نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، ص. ۴۱۶-۴۰۷

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 4, Winter 2014, P. 407-416

ردیابی ژن *phID* در سودوموناس های فلورسنت فراریشه نخود و رابطه آن با کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی نخود با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*

زهرا ابراهیمی کاظم آباد[1*]- حمید روحانی[2]- فاطمه جمالی[3]- عصمت مهدیخانی مقدم[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۲۷

چکیده

پژمردگی فوزاریومی نخود با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* یکی از مهمترین بیماری های این گیاه در ایران به شمار می رود. به منظور کنترل بیولوژیکی این بیماری، سودوموناس های فلورسنت از فرا ریشه نخود در استان خراسان با استفاده از محیط کشت کینگ ب (KB) جداسازی و شمارش شدند. فعالیت ضد قارچی۸۰ استرین باکتریایی علیه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *Ciceris*(Foc) در دو محیط کینگ ب (KB) و سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) بررسی شد. نتایج نشان داد که از بین ۸۰ استرین مورد بررسی، ۸۱/۲۵ درصد استرینها در محیط KB و ۹۴/۳۷ درصد در محیط PDA دارای توانایی بازدارندگی از رشد قارچ بودند. بین تولید متابولیت های ضدقارچی با کاهش بیماری رابطه معنی داری مشاهده شد. این رابطه در مورد سیدروفورهای استرین ها دیده نشد. ردیابی *phlD*، ژن کلیدی در بیوسنتز آنتی بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG) در استرینهای باکتریایی توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی B2BF/BPR4 صورت گرفت. نتایج نشان داد که ۲۰جدایه دارای ژن *phlD* بوده و قطعه ای به اندازه ۶۲۹ bp در این جدایه ها تکثیر گردید. درآزمایش های گلخانه ای، جدایه T26 بهترین اثر را بر وزن تر ریشه و جدایه های T90 و M2-15 بهترین اثر را بر وزن تر بخش های هوایی نشان دادند. در بین استرین های مورد بررسی جدایه M2-15بطور معنی داری بیشترین کاهش را در شدت بیماری نسبت به سایر جدایه ها موجب گردید.

واژه های کلیدی: نخود، پژمردگی فوزاریومی، کنترل بیولوژیک، آنتی بیوتیک۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول، سودوموناس فلورسنس

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.)، گیاهی است یکساله، خودگشن و دیپلوئید که از نظر اهمیت در میان بقولات رتبه سوم دنیا و جایگاه نخست در آسیا و شمال آفریقا را به خود اختصاص داده است. پژمردگی آوندی نخودکه توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* ایجاد می شود مهمترین بیماری خاک زاد این گیاه بشمار می رود. این قارچ نخستین بار توسط پدویک[5] در سال ۱۹۴۰ توصیف گردید و از آن به بعد از چندین کشور گزارش شده است. کاهش عملکرد سالیانه نخود در اثر این بیماری بین ۱۰تا ۱۵درصد گزارش شده است، ولی بیماری می تواند در شرایط طغیان کل محصول را از بین ببرد (۲۵). این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۴۲، توسط منوچهری ومصری از برخی مناطق نخود کاری گزارش شد وخسارت آن تا ۲۲ درصد در بعضی مناطق برآورد شد (۱ و ۲).

به دلیل خاک زاد بودن این بیمارگر، استفاده از قارچ کش ها چندان علیه آن موفقیت آمیز نبوده است. مقاومت میزبانی هم به اندازه ای نیست که بتواند به نحو معنی داری باعث کاهش بیماری شود (۹). بدین جهت در سالهای اخیر استفاده از روش های بیولوژیکی، به ویژه استفاده از سودوموناس های فلورسنت برای مبارزه با بیماری های خاکزاد بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری ها از موفق ترین کلنیزه کنندگان ریشه های جوان می باشند، یعنی همان بخش هایی که بیمارگر غالبا برای ورود خود به داخل بافت ریشه از آنها استفاده می کند (۳ و ۳۰). هرواس و همکاران (۱۳) باکتری های *Bacillus* و *Pseudomonas* را به عنوان عامل بیوکنترل پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی معرفی کرده واظهار داشتند که کاربرد ریزوباکتریها در مبارزه تلفیقی به همراه ارقام زراعی مقاوم و تنظیم تاریخ کاشت می تواند در مدیریت بیماری موثر باشد. کائورو

۲،۱ و ۴- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: ebrahimi.zahra20@gmail.com)
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوشهر

5- Padwick

همکاران (۱۶) نیز نشان دادند که جدایه های سودوموناس فلورسنت، در شرایط گلخانه و مزرعه در مقایسه با تیمار شاهد، به طور معنی داری باعث افزایش جوانه زنی بذر، کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی و بهبود رشد گیاه نخود شدند.

سودوموناس های فلورسنت از مهمترین اعضای تشکیل دهنده میکروفلور فراریشه گیاهان به شمار می روند و به دلیل رشد سریع، آسان بودن کشت و سازش پذیری متابولیکی[1] مورد توجه محققان مبارزه بیولوژیک قرار گرفته اند. با توجه به اطلاعات نسبی زیادی که در مورد ژنتیک سودوموناس های فلورسنت در دست است امکان تهیه موتانت ها و استرین های جدید از طریق همسانه سازی و مهندسی ژنتیک برای مصارف مختلف وجود دارد (۳۷). سودوموناس ها با استفاده از مکانیسم های متعددی مثل تولید سیدروفور (۲۷)، سیانید هیدروژن (۲۸)، ترشح آنزیم های خارج سلولی مانند کیتیناز، بتا ۱و۳- گلوکاناز (۲۴)، پروتئاز و لیپاز (۱۸)، رقابت برای مواد غذایی و اشغال جایگاه های میکروبی در منطقه فراریشه، القای مقاومت سیستمیک در گیاهان و از همه مهمتر تولید آنتی‌بیوتیک های متعدد (۲۹)، قادر به کنترل عوامل بیماری زای قارچی و تحریک مقاومت گیاه در برابر بیمارگر ها می باشند (۱۲ و ۳۴). توماشو و ولر (Thomashow and Weller,1996) تاکید بیشتری بر نقش آنتی بیوتیک های مترشحه بوسیله سودوموناس های فلورسنت دارند. در بیشتر سیستم های بیوکنترل یک یا چند آنتی بیوتیک در ممانعت از بیماری دخالت دارند. از جمله مهمترین این آنتی بیوتیکها، فلوروگلوسینول ها هستند. این آنتی بیوتیک ها جزء متابولیت های ثانویه فنلی در گیاهان، جلبک ها و باکتری ها بشمار می روند و دارای فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، کرم کشی، تنظیم کنندگی رشد و در مواردی ایجاد گیاهسوزی در گیاهان می باشند (۲۳ و ۳۹). آنتی بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلورو گلوسینول (DAPG) یکی از مهمترین فلوروگلوسینول ها به شمار می رود که در ترشحات خارج سلولی غالب سودوموناس های فلورسنت دیده می شود و نقش کلیدی در بیوکنترل عوامل بیماری زا ایفا می کند. این آنتی بیوتیک در کنترل قارچ ها، باکتری ها و نماتدها موثر می باشد. بعلاوه این متابولیت همانند ۲و۴- دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) دارای فعالیت علف کشی نیز می باشد (۲۰، ۲۲ و ۲۳). شواهد متعددی مبنی بر اهمیت تولید DAPG در کنترل بیولوژیک بیماری های گیاهی وجود دارد. در برخی موارد بوجود آمدن موتاسیون در مسیر بیوسنتز DAPG منجر به کاهش فعالیت بیوکنترلی آنها می شود. در مجموع ثابت شده که بین جمعیت سودوموناس های فلورسنت تولید کننده DAPG در فراریشه و کاهش بیماری های مختلف ریشه همبستگی مثبتی وجود دارد. مضاف بر اینکه در گونه‌های سودوموناس تولیدکننده DAPG دو نوع فعالیت شامل افزایش رشد گیاه و جلوگیری از بیماری های ریشه قابل تفکیک می باشد (۹).

این تحقیق به منظور ردیابی ژن آنتی بیوتیک DAPG در جدایه های *P. fluorescens* جداسازی شده از فراریشه نخود ایرانی و بررسی رابطه آنتاگونیستی این جدایه ها در بیوکنترل پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی صورت گرفت.

مواد و روش ها

نمونه برداری از مزارع نخود

در اواخرخرداد و نیمه اول تیر ماه سال ۱۳۸۸، از مزارع نخود درخراسان رضوی و شمالی بازدید به عمل آمد و به صورت تصادفی در طول و عرض مزرعه حرکت کرده و نمونه های نخود همراه با خاک اطراف ریشه درون کیسه نایلونی قرار داده شد و برای جداسازی و شناسایی بعدی باکتری ها در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

جداسازی و شناسائی سودوموناس های فلورسنت

جداسازی سودوموناس های فلورسنت با استفاده از محیط افتراقیKB صورت پذیرفت. ریشه های نخود و خاک اطراف آن (۳-۲ میلیمتری منطقه ریزوسفر) به قطعات کوچک تقسیم شد و ۱۰ گرم از آن توزین گردید و درون ۹۰ میلی لیتر آب پپتون سترون ۱درصد ریخته شد. ارلن حاوی ریشه ها روی شیکر به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس از هر نمونه سری رقت تهیه گردید. ۱۰۰میکرولیتر از هررقت به محیط KB منتقل و با لوپ سترون پخش گردید (۱۰). جهت شناسایی سودوموناس های فلورسنت از کلید شناسایی جکس (Jacques,1994) و بوسیس (Bosiss,1995) به ترتیب آزمون رنگدانه فلورسنت،آزمون گرم، آزمون آرژنین، آزمون اکسیداز، آزمون فوق حساسیت به توتون و آزمون متابولیسم اکسیداتیو (O/F)، آزمون قند تری هالوز، آزمون لوان، آزمون نیترات، آزمون قند آرابینوز و آزمون قند تارتارات انجام گرفت.

ردیابی جدایه های باکتریایی واجد ژن *phlD* (ژن کلیدی در بیوسنتز آنتی بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول)

به منظور شناسایی جدایه های باکتریایی تولید کننده آنتی بیوتیک 2,4-diacetylphloroglocinol (DAPG) ژن *phlD* به عنوان ژن کلیدی در مسیر سنتز این آنتی بیوتیک با استفاده از آغازگرهای

1- phase variation

B2BF(5-ACC CAC CGC AGC ATC GTT) و BPR4(5- CCG CCG GTA TGG TAT GAG C-3 (AAG ATG GAA AAA GTC) (ساخت شرکت تکاپو زیست) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹). این آغازگرها بر اساس توالی ژن *phlD* باکتری *P. fluorescens* Q2-87 (کد دسترسی بانک ژنU41818) طراحی شده اند، قطعه ای از DNA را بطول ۶۲۹ جفت باز تکثیر می کنند (۲۱ و ۲۲).

استخراج DNA، بر اساس روش رامت و همکاران (۳۰) با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای انجام واکنش PCR از کیت آماده شرکت (Bioner Corea) استفاده گردید. ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR، شامل ۰/۲۵ میکرولیتر Taq DNA Polymeras، ۲۵۰میکرومول DNTPs، ۱/۵ میکرو مول $MgCl_2$، ۱۰ میلی مولار Tris- Hcl (pH=9)، ۳۰ میلی مولار KCl، یک میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰پیکو مول) و ۱ میکرولیتر از DNA باکتری بود. عمل تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل TPersonal(ساخت شرکت Biometra آلمان) انجام گرفت. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه ^0C ۹۵ به مدت ۱۸۰ ثانیه و سپس یک برنامه ۳۵ چرخه ای با هر چرخه شامل ۶۰ ثانیه در^0C ۹۴؛ ۳۰ ثانیه در ^0C ۵۴؛ ۳۰ ثانیه در ^0C ۷۲؛ و در پایان یک چرخه ^0C ۷۲ برای ۵ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در ۷۵ ولت به مدت یک ساعت و ۲۰ دقیقه الکتروفورز شده و نتایج با استفاده از Gel- Documentation مدل Gene flash UK (ساخت شرکت Syngene انگلستان) بررسی گردید. دو جدایه Pf5 به عنوان شاهد مثبت و موتانت Gac جدایه CHA0 به عنوان شاهد منفی انتخاب گردید.

آزمون کشت متقابل

برای این آزمایش از روش کیل و همکاران (۱۷) استفاده شد به این ترتیب که باکتریها بصورت نقطه ای روی دو محیط کشت KB و PDA به فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک کشت داده شد و یک روز بعد از آن قطعه ای از محیط کشت حاوی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در وسط تشتک پتری قرار گرفت. برای هر تیمار سه تکرار بکار رفت. پتری ها بمدت ۴ تا ۶ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله کلنی باکتری تا میسلیوم قارچ اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل هر ۱۹ تیمار در سه تکرار انجام گردید، داده های بدست آمده از آزمایش مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱درصد انجام گردید.

بررسی متابولیت های قابل نفوذ در آگار (تولید آنتی بیوتیک)

این آزمون براساس روش کراوس و لوپر (۱۹) انجام گرفت. سوسپانسیون باکتری از کشت تازه هر یک از جدایه های باکتری تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری وآب مقطر سترون (شاهد) به محیط PDA اضافه و پخش شد و بمدت سه روز در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از مدت فوق باکتری ها به کمک پنبه سترون از سطح پتری جمع آوری شدند. سپس پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (بصورت وارونه) قرارداده شد. تشتک پتری ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس به مدت یک ساعت در زیر هود با باز گذاشتن در تشتک ها تهویه انجام شد. سپس یک دیسک پنج میلیمتری از حاشیه کشت سه روزه قارچ با رعایت شرایط سترون در مرکز هر تشتک پتری قرار داده شد. تشتک ها در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و اندازه‌گیری رشد میسلیومی قارچ در مقایسه با شاهد پس از ۵ روز انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل هر ۲۰ تیمار در سه تکرار انجام گردید و داده های بدست آمده از آزمایش مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱درصد انجام گردید. درصد بازداری از رشد میسلیوم با استفاده از رابطه زیر (فرمول شماره ۱) برای هر تیمار محاسبه گردید.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{میزان رشد قارچ درون پتری شاهد} - \text{میزان رشد قارچ درون پتری حاوی باکتری}}{\text{میزان رشد قارچ درون پتری شاهد}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

اندازه گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکترو فتومتر

این آزمون براساس روش کاستاندا و همکاران (۸) انجام گرفت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها در محیط مایع سوکسینات (K_2HPO_4;6.0g/l,KH_2PO_4;3.0g/l;$MgSO_4$. $7H_2O$;0.2g/l,NH_4SO_4; 1.0g/l, Succinic acid; 4.0g/l) به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۴۰ میلی لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول های باکتری با سانتریفوژ کردن در g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

داده‌های حاصله با استفاده از فرمول ذیل (فرمول شماره ۲) بـه مـول در لیتر تبدیل شد (۸).

$$A= eBC \qquad (۲)$$

A= میزان جذب e= ضریب جذب مولی B = قطر کوت C= غلظت ماده

روش آغشته سازی بذر با باکتری های آنتاگونیست

بذرهای نخود رقم کرج MCC358 (تهیـه شـده از پژوهشـکده علوم گیاهی مشهد) به مدت ۳ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصـد کلر فعال ضدعفونی سطحی شدند و با چهار بار شستشو در آب مقطـر هیپوکلریت آن زدوده شد. به منظور آغشته سازی بذر به استرین های آنتاگونیست از روش ولر و همکاران (۳۸) استفاده شد. یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته هر استرین آنتاگونیست روی محیط کینگ بی، به فلاسک های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع کینگ بی منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت روی شـیکر (۱۲۰ دور در دقیقـه) در دمـای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

سلول های باکتریایی به مـدت ۱۰ دقیقـه در g ۶۰۰۰ سـانتریفیوژ و چند بـار بـا محلـول نمـک فیزیولوژیـک (۰/۱۴ مـول NaCl) بـرای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی شستشو شدند. سپس سلول های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ مجدد از این محلول جدا سازی شده سوسپانسیون ۱×۱۰^{۹}آن ها بـا اسـتفاده از منحنـی اسـتاندارد بـا روش اسپکتروفتومتری درمحلول یک درصد کربوکسـی متیـل سـلولز و بـا استفاده از فرمول زیر (فرمول شماره ۳) تهیه گردید.

$$D_۱V_۱ + D_۲V_۲ = D_T (V_۱ + V_۲) \qquad (۳)$$

D۱ = غلظت سوسپانسیون موجود، V۱= حجم سوسپانسـیون اولیـه، D۲ = غلظت باکتری در محلول اضافه شده (در اینجا چـون محلـول CMC بدون باکتری اضافه شد. D۲=۰ است)، V۲= حجـم محلـول اضافه شونده، D_T = غلظـت سوسپانسـیون نهـایی بـذر نخـود درون سوسپانسیون های باکتریایی ریخته شده و به مدت نـیم سـاعت روی شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. در تیمـار شـاهد بـذور درون محلول کربوکسی متیل سلولز یک درصد فاقد باکتری غوطه ور شدند. بذر های آغشته شده در معرض جریان هـوای اسـتریل هـود خشـک شدند.

بررسی اثر تیمار بذور نخود توسط جدایه های بـاکتری در کنتـرل بیمـاری پژمردگـی فوزاریـومی نخـود در شـرایط گلخانه

برای بررسی گلخانه ای از روش توماشو و ولر (۳۵) با کمی تغییـر استفاده شد. به گونه ای که از گلدان های ۸۰۰ گرمـی اسـتفاده شـد، مایه تلقیح (جدایه Foc6) به نسبت ۵ درصد وزنی با خـاک اسـتریل گلدان ها مخلوط گردید. خاک آلوده به اینوکولوم بین دولایه سنگریزه در سطح زیرین گلدان و ماسه در سطح بـالایی قـرار داده شـد، بـذور آغشته به باکتری بر روی خاک قرار داده شدند و بـا لایـه نـرم ماسـه پوشانیده شدند . برای هر ۲۱ تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی اجـرا شـد. گلـدان هـا در شـرایط گلخانه (دمایی ۲۵-۲۰ درجه سانتی گـراد و رطوبـت نسـبی ۹۰-۸۰ درصد) قرار گرفتند. پس از چهار تا شش هفته علائم بیماری مشاهده گردید. با مرطوب کردن گلدان ها بوته های بیمـار از هرتیمـار خـارج گردید. پس از بررسی ریشه ها برای ارزش گـذاری شـدت بیمـاری از شاخص آرورا و پندی (۵) استفاده شد: ۱=بدون تغییر رنگ؛ ۲= ناحیه قهوه ای شدن به صورت خطوط فشرده و برابر بـا ۱۰-۵ میلـی متـر؛ ۳= ناحیه قهوه ای شدن به صورت خطوط فشرده و برابـر بـا ۱۵-۱۰ میلی متر؛ ۴= ناحیه قهوه ای شدن کاملاً فشـرده و برابـر بـا ۱۰-۱۵ میلی متر.

تجزیه و تحلیل داده های آماری

تجزیه وتحلیل آماری و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن و با استفاده از نرم افزارهای آماری MSTATC انجام گرفت.

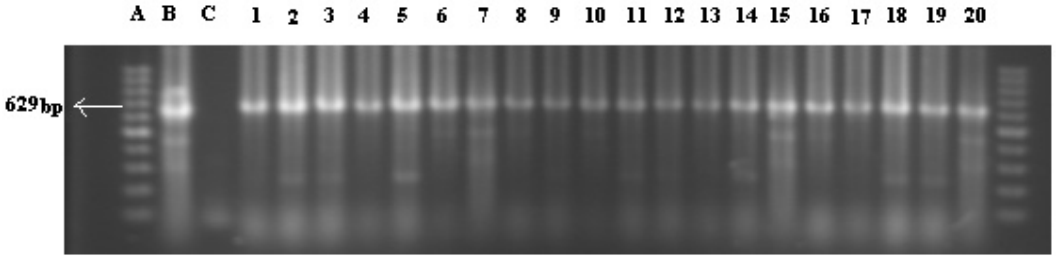
نتایج و بحث

جداسـازی و شناسـایی بـاکتری هـای آنتاگونیسـت سودوموناس فلورسنت

در مجموع ۲۰۰ جدایه از فراریشه نخود ایرانی در استان خراسان رضوی و شمالی بازیافت و خالص سازی شد. جدایه های آنتاگونیسـت با استفاده از آزمون افتراقی نظیر گرم در پتاس سه درصد، رشد هوازی و بی هوازی و تولید پیگمان های فلورسنت روی KB تفکیک شـدند. از بین ۲۰۰جدایه ،۸۰ جدایه متعلق بـه بـاکتری هـای گـرم منفـی از جنس سودوموناس بودند. در نهایت براساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشـیمیایی جدایـه هـای *Pseudomonas* نظیرآزمـون آرژنـین، آزمون قند تری هالوز، آزمون لوان، آزمون نیترات، آزمون قند آرابینـوز و آزمون قند تارتارات، جدایه های *P. fluorescens* تشـخیص داده شدند (۷).

ردیابی جدایه های باکتریایی واجد ژن *phlD* (ژن کلیـدی در بیوسنتز آنتی بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول)

پس از استخراج DNA به روش رامت و همکاران (۳۰) و انجـام واکنش زنجیره ای پلیمراز با پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن تولید کننده آنتی بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول در ۲۰ جدایـه از ۸۰ جدایه، باند مربوط به ژن *phlD* (629bp) مشاهده شد.



شکل۱- باند ۶۲۹ جفت بازی مبتنی بر وجود ژن تولید کننده آنتی بیوتیک DAPG در جدایه های باکتریایی سودوموناس فلورسنت، نشانگر اندازه ۱۰۰bp(A)، شاهد مثبت(B)، شاهد منفی(C) و جدایه های ۲۰-۱ به ترتیب T90(1),T12-2(2),T55-1(3),T59(4),T(5),T3(6),T68-3(7),T17-4(8),T26(9),T29-2(10),T40(11),T48-2(12),T30-2(13),K-15(14),MF-1(15),CH2-7(16),M2-15(17),M2-21(18),M80-5(19) و M3-14(20)

این ۲۰ جدایه شامل جدایه های T90,T12-2,T55-1,T59,T,T3,T68-3,T17-4,T26,T29-2,T40,T48-2,T30-2,K-15,MF-1,CH2-7,M2-15,M2-21,M80-5 و M3-14 بودند (شکل۱).

بررسی اثر بازدارندگی جدایه های *Pseudomonas fluorescens* بر رشد قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در شرایط آزمایشگاه

در این بررسی توانایی آنتاگونیستی ۱۹ جدایه باکتریایی در شرایط آزمایشگاه بر اساس روش کشت متقابل در تشتک پتری روی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* مورد مطالعه قرار گرفت. جدایه‌های Pf-5 وM2-15 به ترتیب با هاله های بازدارندگی ۱۳/۵ و۱۲/۸ میلی متر بیشترین تاثیر و جدایه T55-1 با هاله بازدارندگی ۵/۱ میلی متری کمترین تاثیر را روی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در محیط کشت PDA داشتند. جدایه های T90 وM2-15 به ترتیب با هاله های بازدارندگی ۹/۸ و ۹/۲ میلی متر بیشترین تاثیر در محیط KB و جدایه T40 با هاله بازدارندگی ۱/۸ میلی متری کمترین تاثیر را در ممانعت از رشد قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* داشتند.

آزمون تولید آنتی بیوتیک

جدایه های آنتاگونیست از نظر تولید آنتی بیوتیک در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در سطح ۱درصد تفاوت معنی داری نشان دادند. دامنه رشد قارچ در این آزمایش بین عدم رشد یعنی صفر تا رشد بالا یعنی ۴۰/۴ میلی متر اندازه گیری شد. براساس مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه های Pf-5 و T26 با ۱۰۰ درصد کاهش رشد بیشترین و جدایه T59، با ۳۲/۷۳ درصد کاهش رشد کمترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیومی قارچ داشتند (جدول۲).

بررسی تولید سیدروفور

در روش کاستاندا و همکاران (۸) به صورت اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایوردین قابل ارزیابی است. نتایج به دست آمده از میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب مولی پایوردین خالص به میکرومول پایوردین تبدیل شد. از مجموع ۱۹ جدایه باکتریایی آنتاگونیست که در مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت تمامی آن ها قادر به تولید سیدروفور بودند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین جدایه ها از نظر قدرت تولید سیدروفور اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود دارد. مقایسه میانگین ها نشان داد که جدایه CH2-7 با تولید ۲۷/۲۵ میکرومول پایووردین بیشترین مقدار و جدایه M2-21 با تولید ۲/۸۵ میکرومول پایووردین کمترین مقدار تولید سیدروفور در بین جدایه های تولید کننده سیدروفور را داشت (جدول۲).

آزمایش های گلخانه ای

اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و شاخص نکروز ریشه در اثر *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در تیمارهای مختلف به عنوان شاخص هایی برای توانایی باکتریها در کنترل بیولوژیکی به شرح زیر بررسی شد.

شاخص وزن تر و خشک اندام های هوایی

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات باکتریهای آنتاگونیست بر وزن تر و خشک اندام های هوایی تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد وجود دارد. براساس مقایسه میانگین داده ها، جدایه های T90 و M2-15 وزن تر گیاهان در مقایسه با شاهد به نحو معنی داری افزایش داشتند ولی گیاهان تیمار شده با جدایه های T، T17-4 و T55-1 از نظر وزن تر گیاه شاهد آلوده تفاوت معنی داری نشان ندادند.

جدول ۱-گروه بندی جدایه ها بر اساس قطر هاله بازدارندگی(برحسب میلی متر) بین کلنی باکتری و قارچ در محیط PDA و KB

تیمار (کد جدایه)	قطر هاله بازدارندگی در محیطKB (بر حسب میلیمتر)	قطر هاله بازدارندگی در محیطPDA (بر حسب میلیمتر)
T90	۹/۸a	۱۰/۳abc
T40	۱/۸bc	۷/۷abc
M2-15	۹/۲ab	۱۲/۸ab
T17-4	۲/۵abc	۱۲/۲ab
K-15	۸/۶ab	۹/۱abc
T59	۵/۱abc	۸abc
Mf-1	۷/۸ab	۱۱ab
Pf-5	۷/۸ab	۱۳/۵a
T55-1	۲/۵abc	۵/۱c
T	۶/۴abc	۱۲/۲ab
T26	۴/۶abc	۱۱ab
T68-3	۹ab	۱۱/۵ab
T3	۹ab	۸/۵abc
T30-2	۶/۲abc	۱۱/۶ab
CH2-7	۵/۷abc	۱۰/۲abc
T48-2	۵/۷abc	۱۲/۳ab
M80-5	۲/۳abc	۱۰/۶abc
M2-21	۶/۹abc	۷/۲bc
T12-2	۶/۶abc	۱۲/۲ab
شاهد	۰c	۰d

هر عدد میانگین سه تکرار می باشد. میانگین های که در هر ستون با حروف مشترک نشان داده شده اند در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند($p> 0.01$).

جدول۲-گروه بندی جدایه های سودو موناس فلورسنس براساس تولید آنتی بیوتیک (در صد بازدارندگی از رشد قارچ) و سیدروفور (میکرومول در لیتر)

جدایه های آنتاگونیست	آنتی بیوتیک(درصد بازدارندگی)	سیدروفور(میکرومول در لیتر)
T90	۴۴/۴cde	۱۶/۰۵de
T40	۵۴/۴cd	۱۵/۷۳de
M2-15	۴۹/۴cde	۴/۳h
T17-4	۴۹/۴cde	۲۱/۷bc
K-15	۳۷/۷۳cde	۲۲/۰۵b
T59	۳۲/۷۳e	۲۵ab
Mf-1	۴۱/۶۳d	۵/۸۵gh
Pf-5	۱۰۰a	۲۵/۴۵ab
T55-1	۳۶/۶de	۱۳/۸de
T	۳۷/۲de	۱۷/۵۵d
T26	۱۰۰a	۴/۴۸h
T68-3	۴۰cd	۱۵/۹۵de
T3	۵۴/۹۷cde	۱۷/۸۵cd
T30-2	۴۵/۵۳cde	۱۲ef
CH2-7	۴۴/۴۳cde	۲۷/۲۵a
T48-2	۴۸/۳۳cde	۲۳/۷ab
M80-5	۵۸/۳c	۹/۴۵fg
M2-21	۴۹/۹۷cde	۲/۸۵h
T12-2	۸۱/۰۷b	۴/۲۵h
شاهد	۰f	۰i

هر عدد میانگین سه تکرار می باشد. میانگین های که در هر ستون با حروف مشترک نشان داده شده اند در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند ($p>0.01$) .

جدول ۳-اثرجدایه های سودوموناس های انتخاب شده بر فاکتورهای مختلف رشدی نخود ایرانی و شدت بیماری پژمردگی پس از کاشت بذور در خاک آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در شرایط گلخانه

کد جدایه تیمار	وزن تر اندام‌های هوایی به گرم	وزن خشک اندام های هوایی به گرم	وزن تر ریشه به گرم	وزن خشک ریشه به گرم	نکروز ریشه*	وزن تر اندام هوایی وریشه
T90	۴/۳۶۲ a	۰/۵۷۸ a	۱/۱۵۹ igk	۰/۱۵۳ ghi	۱/۹۷۷ ghi	۵/۵۲۱ b
T40	۱/۸۵ gh	۰/۲۴۱ fghi	۱/۵۲۵ fghi	۰/۲۰۱defgh	۲/۵۸۸ cdef	۳/۳۴۹ ef
M2-15	۴/۲۴۴a	۰/۵۶۳ a	۲/۳۳۷ab	۰/۳۰۹ ab	۱/۳۵۵ jk	۶/۵۸۱ a
T17-4	۰/۸۹۲ jk	۰/۱۷۵ igk	۱/۲۶۳ hij	۰/۱۵ ghi	۳/۰۴۳ abc	۲/۱۵۶ i
K-15	۲/۸۷۷ b	۰/۳۸۲ b	۲/۳۳۵ ab	۰/۳۰۹ ab	۱/۶۶۸ ij	۵/۲۱۲ b
T59	۱/۸۷۸ g	۰/۲۴۹ efgh	۱/۷۳۵ efg	۰/۲۲۹ cdef	۲/۷۴۵ defg	۳/۶۱۲ e
Mf-1	۲/۴۹۷ cde	۰/۳۳۱ bcd	۲/۰۱۵ bcde	۰/۲۶۷ bcd	۱/۸۹۲ hij	۴/۵۱ cd
Pf-5	۲/۶۵۸ bd	۰/۳۰۸ cde	۱/۸۹۸ cdef	۰/۲۶۵ bcd	۲/۰۴۳fghi	۴/۳۳۱ cd
T55-1	۰/۶۸۹ k	۰/۰۹۱i	۰/۸۶۹ k	۰/۱۱۶ ig	۳/۵۵۵ a	۱/۵۶ j
T	۱/۰۵۹ j	۰/۱۴ jkl	۱/۴۴۳ ghij	۰/۱۷۱ fghi	۳/۳۲ ab	۲/۳۵۲ hi
T26	۲/۷۶۷ bc	۰/۳۶۶ bc	۲/۶۳۴ a	۰/۳۴۹ a	۱/۷۳۵ ij	۵/۴۰۱ b
T68-3	۱/۷۵۵ gh	۰/۲۳۲ hi	۱/۶۱۸ fgh	۰/۲۱۵ defg	۲/۶۸۸ cde	۳/۳۷۲ ef
T3	۱/۸۵۷ gh	۰/۲۴۶ efgh	۱/۵۷۸ fgh	۰/۲۰۸ defg	۲/۵۳۸ cdefg	۳/۴۳۴ ef
T30-2	۲/۳۳۹ e	۰/۳۰۵ cdef	۲/۲۲ bcd	۰/۲۸۹ abc	۲/۳۱ efgh	۴/۵۵۹ cd
CH2-7	۱/۵۳۵ hi	۰/۲۰۳ hij	۱/۴۳۱ ghij	۰/۱۸۹ efgh	۲/۹۶۳ bcd	۲/۹۶۶ fg
T48-2	۱/۷۸۹ gh	۰/۲۳۶ ghi	۱/۵۵۲ fghi	۰/۲۰۴defgh	۲/۶۳۸ cde	۳/۳۴۱ ef
M80-5	۱/۳۹۱ i	۰/۱۸۴ hijk	۱/۲۹۱ hij	۰/۱۷۱ fghi	۳/۰۶۵ abc	۲/۶۸۲ gh
M2-21	۱/۹۴۹ fg	۰/۳۰۳ cdef	۰/۸۵۷ k	۰/۰۷۵ j	۲/۱۴۲ efghi	۲/۸۰۶ gh
T12-2	۲/۲۴۲ de	۰/۲۹۸ defg	۱/۸۵۶ def	۰/۲۴۶ bcde	۲/۰۴۳ fghi	۴/۱۰۸ d
شاهد سالم	۲/۴۱ de	۰/۳۱۵ cd	۲/۲۷۲ abc	۰/۳۰۶ ab	۱ k	۴/۶۸۲ c
شاهد آلوده	۰/۹۵۹ jk	۰/۱۲۷ kl	۱/۰۵ jk	۰/۱۳۹ hi	۳/۳۷۵ ab	۲/۰۱ i

هر عدد میانگین چهار تکرار می باشد. میانگین های که در هر ستون با حروف مشترک نشان داده شده اند در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند($p> 0.01$).

*- ارزیابی شدت نکروز بر اساس سیستم نمره دهی بین ۱(ریشه بدن نکروز) و ۴ (ریشه کاملاپوشیده ازنکروز) صورت گرفته تیمار شده با جدایه های M80-5، T17-4، T و T55-1 تفاوت معنی داری را با شاهد آلوده نشان ندادند.

جدایه های T90، M2-15 و K15 وزن خشک بخش های هوایی را در مقایسه با شاهد سالم افزایش دادند ولی وزن خشک گیاهان تیمار شده با جدایه های M80-5، T17-4، T و T55-1 تفاوت معنی داری را با شاهد آلوده نشان ندادند (جدول ۳).

شاخص وزن تر و خشک ریشه

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست بر وزن تر و خشک اندام های هوایی تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد وجوددارد. براساس مقایسه میانگین داده های وزن تر ریشه، گیاهان تیمار شده با جدایه T26 تفاوت معنی داری با گیاه شاهد سالم داشت و دارای وزن بیشتری بود. در مورد جدایه های T90,T55-1 و M2-21 نیز مشاهده شد که وزن تر ریشه در گیاهان تیمار شده با این جدایه ها با شاهد آلوده تفاوت معنی دار نداشتند. بررسی وزن خشک ریشه ها نشان داد که تیمار گیاهان با جدایه T26 موجب افزایش معنی دار رشد آنها نسبت به شاهد سالم شد. وزن خشک ریشه در گیاهان تیمار شده با جدایه M2-21 از گیاه شاهد آلوده کمتر بود و از نظر آماری با شاهد آلوده متفاوت بوده است (جدول ۳).

شاخص درصد نکروز ریشه

نتایج حاصل از بررسی این شاخص نشان داد که بین تیمارها از نظر تاثیر بر درصد نکروز ریشه تفاوت معنی داری در سطح۱ درصد وجود دارد. براساس مقایسه میانگین داده ها، درصد نکروز ریشه درگیاهان تیمار شده با جدایه M2-15 با گیاه شاهد سالم از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت و تیمار گیاهان با جدایه‌های T17-4،M80-5,CH2-7، T و T55-1 درصد نکروز ریشه را کاهش نداد و نسبت به شاهد آلوده کاهش معنی داری در این شاخص مشاهده نگردید (جدول ۳).

جداسازی باکتری ها از منطقه فراریشه یک محصول، به منظور دستیابی به عوامل آنتاگونیست با توانایی بیوکنترل بالا امری ضروری به نظر می رسد. در تحقیق حاضر جدایه های *P. fluorescens* با فعالیت آنتاگونیستی علیه *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* از فراریشه نخود ایرانی جداسازی شدند و توانایی آنتاگونیستی آنها علیه بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه بررسی گردید. در بررسی‌های انجام شده طی این تحقیق، همبستگی معنی داری بین تولید متابولیت های ضد قارچی جدایه های باکتری با کاهش بیماری مشاهده شد. در امر کنترل بیولوژیک عوامل بیماری زا، تولید آنتی بیوتیک (۱۵) و سیدروفورها توسط ریزوباکترها بسیار حائز اهمیت می باشد. یکی از کلیدی ترین آنتی بیوتیک های تولید شده توسط سودوموناس های فلورسنت،۲و۴- دی استیل فلورو گلوسینول است که بعنوان یکی از موثرترین متابولیت های ضد میکروبی تولید شده توسط این باکتری ها مطرح شده است و نقش این آنتی بیوتیک در کنترل قارچ های *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل پاخوره گندم، *Thielaviopsis basicola* عامل بیماری پوسیدگی سیاه ریشه توتون، *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی گوجه فرنگی، *Pythium ultimum* عامل مرگ گیاهچه خیار و *Rhizoctonia solani* روی پنبه به اثبات رسیده است (۳۹ و ۳۷). با توجه به اهمیت این آنتی بیوتیک در کنترل بیولوژیک، در تحقیق حاضر ردیابی ژن تولید کننده آنتی بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول صورت گرفت و مشخص شد که از مجموع ۸۰ جدایه *P. fluorescens* جداشده از فراریشه نخود،۲۰ جدایه واجد ژن *phlD* بودند. بررسی وجود ژن *phlD* به تنهایی نشان دهنده بیان و یا به عبارتی تولید محصول ژن نمی باشد. عوامل متعددی در تنظیم تولید DAPG در جدایه های سودوموناس فلورسنت نقش دارند. تولید DAPG در داخل سلول باکتری، در دو سطح مختلف نسخه برداری و پس از نسخه برداری به ترتیب توسط برخی عوامل مثل سیگما فاکتورها، ژن تنظیم کننده *phlF* و سیستم GacA/GacS تنظیم می شود (۱۲ و ۳۴). علاوه بر نقش عوامل بالا در تنظیم تولید DAPG، فاکتورهای بیولوژیکی، فیزیکی وشیمیایی نیز در تنظیم بیان این ژن نقش دارند (۲۶ و ۳۱). در واقع مدیریت بخش های مختلف در خاک برای اجرای صحیح فعالیت عامل آنتاگونیست نقش موثری دارد (۱۴).

از بین این ۲۰ جدایه، ۱۸جدایه به همراه جدایه *P. flourescens* Pf-5درگلخانه بررسی شدند که از بین آن ها جدایه M2-15 دارای توانایی آنتاگونیستی بهتری نسبت به سایرین بود. بررسی ها نشان دهنده وجود همبستگی معنی داری در وزن تر اندام های هوایی و وزن کل گیاه نخود با کاهش بیماری می باشند. استرین های سودوموناس فلورسنت مولد DAPG، تفاوت هایی را از نظر کنترل بیولوژیک، میزان تولید آنتی بیوتیک پیرول نیترین و توانایی کلنیزه کردن ریشه و تثبیت در فراریشه گیاهان از خود نشان می دهند (۳۷). نتایج این تحقیق نیز موید این مطلب بود که بین استرین های $phlD^{+}$ از نظر کنترل بیولوژیک تفاوت وجود دارد.

باکتریهای آنتاگونیست منتخب در این مطالعه، قادر به تولید سیدروفور نیز بودند که از این میان جدایه CH2-7 بیشترین توانایی را در تولید سیدروفور از خود نشان داد. بررسی ها نشان دهنده عدم وجود همبستگی معنی دار بین تولید سیدروفور با کاهش بیماری بود. سیدروفورها، موادی با وزن مولکولی پائین هستند که در شرایط کمبود آهن تولید شده و دارای قدرت جذب بالایی در جذب آهن فریک (Fe^{3+}) می باشند. با توجه به نقش مهم سیدروفورهای میکروبی در کنترل عوامل بیماری زای خاکزاد، امکان تامین آهن مورد نیاز گیاه و همچنین پتانسیل بالای سودوموناس های فلورسنت برای کلونیزاسیون ریشه و استقرار در فراریشه تا توانایی سیدروفور توسط استرین های آنتاگونیست از اهمیت بالایی برخوردار است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در این بررسی الگوی عمومی توان بازدارندگی استرین ها در شرایط گلخانه با گروه بندی استرین ها از نظر توانایی بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه مطابقت داشته ولی بعضی از استرین هایی که در آزمایشگاه از نظر هاله بازدارنده رشد در گروه های آماری متفاوت بودند، در شرایط گلخانه در یک گروه قرار گرفتند. این پدیده در بسیاری از نتایج کنترل بیولوژیک ارایه شده توسط محققین دیگر نیز به چشم می خورد. از آنجا که شرایط آزمایشگاه به صورت کنترل شده و بدون دخالت میزبان می باشد لذا تفاوت های مشاهده شده را می توان به دخالت شرایط محیط، میزبان و وجود سایر مکانیسم های بیوکنترل در گلخانه نسبت داد. به طور کلی شرایط طبیعی بسیار پیچیده تر از شرایط آزمایشگاه بوده و در نهایت برآیند و اثر متقابل این شرایط است که سهم هریک از مکانیسم ها را در بیوکنترل تعیین می نماید. مواد بازدارنده ترشح شده توسط میکروارگانیسم ها الزاماً دوام یکسان نداشته و برخی از پایداری بیشتری برخوردارند که خود می تواند منشا تفاوت در عملکرد استرین ها تحت شرایط متفاوت باشد به علاوه از آنجا که محیط درون ظروف پتری محدود می باشد با گذشت زمان غلظت مواد بازدارنده بالا رفته و تاثیر آن بیشتر می شود در حالیکه چنین شرایطی در محیط گلخانه برقرار نمی باشد. برخی از استرین های باکتریایی غیر از تولید مواد بازدارنده، سیدروفور، سیانیدهیدروژن و آنتی بیوتیک ها، توان رقابتی بالاتری داشته و به علاوه قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمایند و مجموعه این عوامل در تلفیق با سایر شرایط محیطی تعیین کننده توانایی بیوکنترل آنها در حضور میزبان و استرین بیماریزا است. بنابراین عدم انطباق نتایج آزمایشگاه با شرایط گلخانه می تواند به دلایل ذکر شده قابل انتظار باشد و به همین خاطر نمی توان صرفاً براساس نتایج به دست آمده در شرایط آزمایشگاه اقدام به توصیه برای استفاده از استرینی خاص در شرایط

گلخانه یا شرایط طبیعی نمود (۱۱).

منابع

۱- پارسا م. و باقری ع. ۱۳۸۷. حبوبات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۲- جمالی ف.، شریفی تهرانی ع.، اخوت م. و ذاکری ز. ۱۳۸۴. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست بر عامل پژمردگی فوزاریـومی نخـودایرانی در شرایط گلخانه. مجله بیماریهای گیاهی،۳: ۷۱۷-۷۱۱.

۳- علوی ا. و آهون منش ع. ۱۳۷۶. کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی خاکزاد. تهران. نشر آزمون کشاورزی.

4- Alstrom S., and Burns R.G. 1989. Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition of biology. Journal of Fertility Soils, **7:** 232-238.

5- Arora D.K., and Pandey A.K. 1989. Effect of soil solarization on Fusarium wilt of chickpea. Journal of Phytopathology, 124: 13-22.

6- Bossis E., Lemanceau Ph., Latour X., and Gardan L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Journal of Bacteriology, 20:51-63.

7- Botelho G.R., Mendonca-Hagler L.C. 2006. Fluorescent *Pseudomonas* associated with the rhizosphere of crops-an overview. Journal of Microbiology, 37: 401-416.

8- Castaneda G.C., Munoz T.J.J., and Videa J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. Journal of Microchemical, 81: 35-40.

9- Delany I., Sheehan M.M., Fenton A., Bardin S., Aarons S., and O Gara F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* Fl13: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. Journal of Microbiology, 146: 537-546.

10- Expert J.M., and Digat B. 1995. Biocontrol of Sclerotinia wilt of sunflower by *Pseudomonas putida* strains. Journal of Microbiology, 41: 685-691.

11- Fravel D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Journal of Phytopatology, 26:75-91.

12- Hass D., and Defago W. 2005. Biological control of soil-borne-pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology, 3: 307-319.

13- Hervás A., Landa B and Jiménez-Díaz R.M. 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from Fusarium wilt by treatment with non- pathogenic *Fusarium oxysporoum*. European Journal of Plant Pathology. 103: 631-642.

14- Hiddink G.A., Bruggen A.H.C., Termorshuizen A.J., Raaijmakers J.M., and Semenov A.V. 2005. Effect of organic management of soils on suppressiveness to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and its antagonist, *Pseudomonas fluorescens*. European Journal of Plant Pathology, 113:417-435.

15- Howell C.R., and Stipanovic R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by bacterium. Journal of Phytopathology, 69: 480- 482.

16- Kaur R., Singh R.S., and Alabouvette C. 2007. Antagonistic activity of selected isolates of fluorescent pseudomonas against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Asian Journal of Plant Science, 6: 446-454.

17- Keel C., Weller D.M., Natsch A., D´efago G., Cook R.J., and 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.

18- Keel C., Defago G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gange AC , Brown VK,(eds.). Multitrophic interactions in terrestrial system. Oxford: Blackwell Science.

19- Kraus J., and Loper J.E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Journal of Phytopathology, 82:264-271.

20- Mammino L., Kabanda M.M. 2007. Model structures for the study of acylatedphloroglucinols and computational study of the caespitate molecule. Journal of Molecular Structure, 805: 39–52.

21- McSpadden Gardener B.B., Schroeder K.L., Kalloger S.E., Raaijmakers J.M., Thomashow L.S., and Weller D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains

isolated from the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology, 66:1939-1946.
22- McSpadden Gardener B.B., Gutieerreza L.J., Joshi R., Edema R., and Lutton E. 2005. Distribution and biocontrol potential of *phlD+* Pseudomonads in corn and soybean fields. Journal of Phytopathology, 95:715-724.
23- Moynihan J.A., Morrissey J.P., Coppoolse E.R., Stiekema W.J., O'Gara F., and Boyd E.F. 2009. Evolutionary history of the *phl*Gene cluster in the plant-associated Bacterium *Pseudomonas fluorescens.* Applied and Environmental Microbiology, 7: 2122–2131.
24- Nagarajkumar M., Bhashkaran R., and Velazhahan R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice, sheath blight pathogen. Journal of Microbiology, 159:73-81.
25- Navas-Cortes J.A., Hau B., and Jimenez-Diaz R.M. 2000. Yield loss in chickpeas in relation to development of Fusarium wilt epidemics. Journal of Phytopathology, 11:1269-1278.
26- Notz R., Maurhofer M., Dubach H., Haas D., and Defago 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, 6:2229–2235.
27- O' Sullivan D.J., and O, Gara F. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. involved in suppression of plant root pathogen. Journal of Microbiology, 56:662-676.
28- Owen A., Zlor R. 2001. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and Corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemented glycine. Journal of Soil Biochemistry, 33: 801-809.
29- Raaijmakers J.M., and Weller D.M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. Applied and Environmental Microbiology, 67: 2545–2554.
30- Ramette A., Moe¨nne-Locoz Y., and D´efago G. 2001. Polymorphism of the polypeptide syntheses gene *phlD* in biocontrol fluorescent pseudomonads producing 2, 4-diacetylphloroglucoinol and comparison of *phlD* with plant polypeptide syntheses. Journal of the American Phytopathological Society, 14: 639–652.
31- Saikia R., Varghese S., Singh E.P., and Arora D.K. 2009. Influence of mineral amendment on disease suppressive activity of *Pseudomonas fluorescens* to Fusarium wilt of chickpea. Journal of Microbiological Research, 164: 365-373.
32- Scher F.M., and Baker R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness of Fusarium wilt pathogens. Journal of Phytopathology, 72:1567-1573.
33- Schnider-Keel U., Seematter A., Maurhopher M., Blumer C., Duffy B., Gigot-Boennefoy C., Reimmann C., Notz R., Defago G., Haas D., and Keel Ch. 2000. Auto induction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 an Repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. Journal of Bacteriology, 5:1215–1225.
34- Suresh A., Pallavi P., Srinivas P., Praveen Kumar V., Jeevan Chandra S., and Ram Reddy S. 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Research, 14:1491-1494.
35- Thomashow L.S., Weller D.M. 1988. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Journal of Bacteriology, 170: 3499-3508.
36- Validov S., Mavrodi O.V., De La Fuente L., Boronin A., Weller D.M., Thomashow L.S., and Mavrodi D.M. 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. Journal of Microbiology, 242: 249–356.
37- Velusamy P.J., Immanuel E., Gnanamanickam S.S., and Thomashow L. 2006. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2, 4-diacetylphloroglucinol. Journal of Microbiology, 52:56–65.
38- Weller D.M., Cook R.J. 1983. Suppression of Take-All of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Journal of Phytopathology, 78: 463-469.
39- Weller D.M., Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder K.L., De La Fuente L., Blouin Bankhead S., Allende Molar R., Bonsall R.F., Mavrodi D.V., and Thomasho L.S. 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing Fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots**.** Journal of Plant Biological, 9: 4–20.