

## غربال سودوموناد‌های فلورسنت بر پایه تولید سیدروفور و القای تولید اتیلن گیاه برای القای مقاومت سیستمیک علیه بیماری باکتریایی نواری برگ گندم

وحید فلاحزاده ممقانی<sup>۱\*</sup>، علی عزیزآبادی<sup>۲</sup> و اکبر شیرزاد<sup>۳</sup>

۱ و ۳. استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲. دانشیار، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۶)

### چکیده

در این تحقیق اثر سودوموناد‌های فلورسنت القاءکننده مقاومت سیستمیک در کنترل بیماری باکتریایی نواری برگ گندم بررسی شد. با توجه به اهمیت سیدروفور (سیدروفور) تولیدشده توسط این باکتری‌ها در القای مقاومت سیستمیک، محیط کشت CAS آگار (chrome azurolo S) برای غربال باکتری‌هایی با بیشترین توان تولید سیدروفور استفاده شدند. از بین ۲۰۰ جدایه که از گندمزار مختلف استان‌های شمال غرب کشور جداسازی شدند، ۳۷ جدایه توانایی بالایی در تولید سیدروفور داشتند و هاله‌ای با قطر بیش از ۱۵ میلی‌متر روی محیط CAS ایجاد کردند. این جدایه‌ها با آزمون تولید اتیلن بررسی شدند تا جدایه‌هایی که قابلیت القای مقاومت سیستمیک روی گندم را دارند غربال شوند. از بین این جدایه‌ها تنها چهار جدایه واکنش‌پذیری گیاه نسبت به *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* (XTC) را افزایش دادند و غلظت اتیلن تولیدشده در قطعه‌های برگ گیاهان تیمار شده با این جدایه‌ها بیش از ۲ پیکومول بر میلی‌لیتر هوا بود. تأثیر این جدایه‌ها روی بیماری نواری برگ گندم در شرایط اتاقک کشت بررسی و مشخص شد که تنها جدایه 58A می‌تواند به صورت معنی‌داری این بیماری را کاهش دهد. بررسی تغییرپذیری آنزیمی بوته‌های تیمار شده با این جدایه در طول فرآیند بیماری‌زایی نشان داد که حضور این جدایه در ریشه‌های گندم تأثیری بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (PO) و فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در بخش هوایی آن ندارد، اما پس از ماه‌زنی بیمارگر فعالیت هر دو آنزیم افزایش پیدا کرد.

واژه‌های کلیدی: اتیلن، زانتوموناس، سودوموناد‌های فلورسنت، گندم.

## Screening of fluorescent pseudomonads based on production of siderophore and induction of plant ethylene production for induction of systemic resistance against wheat bacterial leaf streak

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani<sup>1\*</sup>, Ali Alizadeh Aliabadi<sup>2</sup> and Akbar Shirzad<sup>3</sup>

1, 3. Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

2. Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

(Received: May 9, 2016 - Accepted: Aug. 6, 2016)

### ABSTRACT

In this study, the effects of systemic resistance inducing fluorescent pseudomonads on wheat bacterial leaf streak was investigated. According to the importance of produced siderophore by this kind of bacteria in the induction of systemic resistance, CAS agar medium was used for screening of the isolates with the highest potential for siderophore production. From the 200 isolates that isolated from North West part of Iran, 37 could produce a large amount of siderophore and the diameter of halo zones produced by these isolates on CAS medium agar was more than 15 mm. Ethylene production bioassay was used for screening the isolates with the potential for induction of systemic resistance in wheat. Among these isolates, only four increased the plant reaction potential against XTC and concentration of ethylene produced by leaf pieces of plants treated by these isolates was more than 2 pmol/ml air. The effect of selected isolates on bacterial leaf streak of wheat in growth chamber was investigated and it was found that only 58A can significantly decrease this disease. Investigation of the enzymatic changes of plant treated by this isolate during pathogenicity process showed that the presence of this bacterium on the wheat roots did not have any effect on peroxidase (PO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in foliage, but after inoculation of the pathogen, the activity of both of them was increased.

**Keywords:** Ethylene, Pseudomonas, Xanthomonas, wheat.

## مقدمه

بیماری باکتریایی نواری برگ گندم و جو یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذر زاد گندم و جو در مناطق گرم و مرطوب است که توسط پاتووارهای مختلفی از باکتری (*Xanthomonas translucens*) ایجاد می‌شود. این بیماری امروزه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذر زاد گندم و جو به شمار آمده و آسیب و زیان زیادی به این گیاهان وارد می‌سازد (Forster 1982; Forster *et al.*, 1986). در ایران برای نخستین بار، نشانه‌های نواری باکتریایی برگ، در بهار ۱۹۸۳ در برخی از کشتزارهای استان کرمان (جنوب شرقی ایران) مشاهده شد و پس از آن در برخی از سال‌ها به‌صورت همه‌گیری (اپیدمی) درآمد. نشانه‌های این بیماری در ایران منحصر به برگ بوده و هیچ‌گونه نشانه‌های سیاه‌شدگی گلوم و گلومل مشاهده نشده است (Alizadeh & Rahimian, 1989) که دو پاتووار *X. translucens* pv. *cerealis* و *X. translucens* pv. *hordei* در برخی از کشتزارهای کرمان و سپس از اغلب استان‌های ایران گزارش شده است (Alizadeh & Rahimian, 1989).

بسیاری از باکتری‌های سودمند موجود در فراریشه (Rhizosphere) می‌توانند رشد گیاه و سلامتی آن را تحت تأثیر قرار دهند. کلوپر و اسکروج (Kloepper & Schroth, 1981) برای نخستین بار اصطلاح ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) را برای این باکتری‌ها به کار بردند. این باکتری‌های سودمند با سازوکار (مکانیسم)های مختلفی مانند تولید هورمون‌های گیاهی (Gaudin *et al.*, 1994)، سیدروفور (سیدروفور)ها (Burd *et al.*, 2000) و حل‌کنندگی فسفات در خاک (Ryan *et al.*, 2008)، باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. از سوی دیگر با سازوکارهای مختلفی همچون تولید پادزی (آنتی‌بیوتیک)ها، متابولیت‌های فرار سمی و پرگنه شدن (کلنیزاسیون) سریع فراریشه باعث کاهش گسترش بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (O'Sullivan & O'Gara, 1992; Hass & Defago, 2005). یادشده مربوط به تأثیر مستقیم این باکتری‌ها روی گیاه و بیمارگرهای مرتبط با ریشه آن است؛ اما

گزارش‌هایی هم وجود دارد که این باکتری‌ها با داشتن برخی متابولیت‌ها و ویژگی‌های ساختاری، باعث القای مقاومت سیستمیک (سیستمیک) در گیاه می‌شوند. بدین ترتیب به‌رغم اینکه در فراریشه فعالیت می‌کنند، قادر به کاهش بیمارگرهای بخش هوایی گیاه هم هستند (Van loon *et al.*, 1998). چنین مقاومتی علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرها ایجاد می‌شود. برای مثال پرگنه شدن ریشه *Arabidopsis thaliana* توسط باکتری تحریک‌کننده مقاومت *Pseudomonas fluorescens* WCS417r گیاه را از آلوده شدن نسبت به بیمارگرهای مختلفی مانند باکتری‌های برگ *Pseudomonas syingae* pv. *tomato* و *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae* بیمارگر خاک زاد *Fusarium oxysporum* و بیمارگر هوا زاد *Peronospora parasitica* مقاوم ساخت (Pieterse *et al.*, 1996; Ton *et al.*, 2002; Van Wees *et al.*, 1997).

محرک (السیتور)های مختلفی از ریزوباکتری‌های سودمند گیاهی گزارش شده‌اند که توسط گیاه ادراک شده و منجر به ایجاد ISR می‌شوند که در بین آن‌ها سیدروفورها و متابولیت‌های تحت تنظیم آهن نقش ویژه‌ای دارند (Pieterse *et al.*, 2014; Bakker *et al.*, 2013). بسته به نوع میزبان اهمیت این متابولیت‌ها در تحریک ISR ممکن است متفاوت باشد. برای مثال در گیاه توتون شناسایی ترکیب سالیسیلیک اسید تولیدشده توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 منجر به تحریک ISR می‌شود (De Meyer *et al.*, 1999) در صورتی که در گیاه گوجه‌فرنگی شناسایی ترکیب پایوسیانین و سیدروفور پایوچلین تولیدشده توسط این باکتری به‌عنوان مهم‌ترین الیسیتورهای انگیزنده ISR گزارش شده است (Audenaert *et al.*, 2002). در بررسی دیگری مشخص شد که در درخت انگور شناسایی سالیسیلیک اسید، پایوچلین و پایووردین تولید شده توسط سویه (استرین) TNSK2 در تحریک ISR نقش دارد (Verhagen *et al.*, 2010). القای مقاومت سیستمیک در گیاه هویج علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی توسط استرین *P. fluorescens* WCS374

از کشتزارهای مختلف استان‌های شمال غرب (استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی و اردبیل) کشور گردآوری شد. نمونه‌های گیاهی و خاک برداشت‌شده از کشتزارهای درون کیسه فریزر قرار داده شدند و بی‌درنگ به آزمایشگاه منتقل و مراحل جداسازی انجام گرفت.

برای جداسازی باکتری‌ها از خاک، ۱۰ گرم از خاک هر نمونه به‌صورت جداگانه به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸ درصد (حاوی ۱۰۰ میکرولیتر Tween 20 به ازای هر لیتر) استریل ریخته شد. رقت‌های مختلف به تدریج رقیق شده به‌طور سریال در لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم تهیه شدند و از رقت‌های دو و سه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کینگ بی‌تغییر یافته (King's Medium B-<sup>+++</sup> KMB<sup>+++</sup>) با میله شیشه‌ای L شکل پخش شدند. محیط کشت KMB<sup>+++</sup> که ویژگی انتخابی بسیار بالایی در جداسازی سودوموناد‌های فلورسنت دارد با آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کلرامفنیکل (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و سیکلوهگزیمید (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) همراه شده بود (Simon & Ridge, 1974). پس از ۴۸ ساعت نگهداری در ۲۵ درجه سلسیوس، پرگنه‌های تولیدشده که از نظر شکل و رنگ تفاوت داشتند خالص‌سازی شدند. برای جداسازی باکتری‌ها از ریشه، قطعه‌هایی از ریشه گیاهان سالم و آلوده پس از گردآوری به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شستشو زیر جریان آب، ریشه هر نمونه به‌صورت جداگانه تکه‌تکه شد و ۱ گرم از قطعه‌های ریزشده به درون ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸ درصد استریل ریخته و به مدت سی دقیقه با دور ۱۲۰ دور در دقیقه به هم زده شد. رقت‌های مختلف به‌طور سریال در ۹ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم استریل تهیه شد و از رقت‌های دوم و سوم به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط KMB<sup>+++</sup> با میله شیشه‌ای L شکل پخش شدند و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در ۲۵ درجه سلسیوس، پرگنه‌های تولیدشده که از نظر شکل و رنگ تفاوت داشتند خالص‌سازی شدند (Fallahzadeh-<sup>+</sup> Mamaghani et al., 2009).

به واسطه ادراک لیپوساکارید (Leeman et al., 1995a)، سیدروفور (Leeman et al., 1995b) و یک متابولیت تحت تنظیم آهن (Leeman et al., 1995b) صورت می‌گیرد و سرانجام تحریک ISR توسط سویه *P. putida* WCS358 روی گیاه آرابیدوپسیس توسط تاژک، روی گوجه‌فرنگی توسط سیدروفور و روی لوبیا توسط سیدروفور صورت می‌گیرد (Meziane et al., 2005).

با استفاده از جهش یافته‌های آرابیدوپسیس که پیام‌رسانی اسید جاسمونیک و اتیلن در آن‌ها مختل شده بود مشخص شد، هورمون‌هایی مثل اتیلن و اسید جاسمونیک تنظیم‌کننده‌های کلیدی در سامانه ایمنی گیاه و از جمله ISR ناشی از ریزوباکترهای سودمند گیاهی به شمار می‌آیند (Pieterse et al., 2014; Bakker et al., 2013). در بررسی‌هایی که روی گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی و برنج صورت گرفته بود نیز نتایج همانندی به دست آمد (Vleeschauwer et al., 2002; Yaz et al., 2008). حضور ریزوباکتری‌های القاءکننده ISR در ریزوسفر گیاه منجر به افزایش تولید اتیلن در گیاه نمی‌شود بلکه باعث آماده شدن گیاه (Priming) می‌شود که بی‌درنگ پس از حمله پاتوژن اتیلن بیشتری نسبت به حالت عادی تولید کند (Hase et al., 2003; Pieterse et al., 2000).

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر سودوموناد‌های فلورسنت تولیدکننده سیدروفور جداشده از ریشه گندم در القای مقاومت سیستمیک علیه بیماری نواری برگ گندم با عامل *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه بیمارگر

در این پژوهش از باکتری بیمارگر (*XTC*) *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* سویه Gen1 استفاده شد که از کلکسیون باکتری‌های مرکز تحقیقاتی بیولوژی مولکولی گیاه آلمان (Center for plant molecular biology) دریافت شد.

### تهیه جدایه‌های آنتاگونیست

در خرداد سال ۱۳۹۰ حدود ۸۷ نمونه گیاهی و خاکی

فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد تا استریل شد. در آغاز محلول چهار و آنگاه محلول سه به محلول بافر اضافه شد. در آخر محلول معرف به آرامی و با هم زدن کافی اضافه شد و در پتری‌دیش‌های ۹ سانتیمتری توزیع شد. برای مایه‌زنی این محیط‌ها، ۵ میکرولیتر سوسپانسیون، از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به صورت قطره‌گذاری استفاده شد.

تولید سیدروفور باعث جدا شدن آهن از CAS می‌شود که نتیجه آن تولید یک هاله نارنجی‌رنگ اطراف پرگنه (کلنی) باکتری است. قطر این هاله در سه روز متوالی ثبت و میانگین سه روز نیز محاسبه شد.

#### آزمون‌های افتراقی برای تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست

واکنش گرم در پتاس ۳ درصد به روش ساسلو (Suslow *et al.*, 1982)، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش هاف و ولایف سن (Hugh & Leifson, 1953)، تولید رنگ‌دانه فلورسنت روی محیط کینگ ب (King, 1954)، رشد روی محیط D-1 Agar (Kado & Heskett, 1970)، تولید پرگنه‌های زرد یا نارنجی روی محیط YDC, NAG و به روش شاد و همکاران انجام شد (Schaad *et al.*, 2001).

#### آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای شناسایی گونه سودوموناس‌های فلورسنت

تولید رنگ‌دانه فلورسنت روی محیط کینگ ب و تولید رنگ‌دانه آبی (Pyocyanin) روی محیط کینگ آ (King, 1954) انجام شد. برای آزمون بالا حساسیت (HR) سوسپانسیونی با غلظت  $10^8$  میلی‌لیتر تهیه و زیر بشره توتون تزریق شد (Klement, 1963). آزمون اکسیداز به روش کواکس (Kovacs, 1956)، آزمون لهانیدن سیب‌زمینی بنا بر روش فهی (Fahy, 1983)، تولید لوان، هیدرولیز ژلاتین و نشاسته و استفاده از منابع کربنی با استفاده از محیط پایه آیر و همکاران (Ayer *et al.*, 1919)، احیای نیترات، آزمون بیشترین و کمترین دمای رشد در محیط yeast extract به روش شاد و همکاران انجام شد (Schaad *et al.*, 2001).

#### اندازه‌گیری تولید سیدروفور به روش CAS agar

در این بررسی از روش الکساندر و زوبرر (Alexander & Zuberer, 1991) استفاده شد. محیط CAS-آگار از چهار محلول که هرکدام به صورت جداگانه‌ای استریل شدند تهیه شد.

#### محلول معرف Fe-CAS (محلول ۱)

این محلول از اختلاط ۱۰ میلی‌لیتر  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  ۱ میلی‌مولار (در اسیدکلریدریک ۱۰ میلی‌مولار) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول CAS (۱/۲۱ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد. محلول ارغوانی تیره به دست آمده به آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به ۴۰ میلی‌لیتر محلول HDTMA (Hexadecyltrimethyl-amonium bromide) (۱/۸۲ میلی‌گرم در لیتر) اضافه شد. محلول حاصل که رنگ آبی تیره داشت اتوکلاو شده و در دمای محیط تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد شد. این محلول باید به صورت تازه تهیه می‌شد.

#### محلول بافر (محلول ۲)

محلول شماره ۲ با حل کردن ۳۰/۲۴ گرم بافر PIPES در ۷۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم  $KH_2PO_4$ ، ۰/۵ گرم NaCl و ۱/۰ گرم  $NH_4Cl$  تهیه شد و pH آن با KOH ۵۰ درصد به ۶/۸ رسانده شد. پیش از اتوکلاو، به محلول بالا ۱۵ گرم آگار اضافه و با افزودن آب مقطر حجم آن به ۸۰۰ میلی‌لیتر رسید. پس از اتوکلاو تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد شد.

#### محلول غذایی (محلول ۳)

حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی‌گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۱ میلی‌گرم  $CaCl_2$ ، ۱/۱۷ میلی‌گرم  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، ۱/۴ میلی‌گرم  $H_3BO_3$ ، ۰/۰۴ میلی‌گرم  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۱/۲ میلی‌گرم  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  و ۱/۰ میلی‌گرم  $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$  است. این محلول نیز به صورت جداگانه اتوکلاو و سرد شد.

#### محلول کازامینو اسید (محلول ۴)

میزان ۳ گرم کازامینو اسید به ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول با استفاده از دستگاه میلی‌پور از

چهار بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. سپس در گلدان‌های (۵ × ۵ سانتی‌متر) حاوی خاک GS90 (Gebrüder Patzer, Sinntal-Jossa, Germany) با نسبت ورمیکولیت ۲۱:۵ استریل شده کاشته شدند. گلدان‌ها در سینی قرار داده شده و پس از آبیاری با سینی به اتاقک رشد با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و با روشنایی ۱۴ ساعته (شدت نوری ۷۰  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) منتقل شدند. پس از گذشت دو هفته خاک گلدان‌ها با ۵ میلی‌لیتر از دروایه جدایه‌های مختلف باکتری‌های آنتاگونیست در محلول کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار (با جمعیت  $10^8$  یاخته بر میلی‌لیتر) و یا با ۵ میلی‌لیتر محلول کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار (به‌عنوان شاهد منفی) مایه‌زنی شدند و دوباره در همان شرایط رشدی در اتاقک کشت قرار داده شدند. پس از گذشت سه روز قطعه‌هایی به اندازه ۰/۵ میلی‌متر در ۰/۵ میلی‌متر از برگ‌های گندم‌ها تهیه‌شده و پس از نگهداری آن‌ها در آب دیونیزه به مدت شش ساعت به لوله‌های آزمایش کوچکی که حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری XTC (با جمعیت  $10^6$  یاخته بر میلی‌لیتر) بودند منتقل شدند. در لوله‌ها با درپوش پلاستیکی پوشانده شده و به مدت سه ساعت روی شیکر قرار داده شدند. پس از گذشت سه ساعت ۱ میلی‌لیتر از هوای درون لوله‌های آزمایش با سرنگ برداشت و به دستگاه کروماتوگرافی گازی GC-14A Shimadzu, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-column and flame- (ionization detector) تزریق شد و میزان اتیلن تولیدشده برحسب پیکومول بر میلی‌لیتر هوا اندازه‌گیری شد.

#### بررسی جدایه‌های برتر از لحاظ تأثیر بر ایجاد آلودگی توسط باکتری نواری برگ گندم

در آغاز بذره‌های گندم به روش توضیح داده شده در بالا کشت و پس از گذشت دو هفته با باکتری‌های آنتاگونیست منتخب مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی با بیمارگر، در آغاز گیاهان گندم به‌دست‌آمده به مدت یک شب در شرایط رطوبت اشباع قرار داده شدند و در روز بعد با سوسپانسیون باکتری XTC ( $10^8$  یاخته بر میلی‌لیتر) که حاوی ۰/۰۲ درصد Tween 20 بود

#### تهیه سوسپانسیون یاخته‌ای باکتری‌های آنتاگونیست و بیمارگر

برای تهیه سوسپانسیون یاخته‌ای باکتری‌های آنتاگونیست در آغاز باکتری‌ها از فریزر ۸۰- روی محیط کشت کینگ بی آگار منتقل شدند و پس از ۴۸ ساعت پرگنه‌های ظاهرشده به محیط کشت کینگ بی مایع در ارلن منتقل شدند. ارلن‌ها در شیکری اتاقک رشد (شیکر انکوباتور) با چرخش ۱۸۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت باکتری‌های رشد یافته با استفاده از سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شدند. رسوب باکتریایی به‌دست‌آمده یک‌بار با کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار شسته شدند و سپس دوباره در کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار تعلیق و جمعیت آن‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول‌موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم شد (Fallahzadeh-Mamaghani et al., 2009).

تهیه باکتری بیمارگر به روش همانند بالا به انجام رسید با این تفاوت که برای این باکتری از محیط کشت LB استفاده شد و زمان نگهداری (انکوباسیون) روی LB آگار سه روز بود (Fallahzadeh-Mamaghani et al., 2009).

#### غربال باکتری‌های آنتاگونیست القاء‌کننده مقاومت سیستمیک

برای غربال باکتری‌های آنتاگونیست با قابلیت القای مقاومت سیستمیک از روشی که بر پایه اندازه‌گیری اتیلن تولیدشده از گیاه است استفاده شد (Felix et al., 1999). ابداع این روش غربالگری بر پایه یافته‌های بررسی‌های پیشین صورت گرفت که در آن‌ها نشان داده شده بود که تیمار گیاه با سودومونادهای فلورسنت تأثیری روی میزان ساخت (سنتز) اتیلن در آن‌ها نمی‌گذارد اما در صورت القاء شدن ISR توسط این باکتری‌ها، تولید اتیلن پس از ایجاد عفونت توسط بیمارگرها در برگ‌های گیاه افزایش می‌یابد (Felix et al., 1999; Hase et al., 2003; Pieterce et al., 2000). برای این آزمایش در آغاز بذره‌های گندم زمستانه رقم فورنو (Forno) به مدت سه دقیقه با محلول ۵ درصد هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شدند و

### استخراج عصاره گیاهی

۰/۱ گرم از برگ‌های گردآوری شده از بوته‌ها به همراه ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با دمای ۴ درجه شدند. سپس از عصاره گیری هاون چینی قرار داده شده و عصاره‌گیری در دمای ۲۰- سرد شده بودند. عصاره به دست آمده در درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس و با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایع رویی حاصل تا زمان بررسی‌های آنزیمی در دمای ۲۰- نگهداری شدند.

### اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم PO

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم PO بر پایه روش *Anad et al.* (2007) و با کمی تغییر انجام گرفت. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی استخراج شده درون کووت ریخته و با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ مولار پیروگال (Pyrogallol) مخلوط شد. آنگاه پس از قرار دادن کووت در جایگاه خود در دستگاه اسپکتروفوتومتر (PG instruments T70+) ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پراکسید هیدروژن درون کووت ریخته شد و بی‌درنگ محفظه دستگاه بسته شد و جذب محلول در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت یک دقیقه خوانده شد و میزان فعالیت آنزیمی بر پایه  $\Delta_{420nm}$  (شیب منحنی خطی) بر دقیقه بر میزان وزن تر برگ محاسبه شد.

### اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم PAL

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم PAL بر پایه روش *Anad et al.* (2007) و با کمی تغییر صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده، ۹۰۰ میکرولیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار tris HCl (pH 8.8) و ۴۵۰ میکرولیتر L-phenylalanine ۱ میلی‌مولار مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه داشته شدند. سپس واکنش با افزودن اسید کلریدریک ۲ نرمال متوقف شد؛ و غلظت ترنس سینامیک اسید بر پایه منحنی استاندارد این ماده در بافر ترنس محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیمی بر پایه نانو مول‌های تولیدشده ترنس سینامیک اسید بر دقیقه

اسپری شدند تا سطح برگ‌ها به‌طور کامل با دروایه باکتری پوشیده شوند. بی‌درنگ پس از مایه‌زنی شمار لازم از گلدان‌ها برای تعیین جمعیت اولیه باکتری‌های وارد شده به برگ‌ها کنار گذاشته و دیگر گلدان‌ها دوباره در شرایط رطوبت اشباع و در اتاقک کشت قرار داده شدند. لازم به توضیح است که برای تأمین رطوبت اشباع سینی حاوی گلدان‌ها آبیاری شد و با درب ویژه شفاف پوشانده شد. برای تعیین میزان مقاومت گیاهان نسبت به باکتری بیمارگر جمعیت باکتری پس از گذشت دو و چهار روز پس از مایه‌زنی بررسی شد. برای هر بار تعیین جمعیت چهار گلدان و از هر گلدان دو برگ استفاده شد. از هر برگ دو قطعه به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر در ۰/۵ سانتی‌متر با چوب پنبه‌بر (Cork borer) تهیه شد و پس از ضدعفونی در الکل ۷۰ درصد برای انجام چندبار رقیق‌سازی (سری رقت) از پلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده و برای انتقال سوسپانسیون‌ها بین چاهک‌ها از پیپت چند کاناله (Multichannel pipette) استفاده شد. افزون بر این پس از گذشت شش روز از زمان مایه‌زنی بیمارگر نشانه‌های ظاهر شده بررسی و با دوربین عکس برداری شد.

### بررسی‌های فعالیت آنزیمی بوته‌های تیمار شده با

#### باکتری‌های آنتاگونیست در طول فرآیند بیماری‌زایی

در بررسی اثر جدایه‌های انتخاب شده روی بیماری باکتریایی نواری برگ گندم مشخص شد که یکی از جدایه‌ها قادر به کاهش بیماری از راه القای مقاومت سیستمیک در گیاه است. برای بررسی بیشتر اثر این باکتری بر فیزیولوژی گیاه، تغییر آنزیم‌های پراکسیداز (PO) و فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در هنگام مایه‌زنی بیمارگر و پس از آن در گیاه بررسی شد. شرایط کشت و چگونگی مایه‌زنی گیاهان با باکتری آنتاگونیست و بیمارگر همانند روش‌های شرح داده شده در بالا به انجام رسید. نمونه برداری در سه نقطه زمانی و تا ۴۸ ساعت انجام گرفت و از هنگام مایه‌زنی بیمارگر آغاز شد. برای هر نقطه زمانی و برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. هر تکرار شامل ۰/۱ گرم بخش هوایی دو گیاه از یک گلدان بود. آزمایش در قالب طرح کرت‌های کامل تصادفی انجام گرفت.

سودومونادهای فلورسنت نیز ویژگی بازدارندگی دارد و بخشی از جمعیت موجود روی این محیط قابل ردیابی نیستند.

#### غربال جدایه‌های باکتری آنتاگونیست بر پایه تولید سیدروفور

جدایه‌های به‌دست‌آمده با استفاده از محیط CAS غربال شدند تا جدایه‌هایی با بیشترین میزان تولید سیدروفور تعیین شود. از بین ۲۰۰ جدایه مورد بررسی تنها ۱۵ جدایه قادر به ایجاد هاله نبودند. ۴۸ عدد از آن‌ها یا قادر به ایجاد هاله نبودند و یا قطر هاله تولیدشده توسط آن‌ها کمتر از ۵ میلی‌متر بود. ۵۰ عدد از این جدایه‌ها هاله‌ای با قطر ۵-۱۰ و ۵۰ عدد دیگر هاله‌هایی با اندازه ۱۰-۱۵ میلی‌متر ایجاد کردند. بیشترین اندازه هاله ایجاد شده توسط ۳۷ عدد از جدایه‌ها ایجاد شد که محل گردآوری آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است که هاله‌ای با اندازه ۱۵ تا ۲۰ میلی‌متر ایجاد کردند.

بر وزن‌تر برگ محاسبه شد. میزان سینامیک اسید تولیدشده بر پایه منحنی استاندارد به‌دست‌آمده از غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰۰ میلی مول و با pH ۸/۸ محاسبه شد.

#### نتایج

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها از خاک و ریشه در این بررسی در مجموع ۲۰۰ جدایه باکتریایی از خاک و ریشه گیاهان مختلف کشتزارهای استان‌های آذربایجان شرقی، غربی و اردبیل جداسازی و خالص‌سازی شد. هر دو محیط S1 و KB ویژگی انتخابی بالایی در جداسازی سودومونادهای فلورسنت داشتند و تا حدودی همه پرگنه‌های ظاهرشده روی این دو محیط در زیر نور UV ویژگی فلورسنت از خود نشان دادند. با این وجود شمار پرگنه‌هایی که روی محیط KB ظاهر شدند بسیار بیشتر از محیط S1 بود؛ بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که S1 روی

جدول ۱. جدایه‌های آنتاگونیست تولیدکننده سیدروفور برتر و مناطق گردآوری آن‌ها

Table 1. The list of superior siderophore producing antagonistic isolates and their origin

9B	Wheat	Maragheh-Hashtrud road (serajoo)
31B	Wheat	Sain defile
58A	Wheat	Shaheendedj
36A	Potato	Ajabshir
33B	Wheat	Sarab
50A	Cucumber	Shabstar (Shend Abad)
3B	Wheat	20 km Maragheh-Hashtrud road
60B	Barley	Azarshahr (Gheshlagh)
63C	Tomato	Azarshahr (Gheshlagh)
23A	Green pea	Qouri Gol
23C	Green pea	Qouri Gol
85C	Tomato	Orumia (Tümtar)
69B	Squash	Azarshahr (Gheshlagh)
82B	Beans	Orumia
19C	Cucumber	Mamaghan
78B	Potato	Orumia
6C	Squash	Basmenj
26C	Wheat	Duzduzan
85B	Cucumber	Orumia
41B	Cucumber	Maragheh (Mardagh)
41A	Cucumber	Maragheh (Mardagh)
39B	Wheat	Ajabshir
7A	Wheat	Hashtrud-Bostan Abad road
37B	Agropiron	Maragheh (Mardagh)
46B	Wild Barley	Marand (Yam)
11B	Wheat	Hashtrud-Bostan Abad road
43B	Wheat	Marand (Yam)
29B	Squash	Duzduzan
21B	Alfalfa	Bostan Abad
64B	Onion	Govgan
62A	Sunflower	Govgan
14A	Alfalfa	Maragheh (Mardagh)
61B	Alfalfa	Azarshahr (Afgham)
28A	Barley	Sarab
17A	Cucumber	Basmenj
59C	Wheat	Shaheendedj
47A	Wheat	Marand (Yam)

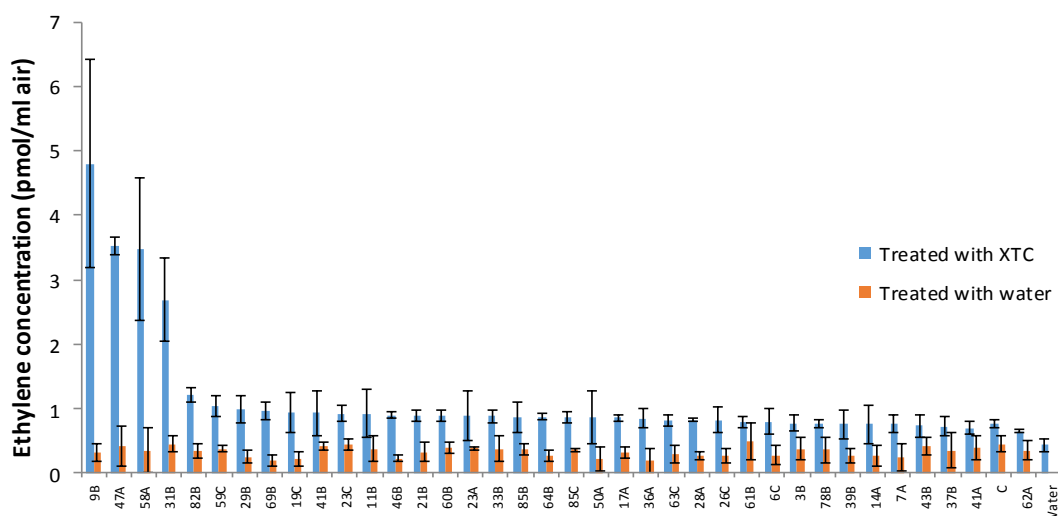
تحقیق پاسخ‌دهی قطعه‌های برگ‌گی به‌دست‌آمده از گندم‌های تیمار شده با باکتری‌های آنتاگونیست پس از قرارگیری درون آب و همچنین دروایهٔ یاخته‌های *XTC*، با استفاده از آزمون تولید اتیلن بررسی شد. میزان اتیلن تولید شده از هیچ‌کدام از تیمارهایی که در آب دیونیزه قرار داده شده بودند تفاوت معنی‌داری نشان ندادند و میزان آن در همهٔ تیمارها کمتر از ۰/۵ پیکومول در میلی‌لیتر هوا بود (شکل ۱). در صورتی که میزان اتیلن تولید شده توسط قطعه‌های برگ‌گی به‌دست‌آمده از همهٔ تیمارها (از جمله گیاهان شاهد تیمار نشده با باکتری آنتاگونیست) پس از قرارگیری در دروایهٔ یاخته‌ای باکتری بیمارگر بیش از ۰/۵ پیکومول بر میلی‌لیتر بود. با این حال بیشتر تیمارها تفاوت قابل توجهی نشان ندادند مگر در مورد چهار جدایهٔ 31B، 58A، 47A و 9B که میزان تولید اتیلن در مورد این تیمارها بیش از ۲ پیکومول بر میلی‌لیتر بود (شکل ۱).

### آزمون‌های افتراقی برای تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های غربال شده که بیشترین میزان تولید سیدروفور را از خود نشان دادند برای تعیین جنس بررسی شدند. همهٔ این جدایه‌ها گرم منفی و با رشد هوازی بودند و همهٔ آن‌ها روی محیط KB رنگ‌دانهٔ فلورسنت تولید کردند. هیچ‌کدام از جدایه‌های مورد بررسی قادر به تولید پرگنهٔ زرد یا نارنجی روی محیط YDC و NAG نبودند. با توجه به این مشاهدات می‌توان گفت که همهٔ این جدایه‌ها متعلق به جنس *Pseudomonas* هستند (Schaad et al., 2001).

### غربال باکتری‌های آنتاگونیست القاء‌کنندهٔ مقاومت سیستمیک

برای غربال باکتری‌هایی با قابلیت القاء مقاومت سیستمیک از آزمون تولید اتیلن استفاده شد. در این



شکل ۱. غربال باکتری‌های آنتاگونیست القاء‌کنندهٔ مقاومت سیستمیک با آزمون تولید اتیلن. قطعه‌هایی از برگ‌های گندم‌های دو هفته‌ای که با سودومونادهای فلورسنت پیش تیمار شده بودند به درون ۰،۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه و یا دروایهٔ باکتری *XTC* (۱۰<sup>۶</sup> یاخته بر میلی‌متر) در لوله‌های آزمایش کوچک منتقل شدند و پس از انکوباسیون این لوله‌ها روی شیکر به مدت سه ساعت، غلظت اتیلن تولید شده در آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای محاسبهٔ ستون‌ها و نوار خطاها از سه تکرار مختلف استفاده شد.

Figure 1. Screening of systemic resistance inducing antagonistic bacteria by ethylene production bioassay. Leaf pieces from two weeks old *Pseudomonas* spp. treated wheat plants were transferred to 0.5 ml deionized water or *XTC* suspension (10<sup>6</sup> cell per ml) in small glass tubes and after incubation on shaker for 3 h, concentration of produced ethylene was measured. The bars and error bars show means and SD of three replicates, respectively.

III با یوار *P. fluorescens* با گونهٔ 47A و 58A، 31B همخوانی داشت. جدایهٔ 9B با گونهٔ *P. fluorescens* با یوار I همخوانی داشت (جدول ۲).

ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت  
ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های

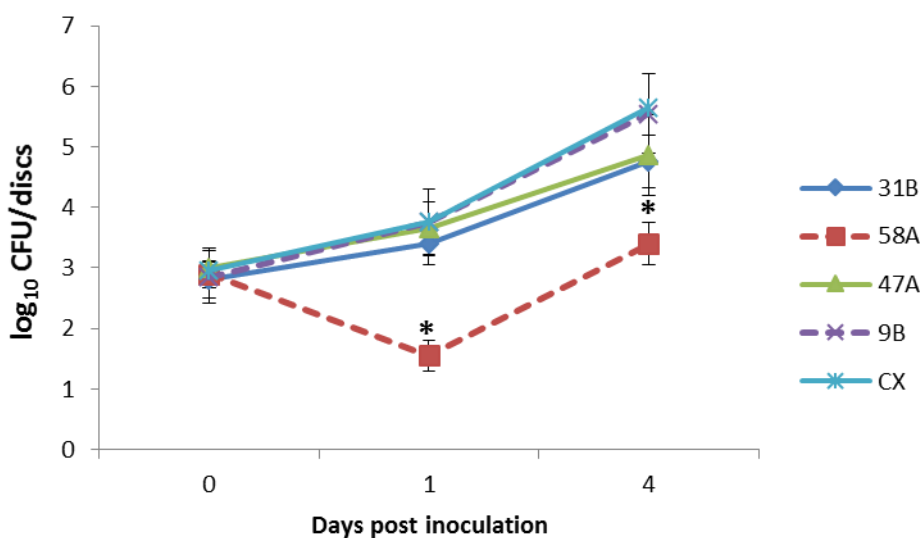


### تأثیر جدایه‌های برتر در کاهش آلودگی ناشی از باکتری نواری برگ گندم

از بین چهار جدایه آنتاگونیست مورد استفاده تنها یکی از آن‌ها به صورت معنی‌داری رشد بیمارگر درون برگ‌های گندم را تحت تأثیر قرار داد. در گندم‌های تیمار شده با 58A جمعیت باکتری بیمارگر ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی به میزان حدود ۱۶۰ برابر نسبت به شاهد تیمار نشده با باکتری آنتاگونیست کمتر بود (شکل ۲). جمعیت باکتری‌ها در زمان چهار روز پس از مایه‌زنی نیز اندازه‌گیری شد و در این نقطه زمانی جمعیت آن نسبت به زمان پیش افزایش نشان می‌داد اما در این نقطه زمانی نیز جمعیت آن حدود ۱۶۰ برابر کمتر از شاهد بود. منحنی رشد بیمارگر در گیاهان تیمار شده با دیگر باکتری‌های آنتاگونیست کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان نداد (شکل ۲).

### جدول ۲. ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

Characteristics	reaction			
	58A	31B	47A	9B
Levan formation	-	-	-	+
Oxidase	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+
Potato rot	-	-	-	-
Arginine dehydrolase	+	+	+	+
Growth at 4°C	+	+	+	+
Growth at 41°C	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	-
Pyocyanin	-	-	-	-
HR	-	-	-	-
Utilization from				
L- arabinose	+	+	+	+
D- galactose	+	+	+	+
Terihalose	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
M- inositol	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
β-alanin	+	+	+	-
Sodium tartarate	+	+	+	+

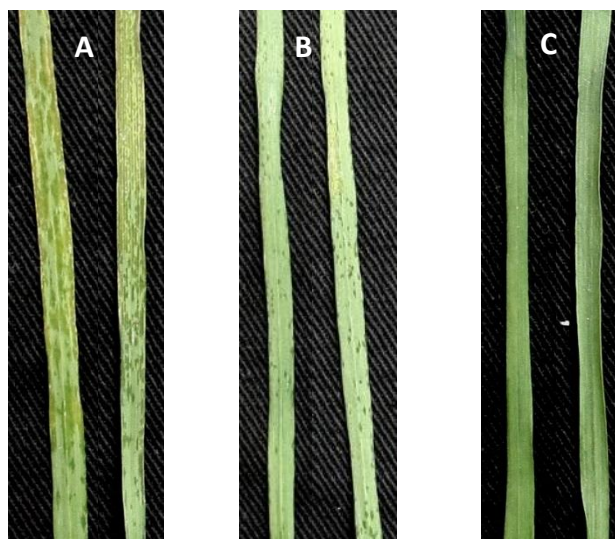


شکل ۲. تأثیر پیش تیمار گندم با باکتری‌های آنتاگونیست بر منحنی رشد باکتری بیمارگر پس از ۰، ۱ و ۴ روز پس از تلقیح بیمارگر. برای محاسبه منحنی‌ها و نوار خطاها از هشت تکرار مختلف استفاده شد. نشانه‌های ستاره معنی‌دار بودن اختلاف را نشان می‌دهد (تعیین شده با آزمون  $t$ ,  $p < 0.05$ ).

Figure 2. Effect of wheat pretreatment with antagonistic bacteria on growth curve of the pathogenic bacteria after 0, 1 and 4 days post inoculation. Eight replicates were used for calculation of error bars. Asterisks indicate significant differences ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

نشان می‌داد. در گیاهانی که با باکتری آنتاگونیست 58A پیش تیمار شده بودند، در مقایسه با شاهد آلوده، شمار نشانه‌های ظاهر شده کمتر بوده و اندازه آن‌ها کوچک‌تر بود (شکل ۳).

افزون بر این، پس از گذشت شش روز از هنگام مایه‌زنی بیمارگر نشانه‌های بیماری بررسی شد. نشانه‌های بیماری به صورت آب سوختگی‌هایی کشیده و نواری شکل ظاهر شد که تا حدی حالت زردی نیز

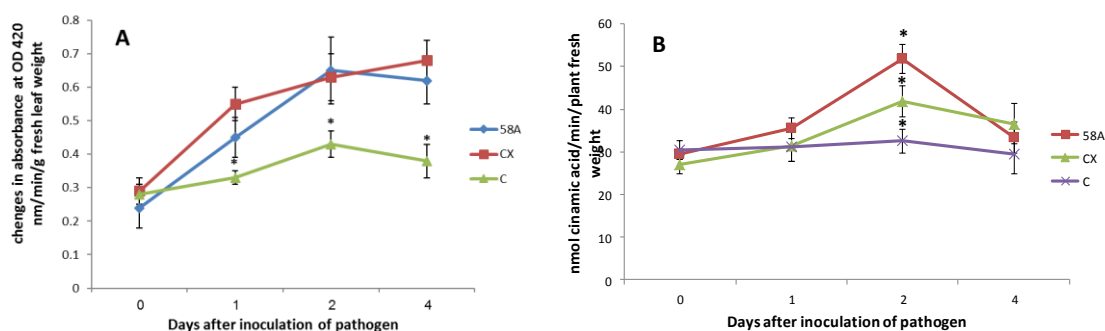


شکل ۳. نشانه‌های بیماری نواری برگ گندم در شاهد آلوده (A)، گیاهان پیش‌تیمار شده با جدایه 58A (B) و شاهد سالم (C). عکس ۶ روز پس از مایه‌زنی بیمارگر گرفته شده است.

Figure 3. Symptoms of wheat streak on infected control (A) pretreated plants with 58A isolate (B) and non infected control (C). The photos were taken 6 days after inoculation with the pathogen.

مایه‌زنی بیمارگر، گیاهان با باکتری آنتاگونیست (در تیمار 58A) تیمار شده بودند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تیمار گندم با این باکتری آنتاگونیست تأثیری در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز ندارد. پس از مایه‌زنی گیاهان با باکتری بیمارگر میزان فعالیت این آنزیم هم در گیاهان تیمار شده با 58A و هم در گیاهان شاهد افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد سالم پیدا کرد و تا روز چهارم نیز این اختلاف معنی‌دار بود.

ارزیابی‌های فعالیت آنزیمی بوته‌های تیمار شده با باکتری‌ها در طول فرآیند بیماری‌زایی یکی از مهم‌ترین رویدادهایی که در نتیجه آلودگی گیاه با بیمارگرهای گیاهی رخ می‌دهد تغییر آنزیم‌های دفاعی است. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان مایه‌زنی بیمارگر در همه تیمارها یکسان بود و اختلاف معنی‌داری نشان نداد (شکل ۴ A). با توجه به اینکه در زمان



شکل ۴. نگره ارزیابی فعالیت آنزیم‌های PO و PAL در فرآیند بیماری‌زایی. بوته‌های دو هفته‌ای گندم تیمار شده با باکتری آنتاگونیست 58A و یا بدون تیمار با این باکتری (CX) با باکتری بیمارگر XTC مایه‌زنی شدند و در زمان‌های ۰ تا ۴ روز پس از مایه‌زنی نمونه‌برداری شدند تا میزان فعالیت آنزیم‌های PO (A) و PAL (B) در آن‌ها تعیین شود. برای محاسبه منحنی‌ها و نوار خطاها (error bars) از چهار تکرار مختلف استفاده شد. علامت‌های ستاره معنی‌دار بودن اختلاف را نشان می‌دهد (تعیین شده با آزمون  $t$ ,  $p < 0.05$ ).

Figure 4. Assessment of PO and PAL activity during pathogenicity process. Non-treated or treated two weeks old wheat plants with antagonistic bacterium 58A were inoculated with pathogenic bacterium XTC and sampled at 0 till 4 days after inoculation to survey of PO (A) and PAL (B) activity. Means and error bars were calculated from 4 different replicates. Asterisks indicate significant differences ( $t$ -test,  $p < 0.05$ ).

Meziane, 2005; Maurhofer *et al.*, 1994; Ongena *et al.*, 2002; Press *et al.*, 2001; Mercado-Blanco *et al.*, 2002; Audenaert *et al.*, 2002). بنابراین، جدایه‌های به‌دست‌آمده با استفاده از محیط کشت CAS آگار غربال شدند تا جدایه‌هایی با بیشترین توان تولید سیدروفور انتخاب شوند (Alexander & Zuberer, 1991). استفاده از این محیط کشت غربال جدایه‌هایی با بیشترین میزان تولید سیدروفور را امکان‌پذیر کرد و مشخص شد که از بین ۲۰۰ جدایه ۳۷ عدد از آن‌ها بیشترین میزان سیدروفور را تولید می‌کنند.

غربال نهایی ۳۷ جدایه برتر بر پایه قابلیت آن‌ها در افزایش قابلیت پاسخ‌دهی گیاه نسبت به *XTC* انجام گرفت. برای این کار از افزایش تولید اتیلن به‌عنوان نشانگر القای مقاومت سیستمیک استفاده شد. پایه این روش بر مبنای بررسی‌هایی است که در آن‌ها گیاهان پیش تیمار شده با ریزوباکترهای القاء‌کننده مقاومت سیستمیک پس از تیمار با باکتری بیمارگر، با شدت بیشتری اتیلن تولید کردند (Pieterse *et al.*, 2014; Hase *et al.*, 2003; Pieterse *et al.*, 2000). گزارش‌های زیادی از نقش داشتن مسیر زیست‌ساخت (بیوسنتز) و ادراک اتیلن در ایجاد القای مقاومت سیستمیک توسط ریزوباکترها در گیاه وجود دارد (Pieterse *et al.*, 2014; Bakker *et al.*, 2013). برای مثال جهش‌یافته (موتانت)‌هایی (*etr1* و *ein2*) از گیاه آرابیدوپسیس که قادر به احساس اتیلن نبودند پس از تیمار با WCS417 قادر به ایجاد ISR نبودند (Pieterse *et al.*, 1998; Knoester *et al.*, 1999). افزون بر این در تحقیقات دیگری مشخص شد که همه جهش‌یافته‌های غیر حساس به اتیلن (*axr1-12* و *ein3-ein7*) قادر به ایجاد ISR نبودند که این نشان‌دهنده این است که مسیر انتقال پیام اتیلن (signal-transduction pathway) به‌طور کامل برای بیان ISR در گیاه مورد نیاز است (Knoester *et al.*, 1999). Pieterse *et al.* (2000) تغییرات تولید اتیلن در گیاه را پیش و پس از تیمار با باکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* WCS417r و پس از مایه‌زنی با باکتری بیمارگر *Pseudomonas syringae*

میزان فعالیت آنزیم PAL نیز در زمان مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر تفاوت معنی‌داری نشان نداد و حضور باکتری 58A روی ریشه‌های گیاه اثر معنی‌داری روی فعالیت این آنزیم درون گیاه نداشت. میزان فعالیت این آنزیم پس از گذشت ۲۴ ساعت از مایه‌زنی بیمارگر به‌صورت ناچیزی افزایش نشان داد و در روز دوم به بیشترین میزان خود رسید به‌طوری‌که در مورد گیاهان تیمار شده با 58A میزان سینامیک اسید تولید شده ۵۱/۸۵ نانومول بر دقیقه بر وزن تر گیاه بود (شکل ۴-B). این میزان فعالیت به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گیاهانی است که تنها با بیمارگر تیمار شده بودند.

## بحث

در این بررسی سودومونادهای فلورسنت مختلفی از کشتزارهای گندم و دیگر گیاهان زراعی استان‌های شمال غرب کشور جداسازی و غربال شد تا سوبه‌هایی با قابلیت القای مقاومت سیستمیک علیه بیماری نواری برگ گندم معرفی شوند. استفاده از محیط کشت S1، ابزار بسیار کارآمدی برای غربال سودوموناس‌های فلورسنت فراهم کرد. ویژگی انتخابی این محیط به دلیل محدود بودن میزان آهن و غلظت بالای گلیسرول و سوکروز آن است. افزون بر این وجود ترکیب‌های دیگری مانند سدیم لائوریل سارکوزین (که نسبت به باکتری‌های گرم مثبت ویژگی بازدارندگی دارد) و تریمتوپریم (آنتی‌بیوتیک محدودکننده رشد سودوموناس‌های غیر فلورسنت) ویژگی انتخابی آن را بالا می‌برد (Gould *et al.*, 1985). محیط کینگ بی‌مورد استفاده حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل بود که این محیط نیز ویژگی انتخابی بسیار خوبی در جداسازی این دسته از باکتری‌ها داشت. در هر دو نوع محیط مورد استفاده حدود ۹۸ درصد پرگنه‌های ظاهر شده روی تشتک‌ها ویژگی فلورسانت از خود نشان دادند.

گزارش‌های چندی نشان می‌دهند که سیدروفورهای مختلف تولید شده توسط سودومونادهای فلورسنت نقش اساسی در ایجاد مقاومت القایی روی گیاهان مختلف دارند (Leeman, 1996; Ran *et al.*, 2005; )

(متابولیسم) اکسین، زیست‌ساخت اتیلن، تشکیل لیگنین، تنفس، فرآیندهای وابسته به نور، رشد و احساس هورمون‌ها نقش دارند (Acosta *et al.*, 2002). دیواره یاخته‌های گیاهی از نخستین سازوکارهای گیاهی در بازداری از حمله بیمارگرها هستند و پراکسیدازها آنزیم‌های کلیدی در فرآیندهای ساخت دیواره و استحکام آن به شمار می‌آیند. این فرایندها عبارت‌اند از اکسیداسیون الکل‌های هیدروکسینامیل (Hydroxycinnamyl alcohols) به رادیکال‌های واسطه‌ای (Radical intermediates) (Gross, 1980) اکسیداسیون فنل (Schmid & Feucht, 1980) اتصال عرضی پلی‌ساکاریدها (Fry, 1986) لیگنینی شدن (لیگنیفیکاسیون) (Grisebach 1981; Walter, 1992) Lignins & و سوپرازیسیون (Espelie and & Kolattukudy, 1986; Espelie *et al.*, 1986). تجمع مواد مستحکم‌کننده به‌دنبال آلودگی می‌تواند در افزایش مقاومت نقش داشته باشد. تزریق برگ‌های برنج با دروایه باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* عامل بلایت باکتریایی، منجر به تجزیه بسیار (پلیمر)های فنلی در طول واکنش‌های مقاومت در محل مایه‌زنی شد. این پدیده میزان افزایش باکتری را کاهش می‌دهد. در گیاهان حساس به بیماری هیچ‌گونه تجزیه لیگنینی در محل آلودگی مشاهده نشد (Reimers & Leach, 1991). افزایش فعالیت پراکسیداز که در مقاومت گیاهان نسبت به بیمارگرهای خود نقش داشتند در گیاهان مختلفی مانند برنج (Young *et al.*, 1995)، گندم (Flott *et al.*, 1989)، جو (Kerbey & Somervill, 1992)، پنبه (Dai *et al.*, 1996) و نیشکر (McGhie *et al.*, 1997) مشاهده شده است. در صورتی که در همه این موارد در گیاهان حساس این افزایش مشاهده نشده است.

با وجود گزارش‌های زیادی که در زمینه نقش آنزیم پراکسیداز در مقاومت گیاه در برابر بیماری‌های گیاهی وجود دارد، در این تحقیق نقش این آنزیم در مقاومت گیاه به اثبات نرسید. به‌رغم اینکه پیش‌تیمار گیاه گندم با جدایه 58A به‌صورت معنی‌داری باعث کاهش بیماری نواری برگ گندم شد، اما الگوی افزایش این آنزیم پس از ایجاد آلودگی تفاوت معنی‌داری بین گندم‌های تیمار شده

pv. *tomato* DC3000 بررسی و گزارش کردند که القای مقاومت سیستمیک در اثر سویه WCS417r در گیاه باعث افزایش پاسخ‌دهی گیاه نسبت به بیمارگر می‌شود اما تولید اتیلن افزایش پیدا نمی‌کند. با این حال پس از ایجاد آلودگی توسط بیمارگر DC3000 تولید اتیلن نسبت به گیاهانی که تنها با بیمارگر و نه با WCS417r مایه‌زنی شده بودند به‌شدت افزایش نشان داد.

در این تحقیق استفاده از نشانگر افزایش تولید اتیلن به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای غربال سویه‌های معرفی شده استفاده و از بین ۳۷ جدایه مورد بررسی چهار جدایه قابلیت گیاه در پاسخ‌دهی نسبت به XTC را افزایش دادند. با این حال در بررسی تأثیر این جدایه‌ها روی بیماری نواری برگ گندم در شرایط اتاقک کشت مشخص شد که از بین جدایه‌های مورد بررسی تنها یکی از آن‌ها قادر بود که به‌صورت معنی‌داری بیماری را کاهش دهد. به نظر می‌رسد که چهار جدایه معرفی شده مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی را در گیاه فعال می‌کنند و تنها مسیر بیوشیمیایی ایجاد شده توسط جدایه 58A قادر به ایجاد مقاومت سیستمیک علیه این بیماری می‌شود.

پس از انتخاب جدایه 58A به‌عنوان جدایه برتر که بیماری نواری برگ گندم را به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌داد، در بررسی دیگری اثر این باکتری روی فیزیولوژی گیاه در زمان ایجاد آلودگی نیز بررسی شد. در این بررسی آنزیم‌های PO و PAL به‌عنوان مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در مقاومت گیاهی ارزیابی شدند. پراکسیدازها از مهم‌ترین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR proteins) هستند که در بسیاری از واکنش‌های گیاه با بیمارگر نقش تعیین‌کننده بازی می‌کنند. این آنزیم‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که در ساختار خودشان هم (Heme) دارند و با حضور  $H_2O_2$ ، دسته گسترده‌ای از بستره (سوبسترا)های آلی و غیر آلی مانند سیتوکروم C، نترات، اسید آسکوربیک، ایندول آمین‌ها و یونید را اکسید می‌کنند (Gaspar *et al.*, 1982). پراکسیدازها ایزوفرم‌های چندی در گیاهان و جانوران دارند. پراکسیدازهای گیاهی در فرآیندهای بسیار گسترده‌ای همچون سوخت‌وساز

نشان داد. باین وجود افزایش آن در بوته‌های پیش‌تیمارشده با جدایه 58A به صورت معنی‌داری بیشتر بود و به صورت آشکاری نقش این آنزیم در مقاومت القاء شده توسط این باکتری آنتاگونیست را نشان می‌دهد.

#### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش روشی به منظور غربال سودومونادهای فلورسنت القاء‌کننده مقاومت سیستمیک گیاه معرفی شد. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که بوته‌های گندمی که ریشه آن‌ها همراه با بعضی از سودومونادها هستند پس از رویارویی با بیمارگر گیاهی به میزان زیادی اتیلن تولید می‌کنند. با توجه به اینکه افزایش تولید اتیلن یک نشانگر مهم القای مقاومت سیستمیک در گیاه است، از روش زیست‌سنجی تولید اتیلن برای غربال جدایه‌های مختلف باکتریایی استفاده شد تا ایزوله‌هایی با بیشترین قابلیت القای مقاومت سیستمیک شناسایی شوند. ایزوله‌های منتخب در این بررسی به صورت قابل توجهی از بروز بیماری باکتریایی نواری برگ گندم جلوگیری کردند. با توجه به این مشاهده‌ها، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که روش معرفی‌شده در این بررسی می‌تواند برای غربال سریع ریزوباکترهای القاء‌کننده مقاومت سیستمیک گیاه استفاده شود.

با این جدایه و شاهد آلوده اختلاف معنی‌داری نشان نداد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که آنزیم‌های دیگری در ایجاد این مقاومت دخیل هستند.

آنزیم دیگری که در این تحقیق ارزیابی شد، آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) بود. این آنزیم نقش کلیدی در ساخت فیتوالکسین‌ها دارد. این آنزیم در اثر آمین‌زدایی فنیل آلانین آن را تبدیل به ترنس سینامیک اسید می‌کند. بعضی از فیتوالکسین‌ها از جمله *p-coumarate* به طور مستقیم از این ترکیب ساخته می‌شوند (Daayf *et al.*, 1997; Bais *et al.*, 2005) و یا در اثر دایمر شدن و تغییر بیشتر ترکیب‌های وابسته لیگنین‌هایی مانند ماتاایرسینول (Matairesinol) (Lewis & Danvin, 1999) یا بی‌فنیل‌هایی مانند آکوپارین (Grayer & Kokubun, 2001) را تولید می‌کنند. افزون بر این ترنس سینامات و مولکول‌های وابسته آن می‌توانند مراحل حلقوی شدن را بگذرانند و ترکیب‌هایی با اسکلت کومارین مانند اسکوپولتین (Scopoletin) و آمبلیفرون (umbelliferone) (Matern *et al.*, 1999) را تولید کنند. همه این ترکیب‌ها در مقاومت گیاه نسبت به بیمارگرها نقش دارند.

در این بررسی میزان آنزیم PAL پس از مایه‌زنی بیمارگر در هر دو تیمار شاهد آلوده و جدایه 58A افزایش

#### REFERENCES

1. Acosta, M., Rodriguez-Lopez, J. N. & Pendreno, M. A. eds. (2002). Plant peroxidases. University of Murcia.
2. Alexander, D. B. & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45.
3. Alizadeh, A. & Rahimian H. (1989). Bacterial Leaf Streak of Graminea in Iran. *EPPO Bulletin*, 19, 113-117.
4. Anand, T., Chandrasekaran, A., Raguchander, T., Prakasam, V. & Samiyappan, R. (2007). Chemical and biological treatments for enhancing resistance in chilli against *Colletotrichum capsici* and *Leveillula taurica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 1, 1-19.
5. Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. & Höfte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 15, 1147-1156.
6. Ayers, S. H., Rupp, P. & Johnson, W. T. (1919). *A study of the alkali-forming bacteria found in milk* (No. 782). US Department of Agriculture.
7. Bakker, P. A. H. M., Doornbos, R. F., Zamioudis, C., Berendsen, R. L. & Pieterse, C. M. J. (2013). Induced Systemic Resistance and the Rhizosphere Microbiome. *Plant Pathology Journal*, 29(2), 136-143.
8. Bais, H. P., Prithviraj, B., Jha, A. K., Ausubel, F. M. & Vivanco, J. M. (2005). Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature*, 434, 217-221.
9. Burd, G. I., Dixon, D. G. & Glick, B. R. (2000). Plant growth promoting bacteria that decreases heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 237-2.

10. Daayf, F., Schmitt, A. & Bélanger, R. R. (1997). Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiology*, 113, 719-727.
11. Dai, G. H., Nicole, M., Andary, C., Martinez, C., Bresson, E., Boher, B., Daniel, J. F. & Geiger, J. P. (1996). Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and calloserich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 285-306.
12. De Meyer, G., Audenaert, K. & Höfte, M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on *in planta* salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 513-517.
13. Espelie, K. E., Franceschi, V. R. & Kolattukudy, P. E. (1986). Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiology*, 87, 487-489.
14. Fallahzadeh-Mamaghani, V., Ahmadzadeh, M. & Sharifi, R. (2009). Screening systemic resistance-inducing fluorescent pseudomonads for control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Journal of Plant Pathology*, 91, 663-670.
15. Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18, 265-276.
16. Flott, B. E., Moerschbacher, B. M. & Reisener, H. (1989). Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytology*, 111, 413-421
17. Forster, R. L. (1982). *The status of black chaff disease in Idaho*. Idaho wheat (Dec. issue). Idaho State Wheat Growers Association, Owyhee Plaza Hotel, Boise. 20 pp.
18. Forster, R. L., Mihuta-Grimm, L. & Schaad, N. W. (1986). Black chaff of wheat and barley. University of Idaho, College of Agriculture. *Current Information Series* 784, 2.
19. Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Review in Plant Physiology*, 37, 165.
20. Gaspar, T. H. C., Thorpe, T. & Greppin, H. (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. *Université de Genève, Centre de Botanique*, 889-1112.
21. Gaudin, V., Vrian, T. & Jouanin, L. (1994). Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 32, 11-29.
22. Gould, W. D., Hagedron, C., Bardinelli, T. R. & Zablutowicz, R. (1985). New selective media for enumeration and recovery of fluorescent Pseudomonads from various habitats. *Applied Environmental Microbiology*, 49, 28-32.
23. Grayer, R. J. & Kokubun, T. (2001). Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56, 253-263.
24. Grisebach, H. (1981). Lignins, in *Secondary Plant Products*. Conn E. E., Ed., Vol. 7 of *The biochemistry of plants*, 457-478, Academic Press, New York.
25. Gross, G. G. (1980). The biochemistry of lignification. *Advanced Botanical Research*, 8, 25.
26. Hase, S., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2003). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 219-226.
27. Hass, D. & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307-319.
28. Hugh, R. & Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative rods. *Journal of Bacteriology* 66, 24-26.
29. Kado, E. & Land Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60, 969-976.
30. Kerby, K. & Somerville, S. C. (1989). Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35, 323-337.
31. King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Methods*, 44, 301-7.
32. Klement, Z. (1963). Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*, 199, 299-300.
33. Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. (1981) Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 71, 642-644
34. Knoester, M. (1998). *The involvement of ethylene in plant disease resistance*. Ph.D. thesis, Utrecht University.

35. Knoester, M., Pieterse, C. M., Bol, J. F. & Van Loon, L. C. (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(8), 720-727.
36. Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703.
37. Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M. & Steijl, H. (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 86, 149-155.
38. 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.
39. 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.
40. Lewis, N. & Davin, L. (1999). Lignans: Biosynthesis and function. In: Sankawa U, ed. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 639-712.
41. Matern, U., Luer, P. & Kreuzsch, D. (1999). Biosynthesis of coumarins. In: Sankawa U, ed. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 623-637.
42. 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 pyoverdine production. *Phytopathology*, 84, 139-146.
43. McGhie, T. K., Masel, N. P., Maclean, D., Croft, B. J. & Smith, G. R. (1997). Biochemical responses of suspension-cultured sugarcane cells to an elicitor derived from the root pathogen *Pachymetra chaunorhiza*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24, 143-149.
44. Mercado-Blanco J., Van der Drift K. M. G. M., Olsson P. E., Thomas-Oates J. E., Van Loon L. C. & Bakker P. A. H. M. (2001). Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Journal of Bacteriology*, 183, 1909-1920.
45. Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Höfte, M. & Bakker, P. A. H. M. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 6, 177-185.
46. O'Sullivan, D. J. & O'Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiological Reviews*, 56, 662-676.
47. Ongena, M., Giger, A., Jacques, P., Dommes, J. & Thonart, P. (2002). Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 187-196.
48. Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P. & Van Loon, L. C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 57, 123-134.
49. Pieterse, C. M. J., Van Wees, SCM., Van Pelt, J. A., Knoester, M. & Laan, R. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1571-1580.
50. Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. & van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8, 1225-1237.
51. Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, C. M. & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375.
52. Press, C. M., Loper, J. E. & Kloepper, J. W. (2001). Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology*, 91, 593-598.
53. Ran, L. X., Li, Z. N., Wu, G. J., Van Loon, L. C. & Bakker, P. A. H. M. (2005). Induction of systemic resistance against bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 59-70.
54. Reimers, P. J. & Leach, J. E. (1991). Race-specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* conferred by bacterial blight resistance gene *Xa-10* in rice *Oryza sativa* involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 38, 39-56.
55. Ryan, P. R., Germaine, K., Franks, A., Ryan, J. D. & Dowling, N. D. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letter*, 278, 1-9.
56. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. (3th ed.), APS PRESS, 374pp.

57. Schmid, P. S. & Feucht, W. (1980). Tissue-specific oxidative browning of polyphenols by peroxidase in cherry shoots. *Gartenbauwissenschaft*, 45, 68.
58. Sharifi R., Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A. & Fallahzadeh, V. (2009). Competition for iron uptake by Fluorescent Pseudomonads to control of *Rhizoctonia solani* Kuhn causing agent of bean damping-off disease. *Plant Protection*, 22, 183-195. (in Farsi)
59. Simon, A. & Ridge, E. H. (1974). The use of ampicillin in a simplified selective medium for the isolation of fluorescent pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 37, 459-460.
60. Suslow, T. V., M. N Schroth & M. Isaka. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917-918.
61. Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C. & Pieterse, C.M.J. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe-Interaction*, 15, 27-34.
62. Van Loon, L. C. & Antoniw, J. F. (1982). Comparison of the effects of salicylic acid and ethephon with virus-induced hypersensitivity and acquired resistance in tobacco. *Netherland Journal of Plant Pathology*, 88, 237-56.
63. Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*, 36, 453-483.
64. 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.
65. Vleeschauwer, D., Djavaheeri, M., Bakker, P. A. H. M. & Hofte, M. (2008) *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology*, 148, 1996-2012.
66. Walter, M. H. (1992). Regulation of lignification in defense. In: Boller, T. & Meins, F., (Ed) *Genes Involved in Plant Defense*. (pp. 327-352.) Springer-Verlag.
67. Yan, Z., Reddy, MS, Ryu, C-M., McInroy, J. A., Wilson, M. & Kloepper, J. W. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 92, 1329-33
68. Young, S. A., Guo, A., Guikema, J. A., White, F. F. & Leach, J. A. (1995). Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Plant Physiology*, 107, 1333-1341.