کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (۱۵۵-۱۴۳)

ردیابی ژن‌های *hcnAB* و *phlD* در سودوموناداهای فلورسنت با توان مهار زیستی *Fusarium graminearum* و بررسی توانایی آن‌ها در کلونیزاسیون اکتوریزوسفر گندم

۱. حدیث شهبازی؛ ۲. کیوان بهبودی*؛ ۳. محمد جوان نیکخواه؛ ۴. مسعود احمدزاده
۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادان، گروه گیاه پزشکی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۵/۲۳)

چکیده

توانایی کنترل بیولوژیکی سودوموناداهای فلورسنت از رقابت بر سر فضا و مواد غذایی، آنتی‌بیوز و کلونیزاسیون ریزوسفر ناشی می‌شود. در این مطالعه، توانایی بیوکنترلی ۳۹ سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* در برابر قارچ *Fusarium graminearum* عامل بلایت خوشهٔ گندم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بازدارندگی از رشد *F. graminearum* با استفاده از آزمون کشت متقابل، اثر ضد قارچی ترکیبات فرّار و غیرفرّار تولیدشده توسط سویه‌ها ارزیابی شد. در تمام این آزمایش‌ها چهار سویهٔ I P13، UTPf127، UTPf125 و UTPf105 در کنترل بیمارگر موفق‌تر بودند. در نتیجه، این سویه‌ها از نظر وجود ژن‌های *hcnAB* و *phlD* و توانایی کلونیزاسیون اکتوریزوسفر گندم در شرایط گلخانه‌ای بررسی شدند. ژن *hcnAB* در تمام سویه‌ها ردیابی شد؛ در حالی که، ژن *phlD* در تمام باکتری‌ها به جز P13 مشاهده شد. جمعیت باکتری‌ها در اکتوریزوسفر گندم در سه دورهٔ چهارده روزه توسط سری رقت روی محیط کشت KB^{+++} تعیین شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی‌داری میان سویه‌های مختلف در کلونیزاسیون اکتوریزوسفر در روزهای مختلف وجود دارد و با گذشت زمان جمعیت باکتری‌ها در ریزوسفر کاهش می‌یابد. سویه‌های P13 وUTPf125 در روز ۴۲ام قابل ردیابی نبودند، در حالی که، در روز ۲۸ام جمعیت آن‌ها بیش از $۱/۸\times۱۰^{۴}$ سلول در گرم وزن تر ریشه ردیابی شده بود. باکتری UTPf127 با جمعیت $۱/۱\times۱۰^{۴}$ سلول در گرم وزن تر ریشه در روز ۴۲ام بیشترین میزان کلونیزاسیون و پایداری در ریزوسفر را نشان داد.

کلیدواژگان: آنتی‌بیوتیک، ریزوسفر، سیانید هیدروژن، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

گندم از میان محصولات کشاورزی به‌دلیل نقش مهمی که در عرصهٔ سیاسی و اقتصادی کشورها به‌خصوص کشورهای در حال توسعه ایفا می‌کند، یک محصول استراتژیک در تمام دنیا به‌حساب می‌آید. سطح زیر کشت گندم در سال زراعی ۹۲-۹۱ در ایران ۶/۴ میلیون هکتار بوده است (Ministry of Agriculture Statistics 2015).

گونه‌های مختلفی از جنس فوزاریوم مانند، *Fusarium culmorum*، *F. pseudograminearum* (teleomorph: *Gibberella coronicola*) و *F. graminearum* (teleomorph: *G. zeae*) از جمله گونه‌های مهم خسارت‌زای فوزاریوم در مزارع گندم هستند و چون در شرایط خشکسالی خسارت بیشتری وارد می‌کنند، به عوامل پوسیدگی پایین ساقهٔ گندم در

* تلفن: ۰۹۱۲۳۰۷۸۳۷۸
E-mail: behbodi@ut.ac.ir

مناطق خشک[1] مشهورند (Cook 2010). در ایران تاکنون، چندین گونهٔ فوزاریوم از بذر، ریشه، طوقه و خوشهٔ گندم جدا شده و بیماریزایی بعضی از آن‌ها نیز در شرایط گلخانه به اثبات رسیده است (Amini 2006, Amini *et al.* 1998, Arjmandian and Rohani 1998, Babadoost 1995, Darvishnia *et al.* 1998, Darvishnia *et al.* 2006, Foroutan *et al.* 1995, Golzar and Ershad 1994, Mansoori 1995, Ravanlou and Banihashemi 1999, Safaee 2004, Saremi 2004).

بیماری بلایت خوشهٔ گندم با عامل *Fusarium graminearum* Schwab یکی از بیماری‌های مهم گندم در مناطق معتدل و نیمه‌گرمسیری است. قارچ عامل بیماری سبب پوسیدگی ریشه، طوقه، ساقه و همچنین، خشک‌شدن و از بین‌رفتن سنبله‌های گندم می‌شود. ابتدا، این بیماری در ایران در سال ۱۳۷۱ از مناطق گرگان، مازندران و آذربایجان گزارش شد. بر اثر ابتلای خوشه‌های گندم به این بیماری، سموم قارچی و زهرابه ترشح می‌شود که مصرف محصول موجب به خطرانداختن سلامتی انسان می‌شود. عامل بیماری علاوه بر گندم به جو نیز حمله می‌کند.

بررسی‌های فراوانی مبنی بر کاربرد باکتری‌های مفید در کاهش شدت بیماری‌های قارچی در گندم انجام شده است. باکتری‌های تحریک‌کنندهٔ رشد گیاه (PGPR)[2] به گروهی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که براساس ترشح‌های ریشهٔ گیاهان، خود را با آن‌ها سازگار می‌کنند و به این ترتیب از سایر باکتری‌ها که نمی‌توانند کلنیزاسیون مؤثری را بر ریشه داشته باشند، جدا می‌شوند (Bais *et al.* 2006, Bakker *et al.* 2007, Botelho and Mendonça-Hagler 2006). یکی از تاکسون‌های مهم باکتریایی که در تحقیقات قبلی عامل کنترل بیولوژیک قارچ *F. graminearum* شناخته شده است، اعضای جنس *Pseudomonas* spp. است (Henkes *et al.* 2011, Nourozian *et al.* 2006, Stockwell *et al.* 1999, Stockwell *et al.* 1997). با توجه به نیازهای تغذیه‌ای ساده، نرخ رشد سریع، توانایی تولید ترکیبات آنتاگونیستی و در نتیجه رقابت ریزوسفری بالا، استرین‌های اختصاصی *Pseudomonas* spp. برای مقابله با بیماری‌های گیاهی خاکزاد بسیار امیدبخش به نظر می‌رسند.

تولید آنتی‌بیوتیک توسط سودوموناده‌های فلورسنت[3]، یکی از مکانیسم‌های مهم در کنترل بیماری‌ها توسط این باکتری‌ها به‌شمار می‌رود (Bloemberg and Lugtenberg 2003). از جمله مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به، آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴ـ دی‌استیل فلوروگلوسینول[4] (DAPG) (Keel *et al.* 1992, Shanahan *et al.* 1992)، فنازین[5] (Brisbane *et al.* 1987, Mazzola *et al.* 1992)، پیرول‌نیترین[6] (Chancey *et al.* 2002)، پایولوتئورین[7] (Howell and Stipanovic 1980) اشاره کرد. آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سودوموناس‌ها، روی فعالیت طیف وسیعی از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها اثر بازدارنده دارند. کلنیزاسیون مؤثر ریشه توسط باکتری‌ها و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها در منطقهٔ ریزوسفر می‌تواند عامل مهمی در کنترل بیماری‌های گیاهی به‌خصوص بیمارگرهای خاک‌زاد باشد (Weller 2007).

فلوروگلوسینول‌ها فعالیت ضد قارچی (Keel *et al.* 1992, Maurhofer *et al.* 1992)، ضد باکتریایی (Isnansetyo *et al.* 2003)، ضد ویروسی، نماتدکشی (Cronin *et al.* 1997, Siddiqui and Shaukat 2003)، تنظیم‌کنندگی رشد و در مواردی ایجاد گیاه‌سوزی در گیاهان دارند (Moynihan *et al.* 2009, Weller 2007). آنتی‌بیوتیک ۲ و ۴ـ دی‌استیل فلوروگلوسینول (DAPG) یکی از فلوروگلوسینول‌ها مهم به‌شمار می‌رود که در ترشح‌های خارج‌سلولی بیشتر سودوموناده‌های فلورسنت دیده می‌شود و نقش کلیدی در بیوکنترل عوامل بیماریزا ایفا می‌کند. این آنتی‌بیوتیک در کنترل قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدها مؤثر بوده است و همانند ۲ و ۴ـ دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) فعالیت علف‌کشی نیز دارد (Keel *et al.* 1992, Maurhofer *et al.* 1995, Reddy *et al.* 1969). ثابت شده است که بین جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت تولیدکنندهٔ DAPG

1. Dryland foot rot
2. plant growth promoting rhizobacteria
3. fluorescent pseudomonads
4. 2,4-diacetylphloroglucinol
5. Phenazine
6. Pyrrolnitrin
7. Pyoluteorin

در فرا ریشه و کاهش بیماری‌های مختلف ریشه همبستگی مثبتی وجود دارد. به‌طوری که، در گونه‌های سودوموناس تولیدکنندهٔ DAPG دو نوع فعالیت شامل افزایش رشد گیاه و جلوگیری از بیماری‌های ریشه تفکیک‌شدنی است (Delany *et al.* 2000).

یکی از مکانیسم‌های بسیار مهم کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی باکتری‌های ریزوسفری مفید، تولید سیانیدهیدروژن است (DeCoste *et al.* 2010). HCN تولیدشده، سیستم تنفسی قارچ‌های بیماریزا را مختل می‌کند و از این طریق موجب توقف رشد آن‌ها می‌شود. سیانید بازدارندهٔ قوی آنزیم سیتوکروم اکسیداز (جزء نهایی چرخهٔ تنفس هوازی) در بسیاری از موجودات زنده است. در گونه‌های سودوموناس بیوسنتز سیانیدهیدروژن توسط آنزیم هیدروژن سیانید اکسیداز موجود در غشا انجام می‌شود (Castric 1977). این آنزیم به اکسیژن مولکولی بسیار حساس است و تنها بعضی از گونه‌های سودوموناس به‌ویژه *P. fluorescens* چنین آنزیمی را دارند. حداکثر تولید سیانیدهیدروژن توسط این باکتری‌ها در پایان مرحلهٔ رشد تصاعدی و ابتدای فاز ساکن است (Laville *et al.* 1998).

در این تحقیق پس از بررسی توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* علیه *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاهی، ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز سیانیدهیدروژن و آنتی‌بیوتیک DAPG در باکتری‌های آنتاگونیست ردیابی شدند و سپس، وزن تر گیاه و میزان کلونیزاسیون اکتوریزوسفر ریشهٔ گندم رقم فلات (رقم حساس به بیمارگر) توسط این باکتری‌های بیوکنترل در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ جدایه‌های باکتری‌های بیوکنترل و عامل بیماری

در این آزمایش ۳۹ جدایهٔ *P. fluorescens* از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران و آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، دریافت شد. قارچ *F. graminearum* از آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان تهیه شد.

آزمون‌های بیوکنترل برای بررسی کارایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* علیه *F. graminearum* در آزمایشگاه

آزمون کشت چهارنقطه‌ای: این آزمون براساس روش اکسپرت و دیگات انجام شد. به این ترتیب که مقدار ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) در چهار نقطه به فاصلهٔ ۳ سانتی‌متر از مرکز تشتک پتری حاوی PDA+NA (به نسبت ۱:۱) کشت داده شد. سپس، دیسکی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر حاوی کشت پنج روزهٔ قارچ بیمارگر در مرکز آن قرار داده شد. تشتک‌های پتری به‌مدت سه روز در دمای ۲۶ C در داخل انکوباتور نگه‌داری شدند. سپس، فاصلهٔ بین پرگنه قارچ عامل بیماری و باکتری‌های آنتاگونیست اندازه‌گیری و میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی تعیین شد. زمانی که پرگنهٔ قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد به نقاط ترسیم‌شده رسید، آزمایش متوقف شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴۰ تیمار (۳۹ جدایهٔ باکتری *P. fluoresens* و یک تیمار شاهد با آب مقطر سترون) و ۴ تکرار انجام شد (Expert and Digat 1995).

بررسی اثر ضد قارچی ترکیبات فرّار باکتریایی علیه بیمارگر

این آزمون به‌روش فیدامن و روزال انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) از باکتری رشدیافته به‌مدت یک روز در محیط کشت مایع نوترینت براث (NB)، روی محیط کشت آگار مغذی پخش شد. هم‌زمان یک قرص میسلیومی از کشت پنج روزهٔ قارچ روی محیط کشت PDA کشت داده شد. آنگاه دو تشتک پتری حاوی باکتری و قارچ در زیر هود و شرایط سترون به‌طوری که، تشتک حاوی قارچ در بالا قرار گیرد، مقابل هم قرار گرفت و با نوار پارافیلم کاملاً مسدود شدند. در تیمار شاهد از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون باکتری استفاده شد. تشتک‌ها به‌مدت هفت روز در دمای ۲۶ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. درصد کاهش رشد کلونی بیمارگر نسبت به شاهد که بدون باکتری بود، به‌عنوان معیاری برای ارزیابی اثر ضد میکروبی ترکیبات فرّار استفاده شد (Fiddaman and Rossall 1993).

بررسی اثر ضد قارچی ترکیبات غیرفرّار باکتریایی

این آزمون به‌روش کراس و لوپر انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^8 واحد تشکیل‌دهندهٔ کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) روی محیط PDA پخش شد و پس از ۷۲ ساعت رشد در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس، با میلهٔ شیشه‌ای باکتری‌ها از سطح محیط جدا شدند و با استفاده از پنبهٔ سترون سطح محیط کشت به‌خوبی پاک شد. تشتک‌های پتری به‌صورت وارونه به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض کلروفرم زیر جریان هوای هود قرار گرفتند. سپس، به‌مدت ۱/۵ ساعت در پتری به‌صورت نیمه‌باز قرار گرفته شدند تا کلروفرم کاملاً تبخیر شود. آنگاه، یک دیسک ۰/۵ سانتی‌متری از کشت پنج روزهٔ قارچ در مرکز پتری قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۶ درجهٔ سلسیوس به‌مدت هفت روز نگه‌داری شدند و اندازه‌گیری زمانی انجام شد که پرگنهٔ قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد به انتهای پتری رسید. تیمار شاهد بدون باکتری و کلروفرم در نظر گرفته شد. درصد کاهش رشد کلونی بیمارگر نسبت به شاهد که بدون باکتری بود، به‌عنوان معیاری برای ارزیابی اثر ضد قارچی ترکیبات غیرفرّار باکتری استفاده شد. این درصد براساس رابطهٔ زیر تعیین شد: ۱۰۰×(قطر کلونی در پتری شاهد/قطر کلونی در پتری تیمار)- ۱=درصد کاهش رشد کلونی نسبت به شاهد (Kraus and Loper 1990).

ردیابی ژن‌های کلیدی در سنتز بیوسنتز سیانیدهیدروژن و آنتی‌بیوتیک DAPG در باکتری‌های بیوکنترل

ابتدا، به‌منظور استخراج DNA، ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری که در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لوریا برتانی[1] به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور شیکردار رشد کرده بود، به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد، مایهٔ رویی حذف شد؛ سلول‌های باکتری ته‌نشین‌شده با بافر نمکی فسفات[2] دو مرتبه شست‌وشو و سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ شد. در نهایت، باکتری‌های ته‌نشین‌شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون سوسپانسیون شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۹ درجهٔ سلسیوس جوشانده شد و بلافاصله در یخ قرار گرفت. سلول‌های لیزشده در دمای ۲۰- برای انجام آزمایش‌ها نگه‌داری شدند (Cuong *et al.* 2011).

به‌منظور ردیابی ژن‌های کلیدی بیوسنتز سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک 2, 4-diacetylphloroglocinol (DAPG) در باکتری‌های منتخب کنترل بیولوژیک، به‌ترتیب ژن‌های *hcnAB* و *phlD* ردیابی شدند. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ است.

۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR شامل ۱ میکرولیتر DNA باکتری، ۰/۵ میکرومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۱۳ میکرولیتر water PCR، ۳ میکرولیتر Phusion HF buffer و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Phusion DNA polymerase بود. برنامهٔ PCR شامل ۳۰ ثانیه واسرشت اولیه در ۹۸°C و سپس، یک برنامهٔ ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۱۵ ثانیه در ۹۸°C، ۳۰ ثانیه در ۶۳°C برای *phlD* و ۶۷°C برای *hcnAB*، ۳۰ ثانیه در ۷۲°C و در پایان ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. جدایهٔ *P. fluorescens* Pf5 به‌عنوان شاهد مثبت انتخاب شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در ۷۵ ولت به‌مدت یک ساعت و ۲۰ دقیقه الکتروفورز و نتایج با استفاده از Gel- Documentation بررسی شد (Cuong *et al.* 2011).

بررسی کلونیزاسیون ریزوسفر گندم توسط باکتری‌های بیوکنترل

به‌منظور بررسی توانایی کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری‌های بیوکنترل، موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک با کمی تغییر با استفاده از روش مازولا و همکارانش به‌صورت زیر انجام شد. ابتدا، از هر چهار جدایهٔ باکتریایی مورد بررسی موتانت مقاوم به کلرامفنیکل (۱۰۰µmL) در محیط کشت KB^+ تهیه شد و سپس، هر چهار جدایهٔ باکتریایی در محیط کشت $KingB^{+++}$ با کمی تغییرات حاوی آمپیسیلین ($100 \mu mL^-$)، کلرامفنیکل ($100 \mu mL^-$) و سیکلوهگزمید ($75 \mu mL^-$) کشت شدند (Mazzola *et al.* 2004). کلونی‌های به‌دست‌آمده، دو بار روی محیط NA بدون آنتی‌بیوتیک کشت شدند. جدایه‌هایی که فنوتیپ مشابه با جدایهٔ وحشی و سرعت رشد بالاتر روی این محیط کشت را داشتند برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

1. Luria-Bertani Broth (LB)
2. Phosphate-buffered saline (PBS)

برای بررسی‌های گلخانه‌ای از بذر گندم رقم فلات استفاده شد. ابتدا، سطوح بذور با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه سترون و ۳۰ دقیقه زیر جریان آب قرار داده شد. سپس، به‌منظور جوانه‌زنی ۱۰ گرم بذر روی کاغذ صافی سترون مرطوب‌شده با آب مقطر سترون درون تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری قرار گرفتند. تشتک‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس، بذور جوانه‌زده با سوسپانسیون با جمعیت 10^8 واحد تشکیل‌دهندهٔ کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) باکتری‌های مقاوم به سه آنتی‌بیوتیک، مایه‌زنی شدند. مخلوطی از خاک مزرعه و شن و خاک برگ به نسبت وزنی ۱:۱:۱ تهیه و در سه روز متوالی به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس اتوکلاو شد و داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانهٔ ۲۰ سانتی‌متر ریخته شد. پنج بذر مایه‌زنی‌شدهٔ گندم در سطح خاک قرار داده و با ۱ سانتی‌متر ورمیکولیت سترون پوشانده شدند. گلدان‌های شاهد حاوی بذوری بودند که با سوسپانسیون باکتری مایه‌زنی نشده بودند. گیاهان در دمای ۲۴ درجهٔ سلسیوس با ۱۶ ساعت روشنایی در گلخانه نگهداری شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر تیمار انجام شد. گیاهچه‌ها در ۱۴، ۲۸ و ۴۲ روز بعد از کاشت جمع‌آوری شدند، جمعیت باکتری‌های موجود در اکتوریزوسفر گیاه ارزیابی و وزن تر گیاه در روز ۴۲ بعد از کاشت اندازه‌گیری شد.

بررسی کلونیزاسیون اکتوریزوسفر گندم توسط باکتری‌های بیوکنترل

برای جداسازی باکتری‌ها، ریشه به‌شدت تکان داده شد تا خاک سست متصل به ریشه‌ها کاملاً جدا شود. سپس، در نمونه‌ای شامل ۵ گیاه از هر تکرار، ۰/۵ گرم از ریشه و خاک فراریشه‌ای به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار سترون منتقل و به‌مدت ۳ دقیقه به کمک دستگاه ورتکس مخلوط شد. در ادامه سری رقت تهیه و رقت‌های مناسب روی محیط کشت انتخابی KB^{+++} کشت شدند. برای هر رقت ۴ تکرار در نظر گرفته شد و تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. سپس، به شمارش کلونی‌های ظاهرشده اقدام شد؛ تعداد باکتری در گرم وزن تر ریشه برآورد شد (Mazzola *et al.* 2004).

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها در ۴ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری و مقایسهٔ میانگین صفات به‌روش دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.2 اجرا شد.

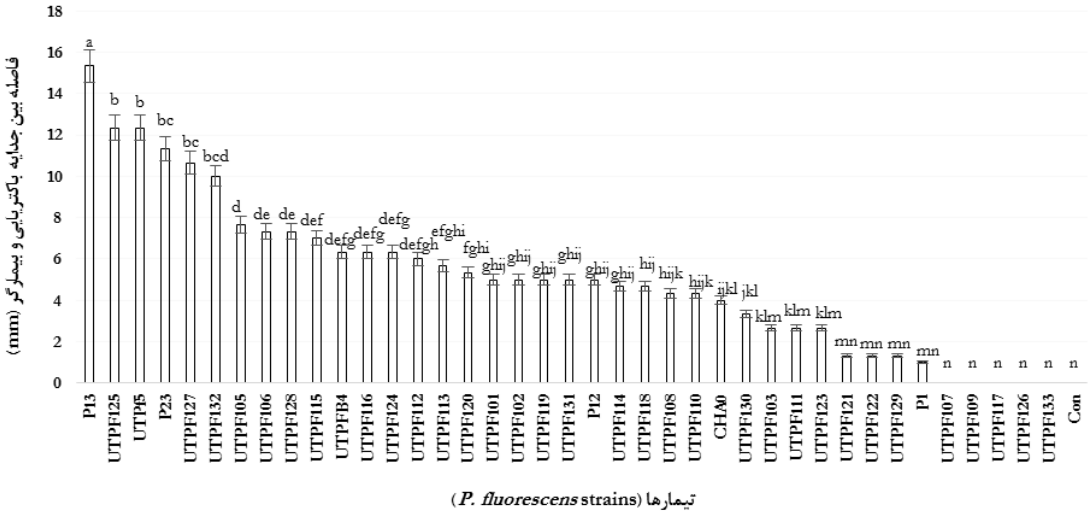
جدول ۱. ژن‌های هدف و آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز DNA باکتری‌های منتخب

ژن هدف	آغازگر	توالی	منابع
phlD	Phl2a	GAGGACGTCGAAGACCACCA	Raaijmakers *et al.* 1997
	Phl2b	ACCGCAGCATCGTGTATGAG	
hcnAB	PM2	TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCTGG	Svercel *et al.* 2007
	PM7-26R	CCGCTCTTGATCTGCAATTGCAGGCC	

نتایج و بحث

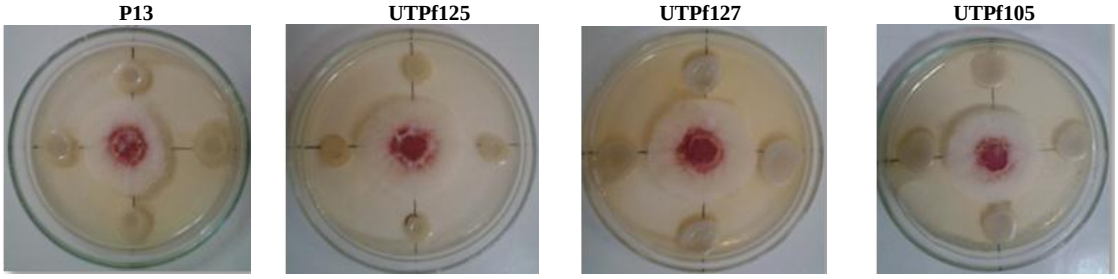
عوامل مهار زیستی مانند باکتری‌های PGPR علاوه بر اینکه رشد گیاه را افزایش می‌دهند، مکانیزم‌های مقاومت سیستمیک را نیز در میزبان فعال می‌کنند و در نتیجه باعث افزایش عملکرد و محصول می‌شوند. یکی از گروه‌های مهم باکتریایی PGPR که در خاک مطالعه شده است، جنس سودوموناس است. در این تحقیق توانایی بیوکنترلی ۳۹ استرین باکتریایی *P. fluorescens*، در برابر عامل بیماری پوسیدگی خوشهٔ گندم *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. از میان این باکتری‌ها، سی و سه جدایه از ریزوسفر گندم و شش جدایه از ریزوسفر سایر گیاهان از مناطق مختلف ایران جدا شده بودند. توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه مثل سیدروفور، سیانیدهیدروژن، پروتئاز، متابولیت‌های فرّار و غیرفرّار تمامی این جدایه‌ها قبلاً بررسی و قدرت بیوکنترل آن‌ها در برابر سایر عوامل بیماریزای گیاهی به اثبات رسیده است (Broukanlo madlo 2011, Sobhanipoor 2003). در این تحقیق آزمون‌های

چهارنقطه‌ای انجام شد و نه جدایهٔ باکتریایی P13، P23، UTPf132، UTPf128، UTPf5، UTPf106، UTPF125، UTPF127 و UTPF105 انتخاب شدند که بیشترین میزان کنترل‌کنندگی را داشتند (شکل‌های ۲ و ۱). این جدایه‌ها هالهٔ بازدارندگی بین ۱۵/۳۳ـ۷/۳۳ میلی‌متر را داشتند. سپس، آزمون اثر ضد قارچی ترکیبات فرّار و غیرفرّار انجام شد؛ از میان آن‌ها ۴ جدایهٔ باکتریایی P13، UTPF125، UTPF127 و UTPF105 برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند که توانایی ایجاد بیشترین بازدارندگی را داشتند (جدول ۲).



شکل ۱. تأثیر سویه‌های آنتاگونیست بر بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium graminearum*

اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن (P≤۰/۰۱) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند. هر ستون در نمودار میانگین ۴ تکرار است.



شکل ۲. تأثیر ۴ سویه‌های برتر *P. fluorescens* در بازدارندگی از رشد بیمارگر

آنتی‌بیوتیک‌ها با تأثیر بر بیمارگر و مختل‌ساختن اعمال حیاتی بیمارگرها از مکانیسم‌های مهم در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شوند. در سی سال گذشته، پیشرفت چشمگیری دربارهٔ شناسایی مکانیسم‌های کنترل بیمارگرها توسط سودموناداهای فلورسنت انجام شده است. چون در بیشتر سیستم‌های بیمارگرـ میزبان، مکانیسم اولیهٔ کنترل بیولوژیکی بیمارگر توسط سودموناداها مکانیسم آنتی‌بیوز است (Thomashow and Weller 1996)، به نظر می‌رسد که کارایی متغیر این باکتری‌ها ممکن است از تغییر در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی در شرایط مختلف محیطی ناشی شود. محققان مختلف از جدایه‌های *P. fluorescens* انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های فنازین ۱ـ کربوکسیلیک اسید، ۵ هیدروکسی ـ فنازین ۲ـ کربوکسیلیک اسید، ۵ هیدروکسی ـ فنازین، ۲ و ۴ دی‌استیل فلوروگلوسینول، پیولوتئورین و پیرول نیترین را گزارش و تأثیرات آن‌ها در بازداری از رشد ریسهٔ قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها را اثبات کرده‌اند (Chin-A-Woeng *et al.* 1997, Savchuk *et al.* 2001). نتایج این تحقیق نشان داد که در آزمون تولید متابولیت‌های غیرفرّار، هر ۴ جدایهٔ سودوموناد فلورسنت تأثیر چشمگیری در کنترل بیمارگر داشتند؛ به‌طوری که، این جدایه‌ها ۹۹/۱۶ـ

۹۷/۲۲ درصد کاهش رشد بیمارگر را سبب شدند (جدول ۲).

آزمون تولید مواد فرّار

تولید ترکیبات فرّار توسط جدایه‌های *P. fluorescens* یکی از مکانیسم‌های کنترل بیماری‌های قارچی است (Kraus and Loper 1992, Laville *et al.* 1998). آنالیز داده‌ها نشان داد که هر چهار آنتاگونیست فوق دارای قدرت تولید مواد فرّار بودند و در جلوگیری از رشد میسلیوم در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با کنترل دارند. UTPf125 با ۳۴/۶۶ درصد و P13 با ۱۳/۶۶ درصد به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ را سبب شدند (جدول ۲).

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین بازدارندگی از رشد قارچ توسط ۴ آنتاگونیست منتخب

باکتری‌های بیوکنترل	درصد بازدارندگی از رشد در آزمون ترکیبات غیرفرّار	درصد بازدارندگی از رشد در آزمون ترکیبات فرّار
UTPf105	۹۷/۷۷a	۱۸/۳۳b
P13	۹۷/۳۶a	۱۳/۶۶c
UTPf125	۹۹/۱۶a	۳۴/۶۶a
UTPf127	۹۷/۲۲a	۳۳a

گروه‌بندی براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد است.

ردیابی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز سیانیدهیدروژن و آنتی‌بیوتیک DAPG

از جمله ترکیبات فرّار شایعی که توسط باکتری‌های بیوکنترل تولید می‌شود، می‌توان به سیانید هیدروژن اشاره کرد که تولید آن توسط جدایه‌های *P. fluorescens* به اثبات رسیده است (Castric and Castric 1983). توانایی تولید HCN به‌طور عمده در بین باکتری‌های سودوموناس متمرکز است و برخی از باکتری‌های ریزوبیومی نیز توان تولید سیانید را از خود نشان داده‌اند (Bakker and Schippers 1987). توانایی تولید HCN توسط باکتری‌های PGPR یک قابلیت بالقوه و مکانیسمی مناسب برای کنترل بیولوژیک علف‌های هرز است که باید به‌عنوان یک جنبهٔ جدید در روش‌های تقویت و تحریک رشد گیاهان زراعی و افزایش عملکرد محصول، بیشتر مورد توجه قرار گیرد (Alström and Burns 1989). با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای PM2 و PM7-26R قطعهٔ DNA به طول تقریبی ۵۷۰ جفت باز تکثیر شد. بر این اساس هر چهار آنتاگونیست واجد ژن بیوسنتز سیانیدهیدروژن بودند (جدول ۳).

یکی از آنتی‌بیوتیک‌های کلیدی تولیدشده توسط سودوموناس‌های فلورسنت، ۲ و ۴ دی‌استیل فلورو گلوسینول است که به‌عنوان یکی از متابولیت‌های مؤثر ضد میکروبی تولیدی توسط این باکتری‌ها مطرح شده است و نقش این آنتی‌بیوتیک در کنترل قارچ‌های *Fusarium culmorum* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقهٔ گندم (Madloo *et al.* 2013)، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل بیماری پاخورهٔ گندم، *Thielaviopsis basicola* عامل پوسیدگی سیاه ریشهٔ توتون، *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی، *Pythium ultimum* عامل مرگ گیاهچهٔ خیار، *Rhizoctonia solani* روی پنبه (Velusamy *et al.* 2006, Weller 2007) و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* عامل پژمردگی نخود ایرانی (Ebrahimi Kazemabad *et al.* 2013) به اثبات رسیده است. با استفاده از آغازگرهای Phl2a و Phl2b قطعهٔ DNA به طول تقریبی ۷۴۵ جفت باز تکثیر شد. ردیابی ژن تولید آنتی‌بیوتیک DAPG نشان داد که تمامی باکتری‌ها بجز سویهٔ P13 ژن تولید این آنتی‌بیوتیک را دارا هستند (جدول ۳). از آنجا که این سویه در آزمون تولید مواد غیرفرّار در تشتک پتری ۹۷/۳۶ درصد سبب کاهش رشد بیمارگر شد، احتمالاً تولید آنتی‌بیوتیک‌های دیگری می‌کند.

جدول ۳. ردیابی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز HCN و آنتی‌بیوتیک DAPG در باکتری‌های بیوکنترل *P. fluorescens*

باکتری‌های بیوکنترل	ژن‌های هدف	
	PhlD	*hcnAB*
UTPf105	+	+
P13	-	+
UTPf125	+	+
UTPf127	+	+
P. fluorescens Pf5	+	+

تعیین جمعیت سویه‌های موتانت ناحیهٔ اکتوریزوسفری

در کنترل بیولوژیک تنها تولید آنتی‌بیوتیک یا سایر مواد ضد میکروبی کافی نیست، بلکه مهم‌تر از آن کلونیزاسیون و افزایش جمعیت و قدرت بقا در ریزوسفر است. نقش باکتری‌های کلنیزه‌کنندهٔ ریشه در کنترل بیمارگرهای گیاهی بسیار حایز اهمیت است. شیپرز و همکارانش بیان کردند که کلونیزاسیون ناکافی ریشه به کاهش فعالیت بیوکنترل منجر می‌شود (Schippers *et al.* 1987). طبق نظر لوگتنبرگ و همکارانش و دکرز و همکارانش، کلنیزاسیون موفق ریزوسفر توسط باکتری‌ها زمانی است که باکتری پس از قرار گرفتن بر بذر به‌مدت چند هفته در حضور میکروفلور بومی خاک پایدار بماند (Dekkers *et al.* 1999, Lugtenberg *et al.* 1999).

بررسی میزان کلونیزاسیون چهار سویهٔ باکتریایی در اکتوریزوسفر گندم در شرایط گلخانه‌ای نشان داد که هر چهار جدایهٔ باکتریایی می‌توانند ریشه را کلونیزاسیون کنند و تفاوت معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۱$) میان جمعیت آن‌ها در روزهای مختلف نمونه‌برداری وجود دارد. توانایی کلونیزاسیون و پایداری در اکتوریزوسفر گندم توسط سه سویهٔ UTPf105، UTPf125 و UTPf127 که دارای ژن *phlD* هستند متفاوت بود. این نتایج، یافته‌های قبلی را تأیید می‌کند؛ مبنی بر اینکه استرین‌های سودوموناد فلورسنت مولد DAPG تفاوت‌هایی را از نظر توانایی کلنیزه‌کردن ریشه و تثبیت در فراریشه گیاهان از خود نشان می‌دهند (Landa *et al.* 2002, Madloo *et al.* 2013, Raaijmakers and Weller 2001). در بیشتر موارد میزان جمعیت اولیهٔ مستقرشده بر ریشه با گذشت زمان کاهش می‌یابد (Kluepfel 1993, Weller 1983, Weller 1994). نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های رشدیافته روی محیط کشت KB^{+++} مشخص کرد هنگامی که بذور گندم با جمعیت $۱۰^{۸}$ باکتری مایه‌زنی می‌شوند سویه‌های باکتریایی با جمعیت $۱/۴\times۱۰^{۷}$ـ $۱/۲\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری در گرم بذر، بذور گندم را کلونیزه کردند (جدول ۴)، در سویهٔ P13 بیشترین و سویهٔ UTPf125 کمترین میزان کلونیزاسیون بذر گندم مشاهده شد. مقایسهٔ میانگین‌های به‌دست‌آمده از الگوی کلونیزاسیون ریشهٔ گندم در طی سه دورهٔ چهارده روزه مشخص کرد که تراکم جمعیت باکتری پس از چهارده روز، در اولین روز نمونه‌برداری دارای کاهش چشمگیری بود. به نظر می‌رسد این کاهش جمعیت به‌دلیل ازبین‌رفتن تعدادی از سلول‌های باکتری یا ناتوانی آن‌ها در چسبندگی و استقرار روی بذر باشد (Hajmalek Zanjani *et al.* 2011). بیشترین جمعیت باکتری در این روز مربوط به باکتری UTPf127 بود که جمعیت آن از $۱/۳\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری بر گرم بذر که بذور گندم را کلونیزه کرده بود، به $۱/۰۳\times۱۰^{۶}$ سلول باکتری در گرم ریشهٔ گندم رسید (جدول ۴). بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که با گذشت زمان میزان جمعیت باکتری کلونیزه‌کنندهٔ ریشهٔ گندم کاهش می‌یابد. به‌طوری که، در روز ۲۸ام در مقایسه با جمعیت اولیهٔ باکتری در بذر، میزان کلونیزاسیون در دو جدایهٔ باکتریایی UTPf127 و UTPf105 حدود ۲ واحد لگاریتمی کاهش یافت (شکل ۳). این نتایج یافته‌های ین و همکارانش را تأیید می‌کند. آن‌ها نشان دادند که جمعیت باکتری بعد از بیست و هشت روز به‌طور معنی‌داری در حدود ۲ واحد لگاریتمی کاهش می‌یابد (Yan *et al.* 2003).

جدول ۴. تراکم جمعیت (سلول باکتری در گرم ریشه) چهار سویهٔ سودوموناد فلورسنت مورد مطالعه طی سه دورهٔ رشدی در اکتوریزوسفر گندم رقم فلات (هر دورهٔ رشدی چهارده روز است)

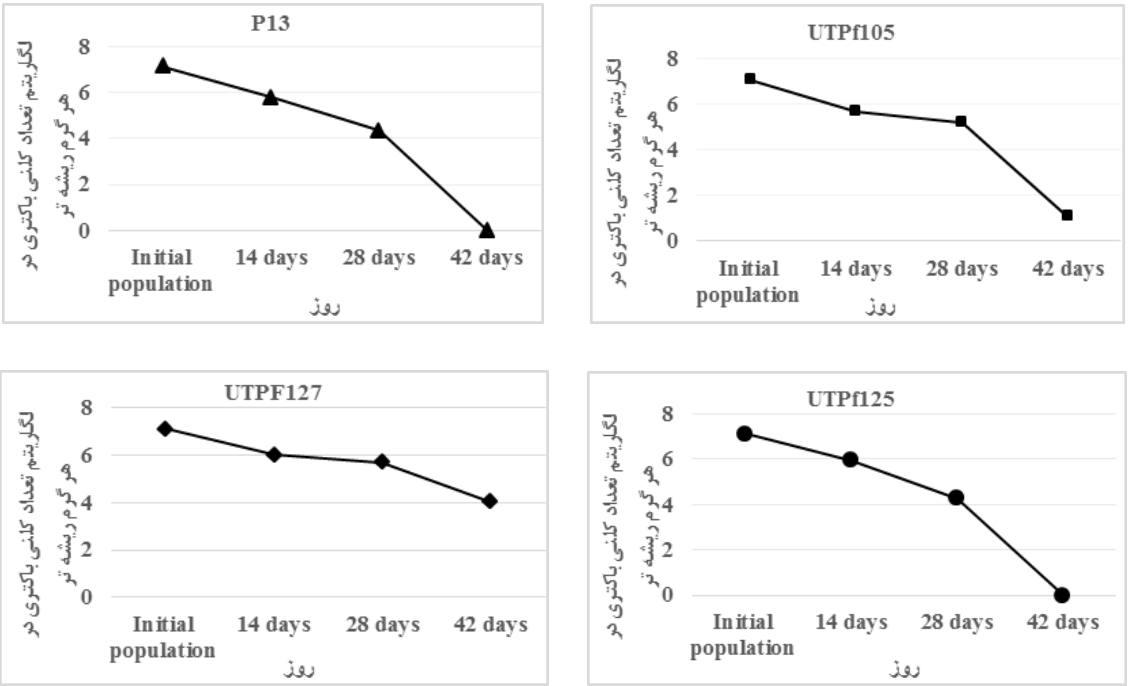
تیمارها	جمعیت اولیه (cfu/g fresh root)	روز ۱۴ام	روز ۲۸ام	روز ۴۲ام
UTPf105	$۱/۳\times۱۰^{۷}$b	$۵/۰۴\times۱۰^{۵}$g	$۱/۷\times۱۰^{۵}$h	۶×۱۰^{۲}i
P13	$۱/۴\times۱۰^{۷}$a	$۶/۱\times۱۰^{۵}$f	$۲/۲\times۱۰^{۴}$i	ND*
UTPf125	$۱/۲\times۱۰^{۷}$c	$۸/۶\times۱۰^{۵}$e	$۱/۸\times۱۰^{۴}$i	ND
UTPF127	$۱/۳\times۱۰^{۷}$b	$۱/۰۳\times۱۰^{۶}$d	$۴/۸\times۱۰^{۵}$g	$۱/۱\times۱۰^{۴}$i

هر عدد شامل میانگین ۴ تکرار است. گروه‌بندی براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد است.

*ND: غیرقابل ردیابی

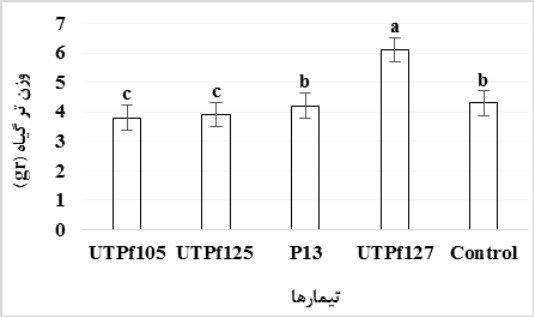
جمعیت دو سویهٔ باکتریایی UTPf127 و UTPf105 در این روز به‌ترتیب به $۴/۸×۱۰^{۵}$ و $۱/۷×۱۰^{۵}$ سلول باکتری در گرم ریشه رسید. سویهٔ UTPf125 با جمعیت $۱/۸×۱۰^{۴}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه کمترین میزان جمعیت کلونیزه‌کنندهٔ ریشه را در روز ۲۸ام داشت (جدول ۴). توانایی کلونیزه‌کردن ریشه به‌حدی مهم است که برخی محققان آن را مبنای انتخاب آنتاگونیست برتر در نظر می‌گیرند (Kraus and Loper 1992) و تغییرات جمعیت آنتاگونیست‌های به‌کار گرفته‌شده توسط محققان زیادی بررسی شده است (Baligh 1999, Bennett and Lynch 1981, Buddrus-Schiemann *et al.* 2010, De La Fuente *et al.* 2002). ریشهٔ گیاهان ظرفیت معینی را از نظر میزان کلونیزاسیون دارند. سودوموناس‌های فلورسنت، ریشه را با جمعیت $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه کلونیزه می‌کنند (Vincent *et al.* 1991) و جمعیت‌های کمتر از این مقدار نمی‌توانند تأثیر مثبتی روی گیاه و بیوکنترل داشته باشند (Weller *et al.* 2002).

توانایی یک باکتری در کلونیزاسیون ریشه شرط لازم برای فعالیت کنترل بیولوژیک علیه قارچ‌های بیمارگر به‌شمار می‌رود. دو باکتری UTPf127 و UTPf105 در این زمینه موفق‌تر بودند، به‌طوری که، چهل و دو روز پس از کشت گیاه، به‌ترتیب با جمعیت ۱/۱×۱۰۴ و ۶×۱۰۲ سلول باکتری در هر گرم ریشه باز هم قابل ردیابی بودند. اما دو جدایهٔ P13 و UTPf125 با اینکه جمعیت مناسبی در روز ۲۸ام داشتند، اما در روز ۴۲ام قابل ردیابی در خاک نبودند (جدول ۴). در این تحقیق به‌منظور شمارش باکتری‌های موجود در ریزوسفر از شمارش کلنی‌ها بر تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت KB+++ استفاده شد. تعداد باکتری‌های ریزوسفر اغلب با شمارش واحدهای تشکیل‌دهندهٔ کلنی (CFU) بر پلیت‌های دارای آگار اندازه‌گیری می‌شوند. این روش تعداد باکتری‌ها را نسبت به تعداد واقعی کمتر تخمین می‌زند، زیرا تجمع سلول‌ها به‌صورت یک تک کلنی ظاهر می‌شود (Bennett and Lynch 1981) و تنها ۱۰-۱ درصد باکتری‌های موجود در خاک کشت‌شدنی هستند. به‌رغم محدودیت‌های موجود در تخمین صحیح جمعیت‌های میکروبی به کمک رقیق‌سازی، اگر این روش به‌صورت مقایسه‌ای استفاده شود می‌تواند کاربرد بیشتری داشته باشد (Duineveld and Van Veen 1999).



شکل ۳. نرخ کلونیزاسیون اکتوریزوسفر سویه‌های سودوموناد فلورسنت در گندم رقم فلات.
داده‌ها بیان‌کنندهٔ لگاریتم میانگین تعداد سلول باکتری در گرم وزن تر ریشه هستند.

به‌منظور بررسی تأثیر سویه‌های باکتریایی در میزان افزایش رشد گیاه، بعد از گذشت چهل و دو روز از کاشت گیاهچهٔ گندم، وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد (شکل ۴). تنها گیاهانی که با سویهٔ UTPf127 تیمار شده بودند افزایش رشد زیادی در مقایسه با شاهد سالم نشان دادند. این افزایش رشد در شرایطی رخ داد که بیشترین جمعیت باکتری اندازه‌گیری‌شده در اکتوریزوسفر گندم در این روز مربوط به این باکتری بود. نتایج حاصله نشان داد که سویهٔ بیوکنترل UTPf127 علاوه بر اینکه بیشترین میزان کلونیزاسیون و پایداری در ریزوسفر را دارد، می‌تواند در افزایش رشد گیاه گندم به‌عنوان یک محرک رشدی عمل کند.



شکل ۴. تأثیر چهار سویهٔ سودوموناد فلورسنت مورد مطالعه بر وزن تر گندم رقم فلات در روز ۴۲ام.
هر عدد شامل میانگین ۴ تکرار است. گروه‌بندی براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد است.

سپاسگزاری

در این تحقیق از یک جدایهٔ باکتری (P13) از کلکسیون باکتری پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، استفاده شد. لازم است از جناب آقای دکتر نوازاله صاحبانی، عضو هیأت علمی گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، به‌دلیل امکان استفاده از این جدایه تشکر نماییم. از جناب آقای دکتر دهقانی (مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) برای جداسازی قارچ و امکان اجازهٔ استفاده از آن در این پژوهش، تشکر قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Alström S, Burns RG (1989) Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soils 7(3): 232-238.

Amini J (2006) Identification of *Fusarium* species associated with root and crown of wheat in Kurdistan province. In 17th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 42.

Amini J, Ershad D, Torrabi M (1998) A survey on mycoflora of wheat root in Tehran province. In Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 45.

Arjmandian A, Rohani H (1998) Fungi associated with root and crown of wheat in Hamedan province. In 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 44.

Babadoost M (1995). Incidence of seed-borne fungal diseases of barley in East Azerbaijan and Ardebil Provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 31 (1/4). (in Persian)

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review Plant Biology 57: 233-266.

Bakker AW, Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. Soil Biology and Biochemistry 19(4): 451-457.

Bakker PA, Pieterse CM, Van Loon L (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology 97(2): 239-243.

Baligh M (1999) Evaluation of *Burkholderia cepacia* Strains: root colonization of catharanthus roseus and in-vitro inhibition of selected soil-borne fungal pathogens. Paper read at Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.

Bennett R, Lynch J (1981) Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. Journal of General Microbiology 125(1): 95-102.

Bloemberg GV, Lugtenberg BJ (2003) Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New Phytologist 157(3): 503-523.

Botelho GR, Mendonça-Hagler LC (2006) Fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere of crops: an overview. Brazilian Journal of Microbiology 37(4): 401-416.

Brisbane PG, Janik LJ, Tate M, Warren R (1987) Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). Antimicrobial Agents and Chemotherapy 31(12): 1967-1971.

Broukanlo madlo P (2011) The population of Fluorescent pseudomonads in wheat cultivars and their biocontrol activity against *Fusarium culmorum* the causal agent of wheat crown and root rot, University of Tehran, Tehran, Iran. (in Persian)

Buddrus-Schiemann K, Schmid M, Schreiner K, Welzl G, Hartmann A (2010) Root colonization by *Pseudomonas* sp. DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. Microbial Ecology 60(2): 381-393.

Castric KF, Castric PA (1983). Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 45(2): 701-702.

Castric PA (1977) Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. Journal of Bacteriology 130(2): 826-831.

Chancey ST, Wood DW, Pierson EA, Pierson LS (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.

Chin-A-Woeng TF, de Priester W, van der Bij AJ, Lugtenberg BJ (1997) Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. Molecular Plant-Microbe Interactions 10(1): 79-86.

Cook R (2010) Fusarium root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. Compendium of wheat diseases and pests. 3rd edition. In: WW Bockus, R. Bowden, R. Hunger, W. Morrill, T. Murray, and R. Smiley (eds.). The Pennsylvania State University Press, University Park, USA: 37-39.

Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O'gara F (1997) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Applied and Environmental Microbiology 63(4): 1357-1361.

Cuong ND, Nicolaisen MH, Sørensen J, Olsson S (2011) Hyphae-colonizing *Burkholderia* sp.-a new source of biological control agents against sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* AG1-IA) in rice. Microbial Ecology 62(2): 425-434.

Darvishnia M, Alizadeh A, Mohamadi Goltapeh E (1998) *Fusarium* sepcies and other fungi associated with crown and root rot of wheat in Lorestan province. In 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 20.

Darvishnia M, Alizadeh A, Zare R, Safaee N, Davari M (2006) Report of three new species from *Fusarium graminearum* clade for Iran. In 17th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 449.

De La Fuente L, Quagliotto L, Bajsa N, Fabiano E, Altier N, Arias A (2002). Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. Soil Biology and Biochemistry 34(4): 545-548.

DeCoste NJ, Gadkar VJ, Filion M (2010) *Verticillium dahliae* alters *Pseudomonas* spp. populations and HCN gene expression in the rhizosphere of strawberry. Canadian Journal of Microbiology 56(11): 906-915.

Dekkers L, Phoelich C, Lugtenberg B (1999) Bacterial traits and genes involved in rhizosphere colonization. Atlanta Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Delany I, Sheehan MM, Fenton A, Bardin S, Aarons S, O'Gara F (2000) Regulation of production of the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. Microbiology 146(2): 537-546.

Duineveld BM, Van Veen J (1999) The number of bacteria in the rhizosphere during plant development: relating colony-forming units to different reference units. Biology and fertility of soils 28(3): 285-291.

Ebrahimi Kazemabad Z, Rouhani H, Jamali F, Mahdikhani Moghadam F (2013) Identification of *phID* gene with fluorescent pseudomonads from rhizospheric zone of Chickpea and its relation with biological control of Chickpea *Fusarium* wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Journal of Plant Protection 27(4): 407-416. (in Persian)

Expert J, Digat B (1995) Biocontrol of Sclerotinia wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. Canadian Journal of Microbiology 41(8): 685-691.

Fiddaman P, Rossall S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 74(2): 119-126.

Foroutan A, Bamdadian T, Valipour M, Kianoosh H (1995) Fungi associate with root and crown rot of wheat in Mazandaran province. In 12th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 46.

Golzar H, Ershad D (1994) Occurrence of pink snow mold in Gorgan area. Iranian Journal of Plant Pathology 30: 83. (in Persian)

Hajmalek Zanjani M, Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Behboudi K, RA SR (2011) Effects of *Rhizoctonia solani* on root colonization of Canola by *Pseudomonas fluorescens* strain UTPF86. Iranian Journal of Plant Protection Science 42(1): 163-170. (in Persian)

Henkes GJ, Jousset A, Bonkowski M, Thorpe MR, Scheu S, Lanoue A, Schurr U, Röse US (2011) *Pseudomonas fluorescens* CHA0 maintains carbon delivery to *Fusarium graminearum*-infected roots and prevents reduction in biomass of barley shoots through systemic interactions. Journal of Experimental Botany 62(12): 4337-4344.

Howell C, Stipanovic R (1980) Suppression of *Pythium ultimium* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluterin. Phytopathology 70(8): 712-715.

Isnansetyo A, Cui L, Hiramatsu K, Kamei Y (2003) Antibacterial activity of 2, 4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. International Journal of Antimicrobial Agents 22(5): 545-547.

Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Dfago G (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. Mol Plant Microbe Interact 5: 413Lodewyckx.

Kluepfel DA (1993) The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Annual Review of Phytopathology 31(1): 441-472.

Kraus J, Loper J (1990) Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies pp. 175-177. Paper read at Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, Interlacen, Switzerlan.

Kraus J, Loper J (1992) Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Phytopathology 82(3): 264-271.

Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D (1998) Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Journal of Bacteriology 180(12): 3187-3196.

Lugtenberg BJ, Kravchenko LV, Simons M (1999) Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environmental Microbiology 1(5): 439-446.

Madloo PB, Behboudi K, Tohidfar M, Jouzani GS, Ahmadzadeh M (2013) Response of some important Iranian wheat cultivars to *Fusarium culmorum* under genetic diversity of indigenous bio-control agent fluorescent *Pseudomonas* spp. Australian Journal of Crop Science 7(7): 1003-1009.

Mansoori B (1995) Soil-borne diseases of wheat in Mazandaran province. In 12th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran, 58.

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. Plant Pathology 44(1): 40-50.

Maurhofer M, Keel C, Schnider U, Voisard C, Haas D, Défago G (1992) Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathology 82(2): 190-195.

Mazzola M, Cook RJ, Thomashow LS, Weller D, Pierson L (1992) Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. Applied and Environmental Microbiology 58(8): 2616-2624.

Mazzola M, Funnell DL, Raaijmakers J (2004) Wheat cultivar-specific selection of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species from resident soil populations. Microbial Ecology 48(3): 338-348.

Ministry of Agriculture Statistics (2015). In The first volume of agricultural statistics crop season 1391-92. Economic and Planning Department. Center for Information and Communication Technology, 154.

Moynihan JA, Morrissey JP, Coppoolse ER, Stiekema WJ, O'Gara F, Boyd EF (2009) Evolutionary history of the phl gene cluster in the plant-associated bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Applied and Environmental Microbiology 75(7): 2122-2131.

Nourozian J, Etebarian HR, Khodakaramian G (2006) Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin Journal Science and Technology 28(1): 29-38.

Ravanlou A, Banihashemi Z (1999) Taxonomy and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with root and crown rot of wheat in Fars Province. Iranian Journal of Plant Pathology 35: 37-45. (in Persian)

Reddy T, Khudiakov I, Borovkov A (1969) *Pseudomonas fluorescens* strain 26-o--producer of phytotoxic substances. Mikrobiologiia 38(5): 909.

Safaee D (2004) Fungi associated with root and Crown rot of wheat in Kermanshah province. In 16th Iranian Plant Protection Congress. Tabriz, Iran, 38.

Saremi H (2004) Crown rot and root rot diseases on wheat caused by *Fusarium graminearum* as new species in Zanjan, East Azarbyjan and Ardabil provinces. In 16th Iranian Plant Protection Congress Tabriz, Iran, 44.

Savchuk S, Fernando WGD, Parks PS (2001) Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. Canadian Journal of Plant Pathology 23(2): 205.

Schippers B, Bakker AW, Bakker PA (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual review of phytopathology 25(1): 339-358.

Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. Applied and Environmental Microbiology 58 (1):353-358.

Siddiqui IA, Shaukat SS (2003) Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: Importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylpholoroglucinol. Soil Biology and Biochemistry 35(12): 1615-1623.

Sobhanipoor A (2003) Biological control of *Fusarium* wilt disease by bacteria *Pseudomonas fluorescens* in cumin, University of Tehran, Tehran, Iran. (in Persian)

Stockwell C, Bergstrom G, Luz Wd (1999). Selection of microbial antagonists for biological control of *Fusarium* head blight of wheat. Paper read at Proceedings of the 1999 National Fusarium Head Blight Forum, Michigan State University, University Printing, East Lasting, MI.

Stockwell C, Luz Wd, Bergstrom G (1997) Biocontrol of wheat scab with microbial antagonists. Phytopathology 87: S94.

Thomashow LS, Weller DM (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. In Plant-microbe interactions: Springer, 187-235.

Velusamy P, Immanuel JE, Gnanamanickam SS, Thomashow L (2006) Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2, 4-diacetylphloroglucinol. Canadian Journal of Microbiology 52(1): 56-65.

Vincent MN, Harrison L, Brackin J, Kovacevich P, Mukerji P, Weller D, Pierson E (1991) Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. Applied and Environmental Microbiology 57(10): 2928-2934.

Weller D (1983) Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. Phytopathology 73(11): 1548-1553.

Weller DM (1994) Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms 1-18.

Weller DM (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology 97(2): 250-256.

Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 40(1): 309-348.

Yan Z, Reddy M, Kloepper JW (2003) Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. Canadian Journal of Microbiology 49(6): 383-389.

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 4, No. 2, Autumn & Winter 2015/ 2016

Detection of *hcnAB* and *phlD* genes in fluorescent pseudomonads biological control agent of *Fusarium graminearum* and studying their ability to ectorhizosphere colonization of wheat

Hadis Shahbazi[1], Keivan Behboudi[2*], Mohammad Javan Nikkhah[3] and Masoud Ahmadzadeh[4]
1, 2, 3, 4. Ph.D. Student, Associate Professor and Professors, Department of Plant Protection, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jun. 15, 2015 - Accepted: Aug. 14, 2015)

ABSTRACT

The biological control ability of fluorescent *Pseudomonas* spp. results from competition for space and untrient, antibiosis and colonization in the rhizosphere. Biocontrol fluorescent pseudomonads produce a wide variety of antibiotics. In this study, the biocontrol ability of 39 strains of biocontrol *Pseudomonas fluorescens*, was examined against *Fusarium graminearum* the causal agent of wheat *Fusarium* Head Blight in vitro. Growth inhibition of *F. graminearum* was examined by a dual culture test and the antifungal activity of bacterial volatile and nonvolatile metabolites. In all experiments, four strains of *Pseudomonas fluorescens* P13, UTPf127, UTPf125 and UTPf105 were the most effective in controlling the pathogen. These strains were evaluated for screening the *phlD* and *hcnAB* genes and their ability to colonize ectorhizosphere of wheat under greenhouse conditions in 14, 28 and 42 days after planting. *hcnAB* gene was detected in all strains while *phlD* was detected in all bacteria except for P13. Wheat seeds were inoculated with the same concentration (10^8 cfu/ml) of each strains and sterile distilled water as a control and bacterial populations were enumerated on selective KB^{+++} medium. The results showed that there are significant differences among strains in different days. Bacterial population colonizing the ectorhizosphere was decreased by the time. P13 and UTPf125 strains couldn't be detected in 42nd day, on the other hand, they could be detected in 28th days more than 1.8×10^4 Cfu/g (fresh weight of root). UTPf127 population remained in ectorhizosphere at 1.1×10^4 CFU/g (fresh weight of root) in 48th day.

Keywords: antibiotic, biological control, hydrogen cyanide, rhizosphere.

* Corresponding author E-mail: behbodi@ut.ac.ir Tel: +98 912 3078378