

اثر بخشی سویه‌های باسیلوس تولید کننده اکسین بر صفات رویشی و بیان نسبی ژن *ARF15* در دو ژنوتیپ نخود در شرایط تنش شوری

Efficacy of Auxin-producing Bacillus Strains on Vegetative Traits and Relative Expression of *ARF15* Gene in Two Genotypes of Chickpea Under Salinity Stress

اعظم رحیمی چگنی^۱، فواد فاتحی^{۲*}، آسا ابراهیمی^۱، محمود ملکی^۳

Azam Rahimi Chegeni¹, Foad Fatehi^{2*}, Asa Ebrahimi¹, Mahmood Maleki³

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

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

۳- گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، 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

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fatehi.foad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۳)

چکیده

شوری خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات کشاورزی، علاوه بر اثر منفی بر تولید محصولات، منجر به عدم تعادل هورمونی گیاه و کاهش رشد می‌شود. ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) شامل طیفی از سویه‌های باکتری از گروه‌های مختلف است که در ریشه گیاهان و ریزوسفر زندگی می‌کنند و با ایجاد تغییرات پیچیده در رشد و نمو گیاهان، می‌توانند مقاومت به تنش را افزایش دهند. PGPR با تغییر در سوخت و ساز گیاه، سیگنالینگ و هومئوستازی هورمون همراه است. در این پژوهش اثر دو سویه باسیلوس تولید کننده اکسین بر صفات رویشی و بیان نسبی ژن *ARF15* در دو ژنوتیپ نخود (*Cicer arietinum*) (MCC68 و MCC77) تحت تنش شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد شاخه‌های فرعی ژنوتیپ MCC68 در تلقیح سویه‌ها با غلظت ۱۰/۵، در شرایط ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش معنی‌دار نشان داد. در تلقیح *Bacillus cereus* (FZB42)، *Bacillus* (FZB42) *amyloliquefaciens* با غلظت ۱۰/۵، بر وزن تر ریشه MCC77 افزایش معنی‌دار مشاهده شد. FZB42 در غلظت ۱ موجب افزایش معنی‌دار ۲۸/۲۰ درصد ارتفاع گیاهان MCC77 در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم شد. همچنین، بیان نسبی ژن *ARF15* ژنوتیپ MCC68 در تیمار تلقیح شده با *Bacillus* sp. در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، افزایش ۹ برابری نشان داد. هر دو سویه FZB42 و *B. cereus* بر صفات رویشی ژنوتیپ‌های نخود MCC68 و MCC77 تأثیر گذاشتند که بیانگر نقش PGPR در افزایش تأمین متابولیت‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و بیان ژن‌های گیاه در پاسخ به تنش‌های غیرزنده است.

واژه‌های کلیدی

باسیلوس تولید کننده اکسین،

ژن *ARF15*

شوری،

نخود

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1, 2021

Abstract

Soil salinity is one of the most crucial agricultural problems that in addition to having negative effects on crop production, causes hormonal imbalance and growth reduction in the plant. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are a range of bacterial strains from different groups that live in plant roots and rhizospheres and can cause the plants to withstand stress by causing complex alterations in their growth and development. PGPR alters plant metabolism, signaling, and hormone homeostasis. The present study aimed to evaluate the effect of two auxin-producing *Bacillus* strains on vegetative traits and the relative expression of the *ARF15* gene of two genotypes of chickpea (*Cicer arietinum*) (MCC77 and MCC68) under salinity stress of 50 and 100 mM sodium chloride in greenhouse conditions. The number of sub-branches of MCC68 has been significantly increased in the inoculation of strains at the concentrations of 0.5 and 1 in the presence of 50 mM sodium chloride. Moreover, the inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42) and *Bacillus. cereus* at a concentration of 0.5 and 1 led to a significant increase in the fresh weight of MCC77 root. In addition, FZB42 at the concentration of 1 caused a significant increase (28.20%) in the height of MCC77 plants in the presence of 100 mM sodium chloride. In the inoculation of *Bacillus* sp. at the concentration of 0.5 and the presence of 50 mM sodium chloride, the relative expression of the *ARF15* gene of MCC68 genotype showed a 9-fold increase. Both FZB42 and *B. cereus* strains affected the vegetative traits of MCC68 and MCC77 genotypes, which indicated the role of PGPR in increasing the supply of enzymatic and non-enzymatic metabolites, and the expression of plant genes in response to abiotic stresses.

Keywords: *ARF15* gene, Auxin-producing *Bacillus*, Chickpea, Salinity

مقدمه

شوری تنش محیطی عمده‌ای است که به شدت بر تولید گیاهان تأثیر می‌گذارد، قرار گرفتن گیاهان در معرض نمک اضافی منجر به عدم تعادل یون‌ها، کمبود آب ناشی از تنش هاپیراسموتیک و عدم تعادل متابولیسم ناشی از سمیت یونی می‌شود. گیاهان متحمل دارای انواع مکانیسم‌های مختلف در برابر شوری مانند، اسمولیت‌ها و سنتز پلی‌آمین‌ها هستند، و با داشتن مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی، سطح گونه‌های اکسیژن فعال و انتقال یون‌ها را کاهش می‌دهند (Bharti et al., 2016)، شوری توانایی گیاهان در جذب مواد معدنی خاک، با مهار رشد ریشه، کاهش می‌دهد، در لگوم‌ها نیز بر همزیستی میزبان-ریزوبیوم و گره‌زایی تأثیر می‌گذارد (Egamberdieva et al., 2016). از سوی دیگر، بسیاری از گیاهان قادر به سازگاری با محیط‌های شور هستند، این سازگاری با تغییرات مورفولوژی، آناتومی و بیوشیمیایی همراه است. علاوه بر این، پاسخ حبوبات به تنش شوری متفاوت است،

و با توجه به غلظت و مدت زمان آن، از بسیار حساس تا گونه‌های متحمل متغیر هستند (Cordovilla et al., 1995)، به‌عنوان مثال، هدایت الکتریکی خاک (EC) با بیش از ۲/۵ تا ۳ دسی‌زیمنس بر متر موجب آسیب و کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Ayers and Westcot, 1985)، همچنین شوری بالا منجر به افزایش سطح اتیلن در ریشه، عدم تعادل و دسترسی مواد غذایی در گیاه می‌شود (Azadikhah et al., 2019)، نخود با عادت رشد نامحدود، حتی پس از شروع گل‌دهی به رشد رویشی خود ادامه می‌دهد (Samineni et al., 2011)، و این امر آن را به تعدادی از عوامل محیطی مانند شوری، خشکی، گرما و سرما حساس می‌کند (Kaashyap et al., 2017).

چندین راهکار برای کاهش اثرات سمی ناشی از شوری زیاد بر رشد گیاه، از جمله مهندسی ژنتیک گیاه، و استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه پیشنهاد شده است. مطالعه‌های قبلی نشان می‌دهد، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه به یک گزینه امیدوارکننده برای کاهش تنش گیاه ناشی از شوری تبدیل شده

است (Shrivastava and Kumar, 2015). جنس‌های مختلف *Variovorax*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* و *Serratia*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella* به‌عنوان PGPR نامیده و موجب رشد و نمو گیاهان در هر دو حالت طبیعی و تنش می‌شوند. ایندول ۳-استیک اسید، از رایج‌ترین اکسین‌ها بوده، و توسط PGPR نیز تولید می‌شود و به‌عنوان مولکول سیگنالینگ عمل می‌کند، و ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه با ترشح فیتوهورمون می‌توانند سطح داخلی ایندول استیک اسید در ریشه را تغییر دهند، و رشد گیاه را تحریک یا مهار کنند (Shilev et al., 2012; Ali et al., 2014). از سوی دیگر ایندول استیک اسید، اکسین اصلی در گیاهان، و بسیاری از فرایندهای مهم فیزیولوژیکی از جمله بزرگ شدن و تقسیم سلول، تمایز بافتی، پاسخ به نور و گرانش را کنترل می‌کند. همچنین باکتری‌های تولید کننده ایندول استیک اسید می‌توانند با ورود آن به ذخیره اکسین گیاه در هر یک از فرایندها دخالت کنند (Leveau and Lindow, 2005).

از آنجا که هورمون‌های گیاهی فرایندهای مهم حیاتی در گیاهان مانند، تغذیه مواد معدنی، روابط آب، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و عملکردهای آنتی‌اکسیدانی را تنظیم می‌کنند، بنابراین، تحریک رشد ریشه با واسطه هورمون می‌تواند تغذیه با مواد معدنی و روابط آبی را بهبود بخشد (Kudoyarova et al., 2019). بیوسنتز ایندول استیک اسید توسط باکتری‌های ساکن ریزوسفر تحت اثر ترشحات ریشه است، و ترشحات ریشه، نیز به عواملی مانند، گونه‌های گیاهی و کلونیزاسیون میکروبی ریزوسفر بستگی دارد (Liu et al., 2016). از سوی دیگر، تکثیر ریشه با بیوسنتز ایندول استیک اسید توسط باکتری‌های ریزوسفر تحریک می‌شود (Spaepen et al., 2007)، و افزایش جذب مواد غذایی با تغییر در ساختار ریشه پس از تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش بیشتر کرک و ریشه‌های جانبی، کوتاه شدن طول ریشه، و به‌طور کلی افزایش سطح ریشه را در پی دارد. تحقیقات صورت گرفته تغییرات مورفولوژیکی ریشه را با تولید اکسین باکتری مرتبط دانسته‌اند، و با استفاده از جهش‌های جایگزین در تولید ایندول استیک اسید به نقش آن پی برده‌اند (Spaepen and Vanderleyden, 2011).

اگرچه توسعه سریع ریشه به لایه‌های مرطوب و عمیق خاک در طی خشکی خاک مهم است (Xiong et al., 2006)، اما غلظت-های بالای اکسین ممکن است، این روند را مهار کند (Kudoyarova et al., 2019). غلظت ایندول استیک اسید ریزوباکتری با کاهش طول ریشه‌های چغندرقد (Beta vulgaris) به‌دنبال استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد رابطه معنی‌دار نشان داد (Loper and Schroth, 1986). تلقیح گیاهان کلزا (*Brassica napus*) با سویه‌های جهش‌یافته *Pseudomonas putida* با کاهش سنتز اکسین، موجب کاهش اثر تلقیح در رشد ریشه شدند (Patten and Glick, 2002)، به‌همین ترتیب، تلقیح گیاهچه‌های گندم (*Triticum aestivum*) با جهش‌های حذف ایندول استیک اسید در *Pseudomonas moraviensis* متحمل به شوری، در مقایسه تلقیح با سویه نوع وحشی، سطح ریشه را ۱۳ تا ۳۸ درصد کاهش داد (Ul Hassan and Bano, 2019)، کاربرد ایندول استیک اسید خارجی در غلظت بالا موجب مهار رشد ریشه و در غلظت پایین، موجب بهبود رشد شده است (Arshad and Frankenberger, 1991).

علاوه براین، مشاهده شد حتی برخی سویه‌های ریزوبیوم متحمل به شوری، می‌توانند تا غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم رشد کنند (Ahmad et al., 2013). در بررسی دیگر اثر مثبت تلقیح *Bacillus subtilis* با *Sulla carnosa*، از حبوبات مهم خوراک دام در مناطق شور، مشاهده شد (Hidri et al., 2019)، پژوهشگران اظهار داشتند، سویه‌های انتخاب شده *Pseudomonas fluorescens* NBRC 14160 و *Bacillus megaterium* NBRC 15308 قادر به افزایش رشد ژنوتیپ‌های گندم در شرایط تنش شوری در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح شدند (Fathalla and El-Mageed, 2020).

در بررسی دیگر، تلقیح سویا با *Bacillus firmus* SW5 با توانایی تولید ایندول استیک اسید، سیدروفور و حلالیت فسفات، عملکرد زیست توده در شرایط شوری را افزایش داد، و افزایش در محتوای کلروفیل، جذب عناصر غذایی، میزان اسمولیت‌ها، محتوای کل فنلی و فلاونوئید، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان را نشان داد (El-Esawi et al., 2018). هدف از تحقیق اثر تلقیح

جداسازی DNA و توالی‌یابی سویه: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ژن *16SrRNA* از DNA ژنومی سویه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی باکتری (27F و 1492R) و (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و (5'GTTACCTTGTACGACTT3')، و با پیروی از دستورالعمل PCR (Senthilraj et al., 2016) تکثیر شد. محصولات PCR ژن *16SrRNA* روی ژل آگارز یک درصد (invitrogen, USA) الکتروفورز (Biorad, Minigel)، و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز خالص شده با روش سنگر توالی‌یابی شدند. توالی ژن *16SrRNA* با استفاده از همترازی با نرم افزار MEGA نشان داد، سویه با توانایی تولید اکسین *B. cereus* است.

آزمایش گلخانه‌ای در شرایط تنش شوری: بررسی اثر سویه‌های مختلف باکتری محرک رشد بر صفات رویشی ژنوتیپ‌های نخود (MCC68 و MCC77)، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در شرایط تنش شوری در گلخانه انجام شد. ژنوتیپ‌های نخود (MCC68 و MCC77) از بانک بذر حبوبات پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. فاکتورهای مورد آزمایش شامل، سه سطح تنش شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم)، دو سویه باکتری تولیدکننده ایندول استیک اسید (*B. cereus* (FZB42) و *B. amyloliquefaciens* بدون تلقیح باکتری)، و سه سطح چگالی نوری (۰، ۵۰، ۱۰۰) بود. بذرهای هیپوکلیت سدیم ۵ درصد ضدعفونی، و با آب مقطر چهار تا پنج بار شستشو شدند. به‌منظور جوانه‌دار شدن روی سطح آب-آگار پخش شدند. بذرهای آماده شده درون گلدان‌های حاوی بستر پرلیت استریل کشت شدند، گیاهچه‌ها با ارتفاع ۵ سانتی‌متر با تزریق ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون از هر یک از سویه‌ها روی ریشه آنها تلقیح شد. گیاهان در گلخانه با درجه حرارت ۲۵ و طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و ۸ ساعت تاریکی رشد یافتند، ۱۵ روز پس از تلقیح باکتری، تیمار شوری اعمال و تا پایان آزمایش ادامه یافت. ۱۰ روز بعد از تنش شوری گیاهان برداشت شدند. در طی دوره رشد از ترکیب محلول غذایی هوگلند برای تغذیه استفاده شد (Hoagland and Arnon, 1950). گلدان‌های بدون باکتری نیز

باکتری‌های محرک رشد گیاه با توانایی تولید اکسین، *B. amyloliquefaciens* (FZB42) و *B. cereus* بر رشد ژنوتیپ‌های نخود (MCC68 و MCC77) در شرایط تنش شوری در گلخانه، و همچنین بررسی بیان ژن Auxin Response Factor (*ARF15*) در تعامل باکتری و گیاه بود.

مواد و روش‌ها

سنجش کمی تولید ایندول ۳- استیک اسید (IAA) با استفاده از معرف Salkowski: ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه مرتبط با ریزوسفر مختلف از نظر تولید مقدار ایندول استیک اسید (IAA) به‌روش کمی و با استفاده از اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید. نمونه‌های باکتری به‌مدت ۷۲ ساعت در محیط کشت نوترینت برات (NB) همراه با ال-تریپتوفان (۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در 28 ± 2 درجه سانتیگراد رشد کرده، و با معرف سالکوفسکی، محلول پرکلریک اسید ۳۵ درصد حاوی ۱۰ میلی‌مولار کلرید آهن (III) (Rahman et al., 2010) به نسبت ۱:۴ مخلوط شدند. تولید اکسین به‌صورت درجاتی از رنگ صورتی نشان داده شد، و چگالی نوری در طول موج ۵۳۱/۸ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Thermo Scientific, 2000c) قرائت گردید. غلظت اکسین تولید شده با تهیه منحنی استاندارد از اکسین در محدوده ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مقایسه شد.

آماده‌سازی سویه برای تلقیح: کشت‌های خالص باکتری سویه استاندارد *B. amyloliquefaciens* (FZB42) از شرکت‌های کود داخلی و *B. cereus* جدا شده از خاک اطراف ریشه در مرحله پنجه‌دهی گندم، به‌ترتیب با شماره دسترسی NC_009725.1، MW911662.1، برای آزمایش در محیط کشت نوترینت آگار (NA) رشد کردند. یک کلنی منفرد از هر سویه به یک ارلن مایر ۱۵۰ میلی‌لیتری حاوی نوترینت برات (NA) منتقل شد. کلنی‌ها یک شب در انکوباتور شیکردار (۱۶۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد رشد کردند. جهت استخراج پلت باکتری در ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس چگالی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت‌های مورد نظر ($OD_{600} \sim 0.5/1$) به‌دست آمد.

برای یکنواخت بودن شرایط آزمایش با آب مقطر استریل تلقیح شدند. در پایان دوره آزمایش گیاهان از گلدان‌ها خارج، و به دو بخش هوایی و ریشه تقسیم شدند و صفات طبق دستورالعمل Pesqueira و همکاران (۲۰۰۶) اندازه‌گیری شد (Pesqueira *et al.*, 2006). نسبت وزن تر و خشک اندام هوایی به وزن تر و خشک ریشه نیز محاسبه شد، همچنین میزان بیان ژن *ARF15* (فاکتور پاسخگو اکسین) در تیمارهایی از ژنوتیپ MCC68 و MCC77 در تلقیح سویه *Bacillus sp.* به ترتیب با غلظت (۰/۵، ۱) در شرایط تنش شوری ۵۰، ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم توسط Real-time PCR با استفاده از سایبرگرین بررسی شد.

آزمایش بررسی بیان ژن *ARF15* نخود در تلقیح *sp.*

***Bacillus* در شرایط تنش شوری:** RNA کل از نمونه‌های منجمد طبق دستورالعمل کیت (دنازیست، ایران) استخراج شد. برای حذف آلودگی DNA مقدار ۱ میکروگرم RNA با ۱ میکرولیتر آنزیم DNase I عاری از RNase (Thermo fisher, USA) و ۱ میکرولیتر بافر آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند، و در نهایت برای حذف و غیرفعال کردن آنزیم آنزیم DNase I، ۱ میکرولیتر اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) با غلظت ۵۰ میلی‌مولار اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس، غلظت و مقدار نمونه‌های RNA با دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, 2000c) و الکتروفورز (Minigel, Biorad) روی ژل آگاروز (Invitrogen, USA) ارزیابی شد.

در تبدیل RNA کل استخراج شده به DNA مکمل از دستورالعمل کیت شرکت فرمتاز به cDNA استفاده شد. همزمان از آغازگرهای الیگوتیمیدین و آغازگرهای تصادفی و در حضور آنزیم رونوشت‌بردار معکوس استفاده شد، cDNA با استفاده از ۱ میکرولیتر آغازگرهای الیگوتیمیدین و ۰/۱ میکرولیتر آغازگرهای تصادفی در حضور آنزیم RT mix 2X (SMOBio, Taiwan) و به کار بردن مقدار ۵۰۰ نانوگرم RNA انجام گرفت. ابتدا مخلوط RNA، آغازگرها و آب DEPC (دی اتیل پیروکربنات)

(Biobasic, Canada) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد، و بلافاصله به سطح یخ منتقل شده، و سپس به نمونه‌ها مخلوط مهارکننده آنزیم RNase، بافر واکنش و داکسی ریبونوکلوئیدها اضافه شد، و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، در نهایت برای غیرفعال کردن آنزیم رونوشت‌بردار معکوس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. آغازگرهای ژن *ARF15* R: 5'ACAAGTCTGGGTCCTTTGGT3' و F: 5'CCATTTGCTGCACTTCCTGA3' (سیناکلون، ایران) براساس توالی‌های نخود با استفاده از پرایمر بلاست طراحی شد، واکنش Real Time PCR از پلیت ۴۸ چاهکی دستگاه (Applied StepOne Biosystems, Carlsbad, USA) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از ۱ میکرولیتر DNA مکمل، ۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین غلظت ۲X (Ampliqon, Denmark) و ۰/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ترموسایکلر (Grad 96, Peqlab) با شرایط واسرشت سازی اولیه، در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲۰ ثانیه با ۴۰ چرخه دو مرحله‌ای به دنبال آن، واسرشت در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه انجام شد، پس از پایان واکنش، برای ارزیابی اختصاصیت واکنش، از منحنی ذوب، دما در ۶۰ چرخه ۱۵ ثانیه‌ای از ۶۰ به ۹۵ درجه سانتیگراد افزایش یافت.

تجزیه آماری: داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه شدند. مقایسه میانگین نیز از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0/05$) انجام شد، و نمودارهای مربوطه با مایکروسافت اکسل رسم گردید، همچنین، میزان بیان نسبی ژن از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ تعیین شد (Livak and Schmittgen, 2001).

نتایج و بحث

نتایج اثر باسیلوس بر تحمل ژنوتیپ MCC68 به شوری: تجزیه واریانس صفات بررسی شده نشان داد، اثر غلظت باکتری بر ارتفاع گیاه، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، و اثر شوری بر وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه ژنوتیپ MCC68 معنی‌دار شد (جدول ۱). طول ریشه اصلی، وزن تر اندام هوایی به وزن تر ریشه نیز تحت اثر برهم‌کنش دوگانه سویه و غلظت قرار گرفت ($p < 0.05$). برهم‌کنش دوگانه شوری و غلظت، و همچنین سویه و غلظت بر صفت تعداد شاخه‌های فرعی معنی‌دار شد ($p < 0.01; 0.05$). از سوی دیگر، برهم‌کنش سه‌گانه، شوری و سویه و غلظت بر صفت وزن تر ریشه معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۱). وزن تر ریشه در تلقیح FZB42 با غلظت ۰/۵، درصد نسبت به سطح بدون تلقیح و بدون شوری افزایش معنی‌دار نشان داد، و تلقیح *B. cereus*، FZB42 در سطح شوری ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم، نسبت به سطح شاهد (بدون تنش شوری) موجب ثبات وزن تر ریشه شد (شکل ۱- A).

تنش ۵۰ میلی‌مولار کلریدسدیم، باعث کاهش معنی‌دار تعداد شاخه‌های فرعی گیاهان MCC68 شد، و تلقیح سویه‌ها در غلظت ۰/۵، ۱ در شرایط شوری ۵۰ میلی‌مولار موجب تعدیل تنش شد،

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس تلقیح سویه‌های *B. cereus*، *B. amyloliquefaciens* (FZB42) بر صفات رویشی گیاهان ژنوتیپ MCC68 در شرایط شوری
Table 1. The results of analysis of variance of *B. amyloliquefaciens* (FZB42) and *B. cereus* inoculation on the vegetative traits of the plants of MCC68 genotype under salinity conditions

منابع تغییر	ارتفاع گیاه (cm)	طول ریشه اصلی (cm)	تعداد شاخه های فرعی	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن تر ریشه (gr)	وزن خشک اندام هوایی (gr)	وزن خشک ریشه (gr)	وزن تر اندام هوایی / وزن تر ریشه	وزن خشک اندام / وزن خشک ریشه
سطوح شوری	۳/۰۴۹ ^{ns}	۵/۵۵۶ ^{**}	۳۹/۲۲ ^{**}	۲/۸۶۸ ^{ns}	۵/۳۳ ^{**}	۲/۲۵۶ ^{ns}	۱۲/۰۴۶ ^{**}	۱/۴۶۳ ^{ns}	۶/۹۴۰ ^{**}
سویه	۰/۵۳۶ ^{ns}	۰/۶۹ ^{ns}	۱/۴۲ ^{ns}	۳/۵۳۳ ^{ns}	۰/۵۹ ^{ns}	۰/۳۱۸ ^{ns}	۱/۶۷۳ ^{ns}	۰/۲۰ ^{ns}	۰/۵۷۷ ^{ns}
غلظت	۴/۳۱۹ [*]	۱/۱۲ ^{ns}	۴/۹۲ [*]	۲۰/۴۸۹ ^{**}	۰/۸۸ ^{ns}	۱۳/۳۵۳ [*]	۳/۹۸۷ [*]	۱/۶۴۳ ^{ns}	۲/۷۶۶ ^{ns}
شوری × سویه	۰/۱۷۵ ^{ns}	۰/۷۸ ^{ns}	۰/۲۰ ^{ns}	۰/۲۲۱ ^{ns}	۱/۳۳ ^{ns}	۰/۸۰۳ ^{ns}	۰/۷۲۸ ^{ns}	۰/۱۳۲ ^{ns}	۲/۷۸۳ ^{ns}
شوری × غلظت	۰/۸۹۳ ^{ns}	۰/۷۱ ^{ns}	۶/۲۵ ^{**}	۱/۳۳۶ ^{ns}	۱/۳۱ ^{ns}	۲/۷۳۴ ^{ns}	۲/۷۲۵ ^{ns}	۰/۲۱ ^{ns}	۱/۳۱۰ ^{ns}
سویه × غلظت	۰/۲۴۳ ^{ns}	۶/۰۲ [*]	۶/۵۳ [*]	۰/۶۹۵ ^{ns}	۱/۳۹ ^{ns}	۱/۷۲۶ ^{ns}	۱/۱۴۸ ^{ns}	۴/۳۵۲ [*]	۰/۸۵ ^{ns}
شوری × سویه × غلظت	۰/۳۶۳ ^{ns}	۰/۶۰ ^{ns}	۲/۴۱ ^{ns}	۰/۹۸۶ ^{ns}	۴/۲۷ [*]	۰/۲۵۰ ^{ns}	۱/۱۷۴ ^{ns}	۲/۷۱۲ ^{ns}	۰/۷۷۹ ^{ns}

ns، **، * به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار ۱، ۵٪

اثر باسیلوس بر تحمل ژنوتیپ MCC77 به شوری: براساس نتایج تجزیه واریانس صفات بررسی شده ژنوتیپ MCC77، اثر شوری بر طول ریشه اصلی، وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه ژنوتیپ MCC77 معنی دار شد ($p < 0/05$)، و اثر سویه نیز بر تعداد شاخه های فرعی، وزن خشک ریشه، وزن تر اندام هوایی به وزن تر ریشه معنی دار شد ($p < 0/05; 0/01$). برهم کنش تیمار شوری و سویه و غلظت، بر ارتفاع گیاهان MCC77 و برهم کنش دوگانه سویه و غلظت، بر وزن تر ریشه نیز معنی دار نشان داد ($p < 0/05$)، (جدول ۲).

تنش ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، موجب کاهش معنی دار ارتفاع گیاهان شد، و تلقیح سویه FZB42 با غلظت ۱ در شرایط شوری ۱۰۰ میلی مولار موجب تعدیل تنش شد، و افزایش معنی دار ۲۸/۲۰ درصد در ارتفاع گیاه مشاهده شد. بیشترین افزایش معنی دار ارتفاع در تلقیح *B. Cereus* با غلظت ۱ در شرایط شاهد (بدون شوری) مشاهده شد (شکل ۲- A).

نتایج برهم کنش سویه و غلظت بر وزن تر ریشه گیاهان MCC77، در تلقیح هر دو سویه با غلظت های ۱، ۰/۵ نسبت به سطح بدون تلقیح افزایش معنی دار نشان داد. وزن تر ریشه گیاهان MCC77 در تلقیح سویه های *B. cereus*، FZB42 با غلظت ۰، ۵۵/۹۵، ۲۲/۰۸ درصد افزایش معنی دار نسبت به سطح (بدون تلقیح) مشاهده شد، همچنین، وزن تر ریشه در تلقیح *B. cereus* و FZB42 با غلظت ۱، نسبت به سطح بدون تلقیح ۳۶/۴۹، ۲۳/۷۵ درصد افزایش معنی دار نشان داد (شکل ۲- B). افزایش معنی دار وزن تر اندام هوایی به وزن تر ریشه گیاهان MCC77 در تلقیح *B. cereus* نسبت به تیمار تلقیح با FZB42 مشاهده شد (شکل ۲- C). تلقیح FZB42 نسبت به تلقیح *B. Cereus* بر وزن خشک ریشه افزایش معنی دار حدود ۲۸/۳۸ درصد نشان داد (شکل ۲- D). تلقیح سویه *B. Cereus* اثر مثبت و معنی دار بر تعداد شاخه های فرعی گیاهان MCC77 داشت و افزایش تعداد شاخه های فرعی در تلقیح سویه *B. cereus* و FZB42 نسبت به سطح بدون تلقیح مشاهده شد (شکل ۲- E).

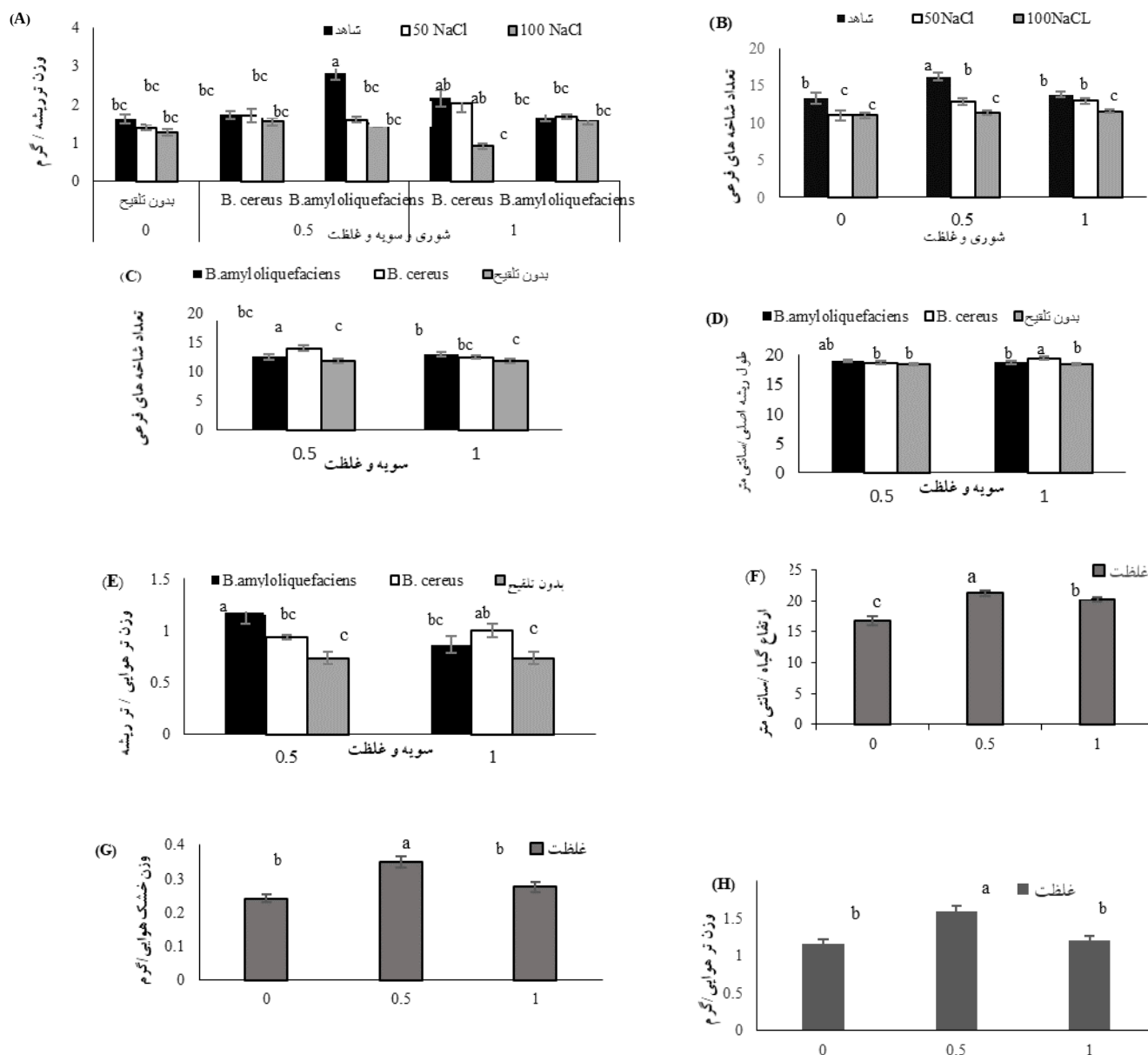
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس سویه های *B. cereus*، *B. amyloliquefaciens* (FZB42) بر صفات رویشی ژنوتیپ MCC77 تحت شرایط شوری

Table 2. The results of analysis of variance of the inoculation of *B. amyloliquefaciens* (FZB42) and *B. cereus* on the growth traits of MCC77 genotype under salinity conditions

منابع تغییر	ارتفاع گیاه cm	طول ریشه اصلی cm	تعداد شاخه های فرعی	وزن تر اندام هوایی	ریشه وزن تر	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	وزن تر اندام هوایی به وزن ریشه	وزن خشک اندام هوایی به وزن خشک ریشه
شوری	۳۰/۸۰**	۳/۶۲*	۰/۰۰۶ ^{n.s}	۲/۹۰۸ ^{n.s}	۱۵/۸۷**	۰/۸۰۴ ^{n.s}	۱/۳۲۴ ^{n.s}	۰/۸۵۸ ^{n.s}	۳/۸۷۸*
سویه	۰/۳۹ ^{n.s}	۱/۰۶۳ ^{n.s}	۵/۵۸۸*	۲/۰۳۲ ^{n.s}	۱/۹۶ ^{n.s}	۱/۸۶۳ ^{n.s}	۱۱/۳۳۱**	۸/۰۰۳**	۲/۵۲۱ ^{n.s}
غلظت	۴/۸۲*	۰/۹۱۱ ^{n.s}	۰/۳۰۹ ^{n.s}	۲/۴۸۰ ^{n.s}	۱/۱۹ ^{n.s}	۰/۰۴۸ ^{n.s}	۰/۰۳۷ ^{n.s}	۱/۲۳۴ ^{n.s}	۰/۷۲۰ ^{n.s}
شوری×سویه	۰/۰۹ ^{n.s}	۱/۳۱۳ ^{n.s}	۰/۰۳۹ ^{n.s}	۰/۶۶۵ ^{n.s}	۰/۰۷ ^{n.s}	۰/۴۱۵ ^{n.s}	۲/۵۸۶ ^{n.s}	۱/۴۷۷ ^{n.s}	۰/۷۹۷ ^{n.s}
شوری×غلظت	۰/۰۵ ^{n.s}	۰/۶۱۱ ^{n.s}	۱/۹ ^{n.s}	۰/۴۰۴ ^{n.s}	۰/۴۳ ^{n.s}	۰/۳۵۶ ^{n.s}	۲/۷۰۲ ^{n.s}	۲/۶۵۵ ^{n.s}	۱/۳۴۸ ^{n.s}
سویه×غلظت	۱/۵۸ ^{n.s}	۰/۳۲۸ ^{n.s}	۰/۴۸۳ ^{n.s}	۰/۱۴۹ ^{n.s}	۵/۸۲*	۰/۴۶۶ ^{n.s}	۰/۸۱۶ ^{n.s}	۰/۰۸۷ ^{n.s}	۰/۰۱۱ ^{n.s}
شوری×سویه×غلظت	۳/۴۲*	۱/۳۰۴ ^{n.s}	۰/۳۲۱ ^{n.s}	۰/۴۱۳ ^{n.s}	۰/۳۱ ^{n.s}	۰/۱۵ ^{n.s}	۰/۶۲۰ ^{n.s}	۰/۴۱۷ ^{n.s}	۱/۹۸۳ ^{n.s}

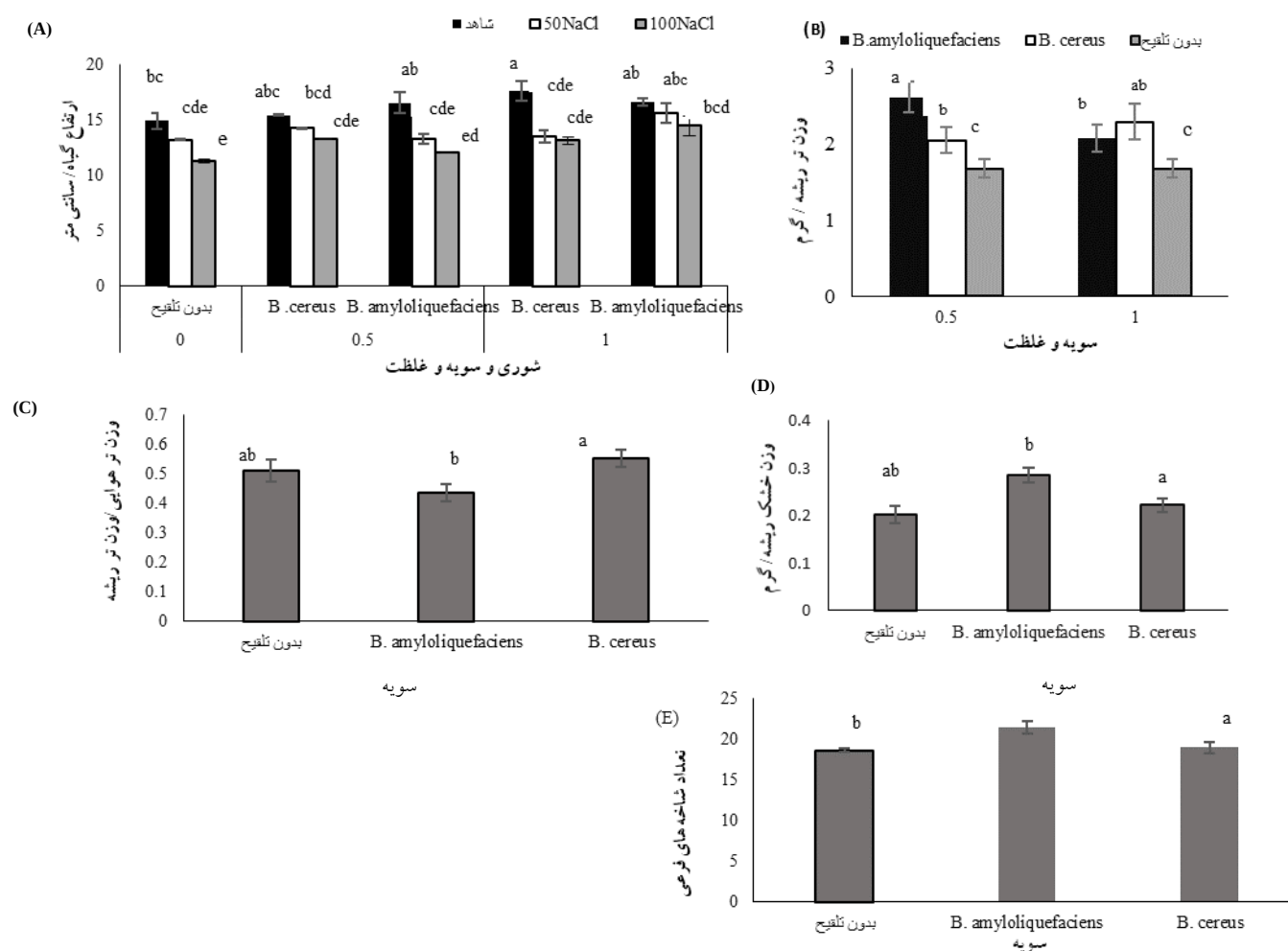
^{n.s}، **، * به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار ۱، ۵٪

وزنها بر اساس گرم هستند.



شکل ۱- برهم‌کنش سه‌گانه سویه‌های FZB42، *B. cereus* در سطوح غلظت (۰، ۰/۵، ۱) و سطوح شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰) میلی‌مولار کلرید سدیم بر وزن تر ریشه (A)، برهم‌کنش دوگانه سطوح شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰) میلی‌مولار کلرید سدیم، و غلظت (۰، ۰/۵، ۱) بر تعداد شاخه‌های فرعی (B)، و برهم‌کنش دوگانه سویه‌های FZB42، *B. cereus* و غلظت (۰، ۰/۵، ۱) بر تعداد شاخه‌های فرعی (C)، طول ریشه اصلی (D)، وزن تر اندام هوایی به تر ریشه (E)، و اثر اصلی غلظت (۰، ۰/۵، ۱) بر ارتفاع گیاه (F)، وزن خشک اندام هوایی (G)، وزن تر اندام هوایی (H) ژنوتیپ Mcc68. مقادیر میانگین با حروف مختلف، تفاوت معنی‌داری دارند ($p < 0.05$).

Fig 1. The effect of triple interaction of the inoculation of FZB42 and *B. cereus* at the concentrations of 0, 0.5, & 1 under the salinity levels of 0, 50, & 100 mM sodium chloride on the fresh weight of root (A), Effect of double interaction of the salinity levels of 0, 50, & 100 mM sodium chloride, and concentrations of 0, 0.5 & 1 on the number of sub-branches (B), and the effect of double interaction of the inoculation of FZB42 & *B. cereus* at the concentrations of 0, 0.5, & 1 on the number of sub-branches (C), and the main root length (D), fresh weight of shoot/root (E), and the main effect of the concentrations of (0, 0.5 & 1) on plant height (F), shoot dry weight (G), and shoot fresh weight (H) of Mcc68 genotype. Mean values denoted by a different letter indicate significant differences ($p < 0.05$).



شکل ۲- برهم کنش سه گانه سویه های *B. cereus* FZB42 در سطوح غلظت (۱، ۰/۵، ۰) و سطوح شوری (۱۰۰، ۵۰، ۰) میلی مولار کلرید سدیم بر ارتفاع (A)، برهم کنش دوگانه سویه های *B. cereus* FZB42 در سطوح غلظت (۱، ۰/۵، ۰) بر وزن تر ریشه (B)، اثر اصلی سویه های *B. cereus* FZB42 بر وزن تر اندام هوایی/ تر ریشه (C)، وزن خشک ریشه (D) تعداد شاخه های فرعی (E) ژنوتیپ MCC77. مقادیر میانگین با حروف مختلف، تفاوت معنی داری دارند ($p < 0.05$).

Fig 2. The effect of triple interaction of the inoculation of FZB42 and *B. cereus* strains at the concentration of 0, 0.5 & 1 and the salinity levels of 0, 50, & 100 mM sodium chloride on plant height (A), Effect of dual interaction of FZB42 and *B. cereus* strains at the concentration of 0, 0.5 & 1 on the fresh weight of roots (B), and the main effect of *B. cereus* and FZB42 strains on shoot/root fresh weight (C), root dry weight (D), and the number of the sub-branches of MCC77 genotype (E). Mean values denoted by different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

اثر تلقیح *Bacillus* sp. در شرایط شوری بر بیان نسبی ژن *ARF15*

در تیمارهای انتخابی از گیاهان MCC68 و MCC77 بیان ژن *ARF15* معنی دار شد ($p < 0.05$)، (جدول ۳). در مطالعه حاضر، روندهای مختلفی از بیان *ARF15* در تلقیح *Bacillus* sp. با غلظت ۰/۵، ۱ در شرایط شوری ۵۰، ۱۰۰ میلی مولار مشاهده شد، همچنین، *ARF15* در شرایط کنترل بیان تقریباً ثابتی را نشان داد، و این نیاز به روند طبیعی رشد را نشان می دهد. بیان *ARF15* در گیاهان MCC68 تلقیح شده بین تیمار شوری و (بدون تلقیح و بدون شوری)

معنی دار بود. بیان نسبی *ARF15* بین تیمارهای ژنوتیپ MCC77 تلقیح شده با *Bacillus* sp. با غلظت ۱ در شرایط شوری ۱۰۰ میلی مولار، و شرایط بدون تلقیح و بدون شوری نیز معنی دار نشان داد (شکل ۳). سطح بیان *ARF15* از نمونه گیاهان MCC68 تلقیح شده با *Bacillus* sp. در غلظت ۰/۵ و تنش شوری ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۹/۲۲ برابر نسبت به تیمار بدون تلقیح بود. همچنین بیان *ARF15* در ژنوتیپ MCC77 در مقایسه با سطح شاهد (بدون شوری، بدون تلقیح) ۶/۰۹۸ برابر افزایش بیان معنی دار نشان داد (شکل ۳). نتایج نشان داد، سطح بیان بالاتر *ARF15* در تلقیح

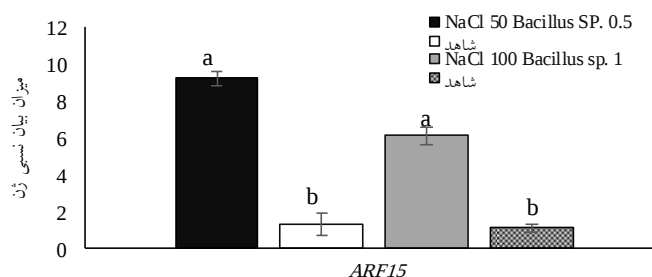
Bacillus sp. با غلظت ۰/۵، در شوری متوسط در ژنوتیپ MCC68 القاء می شود.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس بیان ژن *ARF15*، ژنوتیپ های MCC68، MCC77 در تلقیح *Bacillus* sp. در شرایط شوری

Table 3. The results of analysis of variance related to the expression of *ARF15* gene in Mcc68 and Mcc77 genotypes inoculated with *Bacillus* sp. under salinity conditions

<i>ARF15</i>	نمونه تیمارها
۲۴/۳۲۶ *	ژنوتیپ MCC68 تلقیح شده <i>Bacillus</i> sp. با غلظت ۰/۵ و شرایط شوری ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم
۸/۳۸۰ *	ژنوتیپ MCC77 تلقیح شده <i>Bacillus</i> sp. با غلظت ۱ و شرایط شوری ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم

ns، **، * به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار ۱، ۵٪



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن *ARF15* در نمونه تیمارهای تلقیح شده با *Bacillus* sp. در غلظت ۰/۵ و ۵۰ میلی مولار کلرید سدیم ژنوتیپ MCC68، و تیمارهای تلقیح شده ژنوتیپ MCC77 با *Bacillus* sp. در غلظت ۱ و شوری ۱۰۰ میلی مولار کلرید سدیم. مقادیر میانگین با حروف مختلف، تفاوت معناداری دارد ($p < 0.05$).

Fig 3. Relative expression of *ARF15* gene in the samples of Mcc68 genotype inoculated with *Bacillus* sp. at the concentration of 0.5 in the presence of 50 mM sodium chloride, as well as the samples of Mcc77 genotype inoculated with *Bacillus* sp. at the concentration of 1 in the presence of 100 mM sodium chloride. Mean values denoted by different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

افزایش طول ریشه اصلی MCC68 در تلقیح سویه *B. cereus* با غلظت ۱، مشاهده شد، باکتری های محرک ممکن است، رشد ریشه را صرف نظر از عملکرد اکسین باکتری با اثر بر سطح داخلی اکسین گیاه بهبود دهند (Tsukanova et al., 2017). افزایش رشد ریشه با سست شدن دیواره های سلولی همراه با کلونیزه شدن باکتری های محرک در ریشه وابسته است، و تخریب دیواره های سلول کلونیزاسیون مؤثرتر در ریشه را توسط PGPR بهبود می دهد (Beauregard et al., 2013). از سوی دیگر، PGPR بر بیان ژن های گیاه که بخشی از آنها مرتبط با سنتز، انتقال یا سیگنالینگ اکسین هستند اثر دارند، در گیاهان تلقیح شده با سویه های *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 و *Bacillus* sp. LZR216 بیان ژن های بیوستز و میزان ایندول استیک اسید داخلی در ریشه اصلی را افزایش دادند، به طور معمول، افزایش رشد ریشه در گیاهان کلونیزه شده با ریزوباکتری محرک رشد با افزایش غلظت اکسین توضیح داده می شود

پاسخ مورفولوژیکی دو ژنوتیپ نخود در تلقیح سویه های

B. amyloliquefaciens (FZB42) و *B. cereus*

افزایش تعداد شاخه های فرعی گیاهان MCC68 در تلقیح سویه های *B. amyloliquefaciens* (FZB42) و *B. cereus* با غلظت ۰/۵، ۱ در شرایط تنش شوری، با وجود تجمع سدیم، به حفظ هیدراتاسیون کافی اندام هوایی کمک کرده است. قرار گرفتن گیاهان در معرض تنش های محیطی منجر به تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شود، علاوه بر گیاهان، دیگر موجودات زنده نیز می توانند با افزایش تأمین متابولیت های آنزیمی و غیرآنزیمی موجب سم زدایی از گونه های فعال اکسیژن شوند (Raheem et al., 2018). در تلقیح سویه های *Pseudomonas* تولیدکننده ایندول استیک اسید با نخود در مواردی بهبود رشد شاخه ها مشاهده شد، و نتایج تلقیح در تنش شوری، طول شاخساره در گیاهان تلقیح شده با PGPR بیش از تلقیح نشده افزایش نشان داد (Hossain et al., 2016).

(Tsukanova et al., 2017). افزایش معنی دار ارتفاع گیاه، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک هوایی، وزن تر اندام هوایی به وزن تر ریشه گیاهان MCC68 را می توان مرتبط به اثر مستقیم باکتری ها بر ساختار سیستم ریشه و ترشح مواد تقویت کننده رشد گیاه مانند اکسین ها و سیتوکینین ها، و افزایش رشد اندام هوایی دانست (López-Bucio et al., 2007).

افزایش معنی دار ارتفاع گیاهان MCC77 در تلقیح FZB42 در شرایط تنش شوری مشاهده شد. نتایج کاربرد IAA در *Melissa officinalis* نشان داد، طول ساقه، تعداد گره ها در گیاه، رشد کالوس، تشکیل ریشه و ساقه را تحریک می کند (Çakmakçı et al., 2020). از دلایل افزایش صفات رویشی در گیاهان تلقیح شده یونجه *Medicago sativa L.* در شرایط تنش شوری در تعداد گره ها، رشد ساقه و ریشه را افزایش مقدار اکسین و کاهش تولید اتیلن دانستند (Ansari et al., 2019).

افزایش وزن تر ریشه MCC77 در تلقیح هر دو سویه *B. cereus* و *B. amyloliquefaciens* (FZB42) مرتبط با تولید ایندول استیک اسید دانست، و از آنجا که فیتوهورمون ایندول استیک اسید، در رشد ریشه، تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول نقش دارد. براساس نتایج، ایندول استیک اسید، با افزایش طول و سطح ریشه، موجب دسترسی بیشتر گیاه به مواد مغذی خاک می شود (Boiero et al., 2007). و با اثر تحریک کننده در گیاه، منجر به افزایش رشد ریشه گیاه می شوند (Wagi and Ahmed, 2019). تعداد شاخه های فرعی در تلقیح سویه *B. cereus* و *B. amyloliquefaciens* (FZB42) نسبت به سطح بدون تلقیح افزایش نشان داد، در بررسی رابطه بین ایندول استیک اسید تولید شده از ۱۲ باکتری محرک رشد انتخاب شده، موجب افزایش نسبت ساقه به ریشه و کاهش معنی دار طول ریشه شد (Loper and Schroth, 1986).

بیان نسبی ژن *ARF15* در تلقیح *Bacillus sp.* در شرایط شوری

بیان بالاتر ژن *ARF15* در ژنوتیپ MCC68 در تلقیح *Bacillus sp.* با غلظت ۰/۵، نسبت به ژنوتیپ MCC77 در تلقیح *Bacillus sp.* با غلظت ۱ در شرایط تنش شوری مشاهده شد. برنامه ریزی مجدد بیان ژن در سطح اکسین با تغییرات مکانی و زمانی آن

مرتبط است (Luo et al., 2018). تنظیم رونویسی ژن های هدف توسط اکسین، از طریق عوامل پاسخ دهنده اکسین (ARF)، رخ می دهد (Bouzroud et al., 2020). و عوامل پاسخگو اکسین به عنوان اجزای حیاتی مسیر سیگنالینگ اکسین عمل می کنند (Die et al., 2018).

اکسین می تواند پاسخ های رونویسی گسترده و خاصی را تحریک کند. اجزای اصلی سیگنالینگ اکسین به سه خانواده پروتئینی گیرنده های مشترک اکسین، Transport Inhibitor (TIR1/AFB)، Response 1, Auxin-related F-box، مهارکننده های رونویسی

Auxin/Indole-3-Acetic Acid (Aux/IAA) و فاکتورهای پاسخگو اکسین ARF تعلق دارند. اکسین باعث ایجاد تعامل بین پروتئین های TIR1/AFB و Aux/IAA، در نتیجه تخریب Aux/IAA و آزاد سازی ARF می شود (Lavy and Estelle, 2016). ژن های Aux/IAA به سرعت در پاسخ به اکسین افزایش بیان دارند (Abel et al., 1994)، و در غلظت های بالای اکسین، آزاد شدن ARF با تخریب پروتئین های Aux/IAA همراه است (Tiwari et al., 2003)، علاوه بر این، در حضور اکسین، پروتئین های Aux/IAA در پروتئازوم ۲۶S هدف تخریب قرار می گیرند (Finet et al., 2013).

از سوی دیگر، درک اکسین توسط مجموعه گیرنده اکسین، و سپس تخریب Aux/IAA امکان پاسخ های رونویسی با واسطه ARF را فراهم می کند. عوامل رونویسی ARF از طریق عناصر تنظیمی سیس پاسخگو به اکسین (AuxREs) cis-regulatory (AuxREs) به پیشبر ژن های پاسخ دهنده اکسین متصل می شوند (Lavy and Estelle, 2016)، عملکرد اولین ژن *ARF* (*AtARF1*) در *Arabidopsis thaliana* بررسی شد (Bouzroud et al., 2020)، همچنین، تعداد ۲۲ از اعضای خانواده Aux/IAA در نخود و دیگر گیاهان شناسایی شد (Singh and Jain, 2015). در تجزیه و تحلیل بیان ژنوم نیز تایید شد، تنش های غیرزیستی موجب تغییر در بیان بسیاری از ژن های *ARF* می شوند. همچنین، بیان بسیاری از ژن های *ARF* در موز (*Musa acuminata L.*) در تنش شوری و اسمزی تغییر کرد (Hu et al., 2015)، و تجزیه و تحلیل بیان رونوشت گیاه *Brachypodium*

distachyon L. نیز نشان داد، *BdARF* به‌طور عمده در نوک برگ و ریشه، ساقه‌ها و بذرها در حال رشد بیان می‌شود، و برخی از ژن‌های *BdARF* در تنش‌های مختلف غیرزنده بیان معنی‌دار داشتند، به‌ویژه، *BdARF4* و *BdARF8* در پاسخ به عوامل تنش غیرزنده مانند، اسید سالیسیلیک و فلزات سنگین بیشترین بیان معنی‌دار را نشان دادند (Liu et al., 2018)، به‌تازگی مشاهده کردند، با افزایش محتوای ABA و پرولین و همچنین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، ژن *IbARF5* حاصل از سیب‌زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*) تحمل به شوری و خشکی را در *Arabidopsis* تراریخته افزایش داد (Kang et al., 2018).

در شرایط تنش شوری بسیاری از ژن‌های *SbARF* در سورگوم (*Sorghum bicolor*) افزایش بیان ۵ برابر در برگ نشان دادند، و در ریشه نیز بیشترین کاهش را داشتند (Wang et al., 2010)، بیان تعداد *ARF*ها در پاسخ به تنش، در بین گونه‌ها بسیار متفاوت است، و در بررسی بیان از *ARF* ۲۸ در نخود، ۴ ژن آن به‌طور معنی‌دار در ریشه القاء شد (Kumar et al., 2011)، همچنین در بررسی گسترده ژنوم نخود، مشخص شد، ۲ ژن *ARF15* و *ARF16* روی کروموزوم ۶ در وسط ۲ کلاستر QTL (۷ و ۸) در گروه لینکاژی ۶ وابسته به صفات متحمل به خشکی هستند. براساس نتایج، از تحلیل ترکیب اسید آمینه و طبقه‌بندی *CaARF*، *CaARF15* دارای نواحی دومین باند شونده به DNA (DBB)، دومین دیمیرزاسیون C-ترمینال (CTD) و ناحیه میانی (MR) از دومین فعال (AD)، شامل گلوتامین/سیرین/لوسین (QSL-rich) می‌شود، و نشان از منطقه غنی برای فعال‌سازی *ARF* است. در بررسی‌های دیگر از تجزیه و تحلیل مناطق عناصر تنظیمی سیس (CREs) از *ARF*، به‌طور متوسط میزان گوانین+ سیتوزین ۲۷/۸ درصد (گستره ۲۶/۸ تا ۳۲/۲) در پایگاه داده نخود به‌دست آمد، عناصر سیتوزین و تیمین، CTCTT (CREs) پیشبرهای ژن *ARF* نخود، درگیر در همزیستی و ۷۷ مرتبه در کل ۲۳ پیشبر وجود دارد (Die et al., 2018).

باتوجه به فراوانی عناصر سیتوزین و تیمین CTCTT در پیشبرهای *CaARF*، در تنظیم ژن‌های *ARF*، سیگنالینگ اکسین در برهمکنش گیاه و باکتری نقش دارد (Himmelbach et al., 2018).

(2010). در مطالعه بین فاکتورهای پاسخگو به اکسین (*ARF*)، بیان *SIARF4* در گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) در شرایط شوری و کمبود آب افزایش معنی‌دار نشان داد، و *SIARF4* منطقه تنظیمی غنی از عناصر ویژه سیس (*cis-acting*) در پاسخ شوری و کمبود آب دارد، همچنین لاین‌های گوجه‌فرنگی با حمل ساختار پلاسمید واجد ژن *pARF4::GUS* برای تجزیه بیان *ARF4* در شرایط تنش استفاده شد، و بیان قوی آن در برگ‌ها، ریشه اصلی، نوک ریشه پس از ۲۴ ساعت در معرض تنش شوری مشاهده، و فعالیت ژن بتاگلوکوروئیداز *GUS* در سیستم ریشه و قسمت‌های مختلف برگ شناسایی شد (Bouzroud et al., 2019).

از آنجا که از مهم‌ترین خواص ریزوباکتری به منظور کاهش تنش‌های غیرطبیعی توانایی تولید اکسین می‌باشد، و ماهیت مخرب و اثرات منفی کلریدسیدیم و سایر ترکیبات نمکی در رشد و نمو گیاهان، به‌ویژه در القای تنش کمبود آب، قابل کنترل نیست، این امر نیاز به استفاده از یک استراتژی پایدار برای کاهش تأثیر شوری بر گیاهان زراعی است. تلقیح کردن گیاهان با باکتری‌های تولید کننده ایندول استیک اسید به‌عنوان کودهای زیستی، محرک گیاه و بیوکنترل، جایگزینی بالقوه برای کودهای شیمیایی و علف‌کش‌ها و همراه با عدم آلودگی محیط زیست می‌تواند کارایی داشته باشد.

گیاهان MCC68 در تلقیح *B. Cereus* FZB42 موجب ثبات وزن تر ریشه، افزایش وزن تر اندام هوایی به وزن تر ریشه، تعداد شاخه‌های فرعی، در شرایط شوری شد، و همچنین، تلقیح *B. Cereus* (FZB42 و *B. Cereus*)، به‌ترتیب موجب افزایش طول ریشه اصلی و تعداد شاخه‌های فرعی MCC68 شد. وزن تر ریشه MCC77 در تلقیح سویه‌های *B. Cereus* FZB42 و FZB42 بر ارتفاع گیاه در شرایط شوری، تعداد شاخه‌های فرعی اثر مثبت داشت، این امکان وجود دارد، از این سویه‌های باکتری برای بهبود رشد گیاه در شرایط تنش شوری استفاده شود. حداکثر بیان ژن *ARF15* از ژنوتیپ MCC68 در تلقیح *Bacillus sp.* با غلظت ۰/۵ در شوری ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد، این یافته‌ها پایه محکمی برای مطالعات بیشتر در مورد پاسخ تنش‌های غیرزیستی با واسطه ریزوباکتری‌های تولید کننده اکسین در نخود ایجاد می‌کند،

همچنین تحقیقات بیشتر برای تعیین ژن‌های دیگر در برهم‌کنش باکتری و گیاه و دستیابی تحمل شوری مورد نیاز است.

منابع

- Abel, S., Oeller, P. W. and Theologis, A. 1994. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(1): 326-330.
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Nazli, F., Akram, F., Arshad, M. and Khalid, M. 2013. Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4): 1341-1348.
- Ali, S., Charles, T. C. and Glick, B. R. 2014. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 160-167.
- Ansari, M., Shekari, F., Mohammadi, M. H., Juhos, K., Végvári, G. and Biró, B. 2019. Salt-tolerant plant growth-promoting bacteria enhanced salinity tolerance of salt-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars at high salinity. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(12): 1-13.
- Arshad, M. and Frankenberger, W. 1991. Microbial production of plant hormones the rhizosphere and plant growth. Springer, 327-334.
- Ayers, R. S. and Westcot, D. W. 1985. Water quality for agriculture : Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 29:174.
- Azadikhah, M., Jamali, F., Nooryazdan, H. R. and Bayat, F. 2019. Growth promotion and yield enhancement of barley cultivars using ACC deaminase producing *Pseudomonas fluorescens* strains under salt stress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(1): 1-12.
- Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R. and Kolter, R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17): E1621-E1630.
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F. and Luna, V. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(4): 874-880.
- Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K., and Kalra, A. 2016. Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. *Scientific Reports*, 6(September): 1-16.
- Bouzroud, S., Barbosa, M. A. M., Gasparini, K., Fahr, M., Bendaou, N., Bouzayen, M. and Zouine, M. 2019. Loss of AUXIN RESPONSE FACTOR 4 function alters plant growth, stomatal functions and improves tomato tolerance to salinity and water deficit. *BioRxiv*, 756387.
- Bouzroud, S., Gasparini, K., Hu, G., Antonia, M., Barbosa, M., Rosa, B. L., and Zouine, M. 2020. Down Regulation and Loss of Auxin Response Factor 4 Function Using CRISPR/Cas9 Alters Plant Growth, Stomatal Function and Improves Tomato Tolerance to Salinity and Osmotic Stress. *Genes* (Basel); 11(3): 272.
- Cordovilla, M. P., Ocaña, A., Ligeró, F. and Lluch, C. 1995. Salinity Effects on Growth Analysis and Nutrient Composition in Four Grain legumes- *Rhizobium* Symbiosis. *Journal of Plant Nutrition*, 18(8): 1595-1609.
- Çakmakçı, R., Mosber, G., Milton, A. H., Alatürk, F., and Ali, B. 2020. The Effect of Auxin and Auxin-Producing Bacteria on the Growth, Essential Oil Yield, and Composition in Medicinal and Aromatic Plants. *Current Microbiology*, 77(4): 564-577.
- Die, J. V., Gil, J. and Millan, T. 2018. Genome-wide identification of the auxin response factor gene family in *Cicer arietinum*. *BMC genomics*. 19(1): 1-15.
- Egamberdieva, D., Li, L. I., Lindström, K., and Räsänen, L. A. 2016. A synergistic interaction between salt-tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) under salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6): 2829-2841.
- El-Esawi, M. A., Alaraidh, I. A., Alsahli, A. A., Alamri, S. A., Ali, H. M. and Alayafi, A. A. 2018. *Bacillus firmus* (SW5) augments salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.) by modulating root system architecture, antioxidant defense systems and stress-responsive genes expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132: 375-384.
- Fathalla, A. and El-Mageed, A. A. 2020. Salt tolerance enhancement of wheat (*Triticum asativum* L) genotypes by selected plant growth promoting bacteria. *AIMS Microbiology*, 6(3): 250-271.

- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C. P. and Marlétaz, F. 2013.** Evolution of the *ARF* gene family in land plants: old domains, new tricks. *Molecular Biology and Evolution*, 30(1): 45–56.
- Hu, W., Zuo, J., Hou, X., Yan, Y., Wei, Y., Liu, J., Jin, Z. 2015.** The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 6: 742.
- Hidri, R., Mahmoud, O. M.-B., Debez, A., Abdelly, C., Barea, J.-M. and Azcon, R. 2019.** Modulation of C: N: P stoichiometry is involved in the effectiveness of a PGPR and AM fungus in increasing salt stress tolerance of *Sulla carnosa* Tunisian provenances. *Applied Soil Ecology*, 143: 161–172.
- Himmelbach, A., Liu, L., Zierold, U., Altschmied, L., Maucher, H., Beier, F. and Schützendübel, A. 2010.** Promoters of the barley germin-like *GER4* gene cluster enable strong transgene expression in response to pathogen attack. *The Plant Cell*, 22(3): 937–952.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*, 347 (2nd edit).
- Hossain, M. M., Das, K. C., Yesmin, S. and Shahriar, S. 2016.** Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in seed germination and root-shoot development of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under different salinity condition. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries*, 3(1): 105–113.
- Kaashyap, M., Ford, R., Bohra, A., Kuvalekar, A. and Mantri, N. 2017.** Improving Salt Tolerance of Chickpea Using Modern Genomics Tools and Molecular Breeding. *Current Genomics*, 18(6): 557–567.
- Kang, C., He, S., Zhai, H., Li, R., Zhao, N. and Liu, Q. 2018.** A sweetpotato auxin response factor gene (*IbARF5*) is involved in carotenoid biosynthesis and salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1307.
- Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Korshunova, T., Bakaeva, M., Loginov, O. and Dodd, I. C. 2019.** Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1368.
- Kumar, R., Tyagi, A. K. and Sharma, A. K. 2011.** Genome-wide analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Molecular Genetics and Genomics*, 285(3): 245–260.
- Lavy, M. and Estelle, M. 2016.** Mechanisms of auxin signaling-Development. 143(18): 3226–3229.
- Leveau, J. H. J. and Lindow, S. E. 2005.** Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol*, 71(5): 2365–2371.
- Liu, N., Dong, L., Deng, X., Liu, D., Liu, Y., Li, M. and Yan, Y. 2018.** Genome-wide identification, molecular evolution, and expression analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family in *Brachypodium distachyon* L. *BMC Plant Biology*, 18(1):336.
- Liu, Y., Chen, L., Zhang, N., Li, Z., Zhang, G., Xu, Y. and Zhang, R. 2016.** Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4): 324–330.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4): 402–408.
- Loper, J. E. and Schroth, M. N. 1986.** Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. *Phytopathology*, 76(4): 386–389.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J. C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farías-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L. I. and Valencia-Cantero, E. 2007.** *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin-and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2): 207–217.
- Luo, J., Zhou, J.-J. and Zhang, J.-Z. 2018.** *Aux/IAA* Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1): 259.
- Malik, D. K. and Sindhu, S. S. 2011.** Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp. Effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. *Cicer* on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 17(1): 25–32.
- Patten, C. L. and Glick, B. R. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol*, 68(8): 3795–3801.
- Pesqueira, J., García, M. D., Staltari, S. and Molina, M. d. C. 2006.** NaCl effects in *Zea mays* L. x *Tripsacum dactyloides* (L.) L. hybrid calli and plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3): 286–290.
- Raheem, A., Shaposhnikov, A., Belimov, A. A., Dodd, I.**

- C. and Ali, B. 2018.** Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. Archives of Agronomy and Soil Science, 64(4): 574-587.
- Rahman, A., Sitepu, I. R., Tang, S.-Y. and Hashidoko, Y. 2010.** Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 74(11): 2202-2208.
- Samineni, S., Siddique, K. H., Gaur, P. M. and Colmer, T. D. 2011.** Salt sensitivity of the vegetative and reproductive stages in chickpea (*Cicer arietinum* L.): podding is a particularly sensitive stage. Environmental and Experimental Botany, 71(2):260-268.
- Senthilraj, R., Prasad, G. S. and Janakiraman, K. 2016.** Sequence-based identification of microbial contaminants in non-parenteral products. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 52: 329-336.
- Shilev, S., Naydenov, M., Prieto, M. S., Vassilev, N. and Sancho, E. D. 2012.** PGPR as inoculants in management of lands contaminated with trace elements Bacteria in Agrobiology. Stress Management, Springer. 259-277.
- Shrivastava, P. and Kumar, R. 2015.** Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi journal of biological sciences, 22(2): 123-131.
- Singh, V. K. and Jain, M. 2015.** Genome-wide survey and comprehensive expression profiling of *Aux/IAA* gene family in chickpea and soybean. Frontiers in plant science, 6 (918):1-15.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS microbiology reviews, 31(4): 425-448.
- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. 2011.** Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3(4): a001438.
- Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. 2003.** The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. The Plant Cell, 15(2): 533-543.
- Tsukanova, K., Meyer, J. and Bibikova, T. 2017.** Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. South African Journal of Botany, 113: 91-102.
- Ul Hassan, T. and Bano, A. 2019.** Construction of IAA-deficient mutants of *Pseudomonas moraviensis* and their comparative effects with wild type strains as bio-inoculant on wheat in saline sodic soil. Geomicrobiology journal, 36(4): 376-384.
- Wagi, S. and Ahmed, A. 2019.** *Bacillus* spp. potent microfactories of bacterial IAA. PeerJ, 7: e7258.
- Wang, S., Bai, Y., Shen, C., Wu, Y., Zhang, S., Jiang, D., Guilfoyle, T. J., Chen, M. and Qi, Y. 2010.** Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. Functional and integrative genomics, 10(4): 533-546.
- Xiong, L., Wang, R.-G., Mao, G. and Koczan, J. M. 2006.** Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. Plant physiology, 142(3): 1065-1074.