

بررسی تاثیر رایزوباکتریهای تولید کننده IAA بومی ایران بر روی گندم نان رقم روشن

The effect of IAA-producing rhizobacteria native of Iran on bread wheat Roshan cultivar

مریم مقصودی^۱، فواد فاتحی^{۲*}، آسا ابراهیمی^۱، محمود ملکی^۳

Maryam Maghsoudi¹, Foad Fatehi^{2*}, Asa Ebrahimi¹, Mahmoud Maleki³

۱- گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

1. Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran

3. Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

*Corresponding Author, Email

fatehi.foad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۲۲)

چکیده

واژه‌های کلیدی

در حال حاضر استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه به عنوان جایگزین مناسب برای استفاده از کودهای شیمیایی برای بهبود رشد گندم مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این تحقیق شناسایی بهترین و موثرترین رایزوباکتری‌ها بر روی رشد گندم بود. ابتدا باکتریهای باسیلوس از محیط ریشه گندم جداسازی و قابلیت تولید هورمون اکسین آنها سنجیده شد. سپس گندم نان رقم روشن به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی تحت تأثیر ۸ سویه باکتریایی با بیشترین میزان تولید هورمون IAA در سه غلظت مختلف قرار گرفت. با بررسی صفات مورفولوژیک، بهترین تیمار انتخاب و بیان ژن‌های دخیل در مسیر هورمون اکسین به وسیله تکنیک RT-qPCR مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه ۲۰ سویه باسیلوس از محیط ریزوسفری جدا شدند که به ترتیب کمترین و بیشترین میزان تولید IAA صفر و ۹۵/۸۹ میکروگرم بر لیتر بود. نتایج حاصل از صفات مورفولوژیک نشان داد که در همه صفات سویه C6 با OD₆₀₀ برابر با یک تأثیر مثبت بهتری بر روی رقم روشن گذاشته است. در نتیجه این تیمار برای آنالیز بیان ژن انتخاب شد. نتایج حاصل از آنالیز بیان ژنهای TaTAR2.1 و TaTAR2.4 نشان داد که این ژنها در بخش هوایی تحت تأثیر این سویه و نسبت به شاهد کاهش بیان از خود نشان دادند.

باکتری‌های محرک رشد گیاه،

بیان ژن،

ژنهای TaTAR2.1 و TaTAR2.4،

گندم،

هورمون اکسین

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

At present, the use of plant growth-promoting bacteria has been considered as a suitable alternative to the use of chemical fertilizers to improve wheat growth. The objectives of this study was to identify the best and most effective rhizobacteria on wheat growth. First, *Bacillus* strains were isolated from wheat rhizosphere and their ability to produce IAA was assayed. Then, *Triticum aestivum* (Roshan) plants were treated in a completely randomized design by eight highest IAA-producing bacterial strains at three different bacterial concentrations. By examining morphological traits, the best treatment was selected and the expression of genes involved in the auxin pathway was studied by RT-qPCR technique. Here, twenty *Bacillus* strains were isolated. The amount of IAA production varied among the strains (the minimum and maximum IAA production were 0 and 95.89 $\mu\text{g/ml}$, respectively). Twenty strains were isolated, eight strains with the highest levels of IAA production were selected for applying to the plants. Results of morphological traits demonstrated that strain C6 at concentration 1 ($\text{OD}=1$) had a significantly greater positive effect on Roshan plants. This strain was chosen for genes expression analysis. Analysis of expression of *TaTAR2.1* and *TaTAR2.4* genes showed that these genes have been influenced by strain C6 and they were significantly down-regulated as compared to the control.

Keywords: PGPR, Gene expression, genes *TaTAR2.1* and *TaTAR2.4*, Wheat, Auxin

مقدمه

رایزوباکتری‌های مرتبط با ریزوسفر و تولید کننده اکسین اثرات مفیدی بر روی گیاهان دارند. این هورمون در بسیاری از جنبه‌های کلیدی رشد گیاه و همچنین واکنش‌های دفاعی دخیل است. به طور کلی، اکسین بر تقسیم، توسعه و تمایز سلولهای گیاهی، بر جوانه‌زنی بذرها و غده‌ها، فوتوتروپیسم، ژئوتروپیسم و رشد میوه تأثیر می‌گذارد، ریشه‌های موین، ریشه‌های جانبی و سرعت رشد آوندها را افزایش می‌دهد و فرایندهای رشد رویشی را کنترل می‌کند (Datta and Basu 2000). مطالعات مختلف نشان داده است که علاوه بر گیاهان، باکتری‌ها نیز قادر به تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین هستند (Galledari et al. 2015, Molina et al. 2019, Defez et al. 2018).

در حقیقت، IAA رایزوباکتریایی به عنوان فرم فعال اکسین، توسط سلولهای ریشه جذب می‌شود و همراه با IAA گیاه یک مسیر انتقال سیگنال اکسین را تحریک می‌کند. در نتیجه، IAA باکتریایی سطح و طول ریشه را افزایش می‌دهد و بنابراین دسترسی بیشتر گیاه به مواد مغذی خاک را فراهم می‌کند. IAA باکتریایی همچنین دیواره سلولی گیاه را شل می‌کند و در نتیجه ترشحات ریشه را افزایش می‌دهد و مواد مغذی بیشتری را برای حمایت از رشد رایزوباکتری‌ها فراهم می‌کند (Glick 2012).

یک لایه کوچک و نازک خاک در اطراف ریشه که مستقیماً و از نزدیک تحت تأثیر سیستم ریشه گیاه قرار دارد و از نظر متابولیکی بسیار فعال است، ریزوسفر نامیده می‌شود. این ناحیه به دلیل تجمع انواع ترکیبات آلی که از ریشه ترشح می‌شوند، در مقایسه با خاکهای غیر ریزوسفر سرشار از مواد مغذی است (Chandra et al. 2018). ترشحات ریشه گیاه باعث تغییرات فیزیوشیمیایی در خاک‌های ریزوسفر نسبت به خاکهای غیر ریزوسفر می‌شود. این وضعیت تعداد میکروارگانیسم‌های مفید مانند رایزوباکتریاهای محرک رشد گیاه (PGPR) و تراکم جمعیت در ریزوسفر را افزایش می‌دهد (Van Loon 2007). PGPRs رشد گیاه را به دو روش مستقیم و غیر مستقیم تحریک می‌کند. مکانیسم‌های مستقیم از طریق تولید فیتوهورمون‌ها و مواد فرار باکتریایی، کاهش سطح اتیلن در گیاهان، بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه (آزادسازی فسفات‌ها و عناصر غذایی میکرو از منابع نامحلول و تثبیت نیتروژن) و تحریک مکانیسم‌های مقاومت در برابر بیماریها (مقاومت سیستمیک القا شده) می‌باشد. اثرات غیر مستقیم این است که PGPR مانند عوامل کنترل کننده زیستی عمل می‌کند و بیماری‌ها را کاهش می‌دهد (Lazarovits and Nowak 1997, Maleki et al. 2017).

نوترینت آگار منتقل نموده و با لوپ آن را با دقت پخش کرده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا رشد کنند. پس از ظهور کلونی، کشت‌های مکرر باکتری به منظور حصول تک کلونی انجام شد تا سویه‌های مختلف جنس باسیلوس جداسازی شوند.

اندازه گیری میزان تولید اکسین، روش کمی بررسی تولید IAA:

در این روش ابتدا محیط نوترینت براس حاوی و فاقد mg/ml ۰/۵ تربیتوفان به حجم ۵ ml درون فالکونهای ۵۰ ml تهیه شدند، سپس سویه‌ها تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۵ روز بر روی شیکرانکوباتور با دور 150 rpm رشد داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتریایی در 5000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی به ویال جدید و استریل منتقل گردید. به منظور اندازه‌گیری میزان تولید اکسین، عصاره صاف‌شده هر باکتری با محلول سالکوفسکی با نسبت ۱ به ۴ ترکیب و پس از ۱۵ دقیقه به وسیله اسپکتروفتومتری با طول‌موج ۵۳۱/۸ نانومتر قرائت انجام شد (Sridevi and Mallaiah 2007). با استفاده از نمودار استاندارد مقدار هورمون برحسب $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد (Sridevi and Mallaiah 2007). این آزمایش به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و تمام داده‌ها با استفاده از نرم افزار Excel و SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

شناسایی سویه‌ها به وسیله توالی‌یابی 16S rDNA: ابتدا DNA

ژنومی سویه‌های فعال شده بر روی نوترینت براس بوسیله روش جوشاندن استخراج گردید و سپس با الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری کیفیت و کمیت آن تعیین گردید. با استفاده از ترکیب پرایمری 16F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)، ژن 16S rDNA با استفاده از PCR به صورت زیر تکثیر گردید (Galledari et al. 2015): مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، و سپس ۴۰ چرخه (واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر ۴۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله تکثیر ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه) برای تکثیر ژن مذکور.

مطالعات مختلفی در مورد تأثیر باکتری‌های تولید کننده اکسین بر روی گیاهان انجام شده است. بهترین سویه‌های تولید کننده IAA در تحقیقی، منجر به افزایش زیست توده ریشه و اندام هوایی در گندم و ماش شد (Chandra et al. 2018). تاثیر سویه‌های رایزوباکتریایی تولید کننده IAA بر رشد گیاهچه‌های ذرت نشان داد که سویه R1 به طور معنی‌داری وزن تر و خشک بخش هوایی و ارتفاع ساقه را افزایش داد، در حالی که سویه R3 وزن تر و خشک، تعداد ریشه‌های نابجا و طول ریشه را به میزان قابل توجهی افزایش داد و همه تیمارها با سویه‌های باکتریایی رشد گیاه را نسبت به شاهد افزایش دادند (Lwin et al. 2012).

در حقیقت، رایزوباکتری‌ها می‌توانند با تغییر بیان ژن، رشد و عملکرد گیاه را بهبود بخشند. در نتیجه تیمار برنج با رایزوباکتری‌ها، ۴۹۴ ژن در ریشه افزایش بیان و ۱۰۴۵ ژن کاهش بیان نشان دادند (Agarwal et al. 2019). همچنین، مطالعات دیگر تأثیر رایزوباکتری‌ها را بر سایر ژن‌ها نشان داده‌اند (Ambreetha et al. 2018; EL-Esawi et al. 2018; Calvo et al. 2019; Tiwari et al. 2021).

به دلیل اهمیتی که گندم در رژیم غذایی بشر ایفا می‌کند، توجه محققان زیادی را برای بهبود رشد و عملکرد آن جلب کرده است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سویه‌های تولید کننده IAA بر رشد و بیان برخی از ژن‌های مرتبط با IAA در گندم نان بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی اختصاصی باسیلوس‌ها: برای جداسازی باکتریهای باسیلوس، مقداری خاک از مزارع مختلف گندم برداشت شد و برای جداسازی رایزوباکتری‌ها استفاده گردید. ابتدا یک گرم خاک مزرعه را در لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل حل نموده و سپس محلول حاصل شش برابر رقیق شد. محلولهای رقیق شده، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در آون تحت شوک حرارتی قرار گرفتند تا تمامی فرم‌های رویشی باسیل و فرم‌های غیراسپوری باکتریایی از بین بروند. از محلول حرارت دیده، ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته و به محیط کشت جامد

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از کیت RNX PLUS شرکت سینا ژن و طبق دستورالعمل شرکت مذکور انجام شد. برای حذف آلودگی DNA، از آنزیم DNaseI (شرکت فرمتاز) و طبق دستورالعمل شرکت صورت گرفت. سپس RNAهای استخراج شده طی یک واکنش با حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از دستورالعمل موجود در کیت شرکت فرمتاز به cDNA تبدیل شدند. به این منظور ابتدا ۱ میکرو لیتر آغازگر ۶ نوکلئوتیدی تصادفی (random hexamer) به ۱۱ میکرو لیتر RNA تیمار شده با DNaseI درون ویال اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ویالها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. در مرحله آخر به ترتیب ۴ میکرو لیتر از بافر RT(10X)، ۲ میکرو لیتر dNTP، ۱ میکرو لیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) و ۱ میکرو لیتر آب استریل دو بار تقطیر به ویالها اضافه شد. ویالها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد جهت واکنش ساخت cDNA و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در نهایت cDNA ساخته شده به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

واکنش RT-qPCR: واکنش Real Time PCR با استفاده از cDNAهای سنتز شده، آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای کنترل داخلی به صورت زیر انجام شد: ۵ میکرو لیتر سایر گرین (2X)، ۰/۲۵ میکرو لیتر پرایمر رفت (۱۰ Pmol.µl-1)، ۰/۲۵ میکرو لیتر پرایمر برگشت (۱۰ Pmol.µl-1) و ۱ میکرو لیتر cDNA که با ۳/۵ میکرو لیتر آب مقطر استریل به حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر رسانده شد. بدین منظور از دستگاه Rotor Gene 3000 و کیت SYBR Premix Ex Tag™ II از شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. در واکنش Real Time PCR علاوه بر ژن اصلی و ژن کنترل داخلی، برای اطمینان از آلوده نبودن آغازگرها و یا cDNAهای مورد نظر از یک کنترل منفی (شامل تمامی مواد مورد نیاز برای واکنش جز cDNA) استفاده شد.

بیان ژنهای مورد مطالعه به صورت کمی محاسبه شد. به این منظور CT ژن با استفاده از رسم خط Threshold روی نمودار Quantitative با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene Q محاسبه شد.

محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد مورد تایید قرار گرفت و سپس محصول PCR برای توالی یابی ارسال شد. نتایج توالی یابی نشان داد که باکتریها از جنس باسیلوس و گونه سرئوس بوده و با شماره GI:2025115666 در پایگاه اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) ثبت گردید.

تیمار گلخانه ای: در این آزمایش رقم روشن گندم نان تحت تاثیر غلظت های مختلف سویه های مختلف بومی غربال شده (بیشترین تولیدکننده اکسین) و سویه استاندارد (*Bacillus amyloliquefaciens* fzb42) قرار گرفتند. در این آزمایش سویه های فعال شده، پس از تکثیر در محیط نوترینت براس به مدت ۴۸ ساعت، سانتریفیوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد و سپس با استفاده از محلول هوگلند پلیت باکتریها به حجمی رسانده شدند تا غلظتهایی از باکتری با OD₆₀₀ مختلف ۰/۵ (غلظت A)، ۱ (غلظت B) و ۲ (غلظت C) بدست آیند و سپس تیمار باکتریایی اعمال شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد که در آن فاکتور اول سویه های مختلف رابزوباکتریهای جداسازی شده (در ۸ سطح) و فاکتور دوم غلظت های مختلف سویه ها (چهار سطح) بودند.

پس از انجام آزمایش صفات مورفولوژیک طول ریشه و قسمت هوایی، وزن تر و خشک ریشه و قسمت هوایی و نیز میزان کلروفیل آ، ب، کل و کاروتنوئید اندازه گیری شدند و بر اساس آنها بهترین تیمار مؤثر بر رشد انتخاب و برای بررسی بیان ژنهای دخیل در برهمکنش باکتری-گیاه نمونه گیری از آنها استفاده شد.

بررسی بیان ژنهای دخیل در بیوسنتز اکسین: در این آزمایش یک جفت پرایمر رفت (5'-TGT GTC TGT CGC ATT GAA 3' و برگشت (3'-TGT C-5' ATG TTG CTG ATC AGG AGA) و برای ژن TaTAR2.1 و یک جفت پرایمر رفت (3'-GAT GAC-5' CGG CGT GTC TAG GGA CTC A-3') و برگشت (3'-GAA GTC AAA GAG CCG CCT TGT-5') برای ژن TaTAR2.4 بر اساس مطالعات قبلی انتخاب و استفاده گردیدند (Shao et al. 2017).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سویه در حضور یا عدم حضور تریپتوفان، نشان داد که همه سویه‌های باسیلوس توانایی تولید هورمون IAA را داشتند و تنوع بسیار بالایی از نظر میزان تولید این هورمون در بین تمام سویه‌های باسیلوس مشاهده شد. توانایی تولید هورمون IAA در سویه‌های باسیلوس بین صفر (در عدم حضور تریپتوفان) تا ۹۵/۸۹ (در حضور تریپتوفان) میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. سویه‌های D7, K218, B8, K21, C6, K13, K14 و K114 هشت سویه برتر از نظر تولید هورمون IAA در حضور تریپتوفان بودند که به ترتیب ۹۵/۸۹، ۹۳/۷۴، ۸۱/۲۴، ۷۷/۷۹، ۷۳/۴۸، ۶۵/۲۹، ۶۴/۴۳ و ۶۱/۸۴ میکروگرم بر میلی لیتر هورمون IAA را تولید کردند. کمترین میزان تولید هورمون اکسین هم مربوط به سویه‌های K19 و K220 در شرایط عدم حضور تریپتوفان حاصل شد که به ترتیب صفر و ۰/۶۳ میکروگرم بر میلی لیتر هورمون تولید کردند (شکل ۱).

صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک حاصل از اثر ریزوباکتریها نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌های اثر ریزوباکتریها در غلظتهای مختلف بر روی گیاهچه‌های گندم نان رقم روشن نشان داد که اثر متقابل ریزوباکتری در غلظت آنها در صفات وزن تر بخش هوایی، وزن تر و خشک ریشه حداقل در سطح ۵ درصد معنی دار گردید (جدول ۲). برای صفات طول ساقه، ریشه و کلروفیل ب اثر غلظت ریزوباکتریها در سطح یک درصد معنی دار گردید (جدول ۲) و در مورد سایر صفات اثر ریزوباکتری، غلظت و اثر متقابل آنها معنی دار نشد.

مقایسه میانگین اثر متقابل سویه‌های مختلف باکتری در غلظت‌های متفاوت بر روی رقم روشن

اثر متقابل سویه‌های مختلف باکتری در غلظت‌های متفاوت بر روی رقم روشن اختلاف کاملاً معنی‌داری را در صفات وزن تر بخش هوایی، وزن تر و خشک ریشه نشان داد. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل ریزوباکتری در غلظت برای صفت وزن تر بخش هوایی نشان داد که سویه C6 در غلظت B و سویه استاندارد *B. amyloliquefaciens* fzb42 در غلظت A به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

اعداد CT به‌دست‌آمده به برنامه Excel وارد شدند و میزان بیان آن‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Livak and Schmittgen 2001): مقدار بیان ژن هدف = $2^{-\Delta\Delta CT}$

که $\Delta\Delta CT$ برابر است با: (ΔCT ژن موردنظر در شرایط تیمار - ΔCT ژن موردنظر در شرایط شاهد)

تمامی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک و نیز داده‌های حاصل از ریل تایم qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزارهای XLSTAT (Azzawi et al. 2021) و GraphPad (Kleine et al. 2007) آنالیز شدند.

نتایج و بحث

نتایج تولید اکسین توسط ریزوباکتریها:

از بین تعداد زیادی از سویه‌های باکتریایی که پس از تحمل دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه بر روی محیط کشت نوترینت آگار ظاهر شدند، ۲۰ سویه انتخاب و برای تولید IAA مورد سنجش قرار گرفتند. مقدار IAA تولید شده توسط ریزوباکتریهای مختلف در حضور ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تریپتوفان و نیز عدم حضور تریپتوفان طی ۵ روز با استفاده از داده اسپکتروفتومتری و معادله خطی در سه تکرار بدست آمد. تمام داده‌ها به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سویه‌ها، حضور یا عدم حضور تریپتوفان و نیز اثر متقابل آنها در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس تولید اکسین سویه‌های باکتری در حضور یا عدم حضور تریپتوفان

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه‌ها	۱۹	۱۲۰۱/۳۷***
حضور یا عدم حضور تریپتوفان	۱	۶۰۶۰۳/۴۵***
اثر متقابل	۱۹	۹۱۹/۸۳***
خطا	۸۰	۱۸/۵۶



شکل ۱ - مقایسه میانگین اثر متقابل سویه*وجود و عدم وجود تریپتوفان از نظر صفت میزان تولید هورمون IAA.
 Fig 1. Mean Comparison of interaction of strain * Presence and absence of Tryptophan for IAA production.

جدول ۲- نتایج تجزیه‌ی واریانس صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک. بررسی شده در رقم روشن گندم
 Table 2. Analysis of variance of studied morphological and physiological traits in Roshan cultivar

میانگین مربعات							منابع تغییرات
کلوپیل ب	وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه	وزن تر بخش هوایی	طول ریشه	طول ساقه	درجه آزادی	
۱/۷۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۴۷ ^{ns}	۰/۰۰۸**	۰/۰۰۶*	۴/۳۷۸ ^{ns}	۶/۳۰۹ ^{ns}	۸	باکتری
۱۷/۴۹**	۰/۰۰۰۰۴۹**	۰/۰۰۱۸**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۱۳/۳۰**	۱۰۴/۴۴۸**	۲	غلظت
۱/۳۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱۵*	۰/۰۰۱۵**	۰/۰۰۷**	۳/۱۵۲ ^{ns}	۶/۴۱۵ ^{ns}	۱۶	غلظت*باکتری
۱/۵۲	۰/۰۰۰۰۷۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۲/۶۹۵	۵/۷۱	۵۶	خطا

ns. * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

رایزوباکتری *B. amyloliquefaciens fzb42* استاندارد در غلظت C بیشترین تاثیر را بر روی این صفت نشان داد (جدول ۳).

در مورد صفت وزن خشک ریشه، نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل رایزوباکتری در غلظت نشان داد که سویه‌های K117، D7 و K21 در غلظت A و سویه C6 در غلظت B بیشترین تاثیر مثبت را بر روی وزن خشک ریشه داشتند و سویه D7 در غلظت C به همراه تیمار شاهد کمترین تاثیر را بر روی این صفت داشتند (جدول ۳).
 سویه *B. amyloliquefaciens fzb42* بیشترین تاثیر مثبت بر روی این صفت را در غلظتهای C و A نشان دادند (جدول ۳).

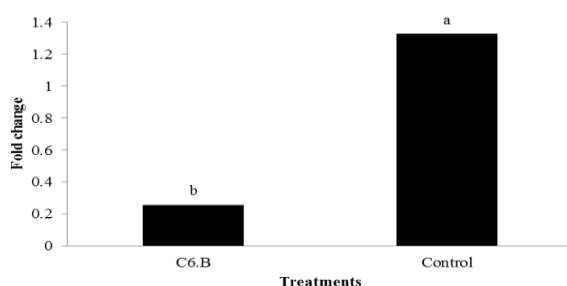
در واقع، سویه *B. amyloliquefaciens fzb42* در غلظت A اثر منفی معنی داری نسبت به شاهد بر روی گیاهچه های گندم داشت و در سایر غلظتها تفاوت معنی داری با بهترین تیمار نداشت (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن برای اثر متقابل باکتری در غلظت باکتری در مورد صفت وزن تر ریشه نشان داد که سویه C6 در غلظت B، به همراه سویه‌های K114 و B8 در غلظت A بیشترین تاثیر مثبت بر روی صفت وزن تر داشتند و سویه *Bacillus amyloliquefaciens fzb42* در غلظت A به همراه تیمار شاهد کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). سویه

جدول ۳ - مقایسه میانگین اثر متقابل رایزوباکتری در غلظت رایزوباکتری برای صفات وزن تر و خشک ریشه و وزن تر ساقه در رقم روشن با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن.

Table 3. Mean comparison of interaction of rhizobacteria * concentration of rhizobacteria for fresh and dry weight of root and fresh weight of shoot in Roshan cultivar using Duncan's multiple range test.

وزن تر ساقه (g)	وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه (g)	تیمارهای مختلف
D7*A	۰/۰۶۷ a	۰/۱۳ cd	
K114*A	۰/۰۷ a	۰/۳۴ a	
K13*A	۰/۰۴۸ ce	۰/۱۶۳ bc	
K21*A	۰/۰۶۵ ac	۰/۱۷۸ bc	
B8*A	۰/۰۵۸ ae	۰/۲۹۳ a	
K218*A	۰/۰۵۸ ae	۰/۱۷۸ b	
K14*A	۰/۰۵ be	۰/۱۲۲ cd	
C6*A	۰/۰۶۳ ad	۰/۱۳۵ cd	
S*A	۰/۰۶ ae	۰/۰۷۸ d	
Control	۰/۰۲۶ f	۰/۱۱۷ cd	
D7*B	۰/۰۵۱ be	۰/۱۱۳ cd	
K114*B	۰/۰۵۱ be	۰/۱۷۰ bc	
K13*B	۰/۰۵۴ ae	۰/۱۲۵ cd	
K21*B	۰/۰۶۲ ad	۰/۱۷۰ bc	
B8*B	۰/۰۵۳ ae	۰/۱۱۸ cd	
K218*B	۰/۰۵۹ ae	۰/۲۱ b	
K14*B	۰/۰۵۶ ae	۰/۱۴ bd	
C6*B	۰/۰۶۵ ac	۰/۳۴۳ a	
S*B	۰/۰۵۲ be	۰/۱۴۸ bd	
D7*C	۰/۰۴۴ e	۰/۱۲ cd	
K114*C	۰/۰۴۹ be	۰/۱۱۲ cd	
K13*C	۰/۰۵۹ ae	۰/۱۷۷ bc	
K21*C	۰/۰۴۸ ce	۰/۱۱۳ cd	
B8*C	۰/۰۵ be	۰/۱۲۲ cd	
K218*C	۰/۰۵۱ be	۰/۱۲۸ cd	
K14*C	۰/۰۵۲ be	۰/۱۳۳ cd	
C6*C	۰/۰۴۶ de	۰/۱۱ cd	
S*C	۰/۰۶۳ ad	۰/۱۶۲ bc	



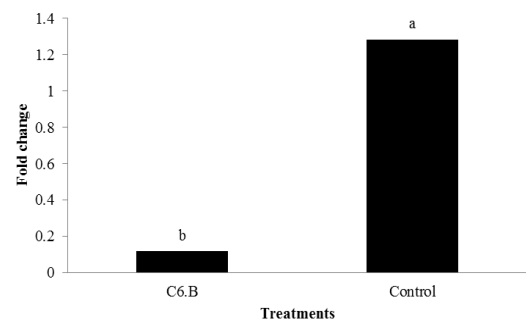
شکل ۲- تغییرات بیان ژن TaTAR2.1 تحت تیمار رایزوباکتری C6 در غلظت B در بافت برگی رقم روشن گندم.

Fig 2. Expression changes of TaTAR2.1 gene under the treatment of C6 at B concentration in leaf tissue in Roshan cultivar

بررسی بیان ژنهای TAR: نتایج آنالیز بیان ژنهای TaTAR2.1 و TaTAR2.4 نشان دادند که بیان هر دو ژن تحت تیمار رایزوباکتری C6 نسبت به شاهد از روند مشابهی برخوردار بوده و کاهش بیان از خود نشان داده‌اند. میزان بیان ژن TaTAR2.1 در تیمار C6 به میزان ۵/۱۶ برابر نسبت به شاهد کاهش بیان نشان داد (شکل ۲). همچنین میزان بیان ژن TaTAR2.4 نیز تحت تیمار C6 نیز به میزان ۱۱/۰۶ برابر نسبت به تیمار شاهد کاهش بیان نشان داد (شکل ۳).

تولید کرد (Sridevi and Mallaiah 2007). در مطالعه‌ای دیگر، ازوتوباکترها طی ۱۵ روز توانستند در حضور ۵ میلی گرم بر میلی لیتر L-تریپتوفان ۳۲ میکروگرم بر میلی لیتر IAA تولید کنند (Ahmad et al. 2005). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که سویه-های باسیلوس از نظر میزان تولید هورمون IAA بسیار متنوع و بین صفر تا ۱۹/۵ میکروگرم بر میلی لیتر IAA تولید کردند (Cherif-Silini et al. 2016). در مطالعه‌ای دیگر، از بین ۵۰ سویه باسیلوس، ۳۹ سویه بدون افزودن تریپتوفان به محیط کشت YPD توانستند IAA تولید کنند. افزودن تریپتوفان باعث افزایش تعداد سویه‌های تولید کننده هورمون IAA شد. بهترین سویه در این مطالعه به میزان ۵۴ میکروگرم بر میلی لیتر IAA تولید کرد (Koua et al. 2020). در مطالعه حاضر نیز بیشترین میزان تولید IAA در حضور تریپتوفان اتفاق افتاد و در غیاب تریپتوفان میزان تولید هورمون IAA به شدت کاهش یافت که این می‌تواند به این معنی باشد که تریپتوفان پیش ماده اصلی بیوسنتز IAA است (Patten and Glick 1996). در این مطالعه تنها یک سویه بدون افزودن تریپتوفان قادر به تولید هورمون IAA نبودند و دو سویه D7 و K114 در طی ۵ روز و در حضور ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تریپتوفان توانستند بیش از ۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر هورمون IAA تولید کنند.

صفات مورفولوژیک: پیش بینی می‌شود جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ بیش از ۹ میلیارد نفر باشد. در نتیجه، فشار بیشتری بر بخش کشاورزی برای تأمین مواد غذایی برای مردم جهان وجود خواهد داشت (Alexandratos and Bruinsma 2012). با توجه به اینکه ممکن است زمین‌های قابل کشت به طور قابل توجهی افزایش پیدا نکند، عملکرد محصولات در واحد سطح باید حفظ و بهبود یابد. بسیاری از محققان به دنبال یافتن ژنهای مفید و انتقال آنها به ارقام مورد نظر از طریق تلاقی یا روشهای مهندسی ژنتیک و ایجاد گیاهان تراریخته به منظور بهبود بازده محصول یا حفظ بازده موجود هستند. اگرچه این روش‌ها می‌توانند در حفظ و حتی بهبود عملکرد محصولات بسیار موثر باشند، با این وجود باید زمان زیادی برای آنها صرف شود تا نتیجه مطلوب حاصل شود. همچنین نگرانی‌هایی در مورد ایمنی زیستی گیاهان تراریخته وجود دارد، به طوری که برخی از کشورها هنوز در مورد پذیرش



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *TaTAR2.4* تحت تیمار رایزوباکتری C6 در غلظت B در بافت برگي رقم روشن گندم

Fig 3. Expression changes of *TaTAR2.4* gene under the treatment of C6 at B concentration in leaf tissue in Roshan cultivar

شناسایی و انتخاب باکتریهای باسیلوس: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که توانایی تولید هورمون IAA توسط سویه‌های مختلف باکتریایی بسیار متفاوت است. مشابه یافته‌های این تحقیق، برخی از محققین نیز گزارش داده‌اند که تولید IAA توسط گونه‌های مختلف باکتریایی و یا سویه‌های یک گونه می‌تواند بسیار متفاوت باشد (Mansour et al. 1994, Zahir et al. 2000). تفاوت در تولید IAA در میان سویه‌های باکتریایی را می‌توان به مسیرهای مختلف بیوسنتز، محل ژن‌های درگیر، توالی‌های تنظیمی و وجود آنزیم‌هایی برای تبدیل IAA آزاد به فرم‌های ترکیبی نسبت داد (Patten and Glick 1996). در برخی مطالعات همه سویه‌ها قابلیت تولید IAA را داشته‌اند (Ashraf et al. 2011, Galledari et al. 2015) و در برخی مطالعات دیگر تنها برخی از سویه‌ها توانایی تولید این هورمون را داشته‌اند (Chaiharan and Lumyong 2011). در مطالعه حاضر نیز تمامی سویه‌ها توانایی تولید هورمون IAA را داشتند.

تولید IAA توسط باکتریهای جدا شده از ریزوسفر محصولات مختلف مثل گندم (Çakmakçı et al. 2007, Abbasi et al. 2011)، ارزن مرواریدی (Hameeda et al. 2006)، گندم، ذرت و برنج (Hafeez et al. 2006)، بادام زمینی (Dey et al. 2004)، برنج (Yasmin et al. 2004) و گیاهان مختلف (Galledari et al. 2015) گزارش شده است.

سویه‌های ریزوبیوم در حضور ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تریپتوفان طی ۳ روز ۶ میکروگرم بر میلی لیتر هورمون IAA

گیاهان تراریخته تردیدهای جدی دارند. یکی از روشهایی که دوستدار محیط زیست قلمداد می شود و می تواند بدون تغییر ژنوم گیاه زراعی، عملکرد محصول را بهبود بخشد، استفاده از باکتریهای محرک رشد گیاه است. در این روش، با استفاده از میکروارگانیسم هایی که به طور طبیعی در محیط ریزوسفر ریشه گیاه وجود دارند، تغییراتی در بیان ژن های زراعی ایجاد می شود که می تواند عملکرد محصول را بهبود بخشد.

PGPR به طور مستقیم و غیر مستقیم از طریق تولید فیتوهورمونها مانند هورمون اکسین، کاهش سطح اتیلن در گیاه، بهبود وضعیت تغذیه گیاه مانند افزایش محلول شدن فسفاتهای نامحلول در خاک و نیز جلوگیری از بیماریها، رشد گیاه را تقویت و تحریک می کند (Jacobsen 1997, Lazarovits and Nowak 1997). باسیلوس ها در میان باکتریها به عنوان باکتریهای محرک رشد گیاه، توجه ویژه ای را به خود جلب کرده اند. به دلیل اهمیت این باکتریها، بسیاری از باکتریهای باسیلوس از محیط ریزوسفر گیاهان مختلف جدا و اثر آنها بر روی گیاهان مختلف بررسی شده اند.

از طرفی IAA، به عنوان مهمترین اکسین، در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی مانند بزرگ شدن و تقسیم سلول، تمایز بافتی و پاسخ به نور و گرانش نقش دارد. باکتریهای تولید کننده اکسین که در محیط ریزوسفر هستند، با تولید این هورمون قادرند بر فرآیندهای فوق در گیاهان تأثیر بگذارند (Spaepen et al. 2007). برخی سویه های باکتری باسیلوس که بیشترین میزان تولید هورمون IAA را از خود نشان دادند، بیشترین تأثیر را بر روی صفات مورفولوژیک گیاه گذاشتند. به همین دلیل پیشنهاد شد که بالاترین میزان تولید IAA ممکن است در افزایش رشد گیاهان گوجه فرنگی نقش داشته باشد (Kalam et al. 2020). در مطالعه دیگری، گونه های مختلفی از جنس باسیلوس که توانایی تولید ایندول استیک اسید (IAA)، حل کنندگی فسفات نامحلول، تولید سیدروفور، تولید آمونیاک و تثبیت نیتروژن را داشتند، باعث بهبود سرعت جوانه زنی، شاخص قدرت گیاهچه و طیف وسیعی از پارامترهای رشد در *L. esculentum* در مقایسه با گیاهان شاهد شدند (Shah et al. 2020).

نقش اکسین در تحریک رشد ریشه نیز فرایند شناخته شده ای است (Spaepen et al. 2007). در گندم افزایش توده ریشه ناشی از تیمار باکتریایی، به سطح بالای اکسین نسبت داده شدند (Kudoyarova et al. 2017). از طرفی تلقیح میکروبی *Bacillus megaterium* و *Bacillus mucilaginous* در گیاه ذرت نه تنها رشد گیاه را افزایش داد، بلکه به خاطر افزایش رشد ریشه باعث بهبود جذب غذایی گیاه نیز شد (Wu et al. 2005). همچنین استفاده از PGPR باعث افزایش وزن خشک ریشه و بخش هوایی (SDW) در گیاهان پنبه و نخود شد (Egamberdiyeva and Höflich 2004). یک سری آزمایشات نیز با تلقیح ریزوبیال گندم انجام شده است که باعث افزایش طول ریشه (به میزان ۲۰ درصد)، وزن خشک ریشه (به میزان ۱۳ درصد)، افزایش طول ساقه (به میزان ۳۸ درصد) و وزن خشک بخش هوایی (به میزان ۳۶ درصد) گردید (Zahir et al. 2000). تلقیح بذر جو با PGPR مختلف نیز باعث افزایش وزن ریشه به میزان ۸/۹ تا ۱۶/۷ درصد و وزن ساقه به میزان ۲۸/۶ تا ۳۴/۷ درصد بیش از شاهد شد (Canbolat et al. 2006). سویه *P. fluorescens* وزن ریشه را در گندم به میزان ۱۹-۴۳ درصد، تعداد پنجه در بوته ۱۰-۲۱ درصد، عملکرد دانه ۱۵-۴۳ درصد و عملکرد کاه به میزان ۲۲-۳۹ درصد نسبت به شاهد افزایش داد (Shaharoon et al. 2008). در مطالعه حاضر نیز، شش سویه که برای ارزیابی اثرات خود بر رشد گندم انتخاب شده اند، بالاترین توانایی تولید IAA را داشتند. نتایج نشان داد که در صفت طول ساقه تنها سویه های D7، K13، K21، B8، K218 و C6 در OD برابر با یک نسبت به شاهد باعث افزایش معنی دار این صفت بین ۲۰/۲۶ تا ۲۸/۷۱ درصد گردید و در سایر تیمارها تفاوت معنی داری با تیمار شاهد وجود نداشت. اما در مورد صفات وزن تر بخش هوایی و ریشه، سویه C6 در OD برابر یک توانست به ترتیب ۵۶/۶۵ و ۱۹۳/۱۶ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد. همچنین در مورد وزن خشک ریشه این سویه توانست در OD برابر ۰/۵، یک و دو به ترتیب ۱۴۵/۶۸، ۱۵۲/۱۵ و ۷۹/۷۴ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد. لازم به ذکر است که تقریباً در اکثر صفات مورد مطالعه اثرات مثبت رایزوباکتریهای مورد مطالعه نسبت به سویه استاندارد بیشتر بود.

بیان ژنها: گزارش شده است که PGPR ها رشد رویشی و به طور کلی عملکرد را در گیاهان مختلف از جمله گندم بهبود می بخشد (Shaharoon et al. 2008, Abbasi et al. 2011)، اگرچه مکانیسم های دقیق مولکولی این تغییرات هنوز مشخص نیست (Agarwal et al. 2019). مطالعات مختلفی نشان می دهند که اکسین تولید شده توسط رایزوباکتریها از طریق تغییر در بیان ژنها در بهبود رشد گیاه بویژه رشد ریشه به شدت دخیل است. تاثیر هورمون IAA حاصل از باکتری *Bacillus altitudinis* بر روی ریشه برنج به دلیل تغییر در سطح بیان خانواده ژن های AUX/IAA است (Ambreetha et al. 2018). همچنین مشخص شده است که بیان ژن *OsIAA1* به عنوان اولین عضو از خانواده AUX/IAA به شدت توسط هورمون IAA القا می شود (Thakur et al. 2005). از طرفی نقش تعداد زیادی از ژنها در پاسخ ریشه های برنج به تیمار با PGPR ها مشخص شده است (Agarwal et al. 2019). شناسایی تعداد زیادی از ژنها نشان می دهد که PGPR ها اثرات گسترده خود بر رشد گیاه را از طریق تغییرات قابل توجهی در ترنسکریپتوم عملی می کنند.

اکسین ها برای وقایع مختلف رشد بسیار مهم هستند (Ludwig-Müller 2011) و ایندول-۳-استیک اسید (IAA) بهترین اکسین فعال طبیعی است که تا کنون مورد مطالعه قرار گرفته است (Zhao 2010). در گیاهان، دو مسیر برای بیوسنتز IAA وجود دارد: مسیرهای مستقل از تریپتوفان (Trp) و وابسته به تریپتوفان (Woodward and Bartel 2005). مسیر ایندول-۳-پیرویک اسید (indole-3-pyruvic acid (IPA)) اصلی ترین مسیر بیوسنتز IAA به عنوان مسیر وابسته به تریپتوفان است (Mashiguchi et al. 2011). در مرحله اولیه این مسیر، تریپتوفان توسط تریپتوفان آمینوترانسفراز آرابیدوپسیس ۱ (Trp Aminotransferase of Arabidopsis1 (TAA1)) و پروتئین های مرتبط با آن (TAA1-Related1 (TAR1)) و TAR2 به IPA تبدیل می شود. متعاقباً، مونوکسیژنازهای حاوی فلاوین رمزگذاری شده توسط اعضای خانواده ژنی (YUCCA (YUC)) تبدیل IPA به IAA را کاتالیز می کنند (Zhao 2012). اعضای هر دو خانواده TAA1/TAR و YUC نقش مهمی در رشد گیاه دارند.

در یک مطالعه، بیان ژنهای *TaTAR2* در اندام های مختلف گیاهان گندم در ۱۴ روز پس از گلدهی در شرایط مزرعه با استفاده از qRT-PCR بررسی شدند. نتایج نشان داد که *TaTAR2.1* در کلیه بافت های مورد بررسی، از جمله ریشه ها، ساقه ها، برگ ها، سنبله ها و دانه ها بیان می شود. علاوه بر این، فراوانی رونوشت *TaTAR2.1* در ریشه در مقایسه با سایر بافت ها بسیار بیشتر بود. میزان بیان *TaTAR2.2* در اکثر اندام های مورد بررسی، به ویژه ریشه، بسیار پایین تر از *TaTAR2.1* بود. بیان ژن *TaTAR2.3* در خوشه ها و دانه ها نسبت به اندام های دیگر نسبتاً بالاتر بود. بیان ژن *TaTAR2.4* نیز در مقایسه با ژنهای دیگر *TaTAR2* بویژه در بافت برگ در سطوح پایین تری بیان شد. ژن *TaTAR2.5* نیز عمدتاً در قسمتهای هوایی بیان شد (Shao et al. 2017).

همچنین پاسخ ژن *TaTAR2* به تیمار کم نیتروژن (N) تحت کشت هیدروپونیک در مرحله گیاهچه ای گندم نشان داد که تیمار کم N به طور قابل توجهی میزان بیان *TaTAR2.1*، *TaTAR2.3*، *TaTAR2.4* و *TaTAR2.5* را در ریشه ها در مقایسه با تیمار بالا N افزایش می دهد، با این حال، در بخش هوایی، تیمار کم نیتروژن، بیان *TaTAR2.2* و *TaTAR2.4* را کاهش داد و هیچ تأثیر آشکاری بر بیان *TaTAR2.1*، *TaTAR2.3* و *TaTAR2.5* نداشت (Shao et al. 2017).

در مطالعه حاضر نیز، بیان ژنهای *TaTAR2.1* و *TaTAR2.4* در بافت برگ و تحت تیمار با باکتری C6 نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد که تا حدودی مشابه با نتایج Shao و همکاران (۲۰۰۷) بود که نشان داده بودند میزان بیان این ژنها در شرایط نرمال و نیز کمبود نیتروژن در ریشه ها بسیار بالاتر از سایر بافتها از جمله بافت برگ گندم هستند.

در این مطالعه اثر ۸ سویه رایزوباکتری بر روی رشد گیاهچه های گندم بررسی شد و مشخص شد که سویه های تولید کننده اکسین می توانند اثرات مثبتی بر روی رشد بخشهای هوایی و بویژه ریشه داشته باشند. همچنین این مطالعه نشان داد که تاثیر رایزوباکتریهای تولید کننده اکسین بر روی صفات ریشه بویژه وزن تر و خشک ریشه بیشتر از بخش هوایی بود. در این مطالعه برای اولین بار نقش ژنهای *TaTAR2.1* و *TaTAR2.4* در برهمکنش بین گیاه-

TaTAR2.1 و *TaTAR2.4* در برگ به تیمار باکتری C6 واکنش داده و از این طریق تعادلی در میزان بیوستز هورمون اکسین در بخش هوایی و ریشه ایجاد کرده است.

رایزوباکتری بررسی شد. درواقع، رایزوباکتریهای تولید کننده اکسین از طریق تغییر در بیان ژنهای مختلف بویژه ژنهای مرتبط با هورمون اکسین بر روی رشد گیاهچه گندم بویژه رشد ریشه تاثیر می گذارند. به نظر می رسد گیاهچه های گندم با کاهش بیان ژنهای

منابع

Abbasi M, Sharif S, Kazmi M, Sultan T, Aslam M. 2011.

Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems* 145:159-168.

Agarwal P, Singh PC, Chaudhry V, Shirke PA, Chakrabarty

D, Farooqui A, Nautiyal CS, Sane AP, Sane VA. 2019. PGPR-induced OsASR6 improves plant growth and yield by altering root auxin sensitivity and the xylem structure in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 240:153010.

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 29:29-34.

Alexandratos N, Bruinsma J. 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. *Global Perspective Studies Team*. ESA Working Paper No.12-03. Food and Agricultural Organization of the United Nations.

Ambreetha S, Chinnadurai C, Marimuthu P, Balachandar D. 2018. Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. *Rhizosphere* 5:57-66.

Ashraf MA, Rasool M, Mirza MS. 2011. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Advances Biological Research* 5:348-355.

Azzawi WA, Gill MB, Fatehi F, Zhou M, Acuña T, Shabala L, Yu M, Shabala S. 2021. Effects of Potassium Availability on Growth and Development of Barley Cultivars. *Agronomy* 11(11): 2269

Çakmakçı R, Erat M, Erdoğan Ü, Dönmez MF. 2007. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 288-295.

Calvo P, Zebelo S, McNear D, Kloepper J, Fadamiro H. 2019. Plant growth-promoting rhizobacteria induce changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression of nitrate and ammonium uptake genes. *Journal of Plant Interactions* 14: 224-231.

Canbolat MY, Bilen S, Çakmakçı R, Şahin F, Aydın A. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil

properties and rhizosphere microflora. *Biology and fertility of soils* 42: 350-357.

Chaihar M, Lumyong S. 2011. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth. *Current microbiology* 62: 173-181.

Chandra S, Askari K, Kumari M. 2018. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 16: 581-586.

Cherif-Silini H, Silini A, Yahiaoui B, Ouzari I, Boudabous A. 2016. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology* 66: 1087-1097.

Datta C, Basu P. 2000. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. *Microbiological research* 155: 123-127.

Defez R, Andreozzi A, Romano S, Pocsfalvi G, Fiume I, Esposito R, Angelini C, Bianco C. 2019. Bacterial IAA-delivery into medicago root nodules triggers a balanced stimulation of C and N metabolism leading to a biomass increase. *Microorganisms* 7: 403.

Dey R, Pal K, Bhatt D, Chauhan S. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological research* 159: 371-394.

Egamberdiyeva D, Höflich G. 2004. Effect of plant growth-promoting bacteria on growth and nutrient uptake of cotton and pea in a semi-arid region of Uzbekistan. *Journal of Arid Environments* 56: 293-301.

El-Esawi MA, Alaraidh IA, Alsahli AA, Alzahrani SM, Ali HM, Alayafi AA, Ahmad M. 2018. *Serratia liquefaciens* KM4 improves salt stress tolerance in maize by regulating redox potential, ion homeostasis, leaf gas exchange and stress-related gene expression. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 3310.

Galledari N, Maleki M, Shakeri S, Baghizadeh A. 2015. Investigation of genetic diversity and molecular identification of IAA producing bacteria using RAPD marker and 16S rDNA sequence analysis. *G3M* 13: 4054-4061.

Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012.

Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D, Renseigné N, Zafar Y, Malik KA. 2006. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development* 26: 143-150.

- Hameeda B, Rupela O, Reddy G, Satyavani K. 2006.** Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 43: 221-227.
- Jacobsen CS. 1997.** Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) cepacia DBO1 (pRO101) in 2, 4-D contaminated soil. *Plant and Soil* 189: 139-144.
- Kalam S, Basu A, Podile AR. 2020.** Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon* 6: e04734.
- Kleine T, Kindgren P, Benedict C, Hendrickson L, Strand A. 2007.** Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for CRYPTOCHROME1 in the response of *Arabidopsis* to high irradiance. *Plant Physiology* 144(3): 1391-1406.
- Koua SH, N'golo DC, Alloue-Boraud WM, Konan F, Dje KM. 2020.** *Bacillus subtilis* strains isolated from cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) rhizosphere for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria in Cote d'Ivoire. *Current Microbiology* 77: 2258-2264.
- Kudoyarova GR, Vysotskaya LB, Arkhipova TN, Kuzmina LY, Galimsyanova NF, Sidorova LV, Gabbasova IM, Melentiev AI, Veselov SY. 2017.** Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soilphosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 1-8.
- Lazarovits G, Nowak J. 1997.** Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32: 188-192.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Ludwig-Müller J. 2011.** Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 1757-1773.
- Lwin KM, Myint MM, Tar T, Aung WZM. 2012.** Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal* 16: 137-144.
- Maleki M, Norouzpour S, Rezvannejad E, Shakeri S. 2017.** Novel strains of *Bacillus cereus* Wah1 and *Enterobacter cloacae* Wkh with high potential for production of siderophores. *Biological Journal of Microorganisms* 6: 1-11.
- Mansour F, Aldesuquy H, Hamedo H. 1994.** Studies on plant growth regulators and enzymes production by some bacteria. *Qatar University Science Journal* 14: 281-288.
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H. 2011.** The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18512-18517.
- Molina R, Rivera D, Mora V, López G, Rosas S, Spaepen S, Vanderleyden J, Cassán F. 2018.** Regulation of IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. *Current Microbiology* 75: 1408-1418.
- Patten CL, Glick BR. 1996.** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 207-220.
- Shah R, Amaresan N, Patel P, Jinal HN, Krishnamurthy R. 2020.** Isolation and characterization of *Bacillus* spp. endowed with multifarious plant growth-promoting traits and their potential effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings. *Arabian Journal for Science and Engineering* 45: 4579-4587.
- Shaharoon B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA. 2008.** Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 147-155.
- Shao A, Ma W, Zhao X, Hu M, He X, Teng W, Li H, Tong Y. 2017.** The auxin biosynthetic TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED TaTAR2. 1-3A increases grain yield of wheat. *Plant Physiology* 174: 2274-2288.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 425-448.
- Sridevi M, Mallaiah KV. 2007.** Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iranian Journal of Biotechnology* 5: 178-182.
- Thakur JK, Jain M, Tyagi AK, Khurana JP. 2005.** Exogenous auxin enhances the degradation of a light down-regulated and nuclear-localized OsIAA1, an Aux/IAA protein from rice, via proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1730: 196-205.
- Tiwari S, Gupta SC, Chauhan PS, Lata C. 2021.** An OsNAM gene plays important role in root rhizobacteria interaction in transgenic *Arabidopsis* through abiotic stress and phytohormone crosstalk. *Plant Cell Reports* 40: 143-155.
- Van Loon LC. 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119: 243-254.
- Woodward AW, Bartel B. 2005.** Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Wu S, Cao Z, Li Z, Cheung K, Wong MH. 2005.** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125: 155-166.
- Yasmin S, Rahman Bakar MA, Malik KA, Hafeez FY. 2004.** Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zanzibar soils. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms* 44: 241-252.
- Zahir ZA, Abbas SA, Khalid M, Arshad M. 2000.** Substrate dependent microbially derived plant hormones for improving growth of maize seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3: 289-291.
- Zhao Y. 2010.** Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64.
- Zhao Y. 2012.** Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant* 5: 334-338.