نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۱۲۶-۱۱۶

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 2, Summer 2012, P. 116-126

ردیابی آنتی‌بیوتیک فنازین- ۱-کربوکسیلیک اسید در سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر گندم و تاثیرآن در کنترل بیولوژیکی بیماری پاخوره‌گندم

سمیه الوانی[۱*] - حمید روحانی[۲] - ماهرخ فلاحتی رستگار[۳] - مسعود احمدزاده[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۲

چکیده

بیماری پاخوره‌گندم با عامل قارچی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در ایران به شمار می رود. به منظور کنترل بیولوژیکی این بیماری،۱۳۰ جدایه سودوموناس فلورسنت از ریزوسفر گندم در نواحی مختلف استان خراسان جداسازی شد. برای انتخاب جدایه‌های سودوموناس فلورسنت با توانایی بازدارندگی از رشد قارچ، آزمون کشت متقابل باکتری‌ها با قارچ Ggt در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروزآگار و کینگ ب انجام شد. از این میان، ۲۱ جدایه با قابلیت بازدارندگی بین ۵۱/۲۵-۱۱/۲۵ درصد به عنوان جدایه‌های برتر از نظر ممانعت از رشد قارچ Ggt انتخاب شدند. برای ردیابی ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید (PCA)، روش PCR با استفاده از پرایمرهای PCA2a و PCA3b انجام شد. نتایج نشان داد ۱۲ جدایه از ۲۱ جدایه انتخاب‌شده حاوی ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک PCA بودند. جهت بررسی تولید این آنتی‌بیوتیک از روش کیفی تولید رسوب سبز تیره یا کریستالی در محیط کشت استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده توانایی تولید این آنتی‌بیوتیک در ۶ جدایه از ۱۲ جدایه حاوی ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک بود. در آزمایش‌های گلخانه‌ای نیز جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید، نسبت به سایرین از توانایی بیشتری در کنترل بیماری پاخوره‌گندم برخوردار بودند و شدت بیماری را ۸۰-۷۷ درصد کاهش دادند. با کاربرد این جدایه‌ها همچنین افزایش قابل ملاحظه‌ای در وزن‌تر ریشه و بخش‌های هوایی گیاهان مشاهده شد. نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که احتمالا آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید تولیدشده توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنت، در کاهش بیماری پاخوره در گندم نقش دارد.

واژه های کلیدی: آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید، پاخوره، سودوموناس فلورسنت، کنترل بیولوژیک، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

مقدمه

پاخوره یا Take-all از بیماری‌های مهم غلات به ویژه گندم به‌شمار می‌رود. این بیماری عموما به گندم‌های زمستانه حمله می‌کند و نقش زیادی در کاهش محصول دارد (۳۸). بررسی‌های فراوانی مبنی بر کاربرد باکتری‌های مفید در کاهش شدت بیماری پاخوره در گندم انجام شده است. باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه (PGPR[5]) به گروهی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که خود را با ریشه‌های گیاهان بر اساس ترشحات آن‌ها آداپته کرده و به این‌ترتیب از سایر باکتری‌ها که نمی‌توانند کلنیزاسیون موثری را بر روی ریشه داشته باشند، جدا می‌گردند (۱و۴ و۵ و۲۵ و۳۲). این باکتری‌ها توانایی خنثی‌کردن اثرات زیان‌آور بیمارگرهای گیاهی را به دو طریق دارا هستند. در یک روش باکتری با تولید آنتی‌بیوتیک، ترشح سیدروفر[6]، تولید سیانید هیدروژن[7]، ترشح آنزیم‌های برون‌سلولی مانند کیتیناز[8]، بتا یک و سه گلوکاناز[9]، پروتئاز[10] و لیپاز[11] فعالیت عامل بیماری‌زا را کاهش و متوقف می‌سازد (۲ و۲۲و۲۷) در روش دیگر باکتری سبب

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email : Somaye5778@gmail.com)
۴- دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تهران

5 - plant growth promoting rhizobacteria

6 - Siderophore
7 - Hydrogen cyanide
8 - Chitinase
9 - ß-1,3 glucanase
10 - Protease
11- Lipase

فعال‌شدن مکانیسم مقاومت سیستمیک القایی[1] در گیاه می‌گردد (۳).

تولید آنتی‌بیوتیک توسط سودوموناس‌های فلورسنت، یکی از مکانیسم‌های مهم در کنترل بیماری‌ها توسط این باکتری‌ها به شمار می‌رود (۹). از جمله مهمترین این ترکیبات می توان به آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴ دی‌استیل فلوروگلوسینول[2]، فنازین[3]، پایولوتئورین[4]، اگروسین۸۴[5]، هربیکولین[6]، اومایسین[7]، پیرولنیترین[8] اشاره کرد(۱۳ و۱۵ و۱۶ و ۷ و۳۵ و۱۹ و۲۰و ۲۳). آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سودوموناس‌ها، روی فعالیت طیف وسیعی از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها اثر بازدارنده دارند. کلنیزاسیون موثر ریشه توسط باکتری‌ها و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها در منطقه ریزوسفر می‌تواند عامل مهمی در کنترل بیماری‌های گیاهی به خصوص بیماری‌های خاک‌زاد باشد (۲۴).

فنازین‌ها ترکیبات هتروسیکلیک حاوی ازت با وزن مولکولی پایین می‌باشند. توانایی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین علاوه بر جنس *Pseudomonas* در جنس‌های *Streptomyces*، *Nocardia*، *Sorangium*، *Brevibacterium* و *Burkholderia* نیز گزارش شده است (۱۴ و۳۱). بسیاری از گونه‌های سودوموناس نظیر *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas aureofaciens*، *Pseudomonas chlororaphis* قادر به تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید[9] می‌باشند. فنازین دارای مشتقات زیادی می‌باشد که از جمله آن می‌توان به فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید (PCA)، فنازین۱- کربوکسامید (PCN[10])، ۲- هیدروکسی فنازین ۱- کربوکسیلیک‌اسید (2-OHPCA[11]) و ۱- هیدروکسی فنازین (1-OHPHZ[12]) اشاره نمود. این ترکیبات از فنازین- ۱- کربوکسیلیک‌اسید مشتق می‌شوند (۹). سیستم آستانه احساس (QS[13]) روابط متقابل بین دو موجود را تحت تاثیر قرار می دهد و از دو جزء quorum به معنای "حدنصاب" وsensing به معنای "احساس" تشکیل شده است. این سیستم در واقع یک مکانیسم سیگنالی سلول به سلول است که به‌وسیله آن باکتری بیان برخی ژن‌های وابسته به تراکم سلولی را کنترل می‌کند. فرآیندی که باکتری توسط آن تراکم سلولی جمعیتش را مشخص می‌کند و از این اطلاعات برای تنظیم بیان ژن‌ها استفاده می‌کند، بنابراین سیستم کوروم سنسینگ یک مثال از رفتار چندسلولی در دنیای تک‌سلولی باکتری ها می‌باشد (۹ و۳۳).

این سیستم با تولید سیگنال‌های شیمیایی موسوم به ان- اسیل هموسرین لاکتون (*N*-AHL[14]) روی فعالیت‌های آنتاگونیستی نقش به‌سزایی دارد. سیگنال فوق ازسیگنال‌های شیمیایی است که در باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شود و در بیماری‌زایی و خصوصیات آنتاگونیسی نقش مهمی ایفا می‌کند (۹).

در تولید آنتی‌بیوتیک فنازین سیستم آستانه احساس دخیل بوده که در باکتری‌های گرم منفی مهم‌ترین سیگنال این سیستم ان- اسیل‌هموسرین لاکتون‌ها می‌باشد. سیستم QS متشکل از سیستم پروتئینی ۲ جزئی به نام LuxI/LuxR می باشدکه این سیستم رفتارهای وابسته به جمعیت را در باکتری‌های تنظیم می‌کند. محصول LuxI یک سیگنال شیمیایی است به نام AHL، که افزایش تولید AHL و پراکنده‌شدن یا پخش آن درمحیط باکتری از طریق پروتئین LuxR روی بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله تعدادی از ژن‌های موثر در کلنیزاسیون و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها دخالت می‌کند. ژن‌های دخیل در بیوسنتزآنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید نیز در خانواده LuxI/LuxR قرار می‌گیرند. در واقع ژن *phzI* سنتز سیگنال *N*-AHL را کد می‌کند. این سیگنال‌ها به فضای خارج سلولی رانده می‌شوند. ورود مجدد سیگنال تحت پتانسیل اسمزی سبب فعال‌شدن ژن *phzR* به عنوان مسئول رونویسی محدوده ژنی پایین‌دست آن یعنی ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک می‌گردد که در جدایه جهانی 2-79 *P.fluorescens* اپرون بیوسنتز فنازین شامل ژن های*phzABCDEFG* می‌باشند. این واکنش‌ها زمانی رخ می‌دهد که جمعیت باکتری به آستانه خاصی برسد چون در جمعیت پایین باکتری، سیگنال‌ها پس از خروج از سلول در فضای اطراف پخش‌شده و وارد سلول نمی‌شوند (۹ و۱۰). مکانیسم کنترل بیمارگرها توسط آنتی‌بیوتیک فنازین هنوز دقیقا مشخص نشده است ولی به نظر می‌رسد که این آنتی‌بیوتیک با ورود به درون غشای سلولی به عنوان عامل احیاکننده عمل‌کرده وبا ایجاد اختلالات در سلول، بنیان های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تولید می‌کند که برای میکروارگانیسم خطرناک است (۹). توماشو و ولر (۳۶) نشان دادندکه استرین 2-79 *P.fluorescens* تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسیدمی‌کند که روی عامل بیماری پاخوره موثر است. بال (۶) برای

1 - Induced Systemic Resistance
2 -2,4-diacetylphloroglucinol
3 -Phenazine
4 -Pyoluteorin
5 - Agrocin84
6 - Herbicolin
7 - Oomycin
8 - Pyrrolnitrin
9 - Phenazine-1-carboxylic acid
10 - Phenazine-1-carboxamide
11 - 2-Hydroxyphenazine-1-carboxylic acid
12 - 1-Hydroxyphenazine
13 - Quorum Sensing
14 - N-acyl-L-homoserine lactone

اولین بار ثابت کرد که فنازین نقش اصلی را در کنترل عامل پاخوره دارد. محققین بسیاری به بررسی نقش آنتی‌بیوتیک فنازین در کنترل بیماری پاخوره‌گندم پرداخته اند (۲۱ و۳۹). در تحقیقی بر روی سودوموناس‌های فلورسنت و نقش آن در کنترل بیولوژیک قارچ Ggt نشان داده شد، آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید مهم‌ترین عامل در کنترل قارچ می‌باشد (۲۶).

براساس نقش مهم این آنتی‌بیوتیک در کاهش شدت بیماری پاخوره‌گندم این تحقیق با هدف ردیابی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت دارای ژن بیوسنتز فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید و بررسی توانایی آن‌ها در کنترل بیولوژیکی پاخوره‌گندم در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفرگندم

به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت تعداد ۶۰ نمونه خاک (شامل ریشه و خاک ناحیه ریزوسفر) از مناطق مختلف استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی جمع‌آوری گردید. سپس یک گرم از خاک ریزوسفری از نمونه‌ها جدا و آنگاه با استفاده از آب پپتون استریل (پپتون ۲ گرم، آب‌مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر) سری رقت 10^{-1} تا 10^{-7} تهیه شد. رقت‌های مختلف روی محیط‌کشت کینگ ب آگار (KB[1]) پخش شدند و به‌منظور رشد باکتری‌ها پلیت‌ها در دمای ۲۸°C در انکوباتور قرارگرفتند. پس از گذشت ۷۲- ۴۸ ساعت، پرگنه‌های رشد یافته مجددا جهت خالص سازی روی محیط کینگ ب آگار رشد داده شدند. در مرحله بعد پرگنه‌های خالص‌شده باکتری‌ها با استفاده از لامپ UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر از نظر تولید رنگدانه فلورسنتس مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌ها به‌منظور آزمایشات بعدی درون سولفات‌منیزیوم (۰/۱ مولار) نگهداری شدند (۳۶).

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت و انتخاب جدایه‌های برتر

جهت شناسایی باکتری‌ها، انجام تست‌های شناسایی بر اساس روش شاد و همکاران (۳۴) صورت گرفت. واکنش های کاتالاز، اکسیداز، رشد بی‌هوازی، گرم، تولید آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان از سوکروز روی محیط آگار مغذی حاوی سوکروز پنج درصد، احیای نیترات، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ ب، رشد در دماهای ۴ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد و مصرف قندهای سوربیتول و ال آرابینوز در جدایه‌های انتخاب شده صورت پذیرفت.

1 - King, s Medium B

بازدارندگی از رشد قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* توسط سودوموناس‌های فلورسنت در تشتک پتری

به‌منظور بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها از دو محیط‌کشت PDA و KB استفاده شد. در این بررسی از ۲۱ جدایه باکتری و یک جدایه قارچ استفاده شد. جدایه‌های باکتری به مدت۲۴ساعت در دمای۲۸°C رشد داده شدند. سپس با استفاده از لوپ استریل باکتری رشد یافته در فاصله ۰/۵ سانتی‌متری لبه تشتک پتری به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و به‌صورت هم‌زمان قطعه‌ای از قارچ Ggt به قطر یک سانتی‌متر که به مدت چهار روز درون محیط‌کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA[2]) رشد داده شده بود، در وسط پتری قرار داده شد. برای هر جدایه باکتری در این آزمون سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون در دمای۲۵°C و گذشت مدت زمان چهار روز، هنگامی که هیف‌های قارچ کل پتری شاهد را پر کردند، بازدارندگی از رشد قارچ در تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون بر روی محیط‌کشت کینگ ب آگار نشان دهنده هاله بازدارندگی بیشتر در مقابل قارچ Ggt بوده است (۳۶).

ردیابی ژن (*phzC*, *phzD*) بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR[3])

به منظور استخراج DNA ژنومی جدایه‌های باکتریایی، از روش ستیل‌تری‌متیل‌آمونیوم‌بروماید (CTAB[4]) استفاده شد.

چند لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط کینگ ب به میکروتیوپ‌های ۱/۵cc حاوی ۱ cc آب مقطر استریل افزوده شد. پس از ۳۰ ثانیه ورتکس، نمونه‌ها بمدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد. پس از افزودن ۳۰ µl از محلول ۲۰٪ SDS و ۵۶۷ µl بافر استخراج به هر نمونه، ۳۰ ثانیه به آرامی ورتکس انجام شد و به‌مدت ۱۰-۵ دقیقه نمونه‌ها در دست تکان داده شد و سپس ۲۰ دقیقه در حمام بن ماری ۶۵ °C قرار گرفت، هر پنج دقیقه میکروتیوپ‌ها به آرامی تکان داده شد. به هر نمونه ۹۰ µl از محلول NaCl ۵M و ۸۰ از محلول CTAB افزوده و سپس به آرامی تکان داده شد و۲۰ دقیقه در حمام بن ماری در دمای۶۵°C قرار گرفت. سپس ۷۶۷ µl محلول کلروفرم-ایزوآمیل به هر نمونه افزوده شد. سپس به آرامی نمونه‌ها را تکان داده و

2 - Potato Dextrose Agar
3 - Polymerase Chain Reaction
4 - Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

به‌مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۴۰۰ سانتریفوژ شد. در این مرحله سه فاز کاملاً مجزا تشکیل می‌گردد. فاز رویی(µl ۳۵۰) به میکروتیوپ استریل جدیدی منتقل شد. به هر نمونه به میزان ۰/۸ حجم محلول برداشته شده قبلی، ایزوپروپانول سرد افزوده شد و سپس به آرامی به‌صورت دورانی تکان داده شد تا زمانی که کلاف DNA به صورت ابر سفید مشاهده گردد و پس از ۴۵-۳۰ دقیقه نگهداری در فریزر به‌مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۴۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی حذف‌شده و رسوب DNA را با الکل ۷۰ درصد شستشو داده و در دمای اتاق در زیر هود رسوب خشک شد. رسوب DNA در µl ۳۰ آب مقطر استریل حل شد و در °C ۲۰-. نگهداری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دوآغازگر ۲۰ نوکلئوتیدی PCA2a و PCA3b (ساخت شرکت تکاپوزیست) انجام شد. آغازگرهای PCA2a و PCA3b براساس توالی ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک PCA در استرین *P. fluorescens* 2-79 و به‌ترتیب براساس توالی ژن‌های *phzC* و *phzD* طراحی شده بودند (۳۰). مشخصات آغازگرها در جدول۱ آورده شده است.

جدول۱- آغازگرهای PCR مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های بیوسنتز PCA (۳۰)

آغازگر	توالی
PCA2a	TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC
PCA3b	CCGCGTTGTTCCTCGTTCAT

واکنش PCR در ۲۵µl (چهار میکرولیتر DNA ، یک میکرولیتر از هر پرایمر و مابقی آب) بر اساس روش رایمیکرز و همکاران (۱۹۹۷) صورت گرفت. برای صحت انجام آزمایش و کنترل آلودگی، در یک واکنش به جای اضافه‌کردن DNA ژنومی از آب مقطر سترون (به عنوان شاهد منفی) و برای شاهد مثبت نیز از استرین *P. fluorescens* 2-79 دارای توانایی تولید PCA استفاده شد (۹). جدایه P4 نیز به عنوان جدایه دارنده ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید از کلکسیون باکتری‌های دانشگاه تهران انتخاب گردید. پس از انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل (Biometra,Germany)، قطعات تکثیرشده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت یک و نیم ساعت در ولتاژ ۸۵ ولت از یکدیگر جداشدند. پس از انجام الکتروفرز، ژل زیر نور ماوراءبنفش مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۰).

ارزیابی بیان ژن‌های بیوسنتز فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید در جدایه‌های انتخاب‌شده

جدایه‌های باکتریایی موردنظر به همراه استرین *P. fluorescens* CHA0 به عنوان شاهد منفی بر روی محیط تریپتیک سوی آگار (TSA[1]) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. در مرحله بعد باکتری‌های رشدیافته روی محیط PDA مخطط شدند. پس از چهار روز نگهداری در دمای °C ۲۸ ، تولید رسوب سبز تیره یا رسوبات کریستالی در مرکز کلنی باکتری که بیانگر تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید است مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه باکتری انجام گردیده شد (۱۲).

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در کنترل بیماری پاخوره‌گندم در شرایط گلخانه

بدین منظور از یک جدایه قارچ (T1 که از نواحی آلوده به بیماری پاخوره در استان مرکزی جداسازی شده بود) و ۲۱ جدایه باکتری (۱۹ جدایه باکتریایی جداسازی شده از ریزوسفر گندم از استان خراسان، جدایه *P. fluorescens* 2-79 و جدایه P4 از کلکسیون آزمایشگاه بیوکنترل دانشگاه تهران) استفاده شد.

برای تهیه زادمایه قارچ از محیط‌کشت ارزن همراه با ماسه به نسبت۱:۱ استفاده شد. قارچ Ggt به مدت چهار روز روی محیط‌کشت PDA ضعیف‌شده رشد داده شد و به میزان ۱۰ قطعه هشت میلی‌متری درون محیط‌کشت ارزن و ماسه ریخته شد. سپس محیط‌ها در دمای °C ۲۵-۲۲ به مدت چهارهفته نگهداری شد. این زادمایه به نسبت پنج درصد با خاک سیلت لوم استریل شده گلدان‌های ۸۰۰ گرمی مخلوط گردید. برای آغشته سازی بذور با باکتری، ابتدا باکتری‌ها در محیط‌کشت Nutrient broth yeast extract agar کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای °C ۲۷ در انکوباتور قرار داده شدند. باکتری‌های رشد یافته با پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل از روی محیط‌کشت شسته شدند و دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط King B کشت داده شد. از محیط جدید سوسپانسیون دیگری تهیه شد و به آن به میزان ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز اضافه گردید. این سوسپانسیون دارای CFU 10^{8}-10^{7} باکتری بود که بر اساس میزان جذب در طول موج ۵۴۶ نانومترکه تقریبا برابر ۰/۱ می‌باشد تعیین می‌گردد. بذرها به مدت ۴۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری حاوی کربوکسی متیل سلولز قرار داده شدند. سپس هفت عدد بذر در هر گلدان بین دو لایه ماسه قرار داده شد. تیمار شاهد سالم بدون افزودن قارچ و شاهد آلوده با افزودن قارچ در نظرگرفته شدند. گلدان‌ها به مدت چهار هفته در شرایط گلخانه در تیرماه در دمای ۲۸-۲۰ قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲۳ تیمار و سه تکرار انجام شد. پس از زمان مذکور گیاهچه‌ها از گلدان‌ها خارج‌شده و با آب‌جاری شستشو

1 - Trypticase Soy Agar

داده شدند و بر اساس میزان آلودگی بین ۵-۰ درجه‌بندی شدند. این شاخص سنجش آلودگی به صورت درجه صفر به مفهوم ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه‌های نکروزه، یک به مفهوم ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه‌ها فاقد هرگونه علائم، دو به مفهوم ریشه‌ها دارای لکه‌های ممتد نکروزه (نکروز بیشتر از ۲۵ و کمتر از ۵۰ درصد)، سه به مفهوم نکروز بیشتر از۵۰ درصد ریشه‌ها و کمتر از ۷۵ درصد و ظهور سیاه‌شدگی طوقه، چهار به مفهوم ریشه‌ها تقریبا سیاه‌رنگ با توسعه ۷۵ درصد سیاه‌شدگی طوقه و پنج به مفهوم ریشه‌ها و طوقه کاملا سیاه‌رنگ و سبز خشک‌شدن گیاه می‌باشد (۲۸). پس از حذف رطوبت سطحی گیاهان، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی و وزن کل گیاه نیز ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار MSTATC مورد بررسی قرار داده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

بر اساس آزمون‌های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی، ۱۳۰ جدایه به عنوان سودوموناس فلورسنت شناسایی شدند.

نتایج تست بازدارندگی از رشد قارچ *Gaeumannomyces graminis* var.*tritici*

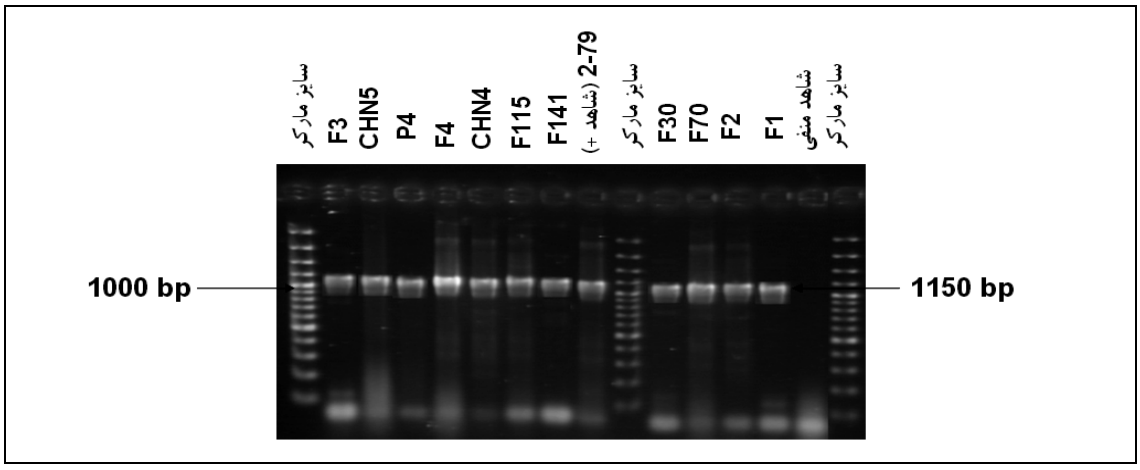
از میان جدایه‌های سودوموناس فلورسنت، ۱۹ جدایه به عنوان مناسب‌ترین جدایه‌ها بر اساس تست آنتاگونیست انتخاب شدند که شامل استرین‌های F1 ، F2 ، F3 ، F4 ، CHN5، CHN4، F115 ، F141 ، F30 ، F70 ، F31 ، F132 ، F138 ، F126 ، F13 ، F12 ، F140 ، KAF2-2 ، F66 ، بودند. این جدایه‌ها دارای هاله بازدارندگی بین ۱۴/۶۶-۳ میلی‌متر بودند.

ردیابی ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید

با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای PCA2a و PCA3bقطعه DNA به طول تقریبی۱۱۵۰ جفت باز از دسته ژنی بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید تکثیر شد. بر این اساس جدایه‌های F141،CHN5، CHN4،F70،F30،F2، F1،F3،F4،F115،P4 و 2-79 واجد ژن بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک بودند (شکل۱).

شناسایی جدایه‌های واجد ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید

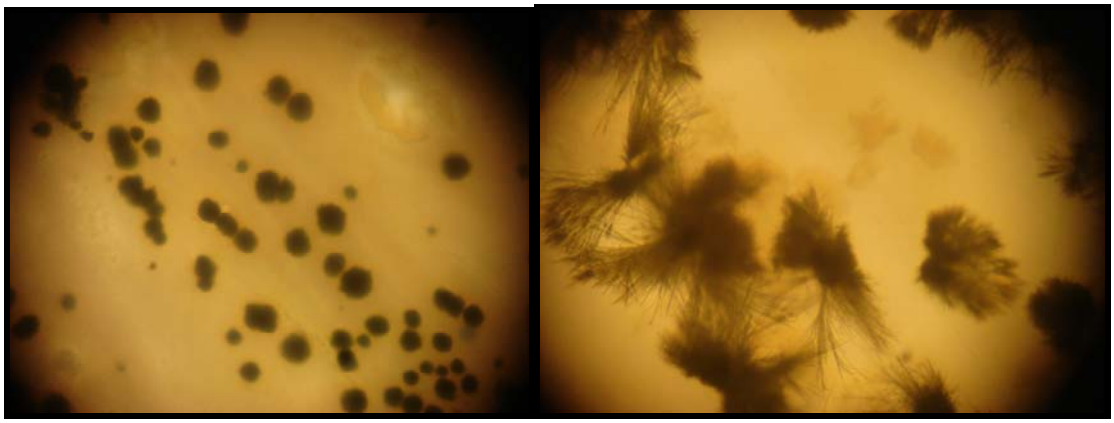
۱۰ جدایه باکتری واجد ژن‌های بیوسنتز PCA که از استان خراسان جداسازی شده بودند، در حد گونه شناسایی شدند. بدین ترتیب جدایه‌های F1 و F2 و F3 و F4 و در گونه *Pseudomonas chlororaphis* و جدایه‌های CHN5 و CHN4 در گونه *P. fluorescens* bv. I و F141 ، F30 ، F70 ، F115 در گونه *P. fluorescens* bv. III قرار گرفتند.



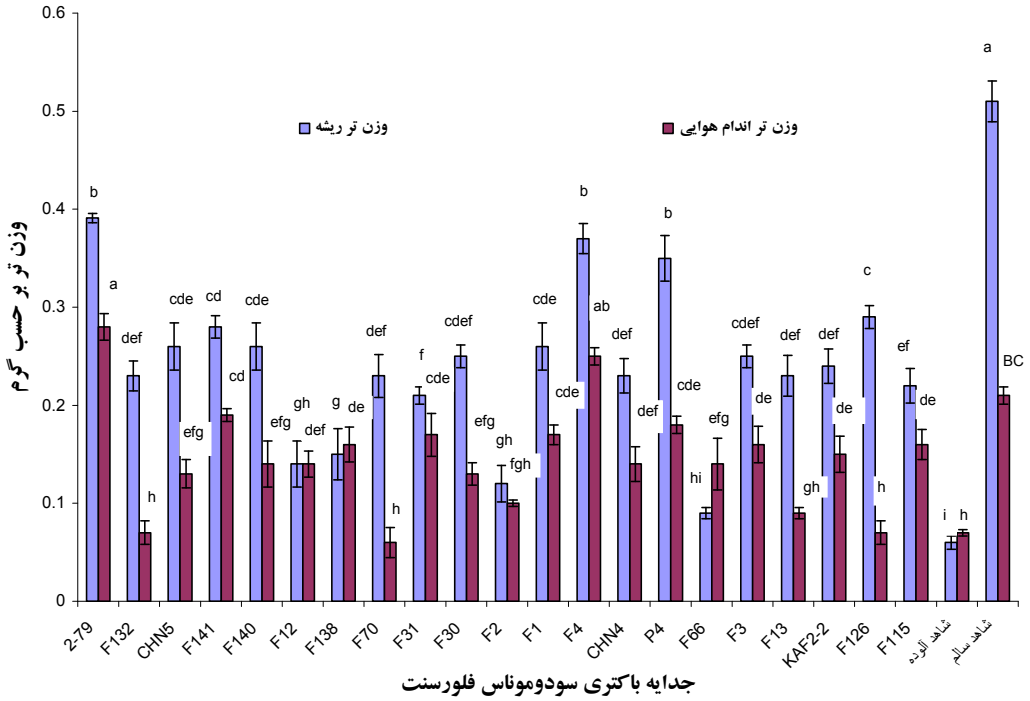
شکل۱- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR، تکثیر شده از DNA ژنومی استرین‌های *Pseudomonas* با پرایمرهای PCA2a و PCA3b. ستون اول نشان‌گر اندازه 1 kb و ستون‌های بعدی نام جدایه‌های مورد استفاده می‌باشد.

تولید رسوب سبز تیره یا کریستالی آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید

پس از انجام تست کیفی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید، تولید این آنتی‌بیوتیک در پنج جدایه F1، F3، F4، F141، P4 و جدایه جهانی 2-79 با ایجاد کریستال‌های سبز تیره‌رنگ در مرکز کلنی‌ها به اثبات رسید (شکل۲). نتایج این آزمایش با استرین CHA0 به عنوان شاهد منفی مقایسه گردید.



شکل۲- تشکیل رسوب کریستالی فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید در مرکز پرگنه‌های باکتری‌های سودوموناس فلورسنت تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در محیط سیب زمینی دکستروزآگار



نمودار۱- تاثیر جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه گیاه گندم رقم فلات در حضور قارچ Ggt چهار هفته بعد از

کاشت. ستون‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند. خطوط بالای نمودار ها نشان‌دهنده SE± (خطای استاندارد) می‌باشد.

توانایی جدایه‌های سودوموناس در کنترل بیولوژیکی Ggt در گلخانه

نتایج حاصل از کاربرد جدایه‌های باکتریایی در شرایط گلخانه در حضور قارچ Ggt نشان داد که جدایه‌های 2-79، F4، P4،F141، F1، و F3 بیشترین اثر را در کنترل بیماری پاخوره‌گندم و افزایش وزن تر بوته‌های گندم در خاک آلوده به Ggt داشتند (نمودار ۱). جدایه‌های F115، F70، F30، CHN5و CHN4 نیز عملکرد خوبی را در کاهش شدت بیماری پاخوره از خود نشان دادند.

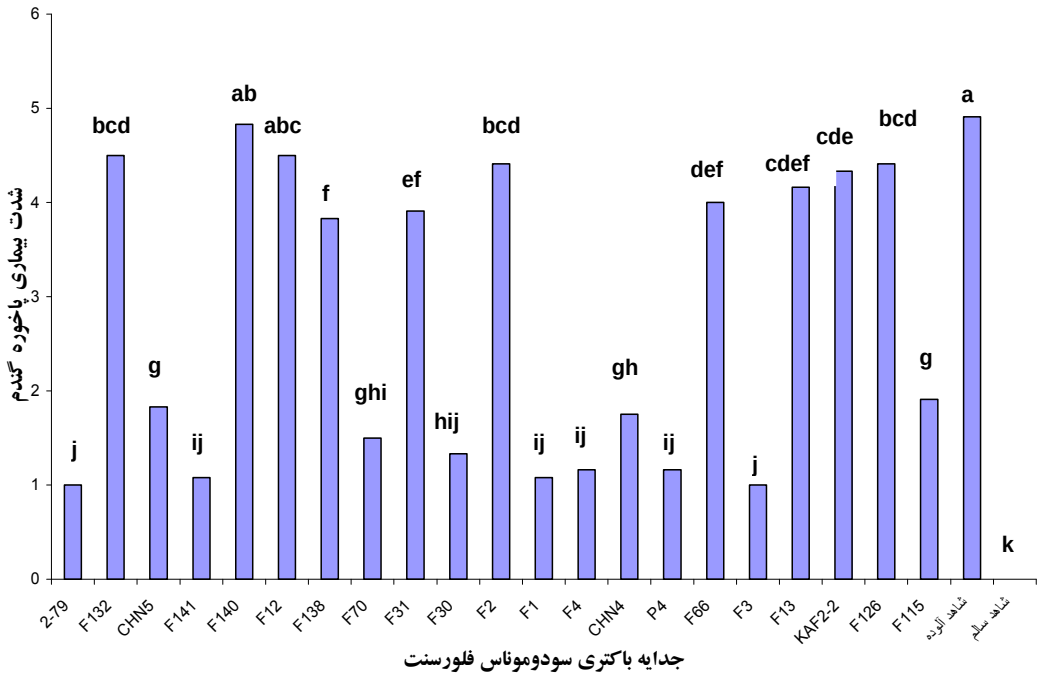
پس از تعیین شاخص آلودگی نتایج نشان‌دهنده کاهش شدت بیماری پاخوره‌گندم در گیاهان تیمارشده با جدایه‌های باکتری بود. میزان آلودگی گیاهان تیمارشده با جدایه‌های باکتری پایین بود و جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید شدت بیماری پاخوره‌گندم را نسبت به سایرین بسیار کاهش داده بودند (نمودار۲).

بر اساس نتایج این تحقیق، جدایه‌های 2-79،F4، F3، F1 ، P4 و F141 شدت بیماری پاخوره‌گندم را به میزان ۸۰-۷۷ درصد پایین آوردند. جدایه‌های F115، F70، F30، CHN5 وCHN4 نیز موجب کاهش شدت بیماری پاخوره‌گندم به میزان ۷۴-۶۲ شدند و جدایه F2 شدت بیماری را ۱۲ درصد کاهش داد .

بحث

نقش باکتری‌های کلنیزه‌کننده ریشه در کنترل بیمارگرهای گیاهی بسیار حائز اهمیت است (۱۱). مکانیسم‌های مختلفی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی وجود دارد که از جمله مهم‌ترین‌های آن‌ها می‌توان به تولید سیدروفر، سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود. همان‌گونه که ذکر شد سودوموناس‌های فلورسنت به دو روش مستقیم و غیر مستقیم سبب جلوگیری از فعالیت بیمارگرها می‌گردد. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها با تاثیر بر روی بیمارگر و مختل ساختن اعمال حیاتی بیمارگرها از جمله مکانیزم‌های مهم در کنترل بیولوژیک محسوب می‌گردند. تولید آنتی‌بیوتیک فنازین توسط سودوموناس‌های فلورسنت از جمله مکانیسم‌های موثر بر روی کاهش فعالیت بیمارگرها به خصوص قارچ Ggt می‌باشد که به عنوان میزبان حساس به آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی شده است (۴ و ۲۱).

در مطالعات بسیاری، از سودوموناس‌های فلورسنت که دارای توانایی تولید آنتی‌بیوتیک هستند در کنترل بیماری پاخوره‌گندم استفاده شده است (۴ و۲۹ و۳۱ و۳۳ و۳۷).



نمودار۲- تاثیر تیمار بذور گندم با جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر کاهش شدت بیماری پاخوره‌گندم

میانگین‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح ۵درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

بـر اسـاس تحقیقـات انجـام‌شـده آنتـی‌بیوتیـک فنـازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید تولیـدشـده بـه‌وسـیله *Pseudomonas* sp. M-18Q نقش بسیار مهمی را درکنترل قـارچ *Fusarium* spp و Ggt ایفاء نموده است (۳۹و۱۷). نتایج مـا نیـز نشـان داد کـه جدایـه‌هـای تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین در آزمون گلخانه‌ای تاثیر بـالایی را در کنترل بیماری پاخوره نشان دادند. به‌طوری‌کـه جدایـه‌هـای F1، F3، F4، F141 ، P4 و 2-79 بیشـترین میـزان بازدارنـدگی را از وقـوع بیماری پاخوره در گلخانه نشان دادند. در تحقیق دیگری که در زمینـه استفاده از بـاکتری‌هـای *P. fluorescens* جدایـه‌هـای Q2-87 و Q8r1-96 علیه بیماری پاخوره‌گندم توسط هیونگ و همکاران انجام گرفت نیز به تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی به عنوان مهم‌ترین عامل در کنترل قارچ Ggt اشاره شده است (۲۱). در تحقیق انجام شده توسـط مدولا و همکاران (۲۶) باکتری *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 به عنوان عامل کنترل بیماری پاخوره بررسی شد؛ یافته‌هـای این پژوهش نشان داد این جدایه با تولیـد آنتـی‌بیوتیـک فنـازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید قادر به بازدارندگی از قارچ Ggt می‌باشد. در بررسی انجـام‌شـده روی گونـه‌هـای *P. chlororaphis* 30-84 و *P. fluorescens* 2-79 مشاهده شد با تیمار بذور بهاره و پاییزه با ایـن دو جدایه بیماری پاخوره‌گندم تا حدود ۶۰ درصد در مزرعه کاهش پیدا کرد (۳۸)

در پژوهش فوق، در آزمون کشت متقابل، مقایسه میـانگین هالـه بازدارندگی نشان داد که تمام ۱۲ جدایه برتر انتخاب شـده کـه دارای ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنـازین۱-کربوکسـیلیک‌اسـید بودنـد، باعـث کاهش رشد میسلیوم قارچ Ggt در شرایط آزمایشـگاه شـدند. جدایـه F4 علاوه بر اینکه در شـرایط آزمایشـگاه دارای توانـایی بازدارنـدگی بالایی از رشد قارچ Ggt بود، در شرایط گلخانـه نیـز موجـب کنتـرل موثر بیماری پاخوره گردید. بر اساس نتایج ایـن پـژوهش، ازمیـان ۱۲ جدایه برتر، در شش جدایه در روش کیفی، تولیدآنتی‌بیوتیک فنـازین-۱-کربوکسیلیک اسید به اثبات رسید. به طورکلی می توان ایـن طـور اثبات کرد که وجود ژن به تنهایی نشان‌دهنده بیـان و یـا بـه عبـارتی تولید محصول ژن نمی‌باشد (۱۰). ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیـک فنـازین-۱-کربوکسیلیک اسید در ۱۲ جدایه از ۲۱ جدایه باکتری استفاده شـده در ایـن پـژوهش یعنـی جدایـه‌هـای F1، F2، F3، F4،F141، F30، F70، F115، CHN4، CHN5، 2-79 وP4 ردیـابی شـد که شش جدایه یعنی جدایه‌های F1، F3، F4، P4، 2-79 و F141 در روش کیفی قادر به تولیـد رسـوب تیـره رنـگ بودنـد. ایـن نتـایج نشان‌دهنده تولید قطعی آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسـید در این شش جدایه مـی‌باشـد. در پـنج جدایـه دیگـر یعنـی جدایـه‌هـای F30، F70، F115، CHN4 وCHN5 هرچنـد در روش کیفـی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسـید هـیچ‌گونـه رسـوبی دیده نشد ولی این جدایه‌ها در شرایط گلخانه خوب عمـل کردنـد. بـر طبـق ایـن نتـایج احتمـال مـی رود کـه در ایـن پـنج جدایـه تولیـد آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید صورت گرفتـه باشـد ولـی تولید آن به میزانی نبوده است که رسوب تیره در محـیط ایجـاد کنـد. چون شرایط محیط‌کشت نیز در تولید آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۱۲). از طرف دیگر احتمال تولید مشتقات آنتـی‌بیوتیـک PCA در ایـن پـنج جدایه نیز وجود دارد زیرا PCA به عنوان مـاده حـد واسـط در سـنتز سایر مشتقات فنازین در سودوموناس‌ها تولید می‌شود به عنوان مثـال وارد شـدن ژن *phzM* سـبب سـنتز پایوسـیانین از فنـازین- ۱-کربوکسیلیک اسید می‌شود که از مشتقات فنازین محسوب می‌گـردد. همچنین ژن *phzO* سبب تولیـد ۲-هیدروکسـی فنـازین، ژن *phzS* سبب تولید ۱-هیدروکسی فنازین و ژن *phzS* سبب تولید فنازین ۱-کربوکسامید می‌گردد (۱۰). از آنجایی‌که سایر مشتقات فنازین نیـز در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش عمده‌ای دارند، لذا کنترل خوب ایـن جدایه‌ها با احتمال تولید سایر مشتقات فنازین نیـز ملمـوس مـی‌باشـد (۱۷).

در جدایه F2 ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین- ۱-کربوکسـیلیک اسید ردیابی شد ولی در روش کیفـی تشـکیل رسـوب بـه‌وسـیله آن مشاهده نگردید. این جدایه در کنترل بیماری پاخوره در شرایط گلخانه نیز تاثیر خوبی نداشته است. لذا از آنجـایی‌کـه مـدیریت بخـش‌هـای مختلف خاک برای اجرای صحیح فعالیـت عامـل آنتاگونیسـت نقـش موثری دارد (۱۸) می توان چنین بیان کرد کـه ژن در ایـن جدایـه در شرایط گلخانه ای بیان نشده است و یا ممکن است باکتری در خـاک از بین رفته باشـد و یـا آنتـی‌بیوتیـک تولیـد شـده باشـد ولـی جـذب کلوئیدهای خاک‌شده باشد، زیرا کنترل بیولوژیک عوامل آنتاگونیسـت به بسیاری از فاکتورهای زنده و غیـر زنـده در خـاک بسـتگی دارنـد. هیدینک و همکاران (۱۸) در بررسی های خـود مشـاهده کردنـد کـه تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک در کـاهش بیمـاری پـاخوره بسـیار مـوثر می‌باشد ولی ممانعت از بیماری در مدت زمـان طـولانی بسـتگی بـه فاکتورهای محیطی دارد. فاکتورهایی نظیـر دمـا، رطوبـت، ترشـحات ریشه در فعال‌شدن میکروارگانیسـم و تشـکیل اجتماعـات در اطـراف ریشه و تولید متابولیت ها نقش دارند (۱۸). از طرف دیگر کلنیزه‌کردن موثر ریشه توسط باکتری نیـز بسـیار حـائز اهمیـت اسـت (۲۹). ایـن احتمال وجود دارد که جدایه F2 کلنیـزه کننـده قـوی ریشـه نبـوده و نتوانسته است به خوبی ریشه گیاهچه‌های گندم را در برابر قارچ Ggt حفاظـت کنـد . بـه طـور کلـی نتـایج نشـان داد شـش جدایـه 2-

F1،F141،79، F4، P4 و F3 کنترل بالایی را در برابر قارچ Ggt داشته‌اند. در این جدایه‌ها به‌ترتیب شدت بیماری ۲۰، ۲۱، ۲۱، ۲۳، ۲۳ و ۲۰ درصد و در جدایه‌های CHN5، CHN4، F70، F30 و F115 شدت بیماری به ترتیب ۳۶ و ۳۵ و ۳۰ و ۲۶ و ۳۸ درصد بود. در جدایه F2 نیز شدت بیماری ۸۸ درصد مشاهده شد. شانسی و همکاران (۸) نیز نشان دادند که تولید آنتی‌بیوتیک فنازین در *P.aureofaciens* 30-84 سبب کنترل بیماری پاخوره گندم تا ۹۰درصد می‌گردد.

بر این اساس نقش اساسی و مهم آنتی‌بیوتیک فنازین۱- کربوکسیلیک اسید در کنترل بیماری پاخوره توسط جدایه های تولیدکننده آن دیده شد. در شش جدایه تولید کننده آنتی‌بیوتیک فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید کنترل بیماری پاخوره گندم به خوبی صورت گرفت. همان‌گونه که مشاهده شد این جدایه‌ها شدت بیماری پاخوره را ۸۰-۷۷ درصد کاهش دادند. بر این اساس و انطباق داده‌ها با پژوهش‌های دانشمندان با احتمال بسیار بالایی نقش این آنتی‌بیوتیک در پژوهش ما دیده شد.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از دو جدایه باکتری که یکی مربوط به کلکسیون باکتری دانشکده‌کشاورزی دانشگاه تهران و دیگری مربوط به دانشگاه لوزان سوئیس می‌باشد. لازم است از جناب آقای دکتر صابری و مسئولین آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده‌کشاورزی دانشگاه‌تهران به خاطر راهنمایی‌های ارزنده و تهیه این جدایه‌ها تشکر نمایم. از سرکار خانم مهندس صادقی جهت جداسازی قارچ و امکان اجازه استفاده از آن در این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

1- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., and Vivanco J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology 57: 233-266.
2- Bagnasco P., Delafuente L., Gualtieri G., Noya F., and Anas A. 1998. Flourescent *Pseudomonas* as biocontrol agent against forage legume root pathogenic fungi. Soil. Biol. Biochem. 30: 1317-1322.
3- Bakker P. A. H. M., Ran L. X., Pieterse C. M. J. and Van loon L. C. 2003. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant disease. Journal of Plant Pathology 25: 5-9.
4- Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J., and Van Loon L. C. 2007. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology 97: 239-243.
5- Botelho G. R., and Mendonça-Hagler L. C. 2006. Fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere of crops-an overview. Brazilian Journal of Microbiology 37: 401-416.
6- Bull C. T. 1987. Wheat root colonization by disease-suppressive or nonsuppressive bacteria and the effect of population size on severity of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var.*tritici*. Ms Thesis, Washington State university. (Abstract).
7- Caroll, H., Moenne-Loccoz, Y., Dowling, D., and Ogra, F. 1995. Mutational disruption of the biosynthesis genes coding for the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugar beets. Applied Environmental Microbiology 61: 3002-3007.
8- Chancey S. T., Wood D. W., Pierson E. A., and Pierson III, L. S. 2002. Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 68(7): 3308-3314.
9- Chin-A-Woeng T. F. C., Bloemberg G. V., and Lungtenberg B. J. J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria.Institute of Molecular Plant Sciences 157: 503-523.
10- Delaney, S. M., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., and Thomashow, L. S. 2000. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Journal of Bacteriology 183(1): 318-327.
11- Dubuis C., Keel C., and Hass D. 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. European Journal of Plant Pathology 119: 311-328.
12- Ellis R. J., Timms-Wilson T. M., and Bailey M. J. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. Enviromental Microbiology 2: 274-284.
13- Ge Y., Huang X., Wang S., Zhang X., and Xu., Y. 2004. Phenazine-1-carboxylic acid is negatively regulated and pyoluteorin positively regulated by *gac*A in *Pseudomonas* sp. M18. FEMS Microbiology letters 237: 41-47.

14- Giddens S. R., and Bean D. C. 2006. Investigation into the in vitro antimicrobial activity and mode of action of the phenazine antibiotic D-Alanylgriseoluteic acid. Journal of Antimicrobial agents 29: 93-97.
15- Girard G., Lugtenberg B. J. J., and Bloemberg G. V. 2006. Regulatory roles of *psr*A and *rpo*S in phenazine-1-carboxamide synthesis by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. Microbiology 152: 43-58.
16- Girard G., Barends S., Rigali S., Van Rij E. T., Lugtenberg B. J. J., and Bloemberg G. V. 2006. Pip, a novel activator of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. Journal of Bacteriology 188(23): 8283-8293.
17- Hernandez M. E., Kappler A. and Newman D. K. 2003. Phenazines and other redox-active antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. Applied and Environmental Microbiology 70(2): 921-928.
18- Hiddink G. A., Bruggen A. H. C., Termorshuizen A. J., Raaijmakers J. M., and Semenov A. V. 2006. 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.
19- Howell C. R., and Stipanovic R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off cotton seedings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology 70: 712-715.
20- Howie W. J., and Suslow T. V. 1991. Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 393-399.
21- Huang Z., Bonsall, R. F., Mavordi D. V., Weller D. M., and Thomashow L. S. 2004. Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of Rhizoctonia root rot and in situ antibiotic production. FEMS Microbiology Ecology 49: 243-251.
22- Kaaijmakers 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 Q81-96. Appl. Environ. Microbiol. 17(3): 2545-2554.
23- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Hass D., and Defago G. 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant-Microbe Interact. 5: 4-13.
24- Khan S. R., Mavordi D. V., Jog G. J., Suga H., Thomashow L. S. and Farrand. S. K. 2005. Activation of the *phz* Operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, *N*-(3-OH-hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a *cis*-Acting *phz* Box. Journal of Bacteriology 187(18): 6517-6527.
25- Leoni L., Ambrosi C., Petrucca, A., and Visca, P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promoting *Pseudomonas* B10. FEMS Microbiology Letters 208: 219-225.
26- Maddula V. R. S. K., Pierson E. A., and Pierson III, L. S. 2008. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition. Journal of Bacteriology 190: 2759-2766.
27- Nagarajkumar M., Bhaskaran R., and Velazhahan R. 2004. Involvement of secondry metaboloties and extracellular lytic enzymes produced dy *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice, sheath blight pathogen. Microbiol. Res. 159: 73-81.
28- Ownley B. H., Weller D. M., and Thomashow L. S. 1992. Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Phytopathology 82: 178-184.
29- Pal K. K., and Scholar V. 2006. Biological control of plant pathogens.Plant Pathology.12:141-149.
30- Raaijmakers J. M., Weller D. M., and Thomashow L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. Applied and Environmental Microbiology 63(3): 881-887.
31- Rane M., Sarode P. D., Chaudhari B. L., and Chincholka S. B. 2007. Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Scientific and Industrial Research. 66: 627-631.
32- Rumjanek N. G., Fonseca M. C. C., and Xavier G. R. 2004. Quorum sensing em sistemas agricolas: Rev. Biotecnol. 33: 35-50.
33- Sanguin H., Kroneisen L., Gazengel K., Kyselkova M., Remenant B., Prigent-Combaret C., Grundmann L. G., Sarniguet A., and Moënne-Loccoz Y. 2008. Development of a 16S rRNA microrrray approach for the monitoring of rhizosphere *Pseudomonas* populations associated with the decline of take-all disease of wheat. Soil Biology and Biochemistry 40:1028-1039.

34- Schaad. N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, USA, APS press. 373pp.
35- Schippers B., Bakker A. W., and Bakker P. A. H. M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 339-358.
36-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.
37- Wei H. L., and Zhang L. Q. 2006. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. Antonie van Leeuwenhoek 89: 267-280.
38- Weller D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking bBack over 30 Years. Phytopathology 97: 250-256.
39-Yyan L-L., Li Y-Q., Wang Y., Zhang, X-H., and Xu Y-Q. 2008. Optimization of critical medium components using response surface methodology for Phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas* sp. M-18Q. Journal of Bioscience and Bioengineering 105: 232-237.