کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۵، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵ (۲۴۶-۲۳۵)
DOI: 10.22059/jbioc.2016.61201

توانایی بیوکنترل سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* مولد ۲و٤-دی استیل فلوروگلوسینول و سیانیدهیدروژن علیه پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی

۱. فاطمه جمالی*؛ ۲. محمد مدرسی؛ ۲. فرشته بیات
۱. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر و استادیار، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
۲. استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۹)

چکیده

سودوموناس‌های فلورسنت مولد ۲و٤-دی‌استیل فلوروگلوسینول (DAPG) در بیوکنترل بسیاری بیماری‌های قارچی گیاهان نقش دارند. پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی یکی از مهمترین بیماری‌های این گیاه است که خسارت زیادی را به محصول وارد می‌آورد. در این پژوهش ۳۵ سویه *Pseudomonas fluorescens* از نظر وجود ژن‌های *phl*D و *hcn*AB بررسی شده و مشخص گردید نه سویه واجد ژن‌های بیوکنترل بودند. توانایی آنتاگونیستی سویه‌های واجد دو ژن همراه با سویه CHA0، علیه بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید و پنج سویه شامل PGU، PGU1، PGU2، PGU4 و سویه CHA0 انتخاب شدند. سویه‌ها از نظر تولید انواع متابولیت‌های ضدمیکروبی یا محرک رشدی گیاهی آزمایش شدند و در مرحله بعد توانایی آنها در بیوکنترل بیماری و افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه مطالعه شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که سویه‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌های DAPG، پایولوتورین و مونواستیل فلوروگلوسینول، سیانیدهیدروژن، اندول استیک‌اسید، پروتئاز و سیدروفور پایووردین و نیز انحلال فسفات معدنی بودند. این سویه‌ها در شرایط گلخانه نیز به‌طور معنی‌داری قادر به کنترل بیماری و تحریک رشد گیاه گوجه‌فرنگی بودند و سویه PGU بهتر از سایرین عمل نمود. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که احتمالاً تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی و/ یا متابولیت‌های محرک رشد گیاه در کنترل بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه مؤثر هستند.

کلیدواژگان: بیوکنترل، سودوموناس فلورسنت، پژمردگی فوزاریومی، گوجه‌فرنگی.

Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* strains producing 2,4-diacetylphloroglucinol and hydrogen cyanide against tomato Fusarium wilt

Fatemeh Jamali[1*], Mohammad Modarresi[2] and Fereshteh Bayat[2]
1. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran and Assistant Professor, Persian Gulf Research Institue, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
2. Assistant Professor, Department of Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
(Received: Jul. 11, 2016 - Accepted: Oct. 10, 2016)

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens strains producing 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) contribute to the biological control of many fungal plant diseases. Tomato Fusarium wilt is one of the most important diseases of this plant that causes considerable damage to the crop. In the current study, 35 strains of *P. fluorescens* were screened for the presence of *phlD* and *hcnAB* genes and it was revealed that nine strains harbored the target genes. Antagonistic ability of *phlD*$^+$- and *hcnAB*$^+$strains was tested against pathogen under *in vitro* conditions using dual culture method and five strains including PGU, PGU1, PGU2, PGU3 and CHA0 were selected for further studies. Strains were checked for production of antimicrobial metabolites and plant growth promoting traits and then, their potential to control Fusarium wilt and promoting tomato growth was investigated under greenhouse conditions. Laboratory results showed that bacterial strains were capable of producing antimicrobial compounds like DAPG, pyoluteorin and monoacetylphloroglucinol, hydrogen cyanide, indole-3-acetic acid, protease and solubilization of mineral phosphate. Strains were also able to control the disease and stimulate tomato plants growth significantly under greenhouse conditions and PGU strain performed better in comparison to other strains. This study suggests that the production of antimicrobial metabolites and/or metabolites stimulating plant growth plays a key role in effective disease control and increasing plant growth parameters under greenhouse conditions.

Keywords: Biocontrol, fluorescent pseudomonads, fusarium wilt, hydrogen cyanide.

* Corresponding author E-mail: jamali@pgu.ac.ir Tel: +98 917 3740716

مقدمه

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاهان[1] (PGPR)، ریشه‌های گیاه میزبان را کلنیزه کرده و تحریک رشد یا کنترل بیماری‌های گیاهی را موجب می‌شوند. PGPRها شامل سویه‌های باکتریایی هستند که حداقل دو ویژگی از سه ویژگی کلنیزاسیون، تحریک رشد و کنترل زیستی را دارا باشند (Lucy *et al*. 2004, Weller *et al*. 2002). PGPRهایی که تحت عنوان کود زیستی به‌شمار می‌آیند، موجب افزایش رشد گیاه به‌واسطه تثبیت نیتروژن اتمسفری، محلول‌سازی فسفات معدنی و تولید فیتوهورمون‌ها می‌شوند (Vessey 2003). در دسته دیگر PGPRها یعنی آفت‌کش‌های بیولوژیک، کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی حائز اهمیت بیشتری می‌باشد (Haas and Défago 2005). از میان این باکتری‌ها، سویه‌های خاصی از سودوموناداهای فلورسنت توجه ویژه‌ای را به خود جلب نموده‌اند زیرا به‌عنوان عوامل بیوکنترل برای کنترل قارچ‌ها و اامیست‌های بیماریزای خاکزاد عمل می‌کنند. سودوموناداهای فلورسنت با کلنیزاسیون مؤثر ریزوسفر (Lugtenberg and Dekkers 1999)، تولید انواع متابولیت‌های ضدمیکروبی (۲و۴-دی استیل فلوروگلوسینول[2] (DAPG)، پایولوتورین[3] (PLT)، پیرول‌نیترین، فنازین‌ها، لیپوپپتیدهای حلقوی، سیانید هیدروژن و آنزیم‌های خارج سلولی (Haas and Défago 2005, Haas and Keel 2003) و نیز القای مقاومت سیستمیک[4] (ISR) درگیاه میزبان (De Meyer *et al*. 1999) در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش بسزایی ایفا می‌نمایند.

آنتی‌بیوتیک ۲و۴-دی‌استیل‌فلوروگلوسینول (DAPG)، یکی از مهمترین ترکیبات فنله ضدمیکروبی است که توسط سویه‌های بیوکنترل *P. fluorescens* تولید می‌شود (Thomashow and Weller 1996) و دارای طیف وسیع سمیت علیه ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، نماتدها، تنظیم‌کنندگی رشد و در غلظت‌های بالاتر دارای فعالیت گیاه‌سوزی می‌باشد (De Souza *et al*. 2003, Haas and Keel 2003, Moynihan *et al*. 2009, Weller *et al*. 2006).

طی دهه‌های اخیر مشخص شده است که آنتی‌بیوتیک DAPG عاملی کلیدی در بیوکنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی از جمله *Fusarium oxysporum* به‌شمار می‌رود. سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شده از خاکهای بازدارنده بیماری نظیر سویه‌های PINR2، PILH1 (به ترتیب جداسازی شده از توتون و گوجه‌فرنگی از ایتالیا) و PGNR1 و PGNL1 (جداسازی شده از توتون در غنا) با تولید DAPG در کنترل بیولوژیک *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* روی گوجه‌فرنگی نقش دارند (Keel *et al*. 1996). در مطالعه‌ای دیگر، سویه نوترکیب CHA0/pME3090 (با خصوصیت بیش‌تولید DAPG) در مقایسه با CHA0 (تیپ والد) علیه بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* مورد استفاده قرار گرفت. بیمارگر موجب ۴۶ درصد پژمردگی در گیاهان مورد مطالعه گردید؛ در حضور تیپ والد پژمردگی به نه درصد تقلیل یافت و در حضور CHA0/pME3090 عملاً هیچ بیماری روی گیاهان مایه‌زنی شده مشاهده نشد (Maurhofer *et al*. 1995). این محققین در مطالعه پیشین خود ثابت نموده بودند که سویه نوترکیب میزان بیشتری DAPG و PLT در شرایط درون‌شیشه‌ای و نیز در ریزوسفر گندم تولید می‌نماید (Maurhofer *et al*. 1992). سویه CHA0 و موتانت تکمیل شده آن (CHA625/pME3128) نقش مؤثرتری در کنترل *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نسبت به موتانت Phl^- آن (CHA625) داشتند؛ درحالی‌که سویه CHA625 هنوز هم قادر به تولید HCN و Plt بود (Keel *et al*. 1992). همین مطالعه ثابت کرد که DAPG سنتزی، بازدارنده *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *F. oxyxporum* f. sp. *lini* در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد. جداسازی سویه‌های سودوموناس فلورسنت مولد DAPG از ریزوسفر نخودفرنگی در خاک‌های بازدارنده نسبت به *F. oxysporum* f. sp. *pisi* نشان داد که این باکتری‌ها در بازدارندگی از بیمارگر نقش داشته و ژنوتیپ D در ریزوسفر غالب می‌باشد (Landa *et al*. 2002). *P. fluorescens* J2 و موتانت آن J2-phlF (با خصوصیت بیش‌تولید DAPG) هر دو بازدارنده *F. oxysporum* در شرایط درون شیشه‌ای بودند (Zhou *et al*. 2014). از طرف دیگر، آنالیزهای

1. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
2. 2,4-diacetylphloroglucinol
3. Pyoluteorin
4. Induced Systemic Resistance

مبتنی بر موتاسیون نشان دادند که تولید DAPG توسط *P. fluorescens* سویه Q2-87، مکانیسم اولیه بیوکنترل علیه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی به‌شمار می‌رود (Duffy *et al*. 2004).

از طرف دیگر، مولدین DAPG که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، همگی قادر به تولید سیانیدهیدروژن (HCN) نیز می‌باشند (Keel *et al*. 1996). تولید HCN توسط سودومونادها در بیوکنترل بیماری‌های ایجاد شده توسط قارچ‌ها از جمله *T. basicola* روی توتون (Laville *et al*. 1998) و *Septoria tritici* روی گندم (Flaishman *et al*. 1996) نقش کلیدی را ایفا می‌نماید.

سودومونادهای فلورسنت علاوه بر تحریک رشد گیاه به صورت غیر مستقیم، قادرند به‌طور مستقیم نیز موجب تحریک رشد گیاه شوند (Weller 2007). این باکتری‌ها با تولید هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین موجب افزایش سطح ریشه، افزایش تولید تارهای کشنده و در نتیجه افزایش جذب آب و مواد غذایی شده و در نتیجه عملکرد گیاه افزایش می‌یابد (Han *et al*. 2005, Kloepper *et al*. 2007). از طرف دیگر، محلول‌سازی منابع فسفات توسط این باکتری‌ها به‌واسطه تولید آنزیم‌هایی نظیر فیتاز، فسفوناتاز و فسفاتاز (Richardson *et al*. 2009) موجب افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند.

پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) از مهمترین بیماری‌های قارچی این گیاه در ایران و دنیا به‌شمار می‌رود و صرف نظر از فصل کاشت و مراحل رشد، دارای اثرات منفی شدیدی بر عملکرد گوجه‌فرنگی می‌باشد (Larkin and Fravel 1998, Viani *et al*. 2008). مدیریت این بیماری از طریق ضدعفونی خاک با استفاده از ترکیبات شیمیایی تدخینی و یا کشت ارقام مقاوم صورت می‌گیرد (Beckman 1987)، ولی ایجاد نژادهای جدید قارچ موجب شکسته شدن مقاومت ارقام گوجه‌فرنگی مقاوم می‌گردد (Rodriguez-Molina *et al*. 2003).

استان بوشهر به دلیل داشتن سطح زیر کشت وسیع گوجه‌فرنگی و تولید خارج از فصل یکی از استان‌های مهم کشور در تولید این محصول بوده و جهت افزایش عملکرد و جلوگیری از خسارت وارده به آن باید به بیماری‌های این گیاه از جمله بیماری‌های فوزاریومی توجه جدی نمود. با توجه به نقش مؤثر سودومونادهای فلورسنت مولد DAPG در بیوکنترل قارچ *Fusarium oxysporum*، هدف از این پژوهش تعیین مکانیسم‌های آنتاگونیستی و تحریک‌کنندگی رشد گیاه گوجه‌فرنگی توسط این باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاه و تأثیر آن‌ها بر کنترل زیستی پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در گلخانه در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های باکتری و جدایه قارچ بیمارگر

تعداد ۳۵ سویه باکتری *Pseudomonas fluorescens* جداسازی شده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی در استان بوشهر از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه خلیج فارس بوشهر دریافت گردید. به منظور حفظ طولانی مدت، پس از کشت سویه‌ها در محیط کینگ ب براث به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، محیط حاوی باکتری رشد یافته به نسبت مساوی با گلیسرول ۸۷ درصد سترون مخلوط و در تیوب‌های اپندورف در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

قارچ بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) از مرکز تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت گردید و برای اطمینان از بیماریزایی جدایه، تست بیماریزایی روی گوجه‌فرنگی صورت گرفت.

ردیابی‌ژن‌های بیوسنتز ترکیبات ضدمیکروبی در باکتری‌ها

ردیابی ژن *phlD* در سویه‌های *P. fluorescens* از طریق آغازگرهای اختصاصی ژن صورت گرفت؛ در مرحله بعد حضور ژن *hcnAB* در سویه‌های واجد ژن بررسی شد.

ردیابی ژن *phlD* (ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز DAPG)

بدین منظور از آغازگر مستقیم B2BF (5′-ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAGC-3′) و آغازگر معکوس BPR4 (5′-CCGCCGTATGGAAGATGAAAAAGTC-3′) (Mc Spadden Gardener *et al*. 2001) ساخت شرکت

سیناژن، استفاده شد. استخراج DNA باکتری‌ها با روش وانگ و همکاران صورت گرفت (Wang *et al*. 2001). حجم واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر شامل ۴ میکرولیتر DNA باکتری (۲۵ ng/µl)، بافر PCR (1xPCR buffer)، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بود. عمل تکثیر با دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient) ساخت شرکت اپندورف آلمان انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل ۹۴°C به مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در °C ۹۴؛ ۳۰ ثانیه در °C ۶۰؛ ۶۰ ثانیه در°C ۷۲ و در پایان °C ۷۲ برای ۵ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد در ۷۵ ولت به مدت یک ساعت الکترفورز شده و نتایج با استفاده از دستگاه مستندساز ژل مدل EV243 ساخت شرکت Consort بلژیک بررسی گردید. دو سویه CHA0 و *P. fluorescens* 2-79 به ترتیب به عنوان شاهد مثبت و منفی (حضور و عدم حضور ژن) استفاده شدند.

ردیابی *hcnAB* (ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز HCN)

باکتری‌هایی که برای ژن *phlD* در مرحله قبل مثبت گزارش شدند، در این مرحله مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره ای مطابق روش بالا انجام شد با این تفاوت که تکثیر با استفاده از آغازگر مستقیم PM2 (5′- TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCT GG-3′) و آغازگر معکوس PM7-26R (5′- CCGCTCTTGATCTGCAATTGCAGGCC-3′) (Svercel *et al*. 2007) صورت گرفت. این آغازگرها قطعه‌ای به طول ۵۷۰ جفت باز را تکثیر می‌نمایند. برنامه حرارتی PCR شامل ۹۴°C به مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴°C؛ ۳۰ ثانیه در ۶۷°C؛ ۶۰ ثانیه در ۷۲°C؛ و در پایان ۷۲°C برای ۵ دقیقه بود.

آزمون کشت متقابل جهت انتخاب سویه‌های برتر

سویه‌های $phlD^+$ ردیابی شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت آزمون بازدارندگی از رشد قارچ در تشتک پتری روی دو محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و کینگ ب آگار (KB) مطابق روش هاجدرون و همکاران مورد بررسی قرار گرفتند (Hagedron *et al*. 1998). پس از رسیدن حاشیه کلونی قارچ به لبه تشتک پتری شاهد، فاصله بازدارندگی اندازه‌گیری و ثبت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۰ تیمار (سودوموناده‌های فلورسنت واجد ژن‌های $hcnAB^+$ و $phlD^+$ به همراه سویه CHA0) در سه تکرار انجام گرفت و داده‌های حاصل با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. بر این اساس پنج جدایه با بیشترین قدرت بازدارندگی شامل PGU، PGU1، PGU2، PGU3 و CHA0 جهت آزمایش‌های بعد انتخاب شدند.

بررسی سویه‌ها از نظر خصوصیات بیوکنترلی و تحریک‌کنندگی رشد گیاه

برای بررسی تولید سیانیدهیدروژن از روش آلستروم و برنز استفاده شد. در صورت تولید HCNتوسط باکتری، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ اولیه زرد، به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره تا آجری‌رنگ دیده می‌شود که نشانه تفاوت در میزان تولید HCN توسط باکتری می‌باشد (Alström and Burns 1989). تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی روی محیط کشت شیر خشک بدون چربی- آگار[1] (SMA) بررسی شد (Maurhofer *et al*. 1994). پس از رشد باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای روی این محیط به مدت ۴۸ ساعت، ایجاد هاله بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری بررسی گردید. اندازه‌گیری تولید سیدروفور پایووردین با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام گرفت (Castaneola *et al*. 2005) و داده‌های حاصل با استفاده از فرمول $A = \varepsilon BC$ به مول در لیتر تبدیل شدند؛ در این فرمول A میزان جذب، ε ضریب جذب مولی، B قطر کوت و C غلظت ماده می‌باشد. آزمون حل کنندگی فسفات معدنی روی محیط کشت اسپربر[2] صورت گرفت و قطر هاله شفاف اطراف کلونی باکتری پس از یک هفته اندازه‌گیری شد (Sperber 1958). آزمون کمی تولید اندول‌استیک اسید طبق روش پتن و گلیک انجام گرفت (Patten and Glick 2002). در نهایت میزان تولید اکسین سویه‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد حاصل از مقدار جذب نور توسط

1. Skim Milk Agar
2. Sperber

غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندول استیک اسید و از فرمول Y=۶/۱۴۷x-۰/۴۹۷ محاسبه گردید.

استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها و تخمین کمی میزان تولید آنها با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

برای ارزیابی تولید آنتی‌بیوتیک توسط سویه‌ها، از محیط کشت YMP (۳ گرم عصاره مالت، ۳ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم باکتوپپتون و ۱۰ گرم گلوکز در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. باکتری‌ها در این محیط در دمای ۲۷ درجه سلسیوس روی شیکر با ۱۷۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. نمونه‌گیری و استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از ۵۰ میلی لیتر از محیط‌کشت پس از ۷۲ ساعت طبق روش مارهوفر و همکاران صورت گرفت (Maurhofer *et al.* 1992). اتیل استات به نسبت مساوی به محیط کشت اضافه شد؛ درب ارلن‌های حاوی محیط کشت و اتیل‌استات بوسیله درپوش بسته و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند. فاز آلی از فاز مایع بوسیله فیلترهای سیلیکونی جدا شد و اتیل‌استات در دستگاه روتاری به‌طور کامل تبخیر گردید. سپس، باقیمانده در یک میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC حل شد. کروماتوگرافی روی کاغذهای سیلیکاژل (۲۰×۲۰ سانتی‌متر) (Merck, Germany) صورت گرفت. آنالیز TLC عصاره‌ها با لکه‌گذاری ۵۰ میکرولیتر عصاره و نیز استفاده از DAPG و PLT استاندارد روی صفحات انجام شد. TLC با استفاده از تولوئن و استون به نسبت ۱:۴ به عنوان فاز متحرک انجام گرفت. ارزش‌های Rf برای DAPG (۰/۵۴) و PLT (۰/۳۵) برای شناسایی باندهای مربوط به این آنتی‌بیوتیک‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شد. مقدار تولید آنتی‌بیوتیک‌ها توسط هر سویه از مقایسه مساحت لکه با منحنی استاندارد و فرمول‌های Y= 4.7X-9.9 و Y= 6.3X-13.7، به‌ترتیب برای آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و PLT محاسبه شد.

آزمون گلخانه‌ای

در بررسی‌های گلخانه‌ای، ابتدا خاک سترون درون گلدان‌ها با استفاده از بذور ارزن سترون آغشته به میسلیوم ۲۱ روزه قارچ به نسبت وزنی ۱:۱۰ مخلوط گردید. گلدان‌ها ضمن آبیاری مرتب هر دو روز یک بار به مدت دو هفته در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۲۵ درجه سلسیوس 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 جدایه‌ها، ریشه گیاهچه‌های ۲-۴ برگی رقم دانفیلد[1] در سوسپانسیون باکتری‌ها به غلظت $۱۰^{۹}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (CFU/ml) به‌مدت یک ساعت غوطه‌ور شدند و سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی خاک آلوده به قارچ کشت شدند. سه روز بعد سوسپانسیون باکتری با غلظت $۱۰^{۷}$ CFU/gr خاک به گلدان‌ها اضافه گردید. گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های کشت شده در گلخانه با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و ضمن آبیاری مرتب هر دو روز یک بار، ارزیابی میزان بازدارندگی ۳۵ روز بعد با در نظر گرفتن معیارهای زیر انجام گرفت:

الف: علائم اندام‌های هوایی: ۰= گیاه سالم و مصون از هر گونه علائم، ۱= ظهور علائم در برگ‌ها اعم از کلروز، پیچیدگی و ... به میزان کمتر از ۲۵ درصد، ۲= ظهور علائم به میزان ۵۰-۲۶ درصد، ۳= ظهور علائم به میزان ۷۵-۵۱ درصد، ۴= ظهور علائم به میزان ۱۰۰-۷۶ درصد؛ ب: وزن تر و خشک اندام‌های هوایی؛ ج: وزن تر و خشک ریشه (Amini 2009, Abo-Elyousr 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شدند 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 و بحث

ردیابی ژن‌های *phlD* و *hcnAB* با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در سویه‌های *P. fluorescens*

به کمک دو آغازگر B2BF و BPR4 و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قطعه DNA به طول تقریبی

1. Daehnfild

۶۲۹ جفت باز، از دسته ژنی *phlACBD* تکثیر و روی ژل آگارز مشخص شد. بر این اساس تعداد نه جدایه واجد ژن *phlD* بودند. همچنین، با استفاده از جفت آغازگر PM7 و PM26-R قطعه DNA به طول تقریبی ۵۷۰ جفت باز از دسته ژنی *hcnABC* تکثیر گردید. بر این اساس تمامی جدایه‌های $phlD^+$ واجد ژن *hcnAB* بودند.

مطالعات مربوط به وجود سودوموناس‌های فلورسنت مولد DAPG، با استفاده از آغازگرهای Phl2a/Phl2b مشخص نموده است که حدود ۱۰٪ از *Pseudomonas*-های فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر ذرت و گندم کشت شده در خاک‌های بازدارنده بیماری، واجد ژن‌های بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک هستند (Raaijmakers*et al*. 1997, Picard *et al*. 2000). این باکتری‌ها از ریزوسفر گیاهان مختلفی نظیر گندم، خیار و گوجه‌فرنگی جداسازی شده، وجود آنها در خاک‌های افریقا، آسیا، استرالیا، اروپا و امریکای شمالی گزارش شده است (Raaijmakers*et al*. 1997, Keel *et al*. 1996). در ایران نیز وجود ژن‌های *phlD* و *hcnAB* (ژن‌های کلیدی در بیوسنتز DAPG و HCN) و نیز تولید متابولیت‌های مرتبط با این ژن‌ها، در برخی سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شده از میزبان‌های مختلف نظیر آفتابگردان و گندم پیش از این به اثبات رسیده است (Jamali 2009, Jamali and Bayat 2015).

بررسی توانایی بازدارندگی از رشد قارچ توسط سویه‌های باکتری $phlD^+$ در شرایط آزمایشگاه

توانایی آنتاگونیستی نه جدایه سودوموناس فلورسنت $phlD^+$ به همراه سویه *P. protegens* CHA0، براساس روش کشت متقابل روی دو محیط PDA و KB در مقابل *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* مورد مطالعه قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که این باکتری‌ها از نظر ممانعت از رشد قارچ بیمارگر در پتری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. سویه‌های PGU، PGU1، PGU2 و PGU3 دارای بیشترین توانایی آنتاگونیستی علیه قارچ بیمارگر بودند؛ از این‌رو چهار سویه اخیر همراه با سویه CHA0 برای ادامه کار در نظر گرفته شدند (جدول ۱). طبق نظر محققین تفاوت در سطح بازدارندگی روی محیط‌های مختلف نظیر KB، PDA و مالت آگار (MA) ممکن است به دلیل تولید ضعیف عوامل ضدقارچی باکتری و یا رشد بهتر قارچ روی محیط‌های مختلف باشد (Sharifi-Tehrani *et al*. 1998, De La Fuente *et al*. 2004, Jamai and Bayat 2015).

جدول ۱. مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های *P. fluorescens* واجد ژن‌های *phlD* و *hcnAB* بر رشد میسلیومی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Table 1. Mean comparison of influence of $phlD^+$- and $hcnAB^+$ *P. fluorescens* strains on mycelial growth of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Strain	Inhibitory halo on PDA (mm)	Inhibitory halo on KB (mm)
PGU	11.54c	16.42a
PGU1	13.25b	15.93ab
PGU2	13.85a	15.81ab
PGU3	8.19e	13.47c
PGU4	6.65g	12.86c
PGU5	5.74h	11.54d
PGU6	11.32c	8.39e
PGU7	7.61f	4.78f
PGU8	7.4f	1g
CHA0	9.42d	15.65b

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Means with common letters in each column are not significantly different ($p \leq 0.05$).

تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی در سویه‌های منتخب

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که که سویه‌ها از نظر تولید پروتئاز، سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و PLT در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند.

بیشترین میزان تولید پروتئاز پس از ۲۴ ساعت مربوط به جدایه‌های PGU، CHA0 و PGU1 بود (جدول ۲). بعضی سویه‌های *Pseudomonas* آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی (کیتیناز و بتا-۱و۳- گلوکاناز)، پروتئاز، فسفولیپاز C و لیپاز تولید می‌کنند که ممکن است در کنترل بیماری‌ها مؤثر باشند. تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی توسط میکروارگانیسم‌ها به عنوان مکانیسم مهمی در توانایی بیوکنترل آنها مد نظر قرار گرفته است (Keel and Défago 1997).

در پژوهش حاضر، به منظور تائید نتایج حاصل از واکنش PCR، توانایی تولید سیانیدهیدروژن در شرایط آزمایشگاه بررسی شد و مشخص گردید که تمامی سویه‌های $hcnAB^+$، قادر به تولید این متابولیت در

شرایط آزمایشگاهی بوده و بیشترین میزان تولید سیانیدهیدروژن در سویه‌های PGU و PGU1 مشاهده گردید (جدول ۲). تولید HCN توسط سودوموناده‌ها در بیوکنترل بیماری‌های ایجاد شده توسط قارچ‌ها از جمله *Thielaviopsis basicola* روی توتون (Laville *et al.* 1998) و *Septoria tritici* و *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* روی گندم (Flaishman *et al.* 1996) نقش کلیدی را ایفا نموده و در *Pseudomonas aeruginosa* به‌عنوان عامل بیماری‌زایی مطرح شده است (Gallagher and Manoil 2001). HCN موجب بازدارندگی مستقیم از رشد قارچ می‌شود (Blumer and Haas 2000)؛ این متابولیت موجب ممانعت از فعالیت سیتوکروم C اکسیداز در زنجیره تنفسی شده (Knowles 1976) و به آنزیم‌های حاوی فلز متصل می‌شود (Blumer and Haas 2000). در سودوموناده‌های فلورسنت مرتبط با گیاهان که قادر به تولید HCN هستند، تفاوت بین سویه‌های مفید و مضر احتمالا از تفاوت در الگوی تولید HCN بر سطوح گیاهی، درون بافت‌ها و یا هر دو ناشی می‌شود (Ramette *et al.* 2003).

با توجه به ارزش‌های Rf به‌دست‌آمده برای آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد، مشخص گردید که تمامی سویه‌های مورد مطالعه هر سه متابولیت DAPG، MAPG و PLT را تولید نمودند (جدول ۲). بیشترین میزان آنتی‌بیوتیک DAPG (۱۵/۶میکروگرم در میلی‌لیتر) توسط سویه PGU تولید شد و پس از آن سویه PGU1 با ۱۴/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار داشت. از نظر تولید آنتی‌بیوتیک PLT نیز سویه‌های PGU3 و PGU1 نسبت به سایر سویه‌ها بیشترین میزان آنتی‌بیوتیک را تولید کردند. میزان MAPG، که پیش‌ماده آنتی‌بیوتیک DAPG می‌باشد در سویه PGU3 بیش از سایر سویه‌ها بود که با سویه‌های PGU و CHA0 تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

جدول ۲. تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط سویه‌های *P. fluorescens* واجد ژن‌های *phlD* و *hcnAB* در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. Production of antimicrobial metabolites by *P. fluorescens* strains harboring *hcnAB* and *phlD* genes under *in vitro* conditions

Strain	Protease[1]	HCN[2]	DAPG (µg/ml)	PLT (µg/ml)	MAPG (µg/ml)
PGU	17.6a	3a	15.6a	8.88c	11.7abc
PGU1	16.8b	3a	14.1ab	10b	9.3c
PGU2	15.4c	2b	12.4bc	9.86b	10.6bc
PGU3	13.6d	2b	11c	11.11a	13.73a
CHA0	17.2ab	2b	12.6bc	7.92c	11.8ab

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

۱. تولید هاله روی محیط SMA (بر حسب میلی‌متر) نشانه‌ای از تولید پروتئاز در نظر گرفته شد.

۲. درجه تغییر رنگ معرف، به عنوان معیار تولید HCN در نظر گرفته شد.

* Means with common letters are not significantly different based on Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$).

1. Production of halo on SMA (mm) is considered as a sign of protease production.

2. The degree of color change in indicator paper was considered as HCN production.

در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است که تولید DAPG در آزمایشگاه در میان سویه‌ها متفاوت است (Sharifi-Tehrani *et al.* 1998) و بنابراین سطح کنترل بیماری ممکن است متفاوت باشد. به‌علاوه، امکان دارد که توالی‌های *phlD* ردیابی‌شده ناقص بوده یا نتوانند اعمال وظیفه نمایند. با این‌حال، گمان می‌رود عدم کارایی این ژن یک پدیده استثنایی باشد. گرچه موتانت‌های *gacS/gacA* که قادر به تولید DAPG نیستند به‌طور خودبخودی حاصل می‌شوند، گزارشی از این موتانت‌ها در محیط‌های طبیعی در دست نیست. در مقابل، همگی سویه‌های سودوموناد $phlD^+$ که تاکنون گزارش شده‌اند قادر به تولید مقادیر قابل توجهی DAPG در آزمایشگاه هستند (Sharifi-Tehrani *et al.* 1998, Jamali and Bayat 2015, Jamali 2009) و طبق نظر ولر و همکاران، واژه سودوموناس‌های $phlD^+$ را می‌توان معادل سودوموناس‌های فلورسنت مولد DAPG مورد استفاده قرار داد چون ردیابی ژن *phlD* با توان تولید آنتی‌بیوتیک DAPG مرتبط است (Weller *et al.* 2006).

۲و۴-دی استیل فلوروگلوسینول به‌وسیله گونه‌های سودوموناس فلورسنت از سراسر دنیا تولید شده (Keel

(*et al*. 1996, Thomashow and Weller 1996) و دارای اهمیت خاصی در کشاورزی می‌باشد. حفظ ژن‌های *phl* برای بیوسنتز DAPG در میان سودوموناد‌های آنتاگونیست که دارای تنوع اکولوژیکی و جغرافیایی هستند، اهمیت جهانی تولید DAPG در بیوکنترل را اثبات می‌نماید (Keel *et al*. 1996, Wang *et al*. 2001).

DAPG موجب ایجاد انواع بی‌نظمی و اختلال در نوک هیف *P. ultimum* می‌گردد که از جمله آنها جمع‌شدگی و توقف غشای پلاسمایی، واکوئله شدن و از هم پاشیدگی محتوای سلولی است (De Souza *et al*. 2003). همچنین به نظر می‌رسد که DAPG تولیدشده توسط سویه CHA0، توسط ریشه‌های گیاه *Arabidopsis thaliana* تشخیص داده شده که این خود منجر به تغییرات فیزیولوژیک در گیاه و در نهایت مقاومت القایی سیستمیک می‌گردد (Iavicoli *et al*. 2003).

تحقیق روی سویه‌های واجد ژن *phlD* با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) مشخص کرد که این جدایه‌ها قادر به تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاه بودند (جدول ۲). کیل و همکاران نیز گزارش کرده‌اند که ارتباط مستقیمی بین وجود ژن‌های بیوسنتز DAPG در سودوموناد‌های فلورسنت و توانایی آنها در تولید آنتی‌بیوتیک مذکور وجود دارد و جایگاه ژنی بیوسنتز DAPG در میان سویه‌های مولد این آنتی‌بیوتیک حفظ شده است (Keel *et al*. 1996). جدایه‌های مورد آزمایش در این تحقیق مقادیر متنوعی از دو آنتی‌بیوتیک DAPG و PLT را بر روی محیط کشت مایع تولید نمودند. کیل و همکاران نیز مشاهده کردند که سویه‌های دارای ژن *phlD* دارای تنوع فنوتیپی قابل توجهی بوده و میزان DAPG تولید شده در آزمایشگاه بسیار متفاوت بود (Keel *et al*. 1996). سویه‌های *P. fluorescens* مولد DAPG از لحاظ تولید آنتی‌بیوتیک‌ها به دو گروه فنوتیپی مشخص تفکیک می‌شوند: گروه اول متابولیت‌های DAPG، PLT و HCN را تولید کرده و گروه دوم از این میان، فقط توانایی تولید PLT را ندارند (Keel *et al*. 1996). نتایج حاصل از تحقیقات ما نشان داد که سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق متعلق به گروه اول بوده و هر سه متابولیت ضدمیکروبی را تولید می‌کنند.

خصوصیات افزایش‌دهندگی رشد گیاه در سویه‌های *P. fluorescens*

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که سویه‌ها از نظر تولید سیدروفور پایووردین، اندول‌استیک‌اسید و حلالیت فسفات معدنی در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

تمامی سویه‌های مورد بررسی قادر به تولید سیدروفور بودند ولی میزان تولید آن در بین سویه‌ها متغیر بود. بیشترین میزان تولید سیدروفور در سویه PGU و کمترین میزان تولید در سویه PGU2 مشاهده گردید (جدول ۳). تحت شرایط کمبود آهن، باکتری‌ها سیدروفور تولید می‌کنند که دارای قدرت جذب زیادی برای یون آهن فریک هستند. این کلات‌های آهن، آهن موجود در ریزوسفر را از دسترس قارچ‌های بیمارگر خارج کرده و بدین ترتیب رشد آنها را محدود می‌سازند (Keel and Défago 1997). سیدروفورهای باکتریایی نظیر پایووردین و پایوچلین تولیدشده توسط *P. aeruginosa* 7NSK2 نقش بارزی در کنترل مرگ گیاهچه پیتیومی گوجه فرنگی دارند (Buysens *et al*. 1996). از طرف دیگر، ترکیبات کلاته‌کننده آهن نظیر پایووردین و سالیسیلات، در برخی گیاهان به عنوان الیسیتور عمل کرده و موجب بروز مقاومت القایی در مقابل بیمارگرها می‌شوند (Maurhofer *et al*. 1998, van Loon *et al*. 1998).

نتایج مربوط به بررسی تولید اندول استیک اسید حاکی از این بود که بیشترین میزان تولید اندول استیک اسید در سویه‌ها ۲/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و در سویه PGU دیده شد که با سویه PGU1 اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳). در میان فیتوهورمون ها، اکسین (IAA) به‌طور گسترده‌ای در باکتری‌های مرتبط با گیاهان تولید می‌گردد و گزارش شده است که حدود ۸۰٪ از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر خاک قادر به تولید IAA هستند (Patten and Glick 2002, Spaepen *et al*. 2007).

توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفات با نسبت قطر هاله به قطر کلونی سنجیده شد. مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از این بود که توانایی محلول‌سازی فسفات پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت در سویه PGU1 و سپس در PGU3 بیش از سایر جدایه‌ها بود (جدول ۳).

فسفر موجود در خاک به صورت ترکیبات

فسفات‌های آلی و معدنی نامحلول در دسترس می‌باشد (Rodriguez *et al*. 2006, Richardson and Simpson 2011). باکتری‌های حل‌کننده فسفات با تولید انواع اسیدهای آلی قادر به انحلال ترکیبات معدنی فسفات، نظیر تری فسفات کلسیم هستند (Chen *et al*. 2006). باکتری‌های حل کننده فسفات از جمله *Pseudomonas* spp. و *Bacillus* spp. با کمک آنزیم‌هایی نظیر فسفاتاز، فسفوناتاز و اسیدهای آلی مثل گلوکونیک اسید و سیتریک اسید، فسفر را از ترکیبات آلی و معدنی خاک آزاد می‌کنند. گلوکونیک اسید و ۲-کتوگلوکانات نقش مهمی در محلول‌سازی فسفات و توانایی بیوکنترل سودوموناس‌های فلورسنت ایفا می‌نمایند (Vessy 2003, De Werra *et al*. 2009). طبق نظر دی ورا و همکاران در سویه CHA0 تولید گلوکونیک اسید برای کاهش اسیدیته محیط و انحلال فسفات ضروری به نظر می‌رسد (De Werra *et al*. 2009).

جدول ۳. مقایسه میانگین خصوصیات افزایش‌دهندگی رشد گیاه در سویه‌های *P. fluorescens* در شرایط آزمایشگاهی

Table 3. Mean comparison of plant growth-promoting traits in *P. fluorescens* strains under *in vitro* conditions

Strain	Siderophore (µM/ml)	IAA (mg/ml)	Phosphate solubilization (48h)	Phosphate solubilization (96h)
PGU	93.81a	2.7a	1.52d	1.62c
PGU1	87.5b	2.51ab	1.87a	1.93a
PGU2	46.2d	2bc	1.56c	1.59d
PGU3	63.73c	1.8cd	1.63b	1.71b
CHA0	43.4e	1.33d	1.47e	1.48e

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Means with common letters are not significantly different based on Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$).

تأثیر سویه‌های باکتری در کنترل بیولوژیک *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* در شرایط گلخانه

نتایج آنالیز واریانس صفات مورد بررسی در مطالعه تأثیر سویه‌های باکتریایی در کنترل بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی گیاه در حضور بیمارگر نشان داد که تأثیر سویه‌ها بر این خصوصیات معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از این بود که سویه PGU و سپس PGU1 و CHA0 بیشترین تأثیر را نسبت به سایر سویه‌ها در افزایش وزن تر شاخساره داشتند. از نظر وزن تر ریشه نیز سویه PGU کارایی بهتری نسبت به سایر سویه‌ها از خود نشان داد. کمترین میزان افزایش وزن تر ریشه نیز در گیاهان تیمار شده با CHA0 مشاهده شد. سویه PGU افزایش بیشتری را در وزن خشک شاخساره و ریشه گیاهان آلوده نسبت به سایر سویه‌ها موجب شد و سویه PGU2 کمترین افزایش وزن خشک شاخساره و ریشه را موجب شد (جدول ۴).

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را نیز به میزان معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده کاهش دادند. مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از این بود که سویه PGU موجب کاهش ۸۷/۵ درصدی شدت بیماری در گیاهان آلوده نسبت به شاهد آلوده شد و سایر سویه‌ها نیز شدت بیماری را به میزان ۵۰ درصد کاهش دادند (جدول ۴).

جدول ۴. مقایسه میانگین تأثیر سویه‌های *P. fluorescens* منتخب بر شدت بیماری و خصوصیات رشدی گیاه در خاک آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Table 4. Mean comparison of influence of *P. fluorescens* strains on disease control and plant growth factors in soil infested with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Treatments	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Disease severity
PGU+FOL	13.01ab	1.61b	1.6b	0.2ab	0.5c
PGU1+FOL	11.75b	1.21c	1.27c	0.18abc	2b
PGU2+FOL	9.29c	1.02cd	0.98c	0.11bc	2b
PGU3+FOL	10.02c	1.13cd	1.11c	0.15abc	2b
CHA0+FOL	11.81b	0.96d	1.2c	0.15abc	2b
Healthy control	13.42a	1.91a	1.93a	0.23a	0c
Infected control	4.13d	0.47e	0.41d	0.091c	4a

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

* Means with common letters are not significantly different based on Duncan's Multiple Range test ($p \leq 0.05$).

به‌نظر می‌رسد سویه‌های *P. fluorescens* مورد استفاده در این پژوهش با تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی (DAPG، PLT، پروتئاز و سیانید هیدروژن) یا تولید عوامل افزایش‌دهنده رشد گیاهی (سیدروفور، آنزیم‌های محلول کننده فسفات و اندول استیک اسید) موجب کنترل بیماری و افزایش رشد گیاه میزبان به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم شده باشند. در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده بود که سویه‌های *P. fluorescens* مولد پایولوتورین و سیانیدهیدروژن و واجد ژن *phlD* در کنترل قهوه‌ای شدن آوندی و پژمردگی بخش‌های هوایی ناشی از بیماری فوزاریومی گوجه‌فرنگی نقش مؤثری دارند (Fakhouri and Buchenauer 2002).

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از اجرای طرح تحقیقاتی با کد PGU/FS/42-2/1392/3155 می‌باشد که با حمایت مالی شورای پژوهشی دانشگاه خلیج‌فارس (بوشهر) و از محل بودجه پژوهشکده خلیج‌فارس انجام شده است و بدینوسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را از فراهم نمودن این امکان، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

Abo-*Elyousr* KAM, Mohamed HM (2009). Biological control of Fusarium wilt in tomato by plant Growth-promoting yeast and Rhizobacteria. Plant Pathology Journal 25(2):199-204.

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

Amini K (2009). Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in Kurdistan Provice of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. Plant Pathology 8: 68-73.

Beckman CH (1987) The nature of wilt diseases of plants. APS Press, St Paul, MN.

Blumer C, Haas D (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Archives of Microbiology 173: 170-177.

Buysens S, Heungens K, Poppe J, Höfte M (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Applied and Environmental Microbiology 62: 865-871.

Bottiglieri M, Keel C (2006) Characterization of PhlG, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucionol in biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Applied and Environmental Microbiology 72: 418-427.

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

Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34: 33-41.

De La Fuente L, Thomashow L, Weller D, Bajsa N, Quagliotto L, Chernin L, Arias A (2004) *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birds foot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. European Journal of Plant Pathology 110: 671-681.

De Meyer G, Capieau K, Audenaert K, Buchala A, Métraux J, Höfte M (1999). Nanogram amount of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. Molecular Plant-Microbe Interaction 12: 450-458.

De Souza JT, Arnould C, Deulvot C, Lemanceau P, Gianinazzi-Pearson V, Raaijmakers JM (2003) Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. Phytopathology 93: 966-975.

De Werra P, Péchy-Tarr M, Keel C, Maurhofer M (2009) Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Applied and Environmental Microbiology75(12): 4162-74.

Duffy B, Keel C, Defago G (2004) Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. Applied and Environmental Microbiology 70(3): 1836-1842.

Fakhouri W, Buchenauer H (2002) Characteristics of fluorescent pseudomonad isolates towards controlling of tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Plant diseases and Protection 110 (2): 143-156.

Flaishman MA, Eyal Z, Zilberstein A, Voisard C, Haas D (1996) Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. Molecular Plant-Microbe Interaction 9: 642-645.

Haas D, Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology 3: 307-319.

Haas D, Keel C (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology 41: 117-153.

Hagedorn C, Gould WD, Bardinelli TR (1998) Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology 55: 2793-2797.

Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. Systematic and Applied Microbiology 28(1): 66-76.

Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux J-P (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Plant-Microbe Interaction 16: 851-858.

Jamali F (2009) Influence of some biotic factors on the expression of hydrogen cyanide- and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes in *Pseudomonas fluorescens* on bean rhizosphere, Ph. D. thesis in Plant pathology, College of Agriculture, Tehran University. (in Persian)

Jamali F, Bayat F (2015) Phenotypic and genotypic study of *Pseudomonas fluorescens* strain PGU0 and assessment of its biocontrol against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping- off. Biological Control of Pests and Plant Diseases 4 (1): 37-46.

Keel C, Défago G (1997) Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. *In*: Gange AC, Brown VK (eds.), Multitrophic Interactions in terrestrial Systems, the 36th symposium of the British Ecological Society, Royal Holloway College, university of London, Blackwell Science, Oxford. pp. 27-46.

Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Défago G (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Molecular Plant-Microbe Interaction 5(1): 4-13.

Keel C, Weller DM, Natsch A, Défago G, Cook RJ, Thomashow LS (1996) Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. Applied and Environmental Microbiology 62: 552-563.

K**loepper JW, Gutierrez-Estrada A, Mclnroy JA** (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiology 53(2): 159-167.

Landa BB, Mavrodi OV, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS, Weller DM (2002) Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinolproducing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 3226-3237.

Larkin RP, Fravel, DR (1998) Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Disease 82: 1022–1028.

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.

Lucy M, Reed E, Glick BR (2004). Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 86: 1-25.

Lugtenberg BJJ, Dekkers LC (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? Environmental Microbiology 1: 9-13.

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G (1994) Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress, but not cucumber. European Journal of Plant Pathology 100: 221-232.

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology 44: 40-50.

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

Maurhofer M, Reimmann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D, Défago G (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathology 88: 678-684.

Mc Spadden Gardener BB, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM (2001) A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. Phytopathology 91: 44-54.

Morrissey JP, Abbas A, Mark L, Cullinane M, O'Gara F (2004) Biosynthesis of antifungal metabolites by biocontrol strains of *Pseudomonas*. *In*: Ramos JL (ed.), *Pseudomonas*: Biosynthesis of macromolecules and molecular metabolism, Vol. 3. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 635-670.

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.

Patten CL, Glick BR (2002) The role of bacterial indole acetic acid in the development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology 68: 3795-3801.

Picard C, Di Cello F, Ventura M, Fani R, Guckert A (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Applied and Environmental Microbiology 66: 948-955.

Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS (1997) Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. Applied and Environmental Microbiology 63: 881-887.

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant and Soil 321: 305-339.

Richardson AE, Simpson RJ (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant Physiology 156: 989-996.

Rodriguez-Molina M, Medina L, lorres-vila L, cuartero J (2003) Vascular colonization pattern in susceptible and resistant tomato cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 0 and 1. Plant pathology 52:199-203.

Rodriguez H, Fraga R, Gonzalez, T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil 287: 15-21.

Sharifi-Tehrani A, Zala M, Natsch A, Moënne-Loccoz Y, Défago 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.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews 31(4): 425-448.

Sperber JI (1958) The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9: 778-781.

Svercel M, Duffy B, Défago G (2007) PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp. Journal of Microbiological Methods 70: 209-213.

Thomashow LS, Weller DM (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: mechanisms and antifungal metabolites, *In*: Stacey G, Keen NT (eds.), Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. Chapman and Hall, New York. pp. 187-235.

Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36: 453-483.

Vessey KJ (2003) Plant growth-Promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.

Viani A, Alizadeh A, Babadoust M, Peighami E (2008) Investigation of Fusarium diseases of tomatoes in East Azarbaijan. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 14(5):192-206. (in Persian)

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

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

Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder LL, De La Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV, Thomashow LS (2006) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biology 9(1): 4-20.

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

Zhou T-T, Li C-Y, Chen D, Wu K, Shen Q-R, Shen B (2014) *phlF*- mutant of *Pseudomonas fluorescens* J2 improved 2,4-DAPG biosynthesis and biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt. Biological Control 78: 1-8.