Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research
Vol. 40, No. 4, Page 731-750 (2024)

DOI: 10.22092/ijmapr.2023.359502.3406

Reduction of the effects of drought stress in *Thymus vulgaris* L. by using endophytic bacteria (*Agrobacterium deltaense*)

Afsoun Kamyab[1], Davod samsampoor[2*], Navid Ahmadinasab[3] and Abdonnabi Bagheri[4]

1- Plant breeding and biotechnology in Horticultural Products, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
2*- Corresponding author, Horticultural Science Department, Agriculture and Natural Resources College, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, E-mail: samsampoor@hormozgan.ac.ir
3- Hormozgan studies and research center, university of hormozgan, Bandar Abbas, Iran
4- Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

Received: December 2023 Revised: May 2023 Accepted: March 2024

Abstract

Background and objectives: Drought is one of the most important factors limiting the production of crops in the world, which can adversely affect the growth and performance of plants. Bacterial endophytes, as one of the microorganisms symbiotic with plants, play an essential role in improving the growth and performance of their host plants under drought-stress conditions. Considering the problems of water scarcity in Iran, this study was conducted to investigate the effect of the bacterial endophyte Agrobacterium deltaense isolated from the bitter myrtle (*Salvia mirzayanii*) plant on some quantitative and qualitative characteristics of thyme plants under drought stress.

Methodology: The bacterial endophyte was identified using morphological, physiological and molecular methods. Then, the sterilized Thyme seeds were cultivated under standard conditions and transferred to pots after two months. Six months after transplanting the culture to the pot, Thyme plants were inoculated in three stages weekly using *A. deltaense* bacterial endophyte. The bacterial suspension was adjusted in an NB culture medium with a 1 × 108 ml concentration. Then, they were applied as foliar spraying to the aerial parts of the plants and injected into the roots. To ensure the presence of endophytes after one month of foliar spraying to the aerial parts and injection to the roots, the bacterial endophyte establishment test was performed in the plant, and then drought stress was applied for three months, and then the morphological traits, Physiological and biochemical properties of thyme plant were evaluated. A factorial experiment in the form of a randomized complete design was performed in three replications on the research greenhouse of the Horticulture Department of Hormozgan University in 2021. The treatments were determined at four levels of drought stress (0, 25, 50 and 75% of field capacity) and two levels of bacterial inoculation (no inoculation and inoculation with A. deltaense). The assessed traits included: height, fresh and dry weight of stem and root, percentage of electrolyte leakage, chlorophyll a and b, total chlorophyll, carotenoid, prolin, soluble sugar, Total Phenolic Content, Essential Oil Percentage and mycorrhizal dependency.

Results: Drought stress led to significant effects on the reduced performance of garden thyme plants, including decreased stem height, fresh and dry weight of stems and roots, chlorophyll a and b, total chlorophyll, and carotenoids. However, under severe drought stress (75% field

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

capacity), inoculation of garden thyme with the endophytic bacterium A. deltaense resulted in a significant increase in stem height (41.35%), root dry weight (71.85%), root fresh weight (74.35%), stem dry weight (83.22%), stem fresh weight (37%), chlorophyll a (97.15%), chlorophyll b (09.41%), total chlorophyll (77.20%), carotenoids (25%), and caused a significant reduction in electrolyte leakage by 90.5% compared to the control. Furthermore, the presence of the endophytic bacterium A. deltaense, in contrast to its absence under drought stress conditions, led to an increase in proline (17.07%), soluble sugars (15.09%), total phenolics (27.39%), and essential oil percentage (20%), mycorrhizal dependency (84%) compared to the control.

Conclusion: The study's results suggest that beneficial microorganisms, including bacterial endophytes, can be used as a suitable way to increase plant resistance to drought. This potential can be used for sustainable agriculture and reduced slaughter limits in dry and low-water areas. In the case of the use of A. deltaense bacterial endophyte in garden aviation slaughter under dry conditions, improvement in the growth and functioning of plants can be observed, as well as an increase in the percentage of essential oil and phenol content, which is an indicator of their quality and effective therapeutic compounds. This increase not only helps promote plants' medicinal properties but also increases their economic and commercial value.

Keywords: *Thymus vulgaris* L., endophyte, drought tolerance, soluble sugars, biofertilizer.

کاهش اثرهای تنش خشکی با استفاده از اندوفیت باکتریایی (*Agrobacterium deltaense*) در آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)

افسون کامیاب[۱]، داود صمصام‌پور[۲*]، نوید احمدی‌نسب [۳] و عبدالنبی باقری[۴]

۱- دانشجوی دکتری، اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی در محصولات باغی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

پست الکترونیک: samsampoor@hormozgan.ac.ir

۳- استادیار، مرکز مطالعات و تحقیقات هرمزگان، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۴- استادیار، اداره تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۲ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) از گیاهان دارویی و معطر و متعلق به خانواده نعناعیان است. این گیاه دارای خواص ارزشمند دارویی و تغذیه‌ای می‌باشد. خواص دارویی آویشن باغی سبب شده است تا این گیاه از معروف‌ترین گیاهان در دنیا باشد، بنابراین تولید آن نقش مهمی در اقتصاد کشاورزی ایران دارد. تنش‌های محیطی اثر معنی‌داری روی عملکرد و کیفیت گیاهان دارویی دارند. خشکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی و از عوامل محدود کننده تولید محصولات در جهان می‌باشد که می‌تواند اثرهای نامطلوبی روی رشد و عملکرد گیاهان داشته باشد. اندوفیت‌های باکتریایی به‌عنوان یکی از انواع میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاهان، نقش مهمی در بهبود رشد و عملکرد گیاهان میزبان خود در شرایط تنش خشکی دارند. با توجه به مشکلات کم‌آبی در ایران، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر اندوفیت باکتریایی *Agrobacterium deltaense* جدا شده از گیاه مور تلخ (*Salvia mirzayanii*) بر برخی خصوصیات کمّی و کیفی گیاهان آویشن باغی تحت تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا با استفاده از روش‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و مولکولی، اندوفیت باکتریایی شناسایی شد. سپس بذرهای ضدعفونی شده آویشن باغی در شرایط استاندارد کشت گردیدند و پس از دو ماه به گلدان منتقل شدند. پس از طی شش ماه از زمان انتقال کشت به گلدان، در سه مرحله به‌طور هفتگی با استفاده از اندوفیت باکتریایی *A. deltaense*، در گیاهان آویشن باغی تلقیح انجام شد. سوسپانسیون باکتری در محیط کشت NB با غلظت $۱۰^{۸} \times ۱$ میلی‌لیتر تنظیم شد، سپس به‌صورت محلول‌پاشی به اندام‌های هوایی گیاهان و تزریق به ریشه انجام گردید. برای اطمینان از حضور اندوفیت‌ها پس از گذشت یک ماه از محلول‌پاشی، آزمون استقرار اندوفیت باکتریایی در گیاه انجام شد و بعد از آن تنش خشکی به مدت سه ماه اعمال گردید و بعد صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه آویشن باغی ارزیابی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه هرمزگان در سال ۱۴۰۰ انجام شد. تیمارها در چهار سطح تنش خشکی (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه) و دو سطح تلقیح باکتری (عدم تلقیح و تلقیح با *A. deltaense*) تعیین شدند. صفات مورد ارزیابی شامل: ارتفاع، وزن‌تر و خشک ساقه و ریشه، درصد نشت الکترولیت، کلروفیل a و b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پرولین، قندهای محلول، میزان فنول کل و درصد اسانس وابستگی میکوریزایی بودند.

نتایج: تنش خشکی اثرهای معنی‌داری بر کاهش عملکرد گیاه آویشن باغی ازجمله کاهش ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه، کلروفیل a وb، کلروفیل کل و کاروتنوئید داشت. با این حال، تحت تنش خشکی شدید (۷۵٪ ظرفیت زراعی)، تلقیح آویشن باغی با اندوفیت باکتریایی *A. deltaense* باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع (۳۵/۴۱٪)، وزن خشک ریشه (۸۵/۷۱٪)، وزن تر ریشه (۳۵/۷۴٪)، وزن خشک ساقه (۲۲/۸۳)، وزن تر ساقه (۳۷٪)، کلروفیل a (۱۵/۹۷٪)، کلروفیل b (۴۱/۰۹٪)، کلروفیل کل (۲۰/۷۷)،

کاروتنوئیدها (۲۵٪) و سبب کاهش نشت الکترولیت به میزان ۵/۹۰٪ نسبت به شاهد و کاهش اثرهای منفی تنش خشکی گردید. همچنین، حضور اندوفیت باکتریایی *A. deltaense* در برابر عدم حضور آن در شرایط تنش خشکی، منجر به افزایش صفات پرولین (۱۷/۰۷٪)، قندهای محلول (۱۵/۰۹٪)، فنول کل (۲۷/۳۹٪)، درصد اسانس (۲۰٪) و میزان وابستگی میکوریزایی (۸۴٪) نسبت به شاهد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌های مفید ازجمله اندوفیت باکتریایی می‌توانند به‌عنوان راهکاری مناسب برای افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی استفاده شوند. از این ظرفیت می‌توان در جهت کشاورزی پایدار و کاهش محدودیت‌های کشت در مناطقی مانند مناطق خشک و کم‌آب استفاده کرد. در صورت استفاده از اندوفیت باکتریایی *A. deltaense* در کشت آویشن باغی تحت شرایط تنش خشکی، می‌توان بهبود رشد و عملکرد گیاهان، افزایش میزان درصد اسانس و فنول کل که نشانگر کیفیت و ترکیبات مؤثر درمانی آنهاست را مشاهده کرد. این افزایش نه تنها به ارتقاء خواص دارویی گیاهان کمک می‌کند بلکه ارزش اقتصادی و تجاری آنها را نیز افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.)، اندوفیت، تحمل خشکی، قند محلول، کود بیولوژیک.

مقدمه

آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) از خانواده نعناعیان (Labiatae) است که از زمان‌های بسیار قدیم به دلیل خواص بسیار با ارزش سلامتی استفاده می‌شده است، در بین ۲۵۰ تا ۳۵۰ گونه آویشن (Casiglia *et al*., 2019)، گونه *T. vulgaris*، به دلیل اهمیت غذایی و دارویی از دیرباز به‌طور گسترده‌ای در مناطق مختلف جهان استفاده می‌شود (Silva *et al*., 2021). سرشاخه‌های گل‌دار این گیاهان به‌صورت جوشانده یا دم‌کرده به‌عنوان مصارف دارویی ازجمله ضد اسپاسم، ضد نفخ، خلط‌آور و برای درمان سرماخوردگی کاربرد دارند (Abdelshafy Mohamad *et al*., 2020). گونه‌های متفاوت جنس آویشن دارای خواص ضدقارچی، ضدباکتری، ضد اسپاسم، ضد انگل و آنتی‌اکسیدان هستند (Bayoub *et al*., 2010). خواص دارویی آویشن باغی سبب شده است تا این گیاه از معروف‌ترین و متداول‌ترین گیاهان در سراسر دنیا باشد، بنابراین تولید آن نقش مهمی در اقتصاد کشاورزی ایران دارد. عوامل مختلف ازجمله تنش‌های محیطی، سبب تغییر در کیفیت و میزان مواد مؤثره مانند استروئیدها، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، اسانس، رشد و عملکرد گیاهان دارویی می‌شوند (Gharib *et al*., 2014). علاوه بر این، تنش خشکی سبب کاهش رشد و عملکرد در گیاه آویشن باغی می‌شود (Abd Elbar *et al*., 2023) و چالش مهمی است که بهره‌وری گیاهان دارویی و معطر ازجمله آویشن باغی را محدود می‌کند (Askary *et al*., 2018).

خشکسالی عامل اصلی محدودکننده در تولید جهانی محصولات کشاورزی می‌باشد (Haider *et al*., 2017؛ Narayanasamy *et al*., 2023). تغییرات اقلیمی موجب افزایش دوره‌های تنش خشکسالی شده و با کاهش رشد محصول سبب ایجاد خطرات قابل توجهی برای ایمنی غذا می‌شود (Rasheed *et al*., 2023؛ Zhao *et al*., 2023). پیامدهای خشکی بر گیاهان موجب تأثیراتی بر تمام مراحل رشد گیاه، ناهمگونی خاک و دسترسی به عناصر غذایی می‌گردد (Riyazuddin *et al*., 2022؛ Yang & Qin, 2023). کمبود آب منجر به کاهش رشد رویشی و زیست‌توده می‌گردد و درپی آن سبب تغییر و انتقال به مراحل اصلی نمو مثل رشد زایشی می‌گردد (Cooper & Messina, 2023؛ Wang *et al*., 2023). گونه‌های گیاهی در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا در معرض تنش‌های مختلف محیطی هستند که بر رشد و عملکرد آنها تاثیرگذار می‌باشد (Zhao *et al*., 2023). در شرایط تنش، توسعه رشد رویشی و زایشی گیاهان به دلیل استفاده از تمام منابع انرژی گیاهی و پیش‌سازهای متابولیک برای تحمل اثرهای تنش، محدود می‌شود (Kang *et al*., 2017). تنش خشکی با

فرایندهایی مانند غیرفعال کردن آنزیم روبیسکو و بسته شدن روزنه‌ها که منجر به محدودیت انتشار CO_2 در برگ‌ها می‌شود، موجب تغییر در متابولیسم کربن گیاه از طریق سرکوب فرایندهای بیوشیمیایی و فیتوشیمیایی می‌شود (Pandey *et al.*, 2023).

استفاده از میکروارگانیسم‌های القاء کننده رشد گیاهان، راهی مناسب برای توسعه رشد گیاه و مقاوم‌سازی آن در برابر تنش محسوب می‌شود (Khan *et al.*, 2017). اندوفیت‌ها، میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که با ایجاد تغییرات ژنتیکی و فیزیولوژیک در گیاه میزبان خود سبب تحریک رشد و افزایش عملکرد آن در واحد سطح شده و امکان توسعه کشت گیاهان را در اقلیم‌هایی با تنش‌های زیستی و غیر زیستی، انواع خاک‌های خشک و شور فراهم می‌کنند (Zhang *et al.*, 2019). اندوفیت‌های هم‌زیست با گیاهان سبب بهبود رشد گیاه و تحمل در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی می‌شوند، در عوض گیاهان پناهگاهی ایمن برای اندوفیت‌ها فراهم می‌کنند (Golparyan *et al.*, 2018). البته همه گونه‌های گیاهی دارای یک یا چند اندوفیت هستند. اندوفیت‌ها بدون ایجاد علائم بیماری، در بافت‌های گونه‌های مختلف گیاهی ازجمله نعناعیان وجود دارند که دارای ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند (Li *et al.*, 2019). اندوفیت‌های باکتریایی هم‌زیست با گیاهان، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی ایفاء می‌کنند (Acuña-Rodríguez *et al.*, 2020). میکروارگانیسم‌های مفید گیاهی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و برخی ویروس‌ها) به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در فرایندهای زیستی گیاه نقش دارند و سبب مقاومت در برابر تنش‌های غیرزیستی ازجمله خشکی می‌شوند. مثلا اندوفیت‌های قارچی و ویروسی موجب مقاومت در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی می‌شوند (Dastogeer *et al.*, 2020). اندوفیت‌های باکتریایی از طریق تنظیم اسمزی، جذب مواد غذایی، تنظیم هورمون گیاهی، رشد و نمو و سلامت گیاهی را بهبود می‌بخشند (Ullah *et al.*, 2019). تلقیح گیاهان با اندوفیت‌های باکتریایی سبب افزایش تعداد برگ، طول ساقه، ریشه، سرعت جوانه‌زنی، مقدار زیست‌توده خشک و میزان کلروفیل در شرایط تلقیح در مقایسه با شرایط عدم تلقیح گردید (Tufail *et al.*, 2021). اندوفیت‌های باکتریایی از طریق جذب مواد معدنی و ویتامین‌های ضروری به سازگاری، اصلاح مورفولوژی و متابولیسم ریشه کمک کرده، در نتیجه سبب تسهیل رشد گیاه می‌شوند (Dubey *et al.*, 2021). در مطالعات پیشین کیفیت و ارزش اقتصادی محصول در دانه‌های ذرت تیمار شده با اندوفیت‌های باکتریایی افزایش یافت (Saleem *et al.*, 2021). باکتری‌های محرک رشد از گیاهان مختلف جدا شده و پس از خالص‌سازی، غربالگری و شناسایی به‌صورت مایه تلقیح استفاده شده‌اند (Khaskheli *et al.*, 2020). حضور اندوفیت باکتریایی در آویشن باغی سبب افزایش معنی‌دار در میزان فنول و اسانس شد. این تعاملات مثبت ممکن است بهبود کیفیت و خواص دارویی آویشن را تقویت کرده و اهمیت این گیاه را در طب سنتی افزایش دهد (Gupta, 2018).

تلقیح گیاهان با اندوفیت‌های باکتریایی می‌تواند سبب کاهش اثرهای منفی کمبود آب در محصول شده و به‌عنوان یک رویکرد امیدوارکننده و ارزشمند استفاده شود (Głodowska *et al.*, 2017). با عنایت به اینکه کشور ایران در کمربند خشک و نیمه‌خشک جهان واقع شده و با توجه به کاهش میزان بارندگی در سال‌های اخیر، کمبود آب یکی از معضلات کشت گیاهان دارویی می‌باشد. کشت گیاهان دارویی زمانی مقرون به صرفه است که درصد میزان مصرف آب متناسب با درآمد حاصل از فروش این گیاهان باشد. بر این اساس، انتخاب گونه گیاهی مناسب و مدیریت صحیح نهاده‌ها می‌تواند کمک شایانی به صرفه‌جویی در مصرف آب و کمّیت و کیفیت محصول مورد نظر نماید. بنابراین، این مطالعه با هدف کاهش اثر تنش خشکی بر روی خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه آویشن باغی با استفاده از اندوفیت‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی، خالص‌سازی، شناسایی و غربالگری اندوفیت‌های باکتریایی

گیاهان مور تلخ (*Salvia mirzayanii*) از مناطق مختلف استان هرمزگان در زمستان ۱۳۹۹ جمع‌آوری و به آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان منتقل شد. سپس به‌منظور جداسازی و نگهداری سویه‌های اندوفیت باکتریایی، محیط کشت نوترینت آگار (NA) با pH ۷/۲–۷/۴ تهیه شد، سپس برای جداسازی و خالص‌سازی سویه‌ها از تمامی قسمت‌های گیاهان شناسایی شده نمونه‌برداری گردید. برای این منظور، ابتدا نمونه‌ها ضدعفونی و بعد با آب مقطر سه مرتبه شستشو داده شدند، در مرحله بعد هر یک از نمونه‌ها به قطعاتی با ابعاد پنج در پنج میلی‌متر تقسیم شدند. در نهایت قطعات جدا شده با استفاده از لوپ استریل به محیط کشت نوترینت آگار منتقل گردیدند.

برای مهار رشد قارچ‌ها در مراحل جداسازی سویه‌های باکتریایی به محیط کشت ۰/۱٪ نیستاتین اضافه شد. شناسایی مورفولوژیک اندوفیت‌های باکتریایی با استفاده از رنگ و شکل پرگنه‌ها، شناسایی فیزیولوژیک براساس آزمون‌های مختلف تولید آنزیم، تولید هورمون و شناسایی مولکولی از طریق استخراج DNA و PCR انجام شد. برای نگهداری و ذخیره‌سازی طولانی مدت سویه‌های مختلف باکتریایی به ترتیب از یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و فریزر ۸۰– درجه سانتی‌گراد استفاده شد، سپس آزمون تحمل جدایه‌ها به خشکی در شرایط آزمایشگاه انجام گردید (Michel & Kaufmann, 1973).

چگالی نوری (OD) سوسپانسیون باکتری در محیط کشت NB با غلظت ۱×۱۰^{۸} میلی‌لیتر تنظیم شد (Shahzad *et al.*, 2017) و به بذرهای آویشن باغی تهیه شده از فروشگاه بذر ولگار (وانیاسید مدل S45) که ضدعفونی شده بودند تلقیح گردید. برای تلقیح بهتر از ماده کربوکسی متیل سلولاز ۱٪ استفاده شد. بذرهای تلقیح شده در بستر کشت مناسب و ضدعفونی در سینی‌های نشاء کشت گردید و بعد از اندازه‌گیری EC، pH، درصد کربن آلی و درصد اشباع خاک و گذشت دو ماه گیاهان به گلدان‌های اصلی در ابعاد ۲۱×۲۱ منتقل شدند. پس از شش ماه و در مرحله‌ای که گیاهان به حد مناسبی از رشد (۴ شاخه فرعی) رسیدند تیماردهی در دو سطح (عدم تلقیح و تلقیح با *A. deltaense*) به مدت یک ماه و در سه مرحله، به گیاهان و خاک گلدان محلول‌پاشی شد (Tefera & Vidal, 2009).

بعد از یک ماه، برای اطمینان از استقرار اندوفیت‌ها در گیاهان نمونه‌های ریشه، ساقه و برگ گیاهان پس از ضدعفونی، در محیط کشت NA برای رشد اندوفیت باکتریایی قرار داده شد و پس از محرز شدن وجود اندوفیت باکتریایی در گیاه، تنش خشکی در چهار سطح (۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه) و به‌مدت سه ماه روی گیاهان اعمال شد، سپس صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اندازه‌گیری گردید.

آزمون میزان تحمل جدایه‌ها به خشکی

بعد از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌ها به منظور بررسی میزان تحمل جدایه‌ها به سطوح خشکی، از محیط کشت NB حاوی غلظت‌های ۰، ۱۵۲، ۲۲۴ و ۲۸۰ گرم پلی‌اتیلن گلیکول 6000 (PEG) به‌ازای هر لیتر محیط کشت NB استفاده شد. ظرفیت‌های آبی سطوح غلظت‌های ذکرشده به‌ترتیب معادل ۰، ۳–، ۶– و ۹– بار می‌باشد، برای تهیه ظرفیت آب برحسب بار، مقادیر مختلف PEG برحسب گرم در لیتر از طریق رابطه ۱ (Michel & Kaufmann, 1973) محاسبه شد.

رابطه ۱ $QS = (1018\times10\text{-}2)\ C - (1018\times10\text{-}4)\ C2 + (2067\times10^{-4})\ CT + (8039\times10\text{-}7)\ C2T$

QS: ظرفیت اسمزی برحسب بار، T: درجه حرارت (سانتی‌گراد)، C: غلظت PEG برحسب گرم در لیتر

اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری ارتفاع گیاه از طوقه تا آخرین برگ از خط‌کش میلی‌متری و برای اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ استفاده گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک ساقه و ریشه، بعد از توزین وزن تر، اندام‌ها به‌صورت مجزا در پاکت‌های آلومینیومی قرار داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و بعد توزین گردید. برای تعیین درصد نشت الکترولیت از رابطه ۲ استفاده شد (Sairam *et al*., 2002).

$$EC = (EC_1/EC_2) \times 100$$ رابطه ۲

میزان کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با روش اسپکتوفتومتری (مدل Cecil) (CE2501) تعیین شد. قند محلول کل به روش اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Yemm & Willis, 1954). میزان پرولین آزاد در نمونه‌های برگ با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) با استفاده از اسید فسفریک، اسید گلایسیال و ناین‌هیدرین، میزان قندمحلول به روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱)، میزان فنول کل به روش Brand-Williams و همکاران (۱۹۹۵)، میزان درصد اسانس و در نهایت میزان وابستگی میکوریزایی با فرمول زیر محاسبه گردید (Khalil *et al*., 1994).

=وابستگی میکوریزایی

۱۰۰ × (عملکرد گیاه میکوریزایی شده) /(عملکرد گیاه میکوریزایی نشده – عملکرد گیاه میکوریزایی شده)

داده‌های حاصل از پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ تجزیه واریانس شده و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون LSD با سطح احتمال ۵٪ انجام و نمودارها در نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج

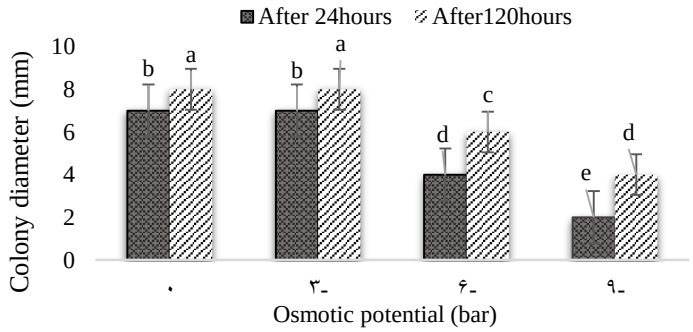
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر ظرفیت اسمزی و مدت زمان در سطح احتمال ۱٪ بر میزان رشد باکتری‌ها معنی‌دار شد، در حالی که اثر متقابل ظرفیت اسمزی× مدت زمان بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت PEG در محیط کشت، رشد باکتری کاهش می‌یابد. اما در بالاترین سطح خشکی (۹- بار) تحت تیمار اندوفیت باکتریایی (*Agrobacterium deltaense*) به رشد خود ادامه داد، در حالی که در غلظت‌های پایین نمک با سرعت بیشتر به حداکثر رشد خود رسید (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پتانسیل اسمزی و مدت زمان بر رشد باکتری *Agrobacterium deltaense*

Table 1. ANOVA of osmotic potential and time duration effects on *Agrobacterium deltaense* growth

S.O.V.	d.f.	M.S.
		Colony diameter
Osmotic potential (O)	3	28.50**
Time duration (T)	1	13.50**
O × T	3	0.50**
Experimental error	16	0.62
C.V. (%)		13.74

**:significant at 1% probability level



شکل ۱- مقایسه میانگین رشد باکتری ***Agrobacterium deltaense*** تحت تأثیر پتانسیل اسمزی × مدت زمان

Figure 1. Means comparison of *Agrobacterium deltaense* growth affected by osmotic potential × time duration

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

صفات مورفولوژیک

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر خشکی و اندوفیت باکتریایی در سطح احتمال ۱٪ بر صفات ارتفاع، وزن تر و خشک ساقه و ریشه معنی‌دار شد، در حالی که اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی در صفات ارتفاع، وزن تر و خشک ساقه در سطح احتمال ۱٪ و در صفت وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها حکایت از افزایش صفات مورفولوژیک در شرایط تنش شدید (۷۵٪ ظرفیت زراعی) تیمارها داشت و نسبت به شاهد بدین شرح بود. وزن تر ساقه (۳۷٪)، وزن خشک ساقه (۲۲/۸۳٪)، وزن تر ریشه (۳۵/۷۴٪)، وزن خشک ریشه (۸۵/۷۱٪) و ارتفاع (۳۵/۴۱٪) بودند (جدول ۳ و شکل ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر خشکی و تلقیح اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***) بر برخی صفات ظاهری آویشن باغی

Table 2. ANOVA of drought and bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation effects on some *Thymus vulgaris* morphological traits

		M.S.				
S.O.V.	**d.f.**	**Plant height**	**Root dry weight**	**Root fresh weight**	**Stem dry weight**	**Stem fresh weight**
Drought (D)	3	303.02**	106.87**	99.59**	162.99**	152.90**
A. deltaense inoculation (A)	1	301.04**	23.34**	26.35**	119.21**	114.36**
D × A	3	9.95**	0.28*	0.50^{ns}	2.87**	3.21**
Experimental error	16	0.70	0.09	0.25	0.01	0.22
C.V. (%)		2.31	5.34	6.09	1.30	3.75

^{ns}, *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

صفات فیزیولوژیک

تعیین درصد نشت الکترولیت: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر خشکی و اندوفیت باکتریایی در سطح احتمال ۱٪ بر این صفت معنی‌دار شد، در حالی که اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، در شرایط تنش شدید (۷۵٪ ظرفیت زراعی)، میزان نشت الکترولیت نیز افزایش یافت اما تلقیح اندوفیت باکتریایی تا حدود زیادی سبب کاهش نشت الکترولیت به میزان (۵/۹۰٪) در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل خشکی × تلقیح اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***) بر برخی صفات ظاهری آویشن باغی

Table 3. Means comparison of drought × bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation interaction on some *Thymus vulgaris* morphological traits

Treatment		Plant height (cm)	Root dry weight (g)	Stem dry weight (g)	Stem fresh weight (g)
Bacterial endophyte inoculation (CFU.mL^{-1})	Drought (%FC)				
Control (no inoculation)	100	40.6^{b}±0.8	10.9^{b}±0.05	12.9^{b}±0.07	17.3^{b}±0.34
	0.75	35.6^{d}±0.57	3.9^{e}±0.07	5.9^{e}±0.01	10.5^{e}±0.31
	0.50	30.8^{f}±0.33	2.4^{g}±0.02	2.9^{g}±0.01	7.9^{f}±0.29
	0.25	24^{g}±0.44	1.7^{h}±0.15	3.2^{h}±0.01	6.3^{g}±0.45
A. deltaense inoculation	100	50^{a}±0.16	12.9^{a}±0.22	16.9^{a}±0.0	21.5^{a}±0.07
	0.75	39.1^{c}±0.16	5.8^{c}±0.02	11^{c}±0.01	15.8^{c}±0.26
	0.50	37.8^{c}±0.57	4.9^{d}±0.14	8.9^{d}±0.14	13.4^{d}±0.08
	0.25	32.5^{e}±0.28	3.2^{f}±0.38	3.9^{f}±0.01	8.7^{f}±0.10

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

CFU: Colony forming units; FC: Field capacity

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر خشکی و اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***) بر برخی صفات فیزیولوژیک آویشن باغی

Table 4. ANOVA of drought and bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation effects on some *Thymus vulgaris* physiological traits

S.O.V.	d.f.	M.S.				
		Ion leakage	Chlorophyll *a*	Chlorophyll *b*	Total chlorophyll	Carotenoids
Drought (D)	3	1748.25**	0.197**	0.40**	0.63**	0.031**
A. deltaense inoculation (A)	1	119.52**	0.001^{ns}	0.03**	0.04^{ns}	0.010**
D × A	3	1.63*	0.04**	0.011**	0.11**	0.009**
Experimental error	16	0.400	0.0031	0.0006	0.0146	0.0001
C.V. (%)		1.82	3.48	2.75	5.18	3.04

ns, *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل خشکی × اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***) بر برخی صفات فیزیولوژیک آویشن باغی

Table 5. Means comparison of drought × bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation interaction on some *Thymus vulgaris* physiological traits

Treatment		Ion leakage (%)	Chlorophyll *a* (mg.g^{-1} FW)	Chlorophyll *b* (mg.g^{-1} FW)	Total chlorophyll (mg.g^{-1} FW)	Carotenoids (mg.g^{-1} FW)
Bacterial endophyte inoculation (CFU.mL^{-1})	Drought (%FC)					
Control (no inoculation)	0	15.2^{g}±0.43	1.63^{c}±0.02	0.86^{e}±01	2.40^{b}±0.02	0.38^{c}±0.003
	0.25	33.3^{e}±0.04	1.36^{e}±0.06	0.57^{h}±0.02	1.83^{d}±0.15	0.25^{e}±0.003
	0.50	45.5^{c}±0.65	1.78^{b}±0.01	1.12^{c}±0.01	2.78^{a}±0.005	0.42^{b}±0.005
	0.75	53.6^{a}±0.01	1.47^{de}±0.02	1.03^{d}±0.01	2.50^{b}±0.02	0.40^{c}±0.005
A. deltaense inoculation	0	10.4^{h}±0.33	1.68^{c}±0.01	1.21b±0.01	2.48^{b}±0.01	0.47^{a}±0.008
	0.25	27.6^{f}±0.18	1.44^{d}±0.04	0.64g±0.005	2^{cd}±0.11	0.34^{d}±0.01
	0.50	41.3^{d}±0.43	1.91^{a}±0.02	1.32a±0.01	2.60^{ab}±0.02	0.49^{a}±0.005
	0.75	50.4^{b}±0.34	1.67^{c}±0.02	0.73f±0.02	2.07^{c}±0.02	0.32^{d}±0.005

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test). CFU: Colony forming units; FC: Field capacity

رنگدانه‌های فتوسنتزی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی در صفات کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها نیز نشان داد، در شرایط تنش شدید (۷۵٪ ظرفیت زراعی)، اندوفیت باکتریایی به‌طور معنی‌داری سبب افزایش کلروفیل a (۱۵/۹۷٪)، کلروفیل b (۴۱/۰۹٪) کلروفیل کل (۲۰/۷۷) و کاروتنوئیدها (۲۵٪) در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۵).

صفات بیوشیمیایی

پرولین و قندهای محلول: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی بر میزان پرولین آزاد برگ و قند محلول در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۶). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، در شرایط تنش شدید (۷۵٪ ظرفیت زراعی)، میزان پرولین و قند محلول در گیاهان تلقیح شده با اندوفیت به‌ترتیب به مقدار (۱۷/۰۷٪) و (۱۵/۰۹٪) در مقایسه با شاهد افزایش یافت (جدول ۷).

فنول کل و درصد اسانس: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر خشکی و اندوفیت باکتریایی در سطح احتمال ۱٪ بر صفات فنول کل و درصد اسانس معنی‌دار شد، در حالی که اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی بر این صفات معنی‌دار نشد (جدول ۶ و شکل ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد، در شرایط تنش شدید (۷۵٪ ظرفیت زراعی)، میزان فنول کل در گیاهان تلقیح شده با اندوفیت به میزان (۲۷/۳۹٪) و درصد اسانس نیز به میزان (۲۰٪) در مقایسه با شاهد افزایش یافت (جدول ۷ و شکل ۴).

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر خشکی و اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***) بر برخی صفات بیوشیمیایی آویشن باغی

Table 6. ANOVA of drought and bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation effects on some *Thymus vulgaris* biochemical traits

S.O.V.	d.f.	M.S.				
		Prolin	Soluble sugar	Total phenolic content	Essential oil	Mycorrhizal dependency
Drought (D)	3	0.0006**	1.75**	0.53**	0.031**	7488**
A. deltaense inoculation (A)	1	0.0005**	1.49**	0.64**	0.015**	150**
D × A	3	0.000**	0.137**	0.008^{ns}	0.001^{ns}	21**
Experimental error	16	0.000	0.002	0.005	0.001	0.75
C.V. (%)		3.18	3.22	3.63	11.76	1.68

ns, *, and **: non-significant, significant at 5, and 1% probability levels, respectively

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل خشکی × اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***) بر برخی صفات بیوشیمیایی آویشن باغی

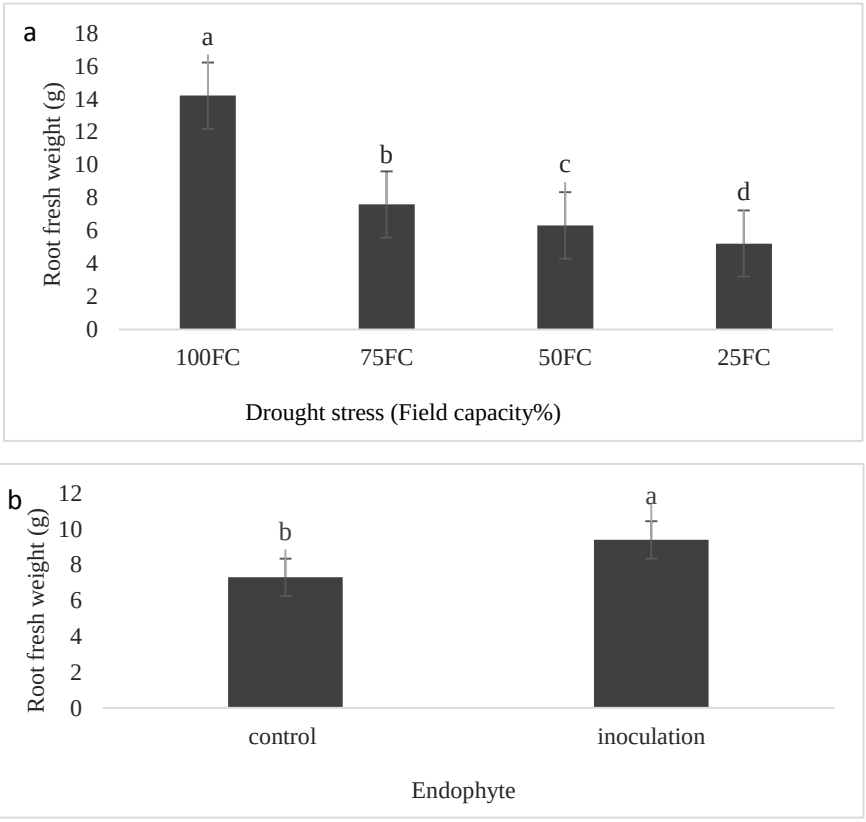
Table 7. Means comparison of drought × bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation interaction on some *Thymus vulgaris* biochemical traits

Treatment		Prolin	Soluble sugar
Bacterial endophyte inoculation (CFU.mL^{-1})	Drought (%FC)	(mg.g^{-1} FW)	(mg.g^{-1} FW)
Control (no inoculation)	0	0.016^{g}±0.0005	0.73^{h}±0.04
	0.25	0.019^{f}±0.0006	0.87^{g}±0.02
	0.50	0.036^{c}±0.0012	1.73^{d}±0.03
	0.75	0.043^{b}±0.0005	2.12^{b}±0.02
A. deltaense Inoculation	0	0.028^{e}±0.0008	1.47^{f}±0.03
	0.25	0.032^{d}±0.0011	1.63^{e}±0.02
	0.50	0.032^{c}±0.0014	1.90^{c}±0.02
	0.75	0.051^{a}±0.0014	2.44^{a}±0.02

In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).
CFU: Colony forming units; FC: Field capacity

میزان وابستگی میکوریزایی

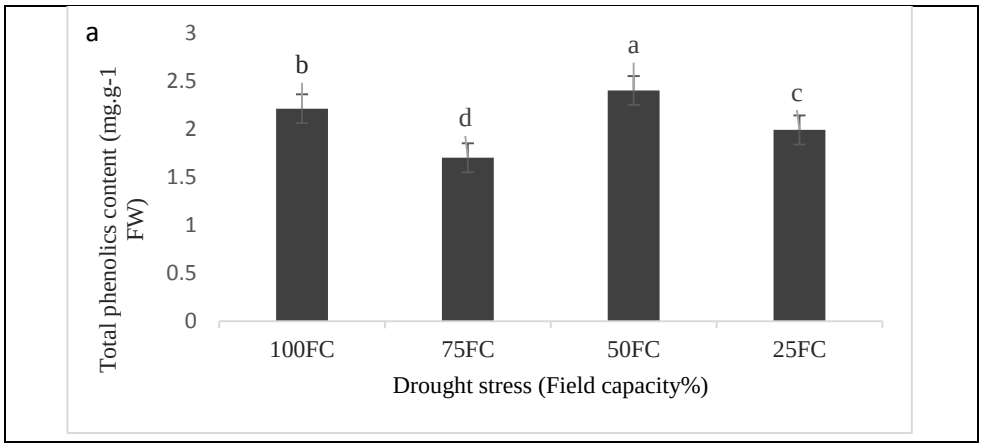
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی بر وابستگی میکوریزایی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۶). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، در شرایط تنش شدید (۷۵٪ ظرفیت مزرعه) و تلقیح اندوفیت، میزان وابستگی در گیاهان آویشن باغی افزایش (۸۴٪) یافت. حداقل میزان وابستگی اندوفیت باکتریایی در عدم تلقیح (شاهد) مشاهده شد (شکل ۵).

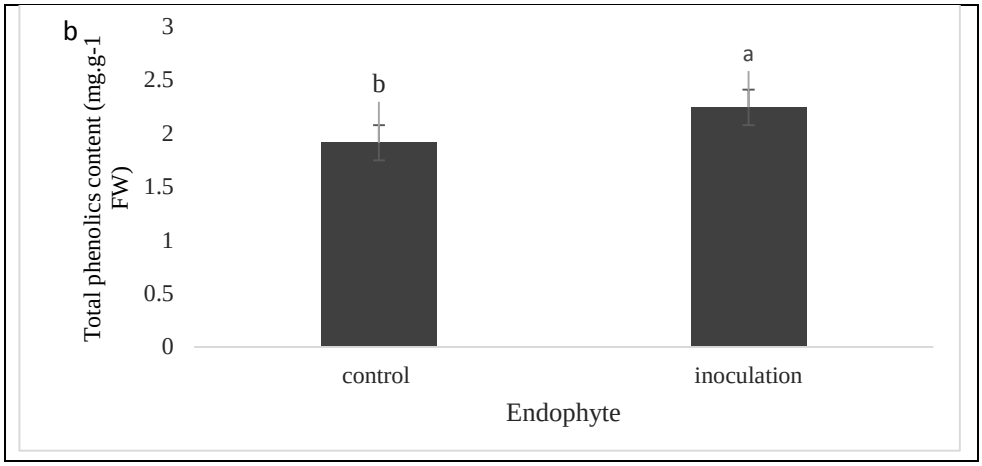


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر خشکی (**a**) وتلقیح اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***)**(b)** بر وزن‌تر ریشه آویشن باغی

Figure 2. Means comparison of drought (a) and bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation (b) on root fresh weight of *Thymus vulgaris*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

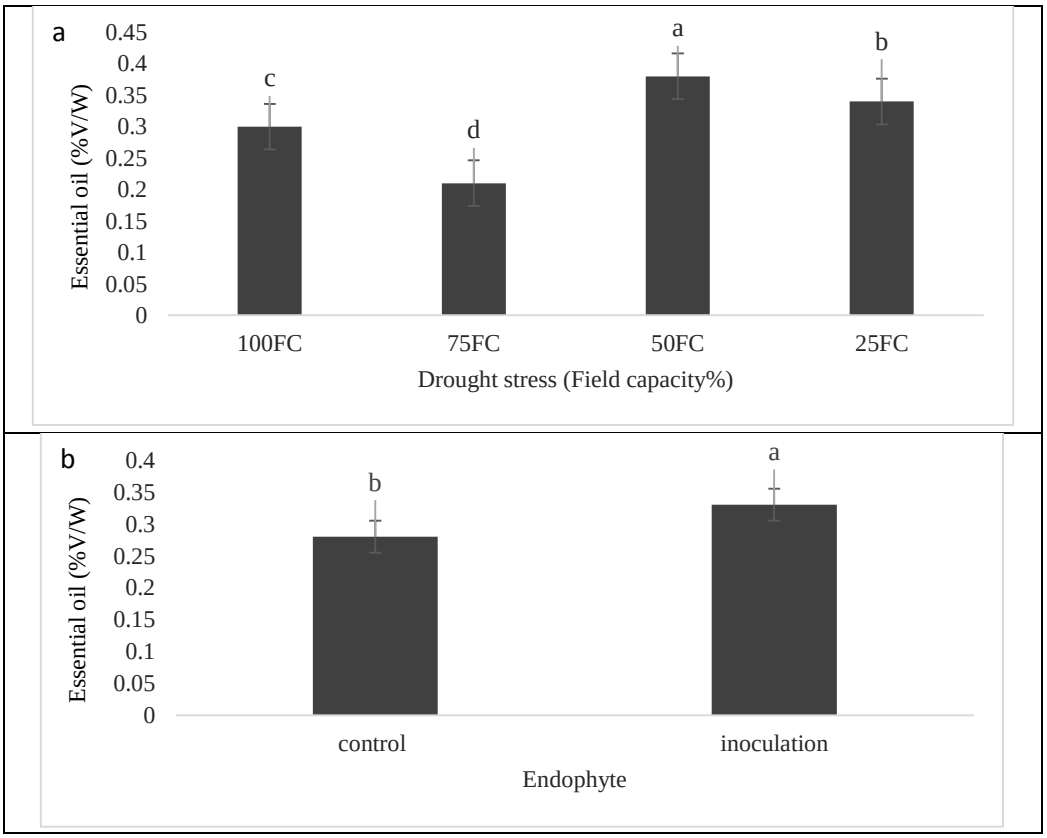




شکل ۳- مقایسه میانگین اثر خشکی (**a**) و تلقیح اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***)(**b**) بر میزان فنول کل آویشن باغی

Figure 3. Means comparison of drought (a) and bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation (b) on total phenolics content of *Thymus vulgaris*

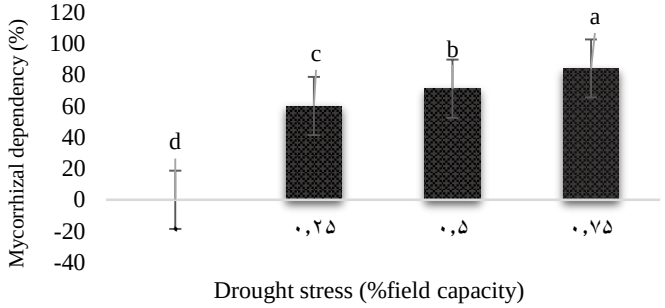
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر خشکی (**a**) و تلقیح اندوفیت باکتریایی (***Agrobacterium deltaense***)(**b**) بر میزان اسانس آویشن باغی

Figure 4. Means comparison of drought (a) and bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation (b) on essential oil content of *Thymus vulgaris*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل خشکی× اندوفیت باکتریایی (*Agrobacterium deltaense*) بر وابستگی میکوریزایی آویشن باغی

Figur 5. Means comparison of drought × bacterial endophyte (*Agrobacterium deltaense*) inoculation interaction on mycorrhizal dependency of *Thymus vulgaris*

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

بحث

در این پژوهش در شرایط عدم اعمال تنش خشکی، کلیه صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان تیمار شده با اندوفیت باکتریایی (*A. deltaense*) نسبت به شاهد افزایش و نشت الکترولیت نیز نسبت به شاهد کاهش یافت. تنش خشکی سبب کاهش صفات مورفولوژیک ازجمله ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه شد. با افزایش شدت تنش عملکرد صفات ذکر شده نیز کاهش یافت اما اندوفیت باکتریایی این کاهش عملکرد را جبران کرد و سبب افزایش آنها در سطوح مختلف تنش خشکی شد. نتایج تحقیقات (Nasr Esfahani, 2013) نشان داد مقدار وزن خشک ساقه، ریشه و وزن خشک کل سه نوع نخود تحت تنش خشکی با۶۰۰۰ PEG به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که علت این کاهش در شاخص‌های رشدی ممکن است به‌دلیل کاهش سرعت فتوسنتز و به دنبال آن بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش سطح برگ در پاسخ به تنش خشکی باشد.

بسیاری از گیاهان توان مقابله با تنش خشکی را ندارند، بنابراین از طریق بکار بردن برخی ترکیبات خارجی مانند اندوفیت‌های باکتریایی می‌توان سبب مقابله با این شرایط در گیاه شد. نقش اندوفیت باکتریایی در ایجاد توانایی مقابله با تنش‌های غیر زیستی اخیراً توسط محققان به اثبات رسیده است (Mateus *et al*., 2019). این اندوفیت‌ها ممکن است در شرایط تنش، تأثیرات مفیدی بر گیاهان داشته باشند. کاهش فشار تورژسانس اولین اثر ناشی از تنش خشکی است (Bhatt & Srinivasa Rao, 2005). با این حال، میکروارگانیسم‌های متحمل به خشکی، به آسانی می‌توانند در شرایط تنش خشکی زنده بمانند که نتایج این تحقیق نیز با یافته‌های دیگر بررسی‌های انجام شده در این راستا همسو می‌باشد (Hartman & Tringe, 2019).

نتایج دیگر مطالعات نشان داد که باکتری‌های ریزوسفر در اطراف ریشه گیاهان تحت تنش خشکی بیشتر بودند تا سبب کاهش اثرهای تنش خشکی شوند. باکتری‌های موجود در خاک تأثیر تنش‌های ناشی از عوامل محیطی متعدد را کاهش می‌دهند، ازجمله این عوامل، تغییرات سریع دما و رطوبت است که منجر به بروز خشکسالی و کاهش دسترسی به مواد مغذی می‌شود (Sarma & Saikia, 2014). یادآوری می‌شود که در میان جنس‌های مختلف (مانند: *Azotobacter*، *Klebsiella*، *Bacillus* و *Pseudomonas*) PGPR، بسیاری از گونه‌های جنس *Pseudomonas* رشد گیاه را حتی در شرایط تنش کم‌آبی تحریک می‌کنند. به همین دلیل، بسیاری از آزمایشگاه‌های علمی به‌دنبال چنین جدایه‌های ارزشمند سازگار با شرایط خشکسالی هستند (Kumar *et al*., 2016).

Sandhya و همکاران (۲۰۱۰) گونه‌های *Pseudomonas* مقاوم به خشکی (مانند: *P. monteilli*،

P. putida، *P. stutzeri* و *P. syringae*) را از ریزوسفر گیاهان زراعی انتخاب کردند. با توجه به اینکه باکتری‌ها از گیاهانی که در محیط‌های کم‌آب و خشک رشد می‌کنند جدا شده بودند، بنابراین ممکن است در افزایش تحمل به خشکی مفید باشند که قابل مقایسه با نتایج ما می‌باشد. دلیل افزایش رشد صفات مورفولوژیک را می‌توان این گونه بیان کرد که بالا رفتن هورمون‌های گیاهی باعث تأثیر مثبت روی رشد و ازدیاد سلول‌های گیاهی به‌ویژه سلول‌های ریشه می‌شود. افزایش رشد و توسعه سیستم ریشه‌ای سبب بهبود روابط آبی گیاهی و جذب بهتر عناصر غذایی و رشد بهتر گیاه می‌شود. در بررسی‌های انجام شده بیشترین تأثیر اندوفیت‌ها بر رشد اندام‌های هوایی و سیستم ریشه‌ای بوده است (Eid *et al*., 2021). پاسخ‌های مشابهی در زمینه رشد گیاه با استفاده از تلقیح اندوفیت‌های باکتریایی در شرایط تنش‌های متعدد غیرزیستی گزارش شده است (Mercado-Blanco & Lugtenberg, 2014).

اندوفیت‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه هورمون‌های اکسین و جیبرلین سبب القای رشد در گیاه میزبان خود می‌شوند (Nanda *et al*., 2019).

در این پژوهش با افزایش شدت تنش خشکی میزان نشت الکترولیت نیز افزایش یافت، اما تیمار اندوفیت باکتریایی سبب کاهش آن در سطوح مختلف تنش خشکی شد. افزایش میزان نشت الکترولیت نشان‌دهنده میزان تراوایی غشاء، تنش و آسیب دیدن غشای سلول می‌باشد. تنش‌های محیطی با ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب کاهش پایداری غشاء و افزایش انتشار مواد سیتوپلاسمی از آن شده، در نتیجه افزایش نشت الکترولیت را موجب می‌شود (Bouremani *et al*., 2023). در این راستا، تحقیقات نشان داد که در سطوح پایین و متوسط تنش، شاخص نشت الکترولیت در گیاه استویا تلقیح‌شده با اندوفیت نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت که افزایش مقاومت غشایی گیاهان تلقیح‌شده در برابر تنش را نشان می‌دهد که دلیل آن می‌تواند تأثیر اندوفیت‌ها باشد که موجب کاهش آسیب به غشای سلولی گیاه شده، درنتیجه نشت یونی را در مقایسه با گیاهان بدون هم‌زیستی در مواجه با تنش، کاهش می‌دهند (Singh *et al*., 2023).

در گیاهان شاهد بدون اعمال تنش خشکی اندوفیت‌های باکتریایی با افزایش تولید کلروفیل، افزایش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و حفاظت از گیاه در برابر تنش خشکی بر آویشن باغی تأثیر مثبت داشت و سبب افزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی شد. با افزایش میزان تنش، مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها کاهش یافت، اما با تلقیح اندوفیت باکتریایی تا حد قابل توجهی این کاهش جبران شد. دلیل این کاهش، آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن از بافت‌ها و سلول‌های گیاه می‌باشد که می‌تواند سبب آسیب‌های اکسیداتیو و تحریک تجزیه پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشای سلولی گیاه شود، در نتیجه سبب تخریب کلروفیل و اکسیداسیون رنگدانه گردد (Lata *et al*., 2018).

اندوفیت‌های تلقیح شده به کلم چینی (*Brassica rapa*) که با پلی اتیلن گلیکول تیمار شده و در معرض تنش خشکی بودند سبب تولید آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و بیان ژن‌های متحمل به خشکی در برگ‌های کلم در طول ۲۴ ساعت شدند (Sun *et al*., 2010). ازجمله فرایندهایی که به‌شدت تحت تنش خشکی قرار می‌گیرد فتوسنتز می‌باشد. خشکی سبب تجزیه اجزای پلی پپتیدی فتوسیستم دو و آسیب به مرکز تولید اکسیژن می‌شود (Chen , 2016).

همچنین اندوفیت‌ها با جذب بهتر آب سبب جذب بهتر عناصر ضروری مانند فسفر، منگنز و آهن شده که در تولید کلروفیل نقش مهمی دارند (Chieb & Gachomo, 2023). گیاهان با انباشت کاروتنوئید سبب فعال‌سازی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی و افزایش عملکرد سازوکار فلورسنس کلروفیل در تنفس نوری و زنجیره انتقال الکترون می‌شوند (Telfer, 2014). در تحقیقات انجام شده توسط محققان تلقیح اندوفیت به دانهال‌های لیمو موجب افزایش میزان انواع کلروفیل و کاروتنوئید تحت شرایط تنش گردید که با نتایج تحقیق ما همسو می‌باشد (Baghazadeh

(Daryaii *et al*., 2023).

با افزایش میزان تنش میزان پرولین نیز افزایش یافت و تیمار اندوفیت باکتریایی نیز سبب افزایش بیشتر پرولین در سطوح مختلف تنش خشکی شد. پرولین تحت تنش کم‌آبی نسبت به سایر اسیدهای آمینه در گیاهان، نسبتاً سریع‌تر افزایش می‌یابد، از این‌رو به‌عنوان پارامتر ارزیابی برای برنامه‌ریزی آبیاری و برای انتخاب واریته‌های مقاوم به خشکی پیشنهاد شده است (Mehrasa *et al*., 2022). در بررسی‌های انجام شده در گیاه بادمجان در شرایط کنترل، میزان پرولین ۵٪، در حالی که در شرایط تنش میزان پرولین ۸۰٪ نسبت به کل آمینواسیدهای موجود بود (Shahbaz *et al*., 2013). چندین مطالعه گزارش کردند که پرولین به‌عنوان منبع کربن، نیتروژن و انرژی در طول بازیابی گیاه در پاسخ به تنش تولید می‌شود (Szabados & Savouré, 2010). پرولین یک اسمولیت سازگار، چند منظوره و آمینو اسید با وزن مولکولی کم است که چندین نقش محافظتی برای سلول‌های تحت تنش دارد. پرولین سبب یکپارچگی غشای پلاسما، سم‌زدایی ROS و تنظیم اسمزی سلول‌ها در پاسخ به تنش و به‌عنوان یک محرک برای تعادل NADP + NADPH/ در طول تنش اسمزی عمل می‌کند (Kavi Kishor *et al*., 2015).

گیاهان تحت تنش پس از تولید پرولین بالا در جهت متعادل کردن میزان آن، از پرولین برای مقابله با خشکی در شرایط تنش استفاده می‌کنند. اما متأسفانه در برخی از ارقام جو حساس به خشکی 'Scarlett' به دلیل علائم پژمردگی برگ‌ها و مرگ زودرس که منجر به کاهش پرولین در شرایط تنش خشکی در جو می‌شد گیاهان نتوانستند از پرولین به‌طور مؤثر استفاده کنند (Sayed *et al*., 2012). بنابراین افزایش پرولین توسط اندوفیت باکتریایی ممکن است تحمل به خشکی را در گیاهان آویشن باغی افزایش دهد. گزارش‌هایی مشابه نتایج تحقیق ما توسط دیگر محققان ارائه شده است که در آنها تولید پرولین در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت (Lastochkina *et al*., 2023).

با افزایش شدت تنش خشکی قند محلول نیز افزایش یافت. قند محلول با حفظ تورژسانس اسمزی در برگ گیاه تحت تنش خشکی به شدت افزایش می‌یابد (Chen *et al*., 2017). همان‌گونه که احتمال می‌رفت، در این تحقیق محتوای قند محلول کل در گیاهان آویشن باغی تحت تنش خشکی به‌طور قابل توجهی افزایش یافت، این موضوع بیان‌گر اینست که اندوفیت‌های باکتریایی به افزایش تجمع قندها برای بهبود تنظیم اسمزی کمک کرده، درنتیجه تنش خشکی را کاهش می‌دهند. نتایج مشابه در گندم و برنج تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است (Chen *et al*., 2017).

البته محتوای قند محلول در گیاه به‌شدت در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت (Sebastiana *et al*., 2018). در گیاهان، قند محلول کل و محتویات پرولین نشان‌گرهای بیوشیمیایی حیاتی در تحمل به تنش‌های غیرزیستی هستند (Sapre *et al*., 2018). تحریک کلی ظرفیت اسمزی توسط سطوح بالای قندهای محلول در سلول از یکسو و درک پاسخ‌های خاص هم‌زیستی اندوفیت‌ها با گیاهان میزبان از سوی دیگر می‌تواند برای کاربردهای کشاورزی بالقوه مفید باشد (Ghabooli, 2014). به‌طور مشابه، سویه‌های باکتریایی مقاوم به خشکی تلقیح شده به ذرت، افزایش بالقوه‌ای در محتوای پرولین و قند محلول نشان دادند (Cohen *et al*., 2015). این اسمولیت‌ها همچنین به کاهش اثرهای تنش اکسیداتیو نیز کمک می‌کنند (Sharma *et al*., 2019). گزارش‌هایی وجود دارد که نقش اندوفیت‌ها در افزایش تجمع قندهای محلول در گیاهان تحت تنش خشکی را نشان می‌دهد که با نتایج تحقیق ما نیز همسو می‌باشد (Eke *et al*., 2019). اندوفیت‌ها به دلیل هم‌زیستی با گیاهان میزبان و محافظت نسبی آنها در برابر تنش‌های محیطی، مانند شوری و خشکسالی در مقایسه با باکتری‌های خاک، مورد توجه خاصی قرار گرفته‌اند (Saeed *et al*., 2021).

اندوفیت‌های تلقیح‌شده به گیاهان ممکن است جذب مواد مغذی، سطوح رنگدانه‌ها، فعالیت فتوسنتزی، رشد ریشه، سیستم آنزیم آنتی‌اکسیدانی گیاهان در معرض خشکی را افزایش دهند. در شرایط خشکی، اندوفیت‌ها با تجمع

قندهای محلول می‌توانند بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش را در میزبان تقویت کرده، حالت متابولیک و اکسیداسیون را متعادل، مسیرهای سیگنالینگ را فعال و بیوسنتز پپتیدها یا متابولیت‌های ثانویه را تحریک کنند (Jayakumar *et al.*, 2020). افزایش غلظت قند محلول در گیاهان سویا که با اندوفیت تلقیح شده بودند نشان می‌دهد که اندوفیت باکتریایی با تجمع قندها برای تنظیم اسمزی بهتر سبب کاهش آسیب ناشی از خشکسالی در گیاه میزبان می‌شوند (Gusain *et al.*, 2015). به‌دلیل تلقیح اندوفیت‌های باکتریایی به گیاه سویا (*Glycine max* (L.) Merr)، این باکتری سبب افزایش میزان قند محلول در شرایط تنش خشکی گردید (Dubey *et al.*, 2021).

با افزایش شدت تنش میزان فنول و درصد اسانس نیز افزایش یافت که تیمار اندوفیت باکتریایی نیز باعث افزایش بیشتر این پارامترها در گیاه گردید. گیاهان در مواجهه با شرایط خشکی، سیستم دفاعی خود را فعال‌تر کرده و مقدار فنول‌ها را افزایش می‌دهند. فنول‌ها به‌عنوان ترکیبات آلی فعال گیاهی با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، گیاهان را در مقابل تنش‌های اکسیداتیو و خشکی حفاظت می‌کنند (Smith *et al.*, 2020). افزایش میزان فنول و درصد اسانس در گیاهان می‌تواند باعث تعادل بهتری در فعالیت روزنه‌ها و کاهش تراکم گیاه در پاسخ به خشکی گردد (Smith *et al.*, 2022). اندوفیت‌ها با تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای سنتز فنول (Johnson *et al.*, 2023) و میزان اسانس (Smith *et al.*, 2023)، با افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در تولید این ترکیبات، سبب مقاومت بیشتر گیاه به تنش خشکی می‌شوند.

افزایش درصد اسانس که مخزن اصلی ترکیبات فعال گیاهی محسوب می‌شود، می‌تواند به‌عنوان یک سیستم آنتی‌اکسیدانی فعال عمل کرده و از آسیب به سلول‌ها جلوگیری کند و با مسیرهای ساخت ترکیبات دارویی، به گیاه این امکان را بدهد که با افزایش تولید ترکیبات مفید و آلی، بهترین پاسخ را به خشکی ارائه دهد (Smith *et al.*, 2023). این تعاملات میان گیاه و اندوفیت‌ها در شرایط خشکی می‌تواند به‌صورت یک سازوکار دفاعی مؤثر علیه تنش‌های محیطی عمل کند و سبب افزایش اسانس در گیاه گردد که با مطالعات ما نیز همسو می‌باشد (Garcia *et al.*, 2024).

در شرایط تنش خشکی و تلقیح اندوفیت، میزان وابستگی میکوریزایی در گیاهان آویشن باغی به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. باکتری *A. deltaense* با تأثیر مثبت خود، موجب افزایش همکاری میکوریزا با گیاه در شرایط تنش خشکی شد که نشان‌دهنده نقش مثبت باکتری در بهبود تعاملات بین گیاه و قارچ میکوریزا در شرایط تنش محیطی است. میکوریزا گونه‌ای از هم‌زیستی گیاهی است که در آن قارچ‌های میکوریزایی با ریشه‌های گیاهان ارتباط برقرار می‌کنند. این ارتباط می‌تواند باعث بهبود جذب مواد غذایی و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی شود. بررسی‌ها نشان داده‌اند که اندوفیت باکتریایی، به‌عنوان یک عامل ارتقاء دهنده میکوریزا، می‌تواند در افزایش وابستگی میکوریزایی در گیاهان نقش مهمی داشته باشد (Alori *et al.*, 2017) که در این پژوهش نیز تأثیر اندوفیت باکتریایی بر افزایش وابستگی میکوریزایی در شرایط تنش خشکی مشهود است.

خشکی فرایند پیچیده‌ای است، زیرا مدت و شدت کمبود آب سبب انجام بسیاری از واکنش‌های شیمیایی می‌شود که از لحاظ بیولوژیکی با هم مرتبط بوده و در محصولات مختلف متفاوت هستند. علاوه بر این، عوامل محیطی در شرایط عادی و تنش با سازوکارهای مختلف به‌دلیل تأثیر بر ویژگی‌های زراعی، پیامدهای متفاوتی را سبب می‌شوند (Liu *et al.*, 2024).

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی باید گفت که استفاده از تلقیح اندوفیت باکتریایی گیاه آویشن باغی باعث افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی، بهبود رشد، جلوگیری از کاهش وزن تر و خشک و افزایش ارتفاع گیاه، کاهش میزان نشت الکترولیت، تعدیل میزان انواع کلروفیل و کاروتنوئیدها و نیز افزایش پرولین و قند محلول و بهبود کنترل فعالیت زیستی

در گیاهان شد. براساس این پژوهش، اندوفیت‌ها دارای ظرفیت بالایی در کاهش تبعات ناشی از خشکی روی دامنه وسیعی از گیاهان بوده و از آن‌جایی که سیستم‌های جدید و پایدار کشاورزی برای تأمین امنیت غذایی فعلی و آینده مورد نیاز است، بنابراین استفاده بهینه از منابع موجود ضروری بوده و کنترل بیولوژیکی به‌طور فزاینده‌ای سبب کاهش اثرهای منفی تنش خشکی بر گیاهان شده و به اقتصاد کشاورزی نیز کمک شایانی نموده است. بنابراین در شرایط کنونی کمبود منابع آبی می‌توان با استفاده از اندوفیت‌های باکتریایی که غیرسمی هستند تأثیر بسیار مطلوبی بر محیط‌زیست، گیاهان و بشر بر جای گذاشت و سبب افزایش تحمل گیاهان به شرایط تنش شد.

References

- Abdelshafy Mohamad, O.A., Ma, J.B., Liu, Y.H., Zhang, D., Hua, S., Bhute, S., Hedlund, B.P., Li, W.J. and Li, L., 2020. Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*. Frontiers in Plant Science, 11: 47.
- Abd Elbar, O.H., Farag, R.E. and Shehata, S.A., 2019. Effect of putrescine application on some growth, biochemical and anatomical characteristics of *Thymus vulgaris* L. under drought stress. Annals of Agricultural Sciences, 64(2): 129-137.
- Acuña-Rodríguez, I.S., Newsham, K.K., Gundel, P.E., Torres-Díaz, C. and Molina-Montenegro, M.A., 2020. Functional roles of microbial symbionts in plant cold tolerance. Ecology Letters, 3(6): 1034-1048.
- Alori, E.T., Glick, B.R. and Babalola, O.O., 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. Frontiers in microbiology, 8: 971.
- Askary, M., Behdani, M.A., Parsa, S., Mahmoodi, S. and Jamialahmadi, M., 2018. Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. Industrial Crops and Products, 111: 336-344.
- Baghazadeh Daryaii, L., Samsampour, D., Bagheri, A. and Sohrabipour, J., 2023. Marine Algal-Derived Endophytic Bacteria: Induced Tolerance to Salinity Stress in Mexican Lime Seedlings. International Journal of Horticultural Science and Technology, 11(1): 1-14.
- Bates, L.S., Waldren, R.A. and Teare, I., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil, 39: 205-207.
- Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A. and Soukri, A., 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. African Journal of Biotechnology, 9(27): 4251-4258.
- Bhatt, R. and Srinivasa Rao, N., 2005. Influence of pod load on response of okra to water stress. Indian journal of plant physiology, 10(1): 54-59.
- Bouremani, N., Cherif-Silini, H., Silini, A., Bouket, A.C., Luptakova, L., Alenezi, F.N., Baranov, O. and Belbahri, L., 2023. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): a rampart against the adverse effects of drought stress. Water, 15(3): 418.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1): 25-30.
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F. and Senatore, F., 2019. Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. Arabian Journal of Chemistry, 12(8): 2704-2712.
- Chen, C., Xin, K., Liu, H., Cheng, J., Shen, X., Wang, Y. and Zhang, L., 2017. Pantoea alhagi, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. Scientific reports, 7(1): 41564.
- Chieb, M. and Gachomo, E.W., 2023. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. BMC Plant Biology, 23(1): 407.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Pontin, M., Berli, F.J., Moreno, D., Boccanlandro, H., Travaglia, C.N. and Piccoli, P.N., 2015. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. Physiologia Plantarum, 153(1): 79-90.
- Cooper, M. and Messina, C.D., 2023. Breeding crops for drought-affected environments and improved climate resilience. The Plant Cell, 35(1): 162-186.
- Dastogeer, K.M.G., Chakraborty, A., Sarker, M.S.A. and Akter, M.A., 2020. Roles of fungal endophytes and viruses in mediating drought stress tolerance in

plants. International Journal of Agriculture and Biology, 24(6): 1497-1512.
- Dubey, A., Saiyam, D., Kumar, A., Hashem, A., Abd-Allah, E.F. and Khan, M.L., 2021. Bacterial root endophytes: Characterization of their competence and plant growth promotion in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought stress. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(3): 931.
- Eid, A.M., Fouda, A., Abdel-Rahman, M.A., Salem, S.S., Elsaied, A., Oelmüller, R., Hijri, M., Bhowmik, A., Elkelish, A. and Hassan, S.E.D., 2021. Harnessing bacterial endophytes for promotion of plant growth and biotechnological applications: an overview. Plants, 10(5): 935.
- Eke, P., Kumar, A., Sahu, K.P., Wakam, L.N., Sheoran, N., Ashajyothi, M., Patel, A. and Fekam, F.B., 2019. Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill.) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Microbiological Research, 228: 126302.
- Garcia, C., Martinez, R. and Lopez, P., 2024. Endophytic microorganisms enhance essential oil production in plants under drought conditions. Journal of Applied Microbiology, 210(3): 432-445.
- Ghabooli, M., 2014. Effect of *Piriformospora indica* inoculation on some physiological traits of barley (*Hordeum vulgare*) under salt stress. Chemistry of natural compounds, 50(6): 1082-1087.
- Gharib, F., Zeid, I.M., Salem, O. and Ahmed, E.Z., 2014. Effects of *Sargassum latifolium* extract on growth, oil content and enzymatic activities of rosemary plants under salinity stress. Life Science Journal, 11(10): 933-945.
- Głodowska, M., Schwinghamer, T., Husk, B. and Smith, D., 2017. Biochar based inoculants improve soybean growth and nodulation. Agricultural Sciences, 8(9): 1048-1064.
- Golparyan, F., Azizi, A. and Soltani, J., 2018. Endophytes of *Lippia citriodora* (Syn. *Aloysia triphylla*) enhance its growth and antioxidant activity. European Journal of Plant Pathology, 152: 759-768.
- Gupta, R., 2018. Impact of Endophytic Bacteria on Phenolic Content and Essential Oil Composition in *Ocimum basilicum* L. Journal of Plant Interactions, 13(1): 132-140.
- Gusain, Y.S., Singh, U. and Sharma, A., 2015. Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology, 14(9): 764-773.
- Haider, M.S., Zhang, C., Kurjogi, M.M., Pervaiz, T., Zheng, T., Zhang, C., Lide, C., Shangguan, L. and Fang, J., 2017. Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis. Scientific reports, 7(1): 13134.
- Hartman, K. and Tringe, S.G., 2019. Interactions between plants and soil shaping the root microbiome under abiotic stress. Biochemical journal, 476(19): 2705-2724.
- Johnson, A., Smith, B. and Davis, D., 2023. Endophytic microorganisms enhance phenolic production in plants under drought conditions. Journal of Plant Interactions, 200(4): 345-360.
- Jayakumar, A., Padmakumar, P., Nair, I.C. and Radhakrishnan, E., 2020. Drought tolerant bacterial endophytes with potential plant probiotic effects from *Ananas comosus*. Biologia, 75(10): 1769-1778.
- Kang, S., Hao, X., Du, T., Tong, L., Su, X., Lu, H., Li, X., Huo, Z., Li, S. and Ding, R., 2017. Improving agricultural water productivity to ensure food security in China under changing environment: From research to practice. Agricultural Water Management, 179: 5-17.
- Kavi Kishor, P.B., Hima Kumari, P., Sunita, M. and Sreenivasulu, N., 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. Frontiers in plant science, 6: 544.
- Khan, A.L., Waqas, M., Asaf, S., Kamran, M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M.A., Kang, S.M., Kim, Y.H. and Yun, B.W., 2017. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. Environmental and Experimental Botany, 133: 58-69.
- Khan, A.L., Waqas, M., Asaf, S., Kamran, M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, M.A., Kang, S.M., Kim, Y.H. and Yun, B.W., 2017. Plant growth-promoting endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 alleviates salinity stress in *Solanum pimpinellifolium*. Environmental and Experimental Botany, 133: 58-69.
- Khalil, S., Loynachan, T.E. and Tabatabai, M.A., 1994. Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. Agronomy journal, 86(6): 949-958.
- Khaskheli, M.A., Wu, L., Chen, G., Chen, L., Hussain, S., Song, D., Liu, S. and Feng, G., 2020. Isolation and characterization of root-associated bacterial endophytes and their biocontrol potential against major fungal phytopathogens of rice (*Oryza sativa* L.). Pathogens, 9(3): 172.
- Kumar, M., Mishra, S., Dixit, V., Kumar, M.,

Agarwal, L., Chauhan, P.S. and Nautiyal, C.S., 2016. Synergistic effect of Pseudomonas putida and Bacillus amyloliquefaciens ameliorates drought stress in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant signaling & behavior, 11(1): 1071004.

- Lastochkina, O., Yakupova, A., Avtushenko, I., Lastochkin, A. and Yuldashev, R., 2023. Effect of Seed Priming with Endophytic Bacillus subtilis on Some Physio-Biochemical Parameters of Two Wheat Varieties Exposed to Drought after Selective Herbicide Application. Plants, 12(8):1724.
- Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K. and White Jr, J.F., 2018. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. Letters in applied microbiology, 66(4): 268-276.
- Li, H., Zhao, Y. and Jiang, X., 2019. Seed soaking with Bacillus sp. strain HX-2 alleviates negative effects of drought stress on maize seedlings. Chilean journal of agricultural research, 79(3): 396-404.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current protocols in food analytical chemistry, 1(1): F4-3.

Liu, H., Li, J. and Singh, B.K., 2024. Harnessing co-evolutionary interactions between plants and Streptomyces to combat drought stress. Nature Plants, *10*(8):1159-1171.

- Mateus, J.R., Marques, J.M., Dal'Rio, I., Vollú, R.E., Coelho, M.R.R. and Seldin, L., 2019. Response of the microbial community associated with sweet potato (*Ipomoea batatas*) to *Bacillus safensis* and *Bacillus velezensis* strains. Antonie Van Leeuwenhoek, 112: 501-512.
- Mehrasa, H., Farnia, A., Kenarsari, M.J. and Nakhjavan, S., 2022. Endophytic bacteria and SA application improve growth, biochemical properties, and nutrient uptake in white beans under drought stress. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 22(3): 3268-3279.
- Mercado-Blanco, J. and JJ Lugtenberg, B., 2014. Biotechnological applications of bacterial endophytes. Current Biotechnology, 3(1): 60-75.
- Michel, B.E. and Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant physiology, 51(5): 914-916.
- Nanda, S., Mohanty, B. and Joshi, R.K., 2019. Endophyte-mediated host stress tolerance as a means for crop improvement. Endophytes and secondary metabolites, 677-701.
- Narayanasamy, S., Thankappan, S., Kumaravel, S., Ragupathi, S. and Uthandi, S., 2023. Complete genome sequence analysis of a plant growth-promoting phylloplane Bacillus altitudinis FD48 offers mechanistic insights into priming drought stress tolerance in rice. Genomics, 115(1): 110550.
- Nasr Esfahani, M., 2013. Effect of dry stress on growth and antioxidant system in three chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Iranian Journal of Plant Biology, 5(15): 111-124.
- Pandey, J., Devadasu, E., Saini, D., Dhokne, K., Marriboina, S., Raghavendra, A.S. and Subramanyam, R., 2023. Reversible changes in structure and function of photosynthetic apparatus of pea (*Pisum sativum*) leaves under drought stress. The Plant Journal, 113(1): 60-74.
- Rasheed, A., Zhao, L., Raza, A., Mahmood, A., Xing, H., Lv, X., Saeed, H., Alqahtani, F.M., Hashem, M. and Hassan, M.U., 2023. Role of Molecular Breeding Tools in Enhancing the Breeding of Drought-Resilient Cotton Genotypes: An Updated Review. Water, 15(7): 1377.
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Singh, K., Verma, R. and Gupta, R., 2022. Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. Plant Cell Reports, 41(3): 519-533.
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F.U., Kučerik, J., Mumtaz, M.Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M. and Naveed, M., 2021. *Rhizosphere bacteria* in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. International Journal of Molecular Sciences, 22(19): 10529.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant science, 163(5): 1037-1046.
- Saleem, M., Nawaz, F., Hussain, M.B. and Ikram, R.M., 2021. Comparative effects of individual and consortia plant growth promoting bacteria on physiological and enzymatic mechanisms to confer drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 21: 3461-3476.
- Sandhya, V., Ali, S.Z., Grover, M., Reddy, G. and Venkateswarlu, B., 2010. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. Plant growth regulation, 62: 21-23.
- Sapre, S., Gontia-Mishra, I. and Tiwari, S., 2018. *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). Microbiological Research, 206: 25-32.
- Sarma, R.K. and Saikia, R., 2014. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. Plant and soil, 377: 111-126.

- Sayed, M.A., Schumann, H., Pillen, K., Naz, A.A. and Léon, J., 2012. AB-QTL analysis reveals new alleles associated to proline accumulation and leaf wilting under drought stress conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC genetics, 13: 1-12.
- Sebastiana, M., da Silva, A.B., Matos, A.R., Alcântara, A., Silvestre, S. and Malhó, R., 2018. Ectomycorrhizal inoculation with Pisolithus tinctorius reduces stress induced by drought in cork oak. Mycorrhiza, 28: 247-258.
- Shahbaz, M., Mushtaq, Z., Andaz, F. and Masood, A., 2013. Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)?. Scientia horticulturae, 164: 507-511.
- Shahzad, R., Khan, A.L., Bilal, S., Waqas, M., Kang, S.M. and Lee, I.J., 2017. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. Environmental and Experimental Botany, 136: 68-77.
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S.K., Sidhu, G.P.S., Bali, A.S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R. and Zheng, B., 2019. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. Biomolecules, 9(7): 285.
- Silva, A.S., Tewari, D., Sureda, A., Suntar, I., Belwal, T., Battino, M., Nabavi, S.M. and Nabavi, S.F., 2021. The evidence of health benefits and food applications of *Thymus vulgaris* L. Trends in Food Science & Technology, 117: 218-227.
- Singh, M., Sharma, J.G. and Giri, B., 2023. Microbial inoculants alter resilience towards drought stress in wheat plants. Plant Growth Regulation, 101(3): 823-843.
- Smith, J., Jones, A. and Brown, C., 2020. The impact of drought on phenolic compounds in *Thymus vulgaris*. Journal of Plant Physiology, 150(3): 265-278.
- Smith, A., Jones, B. and Davis, C., 2022. The role of phenolic compounds in regulating drought resistance in *Thymus vulgaris*. Journal of Plant Physiology, 165(4): 432-445.
- Smith, J., Brown, A. and Davis, C., 2023. The impact of increased essential oil percentage on drought response in *Thymus vulgaris*. Journal of Herbal Medicine, 180(2): 123-136.
- Sun ,C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R. and Lou, B., 2010. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Chinese cabbage* leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. Journal of plant physiology, 167(12): 1009-1017.
- Szabados, L. and Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in plant science, 15(2): 89-97.
- Tefera, T. and Vidal, S., 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 54: 663-669.
- Telfer, A., 2014. Singlet oxygen production by PSII under light stress: mechanism, detection and the protective role of β-carotene. Plant and Cell Physiology, 55(7): 1216-1223.
- Tufail, M.A., Touceda-González, M., Pertot, I. and Ehlers, R.U., 2021. Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5 enhances plant robustness status under the combination of moderate drought and low nitrogen stress in *Zea mays* L. Microorganisms, 9(4): 870.
- Ullah, A., Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., Keerio, A.A., Ihsan, M., Laiq, M., Ullah, S. and Fahad, S., 2019. Drought tolerance improvement in plants: an endophytic bacterial approach. Applied Microbiology and Biotechnology, 103: 7385-7397.
- Wang, Y., Chen, G., Zeng, F., Han, Zh., Qiu, C.W., Zeng, M., Yang, Z., Xu, F., Wu, D., Deng, F., Xu, Sh., Chater, C., Korol, A., Shabala, S., Wu, F., Franks, P., Nevo, E. and Chen, Z.H., 2023. Molecular evidence for adaptive evolution of drought tolerance in wild cereals. New Phytologist, 237(2): 497-514.
- Yang, Z. and Qin, F., 2023. The battle of crops against drought: Genetic dissection and improvement. Journal of Integrative Plant Biology, 65(2): 496-525.
- Yemm, E. and Willis, A., 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. Biochemical journal, 57(3): 508-514.
- Zhang, W., Xie, Z., Zhang, X., Lang, D. and Zhang, X., 2019. Growth-promoting bacteria alleviates drought stress of *G. uralensis* through improving photosynthesis characteristics and water status. Journal of Plant Interactions, 14(1): 580-589 .
- Zhao, X., Yuan, X., Xing, Y., Dao, J., Zhao, D., Li, Y., Li, W. and Wang, Z., 2023. A meta-analysis on morphological, physiological and biochemical responses of plants with PGPR inoculation under drought stress. Plant, Cell & Environment, 46(1): 199-214 .