تاثیر سویه‌های غیربیماری‌زای *Pseudomonas* روی شدت بیــماری ایجاد شده توسط بیمارگرهای *Botrytis cinerea* و *Alternaria alternata* در گیاه گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس

حمیده رئیسی[1*]، سید محسن تقوی[2]، حبیب الله حمزه زرقانی[2]، مریم انصاری[2] و محمد جواهری[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۷)

چکیده

سودوموناس‌های غیربیماری‌زا از مهمترین عوامل کنترل‌زیستی می‌باشند، که در مدیریت بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند. در این تحقیق اثر چهار سویه از *Pseudomonas fluorescens*(Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) و یک سویه از *Pseudomonas putida* (P13) روی بیماری برگی ناشی از *Botrytis cinerea* و *Alternaria alternata* سنجیده شد. هدف این تحقیق بررسی توانایی سودوموناس‌های فلورسنت در کاهش شدت بیماری در گیاه گوجه‌فرنگی (ارقام کوئین و مجار) و آرابیدوپسیس بود. بررسی تاثیر عوامل کنترل زیستی در کاهش غیرمستقیم شدت بیماری‌های فوق نشان داد، که بیشترین کاهش بیماری مربوط به سویه‌های Pf3 و سویه‌ی P13 بود، که سویه Pf3 قادر به کاهش میانگین قطر لکه تا حدود ۲۵ درصد و سویه P13 نیز قادر به کاهش میانگین قطر لکه تا حدود ۳۰ درصد نسبت به شاهد بودند. بررسی توانایی عوامل کنترل زیستی در کنترل مستقیم بیمارگر نشان داد، که سویه‌های به‌کار برده شده تفاوت معنی‌داری در کنترل بیمارگر داشتند و سویه P13 بیشترین توانایی را در کنترل بیمارگر داشت، به‌طوری‌که قادر بود تا حدود ٤٥ درصد بیماری را نسبت به شاهد کاهش دهد. در نهایت سویه‌های *P. fluorescen s* (Pf3) و *P. putida* (P13) به عنوان سویه‌های قوی‌تر معرفی شدند. این سویه‌ها علاوه برکاهش شدت بیماری در گیاه، توانایی افزایش رشد گیاه را نیز داشتند.

کلیدواژه: کنترل زیستی، *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida*، بیمارگرهای برگی.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ha.raeesi@gmail.com

۱. بخش گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت.

۲. بخش گیاهپزشکی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز.

Effect of non-pathogenic *Pseudomonas* strains on the severity of diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on tomato and Arabidopsis plants

H. Raeisi[1*], S.M. Taghavi[2], H. Hamzehzarghani[2], M. Ansari[2], and M. Djavaheri[2]

(Received: 11.4.2018; Accepted: 17.7.2018)

Abstract

Non-pathogenic Pseudomonads are the main biocontrol agents that are used in plant disease management. In this study, effects of four strains of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4), and *P. putida* (P13) were studied for their ability to elicit induced systemic resistance against diseases caused by *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on tomato (Super Majar and Queen cvs) and Arabidopsis. The ability of biocontrol agents to colonize roots of tomato cultivars and Arabidopsis and induce resistance was shown to be highest for P13, and Pf3 strains and P13, and Pf3 were able to reduce the average lesion diameter of diseased leaves to 30% and 25%, compared to that of control, respectively. The ability of biocontrol agents for direct control the pathogens was also evaluated. The results revealed that *P. putida* (P13) was the best biocontrol agent as measured by the reduction in disease severity. P13 reduced the average lesion diameter of diseased tomato leaves by about 45%. Finally, Pf3 and P13 were identified as more powerful strains. Moreover, these strains could induce some level of resistance against various pathogens and they had the ability to enhance plant growth.

Keywords: Biological control, *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida*, leaf pathogens

*Corresponding author's E-mail: ha.raeesi@gmail.com
1. Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, Iran.
2. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

مقدمه

فراریشه (ریزوسفر) محیط احاطه‌کننده ریشه گیاهان می باشد، که غنی از مواد غذایی است. این محیط شامل جمعیت‌های وسیع و متنوعی از میکروارگانیزم‌های مفید می‌باشد که با گیاه همکنش برقرار می‌کنند (Walker *et al.* 2003). از جمله این میکروارگانیزم‌ها می‌توان به ریزوبیوم‌ها و قارچ‌های میکوریزا اشاره نمود، که باعث بهبود جذب آب و تغذیه بهتر گیاه می‌شوند (Pozo & Azcon-Aguilar 2007). در میان این میکروارگانیزم‌ها، باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهان قرار دارند، که باعث تحریک رشد گیاه و افزایش ظرفیت فتوسنتزی گیاه می‌شوند (Zhang *et al.* 2008, Majeed *et al.* 2015). همچنین، این عوامل قادرند تحمل گیاه را نسبت به تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش دهند. باکتری‌های مفید فراریشه به باکتری‌های محرک رشد گیاه یا PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria) موسوم هستند، که توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده‌اند. این باکتری‌ها می‌توانند با استفاده از یک و یا چند مکانیسم خاص موجب افزایش رشد گیاه و یا کاهش میزان خسارت ناشی از بیمارگرهای خاکزاد و بیمارگرهای هوازاد شوند. سرکوب بیمارگرهای گیاهی به وسیله این عوامل در حالت مستقیم در اثر رقابت و یا ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Van Loon *et al.* 1998, Harman *et al.* 2004, Kamilova *et al.* 2008, Narayanan *et al.* 2016) و در حالت غیرمستقیم در اثر تحریک پاسخ‌های دفاعی سیستمیک در گیاه می‌باشد (Bakker *et al.* 2007, Van Wees *et al.* 2008, Egamberdieva *et al.* 2015 Planchamp *et al.* 2014).

در میان گونه‌های PGPR، باکتری‌های جنس سودوموناس بویژه انواع سودوموناس‌های فلورسنت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Van Loon *et al.*1998, Van Loon *et al.* 2005). گونه‌های مختلف این باکتری از طریق به کارگیری مکانیسم‌هایی متنوعی چون تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، تولید کلات کننده‌های آهن، رقابت با بیمارگر برای استقرار بر سطح ریشه و القای مقاومت سیستمیک، قادر به کنترل بیمارگرهای گیاهی می‌باشند (Iavicoli *et al.* 2003, Ryu *et al.* 2004, Jha & Subramanian 2014, Islam *et al.* 2015). همچنین کلونیزه شدن ریشه گیاه با بعضی از سویه‌های سودوموناس غیربیماری‌زا باعث مقاومت سیستمیک القایی ISR (induced systemic resistance) در گیاه می‌شود (Van Loon *et al.* 1998). مقاومت ایجاد شده توسط این دسته از باکتری‌ها در گیاه به تجمع اسید سالیسیلیک و بیان ژن های *pathogenesis-related proteins* (PR) وابسته نمی‌باشد (Pieterse *et al.* 1996). مسیرهای سیگنالی فعال شده توسط ریزوباکترها در گیاه، معمولاً مسیرهای وابسته به سیگنال‌های اتیلن و اسید جاسمونیک می‌باشد (Van Wees *et al.* 1997, Ton *et al.* 2002, Van der Ent *et al.* 2009, Walters *et al.* 2013, Pieterse, *et al.* 2014).

تحقیقات انجام شده روی سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* نشان می‌دهد که این سویه‌ها قادر به کاهش علائم بیماری روی گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زای مختلف مانند *P. syringae*، بیمارگر ریشه *Fusarium oxysporum* Sch.:Fr. و سفیدک‌کرکی *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Pers.:Fr) Fr. هستند. همچنین القای ISR توسط سویه‌های سودوموناس در گیاه آرابیدوپسیس باعث مقاومت گیاه نسبت به بیمارگرهای مختلف مانند *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wilts، *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. و *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams

می‌شود (Van der Ent *et al.* 2009).

علاوه بر کلونیزه شدن ریشه با باکتری‌های غیربیماری‌زای موجود در فراریشه، مشتقات باکتری‌ها نیز قادرند در گیاه مقاومت ایجاد کنند. برای مثال آنتی‌بیوتیک pyocyanin از *P. aeruginosa* 7NSK2 در القای ISR علیه *B. cinerea* در گوجه‌فرنگی دخیل است (Bakker *et al.* 2007). همچنین، نقش تاژک و لیپوپلی‌ساکاریدها در القا مقاومت توسط باکتری‌های *P. fluorescens* و *P. putida* WCS358 در گیاهان آرابیدوپسیس، لوبیا و گوجه‌فرنگی بررسی شده است (Meziane *et al.* 2005). علاوه بر موارد فوق نقش آهن‌بر نیز در ISR در چندین سیستم شرح داده شده است. از جمله آهن‌برهای تولید شده توسط گونه‌های سودوموناس می‌توان به Pyocyanin و Pyochelin (SA) اشاره نمود (Audenaert *et al.* 2002b, Verhagen *et al.* 2010, El Oirdi *et al.* 2011).

ریزوباکتری‌های القاکننده مقاومت به طور وسیعی به عنوان ریزوباکتری‌های بهبود دهنده‌ی رشد گیاهان شناخته شده‌اند. مکانیسم‌هایی که باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند از طریق آنها مستقیماً باعث بهبود و افزایش رشد و عملکرد گیاه شوند عبارتند از یک) تثبیت نیتروژن، دو) حل فسفات‌های کم محلول، سه) تأمین آهن از طریق تولید آهن‌برهای میکروبی، چهار) تولید فیتوهورمون‌هایی چون اکسین، سیتوکینین و اتیلن (Van Loon 2007, Dimkpa *et al.* 2009, Glick 2015, Zahid *et al.* 2015).

در این پژوهش توانایی سویه‌های سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) در کنترل مستقیم بیمارگر بر روی گیاه گوجه‌فرنگی و در القای مقاومت سیستمیک در گیاه گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس سنجیده شد. تعیین پتانسیل ایجاد مقاومت سیستمیک توسط عوامل کنترل زیستی با توجه به میزان کاهش بیماری ناشی از بیمارگرهای *B. cinerea* و *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissl مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به مجزا بودن محل مایه‌زنی عامل کنترل زیستی (ریشه) و محل مایه‌زنی بیمارگر (برگ) کاهش شدت بیماری در گیاه در اثر تغییرات ایجاد شده در سیستم دفاعی گیاه است. توانایی سویه‌هایی که قدرت ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه گوجه‌فرنگی را نسبت به بیمارگرهای فوق داشتند، بر روی گیاه آرابیدوپسیس نیز سنجیده شد. در نهایت توانایی این عوامل در بهبود خصوصیات رشدی گیاه گوجه‌فرنگی نیز سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عامل کنترل زیستی

از بین سویه‌های برتر کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست در دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، سویه‌های *P. fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) انتخاب شدند و سویه‌ای از *P. putida* (P13) از پژوهشکده ملی زیست فناوری و مهندسی ژنتیک دریافت شد (Sarikhani *et al.* 2010). جهت تایید جدایه‌های باکتری آزمون گرم، اکسیداز و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت KB انجام شد (Schaad *et al.* 2001).

برای تکثیر سویه‌های سودوموناس ابتدا هر سویه روی محیط KB حاوی ۱۰۰μM/ml ریفامپیسین کشت داده شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت سوسپانسیونی از هر سویه باکتری در آب تهیه شد و OD آن در ۶۰۰ nm سنجیده شد. OD~1 معادل جمعیت $۱۰^{۹}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

تهیه بیمارگر

قارچ‌های بیمارگر *B. cinerea* جدایه‌ی RA و *A.*

alternata ازکلکسیون قارچ‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انتخاب شدند. جهت تایید بیمارگرهای انتخاب شده از کلیدهای شناسایی مرتبط استفاده شد (Simmons 1992, Barnet & Hunter 1998, Mirzaei *et al.* 2007). برای تکثیر قارچ *B. cinerea* از محیط PDA استفاده شد و پس از کشت، تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. چهارده روز پس از کشت، سوسپانسیون اسپور به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر از قارچ تهیه شد. جهت انجام مایه‌زنی به سوسپانسون تهیه شده قارچ ۱۰ mM گلوکز و ۶/۷ mM KH_2PO_4 با هدف افزایش جوانه‌زنی اسپورهای قارچ اضافه شد (Achuo *et al.* 2004). قارچ *A. alternata* نیز روی محیط PDA کشت داده شد. پس از گذشت ۷ روز سوسپانسیون اسپوری به غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای انجام آزمون بیماری‌زایی تهیه شد.

توانایی سویه‌های Pf1, Pf2, Pf3, Pf4 و P13 در کنترل غیرمستقیم بیماری در گیاه

برای بررسی توانایی سویه‌های *P. fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) و سویه‌ی *P. putida* (P13) در کنترل بیماری به صورت غیرمستقیم در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) از ارقام Super Majar و Queen ۲۲۷۴ (شرکت عنبری، مشهد، ایران) استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا خاک بستر مورد استفاده بصورت مخلوطی از ماسه و خاک (به نسبت پنج به یک) تهیه و دو بار، به فاصله زمانی یک روز، به مدت یک ساعت اتوکلاو شد. سپس سویه‌های سودوموناس، روی محیط KB حاوی ریفامپیسین ۱۰۰μM/ml کشت شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت سوسپانسیونی از باکتری‌های مورد نظر تهیه و در زمان کاشت بذر با خاک گلدان مخلوط و جمعیت نهایی باکتری در هر گرم خاک 5×10^7 سلول باکتری در نظر گرفته شد. از گلدان‌های یک کیلوگرمی برای کشت بذور گیاه گوجه‌فرنگی ارقام Super Majar و Queen ۲۲۷۴ استفاده شد. ۱۵ گیاه (۳ گلدان /در هر گلدان ۵ گیاه) برای هر تیمار در نظر گرفته شد. در نهایت گلدان‌ها در شرایط گلخانه (دمای۳۰°C- ۲۴) نگهداری شدند.

برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی در مرحله ۷-۵ برگی با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر از بیمارگرهای *B. cinerea* سویه‌ی RA و *A. alternata* به روش برگ جدا شده (detached leaf) مایه‌زنی شدند. بررسی علائم بیماری پس از ۵ روز از مایه‌زنی و با اندازه گیری قطر لکه‌ها صورت گرفت و در نهایت برای هر تیمار ۱۳ تکرار در نظر گرفته شد.

کشت گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) در سیستم هیدروپونیک صورت گرفت، به این صورت که گیاهچه‌های یک هفته‌ای آرابیدوپسیس در سینی نشا ۲۵ خانه‌ای مخصوص تشت‌های هیدروپونیک که حاوی کوکوپیت: پرلیت با نسبت ۲:۱ بود، نشا شدند. محلول هیدروپونیک براساس روش کار کرپسی و گالیبا انتخاب شد (Kerepesi & Galiba 2000). پس از کشت گیاه آرابیدوپسیس در سیستم هیدروپونیک سوسپانسیون عوامل کنترل زیستی به تشت‌های هر تیمار اضافه شد، به‌طوری‌که جمعیت باکتری در هر میلی‌لیتر محلول 10^6 سلول باکتری در نظر گرفته شد. تشت حاوی محلول پس از کشت گیاه در جعبه قرار داده شد، تا رطوبت لازم جهت رشد گیاه از این طریق فراهم شود. در تیمار شاهد، به تشت محلول سوسپانسیونی اضافه نشد.

گیاه آرابیدوپسیس ۴ هفته‌ای برای مایه‌زنی در نظر گرفته شد. به این صورت که روی برگ‌ها به وسیله سوزن زخم کوچکی ایجاد شد و به وسیله میکروپیپت قطرات ۵

میکرولیتری از سوسپانسیون‌های اسپورکه با غلظت 10^6 تهیه شده بودند، در محل زخم روی برگ قرار گرفتند. تعیین شدت بیماری روی گیاه آرابیدوپسیس با اندازه‌گیری قطر لکه‌ها صورت گرفت. برای هر تیمار ۱۳ تکرار در نظر گرفته شد.

کاربرد مستقیم سویه‌های Pf2, Pf3 و P13 روی برگ گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار

بذور گوجه‌فرنگی رقم مجار در مخلوطی از خاک: ماسه اتوکلاو شده به نسبت ۵:۱ کشت شد. سوسپانسیون باکتریایی *P. putida* (P13) و *P. fluorescens* (Pf2, Pf3) با غلظت 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون روی گیاهان گوجه‌فرنگی در سن پنج تا هفت برگی، پاشیده شد. در تیمار شاهد، بر روی گیاهان آب مقطر اسپری شد.

گیاهان مربوط به هر تیمار جهت حفظ رطوبت در پلاستیک قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت گیاهان از رطوبت اشباع خارج شدند و در گلخانه قرار داده شدند. بعد از گذشت دو روز، مایه‌زنی گیاهان به روش برگ جدا شده با قارچ‌های بیمارگر *B. cinerea* سویه‌ی RA و *A.alternata* به صورت مجزا انجام شد (Audenaert *et al.* 2002a). علائم پنج روز پس از مایه‌زنی با اندازه‌گیری قطر لکه‌ها بررسی شدند. در این آزمایش برای هر تیمار ۱۳ تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی کلونیزه شدن شدن ریشه و برگ گیاه توسط عوامل کنترل زیستی

سوسپانسیونی از سویه‌های باکتریایی تهیه و با خاک مخلوط شد، به‌طوری که 5×10^7 سلول باکتری در هر گرم خاک باشد. در گلدان شاهد خاک با آب مخلوط شد. برای هر تیمار ۴ تکرار درنظر گرفته شد. سپس بذور ارقام گوجه فرنگی در گلدان‌های یک کیلوگرمی کاشته شد و در شرایط گلخانه (دمای۳۰°C- ۲۴) نگهداری شدند.

برای بررسی کلونیزه شدن ریشه، پس از گذشت یک ماه گیاهان مربوط به هر تیمار از گلدان‌ها خارج شد و یک گرم از بافت ریشه همراه با خاک فراریشه به طور تصادفی برداشته شد. به وسیله KH_2PO_4 ۱۰ mM سری رقتی برای ریشه‌های هر تیمار تهیه شد. سپس رقت‌های تهیه شده روی محیط KB کشت داده شدند و جمعیت باکتری در هر رقت شمارش شد و بر اساس تعداد کلنی‌های شمارش شده جمعیت باکتری در ریزوسفر سنجیده شد.

برای بررسی کلونیزه شدن برگ، پس از گذشت یک هفته یک گرم از بافت گیاهان مربوط به هر تیمار بطور جداگانه وزن شد و ۵ میلی‌لیتر $MgSO_4.7H_2O$ ۱۰ mM به آنها اضافه شد و درهاون چینی بافت کاملا له شد. سپس از عصاره حاصل سری رقت تهیه شد و از رقت‌های 10^5و10^7 کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت پرگنه‌های رشدکرده در هر تشتک پتری شمارش شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد (Vanneste *et al.* 2004).

محاسبه‌ی رشد طولی ریشه، طول ساقه و وزن خشک و تر گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم مجار تحت تیمار با عوامل کنترل زیستی

در این آزمایش برای پی بردن به میزان احتمالی تأثیر سویه‌های سودوموناس روی رشد گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی، اندازه‌گیری میزان رشد ساقه و ریشه و وزن خشک و تر بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهچه‌ها انجام شد. برای اندازه‌گیری رشد بخش‌های هوایی و زیرزمینی و وزن بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهچه‌های

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) *Pseudomonas fluorescens*، (P13) *Pseudomonas putida* و گیاه شاهد (Ctr) بر کاهش شدت بیماری ناشی از *Botrytis cinerea* (RA) و *Alternaria alternata* روی گیاه گوجه فرنگی ارقام کوئین و مجار

Table 1. Results of variance analysis of the treatment effects (including *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4), *Pseudomonas putida* (P13) and control plants (Ctr)) over the reduce of disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) and *Alternaria alternata* in tomato (Queen and Majar cultivars)

Source of variations	Degree of freedom	Mean of squares			
		A. alternata (Majar cultivar)	*A. alternata* (Queenr cultivar)	*B. cinerea* (Majar cultivar)	*B. cinerea* (Queen cultivar)
treatment	5	3.3**	7.1**	4.7**	6.3**
error	72	0.04	0.08	0.04	0.04
CV (%)	_	4.2	6.4	3.4	4.2

**: calculated F is Significant *p<0.01*

گوجه‌فرنگی، گیاهان ۴ هفته پس از مایه‌زنی با عوامل کنترل زیستی از خاک خارج شده، از محل بالای طوقه بریده شده و بررسی رشد طولی بخش‌های هوایی و زیرزمینی به صورت جداگانه انجام شد.

برای اندازه‌گیری وزن خشک، هر یک از بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهچه‌ها به صورت جداگانه در پاکت‌های کاغذی قرار داده شد. پاکت‌ها پس از ذکر مشخصات لازم برای هر تیمار به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شده، پس از ۲۴ ساعت وزن خشک بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهچه-های گوجه‌فرنگی محاسبه شد. در این آزمایش نیز برای هر تیمار ۱۳ تکرار در نظر گرفته شد.

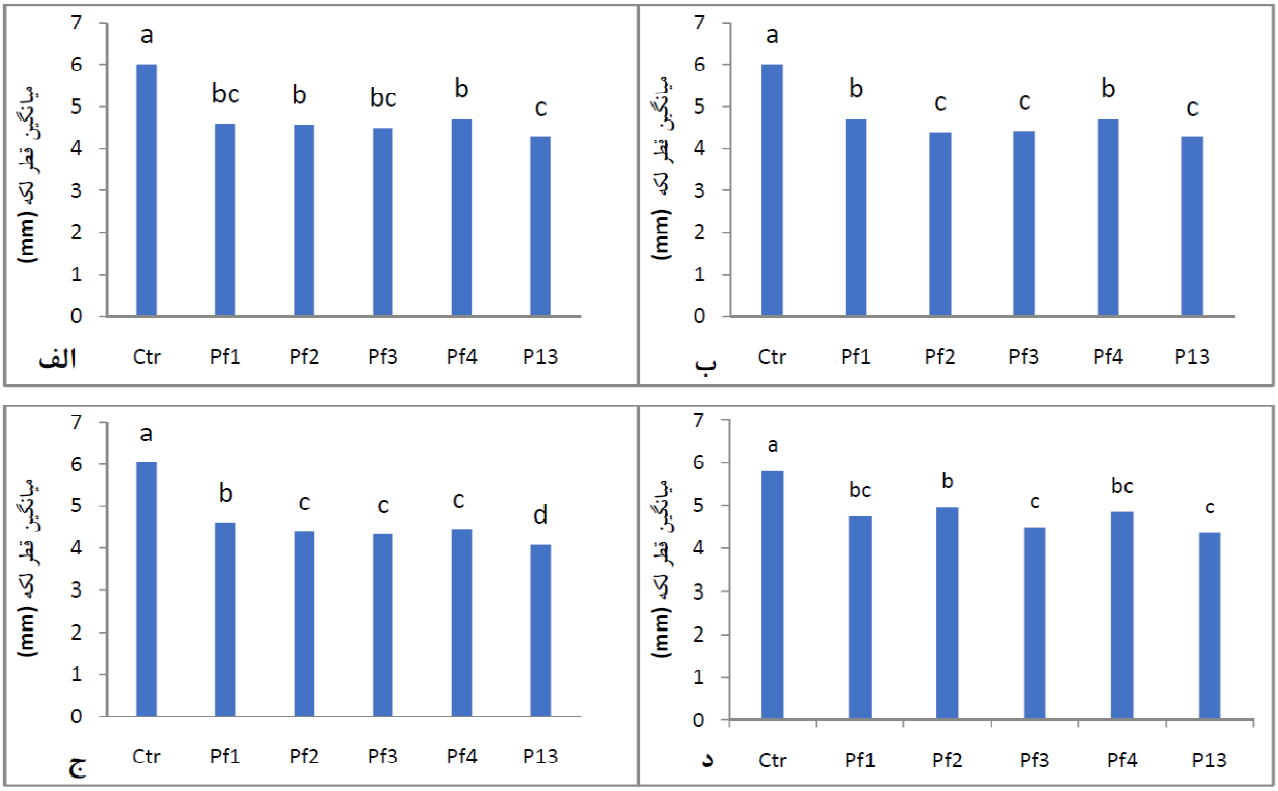
تجزیه و تحلیل آماری

در تمام آزمایش‌های انجام شده جهت آنالیز آماری داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. میانگین تیمارهای به دست آمده با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی دار Fisher´s LSD در سطح ۹۹٪ ($P\leq0.01$) مورد مقایسه آماری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۶ انجام شد.

نتایج

تاثیر سویه‌های Pf1, Pf2, Pf3, Pf4 و P13 بر بیماری لکه برگی ناشی از *B. cinerea* (RA) و *A. alternata* در گیاه گوجه‌فرنگی ارقام مجار و کویین

بررسی میانگین قطر لکه در برگ‌های مایه‌زنی‌شده با بیمارگرهای فوق انجام شد و قطر لکه‌ها برای هر تیمار اندازه‌گیری شد. در رقم مجار، قدرت این سویه‌ها در کنترل بیمارگرها یکسان نبوده و نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمارها تفاوت معنی‌داری روی کنترل بیمارگر داشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین قطر لکه‌ها با آزمون Fisher´s LSD در سطح یک درصد نشان داد که سویه‌های سودوموناس قادر به کاهش بیماری می‌باشند. در این میان طبق نتایج به دست آمده بیشترین کاهش بیماری در مورد هر دو بیمارگر در رقم مجار، در سویه *P. putida* مشاهده می‌شد. این سویه باکتری قادر به کاهش حدود ۳۰٪ بیماری حاصل از هر دو بیمارگر نسبت به گیاه شاهد بود. در مورد بیمارگر *B. cinerea* (RA) علاوه بر سویه P13، سویه‌های Pf1 و Pf3 نیز از قدرت کنترلی خوبی برخوردار بودند. در مقابل، سویه‌ی Pf4 و Pf2 کمترین کاهش بیماری را نسبت به سایر سویه‌ها ایجاد



شکل ۱- اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) و *Pseudomonas putida* (P13) در مقایسه با گیاه شاهد (Ctr) بر الف- بیماری‌زایی سویه *Botrytis cinerea* (RA) ب- بیماری‌زایی سویه *Alternaria alternata* روی گیاه گوجه‌فرنگـی رقم مجار ج- بیماری‌زایی *Botrytis cinerea* (RA) و د- بیماری زایی *Alternaria alternata* بر روی گیاه گوجه‌فرنگی رقم کوئین. لازم به ذکر است که بررسی شدت بیماری با اندازه گیری قطر لکه بر حسب میلی‌متر صورت گرفت.

Figure 1. The effects of the various strains of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) and *Pseudomonas putida* (P13) on a: the disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) and b: *Alternaria alternata* in tomato (Majar cultivar); c: the disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) and d: *Alternaria alternata* in tomato (Queen cultivar). Note: the disease severity was evaluated by spot diameter (mm).

کرد (شکل ۱- الف). در مـورد بیمـارگر *A. alternata* نیـز سویه‌های Pf2, Pf3 علاوه بر سویه‌ی P13 توانایی بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها در کنترل بیماری داشـتند (شـکل ۱- ب). تکرار آزمایش نیز نتایج مشابهی را نشان داد.

مقایسه میانگین قطر لکه‌ها در رقم کوئین نیز نشـان داد، که در این رقم، مشابه رقم مجار بیشـترین کـاهش بیمـاری برای هر دو بیمارگر توسـط سـویه *P. putida* ایجـاد شـده است (شکل ۱). این سـویه بـاکتری قـادر بـه کـاهش ۳۰٪ بیماری نسبت به گیاه شاهد بـود. در بیمـارگر *B. cinerea* (RA) علاوه بـر *P. putida* سـویه Pf2، Pf3 و Pf4 از *P. fluorescens* نیز قادر بـه کـاهش بیمـاری بودنـد. ایـن در حالی است که سویه Pf1 که روی رقم مجار قادر به کنتـرل بیمارگر *B. cinerea* بود، بـر روی رقـم کـوبین از قـدرت کنترل زیستی کمتری بر خوردار بود (شکل ۱- ج).

همچنین، در مورد بیمارگر *A. alternata* میـانگین قطـر لکه‌ها بر روی رقم کوئین در تیمارهای مختلـف نشـان داد که سویه‌ی *P. fluorescens* (Pf3, Pf1, Pf4) نیـز توانـایی بـالایی در کـاهش قطـر لکـه‌هـا نسـبت بـه شـاهد دارد و

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس و اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) و *Pseudomonas putida* (P13) بر میزان کلونیزه شدن ریشه گوجه‌فرنگی ارقام مجار و کوئین

Table 2. Results of variance analysis and the effects of the various strains of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4) and *Pseudomonas putida* (P13) over the tomato root colonization (Majar and Queen cultivars)

The various strains of Pseudomonas	CFU/ml Log	
	Majar cultivar	Queen cultivar
Pf1	8.76 a	8.68 a
Pf2	8.53 d	8.6 a
Pf3	8.6 c	8.63 a
Pf4	8.6 c	8.56 ab
P13	8.66 b	8.65 b
Mean of squares (treatment)	0.01*	0.03**

**: calculated F is Significant *p<0.01*

سویه‌ی Pf2 نسبت به سایر سویه‌ها قدرت کمتری در کاهش بیماری دارد (شکل ۱- د).

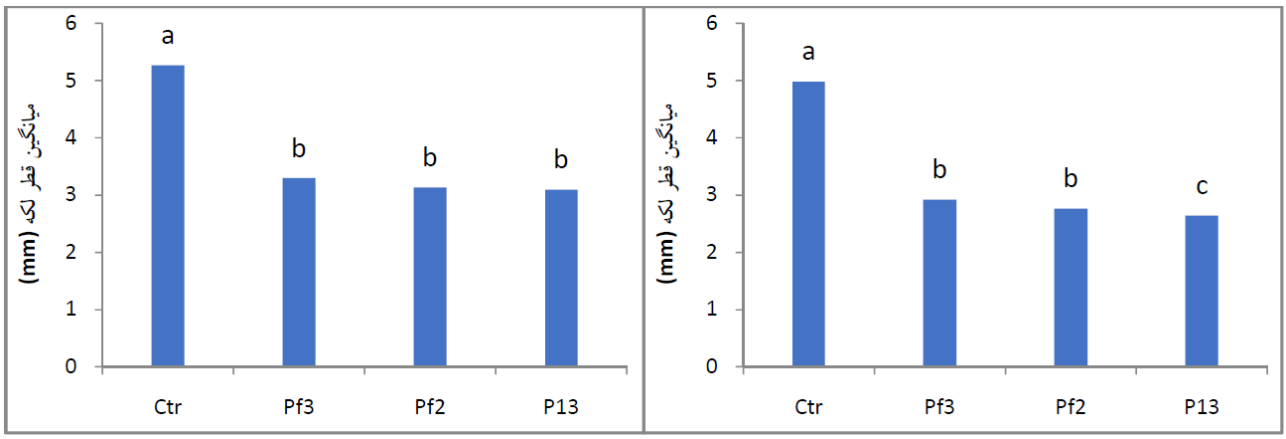
بررسی میزان کلونیزه شدن ریشه گیاه گوجه‌فرنگی ارقام مجار و کویین نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مورد استفاده بود. مقایسه میانگین جمعیت باکتری روی سطح ریشه گیاه نشان داد که این سویه‌ها قادرند جمعیت خود را روی سطح ریشه افزایش دهند. مطابق نتایج به دست آمده *P. fluorescens* (Pf1) نسبت به سایرسویه‌ها توانایی بیشتری در کلونیزه کردن سطح ریشه رقم مجار داشت (جدول ۲). در رقم کویین سویه‌های Pf1, Pf2, Pf3,Pf4 توانایی یکسانی در کلونیزه کردن سطح ریشه داشتند (جدول۲). با توجه به نتایج حاصل از توانایی عوامل کنترل زیستی در کاهش شدت بیماری و میزان کلونیزه شدن ریشه توسط این عوامل، بین میزان کلونیزه شدن ریشه و کاهش شدت بیماری توسط سویه‌های به‌کار برده شده ارتباطی دیده نشد.

از میان چهار سویه *P. fluorescens* سویه‌ی Pf1 بر روی رقم مجار توانایی بیشتری در کنترل بیمارگر *B. cinerea* نسبت به *A. alternata* داشت، در حالی که بر روی رقم کوئین توانایی بیشتری در کنترل بیمارگر *A. alternata* داشت. با توجه به نتایج به دست آمده القای مقاومت توسط این سویه علاوه بر توانایی در کلونیزه کردن ریشه وابسته به عوامل دیگری چون نوع رقم گیاه و نوع بیمارگر می‌باشد. سویه‌ی Pf2 نیز بر روی رقم مجار از توانایی کنترل زیستی خوبی برخوردار بود، اما این سویه بر روی رقم کوئین نسبت به سایر سویه‌ها ضعیف‌تر عمل کرده و کمترین کاهش را در بیماری ناشی از بیمارگر *A. alternata* داشت. سویه Pf3 اثر یکنواخت‌تری در کنترل دو بیمارگر بر روی ارقام گوجه‌فرنگی داشت، به این صورت که روی هر دو رقم کاهش بیماری ناشی از *B. cinerea* حدود ۲۷ درصد و در مورد بیمارگر *A. alternata* حدود ۲۳ درصد بود. سویه‌ی Pf4 نیز توانایی بالاتری در کنترل هر دو بیمارگر بر روی رقم کوئین نسبت به رقم مجار داشت. در حقیقت القای مقاومت توسط این سویه تا حدودی وابسته به رقم گیاه میزبان بود.

اثر مستقیم دو سویه *P. fluorescens* و یک سویه از *P. putida* بر بیماری‌های لکه برگی ناشی از *Botrytis cinerea* (RA) و *Alternaria alternata* در گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار

از بین سویه‌های موجود، با توجه به توانایی بالاتر سویه‌های *P. putida* (P13) و *P. fluorescens* (Pf2, Pf3) در هر دو رقم، توانایی سه سویه فوق در کنترل مستقیم بیماری ناشی از *B. cinerea* (RA) و *A. alternata* در شرایط گلخانه، بر روی رقم مجار سنجیده شد.

بررسی علائم ناشی از این بیمارگر پنج روز پس از مایه‌زنی و با اندازه‌گیری قطر لکه‌ها صورت گرفت. نتایج



شکل ۲- اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf2, Pf3) و *Pseudomonas putida* (P13). بر شدت الف- بیماری‌زایی سویه *Botrytis cinerea* (RA) و ب- بیماری‌زایی سویه *Alternaria alternata* در گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار. لازم به ذکر است که شدت بیماری توسط قطر لکه بر حسب میلی متر ارزیابی شده است.

Figure 2.The effects of the various strains of *Pseudomonas fluorescens* (Pf2, Pf3) and *Pseudomonas putida* (P13) on a: the disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) and b: *Alternaria alternata* in tomato (Majar cultivar. Note: the disease severity was evaluated by spot diameter (mm).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf2, Pf3) و *Pseudomonas putida* (P13). و گیاه کنترل بر کاهش شدت بیماری‌زایی سویه‌های *Botrytis cinerea* (RA) و *Alternaria alternata* روی گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار

Table 3. Results of variance analysis of the treatment effects (including *Pseudomonas fluorescens* (Pf2, Pf3), *Pseudomonas putida* (P13) and control plants (Ctr)) over the reduce of disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) and *Alternaria alternata* in tomato (Majar cultivar)

Source of variations	Degree of freedom	Mean of squares	
		The disease servity	
		A. alternata	*B. cinerea*
Treatment	3	14**	14**
Error	48	0.07	0.07
CV (%)	-	7.2	7.2

**: calculated F is Significant $p<0.01$

نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین توانایی سویه‌های کنترل زیستی به‌کار برده شده بر کاهش شدت بیماری ناشی از بیمارگرهای برگی بود (جدول ۳). میانگین قطر لکه‌های ایجاد شده با آزمون مقایسه میانگین نشان‌دهنده قدرت کنترل زیستی این عوامل نسبت به شاهد بود. در هر دو بیمارگر *B.cinerea* (RA) و *A. alternata*، گیاهان تیمار شده با هر ۳ سویه حداقل ۴۰ درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد نشان دادند. در *B. cinerea* (RA) بیشترین کاهش شدت بیماری مربوط به تیمار *P. putida* بود، که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد (شکل ۲- الف) و در *A.alternata* هر سه تیمار تقریبا اثر یکنواختی در کنترل بیماری داشتند (شکل ۲- ب).

توانایی سویه‌های سودوموناس در کلونیزه کردن برگ گیاه گوجه‌فرنگی نیز بررسی شد. از برگ گیاهان مایه زنی‌شده با سویه‌های سودوموناس پس از گذشت یک هفته سری رقت تهیه شد. نتایج نشان داد، که جمعیت این باکتری‌ها نسبت به جمعیت اولیه تغییر پیدا کرده و افزایش جمعیت در سویه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان می‌داد. مقایسه میانگین جمعیت باکتری روی سطح برگ گیاه با استفاده از آزمون Fisher's LSD در سطح ۹۹ درصد تفاوت معنی داری را بین تیمارهای سودوموناس

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس و اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf2, Pf3) و *Pseudomonas putida* (P13) بر میزان کلونیزه شدن برگ گوجه‌فرنگی رقم مجار.

Table 4. Results of variance analysis and the effects of the various strains of *Pseudomonas fluorescens* (Pf2, Pf3) and *Pseudomonas putida* (P13) over the tomato leaf colonization (Majar cultivar)

the various strains of Pseudomonas	Log CFU/ml
Pf2	9.45 a
Pf3	9.4 b
P13	9.35 b
Mean of squares(treatment)	0.011**

**: calculated F is Significant *p<0.01*

جدول ٥- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf3)، *Pseudomonas putida* (P13) و گیاه شاهد (Ctr) بر کاهش شدت بیماری ناشی از *Botrytis cinerea* (RA) و *Alternaria alternata* در گیاه آرابیدوپسیس

Table 5. Analysis of variance of the treatment effects (including *Pseudomonas fluorescens* (Pf3), *Pseudomonas putida* (P13) and control plants (Ctr)) over the reduce of disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) and *Alternaria alternata* in *Arabidopsis taliana*

Source of variations	Degree of freedom	Mean of squares	
		The disease severity	
		A. alternata	*B. cinerea*
Treatment	2	10*	9.1**
Error	36	0.07	0.06
CV (%)	-	6.5	6.0

**: calculated F is Significant *p<0.01*

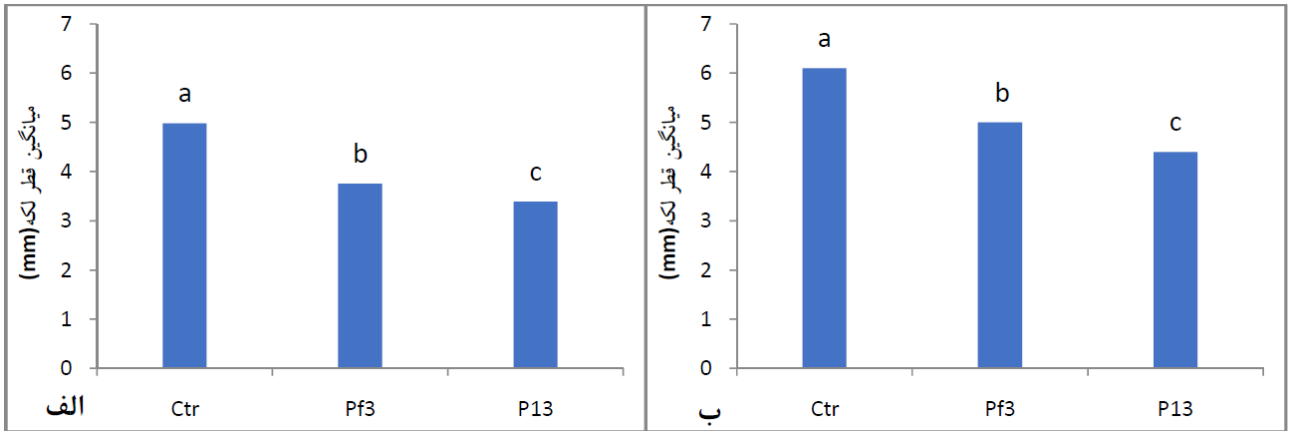
نشان می‌داد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این سویه‌ها قادرند سطح برگ گیاه را کلونیزه کنند (جدول ۴)

نتایج نشان داد که هر سه سویه باکتری قادر به کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط *B. cinerea* و *A. alternata* می‌باشند. در میان این سه تیمار، باکتری *P. putida* بیشترین کاهش را در شدت بیماری ایجاد می‌کند. میزان کاهش بیماری در این تیمار حدود ۴۵ درصد نسبت به کنترل می‌باشد. با توجه به این که محل مایه‌زنی بیمارگر و عامل کنترل زیستی هر دو روی برگ بود و باکتری قادر به کلونیزه کردن سطح برگ بود، ممکن است باکتری با استفاده از مکانیسم‌هایی چون تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مانند 2,4 diacetylphloroglucinal (DAPG)، تولید کلات کننده‌های آهن، رقابت با بیمارگر برای تامین غذا و مکان و تولید آنزیم‌های مختلف روی بیمارگر تاثیر گذاشته و باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط عوامل بیماری‌زا شده باشد (Iavicoli *et al.* 2003, Bakker *et al.* 2007).

تاثیر *P. fluorescens* (Pf3) و *P. putida* (P13) بر بیماری‌های لکه برگی ناشی از *Botrytis cinerea* (RA) و *Alternaria alternata* در گیاه آرابیدوپسیس

باتوجه به توانایی بالاتر سویه‌های *P. putida* (P13) و *P. fluorescens* (Pf3) در کنترل مستقیم و غیرمستقیم بیماری ناشی از *B. cinerea* (RA) و *A. alternata* توانایی این دو عامل در القای مقاومت در گیاه آرابیدوپسیس سنجیده شد. در این آزمون از سیستم هیدروپونیک استفاده شد که این سیستم دارای متغیرهای کمتری نسبت به سیستم خاک می‌باشد و تعامل بین ریشه گیاه و سوسپانسون اسپور به صورت یکنواخت‌تر صورت می‌گیرد. نتایج نشان داد سویه‌های به کار برده شده تفاوت معنی‌داری در کاهش شدت بیماری بر روی گیاه آرابیدوپسیس دارند (جدول ۵).

در گیاه آرابیدوپسیس مقایسه میانگین قطر لکه ناشی از *B. cinerea* و *A. alternata* در سطح یک درصد با آزمون Fisher´s LSD معنی دار بود. بررسی میانگین قطر لکه‌ها نشان داد قطر لکه‌ها در تیمارهای *P. fluorescens* (Pf3) و *P. putida* (P13) کمتر از قطر لکه‌ها در گیاهان شاهد بود (شکل ۳). کاهش قطر لکه‌ها نشان دهنده توانایی این



شکل ۳- اثر (Pf3) *Pseudomonas fluorescens* و (P13) *Pseudomonas putida*. بر شدت بیماری‌زایی سویه *Botrytis cinerea* (RA) (الف) و سویه *Alternaria alternata* (ب) در گیاه آرابیدوپسیس. لازم به ذکر است که شدت بیماری بوسیله‌ی اندازه گیری قطر لکه بر حسب میلی‌متر ارزیابی شده است.

Figure 3. The effects of *Pseudomonas fluorescens* (Pf3) and *Pseudomonas putida* (P13) on the disease severity caused by *Botrytis cinerea* (RA) (a) and *Alternaria alternata* (b) in *Arabidopsis taliana*. Note: the disease severity was evaluated by spot diameter (mm).

جدول ٦- نتایج تجزیه واریانس و اثر *Pseudomonas fluorescens* (Pf3) و *Pseudomonas putida* (P13) بر میزان کلونیزه شدن ریشه آرابیدوپسیس

Table 6. Results of variance analysis and the effects of *Pseudomonas fluorescens* (Pf3) and *Pseudomonas putida* (P13) over the Arabidopsis root colonization

the various strains of Pseudomonas	Log CFU/ml
Pf3	8.66*
P13	8.6
Mean of squares(treatment)	0.011**

**: calculated F is Significant $p<0.01$

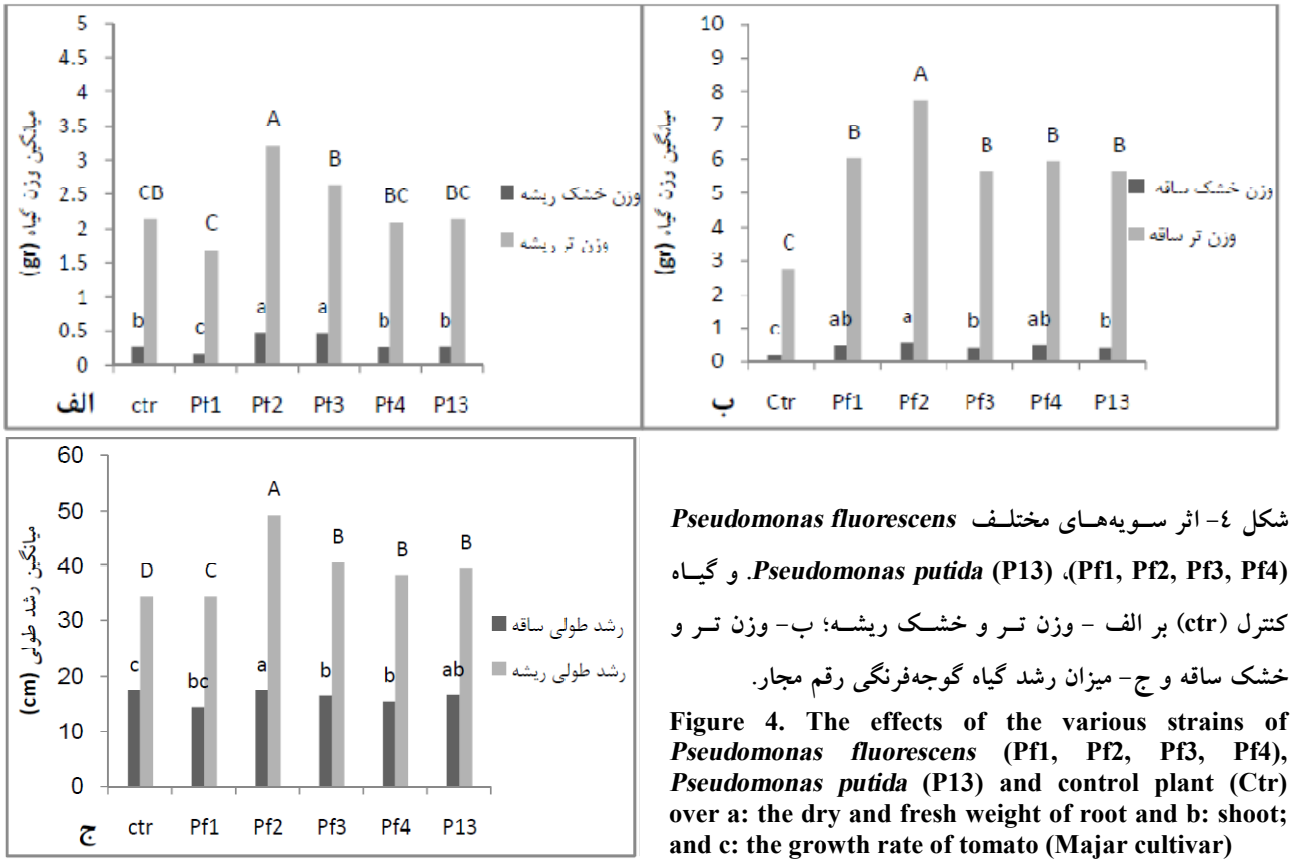
عوامل در کاهش خسارت حاصل از این بیماری‌ها می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این قسمت با نتایج قسمت‌های قبل همخوانی داشت. این نتایج نشان می‌دهد که سویه‌های *P. fluorescens* (Pf3) و *P. putida* (P13) با القا مقاومت در گیاه قادر به کاهش خسارت بیماری‌های برگی ناشی از *B.cinerea* و *A. alternata* می‌باشند.

بررسی میزان کلونیزه شدن ریشه گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که سویه‌های سودوموناس قادرند سطح ریشه این گیاه را کلونیزه کنند. افزایش جمعیت نهایی سویه‌ها پس از گذشت ۴ هفته از مایه‌زنی گیاه، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین سویه‌های به‌کار برده شده می‌باشد. مقایسه میانگین جمعیت باکتری روی سطح ریشه گیاه در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای سودوموناس نشان می‌داد (جدول ۶).

بررسی شاخص‌های افزایش رشد در گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار در حضور سویه‌های Pf1, Pf2, Pf3, Pf4 و P13

برای تعیین رشد رویشی بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار، گیاهان در سن چهار هفتگی خارج و میزان وزن تر و خشک ساقه و ریشه به صورت مجزا اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این بررسی تفاوت معنی‌داری را بین تیمارهای به‌کار برده شده نشان می‌داد (جدول ۷).

بررسی چهار سویه باکتری *P. fluorescens* و یک سویه *P. putida* بر میزان رشد گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار نشان داد، که تیمار گیاه با این باکتری‌ها باعث افزایش رشد



شکل ٤- اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4)، *Pseudomonas putida* (P13). و گیاه کنترل (ctr) بر الف - وزن تر و خشک ریشه؛ ب- وزن تر و خشک ساقه و ج- میزان رشد گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار.

Figure 4. The effects of the various strains of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4), *Pseudomonas putida* (P13) and control plant (Ctr) over a: the dry and fresh weight of root and b: shoot; and c: the growth rate of tomato (Majar cultivar)

جدول۷- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4)، *Pseudomonas putida* (P13). و گیاه کنترل (ctr) بر وزن تر، وزن خشک، رشد ساقه و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی رقم مجار

Table 7. Analysis of variance of the treatment effects (including *Pseudomonas fluorescens* (Pf1, Pf2, Pf3, Pf4), *Pseudomonas putida* (P13) and control plant (ctr)) weight, fresh weight, the shoot and root growth the shoot and root of tomato (Majar cultivar)

Sources of variations	Degree of freedom	Mean of squares					
		Fresh weight of roots	Dry weight of roots	Fresh weight of shoot	Dry weight of shoot	Root growth	Shoot growth
Treatment	5	3.4**	0.14**	22**	0.14**	786**	1491**
Error	72	0.14	0.002	0.69	0.006	4.0	9.6
CV (%)	-	17	14	15	18	8.6	10

**: calculated F is Significant $p<0.01$

گیاه نسبت به گیاهان کنترل می‌شود. این باکتری‌ها می‌توانند باعث افزایش رشد ساقه و ریشه گیاه شوند. بیشترین افزایش رشد در سویه‌ی Pf2 مشاهده شد که باعث رشد شاخه‌های جانبی گیاه شد و کمترین میزان افزایش رشد مربوط به تیمار Pf1 بود (شکل ۴).

بحث

در این تحقیق توانایی چهار سویه *P. fluorescens* و یک سویه *P. putida* روی بیمارگر *B. cinerea* و *A. alternata* بررسی شد. نتایج نشان داد که در صورت کاربرد سویه‌های باکتریایی روی ریشه، گیاه قادر است

نسبت به حمله بیمارگر پاسخ‌های دفاعی قوی‌تری داشته باشد. با توجه به نتایج حاصل، این سویه‌ها قادر به فعال سازی واکنش‌های دفاعی میزبان می‌باشند. مقایسه شدت بیماری‌زایی روی گیاهان شاهد و تیمارهای سودوموناس نشان دهنده این موضوع می‌باشد. بیشترین کاهش شدت بیماری روی رقم مجار و کوبین در تیمار با *P. putida* دیده شد. کاهش بیماری توسط این سویه روی رقم مجار حدود ۲۸ و در رقم کوئین حدود ۳۰ درصد بود، که با نتایج مزیانی و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد. در تحقیق مزیانی و همکاران (۲۰۰۵) اثرات مشتقات باکتریایی نیز در تعیین مسیر مقاومت ایجاد شده در گیاه بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که آهن‌بر سودوباکتین تولید شده توسط باکتری و همچنین، LPS های باکتریایی در مقاومت القا شده توسط این سویه باکتریایی موثر می‌باشند (Meziane *et al.* 2005). این عامل کنترل‌زیستی روی هر دو رقم گوجه‌فرنگی اثر تقریبا یکسانی در کنترل بیماری *B. cinerea* و *A. alternata* داشت که این نشان می‌دهد، مقاومت ایجاد شده در گیاه گوجه‌فرنگی توسط این سویه باکتریایی وابسته به رقم نمی‌باشد و روی ارقام مختلف اثر یکسانی دیده می‌شود.

با توجه به اثر یکنواخت‌تر سویه‌های Pf3 و P13 در کنترل مستقیم و غیرمستقیم بیمارگر، توانایی این دو سویه در کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط پاتوژن‌های برگی *B. cinerea* و *A. alternata* به صورت مجزا بر روی گیاه مدل آرابیدوپسیس سنجیده شد. بررسی میانگین قطر لکه‌ها نشان داد که قطر لکه‌ها در تیمارهای *P. fluorescens* (Pf3) و *P. putida* (P13) کمتر ازقطر لکه‌ها در گیاهان شاهد بود. بنابراین نتایج به دست آمده در این قسمت با نتایج حاصل از آزمون‌های انجام شده روی ارقام گوجه‌فرنگی همخوانی داشت و از نتایج حاصل شده می‌توان نتیجه گرفت، که این سویه‌ها قادر به کاهش شدت بیماری در گیاه می‌باشند.

گیاهانی که ریشه آنها با چهار سویه *P. fluorescens* و یک سویه *P. putida* کلونیزه شده بود، نسبت به گیاه شاهد افزایش رشد نشان دادند. اما بین نتایج حاصل از کلونیزه شدن ریشه گیاه و میزان رشد ارتباطی وجود ندارد. به طور مثال Pf1 دارای بیشترین توانایی در کلونیزه شدن ریشه گیاه می‌باشد، اما نسبت به سایر سویه‌ها توانایی کمتری در تغییر در رشد گیاه نسبت به شاهد دارد. کاهش رشد ایجاد شده توسط Pf1 در گیاه را می‌توان به فعال شدن مسیرهای دفاعی چون جاسمونیک اسید در گیاه نسبت داد. زیرا فعال نمودن واکنش‌های دفاعی به‌وسیله کاربرد عوامل بیولوژیک گاهی دارایی هزینه‌هایی برای گیاه مانند تاثیر روی رشد گیاه یا تولید میوه گیاه است (Conrath & Gollner 2008). در این مورد می‌توان به بیان ژن‌های دفاعی چون PR genes اشاره نمود که گاها فنوتیپ کوتولگی همراه با بیان این ژن‌ها دیده شده است (Heidel *et al.* 2004). مشاهدات نشان داده است که کوتولگی حالتی از هزینه‌های دفاعی جاسمونیک اسید نیز می‌باشد (Conrath *et al.* 2006). همچنین، توانایی این سویه در کاهش شدت بیماری ایجاد شده روی ارقام گوجه فرنگی نسبت به سویه‌های Pf3 و P13 کمتر است، که می‌توان علت این امر را احتمالا به توانایی کم این سویه در تولید ترکیباتی چون آهن‌بر و آنتی‌بیوتیک و غیره دانست. زیرا طبق تحقیقات انجام شده این ترکیبات نقش مهمی در کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط عامل کنترل زیستی در گیاه دارند (Iavicoli *et al.* 2003, Bakker *et al.* 2007). بیشترین افزایش رشد در سویه‌ی Pf2 دیده شد. که این افزایش رشد ممکن است در اثر تغییر در هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند ایندول استیک اسید (IAA) باشد. افزایش غلظت این هورمون در

گیاه محرک افزایش رشد طولی ریشه و شاخه‌های گیاه می‌باشد (Gravel *et al.* 2007). همچنین، این باکتری‌ها می‌توانند با تثبیت ازت، حل کردن مواد غذایی مثل فسفر، تنظیم تولید اتیلن، رهاسازی هورمون‌های گیاهی و کاهش سمیت مواد آهنی تاثیر قابل توجه روی رشد گیاه داشته باشند (Van loon 2007). این سویه علاوه بر توانایی بالا در افزایش رشد گیاه قادر به کلونیزه کردن بالای ریشه گیاه گوجه‌فرنگی نیز بود. اما اثر کنترل‌زیستی این سویه روی ارقام گوجه فرنگی متفاوت و روی رقم کوئین از توانایی کمتری در کاهش شدت بیماری نسبت به رقم مجار برخوردار بود. سویه‌های Pf3 و Pf4 توانایی یکسانی در کلونیزه کردن ریشه گیاه گوجه‌فرنگی داشتند. اما توانایی سویه Pf3 در کاهش شدت بیماری ایجاد شده توسط بیمارگرهای برگی بیشتر بود و بر روی ارقام گوجه فرنگی اثر یکنواخت‌تری داشت. سویه P13 نیز دارای توانایی بالایی در تغییر در رشد گیاه بود، بطوری که بعد از Pf2 بیشترین افزایش رشد ایجاد شده در تیمار P13 مشاهده شد. همچنین، این سویه نسبت سایر سویه‌ها از توانایی بیشتری در کاهش شدت بیماری برخوردار بود.

در نهایت سویه‌های (Pf3) *P. fluorescens* و *P. putida* (P13) به علت توانایی بالاتر و یکنواخت‌تر در کنترل بیمارگرهای مختلف و القای مقاومت در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی و آرابیدوپسیس به عنوان سویه‌های قوی‌تر معرفی شدند. این سویه‌ها علاوه بر القای مقاومت در گیاه توانایی افزایش رشد گیاه را نیز داشتند.

منابع

Achuo E.A., Audenaert K., Meziane, H. and Höfte M. 2004. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. Plant Pathology 53: 65–72.

Audenaert K., De Meyer G. and Höfte M. 2002a. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. Plant Physiology 128: 491-501.

Audenaert K., Pattery T., Cornelis P. and Hofte M. 2002b. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. Molecular Plant-Microbe Interaction 15: 1147–1156.

Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J. and Loon L.C.V. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent Pseudomonas spp. Phytopathology 97: 239–243.

Barnett H.L. and Hunter B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed., APS Press, Saint Paul., Minnesota., USA.

Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., Garcı´a-Agustı´n P., Jakab G., Mauch F., Newman M.A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L. and Mauch-Mani B. 2006. Priming: Getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interaction 19: 1062–1071.

Conrath U. and Gollner K. 2008. Priming: it's all the world to induced disease resistance. European Journal of Plant Pathology 121: 233–242.

Dimkpa C., Weinand T. and Asch F. 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant Cell Environment 32: 1682–1694.

Egamberdieva D., Lindstrom L. and La K. 2015. A synergistic interaction between salt-tolerant Pseudomonas and Mesorhizobium strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) under salt stress. Applied Microbiology and Biotechnology 100: 2829–2841.

El Oirdi M., El Rahman T.A., Rigano L., El Hadrami A., Rodriguez M.C., Daayf F., Vojnov A. and Bouarab K. 2011. Botrytis cinerea manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. Plant Cell 23: 2405–2421.

Glick B.R. 2015. Biocontrol mechanisms. In: Glick BR (ed) Beneficial plant-bacterial interactions. Springer, Heidelberg. pp 123–157.

Gravel V, Antoun H. and Tweddell R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yields improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole-acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry 39: 1968-1977.

Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. 2004. Trichoderma speciesopportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2: 43–56.

Heidel A.J., Clarke J.D., Antonovics J. and Dong X. 2004. Fitness costs of mutations affecting the systemic acquired resistance pathway in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 168: 2197–2206.

Iavicoli A., Boutet E., Buchala A. and Métraux J.P. 2003. Induced systemic resistance in Arabidopsis thaliana in response to root inoculation with Pseudomonas fluorescens CHA0. Molecular Plant-Microbe Interaction 16: 851–858.

Islam S., Akanda A.M., Prova A., Islam M.T. and Hossain M. 2015. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. Frontiers Microbiology 6: 1360.

Jha Y. and Subramanian R. 2014. PGPR regulate caspase-like activity, programmed cell death, and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. Physiology and Molecular Biology of Plants 20: 201–207.

Kamilova F., Lamers G. and Lugtenberg B. 2008. Biocontrol strain Pseudomonas fluorescens WCS365 inhibits germination of Fusarium oxysporum spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. Environment Microbiology 10: 2455–2461.

Kerepesi I. and Galiba G. 2000. Osmotic and salt-stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. Crop Science 40: 482-487.

Majeed A., Abbasi M.K., Hameed S., Imran A. and Rahim N. 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. Frontiers Microbiology 6: 198.

Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M. and Bakker P.A.H.M. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Molecular Plant Pathology 6: 177-185.

Narayanan P., Parthasarathy S., Rajalakshmi J., Arunkumar K. and Vanitha S. 2016. Systemic elicitation of defense related enzymes suppressing *Fusarium* wilt in mulberry (*Morus* spp.). African Journal of Microbiology Research 10: 813-819.

Pieterse C.M.J., Van Wees S.C.M., Hoffland E., Van Pelt J.A. and 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.

Pieterse C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C.M. and Bakker P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annual Review of Phytopathology 52: 347–375.

Planchamp C., Glauser G. and Mauch-Mani B. 2014. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. Frontiers Plant Science 5: 719.

Pozo M.J. and Azcon-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. Current Opinion in Plant Biology 10: 393–398.

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W. and Paré P.W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiology 134: 1017-1026.

Mirzaei S., Goltapeh E.M. and Shams-bakhsh M. 2007. Taxonomical studies on the genus Botrytis in Iran. Journal Agriculture Technology 3: 65-76.

Sarikhani M.R., Malboobi M.A., Aliasgharzad N., Greiner R. and Yakhchali B. 2010. Functional screening of phosphatase-encoding genes from bacterial sources. Iranian Journal of Biotechnology 8(4): 275-279.

Schaad N.W., Jones J.B. and Chum W. 2001. Laboratory guide for identfication of plant pathogenic bacteria. APS Press. 373 p.

Simmons E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, view point, challenge. In *Alternaria* Biology, Plant Diseases and Metabolites (Schakowsky J. and Visconti A. eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

Ton J., Van Pelt J.A., Van Loon L.C. and 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.

Van der Ent S., Van Wees S.C.M. and Pieterse C.M.J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry 70: 1581–1588.

Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. and Pieterse C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36: 453–483.

Van Loon L.C. and Bakker P.A.H.M. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization. pp 39–66.

Van Loon L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119: 243–254.

Van Wees S.C.M., Pieterse C.M.J., Trijssenaar A., Westende Y.A.M., Hartog F. and Van Loon L.C. 1997. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. Molecular Plant-Microbe Interaction 10: 716–724.

Van Wees S.C.M., Van der Ent S. and Pieterse C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Current Opinion in Plant Biology 11: 443–448.

Vanneste J.L., Cornish D.A., Spinelli F. and Yu J. 2004. Colonisation of apple and pear leaves by different strains of biological control agents of fire blight. Journal of the New Zealand Plant Protection 57: 49–53.

Verhagen B.W.M., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Hofte M. and Aziz A. 2010. Pseudomonas spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defense responses in grapevine. Journal of Experimental Botany 61: 249–260.

Verhagen B., Trotel-Aziz P., Jeandet P., Baillieul F. and Aziz A. 2011. Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. Phytopathology 101(7):768–777.

Walker T.S., Bais H.P., Halligan K.M., Stermitz F.R. and Vivanco J.R. 2003. Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2548–2554.

Walters D.R., Ratsep J. and Havis N.D. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for thefuture. Journal of Experimental Botany 64: 1263-1280.

Zahid M., Abbasi M.K., Hameed S. and Rahim N. 2015. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). Frontiers Microbiology 6: 207.

Zhang H., Xie X., Kim M.S., Kornyeyev D.A., Holaday S. and Paré P.W. 2008. Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. Plant Journal 56: 264–273.