

## تأثیر جمعیت‌های مختلف برخی عوامل پروبیوتیک بر آنزیم‌های دخیل در مقاومت، جذب عناصر کم مصرف و میزان کلروفیل و کارتنوئید در پسته

نجمه حاج عبدالهی<sup>۱</sup>، روح‌الله صابری ریشه<sup>۲\*</sup>، پژمان خداگان<sup>۳</sup>، محمد مرادی<sup>۴</sup>، کبری مسلم‌خانی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی دکتری کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، کرمان، ایران.

۲ و ۳. دانشیاران بخش بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، کرمان، ایران.

۴. استادیار بخش بیماری‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات پسته رفسنجان، کرمان، ایران.

۵. دانشیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷)

### چکیده

کلونیزاسیون و جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست در ناحیه ریزوسفر نقش تعیین‌کننده‌ای در ایفای اثر آنتاگونیستی آن‌ها دارد. در این مطالعه به منظور تعیین جمعیت بهینه باکتری‌های آنتاگونیست به گونه‌ای که بتوانند باعث القای حداکثری توان دفاعی گیاه شوند، و هم‌چنین به منظور بررسی اثر جمعیت اولیه مایه‌زنی شده با میزان برخی آنزیم‌های دخیل در مقاومت گیاه، میزان جذب عناصر کم مصرف، کلروفیل و کارتنوئید مقدار آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایاز، فنل کل، پروتئین کل، روی، آهن، منگنز، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در جمعیت‌های  $10^4$ ،  $10^6$  و  $10^8$  CFU/ml در چهار باکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* VUPF5، *P. fluorescens* T-17، *Bacillus subtilis* V1 و *B. subtilis* 96 در گیاه پسته رقم سرخس اندازه‌گیری شد. آزمایشات در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی و با سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. بررسی‌ها نشان داد علیرغم متفاوت بودن نتایج حاصل از اثر تیمارهای جمعیتی گوناگون باکتری‌ها بر روی فاکتورهای مطالعه شده، همه تیمارهای جمعیتی از یک الگوی ثابت پیروی می‌کنند به گونه‌ای که با افزایش جمعیت باکتری میزان آنزیم‌ها، فنل کل اندازه‌گیری شده، میزان عناصر کم مصرف، کلروفیل و کارتنوئید نیز افزایش می‌یابد. **واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های دفاعی، باکتری‌های آنتاگونیست، جمعیت باکتری، عناصر کم مصرف، کلروفیل.

### Effect of different population of some probiotic bacteria in amount of defense enzymes, microelements uptake, chlorophyll and carotenoids in pistachio

Najmeh Hajabdollahi<sup>1</sup>, Roohallah Saberi Rیشه<sup>2\*</sup>, Pejman Khodaygan<sup>3</sup>, Mohammad Moradi<sup>4</sup>, Kobra Moslemkhani<sup>5</sup>

1. Phd student of biological control of plant disease, Vali-e-Asr university of Rafsanjan, Kerman, Iran.

2,3. Associate professors in plant pathology department, Vali-e-Asr university of Rafsanjan, Kerman, Iran.

4. Assistant professor in plant pathology, Pistachio research center, Rafsanjan, Kerman, Iran.

5. Associate professor in Seed and plant certification and registration institute, agricultural research, education and extension organization, Tehran, Iran.

(Received: Dec 18, 2020- Accepted: Marc 7, 2021)

### ABSTRACT

Colonization and population of antagonistic bacteria on rhizosphere have a definite role on their antagonistic effect. In this study in order to determine optimal population density of antagonistic bacteria, in a way that they would be able to induce maximal defensive power in plant, and also in order to investigate effect of initial inoculated population and amount of plant defense enzymes, microelements uptake, chlorophyll and carotenoids; level of peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia lyase, total phenolic compounds, total protein, Zn, Fe, Mn, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids in population of  $10^4$ ,  $10^6$  and  $10^8$  of four antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* VUPF5, *P. fluorescens* T-17, *Bacillus subtilis* V1 and *B. subtilis* 96 in Sarakhs cultivar of pistachio was measured. Experiments were done in randomized complete block design with three replications per each treatment. Studies showed in the measured factors despite of diverse results in bacterial populational treatments, all populational treatments follow a constant pattern in a way that along with increasing in bacterial population, amount of measured enzymes, total phenol content, microelements, chlorophyll and carotenoids increases.

**Key words:** Antagonistic bacteria, Bacterial population, Chlorophyll, Defense enzymes, Microelements.

## مقدمه

پسته پس از نفت و فرش به عنوان سومین محصول مهم صادراتی ایران محسوب شده و اهمیت اقتصادی بسزایی برای کشور دارد. عوامل بیماری زای متعددی از درختان پسته جداسازی شده است که روی قسمت های مختلف درخت شامل ریشه، طوقه، ساقه و برگ ایجاد بیماری می کنند. (Teviotdale *et al.* 2002). در کنترل آفات و بیماری های گیاهی آلودگی های ناشی از کاربرد سموم سبب شده است که کشورها و سازمان های متولی امر تولید محصولات کشاورزی به سوی تدابیر و راهبردهای مناسب مبتنی بر ترکیبات غیرشیمیایی در مدیریت مبارزه با آفات و بیماری های گیاهی گام بردارند. در این بین، کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش نوین و متفاوت، دورنمایی جذاب و جالب از خود به جهانیان نشان داده و افکار عمومی را به خود جلب کرده است (Hasanzadeh 1992).

باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR) گروهی از باکتری های آزادی هستند که به دنبال کلنیزه کردن ریزوسفر باعث افزایش رشد گیاه می شوند. تاکنون، تأثیر طیف وسیعی از باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه در برابر عوامل بیماری زای گیاهی، به خصوص *P. fluorescens* و برخی گونه های جنس *Bacillus* در کنترل بیولوژیک به اثبات رسیده است (Weller 1988, Khan *et al.* 2018, Moradi *et al.* 2018, Khatamidoost *et al.* 2014). مهمترین مکانیسم های مورد استفاده در باکتری های آنتاگونیست شامل رقابت برای جذب مواد غذایی و اشغال جایگاه های مناسب برای رشد بیمارگرها، تولید سیدروفورها، تولید آنتی بیوتیک ها، القای مقاومت، تولید و افزایش فعالیت آنزیم های درگیر در دفاع گیاه و تولید سیانید هیدروژن می باشد (Kloepper *et al.* 1988, Schippers *et al.* 1990, Jing *et al.* 2007).

به دنبال مایه زنی گیاهان با عوامل بیوکنترل طیف وسیعی از آنزیم های دفاعی مانند PR پروتئین ها، پراکسیداز، بتا-۱ و ۳-گلوکاناز، کیتیناز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز فعال می شوند که در

کاهش توسعه بیماری و تغذیه علف خواران موثر می باشد (Deborah *et al.* 2001, Kumara and Vengadaramana 2017).

بور، مس، آهن، منگنز و روی عناصر ریزمغذی هستند که نقش برجسته ای در رشد، توسعه و متابولیسم گیاه بازی می کنند و کمبود آنها می تواند باعث مستعد شدن گیاهان به حمله بیمارگرها شود و به دنبال آن می تواند کیفیت و همچنین کمیت مواد غذایی را کاهش دهد (Tripathi *et al.* 2015). با وجود نقش حیاتی عناصر کم مصرف در رشد و متابولیسم گیاه، به دلایل گوناگون مانند شرایط خاک همیشه این عناصر به مقدار کافی در دسترس گیاه نیستند. به کار بردن باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه می تواند باعث تسهیل دسترسی گیاهان به این عناصر شود. کلنیزه کردن و پایدار بودن آنتاگونیست ها از مهم ترین عوامل محدود کننده در کاربرد و تجاری سازی این عوامل در کشاورزی پایدار است. یکی از عواملی که سبب افزایش سطح کلنیزاسیون ریشه می شود بالا بودن مقدار جمعیت اولیه باکتری است. جمعیتی از باکتری که روی ریشه استقرار می یابد رابطه مستقیمی با جمعیت اولیه ای که روی بذور استفاده می شود دارد (Fukui *et al.* 1994). بنابراین، دانستن این فاکتورها می تواند به تعیین غلظت بهینه، زمان و مکان مناسب قرارگیری مایه تلقیح و در راهبردهای مدیریتی خاک و محصول به افزایش بقا و تکثیر مایه تلقیح کمک کند (Gardener *et al.* 2002). با توجه به نقش تعیین کننده جمعیت اولیه باکتری در اعمال اثرات آنتاگونیستی در این مقاله به بررسی اثر جمعیت های مختلف از چهار باکتری آنتاگونیست بر روی تغییر میزان آنزیم های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لیاز، فنل کل، میزان روی، آهن، منگنز، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در گیاه پسته پرداخته شد.

## مواد و روش ها

### تهیه بذور و کاشت گیاهان پسته

بذور پسته رقم سرخس از مؤسسه تحقیقات پسته

۱ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

### استخراج پروتئین از بافت برگ گیاه

ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ گیاه را وزن کرده و در یک هاون چینی حاوی ۳ تا ۵ میلی‌لیتر بافر نمونه (پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷/۲)، PVP یک درصد و EDTA یک میلی‌مولار) کاملاً له گردید. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون رویی جهت بررسی میزان تغییرات آنزیمی جدا و تا قبل از انجام آزمایش در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

### اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول

#### پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیمی گایاکول پراکسیداز در برگ‌ها با استفاده از پیش‌ماده گایاکول و روش پلوا و همکاران اندازه‌گیری شد (Plewa et al. 1991). یک واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول گایاکول را در مدت یک دقیقه اکسید می‌کند (فرمول ۱).

$$A = \text{جذب خوانده شده}$$

$$\varepsilon = \text{ضریب خاموشی}$$

$$A = \varepsilon bc \quad (1)$$

$$b = \text{عرض کووت برابر با یک سانتی‌متر}$$

$$c = \text{غلظت آنزیم}$$

### اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل

#### اکسیداز (PPO)

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بر اساس روش نیکولی و همکاران سنجیده شد (Nicolini et al. 1991). فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالل معادل  $(6/2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$  و فرمول  $A = \varepsilon bc$  اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره برگ گیاه به‌دست آمده از روش بردفورد محاسبه

کشور (رفسنجان، کرمان، ایران) تهیه گردید. آماده-سازی بذور جهت کاشت مطابق روش ارائه شده توسط مرادی انجام گرفت (Moradi 1998). خاک گلدان‌ها با بافت شنی-رسی (به نسبت ۲ واحد رس ۱ واحد ماسه) در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار به مدت ۴۵ دقیقه سترون شد. بعد از انتقال بذور جوانه‌زده به گلدان، آبیاری به‌صورت کم و کنترل شده انجام شد تا بذرها دچار پوسیدگی نشوند. دمای گلخانه بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس متغیر بود.

### تهیه سویه‌های باکتریایی و تلقیح گیاهچه‌های

#### پسته

به منظور انجام آزمایش، سه سویه باکتریایی *fluorescens Pseudomonas fluorescenc VUPF5*، *Bacillus subtilis V1* و *P. T-17* از کلکسیون بخش گیاهپزشکی دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان و باکتری *B. subtilis 96* از کلکسیون بخش گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات پسته کشور تهیه گردیدند. پس از گذشت دو ماه از کاشت بذور پسته، جهت افزودن سویه‌های باکتریایی، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی محیط کشت NA کشت داده شدند. سپس، سوسپانسیون‌هایی با غلظت  $10^4$ ،  $10^6$  و  $10^8$  CFU/ml از هر کدام از باکتری‌ها در آب مقطر سترون تهیه و به هر گلدان حاوی نیم کیلوگرم خاک ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده اضافه گردید. بدین صورت که چهار حفره نیمه عمیق در اطراف گیاهچه‌ها ایجاد و پس از تلقیح بلافاصله پوشانیده شد. جهت مایه‌زنی گیاهان شاهد از ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی و با سه تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. پس از گذشت ۳ روز از مایه‌زنی میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل‌آلانیل‌آمونیا لیز و میزان فنل کل و پروتئین کل ارزیابی شد. هم چنین پس از ۴۵ روز میزان عناصر روی، آهن و منگنز مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌فزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال

میلی لیتری ریخته شدند و هر بالون با آب دوبار تقطیر به حجم رسانده شد. غلظت عناصر غذایی در عصاره با استفاده از دستگاه جذب اتمی خوانده شد (Chapman et al. 1961).

### سنجش میزان کلروفیل و کارتنوئید

میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کارتنوئید با استفاده از روش آرنون و روابط ۵-۲ محاسبه گردید (Arnon 1949).

- 2- کلروفیل a (mg.g<sup>-1</sup>fw)=[(12.7 × OD 663) - (2.69 × OD 645)] × V ÷ [1000 × W]  
 3- کلروفیل b (mg.g<sup>-1</sup>fw)=[(22.9 × OD 645) - (4.68 × OD 663)] × V ÷ [1000 × W]  
 4- کلروفیل کل (mg.g<sup>-1</sup>fw)=[(8.02 × OD 663) + (20.2 × OD 646)] × V ÷ [1000 × W]  
 5- کارتنوئیدها (mg.g<sup>-1</sup>fw)=[(7.6 × OD 480) - (1.49 × OD 510)] × V ÷ [1000 × W]  
 W- وزن تر نمونه  
 V- حجم نهایی عصاره (۱۰ میلی لیتر)

### نتایج

#### بررسی میزان آنزیم گایاکول پراکسیداز

بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که در بین سویه های باکتریایی، باکتری *P. fluorescens* T-17 قادر به القای تولید آنزیم بیشتری در گیاه نسبت به سایر سویه هاست و در این میان سویه VUPF5 کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان داد (شکل ۱). در سویه های T-17 و 96 بین جمعیت های مختلف باکتری تلقیح شده از لحاظ تولید پراکسیداز اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد وجود داشت، به گونه ای که با افزایش جمعیت میزان تولید آنزیم پراکسیداز روند افزایشی نشان داد. در سویه V1 بین جمعیت های ۱۰<sup>۶</sup> و ۱۰<sup>۸</sup> تفاوت معنی داری در فعالیت آنزیم پراکسیداز وجود نداشت و بیشترین میزان تولید آنزیم مربوط به این دو جمعیت بود. سویه VUPF5 در جمعیت اولیه ۱۰<sup>۸</sup> بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان داد؛ اما، بین جمعیت های ۱۰<sup>۶</sup> و ۱۰<sup>۴</sup> تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۱).

گردید (Bradford 1976).

#### اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در برگ های گیاه

فنیل آلانین آمونیا لیاز واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می کند. در این روش از فنیل آلانین به عنوان پیش ماده آنزیم استفاده و فعالیت آنزیم بر حسب مقدار سینامیک اسید تولید شده تخمین زده می شود (Dcunha et al. 1996). جهت محاسبه مقدار سینامیک اسید تولید شده از منحنی استاندارد سینامیک اسید استفاده گردید.

#### ارزیابی میزان پروتئین کل

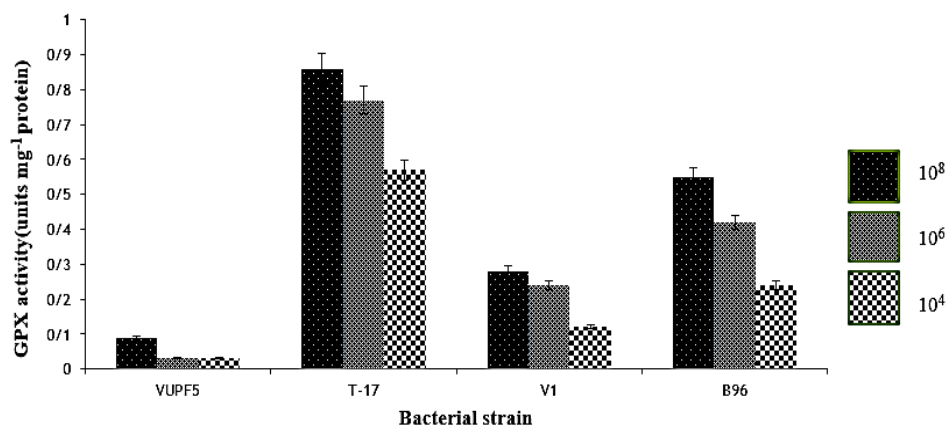
اندازه گیری میزان پروتئین کل در برگ های گیاهچه های پسته مطابق با روش بردفورد انجام و غلظت پروتئین ها با استفاده از منحنی جذب استاندارد OD محاسبه گردید (Bradford 1976).

#### ارزیابی میزان فنل کل

سنجش محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از معرف فولین-سیاکالتئوس انجام شد (Roland and Laima 1999). غلظت ترکیبات فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید.

#### اندازه گیری مقادیر عناصر غذایی در اندام های هوایی گیاهچه های پسته

برای اندازه گیری عناصر آهن، روی و منگنز، ابتدا اندام های هوایی گیاهچه های پسته در تیمارهای مختلف به مدت ۷۲ ساعت در داخل آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس ۵۰۰ میلی گرم از نمونه های خشک و آسیاب شده با تزارو توزین و داخل بوته چینی ریخته شد. نمونه ها در داخل کوره به صورت خاکستر درآمده و پس از خروج نمونه ها از کوره، مقدار ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال به هر بوته چینی اضافه شد. سپس، نمونه ها با عبور از کاغذ صافی به داخل بالون حجمی ۵۰



شکل ۱- فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96  
 Fig 1- Activity of peroxidase enzyme in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۱- گروه‌بندی داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح ۱٪ در جمعیت‌های مختلف سویه‌های VUPF5، T-17 و V1 و B96

Table 1- Grouping of obtained data from the peroxidase activity at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

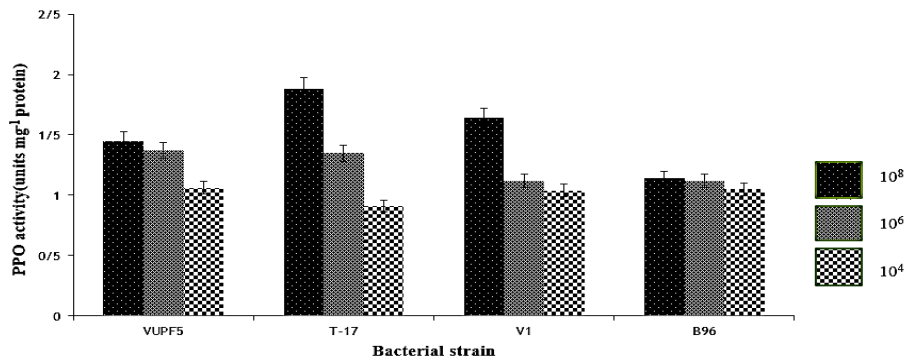
Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	1/46	10 <sup>8</sup>	T-17
B	0/77	10 <sup>6</sup>	T-17
C	0/58	10 <sup>4</sup>	T-17
C	0/55	10 <sup>8</sup>	96
D	0/42	10 <sup>6</sup>	96
E	0/28	10 <sup>8</sup>	V1
E	0/24	10 <sup>6</sup>	V1
E	0/24	10 <sup>4</sup>	96
F	0/12	10 <sup>4</sup>	V1
FG	0/09	10 <sup>8</sup>	VUPF5
GH	0/03	10 <sup>6</sup>	VUPF5
GH	0/03	10 <sup>4</sup>	VUPF5
H	0/005	-	Control

حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

تولید آنزیم PPO در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد؛ اما، در سویه‌های 96 و V1 بین جمعیت‌های ۱۰<sup>۴</sup> و ۱۰<sup>۶</sup> تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲).

**بررسی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز**  
 نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید آنزیم پلی فنل اکسیداز مربوط به جمعیت ۱۰<sup>۸</sup> از باکتری *P. fluorescens* T-17 می‌باشد (شکل ۲). در سویه‌های T-17 و VUPF5 بین هر سه جمعیت باکتری از لحاظ



شکل ۲- فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه های VUPF5، T-17، V1 و B96  
 Fig 2- Activity of polyphenol oxidase enzyme in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۲- گروه بندی داده های حاصل از فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در سطح ۱٪ در جمعیت های مختلف سویه های VUPF5، B96 و V1، T-17

Table 2- Grouping of obtained data from polyphenol oxidase activity at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	1/88	10 <sup>8</sup>	T-17
B	1/64	10 <sup>8</sup>	V1
BC	1/45	10 <sup>8</sup>	VUPF5
C	1/37	10 <sup>6</sup>	VUPF5
CD	1/35	10 <sup>6</sup>	T-17
DE	1/14	10 <sup>8</sup>	96
E	1/12	10 <sup>6</sup>	V1
E	1/12	10 <sup>6</sup>	96
E	1/07	10 <sup>4</sup>	V1
E	1/06	10 <sup>4</sup>	VUPF5
E	1/05	10 <sup>4</sup>	96
E	0/91	10 <sup>4</sup>	T-17
F	0/18	-	Control

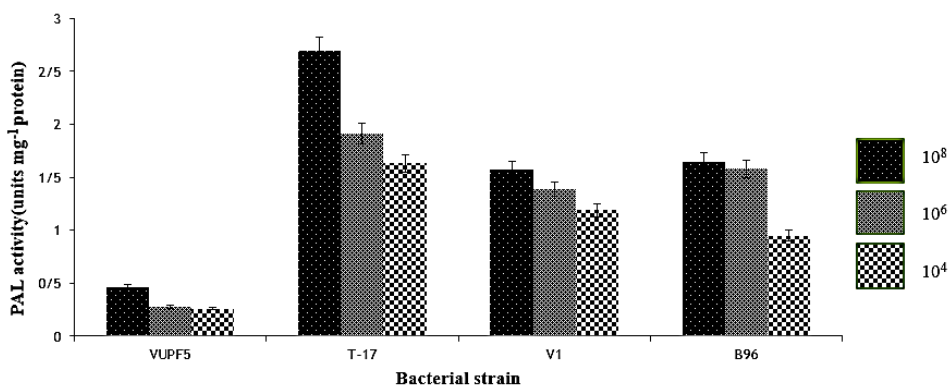
حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

جمعیت های مختلف در میزان تولید آنزیم تفاوت معنی داری وجود داشت و با افزایش جمعیت اولیه تلقیح شده به گیاه سطح آنزیم PAL تولید شده هم افزایش یافت. در سویه 96 بین جمعیت های ۱۰<sup>۶</sup> و ۱۰<sup>۸</sup> و در سویه VUPF5 بین جمعیت های ۱۰<sup>۴</sup> و ۱۰<sup>۶</sup> تفاوت معنی داری در تولید آنزیم PAL دیده نشد.

### بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز

سویه T-17 در تولید آنزیم PAL بسیار موفق عمل کرد (شکل ۳)، به گونه ای که میزان آنزیم تولید شده در جمعیت ۱۰<sup>۴</sup> از این باکتری در گیاهچه پسته تفاوت معنی داری با جمعیت ۱۰<sup>۸</sup> سویه های V1 و 96 نداشت (جدول ۳). در سویه های T-17 و V1، بین



شکل ۳- فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96  
 Fig 3- Activity of phenylalanine ammonia lyase enzyme in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۳- گروه‌بندی داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیاز در سطح ۱٪ در جمعیت‌های مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96

Table 3- Grouping of obtained data from polyphenol oxidase activity at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	2/69	10 <sup>8</sup>	T-17
B	1/91	10 <sup>6</sup>	T-17
BC	1/65	10 <sup>8</sup>	96
BC	1/63	10 <sup>4</sup>	T-17
BC	1/58	10 <sup>6</sup>	96
BC	1/57	10 <sup>8</sup>	V1
BCD	1/39	10 <sup>6</sup>	V1
CD	1/19	10 <sup>4</sup>	V1
DE	0/95	10 <sup>4</sup>	96
EF	0/46	10 <sup>8</sup>	VUPF5
F	0/28	10 <sup>6</sup>	VUPF5
F	0/26	10 <sup>4</sup>	VUPF5
F	0/08	-	Control

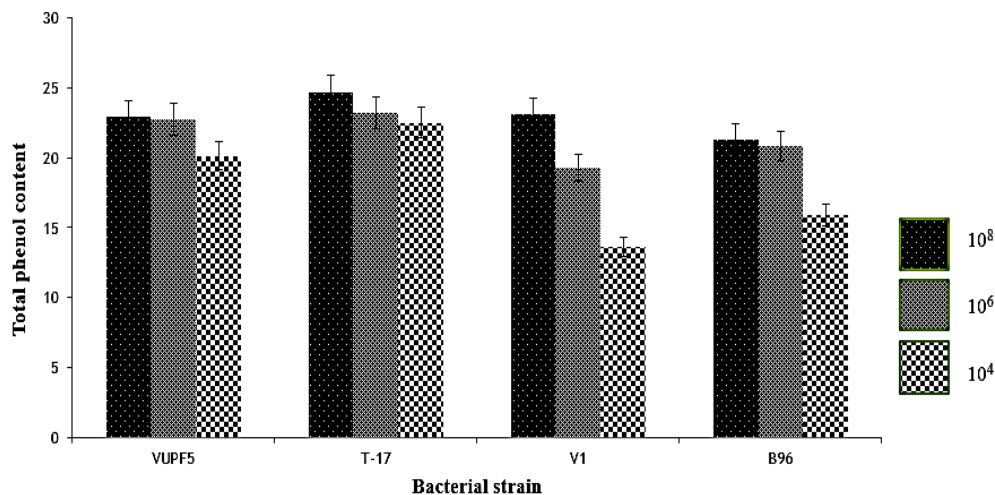
حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

معنی‌داری وجود داشت و با کاهش جمعیت مایه‌زنی شده اولیه، میزان فنل نیز کاهش یافت. در سویه‌های VUPF5 و 96 میان جمعیت‌های ۱۰<sup>۶</sup> و ۱۰<sup>۸</sup> تفاوت معنی‌داری یافت نشد (جدول ۴).

### بررسی میزان فنل کل

بیشترین میزان فنل در گیاهانی که جمعیت ۱۰<sup>۸</sup> از سویه T-17 به آن‌ها مایه‌زنی شده بود، ردیابی شد (شکل ۴). در سویه‌های T-17 و V1 میان جمعیت‌های مختلف باکتری در میزان تولید فنل در گیاه تفاوت



شکل ۴- میزان فنل کل در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه های VUPF5، T-17، V1 و B96

Fig 4- Amount of total phenol in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۴- گروه بندی داده های حاصل از میزان فنل کل در سطح ۱٪ در جمعیت های مختلف سویه های VUPF5، T-17، V1 و B96

Table 4- Grouping of obtained data from amount of total phenol content at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	24/70	10 <sup>8</sup>	T-17
AB	23/21	10 <sup>6</sup>	T-17
AB	23/14	10 <sup>8</sup>	V1
AB	22/9	10 <sup>8</sup>	VUPF5
AB	22/73	10 <sup>6</sup>	VUPF5
AB	22/52	10 <sup>4</sup>	T-17
AB	21/33	10 <sup>8</sup>	96
AB	20/83	10 <sup>6</sup>	96
B	20/11	10 <sup>4</sup>	VUPF5
BC	19/29	10 <sup>6</sup>	V1
CD	15/89	10 <sup>4</sup>	96
DE	13/62	10 <sup>4</sup>	V1
E	10/04	-	Control

حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

اثرات متقابل تیمار-جمعیت فاکتورهای آنزیمی و فنل کل در جدول ۵ نشان داده شده است.



جدول ۵- اثرات متقابل تیمار-جمعیت در فاکتورهای پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایز و فنل کل  
Table 5- Statistical interactions of treatment\*population in amount of peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammoniolyase and total phenolic compounds

Mean of squares					
Total phenol content	Polyphenol oxidase	Polyphenol oxidase	Peroxidase	Degree of freedom	Sources of variation
85/04**	1/97**	0/79**	0/25**	14	Treatment*Population
11/77	17/99	11/9	19/12		Coefficient of variation
4/84	0/08	0/01	0/002		Error

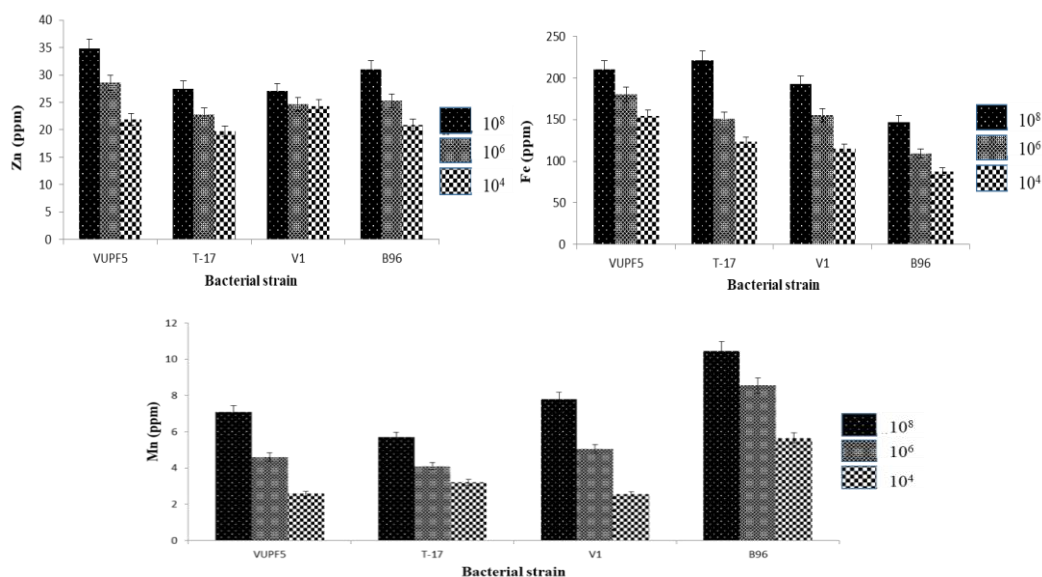
\*\* - Significant differences at 1% probability level

\*\* - وجود اختلاف در سطح ۱٪

می‌باشد. سویه 96 در میزان منگنز ذخیره شده در گیاهچه‌ها در مقایسه با سایر سویه‌ها عملکرد بهتری نشان داد، چرا که میزان منگنز حتی در جمعیت  $10^6$  از این سویه بالاتر از جمعیت  $10^8$  سایر سویه‌ها بود. در هر سه عنصر اندازه‌گیری شده در تمامی سویه‌های مورد آزمایش بین جمعیت‌های مختلف مایه‌زنی شده و میزان عناصر تفاوت معنی‌داری وجود داشت و با افزایش جمعیت باکتری تلقیح شده میزان عناصر نیز در گیاهچه‌ها افزایش یافت (شکل ۵ و جدول ۶).

### میزان عناصر روی، آهن و منگنز

با اندازه‌گیری میزان روی در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده پسته مشاهده شد که میزان روی در جمعیت  $10^8$  از سویه VUPF5 در مقایسه با سایر سویه‌ها و جمعیت‌ها از همه بالاتر بود و کمترین میزان روی در گیاهچه‌ها متعلق به جمعیت  $10^4$  از سویه‌های 96 و T-17 بود. بررسی‌ها پیرامون میزان عنصر آهن در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده بیانگر بالا بودن میزان این عنصر در جمعیت  $10^8$  از سویه T-17 در مقایسه با سایر سویه‌ها



شکل ۵- میزان عناصر روی، آهن و منگنز بر حسب ppm در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96

Fig 5- Amount of Zn, Fe and Mn elements in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۶- گروه بندی داده های حاصل از اندازه گیری عناصر آهن، روی و منگنز در سطح ۱٪ در جمعیت های مختلف سویه های B96 و V1, T-17, VUPF5

Table 6- Grouping of obtained data from amount of Zn, Fe and Mn at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

Fe				Zn			
Grouping at 1% probability	Mean	Population (CFU/ml)	Treatment	Grouping at 1% probability	Mean	Population (CFU/ml)	Treatment
A	221/45	10 <sup>8</sup>	T-17	A	34/8	10 <sup>8</sup>	V5
AB	210/05	10 <sup>8</sup>	V5	B	31/05	10 <sup>8</sup>	96
AB	192/90	10 <sup>8</sup>	V1	BC	28/55	10 <sup>6</sup>	V5
BC	180/40	10 <sup>6</sup>	V5	CD	27/5	10 <sup>8</sup>	T-17
CD	155/45	10 <sup>6</sup>	V1	CDE	27/05	10 <sup>8</sup>	V1
CD	154/05	10 <sup>4</sup>	V5	DEF	25/3	10 <sup>6</sup>	96
CD	151/35	10 <sup>6</sup>	T-17	DEFG	24/65	10 <sup>6</sup>	V1
CDE	147/25	10 <sup>8</sup>	96	EFG	24/3	10 <sup>4</sup>	V1
DEF	123/05	10 <sup>4</sup>	T-17	FGH	22/8	10 <sup>6</sup>	T-17
EFG	115/15	10 <sup>4</sup>	V1	GH	21/9	10 <sup>4</sup>	V5
FG	109/16	10 <sup>6</sup>	96	H	20/85	10 <sup>4</sup>	96
G	87/35	10 <sup>4</sup>	96	H	19/75	10 <sup>4</sup>	T-17
H	33/75	-	Control	I	12/75	-	Control

#### Mn

Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	10/45	10 <sup>8</sup>	96
B	8/55	10 <sup>6</sup>	96
BC	7/80	10 <sup>8</sup>	V1
C	7/10	10 <sup>8</sup>	V5
D	5/70	10 <sup>8</sup>	T-17
D	5/56	10 <sup>4</sup>	96
DE	5/05	10 <sup>6</sup>	V1
DE	4/60	10 <sup>6</sup>	V5
EF	4/10	10 <sup>6</sup>	T-17
FG	3/20	10 <sup>4</sup>	T-17
GH	2/65	10 <sup>4</sup>	V1
GH	2/60	10 <sup>4</sup>	V5
H	1/50	-	Control

حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

اثرات متقابل تیمار-جمعیت در میزان عناصر در جدول ۷ آمده است.

جدول ۷- اثرات متقابل تیمار-جمعیت در میزان عناصر کم مصرف

Table 7- Statistical interactions of treatment\*population in amount of microelements

Mean of squares				
Mn	Fe	Zn	Degree of freedom	Sources of variation
22/94**	11477/4914**	131/27**	14	Treatment*Population
14/56	14/86	7/48		Coefficient of variation
0/48	373/06	2/99		Error

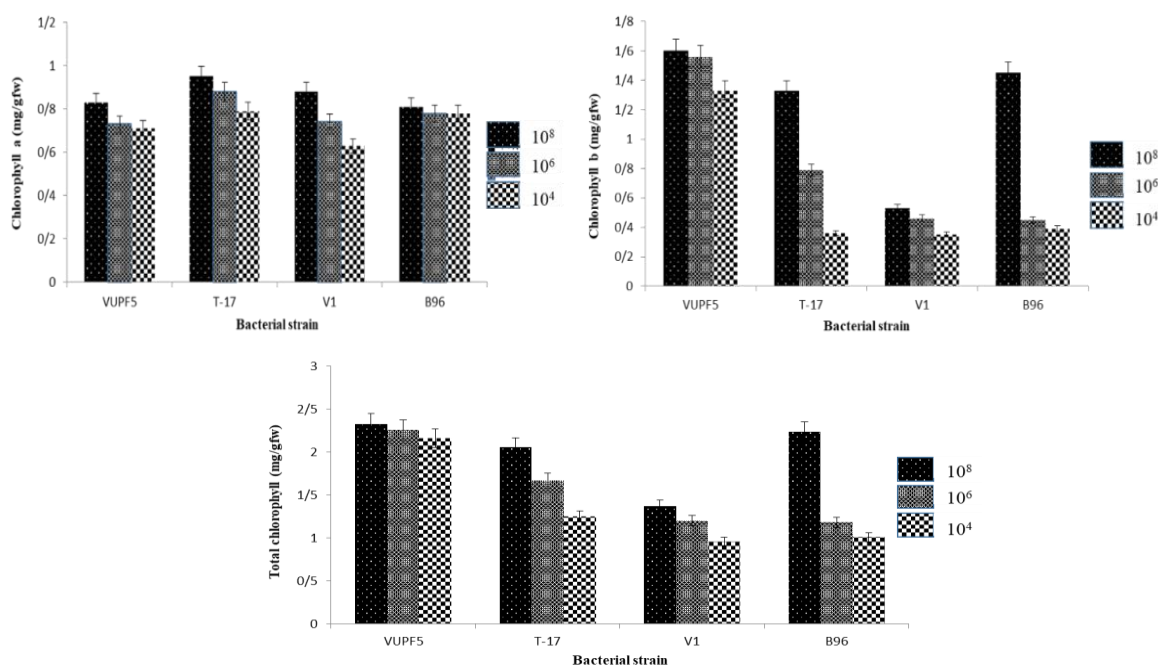
\*\* - Significant differences at 1% probability level

\*\* - وجود اختلاف در سطح ۱٪

نداشت. در تیمارهای سویه 96 میزان کلروفیل b در جمعیت  $10^8$  بالاتر از سایر جمعیت‌ها بود و بین جمعیت  $10^4$  و  $10^6$  تفاوت معنی‌داری دیده نشد. اما در سویه‌های T-17 و V1 بین هر سه جمعیت تفاوت معنی‌دار بود و با کاهش جمعیت اولیه باکتری مایه‌زنی شده میزان کلروفیل b نیز کاهش یافت. داده‌های به‌دست آمده از بررسی میزان کلروفیل کل نشان داد که بین جمعیت‌های مختلف سویه VUPF5 از این لحاظ هیچ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و بیشترین میزان کلروفیل کل در گیاهچه‌ها مربوط به سویه VUPF5 و جمعیت  $10^8$  سویه‌های T-17 و 96 بود. در سویه‌های 96 و V1 بین میزان کلروفیل در جمعیت‌های  $10^4$  و  $10^6$  و تفاوتی وجود نداشت (شکل ۶ و جدول ۸).

### بررسی میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل a بیانگر بالاتر بودن این فاکتور در گیاهچه‌های پسته مایه‌زنی شده با سویه T-17 بود. در سویه‌های T-17 و V1 بین جمعیت‌های مختلف مایه‌زنی شده با باکتری در میزان کلروفیل a تفاوت معنی‌داری وجود داشت و با افزایش جمعیت اولیه افزایش در میزان کلروفیل دیده شد. در سویه‌های VUPF5 و 96 بیشترین میزان کلروفیل a در جمعیت  $10^8$  وجود داشت و بین جمعیت‌های  $10^4$  و  $10^6$  از این بابت تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میزان کلروفیل b در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با جمعیت  $10^6$  و  $10^8$  از سویه VUPF5 بالاتر بود و بین این دو جمعیت تفاوت معنی‌داری از این لحاظ وجود



شکل ۶- میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96

Fig 6- Amount of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll (mg/gr fw) in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۸ - گروه بندی داده های حاصل از میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح ۱٪ در جمعیت های مختلف سویه های B96 و V1، T-17، VUPF5

Table 8- Grouping of obtained data from amount of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

Chlorophyll a				Chlorophyll b			
Grouping at 1% probability	Mean	Population (CFU/ml)	Treatment	Grouping at 1% probability	Mean	Population (CFU/ml)	Treatment
A	0/95	10 <sup>8</sup>	T-17	A	1/60	10 <sup>8</sup>	VUPF5
AB	0/88	10 <sup>6</sup>	T-17	A	1/56	10 <sup>6</sup>	VUPF5
AB	0/88	10 <sup>8</sup>	V1	AB	1/45	10 <sup>8</sup>	96
AB	0/83	10 <sup>8</sup>	VUPF5	B	1/33	10 <sup>4</sup>	VUPF5
AB	0/81	10 <sup>8</sup>	96	B	1/33	10 <sup>8</sup>	T-17
ABC	0/79	10 <sup>4</sup>	T-17	C	0/79	10 <sup>6</sup>	T-17
ABC	0/78	10 <sup>6</sup>	96	D	0/53	10 <sup>8</sup>	V1
ABC	0/78	10 <sup>4</sup>	96	DE	0/46	10 <sup>6</sup>	V1
BC	0/74	10 <sup>6</sup>	V1	DE	0/45	10 <sup>6</sup>	96
BC	0/73	10 <sup>6</sup>	VUPF5	DE	0/39	10 <sup>4</sup>	96
BC	0/71	10 <sup>4</sup>	VUPF5	DE	0/36	10 <sup>4</sup>	T-17
C	0/63	10 <sup>4</sup>	V1	EF	0/35	10 <sup>4</sup>	V1
D	0/43	-	Control	F	0/17	-	Control

#### Total chlorophyll

Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	2/33	10 <sup>8</sup>	VUPF5
A	2/26	10 <sup>6</sup>	VUPF5
A	2/24	10 <sup>8</sup>	96
A	2/16	10 <sup>4</sup>	VUPF5
A	2/06	10 <sup>8</sup>	T-17
AB	1/67	10 <sup>6</sup>	T-17
B	1/37	10 <sup>8</sup>	V1
BC	1/25	10 <sup>4</sup>	T-17
BC	1/20	10 <sup>6</sup>	V1
BC	1/18	10 <sup>6</sup>	96
BC	1/01	10 <sup>4</sup>	96
BC	0/96	10 <sup>4</sup>	V1
C	0/55	-	Control

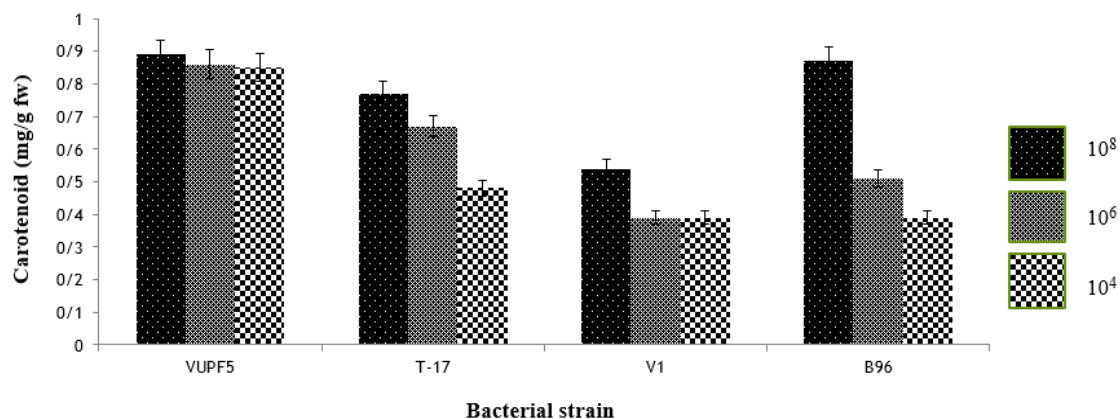
حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین میانگین ها می باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

#### بررسی میزان کارتنوئید

همانند کلروفیل کل، اندازه گیری میزان کارتنوئید در گیاهچه های پسته نشان داد که در جمعیت های مختلف سویه VUPF5 از این لحاظ هیچ تفاوت معنی داری وجود نداشت. بیشترین میزان کارتنوئید در گیاهچه ها مربوط به سویه VUPF5 و جمعیت ۱۰<sup>۸</sup> سویه های T-17 و 96 بود. در سویه های T-17 و 96

بین جمعیت های مختلف سویه ها در میزان کارتنوئید در گیاهچه ها تفاوت معنی داری وجود نداشت و با افزایش جمعیت باکتری تلقیح شده میزان کارتنوئید نیز افزایش یافت. در سویه V1، بیشترین میزان کارتنوئید مربوط به جمعیت ۱۰<sup>۸</sup> بود و بین جمعیت ۱۰<sup>۴</sup> و ۱۰<sup>۶</sup> تفاوت معنی داری دیده نشد (شکل ۷ و جدول ۹).



شکل ۷- میزان کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر در تیمارهای جمعیتی مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96

Fig 7- Amount of carotenoid (mg/g fw) in different populational treatments of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

جدول ۹- گروه‌بندی داده‌های حاصل از میزان کارتنوئید در سطح ۱٪ در جمعیت‌های مختلف سویه‌های VUPF5، T-17، V1 و B96

Table 9- Grouping of obtained data from amount of carotenoids at 1% probability in different population of VUPF5, T-17, V1 and B96 strains

Grouping at 1% probability	Mean	Population(CFU/ml)	Treatment
A	0/89	10 <sup>8</sup>	VUPF5
A	0/87	10 <sup>8</sup>	96
A	0/86	10 <sup>6</sup>	VUPF5
A	0/85	10 <sup>4</sup>	VUPF5
A	0/77	10 <sup>8</sup>	T-17
AB	0/67	10 <sup>6</sup>	T-17
BC	0/54	10 <sup>8</sup>	V1
BC	0/51	10 <sup>6</sup>	96
BC	0/48	10 <sup>4</sup>	T-17
CD	0/39	10 <sup>4</sup>	96
CD	0/39	10 <sup>6</sup>	V1
CD	0/39	10 <sup>4</sup>	V1
D	0/21	-	Control

حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

Dissimilar letters show significant differences between the means

بررسی اثرات متقابل تیمار-جمعیت در کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید در جدول ۱۰ نشان داده

شده است.

جدول ۱۰- اثرات متقابل تیمار-جمعیت در کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید

Table 10- Statistical interactions of treatment\*population in amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids

Mean of squares					
Carotenoids	Total chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Degree of freedom	Sources of variation
0/15**	1/04**	0/90**	0/08**	14	Treatment*Population
23/51	25/76	13/08	12/56		Coefficient of variation
0/01	0/14	0/009	0/008		Error

\*\* - وجود اختلاف در سطح ۱٪

\*\* - Significant differences at 1% probability level

دهنده رشد گیاه با القای مقاومت سیستمیک (ISR) باعث فعال شدن ژن های دفاعی و ساخت ترکیبات موثر در دفاع نظیر آنزیم های دفاعی می شوند. گیاهان مایه زنی شده با باکتری های افزایش دهنده رشد سطوح JA و ET را افزایش می دهند که به عنوان نشانه ای از فعال شدن پاسخ های دفاعی در گیاه می باشد. این مولکول های سیگنال فعال سازی مجموعه بزرگی از ژن های دفاعی را هماهنگ می کنند (Pieters *et al.* 1998). همچنین نتایج نشان داد میزان فنل کل در جمعیت های  $10^6$  و  $10^8$  به طور معنی داری بالاتر از جمعیت  $10^4$  بوده است. میزان عناصر کم مصرف و هم چنین کلروفیل و کارتنوئید نیز با افزایش جمعیت اولیه مایه زنی شده روند صعودی نشان دادند. بنابراین افزایش و توسعه رشد گیاهان به وسیله باکتری های افزایش دهنده رشد، در نتیجه افزایش قابل توجهی از دینامیک جمعیت آن ها در ریزوسفر و رایزوپلن حاصل می شود. نتایج این بررسی مشابه با نتایج تحقیقات یان و همکاران می باشد که گزارش کردند آغشته سازی و مایه زنی بذور گیاهان با جمعیت های اولیه متفاوت، تاثیر مستقیمی بر مقدار جمعیت باکتری روی ریشه می گذارد و به هر نسبت که جمعیت اولیه بیشتری به بذور مایه زنی شوند، کلنیزاسیون بیشتری روی ریشه ی گوجه فرنگی رخ می دهد (Yan *et al.* 2003). به علاوه، کوزمینیا و ملنتو بیان کردند هنگامی که تیمار بذور *Bacillus subtilis* گندم به وسیله باکتری آنتاگونیست

## بحث

توانایی کلنیزه کردن ریزوسفر خصوصیتی مهم برای رایزوباکتریایی است که به عنوان PGPR مطرح می شود. باکتری باید بتواند ناحیه ریزوسفر را کلنیزه کند. بی ثباتی و تغییرپذیری کلنیزاسیون غالباً عامل محدود کننده در استفاده از رایزوباکتریهاست (Ahmadzadeh 2013). یکی از عواملی که سبب افزایش مقدار کلنیزاسیون ریشه می شود، افزایش مقدار جمعیت اولیه باکتری است. در تحقیقات متعدد رابطه مستقیمی بین مقدار جمعیت باکتری روی ریشه و کنترل بیماری به اثبات رسیده است (Bull 1991, Fukui *et al.* 1994, Chin-A-Woeng *et al.* 2003, Patel and Saraf 2017). بررسی دینامیک جمعیت سودوموناس ها در ریزوسفر پیشنهاد می دهد که هرگاه جمعیت اولیه کمتر از  $10^6$  سلول باکتری در میلی لیتر استفاده می شود، رقابت کمی با میکروارگانیزم ها برای کسب مواد غذایی و اشغال فضا به وجود می آید (Fukui *et al.* 1994). شر و همکاران باکتری هایی را کلنیزه کننده می دانند که قادر باشند  $10^8 \times 5$  سلول باکتری به ازای هر گرم ریشه تشکیل دهند (Scher *et al.* 1984). تحقیقات ما نشان می دهد که هرچه جمعیت بالاتری از باکتری به گیاه مایه زنی شود آنزیم های دخیل در مقاومت گیاه نظیر پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز به میزان بیشتری در گیاه تولید می شود. باکتری های افزایش

تحریک شده باشد در آینده در برابر عوامل تهدید کننده از خودش سریع‌تر، قوی‌تر و در مدت زمان طولانی‌تر دفاع می‌کند (Westman et al. 2018). هم چنین در روش پرایمینگ بذر، بذرها با باکتری‌های افزایش دهنده رشد تیمار می‌شوند که باعث می‌شود گیاه بتواند از همان ابتدای جوانه زنی بذر در برابر چالش‌های محیطی گوناگون بهتر مقاومت کند (Singh et al. 2018). از آنجایی که پرایمینگ می‌تواند در جمعیت‌های پایین باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه ایجاد شود و ظرفیت دفاعی گیاه را افزایش دهد به عنوان یک راهکار مناسب در جهت کاهش هزینه‌ها و جایگزینی مناسب در استفاده از سموم شیمیایی مطرح می‌باشد. علی‌رغم اثر مستقیم جمعیت اولیه باکتری بر روی کلنیزاسیون مؤثر ریشه اما باید به این نکته نیز توجه داشت که میزان جمعیت اولیه باید در یک حد آستانه و استاندارد باشد چرا که در گندم جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت بیشتر از یک مقدار مشخصی در حدود  $10^9$  سلول باکتری به ازای هر گرم بذر، گاهی حالت گیاهسوزی ایجاد می‌کند. بیشتر محققان کاربرد  $10^8$  سلول باکتری به ازای هر گرم بذر را بهترین و مؤثرترین مقدار برای کلنیزاسیون ریشه گیاهان می‌دانند. از طرفی گیاهان نیازمند یک مقدار ذخیره مناسب از عناصر کم مصرف هستند که متعاقباً نیازمند یک شبکه هموستتازی فلزی می‌باشد که شامل جذب این عناصر، تجمع آنها در داخل گیاه، متحرک سازی، ذخیره و انتقال بین سلولی است. ذخیره سازی ناکافی و یا در دسترس بودن بیش از حد این عناصر منجر به تولید محدود محصولات در سطح جهانی می‌شود. بنابراین گیاهان به منظور بهره‌وری بهینه نیازمند ذخیره‌سازی و عرضه پایدار این ریزمغذی‌ها در طول فاز رشدی خودشان هستند. در مجموع این عوامل بیانگر اهمیت بهینه سازی جمعیت اولیه مایه زنی شده عوامل بیوکنترل و حفظ این جمعیت بهینه در رایزوسفر می‌باشد.

IB-15 با جمعیت  $10^6$  سلول باکتری انجام گرفت منجر به کلنیزاسیون بیشتر و مؤثرتر ریشه گندم نسبت به زمانی که تیمار با جمعیت  $10^4$  سلول باکتری انجام گرفت، می‌شود. (Kuzmina and Melentiev, 2003).

برخلاف مطالعات قبلی پیرامون نقش مستقیم افزایش کلنیزاسیون در افزایش کارایی بیوکنترل، دگر و همکاران بیان کردند که در مورد مقاومت القایی سیستمیک (Induced systemic resistance) کاهش در کلنیزاسیون ریشه به طور مشخصی منجر به از بین رفتن القای مکانیسم‌های دفاعی نمی‌شود چرا که وجود تعداد کمی از میکروارگانیسم‌های القا کننده بر روی ریشه برای القای پاسخ کافی است و کلنیزه کردن کامل ریشه در این مورد ضروری نیست (Dekkers et al. 2000). مطالعات ما مطابق با نتایج دگر و همکاران تایید می‌کند که ISR در جمعیت‌های پایین هم می‌تواند ایجاد شود چرا که کاربرد جمعیت اولیه  $10^4$  در باکتری‌های مورد استفاده باعث بالا رفتن آنزیم‌های دخیل در ISR مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز در مقایسه با شاهد تیمار شده با آب شد اما متقابلاً نتایج نشان دهنده افزایش میزان این آنزیم‌ها همراه با افزایش جمعیت اولیه باکتری مایه‌زنی شده بود به عبارتی هرچه جمعیت اولیه مایه‌زنی شده بالاتر باشد ISR با شدت بیشتری در گیاه ایجاد شده و ظرفیت دفاعی گیاه بالاتر می‌رود. ایجاد پاسخ‌های دفاعی در گیاه حتی با حضور جمعیت‌های پایین از عوامل بیوکنترل می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت بحث پرایمینگ در افزایش رشد گیاه و القای مقاومت سیستمیک در گیاهان در مقابل استرس‌های زنده و غیرزنده باشد. پرایمینگ در ابتدا بخش کوچکی از پاسخ‌های دفاعی را تحریک می‌کند که باعث افزایش توانایی گیاه در دفاع از خودش در برابر عوامل بیماری‌زای احتمالی در آینده می‌شود. هنگامی که سیستم دفاعی یک گیاه

## REFERENCES

- Ahmadzadeh M (2013) Biological control of plant disease, plant probiotic bacteria. 2th edition. University of Tehran . (In Persian)

- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.**
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.**
- Bull C (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. Phytopathology 81(9): 954-959.**
- Chapman HD, Prah DF (1961) Methods of analysis for soil, plant and water. University of California, Division of Agricultural Science: 60-62.**
- Chin-A-Woeng T, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New phytologist 157(3): 503-523.**
- Dcunha GB, Satyanarayan V, Nair PM (1996) Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 24(1): 17-20.**
- Deborah SD, Palaniswami A, Vidhyasekaran P, Velazhahan, R (2001) Time-course study of the induction of defense enzymes, phenolics and lignin in rice in response to infection by pathogen and non-pathogen. Journal of Plant Diseases and Protection 108: 204-216.**
- Dekker J, Georgopoulos SG (1982) Fungicide Resistance in crop protection. Pudoc. Wageningen, pp 265.**
- Dekkers LC, Mulders IHM, Phoelich CC, Chin-A-Woeng TFC, Wijfjes AHM, Lugtenberg BJJ (2000) The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. Molecular Plant-Microbe Interaction 13: 1177-1183.**
- Dixon RA, Paiva NL, Bhattacharyya MK (1995) Engineering disease resistance in plants: An overview. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, R.P. Singh and U.S. Singh (eds). CRC Press, Boca Raton. pp. 249-270.**
- Fukui R, Schroth MN, Hendson M, Hancock JG (1994) Interaction between strains of pseudomonads in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. Phytopathology 84: 1322-1330.**
- Gardener MS, Fravel DR, Gardener MS, Fravel DR (2002) Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. Plant Health Program.**
- Hasanzadeh N (1992) Biocontrol of soil-born plant disease. 1<sup>st</sup> edition. Pest and plant disease. p17.(In Persian)**
- Jing YD, He ZL, Yang XE (2007) Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Journal of Zhejiang University Science 8: 192-207.**
- Khan N, Martinez-Hidalgo P, Ice TA, Maymon M, Humm EA, Nejat N, Sanders ER, Kaplan D, Hirsch AM (2018) Antifungal activity of *Bacillus* species Against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in microbiology* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02363**
- Khatamidoost Z, Jamali S, Moradi M, Saberi-Riseh R (2014) Effect of Iranian strains of *Pseudomonas* spp. on the control of root-knot nematodes on Pistachios. *Biocontrol science and technology* 25(3): 291-301.**
- Kloepper JW, Lifshitz R, Schroth MN (1988) *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI. Atlas. Aci. Journal of Animal and Plant Sciences: 60-64.**
- Kumara YSMAL, Vengadaramana A (2017) Stimulation of defense enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and chilli (*Capsicum annum* L.) in response to exogenous application of different chemical elicitors. *Universal Journal of Plant Science* 5: 10-15.**
- Kuzmina LY, Melentiev AI (2003) The effect of seed bacterization by *Bacillus Cohn* bacteria on their colonization of the spring wheat rhizosphere. *Microbiology* 72: 230-235.**
- Millaleo R, Reyes-Diaz M, Ivanov AG, Mora ML, Alberdi M (2010) Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of soil science and plant nutrition*. 10(4):470-481**
- Moradi M (1998) Isolation and identification of *Phytophthora* species from root and crown of pistachio in Kerman and Fars provinces and resistance determination of root and crown among current pistachio cultivars. M.Sc. dissertation, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran. (In Persian).**
- Moradi M, Jafari Nejad F, Shahidi Bonjar GH, Fani SR, Mahmudi Mimand B, Probst C, Madani M (2018) Efficacy of *Bacillus subtilis* native strains for biocontrol of *Phytophthora* crown and root rot of pistachio in Iran. *Tropical plant pathology* 43:306-313.**
- Nicoli MC, Elizabel BE, Piotti A, Lericri CR (1991) Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry* 15: 169-184.**
- Patel S, Saraf M (2017) Interaction of root colonizing biocontrol agents demonstrates the antagonistic**



- effect against *fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on tomato. European journal of plant pathology 149: 425-433.
- Plewa MJ, Smith SR, Wanger ED** (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research* 247: 57-64.
- Prasanthath K** (2017) Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. *AgriEast: Journal of Agricultural Sciences* 11: 38-48.
- Roland SF, Laima SK** (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Scher FM, Ziegler JS, Kloepper JW** (1984) A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Canadian Journal of Microbiology* 30(2).
- Schippers B, Bakker AW, Bakker PAHM, Vanpeper R** (1990) Beneficial and deleterious effects of HCN-production pseudomonads on rhizosphere interaction. *Plant Soil* 129: 75-83.
- Singh V, Maharshi A, Singh DP, Upadhyay RS, Sarma BK, Singh HB** (2018) Role of microbial seed priming and microbial phytohormone in modulating growth promotion and defense responses in plants. In: Rakshit A., Singh H. (eds) *Advances in Seed Priming*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0032-5_8)
- Teviotdale BL, Michailides TJ, Pscheidt, JW** (2002) *Compendium of nut crop diseases in temperate zones*. APS Press.
- Tripathi DK, Singh Sh, Singh S, Mishra S, Chauhan DK, Dubey NK** (2015). Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:139.
- Weller DM** (1988) Biological control of soilborne Plant pathogens in the Rhizosphere with bacteria. *Annual review of Phytopathology* 26: 379-407.
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, Thomashow LS** (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-348.
- Westman SM, Kloth KJ, Hanson J, Ohlsson AB, Albrectsen BR** (2019) Defence priming in Arabidopsis- a Meta-Analysis. *Scientific reports* 9:13309 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49811-9>
- Yan Z, Reddy MS, Kloepper JW** (2003) Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology* 49(6).