مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۲، شماره ۳، پائیز ۱۳۹۸

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

پیشرفت‌های جدید در سازوکارهای کنترل زیستی سودوموناس‌ها

فاطمه شهریاری[1*] و مونا اسمعیلی[2]

۱- استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

shahryari@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۲۳، تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۲

صفحه ۵۰-۲۷

چکیده

سودوموناده‌ای فلورسنت به‌عنوان عوامل موثر در کنترل زیستی از قدرت سازگاری بالا و توانایی تولید منبع سرشاری از متابولیت‌های ثانویه برخوردارند. آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل فنازین، دی استیل فلوروگلوسینول و هیدروژن سیانید توسط سودوموناده‌ای فلورسنت تولید می‌شوند و به نظر می‌رسد که یک صفت اجدادی است. این ترکیبات مستقل از فعالیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها، اغلب نقش فیزیولوژیکی برای استرین تولیدکننده دارند. سایر متابولیت‌های ثانویه از قبیل رایزوکسین، پرومیسالین، ال فورانومایسین، توکسین‌های حشره‌ای و بیوسورفکتانت‌ها (رامنولیپیدها و لیپوپپتیدهای حلقوی)، تنها در استرین‌های خاص سودوموناس دیده می‌شوند. توالی‌یابی ژنوم استرین‌های بیوکنترلی سودوموناس منجر به کشف تعداد زیادی خوشه‌های ژنی بیوسنتزکننده ترکیبات ثانویه ناشناخته شده است. داده‌کاوی ژنوم منجر به کشف تعداد زیادی ترکیبات ضدمیکروبی شده است که در کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر گیاهی، اوومیست‌ها و باکتری‌ها نقش دارند. علاوه بر این، برخی از استرین‌های بیوکنترلی سودوموناس ترکیبات ضدحشره‌ای تولید می‌کنند. توانایی بی‌حدوحصر سودوموناس‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترلی همه دانشمندان را متحیر کرده است و روز به روز موارد جدید از این توانایی کشف می‌شود. در این مقاله سعی بر این است که آخرین یافته‌ها در خصوص سازوکارهای کنترل زیستی سودوموناده‌ای فلورسنت بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوز، بیوسورفکتانت ، ژن‌های خانه‌دار، فنازین، لیپوپپتیدهای حلقوی.

مقدمه

کنترل بیولوژیک یا زیستی با توجه به بی خطر بودن برای محیط‌زیست، یکی از روش‌های کاهش خسارت عوامل بیماری‌زا در بخش کشاورزی است (۱۰، ۷). تاکنون برای کنترل زیستی تعاریف و تفاسیر متعددی ارائه شده است که به دلیل ناشناخته بودن بسیاری از جنبه‌های این روش کنترلی، هنوز تعریف جامع و کاملی که بیانگر تمام جنبه‌های کنترل زیستی باشد، ارائه نشده است. کنترل زیستی در مفهوم وسیع عبارت است از کلیه عملیات و فرآیندهایی که با استفاده از موجودات زنده، ژن‌ها و فرآورده‌های ژنی باعث کنترل یا کاهش خسارت ناشی از یک یا چند موجود زنده شود (۱۲).

در واقع بیوکنترل، زمانی که استراتژی دیگری برای کنترل بیماری وجود ندارد و یا در کشاورزی پایدار که استفاده از سموم شیمیایی مجاز نیست، بسیار مفید واقع می شود. علاقه برای تولید و استفاده از محصولات بیولوژیک سبب شده تا این ترکیبات همراه با عوامل شیمیایی در برنامه‌های مدونی استفاده شوند که در نتیجه منجر به کاهش مصرف ترکیبات شیمیایی و عدم ایجاد بیمارگرهای مقاوم می‌شود. از بین این عوامل نقش گونه‌های مختلف جنس سودوموناس در علم کنترل زیستی بسیار برجسته است. این موجودات به‌راحتی از خاک و ریزوسفر جداسازی می‌شوند و قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه فراوانی هستند که در کنترل عوامل بیمارگر نقش بسزایی دارند (۱، ۲، ۳).

علاوه‌بر این، پی بردن به نقطه اثر یا نحوه عملکرد گونه‌های سودوموناس امری بسیار راحت است. زیرا این موجودات همواره به‌عنوان مدل در آزمایشگاه‌های ژنتیک بررسی شده‌اند و دانسته‌ها در مورد آن‌ها بسیار زیاد است (۱۱). مهم‌ترین واکنش های بیوکنترلی سودوموناس‌های فلورسنت شامل آنتی‌بیوز (۱۸،۲۰)، رقابت بر سر نیچ های اکولوژیکی و مواد غذایی (۲۳)، رقابت برای جذب آهن با وساطت سیدروفورها و در نهایت مقاومت القایی سیستمیک (۱۶) است. سودوموناس‌ها از طریق افزایش جذب مواد معدنی همانند فسفات، به افزایش ریشه‌زنی، تولید هورمون‌های گیاهی و حتی تغییر

مورفولوژی کمک می‌کنند (۲۰). در راستای استفاده از عوامل کنترل زیستی در این مقاله ساختار عملکردی متابولیت‌های ثانویه سودوموناده‌ای فلورسنت و دستاوردهای جدید به کمک داده کاوی ژنوم بررسی شده است.

۱- تاکسونومی سودوموناس‌های عوامل بیوکنترل

جنس *Pseudomonas* متعلق به شاخه پروتئوباکتریا، رده گاماپروتئوباکتریا، راسته *Pseudomonadales* و خانواده *Pseudomonadaceae* قرار دارد. جزئیات در مورد تاریخچه تاکسونومی این جنس تا سال ۲۰۰۹ توسط پیکس و همکاران ارائه شده است (۴۲). بسیاری از اعضای این جنس ساپروفیت بوده و در محیط‌های آبی و خاکی یافت می‌شوند. اما گونه‌هایی از آن بیمارگر گیاهان (*P. syringae*، *P. cichorii*، *P. viridiflava* و *P. corrugate*)، قارچ‌های چتری (*P. tolaasii* و *P. agaraci*)،انسان و جانوران (*P. aeruginosa*) هستند(۴۲). در جنس *Pseudomonas*، دو دودمان (Lineage) یا دو گروه درون جنسی قابل تشخیص هستند که *P. aeruginosa lineage* (شامل *P. aeruginosa*، *P. oleovorans* و *P. stutzeri*) و *P. fluorescens lineage* است (جدول۱). بر اساس تجزیه‌وتحلیل‌های تبارزایی توالی‌های 16SrRNA، *gyrB*، *rpoB* و *rpoD* تاکنون شش گروه مختلف در *P. fluorescens lineage* شناسایی شده‌اند که شامل گروه های *P. fluorescens*، *P. syringae*، *P. lutea*، *P. putida*، *P. anguilliseptica* و *P. straminea*هستند. گروه *P. fluorescens*، بسیار متنوع و شامل بیش از ۵۰ گونه مختلف است که خود به نه زیرگروه تقسیم می‌شوند (۳۷، ۱۷). استرین‌های موجود در این گروه بر اساس تجزیه‌وتحلیل توالی چند لوکوسی (MLSA: Multilocus Sequence Analysis)، سه Subclade را تشکیل می دهند. در پژوهشی توالی کامل ژنوم استرین F113 *P. fluorescens* با بخشی یا ژنوم کامل ۴۹ استرین دیگر در جنس *Pseudomonas* مقایسه و با رسم درخت تبارزایی نشان دادند که حداقل پنج

زیرگروه مجزا در گروه *P. fluorescens* وجود دارد و استرین‌های این گونه با استرین‌هایی از گونه‌های دیگر پراکنده بودند (۴۵). همچنین در پژوهش دیگری زیرگروه‌های بیشتری برای این گروه مشخص شده است (۱۷). این مطالعات از این جهت حائز اهمیت هستند که نشان می‌دهند گونه‌های موجود در گروه *P. fluorescens* کمپلکس بوده و نیاز به بازبینی مجدد دارند.

جدول ۱- موقعیت تاکسونومیکی تعدادی از استرین‌های بیوکنترلی *Pseudomonas* که به‌خوبی مطالعه شده اند.

Mulet *et al.* (2010)			Loper *et al*. 2009	Redondo-Nieto *et al*. 2013	Biocontrol strains	Antibiotics[2]	Insect toxins
P. flourescens Lineage	*P. flourescens* group[1]	*P. chlororaphis* subgroup	SubcladeI	Subgroup IV	*P. protegens* Pf-5	DAPG, PLT, PRN, RHI HCN	Fit D
					P. protegens CHA0	DAPG, PLT, PRN, HCN	FitD
					Pseudomonas sp. CMR12a	PHZ, HCN	FitD
					Pseudomonas sp. CRM5c	PHZ, PLT, PRN, HCN	FitD
					P. flourescens NZ17	DAPG, HCN	
					P. chlororaphis PLC1391	PHZ, HCN	FitD
					P. chlororaphis 30-84	PHZ, PRN, HCN	FitD
					P. chlororaphis 06	PHZ, PRN, HCN	FitD
					P. chlororaphis GP72	PHZ, PRN	FitD
					P. chlororaphis PA23	PHZ, PRN	
		P. koreensis subgroup	Subclade 2	Subgroup II	*P. flourescens* Pf0-1	HCN	
		P. corrugata subgroup		Subgroup I	*P. flourescens* F113	DAPG, HCN	
					P. brassicacearum Q8r1-96	DAPG, HCN	
					P. flourescens Q2-87	DAPG, HCN	
					P. corrugata		
		P. flourescens subgroup	Subclade 3	Subgroup V	*P. flourescens* SBW25		
					P. flourescens A506		
					P. flourescens SS101		
					Pseudomonas BG33R		
					P. flourescens 2-79	PCA	
					P. synxantha	PCA	
					P. orientalis	PCA	

		P. aridus	PCA
		P. cerealis	PCA
		P. tolaasii	
	P. syringae group	*P. syringae* 742RS	
		P. syringae ESC-10	
		P. syringae ESC-11	
		P. syringae	
		P. viridiflava	
		P. cichorii	
	P. lutea group		
	P. putida group	*P. putida* 267	
		P. putida RW10S1	PRO
		P. putida PCL 1445	
	P. *anguilliseptica* group	*P. entomophila*	HCN
	P. straminea group		
P. aeruginosa lineage	*P. aeruginosa* group	*P. aeruginosa* M18	PHZ, PLT, HCN
		P. aeruginosa 7NSK2	PYO,HCN
		P. aeruginosa PNA1	PHZ,HCN
		P. aeruginosa PaBP35	PHZ,HCN
	P. oleovorans group		
	P. stutzeri group		

۱- در گروه *P. fluorescens* فقط زیرگروه‌های دارای استرین‌های بیوکنترل شناخته شده، نشان داده شده است

2- DAPG (di-acetyphloroglucinol), PLT(pyoluteorin), PRN(pyrrolnitrin), RHI(rhizoxins), HCN(hydrogen cyanide), PHZ(phenazines: PCA and PCN), PCA (phenazines-1-carboxylate), PRO(promysalin), PYO(pyocyanin).

۲- شناسایی استرین‌های جدید *Pseudomonas*

استفاده از تجزیه‌وتحلیل توالی چند لوکوسی (MLSA)، یک ابزار عمومی برای شناسایی و تشخیص تاکسونومی گونه‌های سودوموناس است. این مطالعات یک روش سریع طبقه‌بندی بر اساس ویژگی های ژنوتیپی است که در آن توالی‌های چندین ژن کدکننده پروتئین بررسی می شوند. ژن 16S rRNA برای توصیف یک استرین در جنس سودوموناس قابل استفاده است، اما تفکیک‌پذیری آن در سطوح درون جنسی پایین است (۳۷). سایر ژن‌های خانه‌دار (housekeeping genes) از جمله *gyrB*، *rpoB*، *rpoD*، *atpD*، *carA* و *recA* نیز برای این منظور

استفاده می‌شوند. بیشترین میزان چند شکلی (Polymorphism) را ژن *rpoD* و سپس *gyrB* و *rpoB* نشان می‌دهند (۳۷). برای تشخیص درست یک استرین متعلق به جنس سودوموناس، اولین مرحله توالی‌یابی ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی است که تعلق استرین به جنس سودوموناس را مشخص می‌کند. گام دوم، توالی‌یابی ژن‌های *rpoD* و *gyrB* است که تعلق استرین به گروه یا زیر گروه خاص تعیین می‌شود. در صورت نیاز به تفکیک بیشتر از ژن *rpoB* استفاده می‌شود. توالی ژن‌های چندگانه استرین‌های متعلق به گونه‌های سودوموناس در پایگاه داده PseudoMLSA وجود دارد و به‌طور آزاد قابل‌دسترسی است (۸).

۳- شناسایی، پیش‌بینی ساختار و تجزیه‌وتحلیل عملکردی متابولیت‌های ثانویه جنس *Pseudomonas*

شناسایی، پیش‌بینی ساختار و تجزیه‌وتحلیل عملکرد متابولیت‌های ثانویه در گونه‌های سودوموناس به کمک روش داده‌کاوی ژنوم (genome mining) انجام می‌شود (۹). افزایش توالی‌یابی ژنوم منجر به افزایش تشخیص خوشه‌های ژنی ارفن (clusters orphan gene) شده است که تولیدکننده پروتئین‌های ناشناخته هستند. این خوشه‌ها شامل ژن‌های سنتتاز پپتیدهای غیر ریبوزومی (non-ribosomal peptide synthase: NRPS) و ژن‌های سنتتاز پلی‌کتید (polyketide synthase: PKS) است که هر دو تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه از جمله لیپوپپتیدها و آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند (۱۹). داده‌کاوی ژنوم برای محصولات جدید NRPS کدشده با توسعه روش genomisotopic که ترکیبی از تجزیه و تحلیل توالی ژنومی و isotope guided fraction است، سرعت بیشتری یافت و همین امر منجر به افزایش جداسازی محصولات طبیعی از خوشه‌های ژنی بی‌خانمان شد. در این رویکرد، موجود یا استرین باکتریایی موردبررسی، در شرایط آزمایشگاهی خاصی کشت می‌شود. شرایط آزمایشگاهی طوری تنظیم شده است که ژن‌های سنتزکننده متابولیت‌های ثانویه در موجود بیان شوند. از ایزوتوپ‌های خاصی (^{15}N

یا $^{15}N^{13}C$) برای ردیابی متابولیت‌های مورد نظر استفاده می‌شود. اولین بار برای تشخیص خوشه‌های ژنی بی‌خانمان در ژنوم *P. protegens* Pf-5 استفاده شد و منجر به تشخیص ارفامید A، یکی از اعضاء زیر کلاس لیپوپپتیدهای تولیدشده توسط گونه‌های *Pseudomonas* شد (۱۹).

۳-۱- ابزار شناسایی، پیش‌بینی و تجزیه و تحلیل‌های محصولات طبیعی

با اعمال روش‌های مختلف توالی‌یابی ژنوم از جمله متاژنوم (metagenome)، منابع زیادی از ژنوم در پایگاه‌های ژنومی آنلاین (GOLD: genomes online database) ثبت شده‌اند (۳۹). دسترسی به توالی‌های کامل منجر به افزایش کشف خوشه‌های ژنی NRPS و PKS شد. این خوشه‌های ژنی با افزایش ابزارهای بیوانفورماتیکی بیشتر از پیش کشف شدند. در کنار استفاده از NRPS-PKS، ابزارهای دیگری برای شناسایی پلی‌کتید یا پپتیدهای غیر ریبوزومی یا هر دوی آن‌ها نیز به‌کار می‌رود (۴). از جمله مهم‌ترین آن‌ها کلاست اسکن (ClustScan) است که به کلاست اسکنر (Clust Scanner) نیز شناخته می‌شود. این نرم‌افزار به‌طور نیمه‌خودکار و سریع توالی‌های DNA را بررسی و نقاطی از آن را که رمزکننده آنزیم‌های بیوسنتیک هستند را شناسایی می‌کند (۴۹). نرم افزار NP.Searcher سریع ژنوم میکروبی را پایش کرده و خوشه‌های ژنی مختلف که وظیفه آن‌ها تولید متابولیت‌های ثانویه است را تشخیص می‌دهد. به کمک نرم افزار SMILES می‌توان شکل‌های دو و سه بعدی از ساختار فضایی متابولیت‌های ثانویه رسم کرد (۲۷). در یک بررسی در سال ۲۰۰۹، با ارائه روش in silico توانستند علاوه بر PKS و NRPS، ساختارهای سه بعدی متابولیت‌های ثانویه را نیز ترسیم کنند (۶). همچنین برنامه antiSMASH به‌صورت آنلاین به کاربران خدمات رایگان ارائه می‌کند (۳۴) و قادر است با شناسایی خوشه‌های ژنی تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه در ژنوم باکتری و قارچ، آگاهی در مورد ساختار سه‌بعدی فرضی این ترکیبات و حتی نحوه

عملکرد آن‌ها ارائه دهد. همچنین پایگاه ژنی DoBISCUIT شامل خوشه‌های ژنی تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه است درحالی که ClusterMine360 منبعی از خوشه‌های ژنی PKS و NRPS است که تعداد آن‌ها تابه‌حال در حدود ۲۰۰ خوشه ژنی است (۲۱، ۱۳). در CLusterMine360 امکان ثبت داده‌ها توسط کاربران وجود دارد و حتی در مورد صحت داده‌های وارد شده قادر به قضاوت است.

۴-بینش جدید در نقش تکاملی و عملکردی آنتی بیوتیک‌های اصلی تولیدشده توسط عوامل کنترل زیستی سودوموناس

۴-۱- فنازین‌ها: فنازین‌ها، رنگدانه‌های سه حلقه‌ای نیتروژن‌داری هستند که توسط گونه‌های مختلف سودوموناس تولید می شوند. ازجمله مهم‌ترین فنازین‌هایی تولیدشده توسط عوامل بیوکنترلی، فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید (phenazine 1-carboxylic acid: PCA)، فنازین ۱-کربوکسامید (phenazine-1-carboxamide: PCN)، ۲-هیدروکسی فنازین (hydroxyphenazine) و ۲-هیدروکسی فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید است. درون جنس سودوموناس، گونه *P. aeruginosa*، زیر گروه *P. chlororaphis* و زیر گروه *P. fluorescens* بیشترین میزان ترکیبات فنازین را تولید می‌کنند. گونه‌های *P. synxantha*، *P. orientalis*، *P. aridus*، *P. cerealis* و *P. flourescens* 2-79 که همگی درون زیر گروه *P. fluorescens* قرار می‌گیرند، قادر به تولید PCA هستند (۴۰). بیشتر استرین های کلینیکی *P. aeruginosa*، تولید رنگدانه پیوسیانین(PYO) (رنگدانه فنازینی آبی) می‌کنند و همین‌طور این گونه چندین ترکیبات فنازینی از جمله PCA و PCN نیز تولید می‌کند. ژن‌های اصلی تولیدکننده فنازین به صورت خوشه ای در کنار یکدیگر بوده و به شدت محافظت‌شده هستند. هفت جایگاه ژنی با نام‌های phzABCDEFG مسئول سنتز اولین مشتقات فنازین در سودوموناس‌ها هستند. این ژن‌ها که به‌نوعی اپران هستند در ژنوم *P. aeruginosa* دارای دو کپی هستند. تنوع فنازین‌ها در نتیجه تغییراتی

است که در PCA توسط آنزیم‌های به‌خصوصی ایجاد می‌شود. این آنزیم‌ها از ژن‌های موجود در نزدیکی اپران phz رمز می‌شوند. در تمامی استرین‌های مطالعه شده، تولید فنازین توسط سیستم حد نصاب احساس (quorum sensing: QS) تنظیم می‌شود. در دو گونه *P. chlororaphis* و *P. fluorescens*، اپران فنازین متصل به ژن‌های تنظیمی *phzI* و *phzR* است، در حالی که در *P. aeruginosa*، تولید فنازین توسط فرآیندهای پیچیده‌تر و سیستم‌های حد نصاب احساس از نوع LasI/LasR، Rh1I/Rh1R و همچنین سیستم سیگنال دهی سومی بر اساس تولید *Pseudomonas* quinolone signal ایجاد می‌شود (۱۵). فنازین‌ها به خاطر توانایی آن‌ها در گرفتن و دادن الکترون‌ها در واکنش اکسیداسیون و احیاء نقش دارند و بر حسب واکنش می‌توانند احیا یا اکسید شوند. به‌عبارت‌دیگر ترکیباتی از قبیل PYO، PCA و PCN توانایی انتقال دو الکترون و دو پروتون را دارا هستند که بر حسب شرایط فیزیولوژیکی فرق می‌کند (۵۴). ساختارهای مختلف فنازین وابسته به ویژگی‌های متفاوت فیزیکی، شیمیایی و اکسیداسیون و احیاء است که در نهایت فعالیت بیولوژیکی آن‌ها را تعیین می‌کند (۳۳). فنازین‌ها دارای نقش‌های عملکردی بسیار متفاوتی هستند. یکی از نقش‌های مهم این ترکیبات، پتانسیل بالای آنتی بیوتیکی آن‌ها در حین رقابت است. خاصیت آنتاگونیستی آنها به تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS: reactive oxygen species) که منجر به تنش اکسیداسیون در سایر بافت‌ها و موجودات می‌شوند، مرتبط است (۳۳). خاصیت سمی این ترکیبات باعث بازدارندگی یا کشتن سایر موجودات می‌شود و از این‌رو در حین رقابت از مزیت‌های خوبی برخوردار هستند. پژوهش‌های گذشته حاکی از نقش بسزای PCA در تولید و تشکیل بیوفیلم است زیرا به‌راحتی قادر به جذب یون‌های آهن در محیط پیرامون است (۵۵).

۴-۲- دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG): تولید DAPG توسط گونه‌های مختلف سودوموناس کمک شایانی به

خاصیت بیوکنترلی این باکتری‌ها می‌کند. تولید DAPG محدود به گروه *P. fluorescens* است که در جدول یک زیر گروه‌ها و مهم‌ترین استرین‌های تولیدکننده این ترکیب بیان شده است. خوشه ژنی مسئول تولید DAPG در حدود هشت کیلوباز است و در بین باکتری‌های سازنده این ترکیب محافظت‌شده است. این خوشه متشکل از نه ژن درگیر در بیوسنتز (*phlACB*، *phlD*)، ترشح (*phlEI*)، تخریب (*phlG*)، و تنظیم *phlH* و *phlF* است. ژن *phlD* یک سنتتاز پلی‌کتید نوع سه (III) بوده و وظیفه آن بیوسنتز مونواستیل‌فلوروگلوسینول (MAPG) است. این خوشه‌های ژنی تنها در باکتری های سودوموناس وجود دارند و در سایر باکتری‌ها مشاهده نشده است (۵۱). علاوه بر نقش این ترکیب در آنتی‌بیوز، DAPG در ارسال پیام نیز نقش دارد. سطوح DAPG، در فازهای مختلف سلولی بسیار متفاوت است، به‌طوریکه در برخی فازها غلظت آن بسیار بالا و در برخی زمان‌ها میزان آن به‌شدت پائین می‌آید. همچنین DAPG یک خودالقاگر است و با تأثیر بر فعالیت *PhlF* فعالیت خود را افزایش می دهد (۵۱). ترکیب DAPG قادر به پیام دهی بین گونه‌های باکتریایی بوده و فعالیت تحریک‌کنندگی رشد گیاه توسط باکتری *Azospirillum brasilense* را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، DAPG، با مسدود کردن جذب آمینواسید به‌وسیله ریشه گیاهان، منجر به افزایش تراوش آمینواسید از ریشه گیاهان می‌شود. همچنین DAPG منجر به تحریک مقاومت القایی سیستمیک (ISR) در گیاه آرابیدوپسیس علیه *Peronospora parasitica* و *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* شده است (۳۸).

۴-۳- پیولوتئورین (Pyoluteorin):

پیولوتئورین آنتی‌بیوتیک طبیعی است که از مسیر سنتتاز پپتید غیر ریبوزومی هیبرید (NRPS) و سنتتاز پلی‌کتید (PKS) بیوسنتز می‌شود و شامل یک حلقه resorcinol متصل به یک بخش پیرول دی کلرینیت است. پیش‌ساز این ماده، ترکیب L-proline و سه مونومر مالونیل-CoA است (۱۸). برخی از استرین‌های سودوموناس قادر به تولید این ترکیب

هستند (جدول۱). خوشه ژنی این ترکیب متشکل از ۱۷ ژن شامل نه ژن ساختاری است که ۳۰ کیلوباز طول دارد. تا به امروز، ژن‌های تولیدکننده این ترکیب در سایر جنس‌ها شناسایی نشده‌اند. آگاهی چندانی از منشاء تکاملی این ترکیب در دسترس نیست. به نظر می‌رسد این خوشه ژنی تنها در دودمان‌های جنس سودوموناس که دارای ژن *phlD* (بخشی از اپران DAPG) هستند، وجود دارد. غلظت‌های نانومولار فلوروگلوسینول حاصل از ژن *phlD* برای تولید پیولوتئورین نیاز است. درحالی‌که غلظت های بیشتر آن برای تولید این ترکیب بازدارنده است. ترکیب DAPG به‌طور مستقیم تاثیری بر تولید این ترکیب ندارد (۴۴).

۴-۴- پیرول نیترین: این ترکیب برای اولین بار از باکتری *Pseudomonas pyrrocinia* با نام جدید (*Burkholderia pyrrocinia*) گزارش شد (۵). این ترکیب در حقیقت یک فنیل پیرول کلرینیت است که در چهار مرحله و از پیش‌ساز ال-تریپتوفان تولید می‌شود. در بین سودوموناس‌ها، پیرول نیترین از باکتری هایی ترشح می‌شود که دارای رابطه تبارزایی نزدیکی نسبت به یکدیگر هستند (جدول ۱). علاوه بر سودوموناده‌ای فلورسنت، این ترکیب از *Myxococcus fulvus*، *Burkholderia cepacia* و *Serratia* spp. گزارش شده است. چهار ژن سنتز کننده این ترکیب (*prnABCD*) در بین استرین‌های *P. fluorescens* به شدت حفاظت‌شده است. استرین‌های جنس سودوموناس ممکن است این اپران را از طریق انتقال افقی ژن اخذ کرده باشند (۳۸). این ترکیب در بازار به‌عنوان ترکیبات ضدقارچی مصرف زیادی دارد. نحوه تاثیر آن اختلال در زنجیره‌های تنفس قارچی است. این ترکیب همچنین برای تولید بسیاری از مواد قارچ‌کش در حوزه علم کشاورزی استفاده می‌شود. از جمله مشهورترین این ترکیبات فنیل پیرول‌ها هستند. دو ترکیب با خاصیت ماندگاری بالا عبارتند از Fludioxonil و Fenpliconil که جزء قارچ‌کش‌های تماسی بوده و برای کنترل قارچ‌های بذر

زاد از قبیل فوزاریوم، رایزوکتونیا و آلترناریا استفاده می‌شود (۳۶).

۴-۵- سیانید هیدروژن: طیف وسیعی از استرین‌های بیوکنترل سودوموناس، سیانید هیدروژن را تولید می‌کنند. این ترکیب بسیار سمی بوده و از فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز C، آخرین جزء در زنجیره تنفسی در بسیاری از موجودات زنده جلوگیری می‌کند. هیدروژن سیانید توسط *P. aeruginosa*، زیرگروه‌های I، II، III و IV باکتری *P. fluorescens* (جدول ۱) و *P. entomophila* تولید می شود(۱، ۴۷). سیانید هیدروژن توسط خوشه سه ژنی *hcnABC* از پیش ماده متابولیکی گلیسین تولید می‌شود. آهن، نقش تحریک‌کنندگی بالایی در تولید سیانید هیدروژن ایفا می‌کند. همچنین تولید این ترکیب توسط ژن *gacA* کنترل می‌شود. این ترکیب قادر به کشتن آفت حشره‌ای *Odontoterms obesus* است. همچنین همراه با DAPG، قادر به کنترل *Clavibacter michiganensia* subsp. *michiganensis* عامل بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی است. علاوه بر این، برخی از استرین‌های سودوموناس قادر به جمع‌آوری و مصرف مقادیر بالای سیانید هیدروژن هستند. این باکتری‌ها از سیانید هیدروژن به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند. آنزیم سیانید اکسیداز قادر است این ترکیب را شکسته و آن را به مواد بی‌خطر دیگر تبدیل کند. مطالعات تبارزایی گذشته نشان داده است که در گونه‌های سودوموناس‌های مرتبط با ریشه گیاهان، ژن‌های بیوسنتتیک سیانید هیدروژن اجدادی یا نیایی هستند (۳۸).

۵- دستاوردهای جدید آنتی‌بیوزی به کمک داده‌کاوی ژنوم

علاوه بر تولید فنازین، دی استیل فلوروگلوسینول، پیرول نیترین، پیولوتئورین و سیانید هیدروژن، استفاده از روش‌های داده‌کاوی ژنوم منجر به کشف محصولات جدیدی در گونه‌های سودوموناس شده که دارای خاصیت آنتی بیوزی هستند که شامل:

۵-۱- رایزوکسین: رایزوکسین‌ها در حقیقت ماکرولیدها (macrolides) یا آنتی بیوتیک‌های پلی‌کتیدی هستند که اساساً

توسط باکتری درون‌زیست *Burkholderia rhizoxinica* تولید می‌شود. در سودوموناس‌ها این آنتی‌بیوتیک در گونه *P. chlororaphis* استرین MA342 برای فعالیت ضدقارچی علیه عامل بیماری لکه قهوه‌ای توری بذرزاد جو (*Drechslera teres*) ضروری است (۲۸). همچنین سمیت این ترکیب در آزمایشگاه علیه قارچ‌های *Botrytis cinerea* و *Phytophthora ramorum* مشخص شده است. روش‌های داده کاوی ژنوم منجر به کشف خوشه ژنی رمزکننده این آنتی بیوتیک در باکتری *P. protegens* Pf-5 شده است (۳۰). باکتری *P. chlororaphis* استرین MA342 با نام تجاری Cedomon به‌عنوان عامل بیوکنترل به فروش می‌رسد (۳۲).

۵-۲- پرومیسالین (Promysalin): یک آنتی‌بیوتیک دوقطبی بوده که متشکل از دو جزء سالیسیلیک اسید و 2,8-dihydroxymyristamide است و با یک بخش 2-pyrroline-5-carboxyl به یکدیگر متصل شده‌اند. این ترکیب توسط استرین بیوکنترل *P. putida* RW10S1، جداسازی‌شده از ریزوسفر برنج تولید می شود. در شرایط آزمایشگاه، این ترکیب از رشد باکتری‌های گرم منفی *P. aeruginosa* PA14، *P. syringae* pv. *glycinea*، *P. savastanoi*، *P. stutzeri* و باکتری‌های گرم مثبت از طریق تخریب غشاء سلولی و نشت محتویات داخل سلول به بیرون جلوگیری می‌کند (۲۶، ۲۲).

۵-۳- ال فورانومایسین (L-Furanomycin): این ترکیب یک آمینواسید non-proteinogenic و واکنش‌پذیر با ninhydrin، با خاصیت ضدمیکروبی انتخابی است که از باکتری *P. fluorescence* SBW25 جداسازی شده است. مصرف خالص این ترکیب در شرایط آزمایشگاه علیه باکتری‌های بیمارگر گیاهی *P. syringae* pv. *tomato*، *Dickeya dadantii* و *Erwinia amylovora* بازدارندگی انتخابی نشان داد (۵۰).

۵-۴- توکسین‌های حشره‌ای: مقایسه ژنوم اعضای گروه سودوموناس نشان داد که در آن‌ها جایگاه‌های ژنومیکی برای رمز

کردن فاکتورهای بیماری‌زایی وجود دارد که دارای ویژگی‌های حشره‌کشی می‌باشند (۴۱). در پژوهشی با تزریق باکتری *P. entomophila* به مگس سرکه، پاسخ ایمنی موضعی و سیستمیک در حشره شروع شد و تخریب شدید سلول‌های روده‌ای رخ داد. این باکتری درون زیست برای هر دو سن لاروی و بالغ مگس سرکه و برخی دیگر از حشرات کشنده است. چون باکتری *P. entomophila* برای گیاهان غیر بیماری‌زا است، گزینه بسیار خوبی برای پژوهش‌های بیوکنترلی است (۵۳). برخی از اعضای گروه *P. fluorescens* دارای فعالیت حشره‌کشی هستند. خاصیت سمیت برخی از اعضای این گروه به خوشه‌های ژنی رمزکننده توکسین‌های Mcf (makes caterpillars floppy) یا Tc (toxin complexes)، نسبت داده می‌شود. اگر دو باکتری *P. protegens* CHA0 و *P. protegens* Pf-5 به درون فضای هموسلی حشرات تزریق شوند، در درون بدن میزبان حشره تکثیر یافته و لارو *Galleria mellonella* و *Manduca sexta* را می کشند. همچنین مشخص شده است که خوشه ژنی *fitD* (fluorescens insect toxin) که در ارتباط نزدیک با *mcf* است، مسئول تولید این توکسین است. جایگاه ژنومیکی *fit* در باکتری *P. chlororaphis* O6 و ۳۰-۸۴ نیز وجود دارد و در ژنوم گونه‌های دیگر سودوموناس نیز کشف شده است (۳۱).

پژوهش‌ها نشان می‌دهد سودوموناس‌های تولیدکننده توکسین Fit روی لارو بیشتر آفات حشره‌ای محصولات کشاورزی از جمله *Spodoptera littoralis*، *Heliothis virescens* و *Plutella xylostella* فعالیت قوی حشره‌کشی خوراکی دارند (۳۸).

۶- بیوسورفکتانت: یک عامل جدید در حوزه بیوکنترل

استرین‌های بیوکنترلی جنس سودوموناس اغلب دو نوع بیوسورفکتانت رامنولیپیدها و لیپوپپتیدهای حلقوی (CLPs: cyclic lipopeptides) تولید می‌کنند. ترکیبات CLPها شامل یک حلقه لاکتونی الیگوپپتید حلقوی جفت شده به یک دنباله اسید چرب است. بر اساس خصوصیات

ساختاری، CLPها در هشت گروه مختلف طبقه‌بندی شده‌اند که عبارتند از آمفیسین، ویسکوزین، پوتیسولوین، ارفامید، تولاسین، سیرینگومایسین، سیرینگوپپتین و انتولیسین می‌باشند. بیوسورفکتانت‌ها، قادر به تخریب غشاءهای میکروبی و در نهایت مرگ باکتری‌ها، قارچ‌ها، شبه قارچ‌ها و ویروس‌ها هستند و نقش اصلی در حرکت دسته جمعی، تشکیل بیوفیلم، سازگاری با محیط، دسترسی به مواد غذایی و کلونیزه کردن ریشه ایفا می‌کنند (۱۴).

۶-۱- رامنولیپیدها: دسته ای از گلیکولیپیدها هستند که به‌طور ویژه توسط *P. aeruginosa* تولید می‌شوند. تولید رامنولیپید در باکتری‌های *P. chlororaphis*، *P. putida*، *P. fluorescens* و *Pseudomonas* sp. GRP شناسایی شده است. این ترکیب علیه میسلیوم قارچ‌های *Pythium myriotylum* و *Botrytis cinerea* موثر است (۵۲). در بازارهای تجاری این مواد توجهات زیادی را به سمت خود معطوف کرده است.

۶-۲-گروه ویسکوزین: این گروه شامل CLPهایی هستند که دارای نه آمینواسید بوده و اغلب در N ترمینال متصل به ۳-هیدروکسی دکانوئیک اسید هستند (3-HDA) اعضای این گروه شامل ویسکوزین، ویسکوزینامید، مستولید (massetolide)، سودودزمین (pseudodesmin) و WLIP (White Line-Inducing Principle) هستند. این CLPها در بسیاری از گروه‌های آنتاگونیستی *Pseudomonas* جداشده از مناطق مختلف کشف شده‌اند. این CLPs برای اولین بار از باکتری *Pseudomonas reactans* و سپس از سایر استرین‌ها از جمله *P. putida*، استرینی از ریزوسفر ریشه برنج، استرین *بیوکنترلی P. reactans* NCPPB1311 و از دیگر استرین‌ها گزارش شد (۲۹). از بین تمام ترکیباتی که جز CLPها هستند، گروه ویسکوزین دارای بیشترین تنوع بوده و پتانسیل بسیار خوبی برای بیوکنترل باکتری‌ها، قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها دارد (۹).

۶-۳- گروه پوتیسولوین (Putisolvin): ویژگی منحصربه‌فرد این ترکیبات وجود بخش پپتیدی ۱۲ آمینواسید به همراه یک دنباله لیپیدی در ساختار آن‌ها است.

تاکنون در *P. putida* PCL 1445 و *P. putida* 267 به ترتیب جداشده از محیط آلوده به مواد هیدروکربنی و ریزوسفر فلفل سیاه، پوتیسولوین نوع یک و دو گزارش شده است (۲۴). این ترکیبات در بیوکنترل نقش بسزایی دارند، اما هنوز مطالعات انجام‌شده جامع نیست. به نظر می‌رسد که توانایی بیوکنترلی این باکتری ها مستقل از تولید CLP است. با این وجود در شرایط آزمایشگاه، ترکیب به‌طور نسبی خالص پوتیسولوین، زئوسپورهای *Phythophthora capsici* را ظرف مدت ۹۰ ثانیه از بین می‌برد (۲۴).

۶-۳- گروه آمفیسین: این گروه شامل CLPهایی حاوی یک پپتید حلقوی ۱۱ آمینواسید است که در ناحیه N ترمینال دارای بتا هیدروکسی دکانیول است (۴۸). اعضای این گروه شامل آمفیسین (amphisin)، تنسین (tensin)، لوکیسین (lokisin)، آرتروفکتین (arthrofactin) و فولیپپتین A (pholipeptin A) هستند. از نظر بیوکنترلی آمفیسین، لوکیسین و تنسین بیشتر از سایر ترکیبات مورد توجه پژوهشگران هستند. تنسین تولیدشده توسط *P. fluorescens* strain 96.578 قادر به کنترل قارچ *Rhizoctonia solani* است. به‌طوری‌که شعاع رشدی پرگنه آن را به‌شدت کاهش می‌دهد (۳۸).

۶-۴- گروه تولاسین (Tolaasin): ترکیب و طول زنجیره پپتیدی اعضای این گروه بین ۱۹ تا ۲۵ آمینو اسید است که همگی به یک دنباله لیپیدی ۳-هیدروکسی اکتانوئیک اسید (3-HDA) ختم می‌شود. اعضای این گروه عبارت از تولاسین‌ها، فوزکوپپتین‌ها (fuscopeptins)، کورپپتین ها، سیرینگوپپتین‌ها، اسکلروسین و سسیلین (sessilin) است (۴۳، ۴۶). از بین این CLPها، تولاسین، سسیلین و اسکلروسین دارای خاصیت بیوکنترلی خوبی علیه بیمارگرهای گیاهی هستند (۲۹). تولاسین نوع I، تولیدشده توسط *P. tolaasii* NCPPB2192، دارای خاصیت ضدقارچی علیه قارچ‌های *Agaricus bisporus*، *Lentinus edodes* و *Pleurotus* spp. است. به‌طور جالبی، تولاسین خالص نوعI، از رشد باکتری‌های گرم منفی از جمله *Erwinia*، *Agrobacterium*، *Xanthomonas*،

Escherichia و *Pseudomonas* جلوگیری می‌کند. توانایی باکتری *Pseudomonas* sp. DF41 در ممانعت از پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کانولا وابسته به تولید اسکلروسین است. با تیمار آسکوسپورها و اسکلروت قارچ با اسکلروسین، از تندش هر دو نوع سلول جلوگیری شد. اسکلروسین همچنین دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه گونه‌های *Bacillus* است. سسیلین قادر به کنترل *R. solani*، عامل بوته میری لوبیا است (۳۸).

۶-۵- ارفامیدها: ارفامیدها که از باکتری *P. protogens* Pf-5 جداسازی شده‌اند، جزء اولین ترکیبات شناسایی‌شده در ژنوم سودوموناس‌ها بودند. این ترکیبات شامل ۱۰ آمینواسید است که شباهت بالایی به CLPهای گروه ویزکوزین دارد. ترکیبات CLP موجود در این گروه شامل ارفامید A-C است. از جمله ویژگی‌های این ترکیب وجود یک دنباله ۳- هیدروکسی دودکانوئیک یا تترادکانوئیک اسید متصل به ناحیهN ترمینال آمینواسیدها است. از بین این سه CLP، ارفامید A غالب‌تر از سایر ترکیبات است و قادر است با نابودی زئوسپورهای شبه قارچی، نقش بسزایی در کنترل بیماری ایفا کند (۱۹).

۶-۶- انتولیزین و زانتولیزین: ترکیب انتولیزین برای اولین بار از *P. entomophila* جداسازی شد. این ترکیب شامل بخش پپتیدی ۱۴ آمینواسید و سیکلینگ خاصی که حلقه لاکتون در بین ناحیه C ترمینال گروه کربوکسیلیک و دهمین آمینواسید به‌جای یکی از اولین آمینواسیدها تشکیل می‌شود. این ترکیب برای حرکت دسته جمعی و فعالیت همولایتیک باکتری مذکور بسیار ضروری است، اما در فعالیت بیوکنترلی این استرین سودوموناس نقشی ندارد. زانتولیزین نیز شامل چهار ترکیب لیپوپپتید است که بسته به نوع ترکیب به آن‌ها A، B، C و D اطلاق می‌شود (۲۷). همچنین *P. putida* BW11M1 جداشده از ریزوسفر موز، قادر به تولید زانتولیزین است. این ترکیب علاوه بر نقش‌هایی که در حرکت باکتری (swarming)، تشکیل بیوفیلم، فعالیت ضدقارچی و سمیت علیه باکتری‌های گرم مثبت دارند، یک ویژگی متمایز آن خاصیت آنتاگونیستی علیه باکتری‌های گرم

منفی از جمله تعدادی از زانتوموناس‌ها است. علاوه بر این برخی از آسکومیست ها نظیر *B. cinerea* و *R. solani* نیز به ترکیب حساس هستند (۳۸).

۶-۷- تنامایسین: استرین *Pseudomonas* SH-C52 برای اولین بار از هلند و از خاک‌های بازدارنده رشد *R. solani* جداسازی شد (۳۵). تجزیه و تحلیل *in silico* توالی ژنوم این باکتری منجر به توصیف یک لیپوپپتید کلرینیت شده نه آمینواسیدی، با عنوان تنامایسین شد. جهش در ژن‌های بیوسنتزکننده این ترکیب و کاربرد خالص آن نشان داد که این ترکیب از خاصیت بیوکنترلی بسیار خوبی برخوردار است و قادر به کنترل *Sclerotium rolfsii* و *R. solani* بود (۳۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به مثال‌های بیان‌شده می‌توان گفت که سودوموناس‌های بیماری‌زا و مفید هردو در گروه‌های مشابه تاکسونومیکی قرار می‌گیرند و بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در هردو نوع این باکتری‌ها تولید می‌شود. باکتری *P. fluorescens* NZ17 بیمارگر قارچ‌های کلاهک‌دار از نظر تولید دی استیل‌فلوروگلوسینول بسیار شبیه به استرین *P. protegens* Pf-5 و *P. flourescens* CHA0 است. باکتری مفید *Pseudomonas* CMR12a قادر به تولید سسیلین بوده که جزء CLPهای دخیل در بیوکنترل است. این ترکیب بسیار شبیه به تولاسینی است که به‌عنوان یک فاکتور بیماریزا توسط باکتری *P. tolaasii* و *P. fluoresens* NZ17 تولید می‌شود. باکتری مفید *Pseudomonas* sp. DF41 قادر به تولید اسکلروزین است. این ترکیب در ارتباط با کورپپتین تولیدشده توسط بیمارگر *P. corrugata* است. استرین‌های بیوکنترلی سودوموناس در گروه‌های *P. fluorescens*، *P. putida* و *P. aeruginosa* هستند. اگرچه گروه *P. fluorescens* از نظر تولید متابولیت‌های آنتی‌بیوتیکی بیشتر از سایر گروه‌ها مورد توجه است ولی از لحاظ تاکسونومیکی بسیار متنوع است و طبقه‌بندی آن‌ها باید مورد بازبینی قرار گیرد. برخی از آنتی بیوتیک‌های یافت شده در استرین‌های

بیوکنترلی *Pseudomonas* از قبیل فنازین ها، DAPG و HCNها توسط گروه‌های تاکسونومیکی خاص تولید می‌شوند و ظاهراً اجدادی هستند. این ترکیبات علاوه بر عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی در باکتری، به‌عنوان فاکتورهای کلیدی در عرصه بیوکنترل عمل می‌کنند. فنازین‌ها در تشکیل بیوفیلم دخیل هستند و می‌توانند به عنوان جایگزین پذیرنده الکترون در زنجیره انتقال الکترون ایفای نقش کنند. ترکیب DAPG، دارای نقش انتقال‌دهنده پیام بوده و در برهمکنش‌های گیاه - باکتری نقش بسزایی ایفا می‌کند و HCN نیز می‌تواند به عنوان منبع نیتروژن برای برخی از باکتری‌ها مفید باشد. سایر آنتی بیوتیک‌ها از قبیل پیرول‌نیترین با انتقال افقی به باکتری‌ها منتقل شده است.

توالی‌یابی ژنوم نشان داد که بسیاری از خوشه‌های ژنی ناشناخته که سنتز کننده ترکیبات بیوکنترلی هستند در استرین‌های مختلف سودوموناس حضور دارند. کاربرد ابزارهای جدید بیوانفورماتیکی و رویکردهای جدید توالی‌یابی منجر به کشف روز افزون طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه در بسیاری از استرین ها شده است. تولید بیوسورفکتانت‌ها، به خصوص لیپوپپتیدهای حلقوی در بین استرین‌های *P. fluoresens* بسیار رایج است. برخی از استرین‌های بیوکنترلی سودوموناس تولیدکننده ترکیبات توکسینی ضد حشره‌ای هستند و قطعاً در آینده یافته های جدید از آن‌ها موجب شگفتی پژوهشگران خواهد شد.

فهرست منابع References

۱. اسماعیلی م. و معرفت ع. (۱۳۹۴). شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور استان قزوین و بررسی اثر بازدارندگی آن‌ها بر *Rhizobium vitis* عامل گال ریشه و طوقه انگور. مجله علمی کشاورزی گیاه‌پزشکی ۳۸(۱):۷۹-۹۰.

۲. شهریاری ف.، خداکرمیان غ. و حیدری ا. (۱۳۸۴). تعیین بیووارهای استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* جداشده از مناطق مهم سیب‌زمینی‌کاری ایران و بررسی توانایی تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور

در آن‌ها. مجله علوم کشاورزی ایران ۳۶(۴): ۸۵۷-۸۴۹.

۳. شهریاری ف.، خداکرمیان غ. و حیدری ا. (۱۳۸۳). ارزیابی توان آنتاگونیستی بیووارهای باکتری *Pseudomonas fluorescens* جداشده از ریزوسفر سیب‌زمینی جهت کنترل *Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۸(۴): ۲۰۱-۲۱۱.

4. Ansari M.Z., Yadav G., Gokhale R.S. and Mohanty D. (2004). NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. Nucleic Acids Research Journal. 32: 405-413.

5. Arima K., Fukuta A., Imanaka H., Kousaka M. and Tamura G. (1964). Pyrrolnitrin new antibiotic substance produced by *Pseudomonas*. Agricaltural Biological Chemistry Tokyo. 28: 575-576.

6. Bachmann B.O. and Ravel J. (2009). Methods for *in silico* prediction of microbial polyketide and non-ribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. Methods Enzymology. 458: 181-217.

7. Bargabus R.L., Zidack N.K., Sherwood J.E. and Jacobsen B.J. (2003). Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. Molecular Plant Microbe Interactions. 16(12): 1145 - 1153.

8. Bennasar A., Mulet M., Lalucat J. and Garcia-Valdes E. (2010). PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. BMC Microbiology. 10:118.

9. de Bruijn I., de Kock M.J.D., Yang M., de Waard P., van Beek T.A. and Raaijmakers J.M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. Molecular Microbiology. 63: 417-428.

10. Chen F., Gao Y., Chen X., Yu Z. and Li X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. International Journal of Molecular Sciences. 14(9): 17477-17500.

11. Chin-A-Woeng T.F.C., Bloemberg G.V. and Lugtenberg B.J.J. (2003). Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New Phytologist. 157: 503-523.

12. Cook R.J. and Weller D.M. (1988). Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology. 26: 379-407.

13. Conway K.R. and Boddy C.N. (2013). ClusterMine 360: a database of microbial PKS/NRPS biosynthesis. Nucleic Acids Research Journal. 41: 402-407.

14. D'aes J., De Maeyer K., Pauwelyn E. and Hofte M. (2010). Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. Environmental Microbiology Reports. 2: 359-372.

15. De Maeyer K., D'aes J., Hua G.K.H., Perneel M., Vanhaecke L., Noppe H. and Höfte M. (2011). N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. Microbiology Journal. 157: 459-472.

16. De Vleesschauwer D., Cornelis P. and Hofte M. (2006). Redox-active pyocyanin secreted

by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice. Molecular Plant Microbe Interaction. 19:1406-1419.

17. Garrido-Sanz D., Meier-Kolthoff J.P., Göker M., Martin M., Rivilla R. and Redondo-Nieto M. (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas flourescens* complex. PLOS ONE. 11(2): e0150183. Doi: 10.1371/ Journal.pone.0150183.

18. Gross H. and Loper J.E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Natural Product Reports. 26: 1408-1446.

19. Gross H., Stockwell V.O., Henkels M.D., Nowak-Thompson B., Loper J.E. and Gerwick W.H. (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. Chemistry and Biology Journal. 14: 53-63.

20. Haas D. and Defago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Natural Review Microbiology. 3: 307–319.

21. Ichikawa N., Sasagawa M., Yamamoto M., Komaki H., Yoshida Y., Yamazaki S. and Fujita N. (2013). DOBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Research. 41: 408-1414.

22. Kaduskar R.D., Scala G.D., Al Jabri Z.J.H., Arioli S., Musso L., Oggioni M.R., Dallavalle S. and Mora D. (2017). Promysalin is a salicylate-containing antimicrobial with a cell-membrane-disrupting mechanism of action on Gram-positive bacteria. Scientific Report Journal. 7:8861.

23. Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I. and Lugtenberg B. (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environmental Microbiology Journal. 7: 1809-1817.

24. Kruijt M., Tran H. and Raaijmakers J.M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting Pseudomonas putida 267. Journal of Applied Microbiology. 107: 546-556.

25. Li M.H.T., Ung P.M.U., Zajkowski J., Garneau-Tsodikova S. and Sherman D.H. (2009). Automated genome mining for natural products. BMC Bioinformatics. 10.

26. Li W., Estrada-de los Santos P., Matthijs S., Xie G.L., Busson R., Cornelis P., Rozenski J. and De Mot R. (2011). Promysalin, a salicylate-containing *Pseudomonas putida* antibiotic, promotes surface colonization and selectively targets other Pseudomonas. Chemistry and Biology. 18: 1320-1330.

27. Li W., Rokni-Zadeh H., De Vleeschouwer M., Ghequire M.G.K., Sinnaeve D., Xie G.L., Rozenski J., Madder A., Martins J.C. and De Mot R. (2013). The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. PLoS One. 8, e62946.

28. Ligon J.M., Hill D.S., Hammer P.E., Torkewitz N.R., Hofmann D., Kempf H.J. and Van Pee K.H. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. Pest Management Science. 56: 688-695.

29. Lo Cantore P., Lazzaroni S., Coraiola M., Dalla Serra M., Cafarchia C., Evidente A. and Iacobellis N.S. (2006). Biological characterization of white line-inducing principle (WLIP) produced by *Pseudomonas reactans* NCPPB1311. Molecular Plant Microbe Interaction. 19: 1113-1120.

30. Loper J.E., Henkels M.D., Shaffer B.T., Valeriote F.A. and Gross H. (2008). Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. Applied and Environmental Microbiology. 74: 3085-3093.

31. Loper J.E., Hassan K.A., Mavrodi D.V., Davis E.W., Lim C.K., Shaffer B.T., Elbourne L.D.H., Stockwell V.O., Hartney S.L. and Breakwell K. (2012). Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. PLoS Genet. 8, e1002784.

32. Mark G.L., Morrissey J.P., Higgins P. and O'Gara F. (2006). Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. FEMS Microbiology Ecology. 56: 167-177.

33. Mavrodi D.V., Blankenfeldt W. and Thomashow L.S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. Annual Review of Phytopathology. 44: 417-445.

34. Medema M.H., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M.A., Weber T., Takano E. and Breitling R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic Acids Research. 39:339-346.

35. Mendes R., Kruijt M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Schneider J.H.M., Piceno Y.M., DeSantis T.Z., Andersen G.L. and Bakker P.A.H.M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science. 332: 1097-1100.

36. Mozes-Koch R., Gover O., Tanne E., Peretz Y., Maori E., Chernin L. and Sela I. (2012). Expression of an entire bacterial operon in plants. Plant Physiology. 158: 1883-1892.

37. Mulet M., Lalucat J. and Garcia-Valdes E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environmental Microbiology. 12: 1513-1530.

38. Olorunleke F.E., Kieu N.P. and Höfte M. (2015). Recent advances in *Pseudomonas* biocontrol. In: Murillo J, Vinatzer BA, Jackson RW, Arnold D L (Ed.) Bacteria-plant interactions: advanced research and future trends. Caister Academic Press, U.K. Pages, 167-198.

39. Pagani I., Liolios K., Jansson J., Chen I.M.A., Smirnova T., Nosrat B., Markowitz V.M. and Kyrpides N.C. (2012). The Genomes Online Database (GOLD) v.4: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. Nucleic Acids Research. 40: D571-D579.

40. Parejko J.A., Mavrodi D.V., Mavrodi O.V., Weller D.M. and Thomashow L.S. (2013). Taxonomy and distribution of phenazine-producing *Pseudomonas* spp. in the dryland agroecosystem of the inland Pacific Northwest, United States. Applied and Environmental Microbiology. 79: 3887-3891.

41. Paulsen I.T., Press C.M., Ravel J., Kobayashi D.Y., Myers G.S.A., Mavrodi D.V., DeBoy R.T., Seshadri R., Ren Q.H. and Madupu R. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-S. Natural Biotechnology Journal. 23: 873-878.

42. Peix A., Ramirez-Bahena M.H. and Velazquez E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infection, Genetics and Evolution. 9: 1132-1147.

43. Raaijmakers J.M., de Bruijn I. and de Kock M.J.D. (2006). Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. Molecular

Plant Microbe Interaction. 19: 699-710.

44. Ramette A., Frapolli M., Fischer-Le Saux M., Gruffaz C., Meyer J.M., Defago G., Sutra L. and Moenne Loccoz Y. (2011). *Pseudomonas protegens sp nov*. wide-spread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. Systematic and Applied Microbiology. 34: 180-188.

45. Redondo-Nieto M., Barret M., Morrissey J., Germaine K., Martinez-Granero F., Barahona E., Navazo A., Sanchez-Contreras M., Moynihan J.A. and Muriel C. (2013). Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. BMC Genomics. 14: 54.

46. Roongsawang N., Washio K. and Morikawa M. (2011). Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. International Journal of Molecular Sciences. 12:141-172.

47. Ryall B., Mitchell H., Mossialos D. and Williams H.D. (2009). Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*. Letters in Applied Microbiology. 49: 131-135.

48. Sorensen D., Nielsen T.H., Christophersen C., Sorensen J. and Gajhede M. (2001). Cyclic lipoundeca-peptide amphisin from *Pseudomonas* sp. strain DSS73. Acta Crystallographica. 7: 1123-1124.

49. Starcevic A., Zucko J., Simunkovic J., Long P.F., Cullum J. and Hranueli D. (2008). Clust Scan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures. Nucleic Acids Research. 36: 6882-6892.

50. Trippe K., McPhail K., Armstrong D., Azevedo M. and Banowetz G. (2013). *Pseudomonas fluorescens* SBW25 produces furanomycin, a non-proteinogenic amino acid with selective antimicrobial properties. BMC Microbiology. 13: 111.

51. Troppens D.M., Moynihan J.A., Barret M., O'Gara F. and Morrissey J. (2013). Genetics and evolution of 2,4-diacetylphloroglucinon synthesis in *Pseudomonas fluorescens*. In: De Bruijn FJ (Ed.) Molecular microbial ecology of the rhizosphere, Wiley Blackwell, Singapore. 593-605.

52. Varnier A.L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S. and Pugin A. (2009). Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. Plant Cell Environmental. 32: 178-193.

53. Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F. and Lemaitre B. (2005). *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102: 11414-11419.

54. Wang Y. and Newman D.K. (2008). Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydr) oxides and molecular oxygen. Environmental Science and Technology. 42: 2380-2386.

55. Wang Y., Wilks J.C., Danhorn T., Ramos I., Croal L. and Newman D.K. (2011). Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. Journal of Bacteriology. 193: 3606-3617.

Recent developments in Pseudomonas biocontrol mechanisms

Fatemeh Shahryari[1]*, Mona Esmaeili [2]

1 Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2 Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

shahryari@znu.ac.ir

Abstract:

Fluorescent pseudomonads are an effective source of biological control that have high adaptive power and able to produce a wonderful source of secondary metabolites. Antibiotics such as phenazines, diacetylphloroglucinol, and hydrogen cyanide are produced by certain taxonomic groups of the genus Pseudomonas and appear to be ancestral. These compounds often play a physiological role in producing strain, independent of their antibiotic activity. Other secondary metabolites including rhizoxins, promysalin, L- Furanomycin, insect toxins, and biosurfactants (rhamnolipids and cyclic lipopeptides) are only found in certain *Pseudomonas* isolates. Recent advances in genome sequencing have led to the discovery of a large number of cryptic biosynthetic gene clusters. Genome mining has led to the discovery of many antimicrobial compounds that have the biocontrol role in the plant-pathogenic fungi, oomycetes and bacteria. In addition, some biocontrol strains of Pseudomonas can produce anti-insect compounds. The ability of *Pseudomonas* biocontrol agents continues to surprise. This paper tries to investigate the latest studies about biocontrol mechanisms of fluorescent *pseudomonads*.

Keywords: Antibiosis, Biosurfactant, Cyclic Lipopeptide, Housekeeping Genes, Phenazine.