Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 48, No 2, Autumn & Winter 2017 (327-339)
DOI: 10.22059/ijpps.2017.234063.1006788

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ (ص ۳۳۹-۳۲۷)

برهمکنش *Pseudomonas fluorescens* UTP100، رقم‌های گندم و قارچ بیمارگر *Fusarium culmorum*

هدی حسین‌زاده فومشی[۱]، کیوان بهبودی[۲*] و ژیلا دلخواه[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی دکتری، پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۸)

چکیده

در این بررسی، تأثیر جدایهٔ *Pseudomonas fluorescens* UTP100 در برهمکنش سه رقم گندم (فلات، مرودشت و نیک‌نژاد) و قارچ بیمارگر *Fusarium culmorum* بررسی شد. نتایج نشان داد، تیمار بذرهای هر سه رقم گندم با ریزوباکتری UTP100 منجر به کاهش معنی‌دار درصد آلودگی قارچ بیمارگر می‌شود. میزان کلونیزاسیون ریزوباکتری روی ریشهٔ سه رقم گندم با یکدیگر متفاوت بود، به‌طوری‌که بیشترین لگاریتم تعداد (شمار) سلول باکتری در میلی‌گرم ریشه در رقم فلات و کمترین آن در رقم نیک‌نژاد ثبت شد. آلودگی دو رقم فلات و مرودشت به قارچ بیمارگر منجر به کاهش تعداد سلول باکتری مستقر روی ریشه در مقایسه با شاهد شد. درحالی‌که در رقم نیک‌نژاد، قارچ بیمارگر در کلونیزاسیون ریزوباکتری اثر افزایشی داشت. فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در واکنش‌های دفاعی گیاه، در هر سه رقم گندم هنگامی‌که گیاه به‌طور همزمان به ریزوباکتری و قارچ بیمارگر آلوده شدند بیش از هنگامی بود که گیاهان به‌صورت جداگانه با هر یک از این عامل‌ها تیمار شدند. این موضوع، به‌احتمال بر نقش ریزوباکتری UTP100 در القای مقاومت سیستمیک از طریق افزایش فنیل‌آلانین آمونیالیاز تأکید دلالت دارد.

واژه‌های کلیدی: درصد آلودگی، ریزوباکتری *Pseudomonas fluorescens* UTP100، فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، قارچ *Fusarium culmorum*، کلونیزاسیون.

Interaction of *Pseudomonas fluorescens* UTP100, wheat and *Fusarium culmorum* pathogenic mushroom cultivars

Hoda Hosseinzadeh[1], Keyvan Behboodi[2*] and Jila Delkhah[3]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Associate Professor and Ph. D. Candidate, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: May 27, 2017 - Accepted: Jul. 30, 2017)

ABSTRACT

In this study, the effects of *Pseudomonas fluorescens* UTP100 as an rhizobacteria was investigated, on interaction of three wheat cultivars (Falat, Marvdasht, and Niknejad) whit *Fusarium culmorum* as an causal of agent wheat foot and root rot. Treatment of seeds by the rhizobacterium caused significant decrease in the infection percentage, and improved germination and growth parameters in all three studied cultivars. The colonization rate of the rhizobacteria was significantly different among wheat cultivars, and the highest and lowest numbers of bacterial cells/ mg root dry weight were estimated in Falat and Niknejad cultivars, respectively. Infection of Falat and Marvdasht cultivars by *F. culmorum* led to decreased rate of bacterial colonization, while the number of bacterial cells increased in Niknejad cultivar following infection by the pathogen. The activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme, as an important enzyme involved in plant defense against plant pathogens, increased significantly when wheat cultivars were infected simultaneously by both *P. fluorescens* and *F. culmorum* compared to when separately treated by each of these agents. This may imply that the rhizobacterium induce systemic resistance to the invaded plant through activation of PAL enzyme.

Keywords: Colonization, *Fusarium culmorum*, infection rate, phenylalanine ammonia lyase (PAL), *Pseudomonas fluorescens*.

* Corresponding author E-mail: behbodi@ut.ac.ir

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum*) به‌عنوان مهم‌ترین محصول استراتژیک ایران و جهان، امروزه بیشترین سطح زیر کشت را در جهان دارد و حدود ۲۰ درصد از پروتئین روزانه بیش از ۴/۵ میلیارد نفر را در سرتاسر زمین تأمین می‌کند. به‌طور متوسط، ۴۷ درصد از نیاز روزانهٔ کالری جمعیت ایران توسط گندم تأمین می‌شود (FAO, 2012) که این موضوع بر اهمیت اقتصادی فوق‌العاده این محصول در ایران تأکید دارد. بیماری پوسیدگی ریشه و طوقهٔ گندم که توسط گونه‌های مختلف جنس *Fusarium* ایجاد می‌شوند، از مهم‌ترین عامل‌های محدودکنندهٔ تولید گندم به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک به شمار می‌آیند (Chekali *et al.*, 2013). در تونس، خسارت این بیماری بر رقم‌های مختلف گندم بین ۸ تا ۴۸ درصد برآورد شده است (Chekali *et al.*, 2013)، درحالی‌که بررسی‌های انجام‌شده توسط Mansouri *et al.* (2002) در ایران، خسارت ناشی از این عامل‌ها را بین ۱۳- ۱۲/۵ درصد برآورد کرده است. در بیشتر بررسی‌های انجام‌شده، گونهٔ *F. culmorum* به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عامل‌ها پوسیدگی ریشه و طوقهٔ گندم شناسایی شده است (Moya-Elizondo *et al.*, 2011; Scherm *et al.*, 2013).

اگرچه قارچ‌کش‌هایی مانند بنزیمیدازول، آزول و استروبیلورین برای کنترل قارچ *F. culmorum* توصیه شده است، اما استفاده از این ترکیب‌ها در مزارع گندم اغلب مشکل بوده و کنترل قابل قبولی در قارچ بیمارگر ایجاد نمی‌کند (Wagacha & Muthombi, 2007). از سوی دیگر، استفاده از قارچ‌کش‌ها به دلیل برهم زدن تنوع میکروبی خاک، تأثیر بر میکروارگانیسم‌های (ریزجانداران) غیر هدف، وجود بقایای قارچ‌کش در محصول و اثر مخرب زیست‌محیطی محدودیت‌هایی را به دنبال دارد (Jones, 2000). از مهم‌ترین استراتژی‌هایی که امروزه برای مدیریت بیماری‌های پوسیدگی ریشه و طوقه استفاده می‌شوند می‌توان به ایجاد تناوب در کشت محصول، استفاده از رقم‌های مقاوم یا متحمل گندم، کوددهی، روش‌های شخم مناسب زمین و استفاده از عامل‌های کنترل (مهار) بیولوژیک اشاره کرد (Wachowska *et al.*, 2013). ریزوباکترها به‌عنوان عامل‌های کنترل بیولوژیک، نه تنها قادر هستند طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی را مهار کنند بلکه توانایی افزایش رشد گیاه و بهبود کیفیت محصول را نیز دارند.

کلنیزاسیون ریشه توسط باکتری‌های آنتاگونیست به‌عنوان یک پیش‌نیاز برای بیوکنترل موفق مورد توجه قرار می‌گیرد. توانایی سودوموناده‌های فلورسنت برای بازداری از بیمارگرهای قارچی خاک زاد کاملاً بستگی به کارایی کلنیزاسیون ریشه دارد (Keel *et al.*, 1996; Thomashow, 1996; Vincent *et al.*, 1991). باکتری باید در ریزوسفر بقا یافته، تکثیرشده و علاوه بر کلنیزاسیون مؤثر بتواند با میکروفلور خاک رقابت کند. کلنیزاسیون موفق ریشه توسط سودوموناده‌های فلورسنت موجب تولید متابولیت‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی و نیز ترکیب‌های القاکنندهٔ مکانیسم‌های دفاعی در گیاه می‌شوند (Notz, 2002). تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته است. برای مثال، جهش‌یافتهٔ *P. chlororaphis* PCL 1391 بدون قدرت کلنیزاسیون ریشهٔ گوجه‌فرنگی قادر به کنترل *F. oxysporum* f.sp. *radici-lycopersici* عامل پوسیدگی ریشه و طوقهٔ گوجه‌فرنگی نبود (Chin-A-Woeng *et al.*, 1998). از طرفی، در بررسی دیگر مشخص شد که در حضور قارچ *R. solani*، کلنیزاسیون ریشهٔ کلزا به‌طور معنی‌داری توسط استرین *P. fluorescens* UTPF86 افزایش می‌یابد (Haj Malek Zanjani *et al.*, 2011).

Broukanloui Madloo *et al.* (2013) در بررسی کنترل بیولوژیک *F. culmorum* به‌وسیلهٔ جمعیت‌های سودوموناده‌های فلورسنت در ریزوسفر برخی رقم‌های گندم نشان دادند، در رقم‌های مختلف، جمعیت‌های سودوموناده‌های فلورسنت به‌طور معنی‌داری تفاوت داشت، سیر تغییرات جمعیت نیز در رقم‌های مختلف متفاوت بود. بنابراین، ادعا کردند که رقم میزبان اثر فراوانی روی ظهور انواع ویژگی‌های بیوکنترلی و افزایش‌دهندگی رشد در سودوموناده‌های فلورسنت دارد و نقش میزبان در کنترل بیماری با عامل بیوکنترل را می‌توان به تأثیر گیاه میزبان بر مکانیسم‌های مهم کنترل بیماری توسط باکتری‌ها تعمیم داد (Broukanloui Madloo *et al.*, 2011).

بسیاری از ریزوباکترهای غیر بیمارگر قادرند از طریق مکانیسم‌هایی مانند رقابت بر سر مواد غذایی و آهن، تولید آنتی‌بیوتیک و القای مقاومت سیستمیک از گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی محافظت کنند.

مقاومت القایی هنگامی ایجاد می‌شود که گیاه تحت تأثیر ریزوباکترهای مفید، غلظت ترکیب‌های دفاعی خود را در محل حمله بیمارگر افزایش دهد و به دنبال آن، با فعال کردن آنزیم‌های دفاعی در این محل‌ها، از خود در برابر بیمارگر دفاع می‌کند (Daval *et al.*, 2011). تاکنون، مقاومت القایی ریزوباکترها در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، تربچه، لوبیا، خیار، برنج و گندم تأیید شده است (Shoresh *et al.*, 2010). به‌عنوان مثال، در چندین بررسی نشان داده شده است که تلقیح باکتری‌های سودوموناس به ریزوسفر گیاه منجر به القای مقاومت سیستمیک و محافظت از ریشه، طوقه و قسمت‌هایی هوایی گیاه در برابر قارچ‌های بیمارگر می‌شوند (Verhagen *et al.*, 2010; Daval *et al.*, 2011). بعلاوه، نشان داده شده است که افزایش مقاومت گیاهان تیمارشده در برابر بیمارگرها با افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در ارتباط است. به‌عنوان مثال، Vanitha & Umesha (2011) در نتایج بررسی‌های خود نشان داده‌اند، تیمار بوته‌های گوجه‌فرنگی با باکتری *P. fluorescens* منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلف ازجمله آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) می‌شود. تیمار ریشهٔ گیاهان لوبیا با ریزوباکتری *P. putida* به افزایش سطح لیگنین ریشه‌ها و افزایش تحمل گیاهان تیمارشده در برابر *F. solani* f. sp. *phaseoli* منجر شده است (Anderson & Guerra, 1985). در بررسی دیگری، نشان داده شده است که مقاومت گیاه فلفل سیاه به قارچ *Phytophthora capsici* پس از تیمار ریشه‌ها با *P. fluorescens* از طریق افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی ازجمله PAL در قسمت‌های مختلف گیاه به دست می‌آید (Diby & Sharma, 2005).

سالسیلیک اسید (SA) یکی از مهم‌ترین مولکول‌های سیگنال‌دهی گیاهان است که با فعال‌کردن ژن‌های دخیل در سیستم دفاعی، باعث بروز مقاومت در برابر بیمارگرهای گیاهی می‌شود. در گیاهان، این ترکیب فنلی وظایف متعدد دیگری نیز دارد که از آن جمله می‌توان به نقش آن در رشد و نمو، فتوسنتز (نورساخت)، تنفس سلولی، جذب و انتقال یون‌ها و واکنش‌های گیاه به عامل‌های تنش‌زا مانند خشکی، آب شویی، گرما، تنش‌های اسمزی و سمیت فلزات سنگین اشاره کرد (Chen *et al.*, 2009). سالیسیلیک اسید در گیاهان به کمک آنزیم PAL از اسیدآمینه فنیل‌آلانین تولید می‌شود، هرچند بررسی‌های انجام‌شده روی گیاه آرابیدوپسیس نشان داده است که این ترکیب ممکن است به کمک آنزیم ایزوکوریزمات‌سینتاز از مسیری مستقل از فنیل‌آلانین نیز تولید شود (Wildermuth *et al.*, 2001). بررسی‌های اخیر نشان داده است که بین آلودگی گیاهان مختلف به بیمارگرها، غلظت سالیسیلیک‌اسید در بافت‌های گیاهی و میزان بیان PAL ارتباط نزدیکی وجود دارد (Pallas *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1998). آنزیم PAL، علاوه بر سالیسیلیک اسید، به‌صورت غیرمستقیم در سنتز (ساخت) چندین ترکیب فنلی دیگر ازجمله پلیمرهای سازندهٔ دیوارهٔ سلولی دخالت دارد (Parr & Bolwell, 2000). به‌عنوان مثال، PAL اولین آنزیم در مسیر سنتز فنیل‌پروپانوئید است که منجر به تولید محصولاتی مانند مونومرهای لیگنین به‌عنوان گروهی از فیتوآلکسین‌ها می‌شود (Hao *et al.*, 2009).

در این تحقیق، قابلیت جدایهٔ *P. fluorescens* UTP100 در کنترل بیولوژیک قارچ *F. culmorum* روی سه رقم گندم بررسی شد. برای این منظور، میزان کلونیزاسیون این ریزوباکتری روی سه رقم گندم آلوده و غیرآلوده به بیمارگر مقایسه و اثر این باکتری بر کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه بررسی شد. درنهایت، میزان فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مسیرهای درگیر با سیستم‌های دفاعی در گیاهان تیمارشده با ریزوباکتری و گیاهان شاهد در هر سه رقم گندم مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ رقم‌های گندم، جدایهٔ باکتری آنتاگونیست و قارچ بیمارگر

بنابر بررسی جامعی که توسط Mansouri *et al.*

(2002)، در ارزیابی مقاومت ۱۱۴ رقم گندم به پوسیدگی معمولی ریشه و طوقهٔ گندم صورت گرفته بود، سه رقم مرودشت (متحمل)، فلات (حساس) و نیک‌نژاد (حساس) انتخاب شدند. انتخاب رقم، بر اساس رقم‌های رایج و مورد استفاده و تفاوت در واکنش بیماریزایی به بیمارگر بوده است. بذرهای این رقم‌ها از مؤسسهٔ اصلاح بذر و نهال کرج تهیه شدند. جدایهٔ باکتری *P. fluorescens* UTP100 از گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج تهیه شد. این جدایه توسط Broukanloui *et al.* (2013) از ریزوسفر گندم جداسازی شده، و با توجه به تولید آنتی‌بیوتیک‌های 2,4-diacetyl phloroglucinol و Pyoluteorin و همچنین توانایی حفظ جمعیت و قدرت کلونیزاسیون زیاد به‌عنوان جدایهٔ برتر در کنترل بیولوژیک قارچ *F. culmorum* معرفی شده بود. برای تهیهٔ زاد مایهٔ جدایه‌های باکتری از روش Weller & Cook (1986) استفاده شد. سویهٔ قارچ بیمارگر *F. culmorum* از مؤسسات تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. این سویه طی بررسی وسیع از مزارع گندم استان تهران جداسازی شده بود. نگهداری قارچ روی بذرهای جو در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس صورت گرفت و در صورت نیاز از کشت بذرهای روی محیط PDA استفاده شد.

آزمون اثبات بیماریزایی

برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح قارچ از روش Pal *et al.* (2001) استفاده شد. به این ترتیب که چهار دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ کشت پنج روزهٔ قارچ بیمارگر رشد کرده روی محیط کشت PDA به ارلن مایر حاوی ۵۰۰ گرم بذر گندم دو بار اتوکلاوشده منتقل شدند. بعد از کلونیزه شدن کامل سطوح بذرها، بذرها هوادهی، خشک و سپس غربال شدند. برای بیماریزایی و به‌منظور آلوده سازی خاک از روش Smiley *et al.* (2009) استفاده شد. به این صورت که ابتدا گلدان‌هایی به ارتفاع ۲۵ و قطر ۱۵سانتی‌متر تهیه شد، سپس تا ارتفاع ۱۵سانتی‌متری با خاک استریل پر شدند و پنج بذر تلقیح شده با باکتری در سطح خاک قرار داده شد و ۲/۵ سانتی‌متر خاک استریل در سطح بذرها پخش شد. در مرحلهٔ بعد، ۱۲ بذر از مایهٔ تلقیح موجود روی سطح خاک پراکنده شده و روی سطح آن‌ها نیز با ۲/۵ سانتی‌متر از همان خاک پوشانده شد تا هیپوکوتیل بذرها بعد از جوانه‌زنی در کنار مایهٔ تلقیح قارچ قرار بگیرد. سپس در ژرمیناتور در دمای ۱۸-۲۳ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای هر رقم سه تکرار و سه شاهد جداگانه در نظرگرفته شد. نمونه‌برداری در روزهای ۱۴، ۱۶ و هفته پنجم پس از کاشت انجام شد.

بررسی تأثیر ریزوباکتری بر برخی ویژگی‌های رشدی رقم‌های گندم در حضور یا عدم حضور بیمارگر

برای تعیین قوهٔ نامیهٔ بذر سه رقم گندم از روش استاندارد ISTA (International seed testing association) استفاده شد. به این منظور، تعداد ۲۰۰ عدد بذر از هر رقم به‌طور تصادفی انتخاب و روی کاغذ صافی مرطوب درون تشتک‌های پتری با قطر ۹ سانتی‌متر با فواصل ۲ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده شدند. این پتری‌ها در دمای ۱۸-۲۴ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند و در روز سوم پس از انکوباسیون، تعداد بذرهای جوانه‌زده هر رقم شمارش شد. تیمارها شامل دو گروه بذرهای تلقیح شده با ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 و بذرهای شاهد بودند. برای تیمار بذرهای رقم‌های گندم، از روش Vidhyasekaran *et al.* (1977) استفاده شد. ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم ۵درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سپس چند بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. جهت تلقیح، بذرها به مدت یک ساعت در سوسپانسون باکتری به غلظت 10^{9} سلول در میلی‌لیتر، سوسپانسیون قارچ بیمارگر و نیز در مخلوط سوسپانسیون باکتری و قارچ معلق شده و روی شیکر با سرعت ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. به سوسپانسون هر یک از تیمارها، کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۱ درصد اضافه شد. در تیمار شاهد فقط از CMC ۱ درصد استفاده شد (Broukanloui *et al.*, 2013 Madloo). بذرهای حاصل، در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای ۹ سانتی‌متری حاوی کاغذ صافی خیس شده با آب مقطر وادار به جوانه‌زنی شدند.

پنج هفته پس از کشت جوانه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک مزرعه و ماسه به نسبت دو به یک، طول گیاه، طول اندام هوایی، طول ریشه، وزن اندام هوایی گیاه و وزن تر ریشه در هر تیمار اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که طول ریشهٔ گندم به دلیل افشان بودن با روش Newman (1966) و با رابطهٔ زیر محاسبه شد

طول ریشه = (وزن ریشه) × ۰/۹۸۰

بررسی تأثیر ریزوباکتری بر درصد آلودگی رقم‌ها

بررسی اثر ریزوباکتری بر درصد آلودگی بافت زیر گرهٔ طوقهٔ رقم‌های گندم، بذرهای هر سه رقم به روشی که در بالا بیان شده، تیمار شدند. با این تفاوت که بذرها بدون جوانه‌زنی و همانند روش به‌کاررفته در آزمون اثبات بیماریزایی کشت شدند. درصد آلودگی در هفتهٔ پنجم با فرمول ارائه‌شده توسط Tinlin (1997) محاسبه شد.

$$\text{درصد آلودگی} = \frac{\text{میزان پوسیدگی} \times \text{تعداد گیاهان در هر گروه}}{\text{تعداد کل گیاهان}} \times ۱۰۰$$

بررسی میزان کلونیزاسیون ریشهٔ رقم‌های مختلف گندم توسط ریزوباکتری

تعداد سلول باکتریایی موجود روی ریشهٔ رقم‌های مختلف گندم به روش Keel *et al.* (1989) ارزیابی شد. ابتدا با تکان دادن شدید و شستشو در جریان ملایم آب مقطر سترون، خاک چسبیده به ریشه شسته شد. ریشه‌ها، به فلاسک‌های ارلن حاوی محلول ۰/۸۵ نمک طعام (NaCl) منتقل شدند و به مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. از سوسپانسیون حاصل دو بار سریال رقت تهیه شد و به مقدار ۱۲۰ میکرولیتر روی محیط اختصاصی لوریا برتانی آگار (LB) حاوی جنتامایسین (۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) پخش شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه، تعداد کلونی‌های ظاهرشده شمارش و میزان کلونیزاسیون باکتری برحسب تعداد واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی (CFU) باکتری در میلی‌گرم وزن خشک ریشه محاسبه شد (Broukanloui Madloo *et al*., 2013).

استخراج عصارهٔ گیاهی

در روزهای هفتم و نهم و هفتهٔ پنجم پس از تلقیح باکتری، ۰/۵ گرم برگ بلافاصله پس از جمع‌آوری به ظروف نیتروژن مایع منتقل شد و پس از انجماد سریع، تا زمان عصاره گیری در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج عصارهٔ گیاهی، نمونه‌های برگ درون ظرف هاون چینی در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس خرد شده و با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ۰/۱مولار (pH ۶) به‌صورت یک مخلوط همگن (عصاره) در آمدند. عصارهٔ حاصل به ویال‌های پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. درنهایت، محلول شفاف رویی به ویال دیگری منتقل شده و تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (Hammerschmidt *et al.,* 1982).

سنجش فعالیت آنزیم PAL

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم PAL با روش Ross & Sedroff (1992) صورت گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصارهٔ استخراج شده، ۴۰۰ میکرولیتر بافر تریس HCl (pH ۸/۸)۵۰ میلی‌مولار و ۴۰ میکرولیتر ال-فنیل‌آلانین (L-phenylalanine) ۱ میلی‌مولار با یکدیگر مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. این واکنش با افزودن اسیدکلریدریک (HCl) ۲ نرمال متوقف شد. سپس به این مخلوط، ۱ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شده و به مدت ۳۰ ثانیه به هم زده شد. برای جداسازی فاز تولوئن حاوی ترنس سینامیک اسید، این مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب تولوئن به‌دست‌آمده در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت ترنس سینامیک اسید بر اساس منحنی استاندارد به‌دست‌آمده از غلظت‌های ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بافر تریس محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیمی بر اساس نانومول‌های تولیدشده ترنس سینامیک اسید بر دقیقه بر وزن تر برگ محاسبه شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 8.7 و مقایسهٔ میانگین داده‌ها نیز با آزمون LSD در سطح احتمال ۱درصد صورت گرفت.

نتایج

آزمون اثبات بیماریزایی

از نظر شدت بیماری تفاوتی بین این سه رقم مشاهده نشد. با استفاده از شاخص‌های معرفی شده توسط Mansouri *et al.* (2002) نتایج زیر به دست آمد (0= بدون علائم؛ ۱=تغییر رنگ مختصر بافت گره زیر طوقه و طوقه ۲= علائم پوسیدگی حاد بافت گره زیر طوقه، طوقه و در مواردی همزمان با قهوه‌ای شدن قسمت پایین ساقه). هر سه فلات، مرودشت و نیک‌نژاد در گروه حساس به بیماری قرار گرفتند. در این رقم‌ها، علاوه بر علائم پوسیدگی در ناحیهٔ طوقه، میان گرهٔ زیر طوقه و قسمت‌های پایین ساقه تعداد زیادی از سنبله‌ها سفید شده و کوچک مانده بودند (جدول ۱).

تأثیر جدایهٔ باکتریایی بر میزان جوانه‌زنی بذر رقم‌های گندم

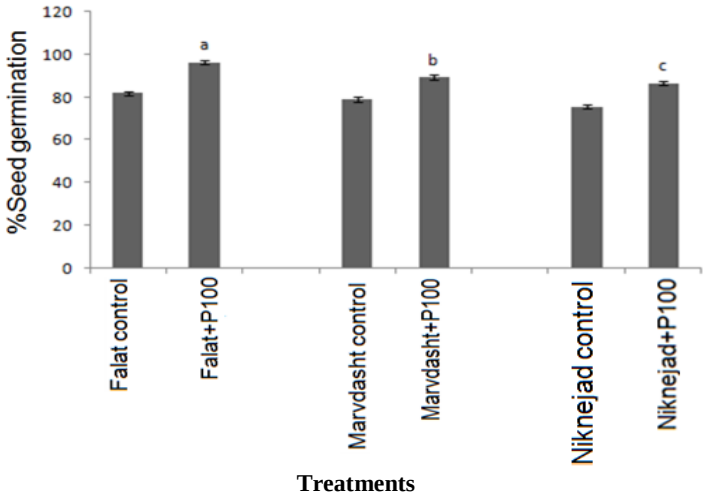
نتایج نشان داد، ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 اثر مثبت بر جوانه‌زنی بذرهای هر سه رقم گندم داشت، به‌طوری‌که درصد جوانه‌زنی بذر این رقم‌ها پس از تیمار با ریزوباکتری به میزان معنی‌داری افزایش یافت. مطابق با این نتایج در شکل ۱، ریزوباکتری با ۱۴/۳۳درصد، بیشترین تأثیر را جوانه‌زنی بذر رقم فلات داشته است، هرچند، این تأثیر در دو رقم مرودشت (۱۰/۳۳٪) و نیک‌نژاد (۱۱٪) کمتر از رقم فلات بوده است، اما تفاوت معنی‌داری بین هر سه رقم از این نظر در حضور ریزوباکتری در سطح احتمال ۱درصد مشاهده شد.

به‌علاوه، ویژگی‌های رشدی هر سه رقم گندم شامل وزن تر قسمت هوایی گیاه و ریشه، طول ریشه و اندام هوایی و طول کل گیاه نیز تحت تأثیر قارچ بیمارگر و ریزوباکتری قرار گرفت (جدول ۲)، به‌طوری‌که در هر سه رقم، بهترین ویژگی‌های رشدی متعلق به گیاهانی بود که تنها با ریزوباکتری تیمار شده بودند.

جدول ۱. واکنش رقم‌های گندم به بیماری‌زایی قارچ *F. culmorum*

Table 1. Wheat cultivar reaction to pathogenicity of F. culmorum fungus

Cultivars	Shrinkage	White head	Disease index	Reaction
Falat	+	+	2	S (susceptible)
Marvdasht	+	+	2	S
Niknejad	+	+	2	S



شکل ۱. اثر ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 بر درصد جوانه‌زنی بذر سه رقم گندم.

اعداد میانگین سه تکرار (± خطای استاندارد) هستند.

Figure 1. Effect of *P. fluorescens* UTP100 on germination percentage of three wheat cultivars. The numbers are means of three repetitions (± standard error)

طول ریشه در هر سه رقم نسبت به دیگر تیمارها در اثر تلقیح با ریزوباکتر افزایش یافت و طول این اندام بعد از پنج هفته به ترتیب در رقم‌های فلات، مرودشت و نیک‌نژاد به ۱۸/۶۶، ۱۵/۳۳ و ۱۸ رسید. طول اندام هوایی نیز همین تیمار به ترتیب در این رقم‌ها، ۴۸، ۴۵/۶۶ و ۴۸/۶۶ برآورد شد. افزایش وزن تر ریشه هم در این تیمار مشاهده شد. هرچند، این روند افزایش در وزن تر اندام‌های هوایی مشاهده نشد ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمار ریزوباکتری با تیمار مربوط به تلقیح هر دو عامل بیمارگر و ریزوباکتر مشاهده نشد. گیاهان تیمارشده با قارچ بیمارگر ویژگی‌های رشدی نامطلوبی داشتند. اثر مثبت ریزوباکتری بر ویژگی‌های رشدی گیاه را می‌توان از تیمار ترکیب قارچ بیمارگر و ریزوباکتری نیز استنباط کرد، چراکه در گیاهانی که همزمان با هر دو عامل تیمار شدند، صرف‌نظر از رقم گیاه، ویژگی‌های رشدی در مقایسه با گیاهان تیمارشده با قارچ بیمارگر بهبود پیدا کرد (جدول ۲).

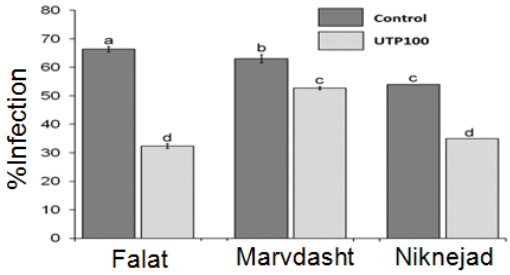
تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر درصد آلودگی رقم‌های گندم

بررسی درصد آلودگی بافت زیر گرهٔ طوقه نشان داد، بین رقم‌های مختلف مورد بررسی گندم از نظر شدت آلودگی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد وجود دارد. به‌طوری‌که بیشترین درصد آلودگی در رقم فلات (۶۶/۳۳٪) و کمترین درصد آلودگی در رقم نیک‌نژاد (۵۴٪) مشاهده شد. از سوی دیگر، تیمار بذرهای با باکتری *P. fluorescens* UTP100 در هر سه رقم مورد بررسی منجر به کاهش معنی‌دار شدت آلودگی شد. بیشترین میزان کاهش درصد آلودگی در رقم فلات (۳۴٪) و کمترین آن در رقم مرودشت (۱۰/۳۳٪) مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۲. تأثیر ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 بر برخی ویژگی‌های رشدی سه رقم گندم در برهمکنش با قارچ بیمارگر *F. culmorum*. اعداد میانگین سه تکرار (± خطای استاندارد) هستند، حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد هستند.

Table 2. The effect of rhizobacteria *P. fluorescens* UTP100 on some growth characteristics of three wheat cultivars in interaction with *F. culmorum* pathogenic fungi. The numbers are three replicates (± standard error), Non-similar alphabets represent a significant difference at 1% level

Cultivars	Treatment	Fresh weight of shoot (g)	Fresh weight of root (g)	Height of plant (cm)	Height of root (cm)	Height of shoot (cm)
Falat	Control	0.45±0.02b	0.062±0.002bc	61.33±1.53b	16±1.53bc	45.33±0.58bc
	Fusarium	0.19±0.01e	0.031±0.001g	44±2e	8.66±0.58g	37.33±0.58gh
	UTP100	0.48±0.01a	0.077±0.002a	66.66±0.58a	18.66±1.15a	48±1ab
	Fusarium + P100	0.37±0.01c	0.056±0.001cde	54±1.73cd	13±1de	41±1def
Marvdasht	Control	0.42±0.03b	0.055±0.002de	57.33±1.15c	14±1cde	43.33±1.15cd
	Fusarium	0.34±0.01d	0.036±0.002fg	48±1e	9.33±1.15g	53.66±1.38fg
	UTP100	0.41±0.01bc	0.057±0.001cde	61±1b	15.33±0.58cd	45.66±1.53abc
	Fusarium + P100	0.42±0.03	0.041±0.001f	52±2.65d	12±1f	40±1efg
Niknejad	Control	0.45±0.02a	0.061±0.001cd	62.33±2.08b	15.66±0.58bc	46.66±0.58ab
	Fusarium	0.38±0.01b	0.038±0.002f	47.33±1.15e	12±1f	35.33±0.58h
	UTP100	0.39±0.01b	0.068±0.002b	66.66±0.58a	18±2ab	48.66±0.58a
	Fusarium + P100	0.4±0.01b	0.052±0.002e	57±2c	14.33±0.58cde	42.66±1.53cde



شکل ۲. میانگین (± خطای استاندارد) درصد آلودگی بافت گرهٔ زیر طوقه سه رقم گندم مایه‌زنی‌شده با قارچ بیمارگر *F. culmorum* در حضور یا عدم حضور ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 در هفتهٔ پنجم پس از آلودگی. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد هستند.

Figure 2. Mean (± standard error) of contamination percentage of under region of crown tissue of three wheat cultivars grown with *F. culmorum* in presence or absence of rhizobacter *P. fluorescens* UTP100 on the fifth week after infection. Non-similar alphabets indicate a significant difference at a probability level of 1%.

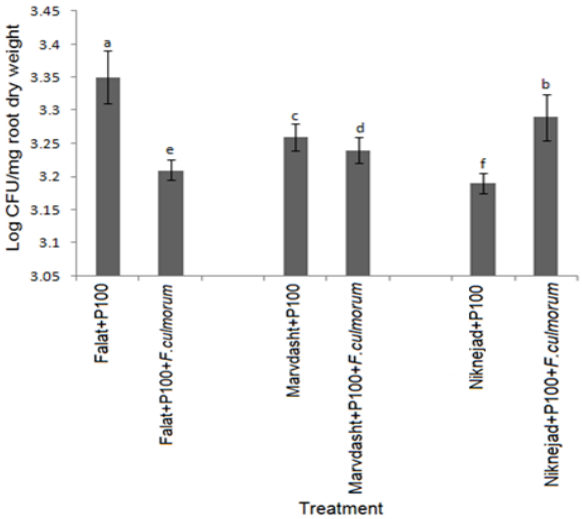
تأثیر رقم گندم و قارچ بیمارگر بر میزان کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری

نتایج این بررسی نشان داد، بین سه رقم گندم مورد استفاده و آلودگی یا عدم آلودگی این رقم‌ها به قارچ بیمارگر *F. culmorum* از نظر میزان کلونیزاسیون ریشه با باکتری *P. fluorescens* اختلاف معنی‌دار وجود دارد (شکل ۳) بیشترین لگاریتم CFU باکتری در رقم فلات غیر آلوده به قارچ بیمارگر (۳/۳۵ لگاریتم CFU در میلی‌گرم وزن خشک‌ریشه) و کمترین لگاریتم CFU در رقم فلات آلوده به قارچ بیمارگر (۳/۱۹ لگاریتم CFU باکتری در میلی‌گرم وزن خشک‌ریشه) مشاهده شد. آلودگی به قارچ بیمارگر اثر متناقضی روی کلونیزاسیون ریشه‌های رقم‌های مختلف توسط باکتری *P. fluorescens* داشت، به‌طوری‌که در دو رقم فلات و مرودشت، آلودگی به قارچ منجر به کاهش قابل‌توجه کلنیزاسیون ریزوباکتری شد، درحالی‌که در رقم نیک‌نژاد، پس از آلودگی به قارچ بیمارگر، تعداد CFUهای باکتری مستقر روی ریشه‌ها به میزان قابل توجهی افزایش پیدا کرد (شکل ۳).

فعالیت آنزیم PAL در رقم‌های گندم

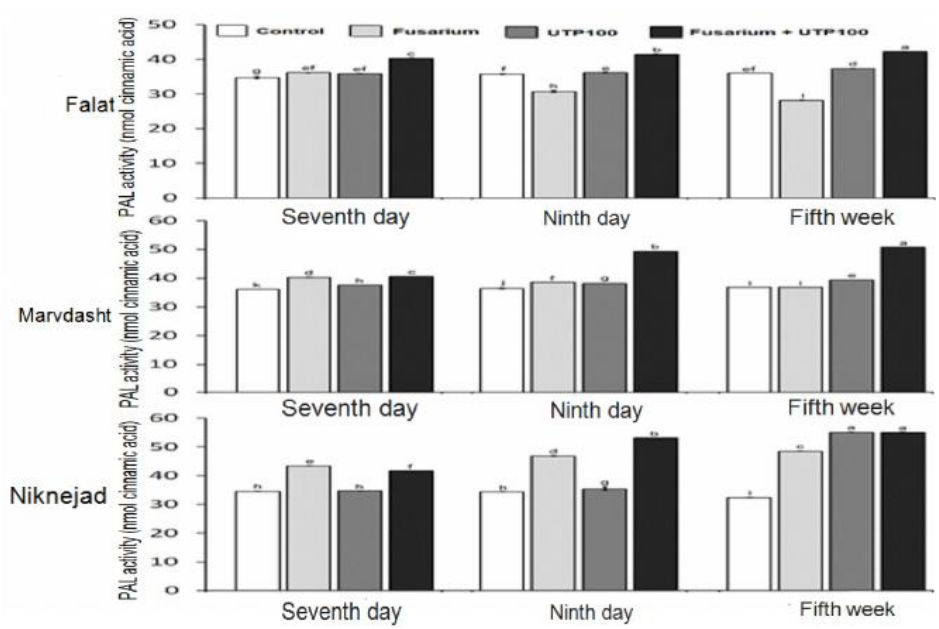
بنابر نتایج حاضر در شکل ۴، در بررسی واکنش رقم‌ها با بیمارگر، در روزهای هفتم، نهم و هفتهٔ پنجم در رقم فلات افزایش فعالیت آنزیمی در روزهای هفتم و کاهش فعالیت در روز نهم و هفتهٔ پنجم مشاهده شد. در رقم مرودشت، در روزهای هفتم و نهم افزایش فعالیت آنزیمی اتفاق افتاد و در هفتهٔ پنجم میانگین تغییرات معنی‌دار نبود. در رقم نیک‌نژاد در هر سه دوره، فعالیت آنزیمی افزایش یافت. در روز هفتم کمترین فعالیت مربوط به رقم نیک‌نژاد آلوده به بیمارگر بود. در هفتهٔ پنجم نیز کمترین فعالیت آنزیمی مربوط به رقم فلات آلوده به بیمارگر بود.

در برهمکنش باکتری با رقم‌های مختلف، افزایش فعالیت آنزیمی مشاهده شد. در هر سه دوره، هر دو جدایه در برهمکنش با بیمارگر موجب افزایش فعالیت آنزیمی شدند. در تعامل باکتری با رقم‌های مختلف در روز هفتم رقم نیک‌نژاد، کمترین فعالیت آنزیمی را داشت. در هفتهٔ پنجم، رقم نیک‌نژاد در برهمکنش با باکتری بیشترین و رقم فلات در این برهمکنش کمترین فعالیت آنزیمی را نشان داد. در برهمکنش باکتری با رقم‌های آلوده، در روز نهم و هفتهٔ پنجم رقم فلات آلوده در برهمکنش با باکتری کمترین فعالیت آنزیمی را نشان داد.



شکل ۳. میانگین (+ خطای استاندارد) میزان کلونیزاسیون باکتری *P. fluorescens* P100 روی ریشهٔ سه رقم گندم برحسب تعداد سلول باکتری در میلی‌گرم وزن خشک‌ریشه. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

Figure 3. Mean (+ standard error) of colonization rate of *P. fluorescens* P100 on the roots of three wheat cultivars based on the number of bacterial cells per milligram weight of dry matter. Non-matching letters indicate a significant difference at 1% level.



شکل ۴. میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز بر اساس نانومول سینامیک‌اسید در سه رقم گندم تیمارشده با *F. culmorum* و *P. fluorescens* UTP100 به‌صورت جداگانه و همزمان. A، B و C به ترتیب رقم فلات، مرودشت و نیک‌نژاد هستند. حروف غیرمشابه نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد است.

Figure 4. Mean (± standard error) of phenylalanine ammonia lyase enzyme activity based on cinnamic acid nanomole in three cultivars of *F. culmorum* and *P. fluorescens* UTP100 separately and simultaneously. Non-matching letters indicate a significant difference at 1% level.

بحث

در این بررسی، برهمکنش بین سه رقم گندم با قارچ بیمارگر *F. culmorum* و ریزوباکتری *P. fluorescens* با ارزیابی درصد آلودگی به‌عنوان صفت مرتبط با قارچ بیمارگر، میزان کلونیزاسیون ریشه‌ها به‌عنوان صفتی از باکتری *P. fluorescens* و برخی ویژگی‌های رشدی و میزان فعالیت آنزیم PAL به‌عنوان ویژگی‌هایی از گیاه میزبان بررسی شد. نتایج نشان داد، تلقیح بذرهای هر سه رقم گندم با باکتری *P. fluorescens* UTP100 منجر به کاهش درصد آلودگی این رقم‌ها به قارچ بیمارگر *F. culmorum* و بهبود ویژگی‌های رشدی گیاهان تیمارشده می‌شود، اگرچه در رقم‌های مختلف، از این نظر تفاوت‌هایی مشاهده شد.

افزون بر این، ریزوباکتری مذکور به تنهایی و در غیاب قارچ بیمارگر باعث بهبود درصد جوانه‌زنی بذر هر سه رقم گندم شد. به‌طورکلی، باکتری‌های جنس سودوموناس جزو باکتری‌های محرک رشد هستند که در طبیعت به‌طور وسیعی گسترش یافته‌اند و به همین دلیل می‌تواند ریزوسفر بسیاری از گیاهان را کلنیزه کنند. از طرفی، توانایی تولید طیف متنوعی از متابولیت‌های محرک رشد مانند سیدروفور (Meyer, 2000)، سیانید هیدروژن (Schippers *et al*., 1990) و اکسین (Patten & Glick, 2002) و نیز توانایی انحلال فسفات (Rashid *et al*., 2004) را دارند. با استناد بر این یافته‌ها، می‌توان گفت که جدایهٔ *P. fluorescens* UTP100 با یک یا چند مورد از این مکانیسم‌ها و ترکیب‌های موجب بهبود توسعهٔ رشد گیاه شده است. کما اینکه امکان تولید سیدروفور و ترکیب‌های فرار ضد قارچی در سطح آزمایشگاه در این جدایه صورت گرفته و نتایج قابل قبولی نیز ارائه شده است (Hosseinzadeh Foumeshi *et al*., 2013).

همچنین، میزان کلونیزاسیون ریشهٔ هر سه رقم به میزان زیادی تحت تأثیر رقم‌های گیاهی و آلودگی یا عدم آلودگی آن‌ها به قارچ بیمارگر قرار گرفت. به‌طوری‌که بیشترین تعداد CFU باکتری در رقم فلات غیر آلوده و کمترین آن در رقم فلات آلوده به قارچ بیمارگر ثبت شدند. به‌علاوه، برخلاف دو رقم مرودشت و فلات که در اثر آلودگی به قارچ میزان کلونیزاسیون باکتری روی ریشهٔ آن‌ها کاهش یافت، در رقم

نیک‌نژاد، آلودگی به قارچ بیمارگر منجر به افزایش قابل‌توجه تعداد CFUهای باکتری مستقر روی ریشه شد. در این میان، رقم مرودشت، کمترین نوسان را از نظر میزان کلونیزاسیون باکتری در گیاهان آلوده و غیرآلوده به قارچ بیمارگر نشان داد (شکل ۳). بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که میزان نقش باکتری در محافظت از گیاه، بسته به نوع رقم گندم و میزان مقاومت آن نسبت به بیمارگر متفاوت است. در بررسی میزان کلنیزاسیون ریشهٔ گندم مشاهده شد که رقم‌های مختلف به‌طور یکسان توسط باکتری کلونیزه نمی‌شوند که در بررسی‌های قبلی نیز مشاهده شده است (Mazzola *et al.*, 2004; Sharifi-tehrani *et al.*, 2009). مشخص‌شده که جایگزینی یک کروموزم در ژنوتیپ (نژادگان) گیاه مادری ممکن است ترکیب جامعهٔ میکروبی را در ریزوسفر تغییر دهد. اختلاف در سطح رقم برای کلنیزاسیون ریشهٔ گیاه پنبه، گندم و گوجه‌فرنگی مشاهده شده است (Mazzola *et al.*, 2002). همچنین، مشخص شده است که بیان ژن *phlA* بیوسنتز کنندهٔ DAPG در جدایهٔ CHAO در میان رقم‌های ذرت متفاوت است (Notz *et al.*, 2002).

Mazzola *et al.* (2002) در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند، رقم‌های متفاوت ظرفیت متفاوتی در افزایش جمعیت باکتری‌های مقیم خاک دارند. همچنین، نشان دادند که یک سطحی از اختصاصیت بین رقم گیاه و استرین باکتری وجود دارد. به‌طوری‌که یک نوع رقم خاص قادر است ژنوتیپ ویژه‌ای را از لحاظ جمعیت حفظ کند، درحالی‌که همان ژنوتیپ در رقم دیگر جمعیت بسیار پایینی دارد.

بررسی میزان فعالیت آنزیم PAL نشان داد، استقرار باکتری در هر سه رقم گندم مورد بررسی، صرف‌نظر از آلودگی آن‌ها به قارچ بیمارگر، منجر به افزایش میزان فعالیت این آنزیم شد. اما آلودگی به قارچ بیمارگر، تنها در رقم نیک‌نژاد باعث افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با شاهد شد. درصد آلودگی پایین این رقم در مقایسه با دو رقم فلات و مرودشت در گیاهان تیمارنشده با ریزوباکتری (شکل۱) ممکن است از این فرضیه حمایت کنند. از سوی دیگر، فعالیت آنزیم PAL در گیاهانی که به‌طور همزمان با قارچ بیمارگر و باکتری تیمار شده بودند، بیشتر از گیاهانی بود که به تنهایی به هر یک از این دو میکروارگانیسم آلوده شده بودند. این موضوع، از سویی بر لزوم حضور عامل بیمارگر برای افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی و از سوی دیگر، بر نقش ریزوباکتری در تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه در مواجهه با بیمارگر تأکید دارد. این نتایج با یافته‌های دیگر محققان کاملاً مطابقت دارد (Chen *et al.*, 2000; Nakkeeran *et al.*, 2005; Basha & Chatterjee, 2007; Daval *et al.*, 2011). به‌عنوان مثال، Basha & Chatterjee (2007) نشان داده‌اند که میزان فعالیت آنزیم PAL در نخودفرنگی، هنگامی‌که بوته‌ها به‌طور همزمان با ریزوباکتری *P. aeruginosa* یا *P. fluorescens* و قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* تیمار می‌شوند، بیشتر از زمانی است که گیاهان به‌صورت جداگانه به هر یک از این عامل‌ها آلوده می‌شوند. در بررسی دیگری، نشان داده شد که فعالیت سه آنزیم PAL، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در گیاهان فلفل قرمز که به‌طور همزمان با ریزوباکتری *P. chlororaphis* یا *Bacillus subtilis* و قارچ بیمارگر *Pythium aphanidermatum* آلوده شده‌اند بیش از گیاهانی است که به‌صورت جداگانه توسط هر یک از این عامل‌ها تیمار شده‌اند (Nakeeran *et al.*, 2005).

درمجموع، بررسی حاضر نشان داد که ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 قادر است به‌خوبی در ریزوسفر رقم‌های مختلف گندم مستقرشده و از گیاه در برابر قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه، *F. culmorum*، محافظت کند. از نظر میزان کلونیزاسیون این باکتری و میزان کنترل بیماری، تفاوت‌هایی بین رقم‌های مختلف مشاهده شد که مستندات و دلیل این تفاوت قبلاً ذکر شد. قدرت بیوکنترل این ریزوباکتری ممکن است از طریق اشغال ریزوسفر، تولید متابولیت‌های مختلف ازجمله آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورها، رقابت بر سر مواد غذایی در گیاه میزبان حاصل شود که توانایی تولید سیدروفور و متابولیت‌های ضد قارچی این جدایهٔ ریزوباکتر بررسی و اثبات شده است (Hosseinzadeh Foumeshi *et al.*, 2013). اما با توجه به افزایش میزان فعالیت

PAL و احتمالاً سایر آنزیم‌های دفاعی گیاه، در حضور ریزوباکتری و در پاسخ به آلودگی توسط قارچ بیمارگر می‌توان گفت که احتمالاً ریزوباکتری در القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان نیز نقش دارد. حفاظت از گیاه، با هر مکانیسمی که صورت گرفته باشد، بیانگر این موضوع است که ریزوباکتری *P. fluorescens* UTP100 در کنترل بیولوژیک قارچ *F. culmorum* کارایی لازم را داشته و می‌تواند در برنامه‌های مدیریتی این بیمارگر استفاده شود. درنهایت می‌توان گفت بین گیاه و میکروب ارتباط وجود دارد. هر چه گیاه بیشتر به کلنیزاسیون ریشه اجازه دهد، مزیت‌های زیادی نیز از ریزوباکتر دریافت می‌کند.

REFERENCES

1. Anderson, A. S. & Guerra, D. (1985). Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in hydroponics' system. *Phytopathology*, 75, 992- 995.
2. Basha, A. S. & Chatterjee, S. C. (2007). Effect of PGPR on *Sclerotinia sclerotiorum* infection through elicitation of phenylalanine ammonia lyase in chickpea. *Indian Phytopathology*, 60, 313-316.
3. Becker, J. S., Marios, E., Huguet, E. J.., Midland, S. L., Sims, J. J. & Keen, N. T. (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiology*, 11, 231-238.
4. Broukanloui, P., Behboudi, K., Tohidfar, M., Salehi, G. & Ahmadzadeh, M. (2013). Response of some important Iranian wheat cultivars to *Fusarium culmorum* under genetic diversity of indigenous bio-control agent fluorescent *Pseudomonas* spp. *Australian Journal of Crop Science*, 7, 1003-1009.
5. Chekali, S., Gargouri, S., Berraies, S., Gharbi, M. S., Nicol, M. J. & Nasraoui, B. (2013). Impact of Fusarium foot and root rot on yield of cereals in Tunisia. Tunisian. *Journal of Plant Protection*, 8, 75-86.
6. Chen, C., Belanger, R. R., Benhamou, N. & Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 13-23.
7. Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z. & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 493-496.
8. Chin-A-Woeng, T. F., Bloemberg, G. & Lugtenberg, B. J. (1998). Biocontrol by Phenazine-1-carboxamide-Producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of Tomato Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici. The American Phytopathological Society*, 11, 1069-107.
9. Davat, S., Lebreton, K., Gazengel, K., Boutin, M., Guillerm-Erckelboudt, A. Y. & Sarniguet, A. (2011). The biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp strain affects the pathogenesis-related gene expression of the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat roots. *Molecular Plant Pathology*, 12, 839-854.
10. Diby, P. & Sharma, Y. R. (2005). *Pseudomonas fluorescens* mediated systematic resistance in black pepper (*Piper nigrum* L.) is driven through an elevated synthesis of defense enzymes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38, 139-149.
11. FAO. (2012). FAOSTAT Database on Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
12. Haj Malek Zanjani, M., Ahmadzadeh, M. Sharifi Tehrani, A., Behboodi, K. & Saberi riseh, R. (2011). Effects of Rhizoctonia solani on Root Colonization of Canola by Pseudomonas fluorescens Strain UTPF86. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 42(1), 163-170.
13. 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.
14. Hao, Z. N., Wang, L. P. & Tao, R. X. (2009). Expression patterns of defense genes and antioxidant defense responses in a rice variety that is resistant to leaf blast but susceptible to neck blast. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 167-174.
15. Hosseinzadeh Foumesh, H., Behboodi, K. & Ahmadzadeh, M. (2013). Induction of PAL and proxidase in interaction of some wheat cultivars and *Pseudomonas fluorescens* UTP100 against *Fusarium culmorum*, the causal agent of common root rot. M. sc. Thesis. Plant Protection Department College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj.
16. Keel, C., Weller, D. M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. J. & Thomashow L. S. (1996). Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 552-563.
17. Mansouri, B., Ravanlou, E., Nourolahi, Kh., Azadbakht, N., Jafari, H. & Ghalandari, M. (2002). Wheat common root and crown rot in Azarbayjan, Ilam, Lorestan, Zanjan and Markazi. In: Proceedings of *Iranian plant protection congress*, Volume, 2. Kermanshah, p. 41.

18. Mazzola, M. & Gu, Y. H. (2002). Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group (AG)-5 and AG-8. *Phytopathology*, 92, 1300-1307.
19. Mazzola, M., Funnell, D. L. & Raaijmakers, J. M. (2004). Wheat cultivar-specific selection of 2,4-Diacetylphloroglucinol-P roducing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. *Microbial Ecology*, 48, 338-348.
20. Meyer, D. M. (2000). Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent *pseudomonas* species. *Archives of Microbiology*, 174, 135-142.
21. Moya-Elizondo, E. A., Hogg, B. J. J. A. C. & Dyer, A. T. (2011). Distribution and prevalence of *Fusarium* crown rot and common root rot pathogens of wheat in Montana. *Plant Disease*, 95, 1099-1108.
22. Nakkeeran, S., Fernando, W. G. D. & Siddiqui Z. A. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui Z.A. (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. *Springer, Dordrecht*, pp. 257-296.
23. Newman, E, I. (1966). A method of estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, 3, 139-145.
24. Notz, R., Maurhofer, M., Dubach, H., Haas, D. & Défago, G. (2002). Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2229-2235.
25. Pal, K. K., Tilak, B. R., Saxena, A. K., Dey, R. & singh, C. S. (2001). Suppression of maize root disease caused by *Macrophomina phaseoli*, *Fusarium moniliform* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiology Research*, 156, 209-223.
26. Pallas, J., Paiva, N., Lamb, C. & Dixon, R. (1996). Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant Journal*, 10, 281-293.
27. Parr, A. J. & Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of Science Food Agriculture*, 80, 985-1012.
28. Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002) .Role of *pseudomonas putida* indole acetic acid in development of hostplant root system. *Applied Environmental Microbiology*, 3795-3801.
29. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. & Latif, F. (2004). Organic acids productions solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 187-196.
30. Ross, W. W. & Sederoff, R. R. (1992). Phenylalanine ammonia lyase from loblolly Pin: Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clone. *Plant Physiology*, 98, 380-386.
31. Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F. Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. & Micheli, Q. (2013). *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular Plant Pathology*, 14, 323-341.
32. Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M. & Vanpeer, R. (1990). Beneficial and deleterious effects of HCN-production pseudomonads on rhizosphere interaction. *Plant and Soil*, 129, 75-83.
33. Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21-43.
34. Smiley, R. W. & Yan, H. (2009). Variability of fusarium crown rot tolerances among cultivars of spring and winter wheat. *Plant Disease*, 93, 954-961.
35. Thomashow, L. S. & Weller, D. M. (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. Plant-Microbe Interaction, vol.1 (Stacey, G. & Keen, N, eds), pp.187-235. Chapman & Hall, New York, NY.
36. Tinlin, R. D. (1997). Multiple infection of subcrown internode of wheat (*Triticum aesativum*) by common root rot fungi. *Canadian Journal of Botany*, 55, 30-34.
37. Vanitha, S. C. & Umesha, S. (2011) *Pseudomonas fluorescens* mediated systemic resistance in tomatois driven through an elevated synthesis of defense enzymes. *Biologia Plantarum*, 55, 317-322.
38. Verhagen,A. A. E., Janvier, A., Leuthner, S. R., Andrews, B., Lagatta, J., Bos, A. F. & Meadow, W. (2010). Categorizing neonatal deaths: A cross-Cultural study in the United States, Canada, and the Netherlands. *Journal of Pediatrics*, 156, 33-7.
39. Vidhyasekaran, P., Rabindran, R., Muthamilan, M., Nayar, K., Rajappa, K., Subramanian, N. & Vasumathi, K. (1997). Development of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. *Plant Pathology*, 46, 291-297.
40. Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J., Kovacevich, P., Mukerji, P., Weller, D. M. & Pierson, E. A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soil-borne *Pseudomonas aureofacience* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2928-2934.

41. Wachowska, U., Kucharska, K., Jedryczka, M. & Lobik, N. (2013) Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 591-597.
42. Wagacha, J. M. & Muthombi, J. W. (2007) *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Protection*, 26, 877-885.
43. Weller, D. M. & Cook, R. J. (1986). Increased growth of wheat by seed treatment with Fluorescent *Pseudomonas* and implication of pythum control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8, 328-334.
44. Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature*, 417-571.