ردیابی آنتی‌بیوتیک فنازین- ۱-کربوکسیلیک اسید جداسازی در سودوموناس‌های فلورسنت شده از ریزوسفر گندم و تاثیرآن در کنترل بیولوژیکی بیماری پاخوره‌گندم

نویسندگان :

سعید خیرگرد زاده، دانشجو دانشگاه فرهنگیان

هادی نادری ، دانشجو دانشگاه فرهنگیان

چکیده

بیماری پاخوره‌گندم با عامل قارچی Gaeumannomyces graminis var. tritici یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در ایران به شمار می رود. به منظور کنترل بیولوژیکی این بیماری،۱۳۰ جدایه سودوموناس فلورسنت از ریزوسفر گندم در نواحی مختلف استان خراسان جداسازی شد. برای انتخاب جدایه‌های سودوموناس فلورسنت با توانایی بازدارندگی از رشد قارچ، آزمون کشت متقابل باکتری‌ها با قارچ Ggt در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروزآگار و کینگ ب انجام شد. از این میان، ۲۱ جدایه با قابلیت بازدارندگی بین ۲۵/۱۱-۲۵/۵۱ درصد به عنوان جدایه‌های برتر از نظر ممانعت از رشد قارچ Ggt انتخاب شدند. برای ردیابی ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید (PCA)، روش PCR با استفاده از پرایمرهای PCA2a و PCA3b انجام شد. نتایج نشان داد ۱۲ جدایه از ۲۱ جدایه انتخاب‌شده حاوی ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک PCA بودند. جهت بررسی تولید این آنتی‌بیوتیک از روش کیفی تولید رسوب سبز تیره یا کریستالی در محیط کشت استفاده شد. نتایج نشاندهنده توانایی تولید این آنتی‌بیوتیک در ۶ جدایه از ۱۲ جدایه حاوی ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک بود. در آزمایش‌های گلخانه‌ای نیزجدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید، نسبت به سایرین از توانایی بیشتری در کنترل بیماری پاخوره‌گندم برخوردار بودند و شدت بیماری را ۷۷-۸۰ درصد کاهش دادند. با کاربرد این جدایه‌ها همچنین افزایش قابل ملاحظه‌ای در وزن‌تر ریشه و بخش‌های هوایی گیاهان مشاهده شد. نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که احتمالا آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید تولیدشده توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنت، در کاهش بیماری پاخوره در گندم نقش دارد.

واژه‌های کلیدی:آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید، پاخوره،سودوموناس فلورسنت،کنترل بیولوژیک

مقدمه:

پاخوره یا Take-all از بیماری‌های مهم غلات به ویژه گندم به‌شمار می‌رود. این بیماری عموما به گندم‌های زمستانه حمله می‌کندو نقش زیادی در کاهش محصول دارد (۳۸). بررسی‌های فراوانی مبنی بر کاربرد باکتری‌های مفید در کاهش شدت بیماری پاخوره در گندم انجام شده است. باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه PGPRبه گروهی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که خود را با ریشه‌های گیاهان بر اساس ترشحات آن‌ها آداپته کرده و به این‌ترتیب از سایر باکتری‌ها که نمی‌توانند کلنیزاسیون موثری را بر روی ریشه‌داشته باشند، جدا می‌گردند. این باکتری‌ها توانایی‌خنثی‌کردن اثرات زیانآور بیمارگرهای گیاهی را به دو طریق دارا هستند. در یک روش باکتری با تولید آنتی‌بیوتیک، ترشح سیدروفرتولید سیانید هیدروژن ، ترشح آنزیم‌های برون‌سلولی مانند کیتیناز،بتا یک و سه گلوکاناز، پروتئازو لیپاز فعالیت عامل بیماریزا راکاهش و متوقف می‌سازد . در روش دیگر باکتری سبب فعال‌شدن مکانیسم مقاومت سیستمیک القایی‌در گیاه می‌گردد.تولید آنتی‌بیوتیک توسط سودوموناس‌های فلورسنت، یکی ازمکانیسم‌های مهم در کنترل بیماری‌ها توسط این باکتری‌ها به شمار می‌رود . از جمله‌مهمترین این ترکیبات می توان به آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴ دیاستیل‌فلوروگلوسینول،فنازین،پایولوتئورین، اگروسین۸۴، هربیکولین،اومایسین،پیرولنیترین‌اشاره‌کرد.

آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سودوموناس‌ها، روی فعالیت طیف وسیعی ازپروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها اثر بازدارنده دارند. کلنیزاسیون موثر ریشه‌توسط باکتری‌ها و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها در منطقه ریزوسفر می‌تواندعامل مهمی در کنترل بیماری‌های گیاهی به خصوص بیماری‌های خاکزادباشد.

جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفرگندم به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت تعداد ۶۰نمونه خاک (شامل ریشه و خاک ناحیه ریزوسفر (از

منـاطق مختلـف‌استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی جمع‌آوری گردید. سـپس یک گرم از خاک ریزوسفری از نمونه‌ها جدا و آنگاه بـا اسـتفاده از آب پپتون استریل (پپتون 2 گرم، آب‌مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر) سـری رقـت تهیه شد. رقت‌های مختلف روی محیط‌کشـت کینـگ ب آگار (KB)پخش شدند و به‌منظور رشد باکتری‌ها پلیت‌ها در دمـای۲۸ C°در انکوبـاتور قرارگرفتنـد. پـس از گذشـت ۴۸ –۷۲ سـاعت،پرگنه‌های رشد یافته مجددا جهت خالص سازی روی محـیط کینـگ ب آگار رشد داده شدند. در مرحله بعد پرگنه‌های خالص‌شده باکتری‌هابا استفاده از لامپ UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر از نظر تولید رنگدانه‌فلورسنتس مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌هـا بـه‌منظـور آزمایشـات بعدی درون سولفات‌منیزیوم (0/1مولار) نگهداری شدند.

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت و انتخاب جدایه‌های‌برتر جهت شناسایی باکتری‌ها، انجام تست‌های شناسـایی بـر اسـاس روش‌شادوهمکـاران‌صـورت‌گرفـت.واکـنش‌هـای کاتـالاز، اکسیداز، رشد بی‌هـوازی، گـرم، تولیـد آرژنـین دهیـدرولاز، هیـدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تولیـد لـوان از سـوکروز روی محـیط آگـار مغذی حـاوی سـوکروز پـنج درصـد، احیـای نیتـرات، تولیـد رنگدانـه فلورسـنت روی محـیط کینـگ ب، رشـد در دماهـای ۴ و ۴۱ درجـه‌سانتی‌گراد و مصرف قندهای سوربیتول و ال آرابینـوز در جدایـه‌هـای انتخاب شده صورت پذیرفت.

بازدارنـدگی‌ازرشـدقـارچ var. triticiGaeumannomyc graminisتوسط‌سودوموناس‌های‌فلورسـنت‌درتشـتک‌پتری‌به‌م نظوربررسی‌اثرآنتاگونیسـتی بـاکتری‌هـا از دو محـیط‌کشـت PDA و KBاستفاده شد. در این بررسی از ۲۱ جدایه باکتری و یک‌جدایه قارچ استفاده شد. جدایه‌هـای بـاکتری بـه مـدت۲۴ساعت در دمای۲۸ C°رشد داده شدند. سپس با استفاده از لوپ استریل باکتریرشد یافته در فاصله ۵/۰ سانتی‌متری لبـه تشـتک پتـری بـه صـورت نقطه‌ای کشت داده شد و به‌صورت هم‌زمان قطعه‌ای از قارچ Ggt بـه قطـر یـک سـانتی‌مترکـه بـه مـدت چهـار روز درون محـیط‌کشـت‌سیب‌زمینی دکستروز آگار PDA)) رشد داده شده بود، در وسط پتری‌قرار داده شد. برای هر جدایه باکتری در این آزمون سه تکرار در نظـر گرفته شد. پس از انکوباسیون در دمای۲۵ C° و گذشت مدت زمـان چهار روز، هنگامی که هیف‌های قارچ کل پتری شـاهد را پـر کردنـد، بازدارندگی از رشد قارچ در تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های باکتری‌مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمون بر روی‌محیط‌کشت‌کینگ به آگار نشان دهنده هاله بازدارندگی بیشتر در مقابل قارچ Ggt بـوده است.

ردیابی ژن (phzC, phzD) بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسـیلیک اسـید توسـط واکـنش زنجیـرهای پلیمـراز

به منظور استخراج DNA ژنومی جدایه‌های باکتریـایی، از روش ستیل‌تری‌متیل‌آمونیوم‌بروماید (CTAB) استفاده شد.چند لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی محـیط کینـگ ب به میکروتیوپ‌های cc۵/۱ حاوی ۱ cc آب مقطر استریل افزوده شـد.پس از ۳۰ ثانیه ورتکـس، نمونـه‌هـا بمـدت ۵ دقیقـه در ۶۰۰۰ rpmسانتریفوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد. پس از افزودن ۳۰ µl از محلول SDS 20% و ۵۶۷ µl بافر استخراج به هر نمونه، ۳۰ ثانیه‌به آرامی ورتکس انجام شد و به‌مدت ۵–۱۰ دقیقه نمونه‌هـا در دسـت تکان داده شد و سپس ۲۰ دقیقـه در حمـام بـن مـاری ۶۵ C° قـرار گرفت، هر پنج دقیقه میکروتیوپ‌ها به آرامی تکان داده شـد. بـه هـر نمونه ۹۰ µl از محلول NaCl 5M و ۸۰ از محلول CTAB افزوده و سپس به آرامی تکان داده شـد و۲۰ دقیقـه در حمـام بـن مـاری در دمای۶۵ C° قرار گرفت. سپس ۷۶۷ µl محلول کلروفـرم–ایزوآمیـل به هر نمونه افزوده شـد. سـپس بـه آرامـی نمونـه‌هـا را تکـان داده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در۱۳۴۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در ایـن مرحلـه سـه‌فاز کاملامجزاتشکیل‌می‌گردد.فازرویـی(µl۳۵۰)بـه میکروتـ یـوپ استریل جدیدی منتقل شد. به هر نمونه به میزان ۸/۰ حجـم محلـول برداشته شده قبلی، ایزوپروپانول سرد افزوده شـد و سـپس بـه آرامـی به‌صورت دورانی تکان داده شد تا زمانی که کلاف DNA به صـورت ابر سفید مشاهده گردد و پـس از ۳۰–۴۵ دقیقـه نگهـداری در فریـزر بـه‌مـدت ۱۵ دقیقـه در ۱۳۴۰۰ rpm سـانتریفوژ شـد. محلـول رویـی حذف‌شده و رسوب DNA را بـا الکـل۷۰ درصـد شستشـو داده و در دمای اتاق در زیر هود رسوب خشک شـد. رسـوب DNA در ۳۰ µlآب مقطر استریل حل شد و در ۲۰ C°-. نگهداری گردید. واکنش زنجیرهای‌پلیمرازبااستفاده از دو آغـازگر ۲۰ نوکلئوتیـدی PCA2a و PCA3b(سـاخت شـرکت تکاپوزیسـت) انجـام شـد.آغازگرهای PCA2a و PCA3b براساس تـوالی ژن‌هـای بیوسـنتز آنتی‌بیوتیک PCA در استرین P. fluorescens 2-79 و به‌ترتیـب براساس توالی ژن‌های phzC و phzD طراحـی شـده بودنـد.

واکنش PCR در ۲۵µl (چهار میکرولیتر DNA ، یک میکرولیتراز هر پرایمر و مابقی آب) بر اساس روش رایمیکرز و همکاران (۱۹۹۷) صورت گرفت. برای صحت انجام آزمایش و کنترل آلودگی، دریک واکنش به جای اضافه‌کردن DNA ژنومی از آب مقطر سترون (به عنوان شاهد منفی) و برای شاهد مثبت نیز از استرین P. fluorescens 2-79 دارای توانایی تولید PCA استفاده شد. جدایه P4نیز به عنوان جدایه دارنده ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید از کلکسیون باکتری‌های دانشگاه تهران انتخاب گردید. پس از انجام واکنش در دستگاه ترموسایکلر مدل (Biometra,Germany)، قطعات تکثیرشده روی ژل آگارز ۵/۱درصد به مدت یک و نیم ساعت در ولتاژ ۸۵ ولت از یکدیگرجداشدند. پس از انجام الکتروفرز، ژل زیر نور ماوراءبنفش مورد ارزیابی‌قرار گرفت.

ارزیابی بیان ژن‌های بیوسنتز فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسیددرجدایه‌هایانتخاب‌شده‌جدایه‌های باکتریایی موردنظربه‌همراه استرین CHA0fluorescens.P به عنوان شاهد منفی بر روی محیط تریپتیک سوی آگار TSA کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری‌شدند.درمرحله‌بعدباکتری‌های رشدیافته روی محیط PDAمخطط شدند. پس از چهار روز نگهداری در دمای۲۸ C° ،تولید رسوب سبز تیره یا رسوبات کریستالی در مرکز کلنی باکتری که‌بیانگر تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید است مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه باکتری انجام گردیده شد. بدین منظور از یک جدایه قارچ (T1 که از نواحی آلوده به بیماری‌پاخوره در استان مرکزی جداسازی شده بود) و ۲۱ جدایه باکتری ۱۹جدایه باکتریایی جداسازی شده از ریزوسفر گندم از استان خراسان، جدایه P. fluorescens 2-79 و جدایه P4 از کلکسیون آزمایشگاه‌بیوکنترل دانشگاه تهران) استفاده شد.

برای تهیه زادمایه قارچ از محیط‌کشت ارزن همراه با ماسه به نسبت۱:۱ استفاده شد. قارچ Ggt به مدت چهار روز روی محیط‌کشت PDAضعیف‌شده رشد داده شد و به میزان ۱۰ قطعه هشت‌میلی‌متری درون محیط‌کشت ارزن و ماسه ریخته شد. سپس محیط‌ها در دمای۲۲-۲۵ C° به مدت چهارهفته نگهداری شد. این زادمایه به‌نسبت پنج درصد با خاک سیلت لوم استریل شده گلدان‌های ۸۰۰گرمی مخلوط گردید. برای آغشته سازی بذور با باکتری، ابتدا Nutrient broth yeast extract agarمحیط‌کشت در باکتری‌هاکشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ C° در انکوباتور قرار داده شدند. باکتری‌های رشد یافته با پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل از روی محیط‌کشت شسته شدند و دو میلی‌لیتر ازسوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط King B کشت داده شد. ازمحیط جدید سوسپانسیون دیگری تهیه شد و به آن به میزان۵/۰درصد کربوکسی متیل سلولز اضافه گردید. این سوسپانسیون دارای‌باکتری بود که بر اساس میزان جذب در طول موج ۵۴۶نانومترکه تقریبا برابر ۱/۰ می‌باشد تعیین می‌گردد. بذرها به مدت۴۵دقیقه در سوسپانسیون باکتری حاوی کربوکسی متیل سلولز قرار داده شدند. سپس هفت عدد بذر در هر گلدان بین دو لایه ماسه قرار داده شد. تیمار شاهد سالم بدون افزودن قارچ و شاهد آلوده با افزودن قارچ در نظرگرفته شدند. گلدان‌ها به مدت چهار هفته در شرایط گلخانه در تیرماه در دمای ۲۰-۲۸ قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲۳ تیمار و سه تکرار انجام شد. پس از زمان مذکور گیاهچه‌ها از گلدان‌ها خارج‌شده و با آب‌جاری شستشو داده شدند و بر اساس میزان آلودگی بین ۰-۵ درجه‌بندی شدند. این شاخص سنجش آلودگی به صورت درجه صفر به مفهوم ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه‌های نکروزه، یک به مفهوم ریشه دارای یک یا چندلکه نکروزه و طوقه‌ها فاقد هرگونه علائم، دو به مفهوم ریشه‌ها دارای‌لکه‌های ممتد نکروزه (نکروز بیشتر از ۲۵ و کمتر از ۵۰ درصد)، سه به‌مفهوم نکروز بیشتر از۵۰ درصد ریشه‌ها و کمتر از ۷۵ درصد و ظهور سیاه‌شدگی طوقه، چهار به مفهوم ریشه‌ها تقریبا سیاهرنگ با توسعه ۷۵ درصد سیاه‌شدگی طوقه و پنج به مفهوم ریشه‌ها و طوقه کاملا سیاهرنگ و سبز خشک‌شدن گیاه می‌باشد. پس از حذف رطوبت‌سطحی گیاهان، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی و وزن کل گیاه نیز ارزیابی‌گردید.

نتیجه گیری:

نقش باکتری‌های کلنیزه‌کننده ریشه در کنترل بیمارگرهای گیاهی بسیار حائز اهمیت است (۱۱). مکانیسم‌های مختلفی برای‌کنترل بیمارگرهای گیاهی وجود دارد که از جمله مهم‌ترین‌های آن‌ها می‌توان به تولید سیدروفر، سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود. همان‌گونه که ذکر شد سودوموناس‌های فلورسنت به دو روش مستقیم و غیر مستقیم

سبب جلوگیری از فعالیت بیمارگرها می‌گردد. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها با تاثیر بر روی بیمارگر و مختل ساختن اعمال حیاتی بیمارگرها از جمله مکانیزم‌های مهم در کنترل بیولوژیک محسوب می‌گردند. تولید آنتی‌بیوتیک فنازین توسط سودوموناس‌های فلورسنت از جمله مکانیسم‌های موثر بر روی کاهش فعالیت بیمارگرهابه خصوص قارچ Ggt می‌باشد که به عنوان میزبان حساس به آنتی‌بیوتیک‌ها شناسایی شده است .در مطالعات بسیاری، ازسودوموناس‌های فلورسنت که دارای توانایی تولید آنتی‌بیوتیک هستند در کنترل بیماری پاخوره‌گندم استفاده شده است. در پژوهش فوق، در آزمون کشت متقابل، مقایسه میانگین هاله بازدارندگی نشان داد که تمام ۱۲ جدایه برتر انتخاب شده که دارای ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین۱-کربوکسیلیک‌اسید بودند، باعث کاهش رشد میسلیوم قارچ Ggt در شرایط آزمایشگاه شدند. جدایه F4علاوه بر اینکه درشرایطآزمایشگاه دارای توانایی بازدارندگی بالایی از رشد قارچ Ggt بود، در شرایط گلخانه نیز موجب کنترل موثر بیماری پاخوره گردید. بر اساس نتایج این پژوهش، ازمیان ۱۲جدایه برتر، در شش جدایه در روش کیفی، تولیدآنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید به اثبات رسید. به طورکلی می توان این طور اثبات کرد که وجود ژن به تنهایی نشاندهنده بیان و یا به عبارتی تولید محصول ژن نمی‌باشد (۱۰). ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در ۱۲ جدایه از ۲۱ جدایه باکتری استفاده شده در این پژوهش یعنی جدایه‌های F141، F4، F3، F1،F2، شد ردیابی P4و ۲-۷۹، CHN5، CHN4، F115، F70،F141 F30 و ۲-۷۹ ، P4، F4، F1،F3جدایه‌های یعنی جدایه شش که‌در روش کیفی قادر به تولید رسوب تیره رنگ‌بودند. این نتایج نشاندهنده تولید قطعی آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک‌اسید در این شش جدایه می‌باشد. در پنج جدایه دیگر یعنی جدایه‌های CHN4 ، F115، F30،F70 وCHN5 هرچند در روش کیفی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید هیچ‌گونه رسوبی دیده نشد ولی این جدایه‌ها در شرایط گلخانه خوب عمل کردند. بر طبق این نتایج احتمال می رود که در این پنج جدایه تولیدآنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید صورت گرفته باشد ولی تولید آن به میزانی نبوده است که رسوب تیره در محیط ایجاد کند. چون شرایط محیط‌کشت نیز در تولید آنتی‌بیوتیک نقش دارند (۱۲). ازطرف دیگر احتمال تولید مشتقات آنتی‌بیوتیک PCA در این پنج‌جدایه نیز وجود دارد زیرا PCA به عنوان ماده حد واسط در سنتز سایر مشتقات فنازین در سودوموناس‌ها تولید می‌شود به عنوان مثال وارد شدن ژن phzM سبب سنتز پایوسیانین از فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید می‌شود که از مشتقات فنازین محسوب می‌گردد. همچنین ژن phzO سبب تولید ۲-هیدروکسی فنازین، ژن phzSسبب تولید ۱-هیدروکسی فنازین و ژن phzS سبب تولید فنازین ۱-کربوکسامید می‌گردد (۱۰). از آنجایی‌که سایر مشتقات فنازین نیز در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش عمده‌ای دارند، لذا کنترل خوب این‌جدایه‌ها با احتمال تولید سایر مشتقات فنازین نیز ملموس می‌باشد. در جدایه F2 ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک فنازین- ۱- کربوکسیلیک اسید ردیابی شد ولی در روش کیفی تشکیل رسوب به‌وسیله آن مشاهده نگردید. این جدایه در کنترل بیماری پاخوره در شرایط گلخانه‌نیز تاثیر خوبی نداشته است. لذا از آنجایی‌که مدیریت بخش‌های مختلف خاک برای اجرای صحیح فعالیت عامل آنتاگونیست نقش موثری دارد می توان چنین بیان کرد که ژن در این جدایه در شرایط گلخانه ای بیان نشده است و یا ممکن است باکتری در خاک از بین رفته باشد و یا آنتی‌بیوتیک تولید شده باشد ولی جذب کلوئیدهای خاک‌شده باشد، زیرا کنترل بیولوژیک عوامل آنتاگونیست به بسیاری از فاکتورهای زنده و غیر زنده در خاک بستگی دارند. هیدینک و همکاران در بررسی های خود مشاهده کردند که تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک در کاهش بیماری پاخوره بسیار موثر می‌باشد ولی ممانعت از بیماری در مدت زمان طولانی بستگی به فاکتورهای محیطی دارد. فاکتورهایی نظیر دما، رطوبت، ترشحات ریشه در فعال‌شدن میکروارگانیسم و تشکیل اجتماعات در اطراف ریشه و تولید متابولیت ها نقش دارند . از طرف دیگر کلنیزه‌کردن‌موثر ریشه توسط باکتری نیز بسیار حائز اهمیت است. این احتمال وجود دارد که جدایه F2 کلنیزه کننده قوی ریشه نبوده و نتوانسته است به خوبی ریشه گیاهچه‌های گندم را در برابر قارچ Ggtحفاظت کند . به طور کلی نتایج نشان داد شش جدایه -۲ P4 ، F4،F1،F141،79 و F3 کنترل بالایی را در برابر قارچ Ggtداشته‌اند. در این جدایه‌ها به‌ترتیب شدت بیماری ۲۳، ۲۳، ۲۱، ۲۱، ۲۰و ۲۰ درصد و در جدایه‌های F30 ، F70، CHN4،CHN5 و F115 شدت بیماری به ترتیب ۳۶ و ۳۵ و ۳۰ و ۲۶ و ۳۸ درصد بود. در جدایه F2 نیز شدت بیماری ۸۸ درصد مشاهده شد. شانسی و همکاران نیز نشان دادند که تولید آنتی‌بیوتیک فنازین در P.aureofaciens 30-

84سبب کنترل بیماری پاخوره گندم تا ۹۰درصد می‌گردد. براین اساس نقش اساسی‌و مهم آنتی‌بیوتیک فنازین۱- کربوکسیلیک اسید در کنترل بیماری پاخوره توسط جدایه های تولیدکننده آن دیده شد. در شش جدایه تولید کننده آنتی‌بیوتیک فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید کنترل بیماری پاخوره گندم به خوبی صورت گرفت. همان‌گونه که مشاهده شد این جدایه‌ها شدت بیماری پاخوره را ۷۷-۸۰ درصد کاهش دادند. بر این اساس و انطباق داده‌ها با پژوهش‌های دانشمندان با احتمال بسیار بالایی نقش این‌آنتی‌بیوتیک در پژوهش ما دیده شد.

منابع:

۱- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Vivanco J. M. 2006. The Gilroy S., and role of root exudates in with plants and rhizosphere interactions other organisms. Annual Review of Plant .Biology 57: 233-266

۲- Bagnasco P., Delafuente L., Gualtieri .G., Noya F., and Anas A. 1998 Flourescent Pseudomonas as biocontrol agent against forage legume pathogenic fungi. Soil. Biol. root .Biochem. 30: 1317-1322

۳- Ran L. X., Pieterse ،.Bakker P. A. H. M C. M. J. and Van loon L. C. 2003. involvement Understanding the of rhizobacteria-mediated induction of biocontrol of plant systemic resistance in disease. Journal of Plant .Pathology 25: 5-9

۴- Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J., and Van Loon L. C. 2007. Induced Resistance by Systemic Fluorescent Pseudomonas spp. .Phytopathology 97: 239-243

۵- Botelho G. R., and Mendonça-Hagler L. C. 2006. Fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere of crops-an overview. Microbiology 37: 401- Brazilian Journal of .416

۶- Bull C. T. 1987. Wheat root disease-suppressive or colonization by nonsuppressive bacteria and the effect size on severity of take-all of population caused by Gaeumannomyces graminis ،Thesis var.tritici. Ms .(Washington State university. (Abstract

۷- Moenne-Loccoz, Y., ،.Caroll, H Dowling, D., and Ogra, F. 1995. biosynthesis Mutational disruption of the genes coding for the antifungal metabolite diacetylphloroglucinol does not ۲،۴- influence the ecological Pseudomonas fluorescens F113 fitness of in the rhizosphere of sugar beets. Applied Environmental .Microbiology 61: 3002-3007

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

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

۱۰- ،.Delaney, S. M., Mavrodi, D. V Bonsall, R. F., and Thomashow, L. S. 2000. phzO, a gene for hydroxylated phenazine ۲- biosynthesis of compounds in Pseudomonas aureofaciens of 30-84. Journal .Bacteriology 183(1): 318-327

۱۱- .Dubuis C., Keel C., and Hass D .۲۰۰۷ Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. European .of Plant Pathology 119: 311-328 Journal

۱۲- Ellis R. J., Timms-Wilson T. M., and Bailey M. J. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. .Enviromental Microbiology 2: 274-284

Ge Y., Huang X., Wang S., Zhang X., ۱۳-
Phenazine-1-carboxylic .and Xu., Y. 2004
acid is negatively
positively regulated and pyoluteorin
regulated by gacA in Pseudomonas sp.
M18. FEMS Microbiology
.letters 237: 41-47