مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۹۴-۸۵)

بررسی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0*mcherry* در میزان کلونیزه کردن ریشه ارقام مختلف گندم و ایجاد مقاومت القایی علیه زنگ قهوه‌ای

عباس شریفی تهرانی[۱]، محسن فرزانه[۲]*، فرزاد افشاری[۳]، کیوان بهبودی[۴]، استفن کلنبرجر[۵]، ماریا پچی تار[۶]، کریستوف کیل[۷] و فابیو ماسچر[۸]

۱، ۴، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۲، استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ۳، دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ۵، ۸، استادیاران پژوهش سازمان تحقیقات کشاورزی سوئیس، ۶، ۷، استادان بخش میکروبیولوژی دانشگاه لوزان، سوئیس

(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۶ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۰/۸)

چکیده

در این پژوهش تأثیر جدایه *Pseudomonas fluorescens* CHA0*mcherry* در همکنش با سه رقم گندم بولانی، روشن و فورنو در کنترل بیماری زنگ برگی (*Puccinia triticina*) به روش آغشته‌سازی بذر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده کاهش شدت بیماری روی برگ‌ها در همکنش جدایه باکتری و ارقام گندم است. این کاهش بیماری به طور ویژه‌ای در همکنش جدایه CHA0*mcherry* با رقم بولانی مشاهده شد. بیشترین میزان آلودگی به زنگ در دو رقم بولانی و فورنو فاقد زادمایه باکتری مشاهده شد. بررسی اثر متقابل جدایه باکتری، رقم گندم و بیمارگر نشان داد که رقم فورنو غیرآلوده به زنگ در همکنش باCHA0*mcherry*، بیشترین میزان کلونیزاسیون باکتریایی را داشته است. کمترین میزان سلول باکتری در ریشه رقم روشن غیرآلوده به زنگ مشاهده شد. همکنش بیمارگر با هر سه رقم گندم باعث افزایش فعالیت فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) در برگ‌ها شد. همچنین آلودگی به زنگ در افزایش فعالیت پراکسیداز نقش معنی‌داری نشان داد. در نهایت بین میزان کلونیزاسیون باکتریایی (تعداد سلول باکتری در میلی‌گرم وزن ریشه خشک) با شدت بیماری زنگ برگی همبستگی منفی مشاهده شد. همچنین همبستگی مثبت بین آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز و شدت بیماری وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: رقم گندم، کلونیزاسیون، سودوموناس فلورسنت، زنگ‌برگی، مقاومت القایی.

مقدمه

قارچ *Puccinia triticina* Eriks. عامل بیماری زنگ قهوه‌ای، به عنوان یکی از بیمارگرهای مخرب مناطق گندم‌کاری دنیا شناخته شده است (Kolmer, 2005). کاربرد ارقام مقاوم به عنوان یک روش کارآمد کنترل بیماری اثبات شده است (Kolmer, 2005). هرچند مقاومت گیاه به صورت تک ژنی یا چند ژنی است (Kolmer, 1996; McIntosh *et al*., 1995). اما کارایی

* نویسنده مسئول: محسن فرزانه تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۸۷۸۰۵ E-mail: mfarzane@alumni.ut.ac.ir

مقاومت توسط فاکتورهای محیطی متعدد زنده و غیرزنده تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Kolmer, 1996; Eversmeyer & Kramer, 2000). حضور باکتری‌های بیوکنترل خاصی روی ریشه پاسخ مقاومتی را در لوبیا، توتون و آرابیدوپسیس القا کرده است (De Meyer & Höfte, 1997; Maurhofer *et al.*, 1994; Vallad & Goodman, 2004). لذا مقاومت القایی یکی از مکانیسم‌های عمل ریزوباکترهای افزایش دهنده رشد گیاه، بخصوص سودوموناد‌های فلورسنت، در کاهش بیماری است (Van Peer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991). مکانیسم مقاومت سیستمیک در اثر تحریک بیمارگر یا عواملی دیگر مثل باکتری‌های مفید ریشه ایجاد می‌شود (Weller, 2007) که در نتیجه این تحریک‌ها سیگنال‌های مقاومت تولید شده و در سراسر گیاه پخش می‌شوند (Agrios, 2005). از طرف دیگر نقش ترشحات ریشه گندم در القاء فعالیت افزایش دهندگی رشد توسط موتانت‌های سودوموناس فلورسنس در ریزوسفر گندم اثبات شده است (Van Overbeek & Van Elsas, 1995). بنابراین سودوموناس‌های خاکزی مفید ریزوسفر گندم نیز از طریق مکانیسم افزایش مقاومت القایی و تامین 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. به هر حال کلنیزاسیون و قابلیت افزایش دهندگی رشد گیاه (Plant growth promoting rhizobacteria: PGPR) اختصاصیت میزبانی خاصی ندارد و بیشتر ریزوباکترها قادر هستند طیف وسیعی از گیاهان را کلنیزه کرده و باعث افزایش رشد آنها شوند، ولی پدیده مقاومت القایی در گیاهان خاصی ایجاد می‌شود. برای مثال استرین های القاء کننده مقاومت، *P. putida* WCS358r و *P. fluorescens* WCS374r روی گونه‌های گیاهی مختلف به صورت متفاوتی عمل می‌کنند؛ آرابیدوپسیس نسبت به استرین WCS358r حساس است، در صورتی که هویج حساسیتی از خود نشان نمی‌دهد (Leeman *et al.*, 1995b; Van Wees *et al.*, 1997). برعکس، هویج نسبت به WCS374r حساس است (Leeman *et al.*, 1995a). در گیاه آرابیدوپسیس استرین‌های مذکور عملکردهای مختلفی را بر روی ارقام مختلف این گیاه از خود نشان می‌دهند، به طوری که WCS417r قادر به ایجاد مقاومت سیستمیکی القایی (Induced systemic resistance: ISR) بر روی واریته Col-0 می‌باشد در صورتی که همین استرین قادر به ایجاد مقاومت در واریته RLD1 نمی‌باشد (Ton *et al.*, 1999; Van Wees *et al.*, 1997). بنابراین به نظر می‌رسد که مقاومت ایجاد شده توسط ریزوباکترها، پدیده ای کاملاً اختصاصی است که بین ریزوباکترهای خاص و گیاهان خاص ایجاد می‌شود.

هدف از این تحقیق بررسی قابلیت جدایه CHA0*mcherry* در میزان کلونیزه کردن ریزوسفر سه رقم گندم و نقش این کلونیزاسیون در ایجاد مقاومت القایی و کاهش بیماری زنگ برگی است. همچنین ارتباط بین فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (proxidase) و فنیل‌آلانین آمونیالیاز (phenylalanine ammonia lyase: PAL) با میزان کلونیزاسیون ریشه و شدت بیماری نیز بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

تهیه ارقام گندم و جدایه آنتاگونیست

دو رقم ایرانی بولانی و روشن از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و رقم فورنو (Forno) از مؤسسه کشاورزی فدرال سویس دریافت شد. جدایه *P. fluorescens* CHA0*mcherry* که سویه نشاندار شده تیپ وحشی CHA0، (Péchy-Tarr & Keel, unpublished) می‌باشد از دانشگاه لوزان(Lausanne) سوئیس دریافت شد. این جدایه حاوی ژن گزارشگر ام-چری (*mcherry*) با ویژگی پروتئین فلورسنت آلبالویی رنگ و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (gentamicin) می‌باشد.

تهیه زادمایه جدایه آنتاگونیست

برای تهیه زادمایه از جدایه CHA0*mcherry*، از کشت ۳۶ ساعته باکتری روی محیط آگار مغذی به فلاسک‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع ال- بی (LB: شامل ۱۰ گرم تریپتون پپتون (Tryptone peptone) ، ۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیوم آبدار، ۸ گرم نمک فیزیولوژیک (NaCl) و

۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد) اضافه شده و به مدت ۳۶ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده (۲۰۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق قرار گرفت. سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ (به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g) از محیط مایع ال- بی جدا شده و برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی، در محلول ۰/۱۵ مولار نمک طعام شستشو شدند. سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ مجدد از این محلول جداسازی شده و از آنها در آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه شده و پس از رقیق سازی، جمعیت آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر به جذب نوری ۰/۷ (حدود 10^9 سلول باکتری) تنظیم شد.

تهیه زادمایه بیمارگر *Puccinia triticina*

ایزوله 140 *P. triticina* که از منطقه اهواز جمع‌آوری و خالص سازی شده بود و در واحد پاتولوژی غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر در دمای ۸۰- نگهداری می‌شد جهت انجام آزمایش انتخاب گردید. تهیه زادمایه قارچ با مایه‌زنی اورودینیوسپور (Urediniospore) روی گیاهچه‌های یک هفته‌ای رقم حساس بولانی انجام شد و پس از دو هفته، اورودینیوسپورهای ظاهر شده جمع‌آوری و برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی اثر جدایه CHA0*mcherry* در کنترل *P. triticina*

۱۰۰ گرم خاک مزرعه ناحیه کرج (شهرک نهال و بذر مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) به درون گلدان‌های پلی‌اتیلن (قطر ۱۰ سانتی‌متر) منتقل شد. آزمایش به روش آغشته‌سازی بذر انجام گرفت. ابتدا ۵ عدد بذر روی سطح خاک هر گلدان قرار داده و سپس۲۰۰ میکرولیتر از سوپانسیون 10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر بذر اضافه شد. بذرها با یک لایه نازکی از خاک بسیار نرم پوشانده شده و اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت و به روش آب‌پاشی خاک سطح گلدان انجام گرفت. گلدان‌ها داخل سینی قرار گرفته و آبیاری‌های بعدی گلدان‌ها با اضافه کردن آب به سینی به فاصله هر سه روز یک بار انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و نور مناسب قرار گرفته و پس از ۱۰ روز با سوسپانسیون اسپور قارچ *P. triticina* مایه‌کوبی شدند. پس از مایه‌زنی، روی گلدان‌ها یک سرپوش کریستالی شفاف قرار داده شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده به مدت ۲۴ ساعت در اتاق تاریک و دمای ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت اشباع نگهداری شده و سپس در شرایط گلخانه با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد منتقل شدند. پس از دو هفته میزان بیماری با شمارش برگ‌های آلوده و تعداد جوش زنگی روی برگ‌ها ارزیابی شد (Sharifi-Tehrani *et al.*, 2008).

ارزیابی توانایی جدایه CHA0*mcherry* در میزان کلونیزاسیون ریشه سه رقم گندم

تعداد سلول باکتریایی تشکیل شده روی ریشه ارقام مختلف گندم به روش شرح داده شده توسط Keel *et al.* (1989) ارزیابی شد. به طور 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 به مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه تکان‌دهنده با تکان ۳۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. از سوسپانسیون حاصل دو بار سریال رقت تهیه شد و به مقدار ۱۲۰ میکرولیتر روی محیط اختصاصی آگار دار ال- بی حاوی جنتامایسین (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کاربندازیم (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) پخش شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه، تعداد کلنی های ظاهر شده شمارش و میزان کلونیزه کردن باکتری بر حسب تعداد سلول باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه محاسبه شد.

بررسی‌های فعالیت آنزیمی بوته‌های تیمار شده با CHA0*mcherry* در طی فرآیند بیماریزایی

استخراج عصاره گیاهی

۰/۵ گرم برگ بلافاصله پس از جمع‌آوری به ظروف نیتروژن مایع منتقل شده تا سریع منجمد گردد و پس از انجماد تا زمان عصاره‌گیری در فریزر منفی ۸۰ نگهداری شدند. سپس هر نمونه را بیرون آورده و در درون ظرف هاون چینی با استفاده از محلول بافر فسفات سدیم، عمل عصاره‌گیری انجام شد. به این صورت که برگها در درون هاون در دمای ۴ درجه سلسیوس با استفاده از دسته هاون پودر و خرد شده و سپس دو

میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH برابر با ۶ اضافه کرده و پس از به دست آوردن یک مخلوط هموژن (عصاره)، عصاره حاصل به داخل ویال‌های پلاستیکی دو میلی‌لیتری منتقل شد. ویال‌های حاوی عصاره‌های برگی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شوند. سپس محلول شفاف رویی را جدا کرده و در ویال دیگری ریخته و تا اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند (Hammerschmidt *et al.*, 1989).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

برای این منظور فعالیت آنزیمی به روش Hammerschmidt *et al.* (1989) مورد بررسی قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۶۰۰ میکرو لیتر محلول پیروگالول(pyrogallol) ۰/۰۵ مولار و ۲۰۰ میکرو لیتر عصاره در کووت کوارتز (Quarts Cuvete) ریخته و درست قبل از اندازه‌گیری سرعت واکنش، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (Hydrogen peroxide) ۰/۱٪ (حجم به حجم) به عنوان پذیرنده الکترون به مخلوط واکنش اضافه شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، ۰/۲ میلی‌لیتر آنزیم استخراج شده غیرفعال (غیرفعال شده با جوشیدن در آب جوش) با ۶۰۰ میکرولیتر محلول پیروگالول ۰/۰۵ مولار مخلوط شده و در کووت ریخته و به عنوان کووت شاهد در نظر گرفته و میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با آن صفر گردید. سپس جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز مقدار تغییرات جذب مخلوط واکنش (پس از افزودن پراکسید هیدروژن) در طول موج ۴۲۰ نانومتر هر ۳۰ ثانیه در به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV, 70 visible (PG Instrument T) اندازه‌گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به ازای هر گرم بافت برگی تازه بیان گردید.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز بر اساس روش Ross & Sederoff (1992) با کمی تغییرات صورت گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، ۴۰۰ میکرولیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار تریس اسیدکلریدیک (HCl) با pH ۸/۸ و ۴۰ میکرولیتر ال-فنیل‌آلانین (L-phenylalanine) یک میلی‌مولار مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگه داشته شده و سپس واکنش با افزودن اسید کلریدریک دو نرمال متوقف گردید. سپس به مخلوط حاضر یک میلی‌لیتر تولوئن (toluene) اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه به هم زده شد. برای جداسازی فاز تولوئن حاوی ترنس سینامیک اسید(trans-cinnamic acid) ، این مخلوط به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. 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 بر اساس نانو مولهای تولید شده ترنس سینامیک اسید بر دقیقه بر وزن تر برگ محاسبه گردید. مقدار سینامیک اسید تولید شده بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده از غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰۰ میلی‌مول و با pH ۸/۸ محاسبه شد.

آنالیزهای آماری

برای تجزیه داده‌ها از سه نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز بهره برده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به وسیلهٔ نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد. برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح ۱٪ یا ۵٪ مقایسه شدند. آنالیزهای همبستگی بین نتایج آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج

تأثیر جدایه CHA0*mcherry* در کاهش آلودگی به *P. triticina*

باتوجه به نتایج شکل‌های ۱ و ۲ بین ارقام از نظر تعداد برگ‌های آلوده و تعداد جوش زنگ روی برگ‌های آلوده در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به طور کلی رقم روشن نسبت به رقم‌های بولانی و فورنو حساسیت کمتری در برابر زنگ قهوه‌ای نشان داد.

همکنش باکتری CHA0*mcherry* با ارقام بولانی و

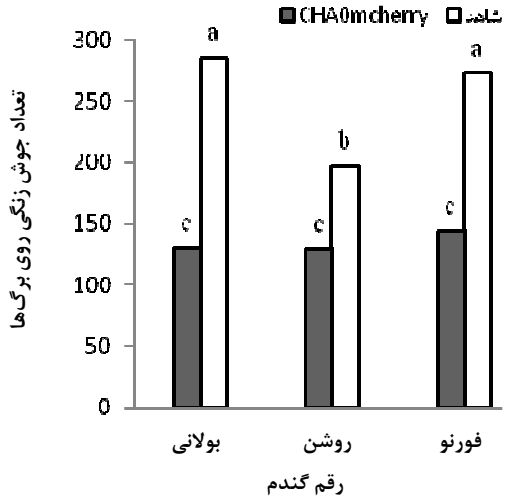
فورنو باعث کاهش معنی‌دار در تعداد برگ‌های آلوده گردید ولی این باکتری در همکنش با رقم روشن تأثیری در کاهش معنی‌دار برگ‌های آلوده نداشت (شکل ۱).

از نظر تعداد جوش زنگ روی برگ‌های آلوده، همکنش جدایه CHA0*mcherry* با رقم بولانی با ۵۴/۴۵ درصد کاهش جوش برگی، تأثیر چشمگیری در ایجاد مقاومت القایی و کنترل بیماری نشان داد. کاربرد باکتری روی ارقام روشن و فورنو نیز به ترتیب با ۳۴/۶۳ و ۴۷/۴ درصد کاهش جوش برگی، در کنترل بیماری مؤثر بود (شکل ۲).

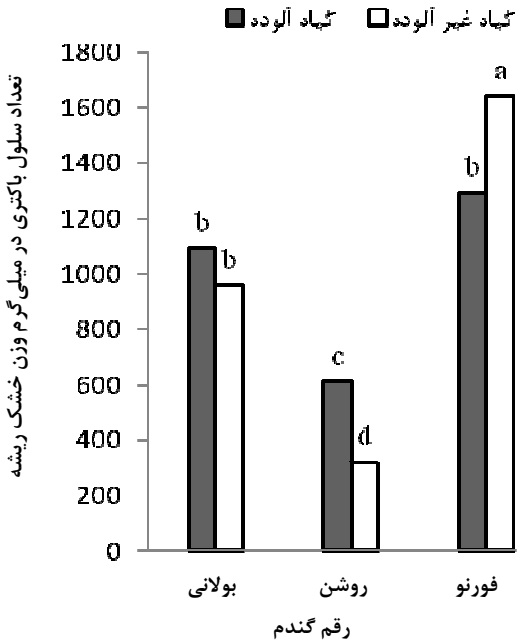
تأثیر رقم گندم و آلودگی به *P. triticina* در میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری

باتوجه به نتایج به دست آمده (شکل ۳) از نظر میزان کلونیزه شدن ریشه گندم توسط باکتری بین ارقام در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در حالت کلی بین گیاه غیرآلوده و آلوده به بیمارگر زنگ قهوه‌ای، از نظر میزان کلونیزه شدن توسط باکتری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اما در مورد هر رقم بین گیاه غیرآلوده و آلوده به بیمارگر زنگ قهوه‌ای تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

شکل ۱- درصد برگ‌های آلوده به زنگ برگی روی ارقام زمستانه گندم بولانی، فورنو (هر دو دارای حساسیت بالا) و رقم روشن (نسبتاً حساس) تلقیح شده با جدایه CHA0*mcherry*. نتایج به دست آمده میانگین سه تکرار است. حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۲- تعداد جوش زنگ قهوه‌ای (شدت بیماری) روی برگ‌های ارقام زمستانه گندم بولانی، فورنو (هر دو دارای حساسیت بالا) و رقم روشن (نسبتاً حساس) تلقیح شده با جدایه CHA0*mcherry*. نتایج به دست آمده میانگین سه تکرار است. حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳- میزان کلونیزاسیون جدایه CHA0*mcherry* روی ریشه سه رقم گندم زمستانه بولانی، روشن و فورنو (بر حسب تعداد سلول باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه). نتایج به دست آمده میانگین سه تکرار است. حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

در مورد تأثیر متقابل جدایه باکتری، رقم و آلودگی، بیشترین جمعیت باکتری روی ریشه رقم فورنو غیرآلوده به زنگ وجود داشت به طوری که تعداد سلول باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه برابر با ۱۶۳۹/۲۹ سلول باکتری و میزان کلونیزاسیون روی ریشه رقم فورنو آلوده به زنگ برابر با ۱۲۹۲/۳۸ سلول باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه بود. کمترین میزان کلونیزاسیون در ریشه رقم روشن غیرآلوده به زنگ مشاهده شد که جمعیت باکتری برابر ۳۲۱/۱۱ سلول در میلی‌گرم خشک ریشه بود (شکل ۳).

تأثیر باکتری، رقم گندم و قارچ *Puccina triticina* در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ گندم ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر

باتوجه به نتایج جدول ۱ از نظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مایه‌زنی با بیمارگر، بین ارقام در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. اثر متقابل رقم-باکتری، رقم-بیمارگر، باکتری- بیمارگر و اثر متقابل رقم-باکتری-بیمارگر در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

اثر متقابل رقم-بیمارگر نشان داد که آلودگی به بیمارگر باعث افزایش فعالیت پراکسیداز می‌شود (جدول ۱).

اثر متقابل رقم-باکتری- بیمارگر نشان داد که رقم روشن آلوده و غیرآلوده به بیمارگر و ارقام فورنو و بولانی آلوده به بیمارگر به ترتیب با فعالیت آنزیمی برابر با ۰/۴۳۷، ۰/۴۲۷، ۰/۴۲۹ و ۰/۴۱۵ بیشترین فعالیت آنزیمی را دارند در حالی که برهمکنش باکتری باعث کاهش این فعالیت آنزیمی به ترتیب به ۰/۳۹۵، ۰/۳۵۵، ۰/۳۶۶ و ۰/۴۰۴ شد. رقم فورنو غیرآلوده در همکنش با باکتری CHA0*mcherry* کمترین فعالیت آنزیمی (۰/۳۴۷) را دارا بود (جدول ۱).

۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، اثر متقابل رقم-باکتری-بیمارگر نشان داد که وجود باکتری و آلودگی به بیمارگر باعث افزایش فعالیت پراکسیداز شد به طوری که بیشترین فعالیت آنزیمی در همکنش باکتری با ارقام بولانی، فورنو و روشن آلوده به بیمارگر به ترتیب با فعالیت آنزیمی برابر با ۰/۵۳۵، ۰/۴۹۸ و ۰/۵۲۸ مشاهده شد (جدول ۱).

تأثیر باکتری، رقم گندم و قارچ *Puccina triticina* در میزان فعالیت آنزیم PAL برگ گندم ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر

با توجه به نتایج از نظر میزان فعالیت آنزیم، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت مایه‌زنی با بیمارگر، بین ارقام در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. اثر متقابل رقم-باکتری، رقم-بیمارگر، باکتری-بیمارگر و اثر متقابل رقم-باکتری-بیمارگر در سطح ۵٪ معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۱- بررسی همکنش جدایه CHA0*mcherry* و سه رقم گندم در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ (بر حسب تغییرات جذب در گرم بافت برگ)

تیمار	۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با *P. triticina*		۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با *P. triticina*	
بولانی	de**	*۰/۳۶۳	e	۰/۳۷۱
بولانی + CHA0*mcherry*	cd	۰/۳۷۹	e	۰/۳۵۵
بولانی + بیمارگر	ab	۰/۴۱۵	ab	۰/۵۳۵
بولانی + بیمارگر + CHA0*mcherry*	b	۰/۴۰۴	ab	۰/۵۲۴
روشن	a	۰/۴۲۷	cd	۰/۴۴۶
روشن + CHA0*mcherry*	e	۰/۳۵۵	de	۰/۳۸۹
روشن + بیمارگر	a	۰/۴۳۷	c	۰/۴۸
روشن + بیمارگر + CHA0*mcherry*	bc	۰/۳۹۵	ab	۰/۵۲۸
فورنو	bc	۰/۳۹۹	e	۰/۳۶۷
فورنو + CHA0*mcherry*	e	۰/۳۴۷	e	۰/۳۸۳
فورنو + بیمارگر	a	۰/۴۲۹	a	۰/۵۴۸
فورنو + بیمارگر + CHA0*mcherry*	de	۰/۳۶۶	abc	۰/۴۹۸

* اعداد متن جدول میانگین سه تکرار است.

** حروف غیر متشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، کاربرد باکتری باعث افزایش جزئی در فعالیت PAL در اکثر همکنش‌های باکتری-رقم شد. همچنین اثر متقابل رقم-بیمارگر نشان داد که آلودگی به بیمارگر در افزایش فعالیتPAL معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲).

اثر متقابل رقم-باکتری-بیمارگر نشان داد که فعالیت آنزیم در ارقام روشن و فورنو آلوده به بیمارگر در مقایسه با گیاه غیرآلوده به ترتیب ۲۳/۷۹ و ۱۷/۲۸ درصد افزایش یافت. همچنین همکنش‌های جدایه CHA0mcherry با ارقام بولانی، روشن و فورنو آلوده به بیمارگر به ترتیب باعث افزایش ۹/۰۷، ۱۹/۴۲ و ۱۶/۶۷ درصدی فعالیت آنزیم PAL در مقایسه با شاهد غیرآلوده (به ترتیب ۳۶/۰۳، ۳۴/۵۵ و ۳۴/۳۱ نانومول سینامیک اسید) شد.

پس از ۴۸ ساعت میزان فعالیت PAL در همکنش‌های جدایه CHA0mcherry با ارقام روشن و فورنو آلوده به بیمارگر به ترتیب ۶۱/۴۶ و ۴۳/۳۷ درصد در مقایسه با شاهد غیرآلوده (به ترتیب ۳۴/۱۲ و ۳۴/۷۷ نانومول سینامیک اسید) افزایش یافت. همچنین در ارقام روشن و فورنو آلوده به بیمارگر فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد غیرآلوده به ترتیب ۳۷/۵۴ و ۴۱/۶۴ درصد افزایش یافت. در مورد همکنش باکتری-بولانی- بیمارگر وجود باکتری در گیاه آلوده باعث افزایش ۱۰/۱۲ درصدی فعالیت آنزیم نسبت به شاهد غیرآلوده شد در حالی که میزان فعالیت این آنزیم در گیاه آلوده فاقد باکتری ۱۴/۹۲ درصد کاهش نشان داد (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 برگ‌ها در حضور باکتری و فعالیت آنزیم پراکسیداز همبستگی منفی در سطح ۵٪ مشاهده می‌شود که با افزایش میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری شدت بیماری روی برگ‌های آلوده به طور معنی‌داری کاهش می یابد. بین نسبت تعداد جوش زنگی و فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت در سطح ۱ درصد وجود داشت. بین سایر تعاملات همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

جدول ۲- بررسی همکنش جدایه CHA0*mcherry* و سه رقم گندم در میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در برگ (بر حسب تغییرات جذب در گرم بافت برگ)

تیمار	۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با *P. triticina*		۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی با *P. triticina*	
بولانی	۳۶/۰۳*	de**	۳۶/۶۶	bcd
بولانی + CHA0*mcherry*	۳۶/۶۹	cde	۳۶/۸۱	bcd
بولانی + بیمارگر	۳۸/۷۵	bcd	۳۱/۱۹	d
بولانی + بیمارگر + CHA0*mcherry*	۳۹/۳۰	abcd	۴۰/۳۷	abcd
روشن	۳۴/۵۵	e	۳۴/۱۲	cd
روشن + CHA0*mcherry*	۳۶/۲۲	de	۳۶/۸۷	bcd
روشن + بیمارگر	۴۲/۷۷	a	۴۶/۹۳	abc
روشن + بیمارگر + CHA0*mcherry*	۴۱/۲۶	ab	۵۵/۰۹	a
فورنو	۳۴/۳۱	e	۳۴/۷۷	bcd
فورنو + CHA0*mcherry*	۳۵/۷۴	de	۳۵/۸۶	bcd
فورنو + بیمارگر	۴۰/۲۴	ab	۴۹/۲۵	abc
فورنو + بیمارگر + CHA0*mcherry*	۴۰/۰۳	abc	۴۹/۸۵	ab

* اعداد متن جدول میانگین سه تکرار است.

**حروف غیر متشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

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

	نسبت تعداد جوش زنگی روی برگ‌ها در حضور باکتری در مقایسه با شاهد	پراکسیداز در همکنش باکتری و گیاه آلوده	PAL در همکنش باکتری و گیاه آلوده
کلونیزاسیون در گیاه آلوده	-۰/۷۸۸*	-۰/۸۰۶*	-۰/۵۵۷ ns
نسبت تعداد جوش زنگ روی برگ‌ها در حضور باکتری در مقایسه با شاهد		-۰/۲۷۰ ns	۰/۹۵۱**
پراکسیداز در همکنش باکتری و گیاه آلوده			-۰/۰۴۲ns

** همبستگی در سطح ۱٪ * همبستگی در سطح ۵٪ ns عدم وجود همبستگی معنی‌دار

بحث

در تحقیقات متعددی مشخص شده است که باکتری‌های سودوموناس که به ریزوسفر گیاه تلقیح شدند با مکانیسم مقاومت 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.,* 1996). در این تحقیق نیز حضور باکتری CHA0*mcherry* روی ریشه از طریق مکانیسم مقاومت القایی باعث کاهش بیماری زنگ برگی در سه رقم گندم شد. هر چند که ارقام بولانی و فورنو نسبت به جدایه ۱۴۰ *P. triticina* از حساسیت بالایی برخوردار بودند اما رقم روشن نسبتاً حساس بود. نقش باکتری CHA0*mcherry* در کاهش بیماری روی ارقام بولانی و فورنو واضح‌تر از رقم روشن بود. 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، در کاهش بیماری زنگ برگی (زادمایه مخلوط جدایه‌ها از مزارع مختلف سوئیس) مؤثرتر است. بنابراین به نظر 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 فهمیدن نقش مقاومت گیاه در همکنش با باکتری‌های بیوکنترل و ایجاد میزان مقاومت القایی نیاز به تحقیقات وسیع‌تری دارد. از طرفی در این مطالعه جهت بهتر فهمیدن نقش باکتری بیوکنترل CHA0*mcherry* در ایجاد مقاومت القایی، میزان کلونیزه شدن ریشه ارقام گندم توسط باکتری نیز ارزیابی شد که نشان داد ارقام مختلف به طور یکسان توسط باکتری کلونیزه نمی‌شوند و بین ارقام اختلاف معنی‌داری وجود دارد. این حقیقت که ارقام مختلف گندم در میزان کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری متفاوت هستند نیز قبلا گزارش شده است (Mazzola *et al.,* 2004; Sharifi-Tehrani *et al.,* 2008). همچنین نقش ترشحات ریشه گندم در افزایش فعالیت مفید موتانت‌های سودوموناس فلورسنس در ریزوسفر گندم اثبات شده است (Van Overbeek & Van Elsas, 1995).

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که این تفاوت در میزان کلونیزه شدن ریشه می‌تواند فعالیت سودمند باکتری را تحت تأثیر قرار دهد و به عبارت دیگر هم درصد بیماری و هم شدت بیماری به طور معنی‌داری وابسته به میزان کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری بیوکنترل است. در تحقیقاتی که در مؤسسه فدرال کشاورزی سویس انجام گرفته بود نیز ارتباط بین میزان کلونیزه شدن ریشه گندم توسط باکتری‌های بیوکنترل و کنترل بیماری زنگ برگی اثبات شده بود (Sharifi-Tehrani *et al.*, 2008)، که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. در این تحقیق حضور بیمارگر نقش معنی‌داری در تحریک کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری نشان نداد اما بسته به رقم حضور بیمارگر در میزان کلونیزه شدن ریشه مؤثر بود به طوری که در رقم فورنو آلودگی به بیمارگر باعث افزایش میزان کلونیزه شدن ریشه توسط جدایه بیوکنترل CHA0*mcherry* شد که با نتایج پژوهشگران دیگر مطابقت داشت (Notz *et al.*, 2001; Sharifi-Tehrani *et al.*, 2008).

در تحقیق حاضر حضور بیمارگر فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش داد در صورتی که وجود باکتری تأثیر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم نداشت. بین نسبت برگ آلوده و نسبت تعداد جوش زنگی روی برگ‌ها با فعالیت آنزیم PAL همبستگی مثبت معنی‌دار وجود داشت. با این اوصاف به نظر می رسد افزایش فعالیت آنزیم PAL در ارتباط با پاسخ گیاه به حضور بیمارگر است و در کاهش بیماری زنگ برگی نقشی ندارد.

در مجموع نتایج تحقیق حاضر در کنار درک پیام‌دهی گیاه-میکروب پیشنهاددهنده یک تبادل اطلاعات بین برگ‌های گیاه، ریشه‌ها و باکتری‌های مفید می‌باشد. هرچه گیاه بیشتر به کلونیزه شده ریشه‌ها اجازه دهد، سودمندی‌های بیشتری از میکروب‌های مفید به دست می‌آورد. بنابراین ممکن است وقتی مباحث کلونیزه شدن ریشه توسط باکتری‌های مفید مورد اهمیت و بررسی قرار گیرد ویژگی‌های مقاومت گیاهان نیز بهبود یابد.

سپاسگزاری

هزینه و امکانات مورد استفاده در این طرح از محل اعتبارات طرح شماره ۷۱۱۰۰۰۴/۱/۰۱ با حمایت

معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تأمین شده است که به این وسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند. همچنین از واحد پاتولوژی غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، که در انجام این پژوهش مساعدت نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. (5th ed.). Academic Press.
2. De Meyer, G. & Höfte, 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.
3. 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.
4. Hammerschmidt, R., Nuckles, E. M. & Kuc, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20, 73-82.
5. Keel, C., Voisard, C., Berling, C. H., Kahr, G. & Défago, 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.
6. Kolmer, J. A. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 435-455.
7. Kolmer, J. A. (2005). Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 441-449.
8. Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, 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.
9. 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.
10. 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.
11. Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J. P. & Défago, 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.
12. 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.
13. McIntosh, R. A., Wellings, C. R. & Park, R. F. (1995). *Wheat rusts: an atlas of resistance genes*. CSIRO Australia, Kluwer Academic Publishers, Melbourne.
14. Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Haas, D. & Défago, 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.
15. 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.
16. Sharifi-Tehrani, A, Kellenberger, S., Farzaneh, 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.
17. 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*, 12, 911-918.
18. Vallad, G. E. & Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44, 1920-1934.
19. 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.
20. 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.

21. Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y. A. M., Hartog, F. & Van Loon, L. C. (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, 716-724.
22. Wei, 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.
23. Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97, 250-256.