

## مطالعه تنوع ژنتیکی سودوموناس های فلورسنت جدا شده از مزارع گندم با قابلیت کنترل *Gaeumannomyces graminis var. tritici*، عامل بیماری پاخوره گندم

اکبر شیرزاد<sup>۱\*</sup>، وحید فلاح زاده ممقانی<sup>۱</sup>، مقصود پژوهنده<sup>۱</sup> و علی رضا علی زاده<sup>۲</sup>

۱. استادیار، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲. دانشجوی دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ایران

( تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۳۰ - تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۸ )

### چکیده

در این تحقیق، از ۲۱ استرین سودوموناس فلورسنت مختلف به منظور بررسی قدرت بازدارندگی آنها علیه قارچ عامل پاخوره غلات، (*Gaeumannomyces graminis var. (Ggt)*، *tritici* استفاده شد. بدین ترتیب که بعد از بررسی ویژگی های بیوشیمیایی استرین های باکتریایی، آزمون بازدارندگی جدایه ها علیه عامل بیماری پاخوره گندم صورت پذیرفت. نتایج نشان داد برخی از این استرین ها قدرت بیوکنترلی قابل توجهی در بازدارندگی قارچ *Ggt* دارند. در نهایت، از نشانگر مولکولی REP-PCR به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه ها و بررسی ارتباط تنوع ژنتیکی و قدرت بازدارندگی جدایه ها استفاده شد. الگوی انگشت نگاری DNA و دندروگرام رسم شده نشان داد، نوزده استرین باکتری در سطح تشابه ۱۰۰-۲۵ درصد از هم جدا شدند و در قالب نه دودمان کلونی یا گروه انگشت نگاری قرار گرفتند که با حروف A تا I از هم مشخص شدند. با توجه به این نتایج، مشخص شد که بین آزمون های بازدارندگی در محیط غذایی PDA، تولید سیانید هیدروژن و دی استیل فلوروگلوکوسینول با گروه های انگشت نگاری DNA به روش REP-PCR رابطه مستقیمی وجود دارد. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود، نشانگر مولکولی REP-PCR به عنوان ابزار مفیدی در شناسایی و غربالگری استرین های سودوموناس فلورسنت مؤثر در کنترل بیولوژیک استفاده شود.

**واژه های کلیدی:** پاخوره گندم، تنوع ژنتیکی، کنترل بیولوژیک، *Pseudomonas fluorescens*

### مقدمه

پاخوره گندم<sup>۱</sup> که عامل آن قارچ (*Gaeumannomyces graminis var. tritici (Ggt)*) است، یکی از بیماری های مهمی است که سبب پوسیدگی ریشه و طوقه گندم و جو در تمام نقاط جهان می شود (Duffy et al., 1996; Raaijmakers & Weller et al., 1988). به طور معمول، برای کنترل این بیماری از تناوب زراعی و انجام عملیات کشاورزی مانند سوزاندن بقایای گیاهی منجر به کاهش زامایه عامل بیماری زا<sup>۱</sup> استفاده شده است. اما به علت مسائل اقتصادی، زارعان تناوب زراعی طولانی مدت را رعایت نمی کنند. سوزاندن کاه و کلش هم به علت مسائل حفظ خاک و محیط و جلوگیری از

فرسایش، توصیه نمی شود. در مورد این بیماری ارقام تجاری مقاوم در دسترس نیست. علاوه بر آن، استفاده از قارچ کش نیز بیماری را در حد مطلوب کنترل نمی کند. لذا، تلاش می شود تا بدون اتکا به استفاده از سموم شیمیایی، روش مناسبی برای کنترل این بیماری و دیگر بیماری های خاکزاد جایگزین شود (Raaijmakers & Weller, 1998). در سال های اخیر، تمایل به کنترل بیولوژیکی به علت خطرهای مشکلات استفاده از آفت کش های شیمیایی بیشتر شده است (Thomashow & Weller, 1990). بنابراین، یکی از پتانسیل های جایگزین برای مدیریت بیماری های گیاهی، استفاده از عوامل بیولوژیکی از جمله

پاخوره محافظت می‌کنند. اولین آنتی‌بیوتیک شناخته‌شده در این زمینه، آنتی‌بیوتیک (PCA) Phenazine-1-Carboxylic acid بود، اما امروزه عقیده بر این است که در خاک‌های بازدارندهٔ پاخورهٔ گندم تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوکوسینول توسط سودومونادهای فلورسنت مهم‌تر از PCA است (Cook, 2003; Raaijmakers *et al.*, 1997; Weller *et al.*, 2002). تکنیک‌های مولکولی مختلفی برای شناسایی، همچنین بررسی تنوع ژنتیکی ایزوله‌های مختلف سودومونادهای فلورسنت استفاده شده است (Mavrodi *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2002). برای مثال، تکنیک آنالیز قطعه‌های تکثیرشدهٔ DNA ریبوزومی محدودشده (Amplified ribosomal DNA restriction analysis-ARDRA) برای شناسایی سودومونادهایی با پتانسیل بیوکنترلی بالا به کار گرفته شده است (O'Sullivan & Ogara, 1992; McspaddenGardener *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای دیگر (Picard, *et al.*, 2000) سودومونادهای فلورسنت تولیدکنندهٔ DAPG در ریشهٔ لاین‌های والد و هیبرید ذرت را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که جمعیت این دسته از باکتری‌ها روی ریشهٔ لاین‌های هیبرید بیشتر از لاین‌های والد است. (McSpadden Gardener, *et al.*, 2000) سیزده و پانزده ژنوتیپ را در مجموعهٔ استرین‌های حاوی *phlD*، به وسیلهٔ PCR-BOX و PCR-ERIC شناسایی کردند. (Keel *et al.*, 1996) و (McSpadden *et al.*, 2000) بیان کرده‌اند که سودوموناس‌های فلورسنت بر اساس آنالیز ARDRA به سه گروه مجزا تفکیک می‌شوند. گروه اول شامل استرین‌هایی است که ۲ و ۴ دی‌استیل فلوروگلوکوسینول، پایولوتئورین و سیانید هیدروژن تولید می‌کنند، که از این بین می‌توان به استرین CHA0 از سوئیس و استرین Pf-5 از آمریکا اشاره کرد. گروه‌های دوم و سوم شامل استرین‌هایی می‌شود که ۲ و ۴ دی‌استیل فلوروگلوکوسینول و سیانید هیدروژن تولید می‌کنند و لیپاپولوتئورین تولید نمی‌کنند. گروه سوم نیز که یک گروه مجزا را تشکیل می‌دهد، شامل تنها دو استرین P12 و F113 است. گروه‌های یک و سه بر اساس توانایی

ریزوباکتری‌های تقویت‌کنندهٔ رشد گیاهی (*plant growth promoting rhizobacteria*, PGPR) و استرین‌های مختلف جنس *Trichoderma* (Benitez *et al.*, 2004; Siddiqui *et al.*, 2003) استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت برای کنترل بیولوژیکی بیماری پاخورهٔ گندم به‌طور گسترده مطالعه شده است (شیرزاد، ۱۳۸۷؛ deSouza *et al.*, 2002; Chapon *et al.*, 2002; Duffy & Weller, 1995; Weller *et al.*, 2002). سودوموناس‌ها از نظر بوم‌شناختی یکی از متنوع‌ترین و مهم‌ترین گروه باکتری‌ها محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها در محیط‌های طبیعی زندگی می‌کنند و ارتباط نزدیکی با گیاهان و حیوانات دارند. بالابودن سازش فیزیولوژیکی و ژنتیکی این باکتری‌ها باعث گستردگی جهانی آنها شده است (Spiers *et al.*, 2000). Burr *et al.* (1978) برای اولین بار به نقش باکتری‌های *P. putida* و *Pseudomonas fluorescens* در افزایش محصول پی بردند. باکتری‌های موجود در ناحیهٔ ریزوسفر از گروه سودوموناس‌های فلورسنت به‌طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه به‌خصوص اندول استیک اسید (Oberhansli *et al.*, 1991) و نیز به‌طور غیرمستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آنها می‌شوند (Weller, 1988). تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی (Fravel, 1988; Picard *et al.*, 2000)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین (Leong, 1987; Schippers *et al.*, 1986)، سیانید هیدروژن (Voisard *et al.*, 1989) ترکیبات فرار ضد قارچی (صابری، ۱۳۸۳؛ شکیب، ۱۳۸۳؛ رضانی، ۱۳۸۱؛ سارانی، ۱۳۸۴) و آنزیم پروتئاز (Keel & Defago, 1997) از مهم‌ترین سازوکارهای مؤثر این باکتری‌ها در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی است. به‌علاوه، تأثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا، همچنین کمک به قدرت جذب مواد معدنی در گیاه از دیگر سازوکارهای مؤثر در افزایش رشد گیاه است (Keel & Defago, 1997). آزمایش‌ها نشان داده‌اند بسیاری از استرین‌های *P. fluorescens* از طریق تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، ریشه‌های گندم را در مقابل بیماری

قابلیت بیوکنترلی مطلوب آنها به اثبات رسیده بود، با اهداف زیر مطالعه شدند:

۱. بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و متابولیت‌های بازدارنده آنها
۲. انجام آزمون بازدارندگی استرین‌ها و بررسی قابلیت آنها در کنترل بیماری پاخوره گندم
۳. ارزیابی تنوع ژنتیکی استرین‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR و تعیین ارتباط بین تنوع ژنتیکی استرین‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی و تست‌های بیوشیمیایی و آزمون بازدارندگی.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه بیمارگر *Ggt* و باکتری‌های آنتاگونیست

جدایه‌های قارچ بیمارگر مورد استفاده در این تحقیق از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شدند. برای به دست آوردن پرگنه‌های تازه قارچ، قارچ در محیط‌های غذایی *Waksman agar* و *PDA* رقیق (۱/۴)، کشت و در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. از بین جدایه‌های قارچ *Ggt*، ایزوله T24 به علت خصوصیات بیماری‌زایی بیشتر آن استفاده شد. استرین‌های سودوموناس فلورسنت مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون عوامل آنتاگونیست گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان (جداسده از مزارع گندم استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل و آذربایجان غربی) و گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران (جداسده از مزارع گندم کرج و قزوین) تهیه شد.

#### بررسی قدرت بازدارندگی از رشد *Ggt* توسط جدایه‌های

##### باکتری درون تشتک پتری

به منظور بررسی قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر *Ggt*، در شرایط آزمایشگاه از روش Hagedorn *et al.* (1989) با کمی تغییرات استفاده شد. به این ترتیب که باکتری‌ها به صورت سه نقطه‌ای و با فاصله ۰/۵ سانتی‌متری از لبه تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی *PDA* و یا واکس من آگار (Berg, *et al.* 2000) کشت داده شدند. یک روز بعد، یک حلقه میسلیومی از

افتراقی آنها برای تولید پایولوتئورین (Keel *et al.*, 1996) و استفاده از منابع کربن برای رشد (McSpadden Gardener *et al.*, 2000) از هم تفکیک می‌شوند. نتایج شریفی تهرانی و همکاران نیز نشان داد که سودومونادهای بیوکنترل‌کننده با توانایی بهتر را می‌توان به طور تاکسونومیکی و بر اساس آنالیزهای ARDRA شناسایی کرد. هر چند این تکنیک تنها سه (O'Sullivan and Ogara, 1992) یا چهار (Keel *et al.*, 1996; McSpadden Gardener *et al.*, 2000) گروه از ایزوله‌های تولیدکننده DAPG را تفکیک می‌کند و منعکس‌کننده طیف کامل تنوع ایزوله‌ها نیست، ژنوتیپ‌های شناسایی‌شده از طریق آنالیزهای RFLP ژن *phid* در میان ایزوله‌ها محافظت شده بود. اما آنالیزهای RAPD ژنوم آنها چند شکلی بسیار زیادی را در بین تولیدکنندگان DAPG نشان داد (Mavrodi *et al.*, 2001). بنابراین، تنوع ژنتیکی بالایی در میان تولیدکننده‌های DAPG بر اساس نشانگر RAPD وجود دارد. دانش تنوع ژن *phid* در میان تولیدکننده‌های DAPG برای ارزیابی پتانسیل آنتاگونیستی و کثرت انتقال افقی ژن در میان جوامع میکروبی موجود در ریزوسفر اهمیت دارد. دانستن این موضوع دانش کاربردی را برای توسعه سیستم غربال ژنتیکی سریع برای شناسایی استرین‌های بیوکنترلی قوی فراهم می‌کند (Dilanta Fernando, 2005). در تحقیق دیگری (Liu *et al.*, 2006) تنوع سودومونادهای فلورسنت تولیدکننده فنازین و پایولوتئورین را بررسی کردند. در این تحقیق از میان ۴۸ ایزوله مورد بررسی، ۴۵ عدد از آنها قادر به تولید فنازین بودند، سه عدد از آنها هر دوی این آنتی‌بیوتیک‌ها و هیچ کدام به تنهایی پایولوتئورین تولید نمی‌کردند. با استفاده از آنالیزهای ARDRA این ایزوله‌ها بر اساس اینکه با آنزیم برشی *HaeIII* یا *HinfI* برش داده شوند، به ترتیب در نوزده یا هفده گروه مشخص قرار گرفتند، که نشان‌دهنده تنوع معنادار در بین آنها است. در این تحقیق، به منظور جداسازی و شناسایی استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت با قابلیت بیوکنترل قارچ عامل پاخوره غلات، استرین‌هایی از سودوموناس‌های فلورسنت که قبلاً

هاله در سه روز متوالی ثبت و میانگین قطر هاله در سه روز نیز محاسبه شد.

#### بررسی تولید آنزیم پروتئاز

به‌منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری‌ها از محیط غذایی (SMA) Skim milk agar مطابق روش (Maurhofer et al., 1995) استفاده شد. محتویات این محیط غذایی شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۷/۵ گرم آگار در یک لیتر آب است. باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای در تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی SMA کشت داده و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. تشکیل هاله‌ای بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری‌ها نشانه فعالیت آنزیم پروتئاز است.

#### تعیین توان تولید سیانید هیدروژن

این آزمون نیز با استفاده از روش پیشنهادی لورک (۱۹۴۸) اصلاح شده آلستروم (Alstrom, 1987) انجام شد. بدین منظور ابتدا جدایه‌های باکتری به مدت ۴۸ ساعت روی محیط غذایی کینگ بی (KB) کشت شد. سپس، برای هر جدایه سه تشتک پتری حاوی محیط KB و دارای ۴/۴ گرم گلیسین در هر لیتر تهیه شد. هر تشتک پتری با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری تلقیح شد. سپس، یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم ۲ درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت در پلیت قرار گرفت. یک پلیت نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح باکتری در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری با نوار پارافیلیم مسدود شد تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی شکل از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری به عمل آید. آنگاه، این ظروف به صورت واژگون به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر می‌یابد که به ترتیب از صفر تا سه مقیاس‌دهی شد.

پرگنه جوان قارچ در وسط تشتک‌های پتری قرار گرفت. سپس، تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و به مدت یک هفته بررسی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی باکتری‌ها، فاصله کلنی باکتری‌ها تا پرگنه قارچ محاسبه و برخی جدایه‌های دارای توان بازدارندگی بالا جهت شناسایی و انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

#### اندازه‌گیری بعضی متابولیت‌های مؤثر در عملکرد استرین‌ها

اندازه‌گیری تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری تولید سیدروفور به صورت کمی و به روش Meyer & Abdallah (1978) اندازه‌گیری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6.0 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3.0g/l, MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O; 0.2 g/l, NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; 1.0 g/l; succinic acid 4.0 g/l) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌های کشت به مدت ۴۰ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰g و دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. در نهایت، محیط‌های غذایی حاوی سلول‌های باکتری به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ g سانتریفوژ و پس از تشکیل رسوب باکتری، این رسوب حذف و با دستگاه اسپکتروفتومتری (PG instruments) میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر قرائت شد. برای اندازه‌گیری تولید سیدروفور کل از روش نیمه کمی CAS-Agar استفاده شد. این بررسی با استفاده از روش Alexander & Zuberer (1991) به انجام رسید. محیط CAS-Agar از چهار محلول تهیه شد که هر کدام به صورت جداگانه استریل شدند. در آخر، محلول معرف به آرامی و با هم‌زدن کافی به این محیط غذایی اضافه و محیط غذایی در تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری توزیع شد. برای تلقیح این پلیت‌ها، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به صورت قطره‌گذاری استفاده شد. این تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تولید سیدروفور باعث جدا شدن آهن از CAS می‌شود، که نتیجه آن تولید هاله‌ای نارنجی‌رنگ اطراف کلونی باکتری است. قطر این

## تولید DAPG توسط استرین‌های انتخاب شده

این آزمون با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و با روش دافی و دفاگو (۱۹۹۷) صورت پذیرفت.

باکتری‌ها در داخل ۱۵ میلی‌لیتر محیط غذایی عصاره مالت و مخمر (۳ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم عصاره مالت، ۵ گرم باکتو پپتون، ۱۰ گرم گلوکز) تلقیح و محیط غذایی روی شیکر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و با سرعت ۲۰۰ g کشت شد. سپس، تمامی محیط‌های غذایی حاصل با اضافه کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۵ نرمال به اسیدیته ۲ رسانده و بعد از اضافه کردن ۱۵ میلی‌لیتر اتیل استات به مدت ۳۰ دقیقه به شدت هم زده شد تا ترکیبات آلی محیط غذایی وارد اتیل استات شود. برای جداسازی اتیل استات از فاز آبی، مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ و فاز آلی به دست آمده به دقت جداسازی شد.

فاز آلی روی شیشه‌های ساعتی ریخته شد و در زیر هود شیمیایی در معرض جریان هوایی قرار گرفت تا به طور کامل تبخیر شود. رسوب حاصل از خشک شدن اتیل استات در داخل ۱ میلی‌لیتر متانول خالص حل و به داخل تیوب‌های ۱ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه داشته شد.

ردیابی و اندازه‌گیری کمی آنتی‌بیوتیک با استفاده از تکنیک High-performance Liquid Chromatography و به کمک دستگاه HPLC انجام گرفت. ستون به ابعاد ۲۵۰ × ۴/۵ میلی‌متر (perfectsil target ODS-3 column) با روش فاز معکوس در دمای اتاق استفاده شد. نمونه‌ها با حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه تزریق شدند. سرعت فاز متحرک (شامل ۶۰ درصد فسفات پتاسیم ۰/۱ میلی‌مولار و ۴۰ درصد استونیتریل با pH=۵) ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. پیک استاندارد با اشعه UV در طول موج ۲۸۳ نانومتر و در زمان تأخیر ۱۰ دقیقه مشاهده شد.

## بررسی قابلیت استرین‌های بیوکنترل در کاهش

## بیماری در شرایط اتاقک کشت

برای تهیه زادمایه قارچ از روش Mazzola et al. (1995) استفاده شد. برای تهیه زادمایه آنتاگونیست‌ها، استرین‌های باکتریایی از استوک گلیسرول آنها و نگهداری شده در یخچال با دمای ۷۰- درجه سلسیوس، روی محیط کشت آگار غذایی کشت شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس، یک تک‌کلون از کلونی‌های به دست آمده از هر استرین به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های غذایی جدید منتقل و در شرایط یکسان به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. بعد از رشد باکتری‌ها در محیط غذایی، مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم (۰/۱۴ مولار) روی محیط غذایی ریخته و به کمک لوپ سترون کلونی‌های سطح محیط غذایی شسته شد. سپس، سوسپانسیون به دست آمده دو بار سانتریفیوژ (۷۵۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه) و با آب مقطر سترون شسته شد. سپس، باکتری‌های به دست آمده در محلول ۰/۵ درصد متیل سلولز استریل شده به روش تندالیزه کردن تعلیق شد. جذب نوری آنها با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۱ (حدوداً معادل ۱۰<sup>۶</sup> سلول باکتریایی در هر میلی‌لیتر) تنظیم شد. بذور گندم رقم فلات به مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضد عفونی و سه بار با آب مقطر استریل شد. سپس، بذور در داخل سوسپانسیون‌های باکتریایی تهیه شده در متیل سلولز قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه به صورت آرام روی شیکر تکان داده شد. بذور آغشته به مدت یک ساعت در زیر هود استریل قرار گرفت تا خشک شود. سپس، برای آزمون بیماری‌زایی استفاده شد.

## آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی به روش Mazzola et al. (1995) به انجام رسید. برای این کار از لوله‌های پلاستیکی دردار با حجم ۵۰ میلی‌لیتر (۲۶ سانتی‌متر طول و ۲/۵ سانتی‌متر عرض) استفاده شد. در قسمت تحتانی لوله‌های مذکور منفذ کوچکی ایجاد شد و در ته آنها تکه کوچکی پنبه قرار گرفت و هر لوله با ۳۰ میلی‌لیتر

### تعیین تنوع ژنتیکی استرین‌های باکتری با استفاده از روش (repetitive extragenomic palindromic-PCR), rep-PCR

در این مطالعه از دو آغازگر BOX و ERIC به منظور انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های سودوموناس فلورسنت استفاده شد (جدول ۱). مراحل مختلف این آزمون بر اساس روش‌های Marten *et al.* (2000) و Masco *et al.* (2003) به انجام رسید. برای استخراج و خالص‌سازی DNA از نمونه‌ها، باکتری‌ها روی محیط کینگ بی<sup>۱</sup> کشت شد و بعد از ۴۸ ساعت دو عدد از کلونی‌های ظاهر شده روی محیط، در داخل بافر لایز (۰/۰۵ مولار هیدراکسید سدیم و ۰/۲۵ درصد SDS) قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه نگهداری شد. بقایای دیواره باکتری‌ها با سانتیفریوژ (۱۴۰۰۰ g) رسوب داده شد و مایع رویی حاوی DNA باکتریایی جدا شد. بعد از اندازه‌گیری غلظت DNA محلول به دست آمده و یکسان‌سازی غلظت نمونه‌ها، ۴ میکرولیتر از محلول به دست آمده برای تکثیر استفاده شد.

ورمیکولیت استریل و ۵ میلی‌لیتر خاک مخلوط شده با اینوکولوم خردشده *Ggt* (به نسبت ۱ درصد W/W) پر شد. سپس، در داخل هر لوله پنج عدد بذر گندم آغشته شده با باکتری یا محلول متیل سلولز (به عنوان شاهد) قرار گرفت و بذور با ۵ میلی‌لیتر ورمیکولیت پوشانیده شد. لوله‌های مذکور به داخل اتاقک رشد با شرایط دمایی ۱۵-۱۸ درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد. بعد از گذشت حدود ۲۰ روز گیاهان از لوله‌ها بیرون آمد و شدت بیماری گیاهچه‌ها با شاخص زیر بررسی شد (شیرزاد، ۱۳۸۷):

فاقد علائم = ۰، سیاه‌شدن کمتر از ۱۰ درصد ریشه‌ها = ۱، سیاه‌شدن ریشه‌ها بین ۱۰ تا ۲۵ درصد = ۲، سیاه‌شدن ریشه‌ها بین ۲۵-۵۰ درصد = ۳، سیاه‌شدن ریشه‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد = ۴، کلروز و کوتولگی شدید = ۵، مرگ گیاه = ۶.

این آزمایش با پنج تیمار (شامل چهار جدایه بیمارگر و شاهد سالم) در چهار تکرار (هر تکرار شامل دو گیاهچه) در قالب بلوک‌های کامل تصادفی به انجام رسید.

جدول ۱. تعداد و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده به منظور انگشت‌نگاری DNA جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

توالی نوکلئوتیدی آغازگرها	آغازگرها
CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	BOX
ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	ERIC1
AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ERIC2
	BOX PCR
	ERIC PCR

گرفت. نرمال بودن پراکنش داده‌ها قبل از آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS آزمایش شد. در صورت نرمال نبودن منحنی پراکنش با استفاده از فرمول‌های مقتضی، تبدیل داده‌ها صورت گرفت. در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آنها وجود داشت، از تبدیل عددی  $\sqrt{x+0.5}$  استفاده شد.

**تجزیه و تحلیل خوشه‌ای نتایج حاصل از rep-PCR**  
برای تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از rep-PCR ابتدا حضور یا عدم حضور باندها به ترتیب به صورت اعداد صفر و یک مشخص و در نرم‌افزار Excel وارد شد. از این ماتریس جهت ایجاد جدول تشابه<sup>۳</sup> بین جدایه‌ها بر مبنای ضریب تشابه دایس<sup>۴</sup> استفاده شد. تجزیه و

برنامه حرارتی BOX-PCR بر اساس مراحل زیر انجام پذیرفت: ۲ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه (۹۴ °C)، ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی ثانویه (۹۴ °C)، ۶۰ ثانیه اتصال آغازگر (۵۰ °C) و ۷ دقیقه بسط آغازگر (۶۵ °C) که در قالب ۳۵ چرخه صورت پذیرفت. برنامه حرارتی ERIC-PCR نیز مشابه برنامه BOX-PCR و با دمای مرحله اتصال آغازگر ۵۵ درجه سلسیوس انجام شد.

### تجزیه و تحلیل آماری آزمون بیماری‌زایی و بازدارندگی

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن ( $P < 0.05$ ) و با استفاده از روش مدل خطی SAS<sup>۲</sup> (SAS institute, Cary, NC) انجام

3. Similarity matrix  
4. Dice's coefficient

1. King B  
2. SAS general linear model procedure (GLM)

(جدول ۲). از میان استرین‌های بررسی شده در محیط غذایی PDA، استرین 8B با ۵۴/۴۴ درصد، بیشترین بازدارندگی را نسبت به *Ggt* از خود نشان داد. استرین‌های UTPF68، F117، F70، F82، CHA0 و B2 در رتبه بعدی قرار داشتند و میزان بازدارندگی این استرین‌ها تفاوت معناداری با هم نداشت. کمترین میزان بازدارندگی در محیط غذایی PDA مربوط به استرین B4 که در حدود ۱۵ درصد بود. نتایج آزمون بازدارندگی در محیط غذایی Waksman تا حدی با نتایج حاصل از این آزمون در محیط غذایی PDA متفاوت بود، به طوری که برای بعضی استرین‌ها، میزان بیشتری از خاصیت بازدارندگی در این محیط غذایی مشاهده شد.

تحلیل خوشه‌ای براساس جدول تشابه، با استفاده از الگوریتم UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) و نرم‌افزار کامپیوتری NTSYSpc-2.02e انجام و فنوگرام تنوع ژنتیکی رسم شد.

### نتایج

**تأثیر باکتری‌ها در جلوگیری از رشد میسلیمی *Ggt***  
در این بررسی توانایی استرین‌های باکتریایی مورد بررسی در جلوگیری از رشد میسلیمی بیمارگر *Ggt*، در شرایط آزمایشگاه به روش کشت متقابل در تشتک‌های پتری و روی دو نوع محیط غذایی متفاوت مطالعه شد. با توجه به نتایج، بین جدایه‌ها از نظر قدرت بازدارندگی اختلاف بسیار معناداری وجود داشت

جدول ۲. اثر بازدارندگی استرین‌های مختلف سودوموناس فلورسنت جدا شده بر علیه *G. graminis var. tritici* روی دو نوع محیط غذایی متفاوت

Mycelial inhibition on waksman agar (%)	Mycelial inhibition on PDA medium* (%)	Bacterial isolates
58.16bcd	54.44a**	8B
58.34bc	45.46b	UTPF68
59.33b	43.83bc	F117
62.08a	43.53bc	CHA0
57.43cde	42.43bc	F82
56.44def	42.66bc	F70
56.58def	42.23bc	B1
55.14f	41.76cd	F133
56.16ef	40.95cd	UTPF5
12.13l	40.22cd	F23
55.07f	40.5cd	30B
47gh	38.9cde	34B
48.1g	37.76efd	B6
46.2h	36.66efdg	B2
22.4k	36.60efdgf	PF5
34.16j	35.56efgh	B21
35.33j	34.43fghi	F113s
43.7i	34.43fghi	B11
21.66k	15hi	B4

\* درصد بازدارندگی با فرمول  $(R - r)/R \times 100$  محاسبه شد، که در آن بیشترین رشد میسلیمی از مرکز تشتک پتری و  $r$  رشد میسلیمی از مرکز تشتک پتری به سمت کلونی باکتری است.  
\*\* مقادیر با حروف مشابه اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد ندارند (تعیین شده با آزمون دانکن).

در صورتی که در Waksman بازدارندگی بسیار ضعیف‌تری از این استرین‌ها مشاهده شد.

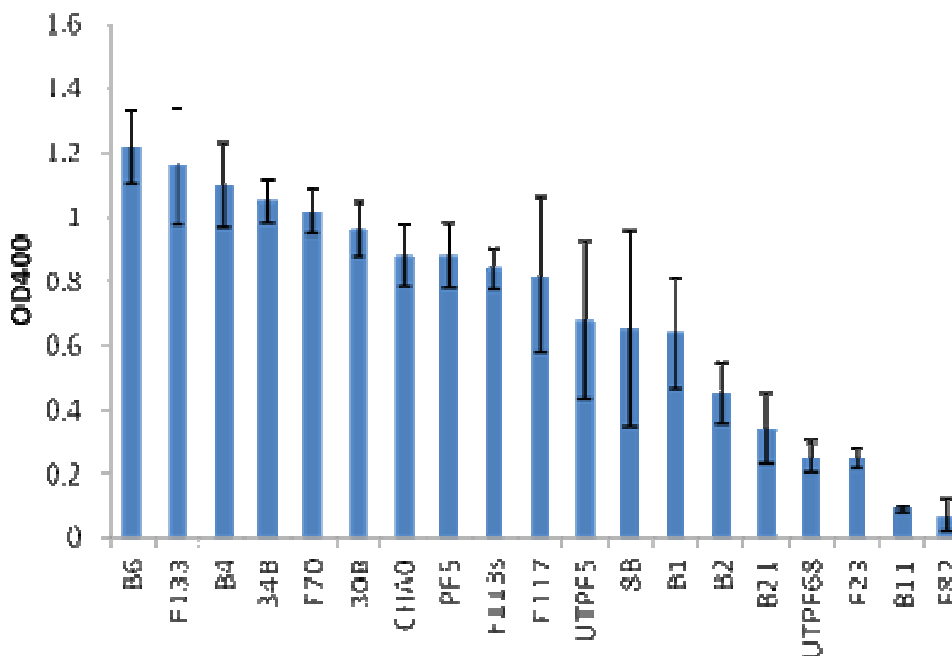
**مقایسه سیدروفور تولید شده بر اساس روش اسپکتروفتومتری**

در این بررسی میزان تولید سیدروفور پایوردین در استرین‌های مختلف در محیط غذایی بر پایه

بیشترین خاصیت بازدارندگی در محیط غذایی Waksman مربوط به استرین استاندارد CHA0 بود. استرین 8B نیز به همراه UTPF68 و F117 در رتبه بعدی قرار گرفتند و میزان بازدارندگی آنها تفاوت معناداری نشان نداد. خاصیت بازدارندگی بعضی استرین‌ها در این محیط غذایی بسیار کمتر بود. برای مثال، بازدارندگی F23 یا PF5 در PDA قابل توجه بود،

سایر استرین‌ها در حد متوسط و میزان جذب نوری حاصل از آن در طول موج ۴۰۰ نانومتر برابر با ۰/۸۸ بود. بیشترین میزان جذب در استرین B6 مشاهده شد که به میزان ۱/۲۲ بود.

سوکسینات و با روش اسپکتروفتومتری بررسی شد. بیشترین میزان تولید پایووردین مربوط به استرین‌های B6، F133، B4، 34B، F70 و 30B بود (شکل ۱). میزان تولید پایووردین در استرین CHA0 نسبت به



شکل ۱. بررسی تولید پایووردین توسط استرین‌های باکتریایی در محیط کشت پایه سوکسینات

و 8B بود که به ترتیب هاله‌های ۱۳/۳۳ و ۱۳ میلی‌متری تشکیل دادند (شکل ۲). استرین‌های F82، B4 و B2 قادر به تولید این متابولیت نبودند و هیچ هاله‌ای در محیط غذایی SMA ایجاد نکردند.

#### بررسی تولید سیانید هیدروژن

این اندازه‌گیری به صورت نیمه‌کمی و با استفاده از کاغذهای آغشته به محلول اسید پیکریک انجام شد، که در آن تغییر رنگ این ماده به قهوه‌ای نشان‌دهنده تولید سیانید هیدروژن بود. بیشتر استرین‌های مورد بررسی قادر به تولید مقادیر متفاوتی سیانید هیدروژن بودند (جدول ۳-۴). بیشترین میزان تولید سیانید هیدروژن مربوط به استرین‌های F133، UTPF68، F70، UTPF5، PF5 و F33 بود و رنگ زرد کاغذ معرف بعد از گذشت ۴۸ ساعت به رنگ قهوه‌ای خرمایی درآمد (جدول ۴). در مقابل، استرین‌های F82، 8B، 34B و 30B قادر به تولید این ماده فرار نبودند و رنگ کاغذهای معرف

#### بررسی تولید سیدروفور توسط استرین‌های باکتریایی به روش CAS

از آنجا که سودومونادهای فلورسنت علاوه بر پایووردین سیدروفورهای دیگری نیز تولید می‌کنند (Alexander, Zuberer & 1991)، از این روش برای اندازه‌گیری سیدروفور کل تولیدی باکتری‌ها استفاده شد. نتایج حاصل از این اندازه‌گیری تا حدی با نتایج اندازه‌گیری پایووردین همخوانی داشت، به طوری که استرین‌های B6، F133 و B4 در این روش اندازه‌گیری بیشترین هاله را ایجاد کردند (جدول ۳).

#### بررسی میزان تولید پروتئاز توسط استرین‌های باکتری

یکی از متابولیت‌هایی که در توانایی کلونیزه کردن و به دنبال آن قابلیت بیوکنترل باکتری‌ها نقش مهمی بازی می‌کند، پروتئاز است (O'Sullivan et al., 1991). در این بررسی بیشتر استرین‌ها قادر به تولید پروتئاز بودند و بیشترین میزان تولید آن مربوط به استرین‌های 30B

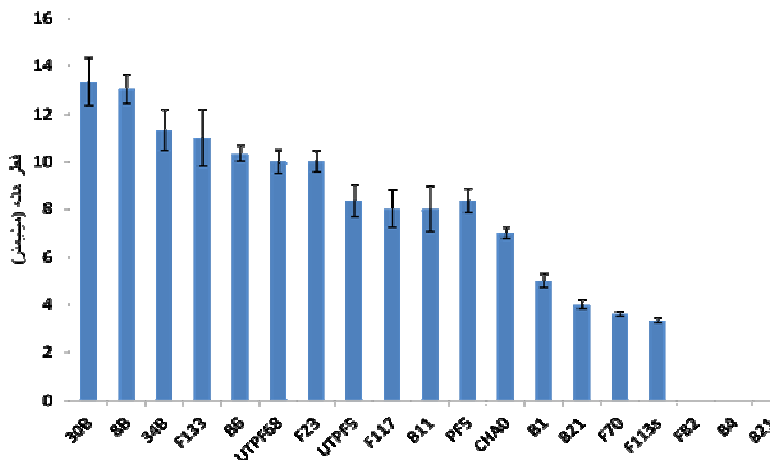


استفاده شده برای این استرین‌ها با رنگ کاغذ تشک‌های پتری شاهد هیچ تفاوتی نداشت.

جدول ۳. بررسی میزان تولید سیدروفور استرین‌های باکتری به روش CAS

استرین باکتریایی	قطر هاله در روز دوم (میلی‌متر)	قطر هاله در روز سوم (میلی‌متر)
F133	16.70a	19.83a
B6	15.5a	17.66b
B4	15.13a	17.5b
PF5	12.16b	14.00cd
CHA0	11.6bc	15.26c
8B	10.78bc	13.45de
F117	10.09cd	12.75de
30B	10cd	12.66de
34B	9de	11.00fg
UTPF68	8.76def	12.10ef
UTPF5	7.4efg	9.90ghi
F23	7.33fg	9.83ghi
F70	7.1gh	10.43gh
B1	6.43gh	9.36hi
F113s	6.33gh	9.5ghi
F82	6.16gh	8.5i
B21	6gh	8.66i
B11	5.5h	8.33i
B2	3i	6.33j

مقایسه میانگین با روش فیشر انجام شده است. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری در سطح ۵ درصد است.



شکل ۲. بررسی تولید پروتئاز توسط استرین‌های باکتری در محیط Skim milk agar

جدول ۴. بررسی میزان تولید سیانید هیدروژن توسط استرین‌های باکتری

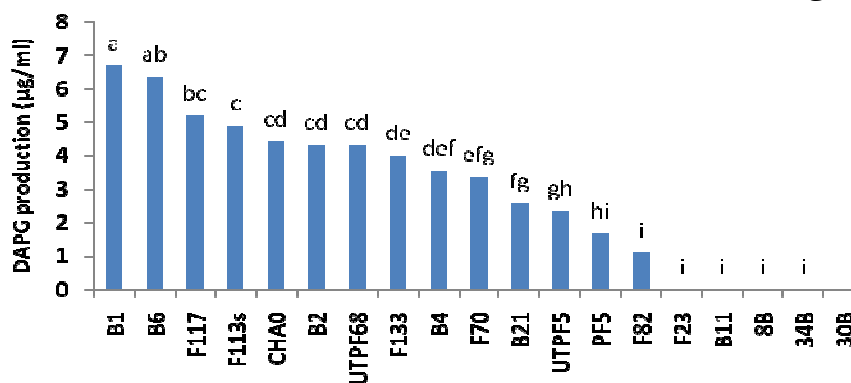
استرین‌های باکتری	درجه تغییر رنگ
F82-8B-34B-30B	۰
B4-B21-F113s-B2-F23	۱
B6-F117-B11-B1	۲
UTPF68-F133-UTPF5-F70-PF5	۳

استرین‌های باکتری داخل تشک‌های پتری حاوی محیط غذایی کینگ‌بی کشت داده شد و در داخل تشک‌های پتری کاغذ معرف قرار گرفت و دو روز بعد تولید سیانید هیدروژن بر اساس تغییر رنگ کاغذ معرف ارزیابی شد. کاغذ معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و در نهایت آجری تغییر رنگ یافت که بر این اساس، میزان تغییر رنگ کاغذ معرف از صفر تا سه مقیاس دهی شد.

ساعت آنتی‌بیوتیک تولید شده استخراج و با روش HPLC ارزیابی شد. استرین‌های B1 و B6 به ترتیب با ۶/۷ و ۶/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیشترین میزان آنتی‌بیوتیک را تولید کردند (شکل ۳-۴). در گروه

بررسی تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG) توسط استرین‌های باکتری استرین‌های باکتری در داخل محیط کشت عصاره مالت مخمر کشت شد و بعد از انکوباسیون به مدت ۷۲

گزارش شده بودند، در این تحقیق قادر به تولید این آنتی‌بیوتیک نبودند یا مقدار آن قابل اندازه‌گیری نبود (شکل ۳).



شکل ۳. ارزیابی تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوکوسینول توسط استرین‌های باکتری با روش HPLC. مقادیر با حروف متفاوت در سطح ۵ درصد اختلاف معنادار دارند (تعیین شده با آزمون فیشر).

مربوط به استرین‌های B1 و 8B با شاخص ۰/۵ بود، به طوری که در بوته‌های آغشته به این استرین‌ها علائم مشاهده شده بسیار ناچیز بود (جدول ۵).

تأثیر استرین‌های باکتری بر بیماری پاختوره و فاکتورهای رشدی گیاه در شرایط اتاقک کشت تمام استرین‌های مورد استفاده در این بررسی به غیر از B4 و F82 به صورت معناداری باعث کاهش علائم بیماری شدند. بیشترین میزان بازدارندگی از بیماری

جدول ۵. تأثیر استرین‌های باکتری در جلوگیری از بیماری پاختوره و فاکتورهای رشدی گیاه در شرایط اتاقک کشت

Total fresh weight of plant(g)	Diseases incidence	Bacterial isolates
0.30d	3.0ab*	B4
0.56abcd	2.5abc	F82
0.62abcd	2.25bcd	B11
0.50bcd	2.0cde	PF5
0.80ab	F113scde	F113s
0.51bcd	2cde	B6
0.49bcd	1.75cde	F23
0.57abcd	1.75cde	B21
0.93a	1.75cde	B2
0.74abc	1.75cde	34B
0.53bcd	1.75cde	30B
0.57abcd	1.5de	UTPF5
0.72abc	1.5de	F70
0.68abcd	1.5de	F117
0.71abc	1.5de	CHA0
0.60abcd	1.25ef	UTPF68
0.60abcd	1.25ef	F133
0.82ab	0.5f	B1
0.60abcd	0.5f	8B
0.38cd	3.25a	Cin**
0.76ab		C***

\* مقادیر با حروف مشابه اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد ندارند (تعیین شده با آزمون فیشر).

\* شاهد آلوده

\*\*\* شاهد سالم

بعد از خارج ساختن از لوله‌ها و جداسازی ذرات ورمیکولیت متصل شده به ریشه‌ها اندازه‌گیری شد.

علاوه بر تعیین شدت بیماری در بوته‌های تیمار شده با چارچ و استرین‌های باکتری، وزن تر آنها نیز بلافاصله

تیمار شده با استرین B2 (با میانگین ۰/۹۳) و کمترین آن مربوط به شاهد آلوده (با میانگین ۰/۳۸ گرم) بود.

میزان وزن تر اندازه‌گیری شده تفاوت قابل توجهی بین تیمارهای مختلف نداشت و تفاوت آن در بسیاری از تیمارها از لحاظ آماری یکسان بود. با وجود این، بیشترین وزن تر اندازه‌گیری شده مربوط به بوته‌های

جدول ۶. مشخصات استرین‌های باکتریایی مورد استفاده برای انگشت‌نگاری DNA به روش rep-PCR

ردیف	نام جدایه	منطقه نمونه‌برداری	میزبان	ژن‌های آنتی‌بیوتیک گزارش‌شده	مرجع
۱	F113S	مشهد	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۲	B1	کرج	گندم	DAPG, Plt, Prn	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۳	F117	مشهد	گندم	DAPG, Plt, Prn	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۴	CHA0	سوئیس	توتون	DAPG, Plt, Prn	(Defago and Hass, 1990)
۵	F70	مشهد	گندم	DAPG, Plt, Prn	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۶	PF5	مشهد	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۷	UTPF68	کرج	برنج	DAPG, Plt, Prn	(احمدزاده و قاسمی، ۱۳۹۱)
۸	UTPF5	کرج	پیاز	DAPG, Plt, Prn	(صابری، ۱۳۸۸)
۱۰	F133	مشهد	گندم	DAPG, Plt, Prn	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۱	F23	مشهد	گندم	DAPG, Plt, Prn	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۲	F82	مشهد	گندم	DAPG, Plt, Prn	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۳	B6	کرج	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۴	B2	کرج	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۵	B21	کرج	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۶	B11	کرج	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۷	B4	کرج	گندم	DAPG	(شیرزاد، ۱۳۸۹)
۱۸	8B	مراغه	گندم	Plt, PCA	(Shirzad et al., 2012)
۱۹	30B	گردنه صاعین	گندم	PCA	(Shirzad et al., 2012)
۲۰	34B	سراب	گندم	PCA	(Shirzad et al., 2012)

DNA چندشکل<sup>۱</sup> تکثیر شده، قابل ارزیابی با دو آغازگر BOX و REP، ۴۵ باند بود که در واقع همه باندهای تکثیر شده با دو آغازگر BOX و REP باندهای چندشکل بودند. هر کدام از آغازگرها به‌طور جداگانه نیز ۱۰۰ درصد چندشکلی را در بین جدایه‌ها نشان دادند و در کل ۱۰۰ درصد پلی‌مورفیسم بین جدایه‌ها با استفاده از این دو آغازگر مشاهده شد. اندازه باندهای قابل ارزیابی برای هر کدام از آغازگرهای BOX و REP به ترتیب بین ۲۵۰۰-۳۰۰ و ۱۰۰۰-۲۰۰۰ جفت باز بود. الگوی انگشت‌نگاری DNA استرین‌ها با استفاده از آغازگرهای BOX و REP به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

الگوی انگشت‌نگاری DNA و دندروگرام رسم شده برای دو آغازگر BOX و REP، به روش UPGMA، ضریب تشابه دایس و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS

#### انگشت‌نگاری DNA و ارزیابی ارتباط ژنتیکی استرین‌های باکتری با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR

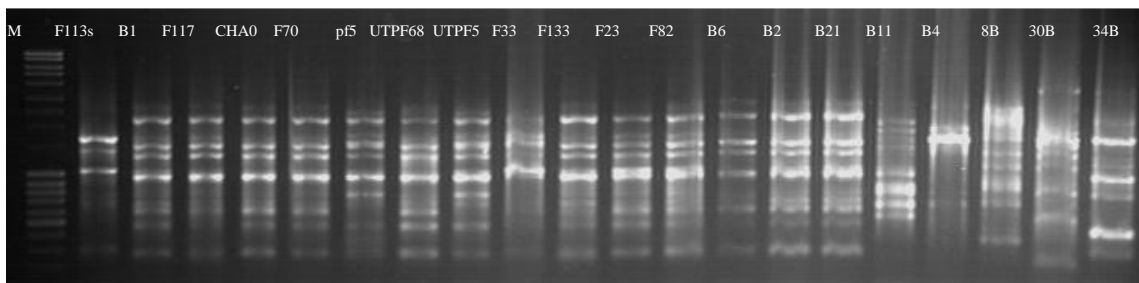
در این تحقیق، از دو آغازگر BOX و ERIC به‌منظور انگشت‌نگاری DNA برای ۲۱ استرین باکتری به روش rep-PCR استفاده شد. از بین ۲۱ استرین، دو استرین دارای الگوی باندی تکثیر شده، قابل ارزیابی نبودند و از مطالعه حذف شدند. بر این اساس، نوزده استرین تولید باندهای چندشکل قابل ارزیابی بودند، که در نهایت ارزیابی تنوع ژنتیکی نوزده استرین باکتری صورت پذیرفت.

در مجموع، ۴۵ باند DNA قابل ارزیابی با دو آغازگر BOX و REP تکثیر شد، که سهم هر کدام از آغازگرهای BOX و REP در تولید باندهای قابل ارزیابی به ترتیب ۲۳ و ۲۲ باند بود. مجموع باندهای

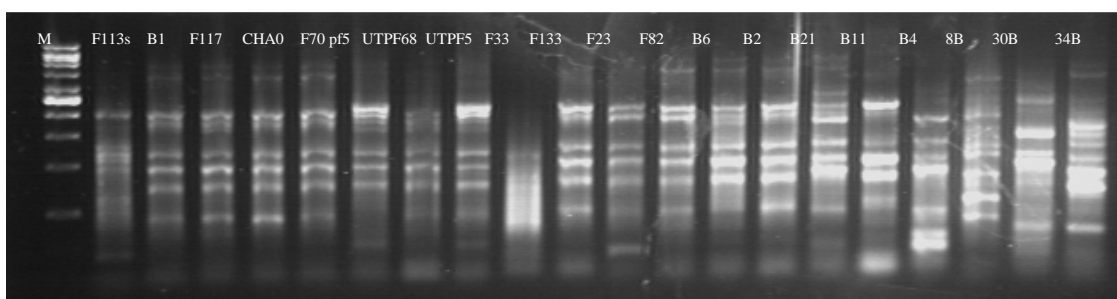
1. Polymorphic

pc-2.02e و برای نوزده استرین باکتری نشان داد که نوزده استرین باکتری در سطح تشابه ۱۰۰-۲۵ درصد

از هم جدا می‌شوند.



شکل ۴. الگوی DNA تکثیرشده به روش rep-PCR برای استرین‌های باکتریایی در ژل آگارز ۱/۲۵٪ با استفاده از آغازگر M.BOX. نشانگر اندازه DNA (100bpGeneruler™DNALadderMix)



شکل ۵. الگوی DNA تکثیرشده به روش rep-PCR برای استرین‌های باکتریایی در ژل آگارز ۱/۲۵٪ با استفاده از آغازگر M.REP. نشانگر اندازه DNA (100bpGeneruler™DNALadderMix)

شباهت ژنتیکی (۱۰۰-۹۲ درصد) را در بین استرین‌ها به خود اختصاص می‌دهند. هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در هر یک از دودمان‌های کلونی برای نوزده استرین باکتری مورد آزمایش، با استفاده از دو آغازگر BOX و REP به روش REP-PCR در جدول ۷ نشان داده شده است. همه دودمان‌ها به جز دودمان B فقط دارای یک جدایه و یک هاپلوتیپ است. دودمان B بیشترین تعداد جدایه‌ها و هاپلوتیپ‌ها را به خود اختصاص داده است، به طوری که یازده جدایه در داخل این دودمان، پنج هاپلوتیپ را تشکیل می‌دهند. هاپلوتیپ‌ها در سطح تشابه ۹۸ درصد تعیین شدند و استرین‌های قرارگرفته در یک گروه هاپلوتیپ بیشترین میزان شباهت ژنتیکی را در بین استرین‌های قرارگرفته در یک دودمان کلونی دارند. بر این اساس استرین‌های B1, F117, CHA0, F70, UTPF6, F133, F82 و F70 که در یک گروه هاپلوتیپ و در دودمان کلونی B قرار می‌گیرند، ۱۰۰٪ شباهت ژنتیکی و الگوی انگشتنگاری DNA یکسانی داشتند،

بر این اساس، نوزده استرین باکتری در قالب نه دودمان کلونی<sup>۱</sup> یا گروه انگشتنگاری<sup>۲</sup> قرارگرفت که با حروف A تا I از هم مشخص شدند (شکل ۶). هر کدام از این دودمان‌ها از جدایه‌هایی تشکیل شده‌اند که از نظر ژنتیکی ۱۰۰-۸۵ درصد با هم شباهت داشتند.

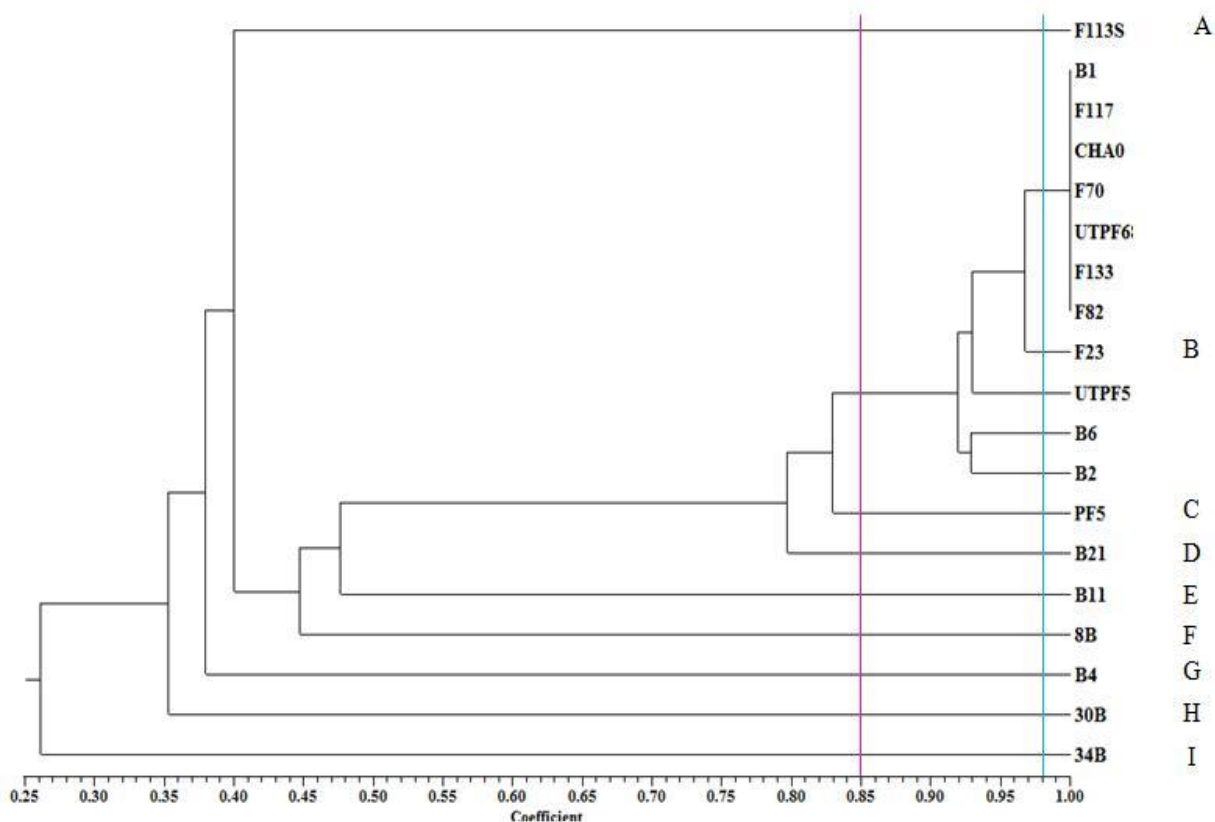
فراوانی جدایه‌ها در هر یک از نه دودمان کلونی شناسایی شده بین نوزده استرین در جدول ۷ بیان شده است. دودمان B دارای یازده و بیشترین تعداد استرین‌هاست. این در صورتی است که سایر دودمان‌ها هر کدام فقط یک استرین دارند. بر اساس دندروگرام تشکیل شده، استرین‌های قرارگرفته در یک دودمان کلونی بیشترین میزان شباهت ژنتیکی را دارند، به طوری که استرین‌های قرارگرفته در دودمان کلونی B شامل B1, F117, CHA0, F70, UTPF6, F133, F82, B2, B6, UTPF5, F23 و F113S بیشترین میزان

1. Clonal lineage  
2. Fingerprintig group

F70 UTPF6, F133, F82, F23, UTPF5, B6, B2 و F113S از خود نشان می‌دهند، به طوری که استرین‌های PF5 و B21 به ترتیب در سطح تشابه ۸۲٪ و ۸۰ درصد از استرین‌های دودمان B جدامی شوند. به طور کلی، نشانگر مولکولی REP-PCR به خوبی توانست ارتباط ژنتیکی جدایه‌ها را نشان دهد و آنها را از هم تفکیک نماید. به طور کلی، از بین نوزده جدایه مورد آزمون، چهارده جدایه B1, F117, CHA0, F70 UTPF6, F113S PF5, F133, F82, F23, UTPF5, B6, B2 و B21 سطح تشابه زیادی نسبت به هم از خود نشان دادند، به طوری که در سطح تشابه ۸۰-۱۰۰ درصد از هم تفکیک شدند.

به طوری که همه ۴۵ باند تکثیر شده با دو آغازگر BOX و ERIC برای این استرین‌ها یکسان است. استرین‌های F23, UTPF5, B6 و B2 نیز که هر کدام یک گروه هاپلو تیبی جداگانه را در دودمان کلونی B تشکیل می‌دهند، به ترتیب شباهت ژنتیکی ۹۲ درصد، ۹۳ درصد، ۹۶ درصد و ۹۲ درصد را نسبت به گروه اول هاپلو تیبی در دودمان B (B1, F117, CHA0, F70, UTPF6, F82) از خود نشان می‌دهند.

همچنین، دو استرین PF5 و B21 اگرچه به ترتیب در دودمان‌های جداگانه C و D قرار می‌گیرند، در بین همه استرین‌ها بیشترین میزان شباهت ژنتیکی را نسبت به استرین‌های دودمان B (B1, F117, CHA0, )



شکل ۶. دندروگرام رسم شده برای نوزده جدایه باکتریایی بر اساس روش UPGMA، با ضریب تشابه دایس (DICE) و با استفاده از نرم‌افزار eNTSYS pc-2.02 با استفاده از دو آغازگر BOX و ERIC که نشان‌دهنده نه دودمان کلونی شناسایی شده است. این دندروگرام با تجزیه و تحلیل ماتریس دوتایی (binary matrix) با مقایسه الگوی DNA تکثیر شده جدایه‌های فوق بر اساس نشانگر مولکولی REP-PCR ایجاد شده است. خط صورتی کشیده شده در سطح تشابه ۸۵ درصد خط برش (cut of line) است، که هر کدام از خطوط متقاطع دندروگرام با آن نمایانگر یک دودمان کلونی است. حروف انگلیسی سمت راست شکل، نشان‌دهنده اسامی دودمان‌هاست. اعضای هر دودمان ۱۰۰-۸۵ درصد با هم شباهت دارند. خط آبی که در سطح تشابه ۹۸ درصد کشیده شده نمایانگر تعداد هاپلو تیب‌ها در هر دودمان کلونی است.

جدول ۷. فراوانی استرین‌های باکتریایی در هر یک از نه دودمان کلونی شناسایی شده بین نوزده استرین و تعیین تعداد هاپلوتیپ‌ها در هر دودمان کلونی با استفاده از دو آغازگر BOX و ERIC به روش REP-PCR

دودمان کلونی	تعداد جدایه	فراوانی جدایه‌ها (%)	تعداد هاپلوتیپ‌های شناسایی شده
A	۱	۵/۲۶	۱
B	۱۱	۵۷	۵
C	۱	۵/۲۶	۱
D	۱	۵/۲۶	۱
E	۱	۵/۲۶	۱
F	۱	۵/۲۶	۱
G	۱	۵/۲۶	۱
H	۱	۵/۲۶	۱
I	۱	۵/۲۶	۱

### بحث

*Ggt* مشاهده می‌شود. (Mavrodi *et al.*, 2001) نیز در تحقیق خود با استفاده از تکنیک rep-PCR چندین استرین از جمله CHA0 را شناسایی کردند که در یک دودمان قرار می‌گرفتند و حاوی سه نوع ژن تولید آنتی‌بیوتیک بودند. در این تحقیق، همچنین در تحقیقات دیگری چنین استرین‌هایی استرین‌های موفق در کنترل بیمارگرهای گیاهی مختلفی گزارش شده‌اند (Keel *et al.*, 1996; Mavrodi *et al.*, 2001; Sharifi-*Tehrani et al.*, 1998). شریفی تهرانی و همکاران (۱۹۹۸) از تکنیک آر‌درا برای گروه‌بندی استرین‌های باکتریایی استفاده و بر اساس این تکنیک استرین‌های حاوی ژن *phl* را به سه گروه تقسیم کردند و در آن بررسی نیز استرین‌های حاوی ژن‌های *phl* و *plt* در یک گروه قرار گرفتند و توانایی بیشتری در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی از خود نشان دادند. آزمون بررسی تولید سیانید هیدروژن نیز نشان داد بیشترین میزان تولید سیانید هیدروژن مربوط به استرین‌های UTPF68، F133، UTPF5، F70 و PF5 است که از این بین استرین‌های UTPF68، F133، UTPF5 و F70 همگی در دودمان کلونی B قرار می‌گیرند و سطح تشابهی بالای ۹۳ درصد دارند. همچنین، استرین PF5 نیز که از نظر میزان تولید سیانید هیدروژن، در حد استرین‌های دودمان B است، دودمان کلونی C را تشکیل می‌دهد و دارای سطح تشابه بالای ۸۳ درصد با استرین‌های دودمان B است. بنابراین، رابطه مستقیم دیگری نیز بین انگشت‌نگاری DNA و آزمون بررسی تولید سیانید هیدروژن مشاهده شد.

آزمون تأثیر باکتری‌ها در جلوگیری از رشد میسلیمی قارچ *Ggt* نشان داد از میان استرین‌های مورد بررسی در محیط کشت PDA، استرین 8B که دودمان کلونی F را تشکیل می‌دهد، بیشترین قدرت بازدارندگی را نسبت به *Ggt* داراست. در تحقیق پیشین، این استرین عامل بازدارنده مؤثری بر علیه *P. drechsleri* گزارش شده بود، چه در شرایط آزمایشگاهی و چه در شرایط گلخانه‌ای (Shirzad *et al.*, 2012). در تحقیق ذکر شده مشخص شد که این استرین ژن‌های کدکننده تولید دو نوع آنتی‌بیوتیک PCA و Plt را داراست. تولید دو نوع آنتی‌بیوتیک متفاوت، با مسیرهای بیوشیمیایی متفاوت (PCA) از طریق مسیر اسید شیکمیک (Turner & Messenger, 1986) و Plt از طریق مسیر پلی‌کتید (Handelsman & Stabb, 1996) در بین باکتری‌ها بسیار نادر است و برای اولین بار Ho *et al.* (2005) گزارش کردند. در تحقیق حاضر نیز استرین 8B خاصیت بازدارندگی بسیار قوی علیه *Ggt* در شرایط درون شیشه و گلخانه از خود نشان داد و به نظر می‌رسد که این دو نوع آنتی‌بیوتیک اثر هم‌افزایی بر هم دارند. به دنبال استرین 8B، استرین‌های UTPF68، F117، F82، CHA0، F70 و B2 که همگی در دودمان کلونی B قرار می‌گیرند و تشابه ژنتیکی زیادی (۱۰۰-۹۳ درصد) دارند، به لحاظ بازدارندگی از قارچ *Ggt* در رتبه بعدی قرار داشتند و میزان بازدارندگی این استرین‌ها تفاوت معناداری با هم نداشت. بنابراین، رابطه مستقیمی بین انگشت‌نگاری DNA به روش rep-PCR و تأثیر باکتری‌ها در جلوگیری از رشد میسلیمی قارچ

فلورسنت وابسته به شرایط محیطی و مواد غذایی موجود است. برای مثال، وجود گلوکز، یون روی و مولیبدن باعث تحریک تولید DAPG می‌شود و این در حالی است که تولید آن در محیط کشتی با منبع کربن گلیسرول و یون کبالت به شدت کاهش می‌یابد. در تحقیق دیگری مشخص شد که فوزاریک اسید تولید شده توسط قارچ *Fusarium oxysporum* تا حد زیادی اثر بازدارنده در تولید آنتی‌بیوتیک DAPG دارد (Schnider-Keel *et al.*, 2000). با توجه به این مشاهدات شاید بتوان گفت که استرین‌های مورد استفاده در این تحقیق قادر به تولید آنتی‌بیوتیک در شرایط درون شیشه بودند، اما بعد از معرفی به شرایط ریزوسفر این توانایی را از دست دادند.

عامل دیگری که نقش تعیین کننده‌ای در قابلیت بیوکنترلی عوامل آنتاگونیست دارد، توانایی آن در کلونیزه کردن ریزوسفر گیاه است. در صورتی که یک عامل بیوکنترل نتواند به صورت مؤثری ریشه را کلونیزه و از منابع موجود در آن به خوبی بهره‌برداری کند، تولید متابولیت‌های بازدارنده آن عامل بی‌اثر خواهد بود و غلظت کلی این متابولیت‌ها در حدی نخواهد بود که بر بیماری مؤثر باشد (Hass & Defago, 2005). در تحقیق حاضر استرین‌های 30B و 34B به صورت قابل توجهی باعث کاهش شدت بیماری شدند و توان بیوکنترلی آنها تفاوت معناداری با استرین‌های تولیدکننده DAPG نداشت. در چندین تحقیق مختلف باکتری‌های تولیدکننده DAPG مهم‌ترین عوامل کنترل‌کننده بیماری پاختوره گندم معرفی شده‌اند (Raaijmakers *et al.*, 1997; Raaijmakers & Weller, 1997; Raaijmakers *et al.*, 1999). شاید بتوان توان بالای استرین‌های 30B و 34B در کاهش بیماری را به خصوصیات دیگری نظیر قابلیت بالای کلونیزه کردن آنها نسبت داد. علاوه بر این، هر دوی این استرین‌ها قادر به تولید مقادیر زیادی پروتئازند (شکل ۲) که خود این متابولیت‌ها نیز نقش مهمی در عملکرد عوامل بیوکنترل دارند (Siddiqui *et al.*, 2005).

مقایسه نتایج مربوط به انگشت‌نگاری DNA به روش REP-PCR با استفاده از دو جفت آغازگر BOX

آزمون بررسی تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوکوسینول با استرین‌های باکتری نشان داد، استرین‌های B1 و B6 بیشترین میزان آنتی‌بیوتیک را تولید کردند. در گروه بعدی آماری استرین‌های F117، F113s، CHA0، B2 و UTPF68 قرار داشتند که میزان تولید DAPG در این استرین‌ها از لحاظ آماری تفاوت معناداری نداشت. به جز استرین F113s، سایر استرین‌های B1، B6، F117، CHA0، B2 و UTPF68 که همگی دارای بیشترین میزان آنتی‌بیوتیک تولیدی بین همه استرین‌ها بودند، متعلق به گروه دودمان کلونی B بود. بنابراین، می‌توان رابطه مستقیم دیگری را بین انگشت‌نگاری DNA و میزان تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوکوسینول مشاهده کرد.

در این تحقیق، تولید متابولیت‌های دیگری نظیر سیدروفور و پروتئاز با استرین‌های باکتریایی نیز بررسی شد و طبق نتایج، ارتباط معناداری بین این دو آزمون و نتایج حاصل از انگشت‌نگاری DNA مشاهده نشد.

با مقایسه نتایج حاصل از بررسی تولید آنتی‌بیوتیک دی‌استیل فلوروگلوکوسینول (شکل ۳) با استرین‌های آنتاگونیست و اثر آنها در کاهش بیماری (جدول ۵) می‌توان مشاهده کرد که بعضی استرین‌ها علی‌رغم تولید مقادیر بالایی آنتی‌بیوتیک DAPG، اثر بیوکنترلی پایینی داشتند. برای مثال، استرین B6 با ۶/۳۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جزء قوی‌ترین استرین‌ها از لحاظ تولید DAPG بود، با وجود این، اثر آن در کاهش بیماری ناچیز بود. با توجه به اینکه در این استرین تنها ژن تولیدکننده DAPG مشاهده شد، به نظر می‌رسد که تولید چندین آنتی‌بیوتیک در عملکرد یک آنتاگونیست تأثیر بسزایی دارد. برای تأیید این نتیجه‌گیری می‌توان به تحقیق شریفی و همکاران (۱۹۹۸) اشاره کرد که استرین‌هایی با توانایی تولید دو نوع آنتی‌بیوتیک را برترین استرین‌ها معرفی کردند. با این حال در این تحقیق استرین F113s با وجود داشتن هر سه نوع ژن تولید آنتی‌بیوتیک عملکرد خوبی از خود نشان نداد. این عدم کارایی را می‌توان به دلایل مختلفی نسبت داد.

Duffy & Deffago (1999) نشان دادند تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورها در سودومونادهای

### نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده، نشانگر مولکولی REP-PCR به‌خوبی توانست ارتباط ژنتیکی استرین‌های باکتریایی را نشان دهد و آنها را بر اساس شباهت و تفاوت ژنتیکی از هم تفکیک کند. با صرف‌نظر از برخی موارد، می‌توان بین نتایج حاصل از انگشت‌نگاری DNA به روش REP-PCR و سایر آزمون‌های انجام شده ارتباط برقرار کرد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود به نشانگر مولکولی REP-PCR به منزله ابزار مفیدی در شناسایی و غربالگری استرین‌های مؤثر در کنترل بیولوژیک توجه شود.

### سپاسگزاری

هزینه انجام این طرح از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تأمین شده است. به این ترتیب نویسنده از مسئولان دانشگاه به خاطر مساعدت در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می‌کند. همچنین، از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران و دانشگاه تربیت مدرس به دلیل همکاری با در اختیار قراردادن سویه‌های باکتریایی و قارچی بسیار سپاسگزارم.

و ERIC و سایر آزمون‌های انجام شده نشان داد، به‌جز مواردی، استرین‌هایی که در دودمان کلونی B قرار می‌گیرند و سطح تشابه بالای ۸۵ درصد دارند، از نظر سایر آزمون‌های انجام شده برای شناسایی استرین‌های آنتاگونیست مؤثر برای کنترل بیماری پاختوره گندم تشابه‌های زیادی دارند. لازم به یادآوری است استرین CHA0 که در حال حاضر یکی از مؤثرترین عوامل در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شود، در دودمان کلونی B قرار می‌گیرد. نکته بسیار مهم این تحقیق این است که تعدادی از استرین‌هایی که طی این تحقیق به‌دست آمدند، همراه با استرین CHA0 در یک دودمان کلونی قرار می‌گیرند و شباهت ژنتیکی ۸۵-۱۰۰ درصد با استرین CHA0 دارند و به لحاظ بسیاری از ویژگی‌های مؤثر در کنترل بیولوژیک شبیه به این استرین‌اند. اگرچه بر اساس نتایج آزمون‌های مختلف در این تحقیق، شاید بتوان استرین B8 را مؤثرترین استرین برای کنترل بیماری پاختوره گندم معرفی کرد، سایر استرین‌هایی که در کنار استرین CHA0 در دودمان کلونی B قرار می‌گیرند نیز ویژگی‌های مطلوب کنترل بیولوژیکی مؤثر برای کنترل بیماری پاختوره گندم را دارند.

### REFERENCES

- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. & Codon, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Burr, T.J., Schroth, M.N. & Suslow, T. (1978). Increased potato yield, by treatment of seed species with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 68, 1377-83.
- Chapon, A., Guillerm, A.Y., Delalane, L., Lebreton, L. & Sarniguet, A. (2002). Dominant colonization of wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and selection of the indigenous microflora in the presence of the take-all fungus. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 449-459.
- Cook, R.J. (2003). Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 73-86.
- De Souza, J.T., Weller, D.M. & Raaijmakers, J.M. (2002). Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. *Phytopathology*, 93, 54-63.
- Dilantha Fernando, W.G., Nakkeeran, S. & Zhang, Y. (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases, in: PGPR: Biocontrol and Biofertilization Z. A. Siddiqui ed., Springer, Netherlands.
- Duffy, B.K. & Weller, D.M. (1995). Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* alone and in combination with *Pseudomonas fluorescens* to suppress take-all of wheat. *Plant Disease*, 79: 907-911.
- Duffy, B.K., Ownley, H.B. & Weller, D.M. (1997). Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology*, 87, 1118-1124.
- Duffy, B.K., Simon, A. & Weller, D.M. (1996). Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology*, 86: 188-
- Fallahzadeh, V., Ahmadzadeh, M. & Sharifi, R. (2009). Screening systemic resistance inducing fluorescent pseudomonads for control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Journal of plant pathology*, 91, 731-738.



12. Fravel, D.R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annual Reviews in Phytopathology*, 26, 75-91.
13. Guo, Y., Zheng, H., Yang, Y. & Wang, H. (2007). Characterization of *Pseudomonas corrugate* strain P94 isolated from soil in Beijing as a potential biocontrol agent. *Current Microbiology*, 55, 247-253.
14. Haas, D. & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by Fluorescent Pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307-319.
15. Hagedorn, C., Gould, W.D. & Bradinelli, R.T. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2793-2797.
16. Handelsman, J. & Stabb, E.V. (1996). Biocontrol of soil-borne plant pathogens. *Plant Cell*, 8, 1855-1869.
17. Ho, H.H., Lu, J.Y. & Gong, L.Y. (1984). *Phytophthora drechsleri* causing blight of *Cucumis* species in China. *Mycologia*, 76, 115-121.
18. Keel, C. & Défago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. In: *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Gange, A.C. and Brown, V. K (eds.). Blackwell Scientific Publishers, London, England. P 27-46.
19. Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R.J. & Thomashow, L.S. (1996). Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 552-563.
20. Kumar, N.R., Arasu, V.T. & Gunashekar, P. (2002). Genotyping of antifungal compounds producing plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*. *Current Science*, 8, 1463-1466.
21. Leong, J. (1986). Siderophore : their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology*, 24, 187-209.
22. Liu, H., Dong, D., Peng, H., Zhang, X. & Xu, Y. (2006). Genetic diversity of phenazine- and pyoluteorin-producing pseudomonads isolated from green pepper rhizosphere. *Archives of Microbiology*, 185, 91-98.
23. Marten, P., Smalla, K. & Berg, G. (2000) Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 463-471
24. Masco, L., Huys, G., Gevers, D., Verbrugghen, L. & Swings, J. (2003). Identification of bifidobacterium species using rep-PCR fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 557-563
25. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Defago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant pathology*, 44: 40-50.
26. Mavrodi, O.V., McSpadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller, D.M., & Thomashow, L.S. (2001). Genetic diversity of phlD from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91: 35-43.
27. Mazzola, M., Fujimoto, D.K., Thomashow, L.S. & Cook, R.J. (1995). Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 2554-2559.
28. McSpadden Gardener, B.B., Schroeder, K.L., Kaloger, S.E., Raaijmakers, J.M., Thomashow, L.S., & Weller, D.M., (2000). Genotypic and phenotypic diversity of phlD containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 1939-1946.
29. Meyer, J.M. & Abdallah, MA. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *Journal of Genetic Microbiology*, 107: 319-328.
30. O'Sullivan, M., Stephens, PM. & O'Gara, F. (1991) Extracellular protease production by fluorescent *Pseudomonas* spp. and the colonization of sugar beet roots and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 23:623-627.
31. Oberhansli, T., Defago, G. & Haas, D. (1991). Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *Journal of General Microbiology*. 137, 2273-2276.
32. Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R., & Gluckert, A., (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied Environmental Microbiology*, 66 : 948-955.
33. Raaijmakers, J.M. & Weller, D.M. (1998). Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 144-152

34. Ramazani, B.M. (2002). Study of effect of some antagonistic bacteria on *Fusarium oxysporum*, the causal agent of root and collar rot of onion. MSc dissertation submitted to collage of agriculture of Tehran University. (In Farsi)
35. Saberi, R. (2004). Study of effect of some antagonistic bacteria and chemical compounds on *Phytophthora citrophthora*, casual agent of pistachio gummosis. MSc dissertation submitted to collage of agriculture of Tehran University. (In Farsi)
- Sarani, Sh. (2005). Biological control of *Rhizoctonia solani* Kuehn, the causal agent of rapeseed damping off by some antagonistic bacteria. MSc dissertation submitted to collage of agriculture of Tehran University (In Farsi)
36. Schipper, B., Bakker, A.W. and Bakker, A.H.M. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Reviews in Phytopathology*, 25: 339-359.
37. Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy B., Gigot-Bonnefoy, C., Reimann, C., Notz, R., De'fago, G., Haas, D., & Keel C. (2000). Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of Bacteriology*, 182: 1215-1225 .
38. Shakiba, B. (2004). Study of effect of some antagonistic bacteria on *Tiarosporella phaseolina* fungus, the causal agent of soybean charcoal rot. MSc dissertation submitted to collage of agriculture of Tehran University. (In Farsi)
39. Sharifi, R., Ahmadzade, M., Sharifi-Tehrani, A., & Fallahzade V. (2009). Competition for iron uptake by fluorescent pseudomonads to control *Rhizoctoniasolani* Kühn, a causing agent of bean damping-off disease. *Journal Of Agriculture Science and Technology*, 22:183-196.
40. Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natasch, A., Moenne-Loccoz, Y. & Defago, G. (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2, 4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16s rDNA. *European. Journal of Plant Pathology*. 104, 631-643.
41. Shirzad, A., Fallahzadeh, V. & Pazhouhandeh, M. (2012). Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of crown and root rot of cucumber caused by *Phytophthora drechsleri*. *The Plant Pathology Journal*, 28, 1-9
42. Shirzad, A. (2008). Interaction of *Trichoderma atroviride* and fluorescent pseudomonads in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici and its role on the expression patterns of chitinase gene. PhD dissertation submitted to collage of agriculture of Tehran University. (In Farsi)
43. Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Habibkhan, G. and Ali, NI. 2003. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S+ in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1625-1634 .
44. Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Habibkhan, G. & Ali, N.I. (2003). Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S+ in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1625-1634.
45. Spiers, A.J., Buckling, A. & Rainey, P.B. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146, 234-2350.
46. Thomashow, L.S., Weller, D.M., Bonsall, R.F. & Pierson, L.S. (1990). Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 908-912.
47. Tran, H., Kruijt, M. & Raaijmakers, J.M. (2008). Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 839-851.
48. Turner, J.M. & Messenger, A.J. (1986). Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances in Microbiology Physiology*, 27: 211-275.
49. Voisard, C., Keel, C., Hass, D. & Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress block root rot of tobacco under genobiotic condition. *European Molecular Biology Organization Journal*, 8, 351-358.
50. Weller, D.M., Howie, W.J. & Cook, R.J. (1988). Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici and suppression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 78, 1094-1100 .
51. Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., McSpadden Gardener, B.B.M. & Thomashow, L.S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 40, 309-348.