

## ردیابی آنتی بیوتیک فنازین - ۱- کربوکسیلیک اسید در سودوموناس های فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر گندم و تاثیر آن در کنترل بیولوژیکی بیماری پاخوره گندم

سمیه الوانی<sup>۱\*</sup> - حمید روحانی<sup>۲</sup> - ماهرخ فلاحتی رستگار<sup>۳</sup> - مسعود احمدزاده<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۲

### چکیده

بیماری پاخوره گندم با عامل قارچی (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (Ggt) یکی از مهم ترین بیماری های 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 جدایه های سودوموناس فلورسنت با توانایی بازدارندگی از رشد قارچ، آزمون کشت متقابل باکتری ها با قارچ Ggt در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار و کینگ ب انجام شد. از این میان، ۲۱ جدایه با قابلیت بازدارندگی بین ۵۱/۲۵-۱۱/۲۵ درصد به عنوان جدایه های برتر از نظر ممانعت از رشد قارچ Ggt انتخاب شدند. برای ردیابی ژن بیوسنتز آنتی بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید (PCA)، روش PCR با استفاده از پرایمرهای PCA2a و PCA3b انجام شد. نتایج نشان داد ۱۲ جدایه از ۲۱ جدایه انتخاب شده حاوی ژن بیوسنتز آنتی بیوتیک PCA بودند. جهت بررسی تولید این آنتی بیوتیک از روش کیفی تولید رسوب سبز تیره یا کریستالی در محیط کشت استفاده شد. نتایج نشان دهنده توانایی تولید این آنتی بیوتیک در ۶ جدایه از ۱۲ جدایه حاوی ژن بیوسنتز آنتی بیوتیک بود. در آزمایش های گلخانه ای نیز جدایه های تولید کننده آنتی بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید، نسبت به سایرین از توانایی بیشتری در کنترل بیماری پاخوره گندم برخوردار بودند و شدت بیماری را ۸۰-۷۷ درصد کاهش دادند. با کاربرد این جدایه ها همچنین افزایش قابل ملاحظه ای در وزن تر ریشه و بخش های هوایی گیاهان مشاهده شد. نتایج این تحقیق پیشنهاد می کند که احتمالاً آنتی بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید تولید شده توسط جدایه های سودوموناس فلورسنت، در کاهش بیماری پاخوره در گندم نقش دارد.

**واژه های کلیدی:** آنتی بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید، پاخوره، سودوموناس فلورسنت، کنترل بیولوژیکی، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

### مقدمه

از سایر باکتری ها که نمی توانند کلینزاسیون موثری را بر روی ریشه داشته باشند، جدا می گردند (۴ و ۵ و ۳۲). این باکتری ها توانایی خنثی کردن اثرات زیان آور بیمارگرهای گیاهی را به دو طریق دارا هستند. در یک روش باکتری با تولید آنتی بیوتیک، ترشح سیدروفور<sup>۶</sup>، تولید سیانید هیدروژن<sup>۷</sup>، ترشح آنزیم های برون سلولی مانند کیتیناز<sup>۸</sup>، بتا یک و سه گلوکاناز<sup>۹</sup>، پروتئاز<sup>۱۰</sup> و لیپاز<sup>۱۱</sup> فعالیت عامل بیماری را کاهش و متوقف می سازد (۲ و ۲۲ و ۲۷) در روش دیگر باکتری سبب

پاخوره یا Take-all از بیماری های مهم غلات به ویژه گندم به شمار می رود. این بیماری عموماً به گندم های زمستانه حمله می کند و نقش زیادی در کاهش محصول دارد (۳۸). بررسی های فراوانی مبنی بر کاربرد باکتری های مفید در کاهش شدت بیماری پاخوره در گندم انجام شده است. باکتری های تحریک کننده رشد گیاه (PGPR<sup>۵</sup>) به گروهی از باکتری ها اطلاق می شود که خود را با ریشه های گیاهان بر اساس ترشحات آن ها آدابته کرده و به این ترتیب

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

- 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 بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تهران
- 5 - plant growth promoting rhizobacteria

"احساس" تشکیل شده است. این سیستم در واقع یک مکانیسم سیگنالی سلول به سلول است که به وسیله 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 باکتری‌ها می‌باشد (۹ و ۳۳).

این سیستم با تولید سیگنال‌های شیمیایی موسوم به ان-اسیل هموسرین لاکتون ( $N\text{-AHL}^4$ ) روی فعالیت‌های آنتاگونیستی نقش به‌سزایی دارد. سیگنال فوق از سیگنال‌های شیمیایی است که در باکتری‌های گرم منفی تولید می‌شود و در بیماری‌زایی و خصوصیات آنتاگونیستی نقش مهمی ایفا می‌کند (۹).

در تولید آنتی‌بیوتیک فنازین سیستم آستانه احساس دخیل بوده که در باکتری‌های گرم منفی مهم‌ترین سیگنال این سیستم ان-اسیل هموسرین لاکتون‌ها می‌باشد. سیستم QS متشکل از سیستم پروتئینی ۲ جزئی به نام LuxI/LuxR می‌باشد که 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 در محیط باکتری از طریق پروتئین LuxR روی بیان بسیاری از ژن‌ها از جمله تعدادی از ژن‌های موثر در کلینزاسیون و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها دخالت می‌کند. ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید نیز در خانواده LuxI/LuxR قرار می‌گیرند. در واقع ژن *phzI* سنتز سیگنال  $N\text{-AHL}$  را کد می‌کند. این سیگنال‌ها به فضای خارج سلولی رانده می‌شوند. ورود مجدد سیگنال تحت پتانسیل اسمزی سبب فعال شدن ژن *phzR* به عنوان مسئول رونویسی محدوده ژنی پایین دست آن یعنی ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک می‌گردد که در جدایه جهانی *P. fluorescens* 2-79 اپرون بیوسنتز فنازین شامل ژن‌های *phzABCDEFGHI* 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 پخش شده و وارد سلول نمی‌شوند (۹ و ۱۰). مکانیسم کنترل بیمارگرها توسط آنتی‌بیوتیک فنازین هنوز دقیقاً مشخص نشده است ولی به نظر می‌رسد که این آنتی‌بیوتیک با ورود به درون غشای سلولی به عنوان عامل احیاکننده عمل کرده و با ایجاد اختلالات در سلول، بنیان‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن تولید می‌کند که برای میکروارگانیسم خطرناک است (۹). توماشو و ولر (۳۶) نشان دادند که استرین *P. fluorescens* 2-79 تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسیدی می‌کند که روی عامل بیماری پاخوره موثر است. بال (۶) برای

فعال شدن مکانیسم مقاومت سیستمیک القایی<sup>۱</sup> 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 می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴ دی‌استیل فلوروگلوکوسینول<sup>۲</sup>، فنازین<sup>۳</sup>، پایولوتئورین<sup>۴</sup>، آگروسین<sup>۵</sup>، هریکولین<sup>۶</sup>، اومایسین<sup>۷</sup>، پیرولتئورین<sup>۸</sup> اشاره کرد (۱۳ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۹ و ۲۰ و ۲۳). آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سودوموناس‌ها، روی فعالیت طیف وسیعی از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها اثر بازدارنده دارند. کلینزاسیون 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 *Nocardia*، *Streptomyces*، *Burkholderia* و *Brevibacterium Sorangium* گزارش شده است (۱۴ و ۳۱). بسیاری از گونه‌های سودوموناس نظیر *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas aureofaciens fluorescens*، *Pseudomonas chlororaphis* قادر به تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید<sup>۹</sup> می‌باشند. فنازین دارای مشتقات زیادی می‌باشد که از جمله آن می‌توان به فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید (PCA)، فنازین-۱-کربوکسامید ( $PCN^{11}$ )، ۲-هیدروکسی فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید ( $2\text{-OHPCA}^{11}$ ) و ۱-هیدروکسی فنازین-۱ ( $1\text{-OHPHZ}^{12}$ ) اشاره نمود. این ترکیبات از فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید مشتق می‌شوند (۹). سیستم آستانه احساس ( $QS^{13}$ ) روابط متقابل بین دو موجود را تحت تاثیر قرار می‌دهد و از دو جزء *quorum* به معنای "حدنصاب" و *sensing* به معنای

- 1 - Induced Systemic Resistance
- 2 - 2,4-diacetylphloroglucinol
- 3 - Phenazine
- 4 - Pyoluteorin
- 5 - Agrocicin84
- 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

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

به منظور بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها از دو محیط کشت PDA و KB استفاده شد. در این بررسی از ۲۱ جدایه باکتری و یک جدایه قارچ استفاده شد. جدایه‌های باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ °C رشد داده شدند. سپس با استفاده از لوپ استریل باکتری رشد یافته در فاصله ۰/۵ سانتی‌متری لبه تشک پتری به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و به صورت هم‌زمان قطعه‌ای از قارچ Ggt به قطر یک سانتی‌متر که به مدت چهار روز درون محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA<sup>۱</sup>) 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 دمای ۲۵ °C و گذشت مدت زمان چهار روز، هنگامی که هیف‌های قارچ کل پتری شاهد را پر کردند، بازدارندگی از رشد قارچ در تشک‌های پتری حاوی جدایه‌های باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون بر روی محیط کشت 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 پلیمرز (PCR<sup>۲</sup>)

به منظور استخراج DNA ژنومی جدایه‌های باکتریایی، از روش ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم‌بروماید (CTAB<sup>۳</sup>) استفاده شد. چند لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محیط کینگ ب به میکروتیوب‌های 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 به مدت ۱۰-۵ دقیقه نمونه‌ها در دست تکان داده شد و سپس ۲۰ دقیقه در حمام بن ماری ۶۵ °C قرار گرفت، هر پنج دقیقه میکروتیوب‌ها به آرامی تکان داده شد. به هر نمونه ۹۰ μl از محلول ۵M NaCl و ۸۰ μl از محلول CTAB افزوده و سپس به آرامی تکان داده شد و ۲۰ دقیقه در حمام بن ماری در دمای ۶۵ °C قرار گرفت. سپس ۷۶۷ μl محلول کلروفرم-ایزوامیل به هر نمونه افزوده شد. سپس به آرامی نمونه‌ها را تکان داده و

اولین بار ثابت کرد که فنازین نقش اصلی را در کنترل عامل پاخوره دارد. محققین بسیاری به بررسی نقش آنتی‌بیوتیک فنازین در کنترل بیماری پاخوره گندم پرداخته‌اند (۲۱ و ۳۹). 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).

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

## مواد و روش‌ها

### جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر گندم

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 ریزوسفیری از نمونه‌ها جدا و آنگاه با استفاده از آب پیتون استریل (پیتون ۲ گرم، آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر) سری رقت<sup>۴</sup> ۱۰ تا ۱۰<sup>-۷</sup> تهیه شد. رقت‌های مختلف روی محیط کشت کینگ ب آگار (KB<sup>۱</sup>) پخش شدند و به منظور رشد باکتری‌ها پلیت‌ها در دمای ۲۸ °C در انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت، پرگنه‌های رشد یافته مجدداً جهت خالص‌سازی 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 به منظور آزمایشات بعدی درون سولفات‌منیزیم‌یوم (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. واکنش‌های کاتالاز، اکسیداز، رشد بی‌هوازی، گرم، تولید آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تولید لووان 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 آل‌آرابینوز در جدایه‌های انتخاب شده صورت پذیرفت.

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

1 - King, s Medium B

آگار (TSA<sup>1</sup>) 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 ۲۸ °C، 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 بیوتکنرل دانشگاه تهران) استفاده شد.

برای تهیه زادمایه قارچ از محیط‌کشت ارزن همراه با ماسه به نسبت ۱:۱ 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 ۲۵-۲۲ °C به مدت چهارهفته نگهداری شد. این زادمایه به نسبت پنج درصد با خاک سیلت لوم استریل شده گلدان‌های ۸۰۰ گرمی مخلوط گردید. برای آغشته‌سازی بذور با باکتری، ابتدا باکتری‌ها در محیط‌کشت Nutrient broth yeast extract agar کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ °C 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 ۱۰<sup>۷</sup>-۱۰<sup>۸</sup> CFU باکتری بود که بر اساس میزان جذب در طول موج ۵۴۶ نانومتر که تقریباً 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 نظر گرفته شدند. گلدان‌ها به مدت چهار هفته در شرایط گلخانه در تیرماه در دمای ۲۸-۲۰ °C قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۳ تیمار و سه تکرار انجام شد. پس از زمان مذکور گیاهچه‌ها از گلدان‌ها خارج شده و با آب‌جاری شستشو

به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۴۰۰ سانتریفوژ شد. در این مرحله سه فاز کاملاً مجزا تشکیل می‌گردد. فاز رویی (۳۵۰ μl) 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 به صورت دورانی تکان داده شد تا زمانی که کلاف DNA به صورت ابر سفید مشاهده گردد و پس از ۴۵-۳۰ دقیقه نگهداری در فریزر به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۴۰۰ سانتریفوژ شد. محلول رویی حذف شده و رسوب DNA را با الکل ۷۰ درصد شستشو داده و در دمای اتاق در زیر هود رسوب خشک شد. رسوب DNA در ۳۰ μl آب مقطر استریل حل شد و در ۲۰ °C نگهداری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دو آغازگر 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 به ترتیب براساس توالی ژن‌های *phzD* و *phzC* طراحی شده بودند (۳۰). مشخصات آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- آغازگرهای PCR مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های

#### بیوسنتز PCA (۳۰)

آغازگر	توالی
PCA2a	TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC
PCA3b	CCGCGTGTCTCCTCGTTTCAT

واکنش PCR در ۲۵ μl (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 اضافه کردن DNA ژنومی از آب مقطر سترون (به عنوان شاهد منفی) و برای شاهد مثبت نیز از استرین *P. fluorescens* 2-79 (به عنوان دارای توانایی تولید PCA استفاده شد (۹)). جدایه P4 نیز به عنوان جدایه دارنده ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید از کلکسیون باکتری‌های دانشگاه تهران انتخاب گردید. پس از انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل (Biometra, Germany)، قطعات تکثیر شده روی ژل آغاز ۱/۵ درصد به مدت یک و نیم ساعت در ولتاژ ۸۵ ولت از یکدیگر جدا شدند. پس از انجام الکتروفورز، ژل زیر نور ماوراءبنفش مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۰).

### ارزیابی بیان ژن‌های بیوسنتز فنازین-۱-

#### کربوکسیلیک اسید در جدایه‌های انتخاب شده

جدایه‌های باکتریایی موردنظر به همراه استرین *P. fluorescens* به عنوان شاهد منفی بر روی محیط تریپتیک سوی

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.

#### ریدیابی ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید

با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای PCA2a و PCA3b قطعه DNA به طول تقریبی ۱۱۵۰ جفت باز از دسته ژنی بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید تکثیر شد. بر این اساس جدایه‌های F141، CHN5، CHN4، F2، F30، F70، F115، F4، F3، F1 و P4 و 79-2 واجد ژن بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک بودند (شکل ۱).

#### 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 F115 در گونه *P. fluorescens* bv. III قرار گرفتند.

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 از ۵۰ درصد ریشه‌ها و کمتر از ۷۵ درصد و ظهور سیاه‌شدگی طوقه، چهار به مفهوم ریشه‌ها تقریباً سیاه‌رنگ با توسعه ۷۵ درصد سیاه‌شدگی طوقه و پنج به مفهوم ریشه‌ها و طوقه کاملاً سیاه‌رنگ و سبز خشک شدن 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.

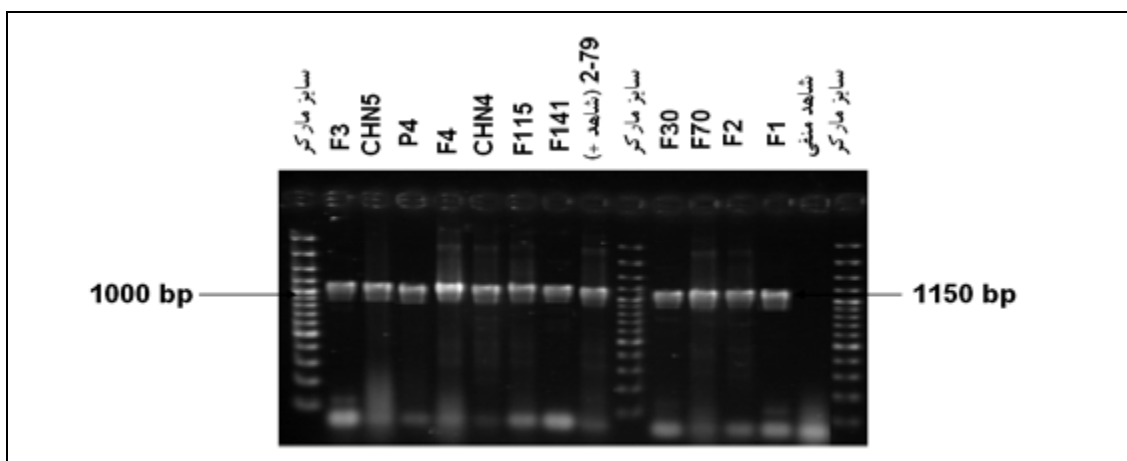
#### نتایج و بحث

##### 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

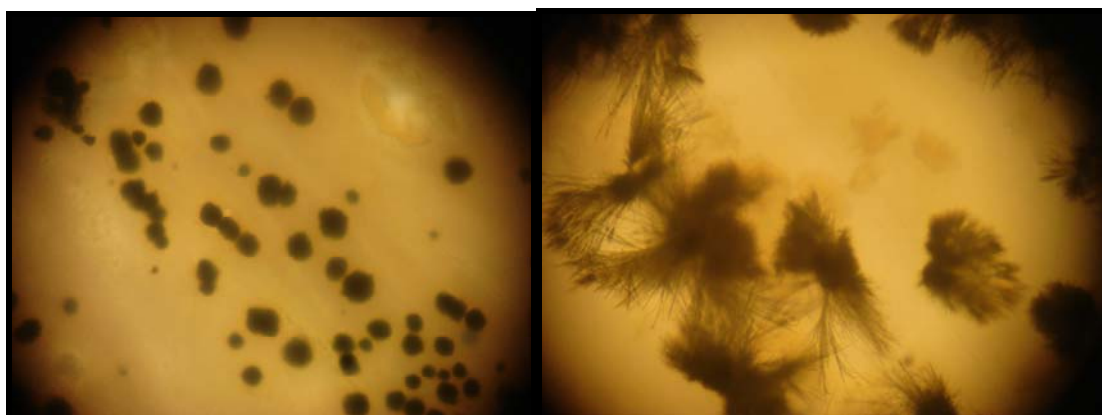


شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR، تکثیر شده از DNA ژنومی استرین‌های *Pseudomonas* با پرایمرهای PCA2a و PCA3b. ستون اول نشان‌گر اندازه 1 kb و ستون‌های بعدی نام جدایه‌های مورد استفاده می‌باشند.

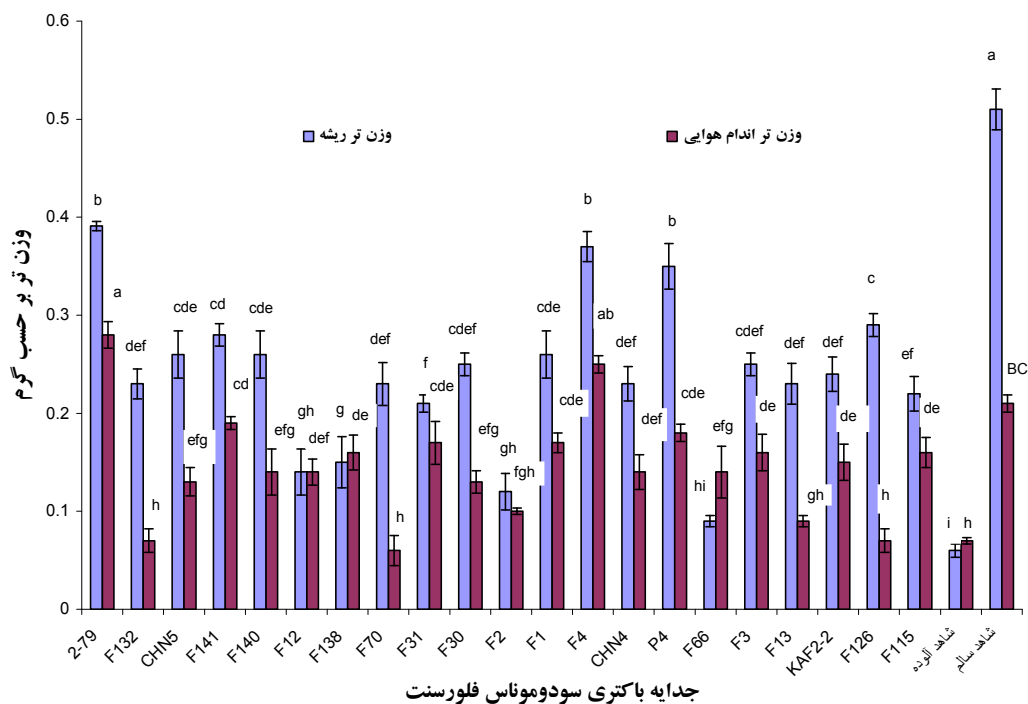
F141، P4 و جدایه جهانی 2-79 با ایجاد کریستال‌های سبز تیره‌رنگ در مرکز کلنی‌ها به اثبات رسید (شکل ۲). نتایج این آزمایش با استرین CHA0 به عنوان شاهد منفی مقایسه گردید.

تولید رسوب سبز تیره یا کریستالی آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید

پس از انجام تست کیفی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید، تولید این آنتی‌بیوتیک در پنج جدایه F4، F3، F1، F4، F3، F1



شکل ۲- تشکیل رسوب کریستالی فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در مرکز پرگنه‌های باکتری‌های سودوموناس فلورسنت تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در محیط سیب زمینی دکستروز آگار



جدایه باکتری سودوموناس فلورسنت نمودار ۱- 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 نمودارها نشان‌دهنده  $\pm SE$  (خطای استاندارد) می‌باشد.

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 سیدروفور، 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 مکانیسم‌های 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).

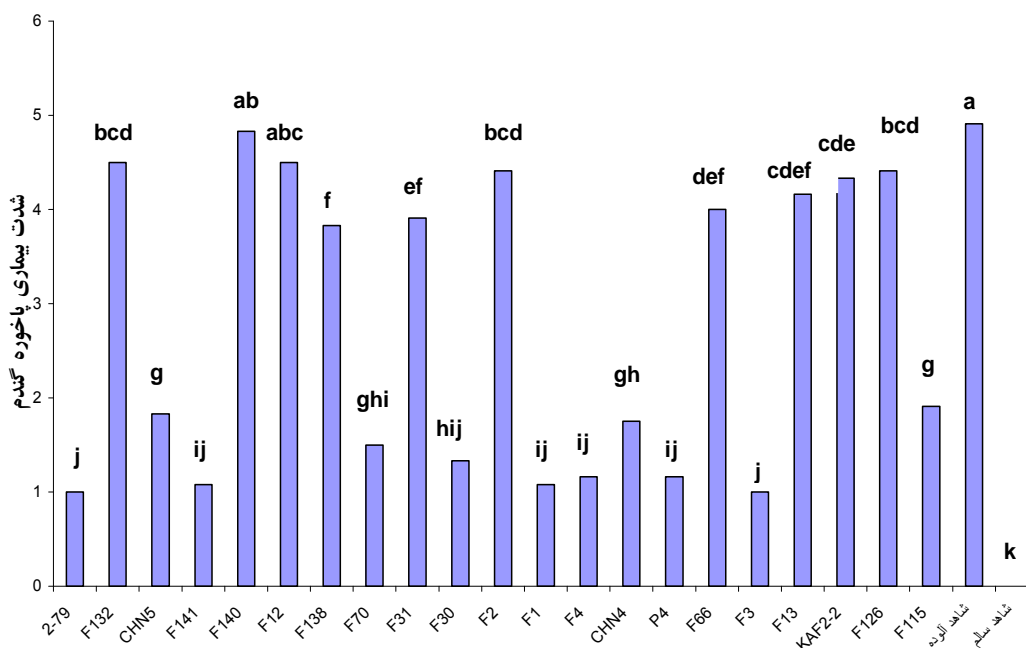
در مطالعات بسیاری، از سودوموناس‌های فلورسنت که دارای توانایی تولید آنتی‌بیوتیک هستند در کنترل بیماری پاختوره‌گندم استفاده شده است (۴ و ۲۹ و ۳۱ و ۳۳ و ۳۷).

### 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 F4، F2-79، F141، P4، F1، F3 بیشترین اثر را در کنترل بیماری پاختوره‌گندم و افزایش وزن تر بوته‌های گندم در خاک آلوده به Ggt داشتند (نمودار ۱). جدایه‌های F115، F70، F30، CHN5 و CHN4 نیز عملکرد خوبی را در کاهش شدت بیماری پاختوره از خود نشان دادند.

پس از تعیین شاخص آلودگی نتایج نشان‌دهنده کاهش شدت بیماری پاختوره‌گندم در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های باکتری بود. میزان آلودگی گیاهان تیمار شده با جدایه‌های باکتری پایین بود و جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید شدت بیماری پاختوره‌گندم را نسبت به سایرین بسیار کاهش داده بودند (نمودار ۲).

بر اساس نتایج این تحقیق، جدایه‌های F1، F3، F4، 2-79، F141 و P4 شدت بیماری پاختوره‌گندم را به میزان ۷۷-۸۰ درصد پایین آوردند. جدایه‌های F115، F70، F30، CHN5 و CHN4 نیز موجب کاهش شدت بیماری پاختوره‌گندم به میزان ۶۲-۷۴ شدند و



نمودار ۲- تاثیر تیمار بذور گندم با جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر کاهش شدت بیماری پاختوره‌گندم

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

F30، F70، F115، CHN4 و CHN5 هرچند در روش کیفی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید هیچ‌گونه رسوبی دیده نشد ولی این جدایه‌ها در شرایط گلخانه خوب عمل کردند. بر طبق این نتایج احتمال می‌رود که در این پنج جدایه تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید صورت گرفته باشد ولی تولید آن به میزانی نبوده است که رسوب تیره در محیط ایجاد کند. چون شرایط محیط‌کشت نیز در تولید آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۱۲). از طرف دیگر احتمال تولید مشتقات آنتی‌بیوتیک PCA در این پنج جدایه نیز وجود دارد زیرا PCA به عنوان ماده حد واسط در سنتز سایر مشتقات فنازین در سودوموناس‌ها تولید می‌شود به عنوان مثال وارد شدن ژن *phzM* سبب سنتز پایوسیانین از فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید می‌شود که از مشتقات فنازین محسوب می‌گردد. همچنین ژن *phzO* سبب تولید ۲-هیدروکسی فنازین، ژن *phzS* سبب تولید ۱-هیدروکسی فنازین و ژن *phzK* سبب تولید فنازین-۱-کربوکسامید می‌گردد (۱۰). از آنجایی که سایر مشتقات فنازین نیز در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش عمده‌ای دارند، لذا کنترل خوب این جدایه‌ها با احتمال تولید سایر مشتقات فنازین نیز ملموس می‌باشد (۱۷).

در جدایه F2 ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید ردیابی شد ولی در روش کیفی تشکیل رسوب به‌وسیله آن مشاهده نگردید. این جدایه در کنترل بیماری پاختوره در شرایط گلخانه نیز تأثیر خوبی نداشته است. لذا از آنجایی که مدیریت بخش‌های مختلف خاک برای اجرای صحیح فعالیت عامل آنتاگونیست نقش موثری دارد (۱۸) می‌توان چنین بیان کرد که ژن در این جدایه در شرایط گلخانه ای بیان نشده است و یا ممکن است باکتری در خاک از بین رفته باشد و یا آنتی‌بیوتیک تولید شده باشد ولی جذب کلونیدهای خاک شده باشد، زیرا کنترل بیولوژیک عوامل آنتاگونیست به بسیاری از فاکتورهای زنده و غیر زنده در خاک بستگی دارند. هیدینک و همکاران (۱۸) در بررسی‌های خود مشاهده کردند که تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک در کاهش بیماری پاختوره بسیار موثر می‌باشد ولی ممانعت از بیماری در مدت زمان طولانی بستگی به فاکتورهای محیطی دارد. فاکتورهایی نظیر دما، رطوبت، ترشحات ریشه در فعال شدن میکروارگانیسم و تشکیل اجتماعات در اطراف ریشه و تولید متابولیت‌ها نقش دارند (۱۸). از طرف دیگر کلنیزه کردن موثر ریشه توسط باکتری نیز بسیار حائز اهمیت است (۲۹). این احتمال وجود دارد که جدایه F2 کلنیزه کننده قوی ریشه نبوده و نتوانسته است به خوبی ریشه گیاهچه‌های گندم را در برابر قارچ *Ggt* حفاظت کند. به طور کلی نتایج نشان داد شش جدایه 2-

بر اساس تحقیقات انجام‌شده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-*Pseudomonas* sp. M-18Q نقش بسیار مهمی را در کنترل قارچ *Fusarium* spp و *Ggt* ایفاء نموده است (۱۷ و ۳۹). نتایج ما نیز نشان داد که جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین در آزمون گلخانه‌ای تأثیر بالایی را در کنترل بیماری پاختوره نشان دادند. به طوری که جدایه‌های F3، F1، F4، F141، P4 و 2-79 بیشترین میزان بازدارندگی را از وقوع بیماری پاختوره در گلخانه نشان دادند. در تحقیق دیگری که در زمینه استفاده از باکتری‌های *P. fluorescens* جدایه‌های Q2-87 و Q8r1-96 علیه بیماری پاختوره گندم 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 توسط مدولا و همکاران (۲۶) باکتری *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 به عنوان عامل کنترل بیماری پاختوره بررسی شد؛ یافته‌های این پژوهش نشان داد این جدایه با تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید قادر به بازدارندگی از قارچ *Ggt* می‌باشد. در بررسی انجام‌شده روی گونه‌های 30-84 *P. chlororaphis* و *P. fluorescens* 2-79 مشاهده شد با تیمار بذور بهاره و پاییزه با این دو جدایه بیماری پاختوره گندم تا حدود ۶۰ درصد در مزرعه کاهش پیدا کرد (۳۸).

در پژوهش فوق، در آزمون کشت متقابل، مقایسه میانگین‌ها به بازدارندگی نشان داد که تمام ۱۲ جدایه برتر انتخاب شده که دارای ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید بودند، باعث کاهش رشد میسلیم قارچ *Ggt* در شرایط آزمایشگاه شدند. جدایه F4 علاوه بر اینکه در شرایط آزمایشگاه دارای توانایی بازدارندگی بالایی از رشد قارچ *Ggt* بود، در شرایط گلخانه نیز موجب کنترل موثر بیماری پاختوره گردید. بر اساس نتایج این پژوهش، از میان ۱۲ جدایه برتر، در شش جدایه در روش کیفی، تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید به اثبات رسید. به طور کلی می‌توان این طور اثبات کرد که وجود ژن به تنهایی نشان‌دهنده بیان و یا به عبارتی تولید محصول ژن نمی‌باشد (۱۰). ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در ۱۲ جدایه از ۲۱ جدایه باکتری استفاده شده در این پژوهش یعنی جدایه‌های F1، F2، F3، F4، F141، F30، F70، F115، CHN4، CHN5، 2-79 و P4 ردیابی شد که شش جدایه یعنی جدایه‌های F1، F3، F4، P4 و 2-79 F141 در روش کیفی قادر به تولید رسوب تیره رنگ بودند. این نتایج نشان‌دهنده تولید قطعی آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در این شش جدایه می‌باشد. در پنج جدایه دیگر یعنی جدایه‌های



پاخوره را ۷۷-۸۰ درصد کاهش دادند. بر این اساس و انطباق داده‌ها با پژوهش‌های دانشمندان با احتمال بسیار بالایی نقش این آنتی‌بیوتیک در پژوهش ما دیده شد.

### سیاسگزاری

این تحقیق با استفاده از دو جدایه باکتری که یکی مربوط به کلکسیون باکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و دیگری مربوط به دانشگاه لوزان سوئیس می‌باشد. لازم است از جناب آقای دکتر صابری و مسئولین آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران 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.

Ggt F3 و P4، F4، F1، F141، 79 داشته‌اند. در این جدایه‌ها به ترتیب شدت بیماری ۲۰، ۲۱، ۲۱، ۲۳، ۲۳ و ۲۰ درصد و در جدایه‌های CHN4، CHN5، F30، F70 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. شانس و همکاران (۸) نیز نشان دادند که تولید آنتی‌بیوتیک فنازین در *P. aureofaciens* 30-84 سبب کنترل بیماری پاخوره گندم تا ۹۰ درصد می‌گردد.

بر این اساس نقش اساسی و مهم آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در کنترل بیماری پاخوره توسط جدایه‌های تولیدکننده آن دیده شد. در شش جدایه تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید کنترل بیماری پاخوره گندم به خوبی صورت گرفت. همان‌گونه که مشاهده شد این جدایه‌ها شدت بیماری

### 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. Fluorescent *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. *Environmental 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 *gacA* 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 *psrA* and *rpoS* 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 seedlings 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 secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *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 agrícolas: Rev. *Biotechnol.* 33: 35-50.
- 33- Sanguin H., Kroneisen L., Gazengel K., Kyselkova M., Remenant B., Prigent-Combaret C., Grundmann L. G., Sarniguet A., and Moënné-Loccoz Y. 2008. Development of a 16S rRNA microarray 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 back over 30 Years. Phytopathology 97: 250-256.
- 39- Yan 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.