DOI: http://dx.doi.org/10.22092/bcpp.2016.108156

مطالعه‌ی میزان کلونیزاسیون ریشه و کاهش بیماری زنگ برگی گندم در برهمکنش‌های جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens*، رقم گندم و قارچ *Puccinia triticina*

محسن فرزانه[1]، فرزاد افشاری[2]، عباس شریفی تهرانی[3]

۱- گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران

۲- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران، کرج

مسئول مکاتبات: محسن فرزانه، پست الکترونیک: M_farzaneh@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۳۰ ۴ (۱) ۶۵-۷۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۲

چکیده

در این پژوهش قابلیت میزان کلونیزه شدن ریزوسفر سه رقم گندم (بولانی، روشن و فورنو) توسط دو جدایه باکتری سودمند *Pseudomonas fluorescens* PF153*mcherry* و *P. fluorescens* CHA0*gfp2* به روش آغشته‌سازی بذر در کاهش بیماری زنگ برگی ناشی از *Puccinia triticina* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده کاهش شدت بیماری روی برگ‌ها در تعامل‌های خاصی از جدایه باکتری و رقم گندم بود. این کاهش بیماری به‌طور ویژه‌ای در تعامل جدایه‌ی CHA0*gfp2* و رقم فورنو با ۶۹/۷۴٪ کاهش جوش روی برگ‌ها مشاهده شد. دو رقم بولانی و فورنو فاقد زادمایه باکتری، بیشترین میزان آلودگی به زنگ را داشتند. بررسی اثر متقابل جدایه باکتری، رقم گندم و بیمارگر نشان داد که در تعامل‌های جدایه‌ی PF153*mcherry* با رقم روشن آلوده و غیرآلوده به زنگ، بیشترین جمعیت باکتریایی روی ریشه وجود دارد (به‌ترتیب ۷۸۰۱/۲ و ۸۱۵۴/۴ یاخته باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه). کمترین تعداد یاخته باکتری روی ریشه در تعامل جدایه CHA0*gfp2* با رقم روشن آلوده و غیرآلوده به زنگ به‌ترتیب با جمعیتی برابر با ۹۳۸/۲ و ۸۸۷/۳ یاخته باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه مشاهده شد. تعامل بیمارگر با هر سه رقم گندم باعث افزایش معنی‌دار فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در برگ‌ها شد. همچنین آلودگی به زنگ در افزایش فعالیت پراکسیداز تفاوت معنی داری نشان داد. در نهایت بین میزان کلونیزاسیون باکتری (تعداد یاخته باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه) با شدت بیماری زنگ برگی همبستگی منفی مشاهده شد. همچنین همبستگی مثبت بین آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و شدت بیماری وجود داشت. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده برقراری تعامل سودمند بین جدایه ریزوباکتری-رقم گندم است که در راستای القای مقاومت و مهار بیمارگرهای برگی در سیستم کشاورزی پایدار امیدوارکننده بود.

واژه‌های کلیدی: ریزوسفر گندم، باکتری سودمند، مقاومت القایی، بیماری زنگ، فعالیت آنزیمی

مقدمه

قارچ *Puccinia triticina* (Syn: *P. recondita* f.sp. *tritici*) عامل بیماری زنگ قهوه‌ای (Brown rust) یا زنگ برگی (Leaf rust) به‌عنوان یکی از بیمارگرهای مخرب مناطق گندم‌کاری دنیا شناخته شده است (Kolmer, 2005, McIntosh *et al.,* 1995). هرچند کاربرد ارقام مقاوم به‌عنوان یک روش کارآمد کنترل بیماری اثبات شده است (Kolmer, 2005) اما مقاومت گیاه به‌صورت تک ژنی یا چند ژنی است (Kolmer, 1996, McIntosh *et al.,* 1995) و کارایی مقاومت توسط شرایط محیطی متعدد زنده و غیرزنده تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Eversmeyer & Kramer, 2000, Kolmer, 1996). برای مثال، حضور باکتری‌های سودمند خاصی روی ریشه پاسخ مقاومتی را در لوبیا، توتون و آرابیدوبسیس القاء کرده است (De Meyer & Maurhofer *et al.,* 1994, Vallad & Höft, 1997, Goodman, 2004). لذا مقاومت القایی یکی از

سازوکارهای ریزوباکترهای افزایش دهنده‌ی رشد گیاه (Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR))، به‌خصوص گروه سودومونادهای فلورسنت، در کاهش بیماری است (Van Peer *et al.,* 1991; Wei *et al.,* 1991). باکترهای سودوموناس که به ریزوسفر گیاه تلقیح می‌شوند با سازوکار مقاومت سیستمیک القایی (Induced systemic resistance) از بیمارگرهای قسمت‌هایی هوایی گیاه مانند بیماری‌های ساقه (Van Peer *et al.,* 1991) و برگ (Wei *et al.,* 1991) ممانعت کرده و همچنین در کنترل بیمارگرهای ریشه مفید هستند (Leeman *et al.,* 1995, Leeman *et al.,* 1996). مقاومت سیستمیک در اثر تحریک‌های بیمارگر یا عواملی دیگر مثل باکتری های مفید ریشه ایجاد می‌شود (Weller, 2007) که در نتیجه این تحریک‌ها، پیام رسان‌های مقاومت، تولید شده و در سراسر گیاه پخش می شوند (Agrios, 2005). از طرف دیگر نقش ترشحات ریشه گندم در القاء فعالیت افزایش دهندگی رشد توسط جهش‌یافته‌های سودوموناس فلورسنس در ریزوسفر گندم اثبات شده است (Van Overbeek & Vand Elsas, 1995). بنابراین سودوموناس‌های خاکزی مفید ریزوسفر گندم نیز از طریق سازوکار افزایش مقاومت سیستمیک و تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاه گندم، در افزایش رشد گیاه مؤثرند. لذا این میکروارگانیسم‌ها قادرند نتایج منفی سیستم‌های زراعی کم هزینه از قبیل ذخایر غذایی محدود و فشار زیاد بیماری را جبران نمایند. به‌هرحال کلنیزاسیون و قابلیت PGPR اختصاصیت میزبانی خاصی ندارد و بیشتر ریزوباکتری‌ها قادر هستند دامنه‌ی وسیعی از گیاهان را کلنیزه کرده و باعث افزایش رشد آن‌ها شوند، ولی پدیده‌ی مقاومت القایی در گیاهان خاصی ایجاد می‌شود. برای مثال جدایه‌های القاء کننده مقاومت، *P. putida* WCS358r و *Pseudomonas fluorescens* WCS374r بر روی گونه‌های گیاهی مختلف به‌صورت متفاوتی عمل می‌کنند. در آرابیدوپسیس نسبت به‌حضور جدایه‌ی WCS358r واکنش مقاومتی معنی‌داری القا می‌شود در صورتی که در هویج چنین واکنشی رخ نمی‌دهد (Leeman *et al.,* 1995b; VanWees *et al.,* 1997). برعکس، القای واکنش‌های مقاومتی در هویج با حضور جدایه‌ی WCS374r رخ می‌دهد (Leeman *et al.,* 1995a, 1996). در گیاه *Arabidopsis* جدایه‌های مذکور عملکردهای مختلفی را بر روی واریته‌های مختلف این گیاه از خود نشان می دهند، به‌طوری که WCS417r قادر به ایجاد مقاومت سیستمیک القایی (ISR) بر روی واریته Col-0 می باشد در صورتی که همین جدایه قادر به ایجاد مقاومت در واریته RLD1 نیست (Van Wees *et al.,* 1997; Ton *et al.,* 1999). بنابراین به‌نظر می‌رسد که مقاومت ایجاد شده توسط ریزوباکترها، پدیده‌ای کاملاً اختصاصی است که بین ریزوباکترهای خاص و با گیاهان خاص ایجاد می‌شود.

هدف از انجام این تحقیق بررسی قابلیت میزان کلونیزه شدن ریزوسفر سه رقم گندم آلوده و غیرآلوده به بیمارگر زنگ‌برگی توسط دو جدایه سودمند *Pseudomonas fluorescens* PF153*mcherry* و *P. fluorescens* CHA0*gfp2* و دانستن تأثیر این کلونیزاسیون باکتریایی در ایجاد مقاومت سیستمیک القایی در گیاه و کاهش بیماری زنگ برگی است. همچنین ارتباط بین میزان کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری و شدت آلودگی زنگ برگی با میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (peroxidase) و فنیل آلانین آمونیالیاز (phenylalanine ammonia lyase) در برگ‌های گیاه نیز تعیین شد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی جدایه‌های باکتری و ارقام گندم

جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* PF153*mcherry* و *P. fluorescens* CHA0*gfp2* (Péchy-Tarr & Keel unpublished) که به‌ترتیب سویه‌های نشان‌دار شده‌ی تیپ وحشی PF153 (Fuchs *et al.,* 2000) و CHA0 (Keel *et al.,* 1989) می باشند از دانشگاه لوزان سوئیس (University of Lausanne, Switzerland) دریافت شدند. جدایه‌ی PF153*mcherry* حاوی ژن گزارش‌گر *mcherry* (پروتئین فلورسنت آلبالویی رنگ) و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (gentamicin) است. جدایه‌ی CHA0*gfp2* نیز دارای ژن گزارش‌گر *gfp* (پروتئین فلورسنت سبز) و ژن

مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین می‌باشد. دو رقم ایرانی بولانی و روشن از بخش پاتولوژی غلات مؤسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و رقم فورنو (Forno) از مؤسسه‌ی کشاورزی فدرال سوئیس دریافت شد.

تهیه زادمایه جدایه باکتری

برای تهیه‌ی زادمایه‌ی جدایه‌های باکتری، یک حلقه کامل از کشت ۳۶ ساعته روی محیط آگار مغذی به‌فلاسک‌های ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع LB منتقل شده و به‌مدت ۳۶ ساعت روی دستگاه تکان دهنده‌ی (۲۰۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارگرفت. یاخته‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g) از محیط مایع LB جدا شده و برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی، در محلول ۰/۱۵ مولار نمک طعام شستشو شدند. سپس یاخته‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ مجدد از این محلول جدا سازی شد و از آن‌ها در آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه شد و پس از رقیق سازی، جمعیت آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر با جذب نوری ۰/۷ (حدود 10^9 یاخته باکتری) تنظیم شد.

تهیه‌ی زادمایه بیمارگر (*Puccinia triticina*)

جدایه‌ی ۱۴۰ از *P. triticina* که از منطقه‌ی اهواز جمع‌آوری و خالص‌سازی شده بود و در واحد پاتولوژی غلات مؤسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر در دمای ۸۰- نگهداری می‌شد جهت انجام آزمایش انتخاب گردید. تهیه‌ی زادمایه‌ی قارچ با مایه زنی اورودوسپور روی گیاهچه‌های یک هفته‌ای رقم حساس بولانی انجام شد و پس از دو هفته، اورودوسپورهای ظاهر شده جمع‌آوری و برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی اثر باکتری‌های سودمند در کنترل بیماری زنگ برگی

صد گرم خاک مزرعه ناحیه‌ی کرج (شهرک نهال و بذر مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) به گلدان‌های پلی اتیلن (قطر ۱۰ سانتیمتر) منتقل شد. آزمایش به‌روش آغشته سازی بذر انجام گرفت. ابتدا پنج عدد بذر روی سطح خاک هر گلدان قرار داده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^9 یاخته باکتری در میلی‌لیتر آب مقطر سترون، به هر بذر اضافه شد. بذرها با یک لایه‌ی نازکی از خاک بسیار نرم پوشانده شده و اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت و به‌روش آب پاشی خاک سطح گلدان انجام گرفت. گلدان‌ها داخل سینی قرار گرفته و آبیاری‌های بعدی گلدان‌ها با اضافه کردن آب به سینی به‌فاصله‌ی هر سه روز یک بار انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۱۸ درجه‌ی سلسیوس و نور مناسب قرار گرفته و پس از ۱۰ روز با سوسپانسیون اسپور قارچ مایه کوبی شدند. پس از مایه زنی، روی گلدان‌ها یک سرپوش کریستالی شفاف قرار داده شد. گلدان‌های مایه زنی شده به‌مدت ۲۴ ساعت در اتاق تاریک و دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت اشباع نگهداری شده و سپس در شرایط گلخانه با دمای ۲۲ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد منتقل شدند. پس از ۱۲ روز میزان بیماری با شمارش برگ‌های آلوده و تعداد جوش‌های زنگ روی برگ‌ها ارزیابی شد (Kamlofskia *et al.,* 2007, Sharifi-Tehrani *et al.,* 2011).

قابلیت باکتری‌های سودمند در میزان کلونیزاسیون ریشه‌ی سه رقم گندم

تعداد یاخته باکتریایی تشکیل شده روی ریشه ارقام مختلف گندم به روش شرح داده شده توسط کیل و همکاران (Keel *et al.,* 1989) ارزیابی شد. به‌طور خلاصه ابتدا خاک چسبیده به ریشه با تکان دادن شدید و شستشو در جریان ملایم آب مقطر سترون برطرف شد. ریشه‌های حاصل به فلاسک‌های ارلن حاوی محلول ۰/۸۵ نمک طعام اضافه شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه تکان دهنده با تکان ۳۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. از سوسپانسیون حاصل دوبار سریال رقت تهیه شد و به مقدار ۱۲۰ میکرولیتر روی محیط اختصاصی آکار دار LB حاوی جنتامایسین (۸ میکرو گرم در میلی‌لیتر) و کاربنداژیم (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) پخش شد. پس از ۴۸ نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، تعداد پرگنه‌های ظاهر شده شمارش و میزان کلونیزه کردن باکتری بر حسب تعداد یاخته باکتری در میلی‌گرم خشک ریشه محاسبه شد.

بررسی‌های فعالیت آنزیمی بوته‌های تیمار شده با باکتری‌های سودمند طی فرایند بیماری‌زایی استخراج عصاره‌ی گیاهی

یک گرم برگ بلافاصله پس از جمع‌آوری به ظروف نیتروژن مایع منتقل شده تا سریع منجمد گردد و پس از انجماد تا زمان عصاره گیری در فریزر منفی ۸۰ نگهداری شدند. سپس هر نمونه را بیرون آورده و در درون ظرف هاون چینی با استفاده از محلول بافر، عمل عصاره‌گیری انجام شد. بدین صورت که ابتدا هاون چینی در ظرف یخ قرار داده و برگ‌ها در درون هاون در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با استفاده از دسته هاون پودر و خرد شده و سپس دو میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH = ۶ اضافه کرده و پس از به دست آوردن یک مخلوط هموژن (عصاره)، عصاره حاصل داخل ویال‌های پلاستیکی دو میلی‌لیتری منتقل شد. ویال‌های حاوی عصاره‌ها برگی به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول شفاف رویی را جدا کرده و در ویال دیگری ریخته و تا اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Hammerschmidt *et al.,* 1982).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای این منظور فعالیت آنزیمی به‌روش همراشمیت و همکاران (Hammerschmidt *et al.,* 1982) مورد بررسی قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۶۰۰ میکرو لیتر محلول پیروگالول (pyrogallol) ۰/۰۵ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم در کووت کوارتز ریخته و درست قبل از اندازه‌گیری سرعت واکنش ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱٪ (حجم به حجم) به‌عنوان پذیرنده الکترون به مخلوط واکنش اضافه شد. برای صفر کردن دستگاه ۰/۲ میلی‌لیتر آنزیم استخراج شده غیر فعال (غیر فعال شده با جوشیدن در آب جوش) با ۶۰۰ میکرولیتر محلول پیروگالول ۰/۰۵ مولار مخلوط شده و در کووت ریخته و به‌عنوان کووت شاهد در نظر گرفته و میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با آن صفر شد. سپس جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز مقدار تغییرات جذب مخلوط واکنش (پس از افزودن پراکسید هیدروژن) در طول موج ۴۲۰ نانومتر هر ۳۰ ثانیه و به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم بافت برگی تازه بیان شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز براساس روش راس و سدورف (Ross & Sederoff, 1992) با کمی تغییرات (شریفی تهرانی و همکاران ۱۳۹۰) صورت‌گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، ۴۰۰میکرولیتر بافر ۵۰ میلی مولار بافر تریس HCl (با pH برابر با ۸/۸) و ۴۰ میکرولیتر ال-فنبل آلانین (L-phenylalanine) یک میلی مولار مخلوط و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نگه داشته شده وسپس واکنش با افزودن اسید کلریدریک ۲ نرمال متوقف گردید. سپس به مخلوط حاضر ۱ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌هم زده شد. برای جداسازی فاز تولوئن حاوی ترنس‌سینامیک‌اسید، این مخلوط به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب تولوئن به دست آمده در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و غلظت ترنس سینامیک اسید بر اساس منحنی استاندارد این ماده در بافر تریس محاسبه گردید. میزان فعالیت آنزیمی براساس نانومول‌های تولید شده ترنس‌سینامیک‌اسید بر دقیقه بر وزن تر برگ محاسبه شد. مقدار ترنس‌سینامیک‌اسید تولید شده بر اساس منحنی استاندارد به‌دست آمده از غلظت‌های، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰۰ میلی مول و با pH برابر با ۸/۸ محاسبه شد.

آنالیزهای آماری

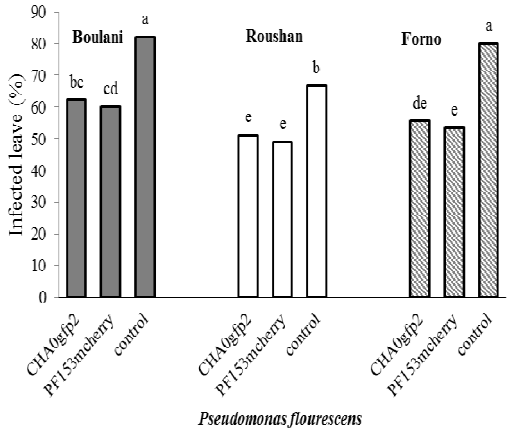
برای تجزیه‌ی داده‌ها از دو نرم افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز بهره برده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌وسیله‌ی نرم افزار Minitab نسخه ۱۷/۱مشخص شد. برای تجزیه‌ی واریانس از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و به‌روش GLM استفاده شد و پس از تجزیه‌ی واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ یا ۵٪ مقایسه شدند. آنالیزهای همبستگی بین نتایج آزمایش‌های

مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های آماری همبستگی Pearson انجام شد.

نتایج

تأثیر جدایه‌های سودمند در کاهش آلودگی به *P. triticina*

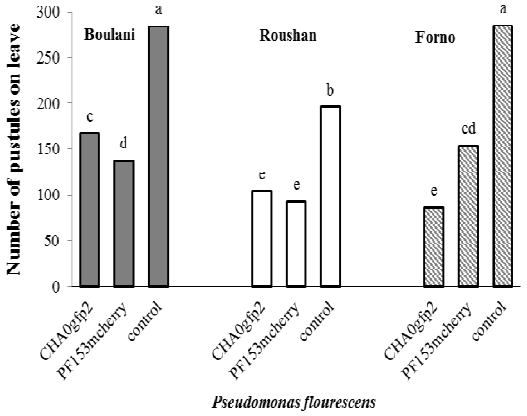
باتوجه به‌نتایج به‌دست آمده (شکل‌های ۱ و ۲) از نظر تعداد برگ‌های آلوده و تعداد جوش زنگ روی برگ‌ها، بین ارقام و بین جدایه‌های باکتری در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به‌طور کلی رقم روشن (با ۶۰ درصد آلودگی) نسبت به رقم های بولانی و فورنو (به‌ترتیب با ۸۲/۲ و ۸۰ درصد آلودگی) حساسیت کمتری در برابر زنگ قهوه‌ای نشان داد. جدایه PF153*mcherry* در مقایسه با جدایه CHA0*gfp2* تأثیر بیشتری در کاهش تعداد برگ آلوده روی هر سه رقم داشته به‌طوری که مقدار کاهش آلودگی در مقایسه با شاهد آلوده در ارقام فورنو، روشن و بولانی به‌ترتیب ۲۶/۶۷، ۱۷/۸ و ۲۲/۲ درصد بود.



شکل ۱- درصد برگ‌های آلوده به زنگ برگی روی ارقام زمستانه‌ی گندم بولانی، فورنو (هر دو دارای حساسیت بالا) و رقم روشن (نسبتاً حساس) تلقیح شده با جدایه‌های سودمند سودوموناس فلورسنت. نتایج به‌دست آمده میانگین سه تکرار است. حروف مشابه بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. 1. Disease severity of leaf rust on the winter wheat varieties Boulani and Forno (highly susceptible), and Roushan (moderately susceptible) inoculated with root-colonizing *P. fluorescens* strains. Mean values (three replications) followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

از نظر تعداد جوش زنگی روی برگ‌های آلوده تعامل جدایه‌ی CHA0*gfp2* با رقم فورنو با ۶۹/۷۴ درصد کاهش جوش برگی در مقایسه با شاهد آلوده، تأثیر چشم‌گیری در القای مقاومت سیستمیک و کاهش شدت بیماری داشت. کاربرد این باکتری روی ارقام روشن و بولانی نیز به‌ترتیب با ۴۷/۰۳ و ۴۱/۲۲ درصد کاهش جوش برگی در کنترل شدت بیماری مؤثر بود. میزان تأثیر جدایه‌ی PF153*mcherry* در کاهش جوش برگی روی هر سه رقم تقریباً یکسان بود به‌طوری که شدت این کاهش روی ارقام فورنو، روشن و بولانی به‌ترتیب ۴۶/۱۴، ۵۲/۸ و ۵۱/۶۴ درصد بود (شکل ۲).



شکل ۲- شدت بیماری زنگ برگی روی ارقام زمستانه گندم بولانی و فورنو (هر دو دارای حساسیت بالا) و رقم روشن (نسبتاً حساس) تلقیح شده با جدایه‌های سودمند سودوموناس فلورسنت. نتایج به‌دست آمده میانگین سه تکرار است. حروف مشابه بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. 2. The number of pustules on leave of the winter wheat varieties Boulani and Forno (highly susceptible), and Roushan (moderately susceptible) inoculated with root-colonizing *P. fluorescens* strains. Mean values (three replications) followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

تأثیر جدایه‌ی باکتری، رقم گندم و آلودگی به *Puccina triticina* در میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری

باتوجه به نتایج شکل ۳ از نظر میزان کلونیزه شدن ریشه‌ی گندم توسط باکتری بین سطوح باکتری و سطوح

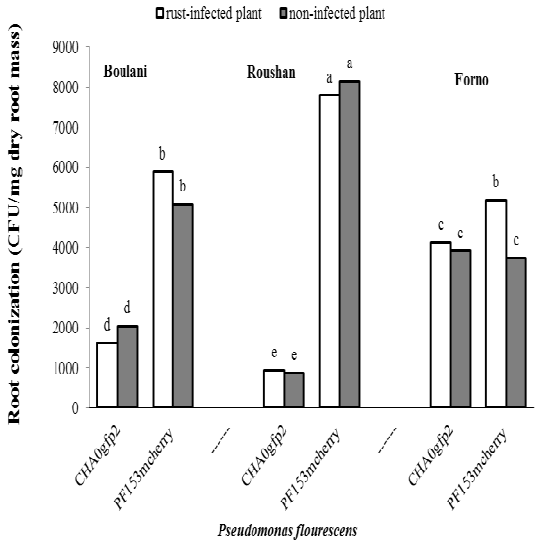
رقم در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. اثرات متقابل باکتری و آلودگی، باکتری و رقم، رقم و آلودگی و باکتری، آلودگی و رقم در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد. بین گیاه غیر آلوده و آلوده به بیمارگر زنگ قهوه‌ای تفاوت معنی‌داری از نظر میزان کلونیزه شدن ریشه مشاهده نشد.

به‌طور کلی جدایه‌ی PF153*mcherry* دارای بیشترین یاخته باکتری در میلی‌گرم خشک ریشه بود و توانایی بالاتری در کلونیزه کردن ریشه نشان داد. رقم روشن دارای بیشترین جمعیت باکتری روی ریشه بود و به‌عبارتی تأثیر بیشتری در افزایش میزان کلونیزه کردن باکتری روی ریشه نشان داد اما بین دو رقم دیگر از نظر میزان یاخته باکتری روی ریشه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد(شکل ۳).

در مورد تعامل جدایه‌ی باکتری با بیمارگر، بیشترین میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری در تعامل جدایه PF153*mcherry* با گیاه آلوده به بیمارگر مشاهده شد. همچنین این جدایه روی گیاه غیرآلوده نیز از جمعیت بالایی برخوردار بود. بررسی اثر متقابل جدایه باکتری، رقم و بیمارگر نشان داد که در میانکنش‌های جدایه‌ی PF153*mcherry* با رقم روشن آلوده و غیر آلوده به زنگ بیشترین جمعیت باکتریایی روی ریشه مشاهده شد (به‌ترتیب ۷۸۰۱/۲ و ۸۱۵۴/۴ یاخته باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه) و در گروه آماری a قرار گرفتند. همچنین تعامل‌های این جدایه با ارقام بولانی و فورنو آلوده شده به زنگ، و رقم بولانی غیر آلوده به‌زنگ به‌ترتیب با ۵۸۸۵/۷، ۵۱۸۶/۹ و ۵۰۷۹/۹ یاخته باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه در مرتبه بعدی قرارگرفتند. کمترین میزان جمعیت باکتری در تعامل جدایه CHA0*gfp2* با رقم روشن آلوده و غیر آلوده به‌زنگ به‌ترتیب با جمعیت برابر ۹۳۸/۲ و ۸۸۷/۳ یاخته باکتری در میلی‌گرم خشک ریشه مشاهده شد و در گروه آماری e قرار گرفتند (شکل ۳).

تأثیر جدایه باکتری، رقم گندم و قارچ *Puccina triticina* در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ گندم

از نظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۴۸ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر، بین ارقام و بین جدایه‌های باکتری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما بین گیاه آلوده و غیرآلوده به بیمارگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. اثر متقابل رقم-بیمارگر و اثر متقابل رقم-باکتری-بیمارگر در سطح ۵٪ معنی دار می‌باشد.



شکل ۳- میزان کلونیزاسیون جدایه‌های سودمند سودوموناس فلورسنت روی ریشه‌ی سه رقم گندم زمستانه بولانی، روشن و فورنو (بر حسب تعداد یاخته باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه). نتایج به‌دست آمده میانگین سه تکرار است. حروف مشابه بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. 3. Colonization levels of two *P. fluorescens* biocontrol strains on the roots of the winter wheat varieties Boulani, Roushan and Forno (in CFU/mg of dry root mass). Mean values (three replications) followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$).

اثر متقابل رقم- بیمارگر نشان داد که تعامل بولانی بیمارگر بیشترین میزان و تیمار بولانی فاقد بیمارگر کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را دارا بودند (جدول ۱). اثر متقابل رقم-باکتری-بیمارگر نشان داد که فعالیت آنزیم در تعامل‌های PF153*mcherry* - فورنو-بیمارگر و فورنو-بیمارگر در مقایسه با گیاه غیر آلوده (۰/۳۶۷) به‌ترتیب ۵۲/۰۴ و ۴۹/۳۱ درصد افزایش یافت. هم‌چنین تعامل جدایه‌ی CHA0*gfp2* با ارقام بولانی و روشن آلوده به

بیمارگر و تعامل PF153*mcherry*- بولانی- بیمارگر، به‌ترتیب باعث افزایش ۴۴/۴۷، ۱۳/۲۲ و ۴۰/۴۳ درصدی فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد غیرآلوده (به‌ترتیب ۳۷۱/ ۰ و ۰/۴۴۶) شد.

تأثیر جدایه‌ی باکتری، رقم گندم و قارچ *Puccinia triticina* در میزان فعالیت آنزیم PAL برگ گندم

از نظر میزان فعالیت آنزیم PAL، ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، فقط بین ارقام و بین گیاه آلوده و غیرآلوده به بیمارگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. اثر متقابل رقم-باکتری- بیمارگر نشان داد که کاربرد باکتری تأثیر معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم PAL ندارد. به‌طور کلی فعالیت آنزیمی PAL در رقم روشن نسبت به دو رقم دیگر بالاتر بود. هم‌چنین آلودگی به بیمارگر باعث افزایش چشم‌گیر فعالیت PAL در گیاه شد (جدول ۲).

بررسی میزان ارتباط بین صفات مختلف آلودگی، کلونیزاسیون و فعالیت آنزیمی

با توجه به نتایج جدول ۳ بین میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری با نسبت تعداد جوش زنگ روی برگ آلوده در حضور باکتری همبستگی منفی در سطح ۵٪ مشاهده می‌شود که با افزایش میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری شدت بیماری روی برگ‌های آلوده به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. بین نسبت تعداد جوش زنگی با فعالیت آنزیم‌های PAL و پراکسیداز هم‌بستگی مثبت در سطح ۵ درصد وجود داشت.

جدول ۱- بررسی تعامل‌های دو جدایه‌ی *P. fluorescens* PF153*mcherry* و *P. fluorescens* CHA0*gfp2* و بیمارگر *Puccinia triticina* با سه رقم گندم در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ بعد از ۴۸ ساعت مایه زنی با بیمارگر.

Table 1. Peroxidase activity in the leave of three wheat varieties in the interaction among *Pseudomonas fluorescens* CHA0*gfp2, P. fluorescens* PF153*mcherry* and *Puccinia triticina* after 48 hour inoculation by pathogen.

Treatment	Peroxidase activity	Treatment	Peroxidase activity
Boulani	0.371 g	Roushan+Pt	0.480 bcd
Boulani+CHA0	0.395 fg	Roushan+CHA0+Pt	0.505 abc
Boulani+PF153	0.364 g	Roushan+PF153+Pt	0.487 bcd
Boulani+Pt	0.535 ab	Forno	0.367 g
Boulani+CHA0+Pt	0.536 ab	Forno+CHA0	0.363 g
Boulani+PF153+Pt	0.521 ab	Forno+PF153	0.407 efg
Roushan	0.446 def	Forno+Pt	0.548 a
Roushan+CHA0	0.456 cde	Forno+CHA0+Pt	0.508 abc
Roushan+PF153	0.450 cde	Forno+PF153+Pt	0.558 a

Pt: *Puccinia triticina*

Mean values followed by the same letter are not significantly different (Duncan test, α=0.05)

جدول ۲- بررسی تعامل‌های دو جدایه *P. fluorescens* PF153*mcherry* و *P. fluorescens* CHA0*gfp2* و بیمارگر *Puccinia triticina* با سه رقم گندم در میزان فعالیت آنزیم فتیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در برگ بعد از ۴۸ ساعت مایه زنی با بیمارگر.

Table 2. PAL activity in the leave of three wheat varieties in the interaction among *Pseudomonas fluorescens* CHA0*gfp2, P. fluorescens* PF153*mcherry* and *Puccinia triticina* after 48 hour inoculation by pathogen.

Treatment	PAL activity	Treatment	PAL activity
Boulani	36.75 ef	Roushan+Pt	55.08 a
Boulani+CHA0	35.87 f	Roushan+CHA0+Pt	57.71 a
Boulani+PF153	37.45 def	Roushan+PF153+Pt	57.94 a
Boulani+Pt	38.75 cde	Forno	34.77 f
Boulani+CHA0+Pt	41.27 c	Forno+CHA0	34.93 f
Boulani+PF153+Pt	40.37 cd	Forno+PF153	35.61 f
Roushan	34.12 f	Forno+Pt	49.25 b
Roushan+CHA0	37.99 def	Forno+CHA0+Pt	49.87 b
Roushan+PF153	36.38 ef	Forno+PF153+Pt	49.08 b

Pt: *Puccinia triticina*

Mean values followed by the same letter are not significantly different (Duncan test, α=0.05)

جدول ۳- وجود هم‌بستگی (Pearson correlations) بین صفات مختلف آلودگی، کلونیزاسیون و فعالیت آنزیمی.

Table 3. Pearson correlations between infection parameters (disease incidence and severity) and bacterial root colonisation and PAL activity.

	Number of pustules per leaf	Peroxidase activity	PAL activity
Root colonization of rust-infected plants	-0.624*	0.189^{ns}	-0.245^{ns}
Number of pustules per leaf		0.594*	0.671*
Peroxidase activity			0.081^{ns}

*, significant correlation at $P<0.05$
^{ns}, Non-significant correlation

بحث

ریزوسفر ناحیه‌ای از خاک است که تحت تأثیر ریشه‌ی گیاه بوده و از نظر میکروبی بسیار غنی‌تر از خاک اطراف آن می‌باشد. ترشحات ریشه‌ی گیاهان منبع مهم غذایی برای جذب میکروارگانیسم‌ها بوده و سبب شده تا جمعیت میکروبی ریزوسفر ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از خاک اطراف باشد (Raaijmakers *et al.,* 2008, Lugtenberg and Kamilova, 2009). از طرفی گیاهان برای شناسایی میکروب‌ها دارای گیرنده‌های شناسایی الگویی (Pattern recognition receptors) در غشای پلاسمایی هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (Microbe-associated molecular patterns: MAMPs) را شناسایی کرده و پیام‌های داخلی سلولی را تولید و واکنش‌های دفاعی را راه‌اندازی کنند (Chisholm *et al.,* 2006, Jones & Dangl, 2006). شناسایی MAMPs چندین فرآیند پاسخ سلولی از قبیل نسخه‌برداری ژن‌های کد کننده پروتئین‌های ضد میکروبی و زیست ساخت آنزیم‌های لازم برای سنتز و تجمع ساختارها و ترکیبات ضد میکروبی را راه اندازی می‌کند (Nurnberger *et al.,* 2004). به‌دلیل این که میکروب‌های مفید نیز ابتدا به‌وسیله‌ی گیاه به‌عنوان مهاجم بالقوه تشخیص داده می شوند، غالباً دخالت فعالی در سیستم ایمنی گیاه جهت استقرار یک هم‌زیستی پایدار ایجاد می‌شود (Zamioudis & Pieterse, 2012). این دخالت هم‌چنین باعث افزایش آمادگی دفاعی گیاه جهت مقابله با مهاجمان بعدی است که مقاومت القایی سیستمیک (ISR) نامیده می‌شود. در تحقیقات متعددی مشخص شده است باکتری‌های سودوموناس که به ریزوسفر گیاه تلقیح شدند با سازوکار مقاومت سیستمیک القایی از بیمارگرهای قسمت‌های هوایی گیاه مانند بیماری‌های ساقه (Van Peer *et al.,* 1991) و برگ (Wei *et al.,* 1991) ممانعت کرده و همچنین در کنترل بیمارگرهای ریشه مفید هستند (Leeman *et al.,* 1995, Leeman *et al.,* 1996). در تحقیق حاضر نیز حضور باکتری‌های سودمند PF153*mcherry* و CHA0*gfp2* روی ریشه از طریق سازوکار مقاومت سیستمیک القایی باعث کاهش بیماری زنگ برگی در سه رقم گندم شد. هر دو باکتری سودمند PF153*mcherry* و CHA0*gfp2* در کاهش بیماری در ارقام بولانی و فورنو در مقایسه با رقم روشن مؤثرتر بودند. شریفی تهرانی و همکاران (Sharifi-Tehrani *et al.,* 2008) گزارش کردند که حضور سودوموناس‌های فلورسنت روی ریشه ارقام نسبتاً مقاوم سیمتا (cimetta) و زینال (zinal)، در مقایسه با رقم حساس آرینا (arina) در کاهش بیماری زنگ برگی (زادمایه مخلوط جدایه‌ها از مزارع مختلف سوئیس) مؤثرتر است. همچنین مشخص شده است که حضور باکتری CHA0mcherry *P. fluorescens* در منطقه‌ی ریزوسفر سه رقم گندم باعث کاهش چشمگیر زنگ برگی فقط در رقم بولانی می‌شود (Sharifi-Tehrani *et al.,* 2011). بنابراین به‌نظر می‌رسد که میزان نقش باکتری در محافظت از گیاه، بسته به نوع رقم گندم و میزان مقاومت آن نسبت به جدایه‌های بیمارگر، متفاوت است و یافتن نقش مقاومت گیاه در تعامل با باکتری‌های سودمند و ایجاد میزان مقاومت القایی نیاز به تحقیقات وسیع‌تری دارد. از طرفی در این پژوهش، جهت بهتر فهمیدن نقش باکتری‌های سودمند در القای مقاومت سیستمیک، میزان کلونیزه شدن ریشه‌ی ارقام گندم توسط باکتری‌ها نیز ارزیابی شد که نشان داد نه‌تنها میزان کلونیزه شدن ریشه‌ی یک گیاه توسط باکتری‌های مختلف متفاوت است بلکه ارقام مختلف نیز به‌طور یکسان توسط یک باکتری کلونیزه نمی‌شوند و بین ارقام اختلاف

معنی‌داری وجود دارد. به‌طور کلی جدایه‌ی PF153*mcherry* دارای بیشترین یاخته باکتری در میلی‌گرم خشک ریشه بود و به عبارتی قابلیت بیشتری در کلونیزه کردن ریشه نشان داد. رقم روشن دارای بیشترین جمعیت باکتری روی ریشه بود و به‌عبارتی ترشحات ریشه‌ی آن شرایط مساعدتری جهت رشد و کلونیزه کردن باکتری فراهم کرده‌است. در مورد تعامل جدایه باکتری-بیمارگر بیشترین میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری در تعامل جدایه PF153*mcherry* با گیاه آلوده به بیمارگر مشاهده شد. همچنین این جدایه روی گیاه غیرآلوده نیز از جمعیت بالایی برخوردار بود. بنابراین جدایه PF153*mcherry* از شایستگی بالاتری جهت تکثیر و فعالیت در ریزوسفر گندم برخوردار بود. این حقیقت که ارقام مختلف گندم در میزان کلونیزه شدن ریشه توسط جدایه‌های باکتری متفاوت هستند نیز قبلاً گزارش شده است (Mazzola *et al.,* 2004, Sharifi-Tehrani *et al.,* 2008, Sharifi-Tehrani *et al.,* 2011). از طرف دیگر نقش ترشحات ریشه گندم در القاء فعالیت مفید جهش‌یافته‌های سودوموناس فلورسنس در ریزوسفر گندم اثبات شده است (Van Overbeek & Vand Elsas, 1995). این تفاوت در میزان کلونیزه شدن ریشه می‌تواند فعالیت سودمند باکتری را تحت تأثیر قرار دهد و به‌عبارت دیگر هم درصد بیماری و هم شدت بیماری به‌طور معنی‌داری وابسته به میزان کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری سودمند است. در این تحقیق حضور بیمارگر، نقش معنی داری در تحریک و افزایش کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری نشان نداد اما بسته به باکتری و رقم گندم، حضور بیمارگر در میزان کلونیزه شدن ریشه مؤثر بود به‌طوری که در رقم فورنو، آلودگی به بیمارگر باعث افزایش میزان کلونیزه شدن ریشه توسط جدایه سودمند PF153*mcherry* شد در حالی که در رقم بولانی بیشترین جمعیت باکتری CHA0*gfp2* روی ریشه گیاه غیرآلوده به بیمارگر مشاهده شد. بنابراین حضور بیمارگر بسته به جدایه باکتری و رقم گیاه در افزایش و یا کاهش میزان کلونیزه شده ریشه‌ی گیاه توسط باکتری مؤثر است که با نتایج پژوهشگران دیگر مطابقت دارد (Notz *et al.,* 2001, Sharifi-Tehrani *et al.,* 2008, Sharifi-Tehrani *et al.,* 2011).

در تحقیق حاضر حضور بیمارگر فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد در صورتی که وجود باکتری تأثیر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم نداشت. بین تعداد جوش زنگی روی برگ‌ها با فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت. از طرفی هیچ‌گونه همبستگی بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و شدت بیماری مشاهده نشد. با این اوصاف به‌نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم PAL بیشتر در ارتباط با پاسخ گیاه به‌حضور بیمارگر است و در کاهش بیماری زنگ برگی نقش معنی‌داری ندارد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان‌دهنده‌ی برقراری تعامل سودمند بین جدایه ریزوباکتری-رقم گندم است که در راستای القای مقاومت و مهار بیمارگرهای برگی در سیستم کشاورزی پایدار امیدوارکننده بود. لذا این پیام دهی گیاه-میکروب پیشنهاد دهنده‌ی یک تبادل اطلاعات بین برگ‌های گیاه، ریشه‌ها و باکتری‌های مفید می‌باشد. هر قدر گیاه شرایط مساعدتری را در ریزوسفر خود جهت کلونیزه شدن بیشتر ریشه توسط باکتری مفید فراهم آورد، سودمندی‌های بیشتری از باکتری‌های مفید به‌دست خواهد آورد. بنابراین ممکن است وقتی تراکم باکتری‌های مفید روی ریشه‌ی گیاهان افزایش پیدا کند ویژگی‌های مقاومت در گیاهان نیز بهبود یابد.

سپاس‌گزاری

از دکتر Fabio Mascher از مؤسسه‌ی تحقیقات کشاورزی فدرال سوئیس (Agroscope Changins-Wädenswil) و خانم دکتر Maria Pechy-Tarr و پروفسور Christoph Keel از دانشگاه لوزان (University of Lausanne) به‌خاطر در اختیار قراردادن سویه‌های نشان‌دار باکتری‌ها و رقم گندم فورنو صمیمانه تشکر می‌شود. همچنین از مؤسسه‌ی تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واحد پاتولوژی غلات که در انجام این پژوهش مساعدت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology, 5th ed. Elsevier Academic Press, Florida, pp, 922.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell, 124: 803-814.

De Meyer, G. & Hofte, M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. Phytopathology, 87: 588–593.

Eversmeyer, M.G. & Kramer, C.L. 2000. Epidemiology of wheat leaf and stem rust in the central great plains of the USA. Annual Review of Phytopathology, 38: 491–513.

Fuchs, J.G., Moenne-Loccoz, Y. & Defago, G. 2000. The laboratory medium used to grow biocontrol *Pseudomonas* sp. Pf153 influences its subsequent ability to protect cucumber from black root rot. Soil Biology and Biochemistry, 32: 421–424.

Hammerschmidt, R. & Nuckles Em, Kuc, J. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiological Plant Pathology, 20: 73–82.

Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. Nature, 444: 323-329.

Kamlofskia, C.A., Antonelli, E., Bendera, C., Jaskelioff, M., Danna, C.H., Ugaldec, R. & Acevedo, A. 2007. A lesion-mimic mutant of wheat with enhanced resistance to leaf rust. Plant Pathology, 56: 46-54

Keel, C., Voisard, C., Berling, C.H., Kahr, G. & Defago, G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. Phytopathology, 79: 584–589.

Kolmer, J.A. 1996. Genetics of resistance to wheat leaf rust. Annual Review of Phytopathology, 34: 435–455.

Kolmer, J.A. 2005. Tracking wheat rust on a continental scale. Current Opinion in Plant Biology, 8: 441–449.

Leeman, M., Den Ouden, F.M., Van Pelt, J.A., Dirkx, F.P.M., Steiji, H., Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance against *fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 86: 149-155.

Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B. 1995a. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *fusarium* wilt, using a novel bioassay. European Journal of Plant Pathology, 101: 655-664.

Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B. 1995b. Induction of systemic resistance against *fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 85: 1021-1027.

Lugtenberg, B. & Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63(1): 541-556.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. & Defago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdin production. Phytopathology, 84: 139–146.

Mazzola, M., Funnell D.L. & Raaijmakers, J.M. 2004. Wheat cultivar-specific selection of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. Microbial Ecology, 48: 338–348.

McIntosh, R.A., Hart, G.E., Devos, K.M., Gale, M.D. & Rogers, W.J. 1998. Catalogue of gene symbols for wheat. Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium, 2-7 Aug. Vol. 5, Saskatoon, Canada.

McIntosh, R.A., Wellings, C.R. & Park, R.F. 1995. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO Australia, Kluwer Academic Publishers, Melbourne, Australia.

Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Hass, D. & Defago, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. Phytopathology, 91: 873–881.

Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. & Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. Immunological Reviews, 198: 249-266.

Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. & Moënne-Loccoz, Y. 2008. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. Plant and Soil, 321(1-2): 341-361.

Ross, W.W. & Sederoff, R.R. 1992. Phenylalanine ammonia lyase from loblolly Pine: Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clone. Plant Physiology, 98: 380 – 386.

Sharifi-Tehrani, A., Farzaneh, M., Afshari, F., Behboudi, K., Kellenberger, S., Pechy-Tarr, M., Keel C. & Mascher, F. 2011. Study of interaction between biocontrol bacteria-wheat cultivar-*Puccinia triticina* on degree of root colonization and Induction of systemic resistance against leaf rust. Journal of Crop Protection, 42 (1): 85-94.

Sharifi-Tehrani, A., Kelleberger, S., Farzane, M., Pechy-Tarr, M., Keel, C. & Mascher, F. 2008. Genotype-level interactions determine the degree of reduction of leaf rust on wheat by seed application of beneficial pseudomonads. IOBC/WPRS Bulletin, 43: 321-325.

Ton, J., Pieterse, C.M.J. & Van Loon, L.C. 1999. Identification of a locus in Arabidopsis controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 12: 911-918.

Vallad, G.E. & Goodman, R.M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science, 44: 1920–1934.

Van Overbeek, L.S. & Van Elsas, J.D. 1995. Root exudate-induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, 61: 890–898.

Van Peer, R., Niemann, G.J. & Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. Phytopathology, 81:728-734.

Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y.A.M., Hartog, F., & Vav Loon, L.C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 10: 716-724.

Wel, G., Kloepper, J.W., & Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 81:1508-1512.

Weller, D.M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. Phytopathology, 97:250-256.

Zamioudis, C. & Pieterse, C.M.J. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 25(2): 139-150.

Study of the root colonization and reduction of leaf rust disease in the interactions among beneficial rhizobacetria, wheat cultivars and *Puccinia triticina*

Mohsen Farzaneh[1], Farzad Afshari[2], Abbas Sharifi-Tehrani[3]

1. Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C. Evin, Tehran, Iran
2. Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO) Karaj, Iran
3. Associate Member of the Academy of Sciences, Tehran, Iran and Emeritus Professor, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran

Corresponding author: Mohsen Farzaneh, email: M_farzaneh@sbu.ac.ir

Received: Oct., 30, 2015 4 (1) 65-77 Accepted: Oct., 03, 2016

Abstarct

In this research, the interaction between two biocontrol strains of *Pseudomonas fluorescens* (PF153*mcherry* and CHA0*gfp2*) and three wheat cultivars (Boulani, Roushan, Forno) were studied to control wheat leaf rust disease (*Puccinia triticina*) under greenhouse conditions. Bacteria were appliedusing the seed treatment method. Results showed a reduction in disease severity on the leaves in certain combinations of bacterial strains and wheat cultivars. This was particularly evident for the interaction between CHA0*gfp2* and Forno with 69.74% decrease in the number of pustules on leaves. The Bolani and Forno cultivars that were not treated by bacteria exhibited the highest infection of leaf rust. Study of bacteria–wheat-pathogen interactions showed that the interaction between PF153*mcherry* with infected and non-infected Forno showed the highest bacterial colonization (7801.1 and 8154.4 cfu per mg dry root, respectively). Interaction between CHA0*gfp2* with infected and non-infected Roushan cultivar induced the lowest colonization on the rhizosphere by 938.2 and 887.3 cfu per mg dry root, respectively. However, interaction between pathogen and cultivars resulted in the increase of peroxidase and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in the leaves. In summary, we observed negative correlations between the bacterial colonization (cfu per mg dry root) and the number of rust pustules on the leaves. There was significant correlation between PAL activity and disease severity. Overall results of this study indicate that there is a promising beneficial interaction between the bacterial isolates and wheat cultivars which induce systemic resistance and suppress the leaf diseases in the sustainable agricultural system.

Keywords: wheat rhizosphere, beneficial bacteria, induced resistance, leaf rust, enzyme activity