doi: 10.22124/c.2018.7911.1314

دانشگاه گیلان
دانشکده علوم کشاورزی

تحقیقات غلات

دوره هشتم/ شماره دوم/ تابستان ۱۳۹۷ (۲۳۸-۲۲۷)

غربال سویه‌های *Pseudomonas flourescens* واجد ژن فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید و بررسی تاثیر آن در مهار زیستی بیماری پاخوره گندم

مسعود خان‌احمدی[۱]، فرشته بیات[۲*]، فاطمه جمالی[۳] و حمیدرضا نوریزدان[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۸

چکیده

پاخوره گندم با عامل قارچی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* از عوامل بیماری‌زای مهم گندم در کشور به‌شمار می‌رود. باکتری‌های *Pseudomonas flourescens* از طریق کلونیزاسیون ریشه و تولید آنتی‌بیوتیک در منطقه ریزوسفر در کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی به‌ویژه بیماری‌های خاکزاد موثر هستند. در مطالعه حاضر، ۲۱ جدایه *P. flourescens* از نظر وجود ژن‌های دخیل در بیوسنتز فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید (*phzC* و *phzD*) از طریق آغازگرهای اختصاصی PCA2a و PCA3b در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی نظیر سیدروفور و سیانید هیدروژن توسط این باکتری‌ها و تأثیر باکتری‌ها بر رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی نیز بررسی شد. در آزمایش گلخانه‌ای، توانایی جدایه‌های منتخب در کنترل پاخوره گندم در آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های باکتریایی قادر به تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور در شرایط آزمایشگاهی بودند. نتایج آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های wt_20، eq1_3، wt1_65، eq1_4، 2_79، whm_3 و wbo2_7 با تأثیر مثبت بر تعدادی از شاخص‌های رشد مانند طول ریشه/ شاخساره، وزن خشک/ وزن تر ریشه و شاخساره و نیز کاهش شاخص بیماری‌زایی در کنترل بیماری پاخوره در گیاهان آلوده موثر بودند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که از این باکتری‌ها می‌توان در مهار زیستی بیماری پاخوره استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های خاکزاد، سیانید هیدروژن، سیدروفور، کلونیزاسیون ریشه، کنترل زیستی

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۳- استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
۴- استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران
* نویسنده مسئول: bayatfereshteh59@gmail.com

مقدمه

پاخوره (Take-all) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی ریشه، طوقه و قاعده ساقه گندم می‌باشد که هر ساله خسارت قابل توجه‌ای را به این محصول وارد می‌آورد. عامل بیماری قارچ *Gaeumannomyces graminis* است. این بیماری عموماً به گندم‌های زمستانه حمله می‌کند و نقش زیادی در کاهش محصول دارد (Cook *et al.*, 1988). در آلودگی زودهنگام، بوته‌ها کوتاه و کمی زردرنگ و سنبله‌ها دارای دانه‌های چروکیده هستند و در اثر رشد قارچ تیره‌رنگ می‌شوند. بوته‌های آلوده به آسانی از خاک بیرون می‌آیند یا از محل طوقه می‌شکنند. ریشه چنین بوته‌هایی سیاه، کوتاه، ضخیم و محدود می‌شود، ولی در صورت رطوبت زیاد در فصل رشد، سیاه‌شدگی ریشه‌ها به سمت طوقه و قاعده ساقه ادامه می‌یابد. این قارچ در اغلب خاک‌های دنیا به‌وفور یافت می‌شود و خسارت وارد می‌کند، اما در خاک‌های قلیایی و تا حدی خنثی، غیرحاصلخیز و فاقد زهکشی مناسب، شدت دارد و در خاک‌های مرطوب و جاهایی که زراعت گندم سه تا چهار سال پی‌درپی و به‌طور مداوم انجام می‌شود، شدیدتر است (Cook *et al.*, 1988; Hornby *et al.*, 1998).

گسترده بودن دامنه میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی و قدرت بقا از یک‌سو و پیچیدگی محیط خاک که موجب ناکارآمدی کنترل شیمیایی می‌شود از سوی دیگر، مدیریت و مهار این بیماری را مشکل می‌سازد (Altman and Rovira, 1989; Mathre *et al.*, 1998; Tilson *et al.*, 2005). روش‌های مختلفی برای مبارزه با بیماری پاخوره وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به استفاده از گیاهان مقاوم، برنامه‌های جدید به‌نژادی، تناوب، تغذیه گیاه میزبان، عنصر منگنز، اسیدیته خاک، استفاده از علف‌کش‌ها و کنترل زیستی اشاره کرد (Huber and McCay-Buis, 1993; Hass and Defago, 2005). باکتری‌ها از جمله میکروارگانیسم‌های مفید در کنترل زیستی هستند. باکتری‌های آنتاگونیست برای موفقیت در کنترل زیستی باید دارای دو ویژگی باشند: نخست عامل ضد قارچی تولید کنند و دوم در زمان و مکان مناسب روی ریشه قرار گرفته و ریشه را کلونیزه کنند. کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌ها می‌تواند به‌صورت اتصال به ریشه، به‌صورت آزاد در فراریشه یا به‌صورت اندوفیت باشد (Lugtenberg *et al.*, 2001; Whipps, 2001; Gamalero *et al.*, 2004)، باکتری‌های *Pseudomonas* فلورسنت با داشتن این ویژگی‌ها از عوامل موفق کنترل زیستی محسوب می‌شوند. مکانیزم‌هایی که سودوموناس‌های فلورسنت به‌واسطه آن‌ها بیمارگرها را کنترل می‌کنند، متفاوت هستند و شامل رقابت، آنتی‌بیوز، پارازیتیسم، تخریب عوامل بیماری‌زای قارچی و مقاومت القایی است (O'Sullivan and Gara, 1992; Weller, 2007). باکتری سودوموناس با تولید سیانید هیدروژن، ترشح سیدروفور، تولید آنتی‌بیوتیک، ترشح آنزیم‌های برون سلولی مانند کیتیناز، بتا (β) ۱ و ۳-گلوکاناز، پروتئاز و لیپاز، فعالیت عامل بیماریزا را کاهش می‌دهد و یا متوقف می‌سازد. تولید مواد ضد میکروبی به‌عنوان یک عامل مهم در کاهش بسیاری از بیماری‌های ریشه مطرح شده است (Alvani *et al.*, 2012).

توماشو و ولر (Thomashow and Weller, 1988) مکانیسم اولیه کنترل بیمارگرها توسط سودوموناس‌های فلورسنت را تولید آنتی بیوتیک‌های مختلف بیان کردند. از جمله مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌ها می‌توان به فنازین‌ها اشاره کرد. ژن‌های دخیل در بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در خانواده LuxI/LuxR قرار می‌گیرند. در جدایه جهانی *P. fluorescens* 2-79 اپرون بیوسنتز فنازین شامل ژن‌های *phzABCDEFG* است (Chin-A-Woeng, 2003). مکانیسم کنترل بیمارگرها به‌وسیله آنتی‌بیوتیک فنازین هنوز دقیقاً مشخص نشده است، ولی به‌نظر می‌رسد که این آنتی‌بیوتیک با ورود به درون غشای سلولی به‌عنوان عامل احیاکننده عمل می‌کند و با ایجاد اختلالاتی در سلول، بنیان‌های سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن تولید می‌کند که برای میکروارگانیسم‌ها خطرناک است (Chin-A-Woeng, 2003). تأثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا، کمک به افزایش قابلیت دسترسی گیاه به عناصر معدنی نامحلول مثل فسفر، تثبیت ازت، تولید هورمون‌های گیاهی و تولید آنزیم ACC- دآمیناز جهت تنظیم رشد گیاه است (Schroth and Hancock, 1982; Hass and Defago, 2005). در این تحقیق، نقش باکتری‌های *Pseudomonas* فلورسنت واجد ژن‌های phzC و phzD دخیل در بیوسنتز فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید در کنترل بیماری پاخوره گندم در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های باکتری و جدایه قارچ بیمارگر

از مزارع مختلف گندم استان بوشهر به‌صورت تصادفی نمونه‌های گندم (مجموعاً ۱۰۰ نمونه) همراه با خاک اطراف

ریشه جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس منتقل شد. جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت با استفاده از محیط افتراقی King-B (۱/۵ گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم، ۱/۵ گرم سولفات منیزیم، ۲۰گرم پپتون، ۱۵ گرم آگار و ۱۵ میلی‌لیتر گلیسرول در یک لیتر آب) انجام شد (Iswandi *et al.*, 1987). یک گرم از خاک اطراف ریشه و ۳-۲ میلی‌متر از منطقه فراریشه، توزین و در ۹۰ میلی‌لیتر آب پپتون سترون پنج درصد ریخته شد. ارلن حاوی ریشه‌ها به‌مدت ۴۵-۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت و سپس از هر نمونه سری رقت تهیه شد. از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به محیط King-B منتقل و با لوپ سترون پخش شد و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در ۲۵ درجه سیلسیوس طی چند مرحله عمل خالص‌سازی در محیط S1 صورت گرفت. به‌منظور حفظ طولانی‌مدت، پس از کشت جدایه‌ها در محیط کینگ براث به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۷ درجه سیلسیوس، محیط حاوی باکتری رشد یافته به نسبت مساوی با گلیسرول ۸۷ درصد سترون مخلوط و در تیوب‌های اپندورف در فریزر منفی ۸۰ نگهداری شد. قارچ بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* از دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و برای اطمینان از بیماریزایی جدایه، تست بیماریزایی روی گندم انجام شد.

ردیابی ژن (phzC و phzD) بیوسنتز فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید در جدایه‌های باکتری

به‌منظور ردیابی این ژن‌ها از آغازگرهای PCA2a (TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC) و PCA3b (CCGCGTTGTTCCTCGTTCAT) ساخت شرکت سیناژن استفاده شد. این آغازگرها بر اساس توالی ژن‌های بیوسنتز آنتی‌بیوتیک PCA در جدایه 2-79 باکتری *P. fluorescens* به‌ترتیب بر اساس توالی ژن‌های phzC و phzD طراحی شده‌اند (Alvani *et al.*, 2012). استخراج DNA باکتری‌ها طبق روش وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2001) انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر DNA باکتری (۲۵ ng/µl)، بافر PCR (PCR buffer, 1X)، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بود. واکنش تکثیر با دستگاه ترموسایکلر (Master cycler gradient) ساخت شرکت اپندورف (Eppendorf) آلمان انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه در ^{o}C ۹۵ به‌مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ^{o}C ۹۴ برای واسرشته‌سازی، ۳۰ ثانیه در ^{o}C ۵۴ جهت اتصال آغازگر و ۶۰ ثانیه در ^{o}C ۷۲ برای بسط آغازگر و در پایان یک مرحله بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ^{o}C ۷۲ بود. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد در ۷۵ ولت به‌مدت یک ساعت الکترفورز و نتایج با استفاده از دستگاه مستندساز ژل مدل EV243 ساخت شرکت (Consort) بلژیک بررسی شد. از جدایه‌های *P. flourescens* 2-79 و *P. flourescens* CHA0 به‌ترتیب به‌عنوان شاهد مثبت و منفی (به‌ترتیب برای حضور و فقدان ژن) استفاده شد.

آزمایش کشت متقابل جدایه‌های سودوموناس فلورسنت و قارچ بیمارگر در پتری

جهت آزمون بازدارندگی جدایه‌های باکتری واجد ژن مورد نظر از رشد قارچ در تشتک پتری روی دو محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و King-B آگار مطابق روش کیل و همکاران (Keel *et al.*, 1996) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، زمانی که کلنی‌های قارچ کل پتری شاهد را پر کردند، بازدارندگی از رشد قارچ در پتری‌های حاوی سویه‌های باکتری، ارزیابی و هاله بازدارندگی اندازه‌گیری و ثبت شد. این آزمـایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

بررسی جدایه‌های باکتری از نظر ویژگی‌های کنترل زیستی

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم و برنز (Alström and Burns, 1989) استفاده شد. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ اولیه زرد، به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره تا آجری رنگ تغییر می‌یابد که نشانه تفاوت در میزان تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری است. پس از رشد باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی این محیط به‌مدت ۴۸ ساعت، ایجاد هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی باکتری بررسی شد. اندازه‌گیری تولید سیدروفور پایووردین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام گرفت (۵) و داده‌های حاصل با استفاده از رابطه $A = \varepsilon B C$ به

مول در لیتر تبدیل شدند که در آن A میزان جذب، ε ضریب جذب مولی، B قطر کووت و C غلظت ماده است.

آزمایش گلخانه‌ای

برای آزمایش گلخانه‌ای، ابتدا خاک سترون درون گلدان‌ها با بذر ارزن سترون آغشته به میسلیوم ۲۱ روزه قارچ به نسبت وزنی ۲۰:۱ مخلوط شد. گلدان‌ها ضمن آبیاری مرتب هر دو روز یک‌بار، به‌مدت دو هفته در شرایط گلخانه (دمای ۲۵ درجه سیلسیوس و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند تا بیمارگر بتواند در خاک گلدان‌ها توسعه یابد. در مرحله بعد برای ارزیابی قدرت آنتاگونیستی هر کدام از جدایه‌های باکتری، بذر گندم رقم زرین مادری (حساس به پاخوره) (Khanahmadi *et al.*, 2016) در سوسپانسیون باکتری‌ها به غلظت 10^9 واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر (CFU/ml) به‌مدت یک ساعت غوطه‌ور و در گلدان‌های حاوی خاک آلوده به قارچ کشت شدند. پس از یک ماه گیاهان از خاک خارج و طول ریشه و شاخساره، وزن تر و خشک ریشه و شاخساره اندازه‌گیری و شاخص بیماری‌زایی بر اساس درصد نکروزه شدن ریشه‌ها و طوقه‌ها بین صفر تا ۵ ارزش‌گذاری شد (Thomashow and Weller, 1988). در این شاخص سنجش آلودگی، درجه صفر به مفهوم ریشه و طوقه‌های بدون لکه نکروزه، درجه یک به مفهوم ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه فاقد علایم بیماری، درجه دو به مفهوم ریشه دارای لکه‌های ممتد و پیوسته نکروزه و طوقه بدون علایم بیماری، درجه سه به مفهوم نکروزه شدن بیش‌تر از ۵۰ درصد ریشه‌ها و سیاه شدن طوقه، درجه چهار به مفهوم ریشه‌های تقریباً سیاه‌رنگ با توسعه ۷۵ درصد سیاه شدن طوقه و در نهایت درجه پنج به مفهوم ریشه و طوقه سیاه و سبز با خشکیدگی گیاه است.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا و داده‌های حاصل با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد از یکدیگر جدا شدند.

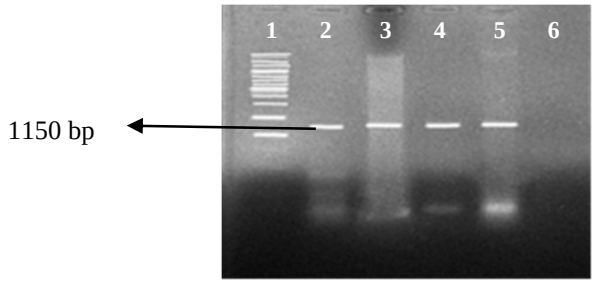
نتایج

ردیابی ژن (phzC و phzD) بیوسنتز فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید در جدایه‌های باکتری

به‌کمک دو آغازگر PCA2a و PCA3b در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، یک قطعه DNA به‌طول تقریبی ۱۱۵۰ جفت باز از دسته ژنی بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین ۱- کربوکسیلیک تکثیر و روی ژل آگارز مشخص شد. بر این اساس، ۲۱ جدایه از ۸۳ جدایه مورد بررسی واجد ژن *phzC,D* بودند. این ۲۱ جدایه شامل جدایه‌های Wh_m5، b14، wt1_48، wkz1_105، b1_3، wkz1_89، wt1_65، w_13، jkh_9، wb1_2، b_70، dn_2، wbo2_7، wh_m3، dn2_2، eq1_3، eq1_4، gn2_2، whm_90، whm_2 و wt_20 بودند. همان‌طور که گفته شد، جدایه *P. flourescens* 2_79 به‌عنوان شاهد مثبت و جدایه *P. flourescens* CHA0 به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند (شکل ۱).

بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های *Pseudomonas* فلورسنت بر رشد قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در شرایط آزمایشگاه

توانایی آنتاگونیستی ۲۱ جدایه باکتریایی دارای ژن فنازین حاصل از ردیابی ژن از طریق PCR، در شرایط آزمایشگاه بر اساس روش کشت متقابل در تشتک پتری علیه قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* مورد مطالعه قرار گرفت. جدایه‌های *P. flourescens* ۲-۷۹ و jkh_9 به‌ترتیب با هاله‌های بازدارندگی ۹/۶۶ و ۹/۳۳ میلی‌متر بیش‌ترین تاثیر و جدایه wkz1_105 با هاله بازدارندگی ۵/۱ میلی‌متری کم‌ترین تاثیر را روی قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در محیط کشت King-B داشتند (جدول ۱). جدایه‌های eq1_3 و 2_79 به‌ترتیب با هاله‌های بازدارندگی ۱۳/۳۳ و ۱۲/۶۶ میلی‌متر بیش‌ترین تاثیر را در محیط PDA و جدایه whm_2 با هاله بازدارندگی ۴/۶۶ میلی‌متری کم‌ترین تاثیر را روی قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* داشتند. گروه‌بندی تیمارها بر اساس میزان هاله بازدارندگی، نشان‌دهنده قرار گرفتن تیمارها در گروه‌های مختلف می‌باشد (جدول ۱).



شکل ۱- فرآورده PCR حاصل از تکثیر ژن بیوستز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید (PCA) با آغازگرهای اختصاصی PCA2a و PCA3b (۱۱۵۰ جفت باز) در جدایه‌های *P. fluorescens* فلورسنت روی ژل آگارز یک درصد. چاهک‌ها به‌ترتیب عبارت‌اند از: ۱- ladder (1 Kbp) ۲- dn2، ۳- w_13، ۴- wt1_65، ۵- 2_79 (به‌عنوان شاهد مثبت) و ۶- CHA0 (به‌عنوان شاهد منفی).

Figure 1. PCR product from phenazine-1-carboxylic acid (PCA) synthase gene with the specific primers, PCA2a and PCA3b (1150 bp), in *P. fluorescens* isolates on 1% agarose gel. The wells are including: 1. 100 bp DNA ladder, 2. dn2, 3. w_13, 4. wt1_65, 5. 2-79 as positive control, 6. CHA0 as negative control.

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر سویه‌های *P. fluorescens* واجد ژن *phzC, D* بر رشد میسلیومی قارچ *G. graminis* var. *tritici*

Table 1. Mean comparison of the influence of *P. fluorescens* isolates having *phzC, D* on mycelial growth of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

Strain	Inhibitory halo on KB (mm)	Strain	Inhibitory halo on KB (mm)	Strain	Inhibitory halo on PDA (mm)	Strain	Inhibitory halo on PDA (mm)
wkz1_89	9.66 a	wt_20	5.33 ghi	eq1_3	13.33 a	gn2_2	9.33 efghi
j_kh9	9.33 ab	eq1_4	5.33 ghi	wt1_65	12.66 ab	whm3	9.0 fghij
2_79	9.0 abc	b1_3	5.33 ghi	dn2	12.33 abc	b_14	8.33 ghijk
b_70	8.0 bcd	whm_90	4.33 hij	wh_m5	12.33 abc	w_13	8.0 hijk
gn2_2	8.0 bcd	dn2	4.33 hij	wkz1_89	11.66 abcd	b1_3	7.33 ijkl
wh_m5	7.66 cd	wb1_2	4.33 hij	j_kh9	11.66 abcd	wt_20	7.33 ijkl
whm3	7.33 de	b_14	4.33 hij	2_79	11.33 abcde	wbo2_7	7.0 jkl
wt1_65	7.0 def	dn2_2	3.33 jk	whm_90	11.33 abcde	eq1_4	6.66 kl
wt1_48	6.0 efg	eq1_3	2.33 kl	dn2_2	10.66 bcdef	wb1_2	5.33 lm
whm_2	6.0 efg	wkz1_105	1.33 l	wkz1_105	10.33 cdefg	whm_2	4.66 m
w_13	5.66 fgh	Check	0.0 m	wt1_48	10.0 defgh	Check	0.0 n
wbo2_7	5.66 fgh			b_70	9.33 efghi		

Means followed by the same letters are not significantly different by Duncan's test at 5% probanility level.

تولید سیدروفور در جدایه‌های *P. fluorescens*

از مجموع ۲۱ جدایه باکتریایی آنتاگونیست که در مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت، تمامی آن‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر قدرت تولید سیدروفور اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ وجود داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جدایه b_13 با تولید ۲۹/۵۹ میکرومول پایووردین بیش‌ترین و جدایه‌های whm_2 و w_13 با تولید ۲/۱۵ و ۲/۸۳ میکرومول پایووردین کم‌ترین مقدار تولید سیدروفور را در بین جدایه‌ها داشتند (شکل ۲).

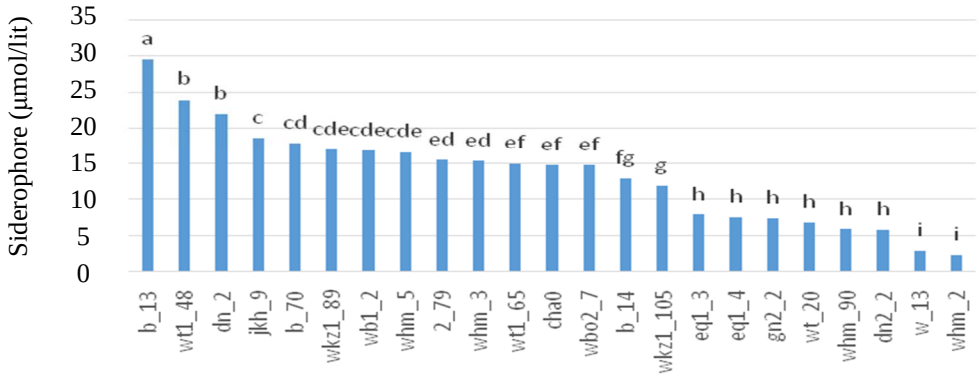
تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌های *P. fluorescens*

توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ معرف ارزیابی شد. بر اساس رتبه‌بندی رنگ‌ها از صفر تا سه مشخص شد که از بین جدایه‌های بررسی شده، هشت جدایه رنگ کاغذ آغشته به معرف را به رنگ قهوه‌ای تیره (رتبه ۳)، هفت جدایه به رنگ قهوه‌ای روشن (رتبه ۲) و هشت جدایه به رنگ کرم (رتبه ۱) تغییر دادند (جدول ۲).

تاثیر جدایه‌های باکتری در کنترل زیستی *G. graminis* var. *tritici* در شرایط گلخانه

برای مطالعه تاثیر جدایه‌های *P. fluorescens* علیه بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*، رقم زرین مادری به‌عنوان رقم حساس در شرایط گلخانه با جدایه‌های مختلف باکتری‌های *P. fluorescens* تلقیح و توسط قارچ عامل بیماری پاخوره گندم آلوده شد و پس از یک ماه گیاهان از خاک خارج شدند و صفات مختلف شامل طول ریشه و شاخساره، وزن تر ریشه و شاخساره، وزن خشک ریشه و شاخساره و شاخص بیماری‌زایی در گیاهان

اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی نشان داد که جدایه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens* تاثیر متفاوتی بر شاخص‌های رشدی رقم زرین مادری آلوده به قارچ *G. graminis* var. *tritici* داشتند (جدول ۳).



شکل ۲- تولید سیدروفور توسط جدایه‌های *P. fluorescens* (بر حسب میکرومول در لیتر). میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف معنی‌داری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Figure 2. Siderophore production by *P. fluorescens* isolates (µmol/lit). Means with the same letters are not significantly different by Duncan's test at 5% probability level.

جدول ۲- میزان تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌های سودوموناس فلورسنت در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. Production of hydrogen cyanide (HCN) by *P. fluorescens* isolates under *in vitro* conditions

Strain	HCN	Strain	HCN	Strain	HCN
2-79	3	wt1_65	2	CHA0	3
whm_5	1	w_13	1	b_70	1
b_14	2	jkh_9	2	dn_2	3
wt1_48	1	wb1_2	3	wbo2_7	1
wkz1_105	3	whm_90	1	whm_3	2
b_13	1	whm_2	2	dn2_2	2
wkz1_89	3	wt_20	1	eq1_3	3
eq1_4	3	gn2_2	2	-	-

جدول ۳- تجزیه واریانس تاثیر جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* بر شاخص‌های رشدی گندم آلوده به قارچ *G. graminis* var. *tritici*

Table 3. Analysis of variance for the effects of *P. fluorescens* isolates on growth factors of wheat infected by *G. graminis* var. *tritici*

Source of variations	df	Mean squares						
		Stem length	Root length	Pathogenicity index	Stem fresh weight	Stem dry weight	Root fresh weight	Root dry weight
Isolate	23	5.11**	89.48**	5.87**	0.0024**	0.0005**	0.0240**	0.0020**
Error	48	0.17	0.19	0.22	0.00008	0.00008	0.00004	0.00008
CV (%)	-	2.31	2.96	18.44	3.16	6.33	3.22	5.30

**: Significant at 1% probability level.

شاخص بیماری‌زایی

بررسی این شاخص نشان داد که بین تیمارها از نظر آثار آنتاگونیست بر درصد نکروز ریشه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بر اساس نتایج، گیاهان تیمارشده با جدایه‌های باکتری wt_20، eq1_3، wt1_65، eq1_4، 2_79، whm_5 و wbo2_7 کم‌ترین علایم نکروز ریشه (شاخص بیماریزایی) را نشان دادند و با گیاهان شاهد سالم از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان ندادند که توانایی این جدایه‌ها را در کنترل قارچ عامل پاخوره گندم نشان داد. جدایه‌های b1_3، dn2_2، wkz1_89 و wb1_2 در کنترل قارچ خیلی موفق نبودند و گیاهان تیمار شده با این جدایه‌ها بیش‌ترین شاخص بیماریزایی را داشتند و تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد آلوده نشان ندادند (شکل ۳- a).

شاخص‌های رشدی

نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳- b) نشان داد که جدایه wt1_65 سبب افزایش طول شاخساره نسبت به شاهد عاری از باکتری شد که نشان‌دهنده نقش آن‌ها در افزایش رشد گیاه است. جدایه‌های wt1_65، dn_2، w-13 و 2-79 توانستند در حضور آلودگی، طول شاخساره را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده افزایش دهند. مقایسه میانگین‌ها برای طول ریشه در رقم گندم آلوده به بیماری پاخوره نشان داد که همه جدایه‌های باکتری به‌جز جدایه‌های wb1-2، 1b-3، 2dn-2 و w2-1-89 توانستند در حضور آلودگی نسبت به عدم کاربرد باکتری، طول ریشه را به‌طور معنی‌داری بالاتر نگه دارند. بیش‌ترین طول ریشه در رقم زرین مادری تحت تاثیر جدایه باکتری Wt_20 و wt1_65 مشاهده شد (شکل ۳- c).

صفت وزن تر ریشه در رقم زرین مادری تحت تاثیر همه جدایه‌های باکتری قرار گرفت و نسبت به عدم کاربرد باکتری به‌طور معنی‌داری وزن بیش‌تری داشت. بیش‌ترین مقدار تحت تاثیر جدایه‌های باکتری wt_20 و 2_79 و wbo2-7 حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد سالم (فاقد قارچ عامل بیماری) مشاهده نشد (شکل ۳- d). این امر نشان‌دهنده توانایی این جدایه‌ها در کنترل بیماری است. بیش‌تر جدایه‌ها به‌ویژه جدایه‌های wt1-65، wh-m5 و wbo2-7 توانستند تحت آلودگی قارچ، وزن شاخساره را در بالاترین مقدار حفظ و نسبت به گیاهان شاهد آلوده (عدم کاربرد باکتری) به‌طور معنی‌داری وزن تر شاخساره بیش‌تری را برای گیاه میزبان تولید کنند (شکل ۳- e).

برای صفت وزن خشک شاخساره نتایج نشان از تاثیر مثبت تیمار گیاهان با جدایه‌های باکتری نسبت به عدم کاربرد داشت (شکل ۳- f). بررسی وزن خشک ریشه‌ها نشان داد که جدایه‌های wt1_48، wkz1-105 و wt-20 باعث شدند گیاه میزبان تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد سالم نداشته و دارای وزن بیش‌تری باشد. چنانچه مشاهده می‌شود، تیمار با باکتری سبب افزایش رشد ریشه شد و تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد آلوده (عدم کاربرد باکتری) از نظر این صفت دارند. تیمار گیاهان با جدایه‌های wkz1_89 و wb1_2 تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد آلوده (عدم کاربرد باکتری) نداشتند که نشان‌دهنده عدم توانایی این جدایه‌ها در این مورد است (شکل ۳- g).

بحث

در این تحقیق جداسازی و انتخاب سودوموناس‌های فلورسنت حاوی ژن فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید با فعالیت آنتاگونیستی علیه *G. graminis* var. *tritici* که عامل بیماری پاخوره گندم است، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه بررسی شد. جداسازی باکتری‌ها از منطقه فاریشه در محصول هدف برای شناسایی موفقیت‌آمیز عواملی که دارای پتانسیل کنترل زیستی هستند، ضروری است. ردیابی ژن تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید از جدایه‌های جداسازی شده از مزارع مختلف گندم که تعداد ۸۳ جدایه باکتری بود، منجر به غربال ۲۱ باکتری حاوی ژن آنتی‌بیوتیک فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید شد. در آزمون کشت متقابل، مقایسه میانگین اندازه هاله بازدارندگی نشان داد که تمام ۲۱ جدایه برتر انتخاب‌شده که دارای ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید بودند، باعث کاهش رشد میسلیومی قارچ *G. graminis* var. *tritici* در شرایط آزمایشگاه شدند. جدایه‌های wt_20، eq1_3، wt1_65، eq1_4، 2_79، whm_5 و wbo2_7 علاوه بر اینکه در شرایط آزمایشگاه دارای توانایی بازدارندگی بالایی از رشد قارچ *G. graminis* var. *tritici* بودند، در شرایط گلخانه نیز موجب کنترل موثر بیماری پاخوره شدند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر تقریباً ۶۰ درصد باکتری‌های بررسی‌شده توانایی بالایی در بازدارندگی قارچ عامل بیماری در آزمون چهار نقطه‌ای روی محیط KB و PDA داشتند. چانسی و همکاران (Chancey *et al.*, 2002) نیز

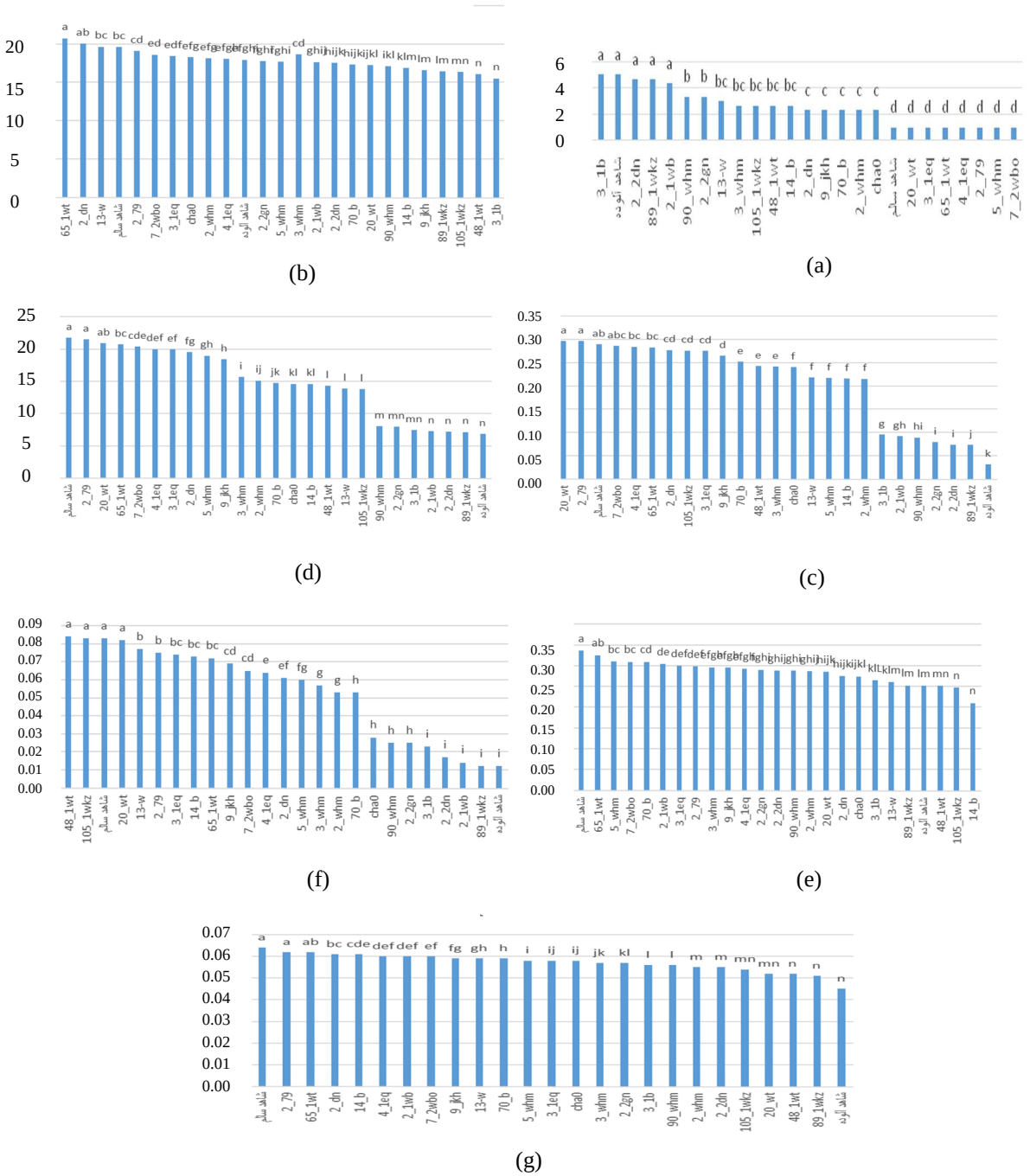
نشان دادند که تولید آنتی‌بیوتیک فنازین در *P. aureofaciens* 30-84 سبب کنترل بیماری پاخوره گندم تا ۹۰ درصد شد. در تحقیق دیگری که توسط هوانگ و همکاران (Huang *et al.*, 2004) در استفاده از باکتری *P. fluorescens* جدایه‌های Q2-87 و Q8r1-96 علیه بیماری پاخوره گندم انجام گرفت، به تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک به‌عنوان مهم‌ترین عامل در کنترل قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* اشاره شد.

توانایی بسیار بالای تولید سیدروفور توسط سویه‌های مختلفی از سودوموناس‌ها گزارش شده است (Meyer, 2000). در این پژوهش نیز مشخص شد که تمامی جدایه‌ها تولید سیدروفور کردند، ولی میزان سیدروفور در جدایه‌های مختلف متفاوت بود، به‌طوری‌که جدایه b_13 با تولید ۲۹/۵۹ میکرومول در لیتر پایووردین بیش‌ترین میزان سیدرفور و جدایه whm_2 با تولید ۲/۱۵ میکرومول پایووردین کم‌ترین مقدار سیدروفور را در بین جدایه‌های مورد مطالعه تولید کرد. نتایج به‌دست آمده از آزمون تولید سیدروفور نشان داد که جدایه‌های *Pseudomonas* فلورسنت مورد استفاده در این تحقیق قابلیت نسبتاً خوبی در تولید سیدروفور داشتند که با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت داشت (Rasouli Sadaghiani *et al.*, 2005). اوسیلوان و اگارا (O'Sullivan and Gara, 1992) نشان دادند که بسیاری از سویه‌های *P. fluorescens* توانایی تولید سیدروفور را داشتند. ایسواندی و همکاران (Iswandi *et al.*, 1987) نیز نشان دادند که اثر بازدارندگی ناشی از تولید سیدروفر توسط جدایه سودوموناس 7NSK2 نقش مهمی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا دارد. در این تحقیق میزان تولید سیدروفور پاپووردین اندازه‌گیری و مشاهده شد که همه جدایه‌های واجد ژن *phzl* پایووردین تولید کردند که با نتایج اسیلوان و اگارا (O'Sullivan and Gara, 1992) مطابقت داشت. پژوهش‌های انجام شده توسط کرمر و سوئیسی (Kremer and Souissi, 2001) نشان داده است که تقریباً ۳۲ درصد از یک مجموعه شامل ۲۰۰۰ جدایه باکتری، توانایی تولید سیانید هیدروژن را داشتند. 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 (Castric, 1975). نتایج حاصل از ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن در این تحقیق نیز نشان داد که همه سویه‌های phz^+ توانایی تولید سطوح مختلفی از HCN را دارا بودند. همه ۲۱ جدایه واجد ژن فنازین در این آزمایش قادر به تولید سطوح مختلفی از سیانید هیدروژن بودند.

تحقیقات نشان داده که بیماری پاخوره بیش‌ترین تاثیر را روی ریشه می‌گذارد، به‌طوری که کلارکسون و پالی (Clarkson and Polley, 1981) بیان داشتند که از علایم بارز این بیماری سیاه‌شدگی ریشه‌ها است که از همان مراحل اولیه رشد گیاهچه‌ای خود را نشان می‌دهد.

نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های eq1_3، wt1_65، eq1_4، 2_79، whm_3 و wbo2_7 واجد ژن آنتی‌بیوتیک فنازین در آزمون گلخانه‌ای تاثیر بالایی را در کنترل بیماری پاخوره نشان دادند. همچنین مشخص شد که الگوی عمومی توان بازدارندگی جدایه‌ها در شرایط گلخانه با گروه‌بندی جدایه‌ها از نظر توانایی بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه مطابقت داشت، ولی بعضی از جدایه‌هایی که در آزمایشگاه از نظر هاله بازدارنده رشد در گروه‌های آماری متفاوتی بودند، در شرایط گلخانه در یک گروه قرار گرفتند. این پدیده در بسیاری از مطالعات کنترل زیستی توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. از آنجا که شرایط آزمایشگاه به‌صورت کنترل‌شده و بدون دخالت میزبان است، از این‌رو تفاوت‌های مشاهده شده را می‌توان به دخالت شرایط محیط، میزبان و وجود سایر مکانیسم‌های کنترل زیستی در گلخانه نسبت داد.

به‌طور کلی، وجود ژن به تنهایی نشان‌دهنده بیان و یا تولید محصول ژن نیست (Rane *et al.*, 2007). ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید در ۲۱ جدایه باکتری استفاده شده در این تحقیق ردیابی شد که همه این جدایه‌ها نتوانستند بیماری پاخوره را کنترل کنند. از آنجایی که مدیریت بخش‌های مختلف خاک نقش موثری در اجرای صحیح فعالیت عامل آنتاگونیست دارد (Klopper *et al.*, 1980; Alstrom, 1989; Glick, 1995)، می‌توان چنین بیان کرد که در جدایه‌هایی که در شرایط گلخانه نتوانستند از بیماری پاخوره گندم جلوگیری کنند، ممکن است ژن بیان نشده یا باکتری در خاک از بین رفته باشد و یا آنتی‌بیوتیک تولید شده ولی جذب کلوئیدهای خاک شده باشد، زیرا کنترل زیستی عوامل آنتاگونیست به بسیاری از عوامل زنده و غیرزنده در خاک بستگی دارد. از طرفی، ممکن است جدایه‌های b1_3، dn2_2، wkz1_89 و wb1_2 کلونیزه کننده قوی ریشه نباشند و نتوانسته‌اند به‌خوبی ریشه گیاهچه‌های گندم را در برابر قارچ *G. graminis* var. *Tritici* حفاظت کند.



شکل ۳- تاثیر جدایه‌های *P. fluorescens* بر صفات مورد مطالعه گندم آلوده به بیماری پاخوره. a) شاخص بیماریزایی، b) طول شاخساره، c) طول ریشه، d) وزن تر ریشه، e) وزن خشک ریشه، f) وزن تر شاخساره، g) وزن خشک شاخساره.

Figure 2. Effects of *P. fluorescens* isolates on wheat growth infected by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. a) Pathogenicity index, b) shoot length (cm), c) root length (cm), d) root fresh weight (g), e) root dry weight (g), f) shoot fresh weight (g), g) shoot dry weight (g).

در تحقیق حاضر، جدایه‌های wt_20، eq1_3، wt1_65، eq1_4، 2_79، whm_3 و wbo2_7 به لحاظ تأثیر مثبت بر تعدادی از شاخص‌های رشد و کاهش شاخص بیماری، اختلاف معنی‌داری با شاهد بیمار داشتند. هر چند که میزان تولید سیدروفور در این جدایه‌ها متفاوت بود، ولی ممکن است به روش غیرمستقیم، مثلاً تولید آنتی‌بیوتیک یا افزایش مقاومت گیاه نسبت به عامل بیماری‌زا، باعث تأثیر مثبت در کاهش بیماری مورد نظر شده باشند. از آنجا که

گیاهان شاهد آلوده (بدون کاربرد باکتری) کم‌ترین مقدار وزن تر ریشه را نشان دادند، بیان‌کننده تاثیر این بیماری بر رشد ریشه است که تمامی جدایه‌های باکتری توانستند نسبت به عدم کاربرد باکتری برتری خود را در این مورد نشان دهند، هر چند که توانایی جدایه‌های مختلف متفاوت بود. با مقایسه وزن خشک شاخساره و وزن تر شاخساره شاید بتوان گفت تاثیر باکتری تجمع بیش‌تر ماده خشک نبوده است، ولی به‌طور موثری در گیاهان میزبان سبب حفظ محتوای آبی گیاه تحت آلودگی قارچ شده است.

نتیجه‌گیری کلی

نظر به تاثیر مخرب زیست‌محیطی انواع آفت‌کش‌ها در تولید محصولات کشاورزی و رویکرد جدیدی که از چند دهه پیش آغاز شده و استفاده از انواع مواد زیستی را در کنترل آفات در دستور کار متخصصین و برنامه‌ریزان کشاورزی قرار داده است و پشتوانه بزرگ تحقیقاتی که در این مدت حاصل شده و امکان مبارزه بیولوژیک را در سطوح آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه مورد بررسی قرار داده است، ادامه این مسیر را اجتناب‌ناپذیر می‌کند که در سطح کلان و منافع ملی هم از استراتژی‌های مهم در برنامه‌های توسعه پایدار در هر کشوری است. این رویکرد برای محصولات استراتژیک مثل گندم اهمیت بیش‌تری دارد و انجام طرحی که در آن امکان جایگزینی قارچ کش‌ها با مواد زیستی جهت پیشگیری و مبارزه با بیماری‌های مهم را بررسی کند، حائز اهمیت است و با حصول نتایج قابل عرضه و عملی می‌تواند در اختیار کاربران بخش کشاورزی و شرکت‌های ارایه‌دهنده خدمات کشاورزی قرار گیرد.

References

Alvani, S. H., Falahati Rastegar, M. and Ahmadzadeh, M. 2012. Monitoring of phenazines antibiotics in *Pseudomonas* bacteria and their role in biocontrol of wheat take all. **Journal of Plant Protection** 2: 116-126.

Alstrom, S. 1989. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. **Plant and Soil** 102: 3-9.

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

Altman, J. and Rovira, A. 1989. Herbicide-pathogen interactions in soil-borne root diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology** 11 (2): 166-172.

Castañeda, G., Muñoz, J. J. and Peralta-Videa, J. R. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. **Microchemical Journal** 81 (1): 35-40.

Castric, P. A. 1975. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen cyanide biosynthesis. **Journal of Bacteriology** 130: 826-831.

Chancey, S. T., Wood, D. W., Pierson, E. A. and Pierson, L. S. 2002. Survival of *GacS/GacA* mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology** 68 (7): 3308-3314.

Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V. and Lungtenberg, B. J. J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by Pseudomonas bacteria. **Institute of Molecular Plant Sciences** 157: 503-523.

Clarkson, J. D. S. and Polley, R. W. 1981. Diagnosis, assessment, crop-loss appraisal and forecasting. In: Asher, M. J. C. and Shipton, P. J. (Eds.). Biology and Control of Take-all Academic Press, London.

Cook, R. J., Weller, D. M. and Bassett, E. N. 1988. Take-all and wheat. Biology culture. **Tests Control Plant Disease** 3: 53.

Gamalero, E., Lingua G., Giusy Capri, F., Fusconi, A., Berta, G. and Lemanceau, P. 2004. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. **FEMS Microbiology Ecology** 48: 79-87.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 41 (2): 109-117.

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

Hornby, D., Bateman, G. L., Gutteridge, R. J., Lucas, P., Osburn, A. E., Word, E. and Yarham, D. J. 1998. Take-all disease of cereals: A regional perspective. CAB International, London, UK.

Huang, Z., Bonsall, R. F., Mavordi, D. V., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 2004. Transformation of *Pseudomonas fluorescens* with genes for biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid improves biocontrol of *Rhizoctonia* root rot and in situ antibiotic production. **FEMS Microbiology Ecology** 49: 243-251.

Huber, D. and McCay-Buis, T. 1993. A multiple component analysis of the take-all disease of cereals. **Plant Disease** 77: 437-447.

Iswandi, A., Bossier, P., Vandenabeele, J. and Verstraete, W. 1987. Effects of seed inoculation with the rhizopseudomonas strain 7NSK2 on the root microbiota of maize and barley. **Biology and Fertility of Soil** 3: 153-158.

Keel, C., Weller, M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. J. and Thomashow, L. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strain from diverse geographic locations. **Applied Environmental Microbiology** 62: 552-563.

Khanahmadi, M., Bayat, F. and Jamali, F. 2016. Evaluating reaction of some wheat cultivars to take-all disease (*Gaeumannomyces graminis*). **Biological Forum-An International Journal** 8 (1): 1-6.

King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory Clinical Medy** 44: 301-307.

Klopper, J. W., Leong, J., Teuntze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophore produced by plant growth–promoting rhizobacteria. **Nature** 286: 885-886.

Kremer, R. J. and Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. **Current Microbiol**ogy 43: 182-186.

Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L. C. and Bloemberg, G. V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Journal of Phytopathol0gy** 39: 461-490.

Mathre, D. E., Johnson, R. H. and Grey, W. E. 1998. Biological control of take-all disease of wheat caused by *Gaemannomyces graminis* var. *tritic* under field conditions using a *phialophora* sp. **Biocontrol Science and Technology** 8 (3): 57-449.

Meyer, D. M. 2000. Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent *pseudomonas* species. **Archives of Microbiology** 174: 135-142.

O' Sullivan, D. J. and Gara, F. O. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. involved in suppression of plant root pathogen. **Journal of Microbiology** 56: 662-676.

Rane, M., Sarode, P. D., Chaudhari, B. L. and Chincholka, S. B. 2007. Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Scientific and Industrial Research** 66: 627-631.

Rasouli Sadaghiani, M. H., Kavazi, K., Rahimian, H., Malakouti, M. J. and Asadi, H. 2005. Population density and identification of fluorescent *Pseudomonads* associated with rhizosphere of wheat. **Journal of Soil and Water Science** 19: 224-234. (In Persian with English Abstract).

Schroth, M. N. and Hancock, J. G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science** 2216: 1276-1387.

Thomashow, L. S. and Weller, D. M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. **Journal of Bacteriology** 170: 3499-3508.

Tilson, E. L., Pitt, D., Fuller, M. P. and Groenhof, A. C. 2005. Compost increases yield and decreases take-all severity in winter wheat. **Field Crops Research** 94: 176-188.

Wang, C., Ramette, A., Punjasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. **FEMS Microbiology Ecology** 37: 105-116.

Weller, D. M. 2007. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. **Phytopathology** 97: 250-256.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 52: 487-511.

doi: 10.22124/c.2018.7911.1314

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research
Vol. 8, No. 3, Autumn 2018 (227-238)

Screening of *P. fluorescens* isolates containing phenazine 1-carboxylic acid (PHZ) gene to biocontrol of wheat take-all disease

Masoud Khan-Ahmadi[1], Fereshteh Bayat[2*], Fatemeh Jamali[3] and Hamid-Reza Noor-Yazdan[4]

Received: September 3, 2017 Accepted: May 29, 2018

Abstract

Wheat take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* is one of the serious wheat diseases in our country, Iran. The *Pseudomonas fluorescens* bacteria by root colonization and antibiotic production ability are an important biologic control agent of soil born disease. In this study, presence of the phenazine 1-carboxylic acid synthase gene was tracked in 21 *Pseudomonas fluorescens* isolates via PCR using specific primers of PCA2a and PCA3b. Also, the ability of antimicrobial metabolites production by all of these bacterial isolates such as siderophore and hydrogen cyanide and influences on the growth of pathogenic fungi was investigated via in vitro culture. Ability of the selected bacterial isolates for controlling wheat take-all disease were tested in a greenhouse experiment using a completely randomized design with three replications. The results showed that bacterial isolates were able to produce siderophore and hydrogen cyanide under in vitro conditions. The results of the greenhouse experiment showed that wt_20 ،eq1_3 ،wt1_65 ،eq1_4 ،2_79 ،whm_3 و wbo2_7 isolates had positive effects on a number of wheat growth factors such as root/shoot length, root and shoot dry/fresh weight and also reduce in the pathogenicity index was effective in controlling take-all disease in effected plant. In total, the results of this research showed that *P. fluorescens* bacteria can be used to biologic control of the take-all disease.

Keywords: Biocontrol, Hydrogen cyanide, Root colonization, Siderophore, Soil born disease

1. M. Sc. Student, Dept. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Boushehr, Iran
2. Assist. Prof., Dept. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Boushehr, Iran
3. Assist. Prof., Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Boushehr, Iran
4. Assist. Prof., Dept. of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Boushehr, Iran
* Corresponding author: bayatfereshteh59@gmail.com