

تنوع ژنتیکی برخی استرین‌های مهم سودوموناس فلورسنت و تاثیر آن‌ها بر آنزیم‌های دفاعی و پارامترهای رشدی گندم نان

مریم خضری^۱، حسین دشتی^۲، روح‌اله صابری ریشه^{۳*}، مژگان قلی‌زاده وزوانی^۴

۱: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان.

۲: استاد، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان.

۳: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان.

۴: دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۰۸)

چکیده

باکتری‌های سودوموناس فلورسنت مهم‌ترین باکتری‌های ریزوسفری می‌باشند که دارای اثر مثبت روی صفات رویشی و بیوشیمیایی گیاه می‌باشند. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۲۲ استرین سودوموناس فلورسنت و تاثیر آن‌ها بر آنزیم‌های دفاعی و فاکتورهای رویشی گیاه گندم در ارزیابی‌های گلخانه‌ای، مولکولی و بیوشیمیایی انجام شد. در ارزیابی مولکولی ۱۲ آغازگر RAPD به منظور بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی بیوشیمیایی در ۴ مرحله صفر، ۳، ۶ و ۹ روز بعد از تلقیح روی گیاه گندم به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و فنیل‌آلنین‌آمونیا لیاز صورت پذیرفت. استرین VUPF5 روی گندم باعث افزایش وزن اندام هوایی و بیولوژیک گردید. RAPD-PCR تا حدودی استرین‌های دارای مکان جغرافیایی مشابه و میزبان مشابه را تفکیک نمود. گروه‌بندی‌های گلخانه‌ای، مولکولی و بیوشیمیایی تقریباً استرین‌های برتر را شناسایی نمود. استرین‌های ۶۸۰، ۷۳۸، ۵۰، ۳۵۴، ۴۹، ۵۸ و VUPF5 که در ارزیابی مولکولی در یک گروه و دارای اثر مثبت بودند، با گروه برتر آنزیم‌ها مشترک بودند. T26-2 و F-68 در آغازگرهای OP-I15 و OP-H8 به ترتیب نوارهایی با طول ۱۳۰۰bp و ۱۲۰۰bp را تکثیر نمودند که این نوارها می‌توانند بعد از بررسی‌های بیشتر به عنوان نوارهای کاندید در بیان این آنزیم‌ها در گندم مورد مطالعه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، گندم، VUPF5، OP-H8.

Genetic diversity of some important strains of *Pseudomonas fluorescens* and their effects on defense enzymes and growth parameters of bread wheat

Maryam Khezri¹, Hossein Dashti², Roohallah Saberi Rیشه^{3*}, Mozghan Gholizadeh Vazvani⁴

1: Graduate Master of Biotechnology, Genetic and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran

2: Professor, Department of Genetics and Plant Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran,

3: Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran, Corresponding author

4: PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan.

(Received: December 19, 2020 - Accepted: March 28, 2021)

Abstract

Pseudomonas fluorescens bacteria are the most important rhizosphere bacteria that have a positive effect on vegetative and biochemical traits of the plant. In this study, genetic diversity of 22 *Pseudomonas fluorescens* strains and their effect on defense enzymes and growth factors of wheat plant were performed in three stages of greenhouse, molecular and biochemical evaluation. In molecular evaluation, 12 RAPD primers were used to evaluate the genetic diversity of strains. Biochemical evaluation was performed in 4 stages of 0, 3, 6 and 9 days after inoculation on wheat to measure the defense enzymes peroxidase and phenylalanine ammoniolyase. VUPF5 strain on wheat increased shoot and biological weight. RAPD-PCR separated strains with similar geographic location and similar host. Greenhouse, molecular, and biochemical groupings identified almost the top strains. Strains 680, 738, 50, 354, 49, 58 and VUPF5, which had a positive effect on molecular evaluation in one group, were shared with the superior group of enzymes. T26-2 and F-68 in OP-I15 and OP-H8 primers amplified 1300 bp and 1200 bp bands, respectively with these bands can be evaluated after further studies as candidate bands in the expression of these enzymes in wheat.

Key Words: Cluster analysis, genetic diversity, VUPF5, OP-H8, wheat.

مقدمه

بعضی از باکتری‌های ریزوسفری که به آن‌ها باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) اطلاق می‌گردد، از جمله منابع زیستی می‌باشند که باعث بهبود رشد گیاه می‌شوند (Todar 2004). بعضی از ریزجانداران موجود در ریزوسفر با مکانیسم‌های مختلفی باعث تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک در گیاه شده که مجموعه این تغییرات روی رشد گیاه، تغذیه و سلامت آن تاثیر دارد. امروزه اصطلاح PGPR در معنای وسیع‌تری به کار رفته و برای برخی دیگر از باکتری‌های فعال ریزوسفری که تاثیر مشخصی در افزایش رشد گیاه نشان داده‌اند، مانند *Bacillus*، *Klebsiella*، *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*، *Agrobacterium* و *Serratia* نیز به کار می‌رود. در حال حاضر سویه‌های موثری از سودوموناس‌های فلورسنت شناسایی و از آن‌ها به منظور اهداف فوق استفاده می‌شود. باکتری‌های جنس سودوموناس و بخصوص گونه فلورسنت از مهم‌ترین اعضای جامعه باکتری‌های ریزوسفری می‌باشند که پژوهش‌های زیادی در خصوص صفات PGPR و اثرات مثبت ناشی از تلقیح آن‌ها بر رشد گیاه صورت گرفته است (Holt and Williams *et al.* 1989). سودوموناس‌های فلورسنت به دو صورت مستقیم (تحریک رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیک) مانند تولید هورمون‌های گیاهی، حل‌کنندگی فسفات، تسریع فرآیند معدنی شدن) و یا غیر مستقیم (کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانید، سیدروفور، متابولیت‌های ضد قارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها) به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (Abbass and Okon 1993). تاثیر مثبت گونه‌های باکتری *Pseudomonas sp.* مانند *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. chlororaphis* بر رشد گیاهان به واسطه بهبود تغذیه گیاه (با قابلیت افزایش حلالیت و سهولت جذب فسفر) و نیز تولید (هورمون ایندول استیک اسید IAA) گزارش شده است (Patten and Glick 2002, Kang *et al.* 2006, Avis *et al.* 2008). افزایش قابل توجه عملکرد گندم، افزایش معنی‌دار وزن هزار دانه تحت تیمار سویه‌های مختلف باکتری

سودوموناس در مقایسه با شاهد گزارش شده است (Pirdashti *et al.* 2010). در پی تیمار گیاهان با PGPR، افزایش چشمگیری در مقدار فیتوالکسین‌ها (Van Peer *et al.* 1991)، ترکیبات فنلی (M'piga *et al.* 1997)، پراکسیدازها (Anderson and Guerra 1985)، سطوح mRNA های شناساگر فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL) و همچنین میزان چوبی شدن گیاه، مشاهده شده است (Anderson and Guerra 1985). به نظر می‌رسد که عوامل تقویت‌کننده مقاومت، مانند باکتری‌های *P. fluorescens* می‌تواند سطح و یا مدت این حفاظت را افزایش دهند. برای استفاده موفق از باکتری‌های سودوموناس، به عنوان PGPR در کشاورزی، مهم است که تنوع ژنتیکی و تنوع متابولیک آن‌ها و ظرفیت تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها درک شود. نشان دادن تنوع سودوموناس‌های فلورسنت با توجه به ویژگی‌های فنوتیپی و شناسایی آن‌ها در سطح بیولوژیکی دشوار است. تکنیک‌های اثر انگشت مولکولی یک روش جالب و قابل اعتماد برای شناسایی و فهرست‌بندی ایزوله‌های مرتبط ارائه می‌کند. مطالعه تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی *Pseudomonas spp.* و پتانسیل رشد گیاهان نه تنها برای درک مهم نقش اکولوژیکی آن‌ها در ریزوسفر و تعامل آن‌ها با گیاهان است، بلکه برای هرگونه کاربرد بیوتکنولوژی مهم است. تکنیک‌های مولکولی مختلفی برای شناسایی، همچنین بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های مختلف سودوموناس‌های فلورسنت استفاده شده است (Kumar *et al.*, 2002; Mavrodi *et al.* 2001). برای ایجاد شناسایی موثر از استرین‌های سودوموناس به عنوان یک عامل کنترل زیستی، رابطه درون‌گونه‌ای باید بررسی گردد، که در این میان استفاده از مارکرهای مولکولی این رابطه را نشان می‌دهد. یکی از این مارکرها، مارکر RAPD است که تنوع ژنتیکی را به خوبی نشان می‌دهد (Rayar *et al.* 2015). تکنیک RAPD-PCR روشی مفید برای تعیین تنوع ژنتیکی در سطح جمعیت است (Diaz *et al.* 2010) و همچنین نتایجی که توسط تجزیه RAPD بدست آمده است، مشابه نتایج تکنیک‌های AFLP، RFLP، SSR و مارکرهای ایزوزایم می‌باشد (Powell *et al.* 1996).

مواد و روش‌ها

استرین‌های باکتری مورد استفاده

۲۲ استرین باکتریایی *Pseudomonas fluorescens*، از کلکسیون کنترل بیولوژیک آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه شد. مشخصات و نام استرین‌ها در جدول ۱ آورده شده است

از آنجایی که باکتری‌های محرک رشد به طور مستقیم و غیر مستقیم باعث بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شوند و حضور این باکتری‌ها در خاک به انحلال و جذب فسفر توسط گیاه کمک می‌نماید، ما در این پژوهش، علاوه بر بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های سودوموناس، پتانسیل و کارایی این ۲۲ استرین را در افزایش عملکرد و افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی در گندم بررسی نموده‌ایم.

جدول ۱- استرین‌های باکتری مورد مطالعه

Table 1- Bacterial strains studied

Strain	Host plant	Origin
CHA0	Tobacco rhizosphere	Strain Reference, Switzerland
VUPF5	Pistachio rhizosphere	Rafsanjan
T26-2	Wheat rhizosphere	Bijar
T17-4	Pistachio rhizosphere	Khatoon-Abad, Shahr-e-Babak
F-68	Wheat rhizosphere	Raviz, Rafsanjan
44	Apple rhizosphere	Damavand
49	Pistachio rhizosphere	Sirjan
50	Apricot rhizosphere	Lavasan
58	Peach rhizosphere	Karaj
60	Pomegranate rhizosphere	Saveh
67	Walnut rhizosphere	Chaloos
84	Citrus rhizosphere	Jahrom, Fars
95	Onion rhizosphere	Sirch, Kerman
156	Corn rhizosphere	Jiroft
240	Apple rhizosphere	Jaban
305	Citrus rhizosphere	Sari
354	Bean rhizosphere	Karaj
409	Cucumber rhizosphere	Jiroft
506	Pistachio rhizosphere	Rafsanjan
680	Chickpea rhizosphere	Rviz, Rafsanjan
686	Almond rhizosphere	Riseh, Shahr-e-Babak
738	Plum rhizosphere	Paghaleh, Shahr-e-Babak

با 0.5×10^{11} CFU/ml (معادل سلول باکتری).

کشت در گلخانه، تلقیح با سوسپانسیون باکتری و انجام نمونه‌برداری

ماسه و خاک (به ترتیب به نسبت ۱ به ۲) در گلدان‌های یک کیلوگرمی ریخته و در هر گلدان تعداد هفت بذر رقم فلات گندم تهیه شده از کلکسیون بذر دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان کشت گردید. آزمایش با ۲۳ تیمار (۲۲ استرین باکتری + یک شاهد) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در مرحله چهاربرگی نمونه‌برداری روز صفر و پس از آن تلقیح با سوسپانسیون باکتری انجام گرفت و در زمان‌های ۳، ۶ و ۹ روز بعد از تلقیح، نمونه‌برداری‌های دوم، سوم و چهارم از گیاهچه‌ها انجام گرفت.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری

برای استفاده از استرین‌های موردنظر، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در لوله‌ی آزمایش استریل شد و سپس با لوپ، کلنی حاصل از کشت ۲۴ ساعته باکتری جمع‌آوری گردید و سوسپانسیونی از آن تهیه و در یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. به منظور اعمال آزمون ابتدا از سوسپانسیون تهیه شده یک لوپ در محیط NA کشت شده تا از عدم آلودگی اطمینان حاصل شود و سپس تعداد سلول باکتری مورد نظر تنظیم گردید.

در آزمایش مربوط به کنترل بیولوژیک با استفاده از باکتری، از OD مشخصی جهت آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای استفاده می‌شود. به همین دلیل پس از آماده‌سازی سوسپانسیون، توسط دستگاه اسپکتوفتومتر غلظت باکتری‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر در OD برابر

اندازه‌گیری آنزیم‌های دفاعی و ارزیابی گلخانه‌ای

میزان آنزیم‌های پراکسیداز (Plewa *et al.* 1991)، فنیل‌آلانین‌آمونیاایز (D'cunha *et al.* 1996) و میزان پروتئین کل (Bradford 1976) در چهار مرحله نمونه‌برداری با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید و بعد از پایان دوره رویشی گندم، صفات ارتفاع بوته، طول پدانکل، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، طول خوشه و وزن خشک بیولوژیک اندازه‌گیری گردید.

مطالعات مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی با آغازگرهای RAPD

استخراج DNA باکتری

تهیه محلول‌ها و بافرهای لازم جهت استخراج DNA به منظور آماده‌سازی DNA، مطابق روش آیسوبل و همکاران صورت گرفت (Ausubel *et al.* 1992). به منظور اندازه‌گیری کیفیت DNA استخراجی از ژل آگارز ۱٪ و بافر TBE 1X استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری کمیت DNA، از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

آغازگرهای مورد استفاده

آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- توالی پرایمرهای RAPD
Table 2- Primers sequence for RAPD

Primer	Primer sequence
UBC-239	5-CTGAAGCGGA-3
UBC-301	5-CGGTGGCGAA-3
UBC-465	5-GGTGAGGGCT-3
UBC-292	5-AAACAGCCCG-3
UBC-775	5-GGTTTGGTGG-3
UBC-556	5-ATGGATGACG-3
OP O-14	5-AGCATGGCTC-3
H-8	5-GAAACACCCC-3
I-15	5-TCATCCGAGG-3
OP P-12	5-AAGGGCGAGT-3
UBC-336	5-GCCACGGAGA-3
UBC-337	5-TCCCGAACCG-3

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نمونه‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر Master Mix (بافر PCR، $10\times$ ، $MgCl_2$ ، dNTPs و Tag DNA Polymerase)، ۳ میکرولیتر آب دیونیزه، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر و در نهایت ۱/۵ میکرولیتر DNA ۳۰ نانوگرمی بود. پس از آماده‌نمودن میکروتیوب‌ها، نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت‌سازی ابتدایی به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۴ چرخه ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی به مدت ۱ دقیقه، ۳۸ درجه سلسیوس برای اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس برای بسط آغازگر به مدت ۲ دقیقه و در نهایت دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی بود. پس از پایان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، DNA تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و دستگاه UV مشاهده گردید.

تجزیه‌های آماری

منابع آزمایش در این مطالعه شامل ژنوتیپ (یک

ژنوتیپ)، تیمارها (۶۹ سطح تیمار شده و شاهد (۲۲) استرین باکتریایی به همراه یک شاهد (تلقیح نشده با باکتری) در سه تکرار) زمان (۴ سطح صفر، ۳، ۶ و ۹ روز) و اثر متقابل دو جانبه و سه جانبه استرین باکتری با تیمار گندم، ژنوتیپ در زمان، تیمار در زمان و ژنوتیپ در تیمار در زمان بود. به منظور تجزیه داده‌های مولکولی و گروه‌بندی استرین‌های باکتریایی از نرم‌افزار NTSYS استفاده شد. به منظور تجزیه داده‌های مولکولی و صفات بیوشیمیایی از نرم‌افزار MINITAB 14 و به منظور رسم تغییرات آنزیم‌ها در طی روزهای نمونه‌برداری از Excel استفاده شد.

نتایج

نتایج ارزیابی گلخانه‌ای

نتایج تجزیه واریانس استرین‌های باکتریایی نشان داد که استرین‌های باکتریایی از نظر صفات طول خوشه، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک بیولوژیکی با یکدیگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ دارند. استرین‌های باکتریایی مورد مطالعه از نظر سایر صفات

باکتریایی در صفت وزن اندام هوایی نشان داد که هیچ کدام از استرین‌ها باعث افزایش این صفت نسبت به شاهد در گیاه گندم نشدند، ولی استرین‌های T26-2، ۶۷، ۷۳۸، ۹۵ و ۱۵۶ اثر منفی معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند. نتایج مقایسات میانگین استرین‌های باکتریایی صفت وزن کل بیولوژیک نشان داد که استرین شماره ۴۴ و ۳۵۴ به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را نسبت به سایر استرین‌ها در مقایسه با شاهد داشتند (جدول ۴).

اختلافی با یکدیگر نداشتند (جدول ۳). به منظور مشخص نمودن بهترین استرین باکتریایی، جهت افزایش فاکتورهای رشدی، مقایسه میانگین صفات بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام گرفت. نتایج مقایسات میانگین استرین‌های باکتریایی در صفت طول خوشه نشان داد که استرین ۵۸ نسبت به سایر استرین‌ها بیشترین تاثیر را در افزایش صفت طول خوشه نسبت به شاهد داشته است و سایر استرین‌ها تاثیری بر افزایش میزان این صفت در گیاه گندم در مقایسه با شاهد نداشتند. نتایج مقایسات میانگین استرین‌های

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتریایی از نظر صفات رویشی بر مبنای طرح کاملا تصادفی
Table 3- Analysis of variance effect of bacterial treatments in wheat in terms of vegetative traits based completely randomized design

Source	df	MS					
		Plant height (cm)	Peduncle length (cm)	Panicle length (cm)	Shoot weight (gr)	Root weight (gr)	Biological weight (gr)
Strain	22	5.926 ^{ns}	1.312 ^{ns}	0.162*	0.0018 ^{***}	0.0002 ^{ns}	0.0027 ^{***}
Error	41	4.374	1.194	0.077	0.0004	0.0001	0.0007
Total	63						
C.V (%)		8.07	14.32	8.96	13.21	28.04	13.17

*، **، و *** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و عدم وجود تفاوت معنی‌دار

ns: significant at 0.05, 0.001, and no significant, respectively

جدول ۴- نتایج مقایسات میانگین تاثیر استرین‌های باکتریایی روی صفات رویشی گندم بر اساس آزمون LSD و سطح احتمال ۰/۰۵

Table 4- The Comparison of the mean effect of bacterial treatments in wheat in terms of vegetative traits based on LSD test at the probability level of 0.05

Strain	Biological weight	Shoot weight	Panicle length
156	0.2006d-h	0.1477d-i	2.9166de
240	0.2134c-g	0.1672b-f	3.1222c-e
305	0.2266b-e	0.1758b-e	3.1333b-e
354	0.1527i	0.1281hi	2.7361e
409	0.1784f-i	0.1380f-i	3.2361b-d
44	0.2761a	0.2112a	3.2361b-d
49	0.2264b-e	0.1717b-e	3.1861b-e
50	0.2596ab	0.2089a	3.5861b
506	0.2348a-d	0.1825a-c	3.5333a-c
58	0.2205b-f	0.1744b-e	3.75a
60	0.2267b-e	0.1789a-d	3.1666b-e
67	0.1856e-i	0.1351f-i	2.9166de
680	0.2095c-g	0.1608c-h	3.2444b-d
686	0.2464a-c	0.1797a-d	3.1666b-e
738	d-h-0.2010	0.1445e-i	2.9166d-e
84	0.2174b-g	0.1650b-g	3.0805c-e
95	0.1633hi	0.1213i	2.9583d-e
CHA0	0.2449a-c	0.1938ab	3.1472b-e
Control	0.2264b-e	0.1883a-c	3.1333b-e
F-68	0.1750g-i	0.1357f-i	3.0416de
T17-4	0.2071c-g	0.1562c-h	3de
T26-2	0.1915d-i	0.1339g-i	2.9166de
VUPF5	0.2285ab	0.1973ab	3.0555de
LSD	0.04363	0.03298	0.4576

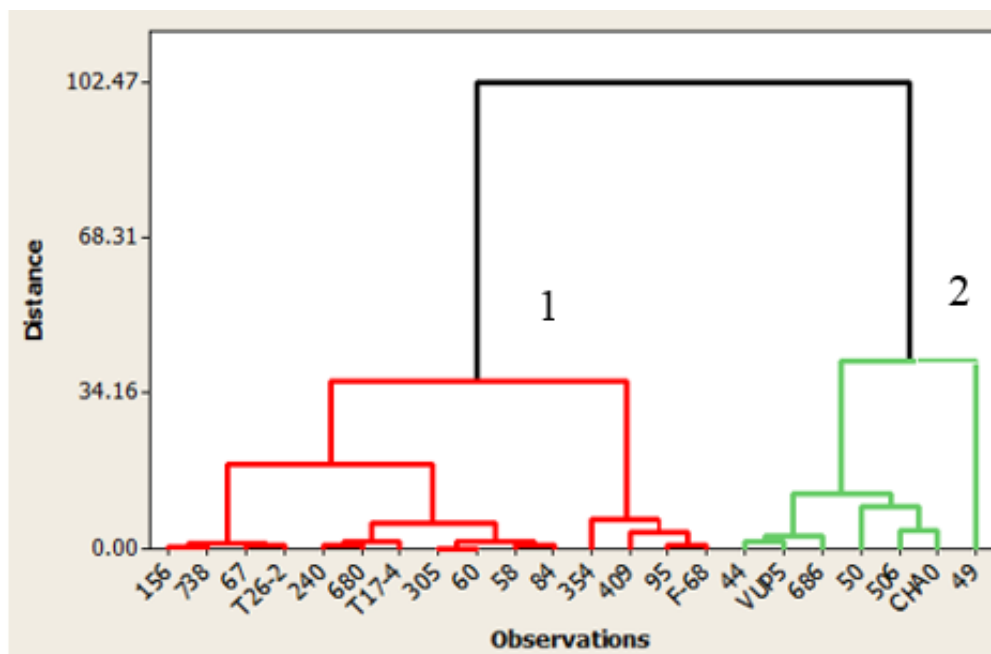
خوشه‌ای به روش ward و از مربع فاصله اقلیدسی به عنوان معیار فاصله استفاده شد (Ward 1963). نتایج تجزیه خوشه‌ای، استرین‌های باکتریایی را به دو گروه

نتایج تجزیه خوشه‌ای

به منظور گروه‌بندی استرین‌های باکتریایی بر اساس میانگین استاندارد شده صفات رویشی، از تجزیه

نسبت به استرین‌های گروه اول تاثیر بیشتری بر روی شاخص‌های رویشی گیاه گندم داشتند (جدول ۵).

تقسیم نمود (شکل ۱). نتایج بردار میانگین صفات نشان داد که استرین‌های گروه دوم با میانگین صفات بالاتر



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای استرین‌های باکتریایی به روش ward براساس میانگین استاندارد شده صفات
Figure 1 - Dendrogram from cluster analysis of bacterial treatments based on standardized mean of traits

جدول ۵- نتایج بردار میانگین صفات

Table 5- Results of mean vector traits

Traits	Cluster 1	Cluster 2
Height	-0.4777	1.0238
Peduncle length	-0.2221	0.4759
Panicle length	-0.4095	0.8775
Shoot dry weight	-0.5017	0.0752
Root dry weight	-0.3598	0.7711
Biological dry weight	-0.5100	1.0930

بعد از تلقیح با باکتری نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که در بین زمان‌های نمونه‌برداری، بیشترین میزان مربوط به ۳ روز بعد از تلقیح می‌باشد. در زمان ۳، استرین‌های ۵۰، ۳۵۴، ۷۳۸ و T26-2 و VUPF5 بیشترین میزان آنزیمی را در بین سایر استرین‌ها داشتند. در زمان ۶ روز بعد از تلقیح، استرین‌های ۲۴۰، ۳۰۵، T26-2 و VUPF5 و در زمان ۹، استرین‌های ۷۳۸، ۶۸۶، ۳۰۵، ۳۵۴ و F-68 در بین سایر استرین‌ها بیشترین میزان آنزیمی را داشتند.

نتایج ارزیابی بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس استرین‌های مورد مطالعه از نظر صفات آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل‌آلانیل‌آمونیا لیا ز و پروتئین کل نشان می‌دهد که بین استرین‌های مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری در طی روزهای نمونه برداری وجود دارد (جدول ۶). به منظور مشخص نمودن بهترین استرین در افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی در گیاه گندم، مقایسه میانگین صفات بر اساس آزمون LSD انجام گرفت. جدول ۷، نتایج مقایسات میانگین آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا لیا ز، را در ۴ زمان صفر، ۳، ۶ و ۹ روز

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتریایی و روزهای نمونه‌برداری از نظر صفات بیوشیمیایی بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

Table 6- Analysis of variance effect of bacterial treatments and sampling days in biochemical traits based factorial based on completely randomized design

Source	df	MS		
		Peroxidase	Phenylalanine ammonia-lyase	Total Protein
Strain	22	0.0179 ^{***}	0.0192 ^{**}	7.415 ^{**}
Time	3	0.868 ^{***}	2.078 ^{***}	842.083 ^{***}
Strain × Time	66	0.0161 ^{***}	0.0094 ^{**}	4.550 ^{**}
Error	92	0.0066	0.0077	3.293
Total	183			
C.V (%)		11.31	11.61	9.86

** و ***: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱

** and ***: significant at 0.01 and 0.001, respectively

جدول ۷- نتایج مقایسات میانگین فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا‌لیاز در گیاهان تیمار شده با استرین‌های باکتریایی در طی روزهای نمونه‌برداری

Table 7- The Result of comparisons of mean phenylalanine-ammonialyase enzyme in treatment plants with bacterial strains during sampling days

Strain	Time 3	Time 6	Time 9
Control	0.587i	0.673e-g	0.704h
156	0.942c-e	0.697e-g	0.905b-f
240	0.900d-f	0.834ab	0.979ab
305	0.889d-f	0.863a	0.959a-d
354	1.062a	0.795a-d	0.973a-c
409	0.820f-h	0.794a-d	0.897b-f
44	0.745h	0.690e-g	0.830f-g
49	0.962b-d	0.725d-g	0.888c-f
50	1.010a-c	0.711d-g	0.913b-f
506	0.861e-g	0.758b-e	0.847fg
58	0.902d-f	0.795a-d	0.881d-f
60	0.997a-c	0.730d-g	0.908b-f
67	0.785g-h	0.670fg	0.854e-g
680	0.972b-d	0.667fg	0.905b-f
686	0.976a-d	0.745c-f	0.971a-c
738	1.040ab	0.719d-g	0.935a-e
84	0.963b-d	0.724d-g	0.951a-d
95	0.960b-d	0.645gh	0.828fg
CHA0	0.929c-e	0.748b-f	0.838fg
F-68	0.995a-c	0.563h	1.005a
T17-4	0.943c-e	0.719d-g	0.965a-d
T26-2	1.014a-c	0.873a	0.906b-f
VUPF5	1.018a-c	0.822a-c	0.780gh

بین زمان‌های مختلف نشان داد که در زمان ۳، استرین‌های ۳۵۴، ۵۰، ۶۸۶، ۷۳۸، F-68، T26-2 و VUPF5، در زمان ۶ استرین‌های ۳۰۵، ۷۳۸، VUPF5 و T26-2 و در زمان ۹ استرین‌های ۳۰۵، ۶۸۶، ۷۳۸، F-68 و T17-4 بیشترین میزان در پروتئین کل را در بین سایر استرین‌ها داشتند (جدول ۹).

نتایج مقایسات میانگین آنزیم پراکسیداز (جدول ۸) نشان داد که در زمان ۳، استرین‌های ۴۴، ۱۵۶، ۷۳۸، ۳۵۴، VUPF5 و CHA0، در زمان ۶ استرین‌های ۶۰، ۵۰ و F-68 و در زمان ۹ استرین‌های VUPF5، T26-2 و CHA0 در بین سایر استرین‌ها بیشترین میزان آنزیمی را داشتند. نتایج مقایسات میانگین محتوای پروتئین کل

جدول ۸- نتایج مقایسات میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با استرین‌های باکتریایی در طی روزهای نمونه‌برداری

Table 8- The Result of comparisons of mean peroxidase enzyme in treatment plants with bacterial strains during sampling days

strain	time 3	time 6	time 9
control	0.594i-k	0.545j	0.627k
156	0.830ab	0.840c-e	0.875d-f
240	0.682e-h	0.758f-i	0.882de
305	0.576jk	0.751g-i	0.791g-i
354	0.819ab	0.801d-i	0.898cd
409	0.671f-i	0.737i	0.887c-e
44	0.845a	0.864b-d	0.612k
49	0.760b-e	0.832c-f	0.829d-h
50	0.729c-f	0.941b	0.873d-f
506	0.647g-j	0.834c-f	0.865d-g
58	0.848a	0.822c-h	0.892cd
60	0.596i-k	1.034a	0.676jk
67	0.673f-i	0.818c-h	0.773hi
680	0.801a-c	0.746g-i	0.882de
686	0.494l	0.824c-g	0.742ij
738	0.792a-c	0.800d-i	0.796f-i
84	0.616h-j	0.885bc	0.801f-i
95	0.750b-f	0.743hi	0.750h-j
CHA0	0.789a-c	0.768e-i	0.991b
F-68	0.531kl	0.929b	0.754h-j
T17-4	0.724c-g	0.889bc	0.809e-i
T26-2	0.708ad-g	0.834c-f	0.964bc
VUPF5	0.777a-d	0.733i	1.108a

جدول ۹- نتایج مقایسات میانگین فعالیت پروتئین کل در گیاهان تیمار شده با استرین‌های باکتریایی در طی روزهای نمونه‌برداری

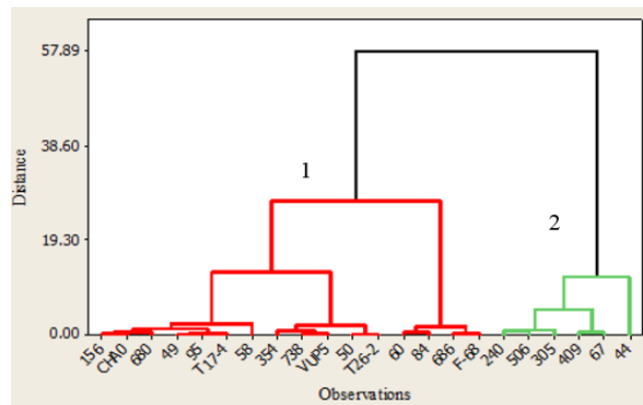
Table 9- The Result of comparison of mean total protein in treatment plants with bacterial strains during sampling days

Strain	Time 9	Time 6	Time 3
Control	17.71j	17.10g-i	18.22 i
156	21.34 b-g	16.44 h-j	22.22 c-f
240	23.08 ab	19.68 a-d	21.23 e-g
305	22.62 a-d	20.35 a-c	20.97 f-h
354	22.94 a-c	18.76 c-g	25.05 a
409	21.15 c-h	18.72 c-g	19.34 hi
44	19.58 g-i	16.27 h-j	17.56 i
49	20.95 d-h	17.10 g-i	22.69 c-f
50	21.51 b-f	16.76 h-j	23.81 a-c
506	19.98 f-i	17.88 d-h	20.31 gh
58	20.77 e-h	18.75 c-g	21.27 e-g
60	21.41 b-f	17.21 g-i	23.51 a-d
67	20.13 f-i	19.30 b-f	18.50 i
680	21.34 b-g	15.73ij	22.92b-e
686	22.90 a-c	17.56 f-h	23 a-d
738	22.05 a-e	21.46a	24.52 ab
84	22.43 a-e	17.07 g-i	22.70 c-f
95	19.51 h-j	15.21 j	22.63 c-f
CHA0	19.77 f-i	17.65 e-h	21.89 d-g
F-68	23.71 a	13.27 k	23.47 a-d
T17-4	22.75 a-d	16.96 g-j	22.24 c-f
T26-2	21.36 b-g	20.59 ab	23.91 a-c
VUPF5	18.40 ij	19.38 b-e	23.99 a-c

روز بعد از تلقیح استفاده شد. از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و مربع فاصله اقلیدسی استفاده شد. از میانگین صفات استاندارد شده صفات بیوشیمیایی به این منظور استفاده شد. استرین‌های مورد مطالعه در این پژوهش بر اساس میانگین صفات بیوشیمیایی در ۲ گروه قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج تجزیه خوشه‌ای صفات بیوشیمیایی

با توجه به نتایج تجزیه واریانس و مقایسات میانگین صفات بیوشیمیایی، بیشترین میزان آنزیمی در زمان ۳ روز بعد از تلقیح با سوسپانسیون باکتری بود. بنابراین به منظور گروه‌بندی استرین‌ها و مشخص نمودن استرین‌هایی که بیشترین تاثیر را در افزایش میزان آنزیم‌ها در گیاه داشتند از میانگین آنزیم‌ها در زمان ۳



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای تیمارهای باکتریایی بر اساس میانگین استاندارد شده صفات بیوشیمیایی در روز ۳ بعد از تلقیح با باکتری

Figure 2- Dendrogram from cluster analysis of bacterial treatments based on standardized mean of biochemical traits on day 3 after bacterial inoculation

متوسط شاخص تنوع، یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها می‌باشد. جدول ۸ شاخص تنوع و قدرت تفکیک هر آغازگر را نشان می‌دهد و متوسط شاخص تنوع بر اساس فرمول $(DI = (\sum Di/n))$ و قدرت تفکیک بر اساس فرمول $Rp = \sum Ibi$ محاسبه شد (Milbourne *et al.* 1997). آغازگرهای UBC-292 و OP-P12 به ترتیب با شاخص تنوع ۰/۳۶۱ و ۰/۳۵۷ و آغازگرهای UBC-775، OP- H8، 775، UBC-556 و UBC-292 با بیشترین میزان قدرت تفکیک، در بین سایر آغازگرها شناسایی شدند. هرچه قدرت تفکیک برای یک نشانگر بالاتر باشد، آن نشانگر از کارایی بالاتری در تفکیک بین گونه‌ها برخوردار می‌باشد. شکل ۳، الگوی تکثیر DNA استرین‌های باکتریایی با پرایمر OP-H8 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد را نشان می‌دهد.

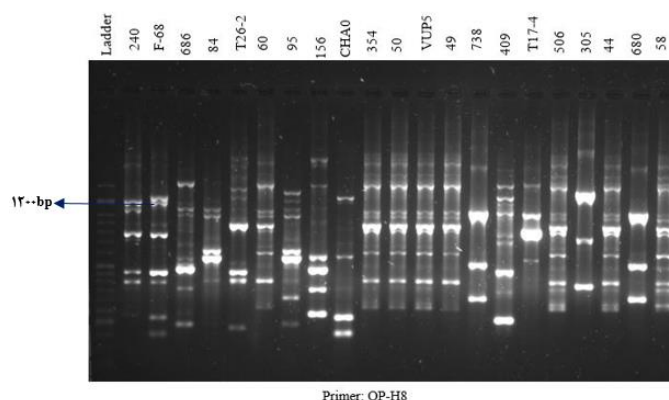
نتایج ارزیابی مولکولی بررسی چندشکلی

۱۲ آغازگر RAPD مورد استفاده در این پژوهش، روی ۲۲ استرین باکتریایی سودوموناس، ۱۲۲۶ نوار تولید نمودند که در مجموع ۲۲۴ مکان را شناسایی نمودند (جدول ۱۰). در بین این آغازگرها، آغازگر UBC-775 با ۲۶ و بعد از آن آغازگر OP- H8 با ۲۴ مکان، بیشترین مکان تکثیرشده را داشت. این آغازگرها بیشترین تعداد نوار تکثیرشده در مکان را داشتند. آغازگر UBC-301 با ۹ مکان کمترین تعداد مکان تکثیرشده را داشت. همچنین استرین CHA0 از سوئیس در آغازگرهای UBC-239، OP-14، OP-I15، OP-337، UBC-337 دارای نوار متفاوت نسبت به ۲۱ استرین دیگر بومی ایران به ترتیب در اندازه‌های ۴۰۰bp، ۲۵۰bp، ۲۰۰bp، ۵۰۰bp بود.

جدول ۱۰- تعداد کل نوار، تعداد مکان تکثیرشده، متوسط نوار در مکان، تعداد مکان‌های چندشکل، درصد لوکوس‌های چند شکل، متوسط شاخص تنوع و قدرت تفکیک برای آغازگرهای مختلف

Table 10- Number of total bands, Number of amplified locus, the average of band in locus, number of polymorphic locus, percent of polymorphic loci, average of diversity index and resolving power for different primers

Primer	Number of amplified locus	The average of band in locus	Number of total bands	Number of polymorphic locus	Average of diversity index	Resolving power	Average of resolving power
UBC-239	15	4.8	72	15	0.307	11.72	0.78
UBC-465	17	5.76	98	17	0.300	12.54	0.73
UBC-775	26	6.19	161	26	0.353	18.68	0.71
OP- P12	19	6.10	116	19	0.357	13.72	0.72
UBC-556	22	5.86	129	22	0.327	16.13	0.73
UBC-337	16	4.31	69	16	0.267	12.86	0.80
UBC-336	17	4.82	82	17	0.293	13.27	0.78
OP- I15	17	3.35	57	17	0.236	14.40	0.84
OP- H8	24	6.54	157	24	0.340	16.86	0.70
OP- P14	20	5.25	105	20	0.310	15.22	0.76
UBC-292	22	6.04	133	22	0.361	15.95	0.72
UBC-301	9	5.22	47	100	0.277	6.86	0.76



شکل ۳- ژل آگارز ۱/۵ درصد محصولات تکثیر با استفاده از به کارگیری آغازگر OP-H8
Figure 3- Agarose gel 1.5% of amplified products using OP-H8 primer

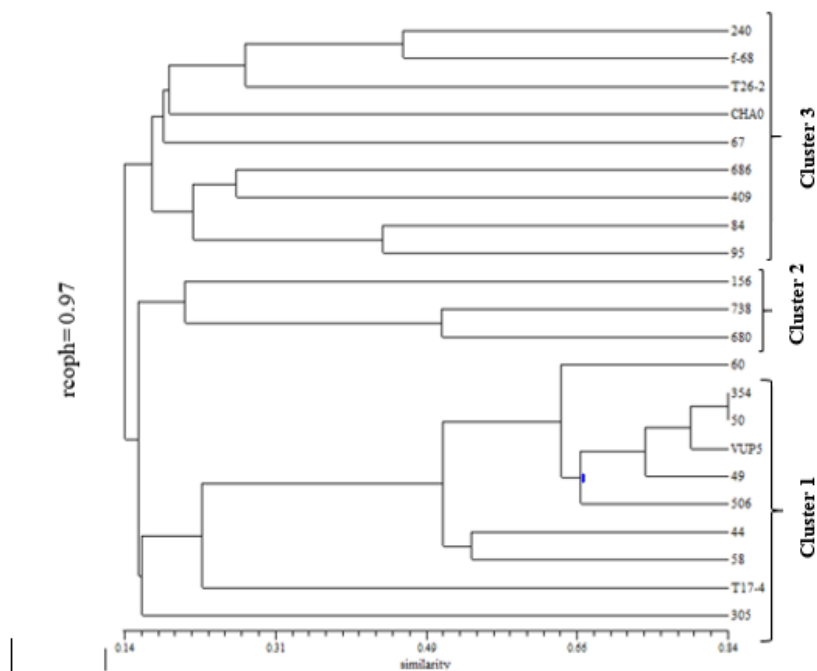
می‌باشد، در تجزیه تنوع ژنتیکی با آغازگرهای RAPD تقریباً در یک گروه قرار گرفتند. این استرین‌ها شامل ۵۰۶، ۴۹، VUPF5 و T17-4 می‌باشند. همچنین استرین‌هایی که میزبان‌شان گندم می‌باشد نیز در یک گروه کنار یکدیگر قرار گرفتند، این استرین‌ها شامل F-68 و T26-2 می‌باشند و همچنین استرین‌های ۳۰۵، ۳۵۴، ۵۸، ۴۴، ۵۰ و ۶۰ که میزبان آن‌ها مرکبات و درخت میوه هستند کنار یکدیگر و در یک گروه قرار گرفتند. در دندروگرام حاصل از تجزیه تنوع ژنتیکی، استرین‌های ۵۰ و ۳۵۴ از نظر مولکولی مشابه یکدیگر بودند که این استرین‌ها از مناطق نزدیک (لواسان و کرج) جداسازی شده بودند. تقسیم‌بندی تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای RAPD تا حدودی با منشا و گیاه میزبان استرین‌ها همخوانی دارد. دامنه تشابه از ۰/۱۴ تا ۰/۸۴ نشان‌دهنده تنوع زیاد بین نژادهای باکتری است که مطابق آن، دو استرین ۳۵۴ و ۵۰ با حدود ۸۴ درصد تشابه ژنتیکی نسبت به دیگر استرین‌ها تشابه ژنتیکی بالایی دارند که با اطلاعات ماتریس تشابه هم مطابقت دارد و ضریب کوفنتیک ۰/۹۷ تطابق بسیار خوب مدل بین دندروگرام و ماتریس تشابه را نشان می‌دهد و نشان‌دهنده این است که ۹۷ درصد اطلاعات ماتریس تشابه به دندروگرام منتقل شده و روش به کار رفته در گروه‌بندی استرین‌های سودوموناس، عملکرد موفق‌تری داشته است. ژنوم سودوموناس، بیشترین تنوع را در بین باکتری‌ها داراست. تقسیم‌بندی بر اساس آغازگرهای RAPD تا حدودی توانست استرین‌های

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

به منظور گروه‌بندی استرین‌های باکتریایی و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها، از نرم افزار NTSYS و از ضریب تشابه جاکارد و از روش UPGMA استفاده شد. شکل ۴ دندروگرام حاصل از تجزیه استرین‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس گروه‌بندی، استرین‌ها در سطح تشابه ژنتیکی ۰/۱۶ در سه گروه طبقه‌بندی شده‌اند، در گروه اول ۱۰ استرین شامل، استرین‌های ۶۰ (ریزوسفر انار، ساوه)، ۳۵۴ (ریزوسفر لوبیا، کرج)، ۵۰ (ریزوسفر زردآلو، لواسان)، VUPF5 (ریزوسفر پسته، رفسنجان)، ۴۹ (ریزوسفر پسته، سیرجان)، ۵۰۶ (ریزوسفر پسته، رفسنجان)، ۴۴ (ریزوسفر سیب، دماوند)، ۵۸ (ریزوسفر هلو، کرج)، T17-4 (ریزوسفر پسته، شهرباک) و ۳۰۵ (ریزوسفر مرکبات، ساری)، قرار گرفتند و در گروه دوم سه استرین شامل: ۶۸۰ (ریزوسفر نخود، رفسنجان) و ۷۳۸ (ریزوسفر آلو، شهرباک) و ۱۵۶ (ریزوسفر ذرت، جیرفت) قرار گرفتند و در گروه سوم ۹ استرین شامل: ۲۴۰ (ریزوسفر سیب، جابان تهران)، F-68 (ریزوسفر گندم، رفسنجان)، T26-2 (ریزوسفر گندم، بیجار)، CHAO (ریزوسفر توتون و تنباکو، سوئیس)، ۶۷ (ریزوسفر گردو، چالوس)، ۶۸۶ (ریزوسفر بادام، شهرباک)، ۴۰۹ (ریزوسفر پسته، سیرجان)، ۸۴ (ریزوسفر مرکبات، فارس)، و ۹۵ (ریزوسفر پیاز، کرمان) می‌باشند قرار گرفته‌اند (شکل ۴). در بین استرین‌های مورد مطالعه، استرین‌هایی که میزبان‌شان پسته

دامنه‌ی میزبانی تفکیک کند، که پیشنهاد می‌شود با آغازگرهای اختصاصی‌تری تنوع ژنتیکی استرین‌های سودوموناس بررسی گردند.

سودوموناس را بر اساس دامنه میزبانی یا منطقه جغرافیایی از دیگر استرین‌ها جدا نماید؛ ولی کاملاً نتوانست استرین‌ها را بر اساس منطقه‌ی جغرافیایی و



شکل ۴- دندروگرام ۲۲ استرین سودوموناس بر اساس نوارهای تولید شده با پرایمرهای RAPD با ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA

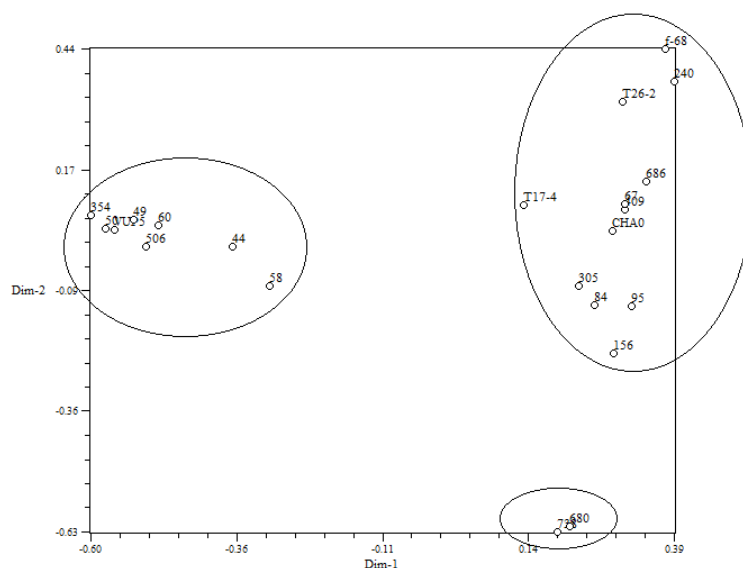
Figure 4- Dendrogram of 22 pseudomonas strains based on produced bands by RAPD primers With Jaccard similarity coefficient and UPGMA method

قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند. نتایج این تجزیه نشان می‌دهد که نشانگرهای مطالعه شده، ارتباطی با یکدیگر نداشته و به عبارت دیگر توزیع خوبی روی ژنوم استرین‌های باکتری سودوموناس داشته و هر یک از نشانگرها بخش متفاوتی از ژنوم را تکثیر نموده‌اند. پراکنش دو بعدی جدایه‌ها، با استفاده از تجزیه به مولفه‌های اصلی، در شکل ۵ نشان داده شده است. پراکنش دو بعدی استرین‌ها با دندروگرام حاصل از تنوع ژنتیکی استرین‌ها تا حدود زیادی مشابه می‌باشد. در این تجزیه استرین‌ها به ۳ گروه مجزا تقسیم شده‌اند که مشابه تقسیم‌بندی تنوع ژنتیکی می‌باشد و موارد متفاوت مربوط به استرین ۱۵۶ می‌باشد که در دندروگرام در کنار استرین‌های ۶۸۰ و ۷۳۸ در یک گروه قرار دارند؛ ولی در تجزیه دو بعدی در مولفه مربوط به گروه اول قرار دارد.

تجزیه به مختصات

تجزیه مختصات روشی است که از آن می‌توان الگوهای تنوع را به صورت چند بعدی نشان داد و اجازه تفسیر بیشتر در مورد ارتباط بین افراد را فراهم می‌کند. بردارها، ریشه‌های مشخصه، نسبت واریانس توجیه شده و جمع کل واریانس توجیه شده در تجزیه مختصات استرین‌های سودوموناس با استفاده از آغازگر RAPD مشخص شد (نتایج نشان داده نشده).

در این تجزیه، ۲۲ مولفه توانستند، ۱۰۰ درصد از واریانس کل را توجیه نمایند که سه مولفه اول به تنهایی توانستند حدود ۳۴ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. مولفه اول بیشترین سهم را در توجیه تغییرات دارا می‌باشد. در این بررسی تعداد صفات به تعداد زیادی مولفه کاهش یافته است این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی می‌باشد و این موضوع نشانگر این است که نشانگر RAPD در



شکل ۵- نمودار دو بعدی (با بردار) از ۱۷ سودوموناس فلورسنت با استفاده از تجزیه و تحلیل مختصات اصلی با پرایمرهای RAPD
Table 5- Two-dimensional plot (with vectors) of the 17 *Pseudomonas fluorescens* obtained using principal coordinate analysis

یافت. افزایش عملکرد غلات با تلقیح بذر و یا خاک زیر کشت آن‌ها با سویه‌های سودوموناس از جمله 7NSK2 توسط هوفت و همکاران گزارش شده است (Hoft *et al.* 1991). همچنین افزایش قابل توجه عملکرد گندم و افزایش معنی‌دار وزن هزار دانه تحت تیمار استرین‌های مختلف باکتری سودوموناس در مقایسه با شاهد (عدم کاربرد باکتری) گزارش شده است (Rezvan Bidokhti *et al.* 2010). در مطالعه حاضر افزایش عملکرد بیولوژیکی گیاه با تلقیح با برخی از نژادهای سودوموناس مشاهده شد. تحریک باکتری مفید با گیاه منجر به تحریک هورمون‌های رشدی گیاه شده و در نهایت افزایش عملکرد گیاه را به دنبال دارد. ریزوباکتری‌ها قادرند با بیوسنتز هورمون اکسین، مورفولوژی ریشه را تغییر دهند و موجب افزایش رشد و عملکرد گیاه گردند (Klopper *et al.* 2007).

در این مطالعه مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در مقاومت گیاه یعنی پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز بررسی گردید. این دو آنزیم نقش مهمی در ایجاد مقاومت گیاه در برابر پاتوژن‌ها دارند و منجر به سنتز یک سری ترکیبات فنیل‌پروپانوئیدی و لیگنین در دیواره سلولی گیاه می‌شوند. همچنین برخی از فیتوآلکسین‌ها نیز در اثر فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه بیان می‌شوند و در

بحث

نتایج ارزیابی‌های گلخانه‌ای و بیوشیمیایی استرین‌های باکتریایی بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که استرین‌های مورد مطالعه در این پژوهش به دو گروه قرار گرفتند. گروه برتر از نظر صفات رویشی با گروه برتر از نظر صفات بیوشیمیایی، تقریباً تطابق دارد. استرین‌های VUPF5، ۶۸۶، ۴۹، ۵۰ و CHA0 که از نظر فاکتورهای رویشی بیشترین تاثیر را در گیاه گندم داشتند از نظر صفات بیوشیمیایی نیز عملکرد بالایی بر روی گیاه گندم داشتند. تلقیح گیاه با باکتری سودوموناس منجر به تحریک ترکیبات محرک رشد و همچنین هورمون‌های رشدی گیاه می‌گردد. در این پژوهش، تعدادی از استرین‌ها توانستند عملکرد رویشی گیاه گندم را افزایش دهند. PGPR ها با افزایش انحلال عناصر غذایی نظیر فسفر، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین و تولید سیدروفور به طور مستقیم در افزایش رشد گیاهان نقش ایفا می‌کنند. باکتری‌های جنس سودوموناس به دلیل داشتن مکانیسم‌های متعدد، تحریک رشد گیاه را باعث می‌شوند (Ping *et al.* 2004, Guerinot 1991). نتایج این پژوهش نشان داد که عملکرد بیولوژیک به دلیل افزایش فاکتورهای رشدی در تیمار باکتریایی سودوموناس نسبت به شاهد افزایش

تنوع ژنتیکی باکتری‌های سودوموناس، به علت توانایی سازگاری، میزبان‌ها و محیط‌های مختلف، واکنش‌های فنوتیپی متفاوتی ایجاد می‌کند (Ktari et al. 2011). قدرت تفکیک نشانگر از مواردی است که با توجه به آن می‌توان کارایی نشانگر را در تفکیک گونه‌ها مورد بررسی قرار داد (Rayar et al. 2015). تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها به توانایی آغازگر در ایجاد پلی‌مورفیسم زیاد بستگی دارد و اینکه چه تعداد جایگاه یا لوکوس را تشخیص دهد (Souframanien et al. 2019, Prabhukarthikeyan et al. 2004). آنزیم‌ها تحت تاثیر ژن‌ها قرار دارند و باندهای تکثیر شده، پس از بررسی‌های بیشتر می‌توانند به عنوان باندهای کاندید در بیان ژن‌هایی که در بیان این آنزیم‌ها نقش دارند، مورد بررسی قرار گیرند. علاوه بر این تنوع ژنتیکی استرین‌ها که با آغازگرهای RAPD انجام شد، توانست تعدادی از استرین‌ها را که دارای سطح بالایی از آنزیم‌ها هستند (۳۵۴، ۵۰، ۷۳۸، ۲۶-۲، VUPF5 و F-68) و همچنین از نظر باند تکثیر شده از دیگر استرین‌ها متمایز هستند را در کنار یکدیگر قرار دهد. تعدادی از استرین‌های سودوموناس فلورسنت توانستند به طرز معنی‌داری سطح آنزیم‌های دفاعی در گندم را افزایش دهند. در این پژوهش نشانگر OP-I15 با قدرت تفکیک بالا می‌تواند به عنوان یک نشانگر کارآمد در بررسی تنوع گونه‌های سودوموناس مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد.

سنتز یک سری هورمون‌ها نیز مهم تلقی می‌گردند (Bais et al. 2005, Acosta et al. 2002). نتایج این پژوهش نشان داد که تعدادی از استرین‌های باکتریایی منجر به افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی در گیاه گندم می‌شوند که می‌توان از این استرین‌ها در کنترل بیولوژیک گندم در واکنش به بیمارگرها استفاده بیشتری نمود. در این مطالعه توانایی مارکر مولکولی RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های سودوموناس و همچنین نقش این استرین‌ها در افزایش فاکتورهای رویشی در گندم و آنزیم‌های دفاعی بررسی گردید. نتایج RAPD-PCR استرین‌ها را بر اساس تعداد مکان تکثیر و باند تکثیرشده و تا حدودی نیز بر اساس مکان جغرافیایی و میزبان گیاهی از یکدیگر جدا نموده است. ولی با این حال استرین‌هایی که میزان آنزیم‌های بیوشیمیایی بالاتری داشتند تقریباً از دیگر استرین‌ها بر اساس تجزیه مولکولی جدا شده‌اند. همچنین استرین‌های T26-2 و F-68 که از ریزوسفر گندم جدا شده‌اند، و همچنین میزان آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیلایز و پروتئین‌های بالایی دارند و در بعضی از آغازگرها دارای باندهای متفاوت از سایر استرین‌ها می‌باشند. استرین T26-2 در آغازگر OP-I15 دارای باند تکثیر شده در اندازه ۱۳۰۰ bp و استرین F-68 با آغازگر OP-H8 دارای باندهای در حدود ۱۲۰۰ bp می‌باشند. نتایج RAPD-PCR بیانگر تنوع ژنتیکی بالای این استرین‌ها بود و استرین‌های دارای میزبان و محل جغرافیایی مشابه تا حدودی از یکدیگر تفکیک شدند.

REFERENCES

- Abbass Z, Okon Y (1993) Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil biology and biochemistry* 25: 1075-1083.
- Acosta M, Rodriguez-Lopez JN, Pendent MA (2002) Plant peroxidases. University of Murcia.
- Anderson AJ, Guerra D (1985) Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology* 75: 992-995.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1992) Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc., London.
- Avis TJ, Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2008) Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil biology and biochemistry* 40: 1733-1740.
- Bais, HP, Prithiviraj B, Jha AK, Ausubel FM, Vivanco JM (2005) Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434: 217-221.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical of Biochemistry* 72: 248-254.
- D'cunha GB, Satyanarayan V, Nair PM (1996) Purification of phenylalanine ammonialyase from *rhodotorula glutinis*. *Journal of Phytochemistry* 42: 17-20.
- Diaz MH, Hauser AR (2010) *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. *Infection and immunity* 78: 1447-1456.
- Guerinot ML (1991) Iron Uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. *Plant and soil* 130:

- 199-209.
- Hoft M, Seong K, Jurkevitch E, Verstraete W (1991)** Pyoverdinin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK 2: Ecological significance in soil. *Plant and soil* 130: 249-257.
- Holt JG, Williams ST (1989)** Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 4. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kang BR, Yang KY, Cho BH, Han TH, Kim IS, Lee MC, Anderson AJ, Kim YC (2006)** Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. *Current microbiology* 52: 473-476.
- Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA (2007)** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology* 53(2): 159-167.
- Ktari S, Mnif B, Znazen A, Rekik M, Mezghani S, Mahjoubi-Rhimi F, Hammami A (2011)** Diversity of β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo- β -lactamase in two Tunisian hospitals. *Microbial Drug Resistance* 17: 25-30.
- Kumar NR, Arasu VT, Gunasekaran P (2002)** Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*.
- Mavrodi OV, McSpadden Gardener BB, Mavrodi DV, Bonsall RF, Weller DM, Thomashow LS (2001)** Genetic diversity of pHLI from 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescent* spp. *Phytopathology* 91: 35-43.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R (1997)** Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular breeding* 3(2):127-36.
- M'piga P, Belanger R, Paulitz T, Benhamou N (1997)** Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 301-320.
- Ping L, Boland W (2004)** Signals from the underground: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in plant science* 9: 263-266.
- Pirdashti H, Mottaghian A, Tajick Ghanbary MA (2010)** Response of growth characters and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) to co-inoculation of farmyard manure, *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. *Journal of Agronomy* 2(3): 448-458 (In Persian).
- Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED. (1991)** Diethylthiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 247(1): 57-64.
- Powell W, Morgante, M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996)** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding* 2: 225-238.
- Prabhukarthikeyan SR, Umapathy K, Thiruvengadam R, Yadav MK (2010)** Comparative analysis of genetic diversity among fluorescent pseudomonads using RAPD and ISSR fingerprinting. *Research Journal of Biotechnology* 14(7): 86-93.
- Rayar JK, Arif M, Singh US (2015)** Relative efficiency of RAPD and ISSR markers in assessment of DNA polymorphism and genetic diversity among *Pseudomonas* strains. *African Journal of Biotechnology* 14(13):1097-106.
- Rezvan Beidokhti S, Dashtban A, Kafi M, Sanjani S (2009)** Evaluating the effect of some *Pseudomonas* bacteria strains on wheat yield and its components at various levels of phosphorus fertilization. *Journal of Agroecology* 1(1): 33-40 (In Persian).
- Souframanien J, Gopalakrishna TA (2004)** Comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1687-1693.
- Todar M (2004)** *Pseudomonas aeruginosa* in Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology" The Good, the Bad, and the Deadly. *Science Magazine* 304: 1-12.
- Van Peer R, Niemann G, Schippers B (1991)** Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Ward Jr JH (1963)** Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association*, 58: 236-244.