فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
۱۳۹۵- ۸ : ۸۵-۱۰۶

مطالعه‌ی پتانسیل استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* در مهار زیستی *Rhizoctonia solani* و کلونیزاسیون ریزوسفر لوبیا

نسیم جلودارنژادیان*، حدیث شهبازی
گروه گیاه‌پزشکی، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی مهرگان، محلات، ایران

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های لوبیا، بیماری بوته‌میری ناشی از *Rhizoctonia solani* است که کنترل‌شیمیایی آن به‌دلیل خاکزاد بودن و دامنه‌ی میزبانی بالا ناکاراست. کاربرد عوامل بیوکنترل باکتریایی از راهکارهای امیدبخش در کنترل این بیماری است. در این تحقیق توانایی آنتاگونیستی هشت جدایه‌ی *Pseudomonas fluorescens* علیه *R. solani* بررسی و جدایه‌ی P13 که در کنترل بیمارگر موفق‌تر بود جهت مطالعه‌ی الگوی کلونیزاسیون ریشه‌ی لوبیا مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش توانایی بیوکنترل جدایه‌های‌باکتری در مقابل جدایه‌ی *R. solani* با قدرت بیماریزایی بالاتر که از مزارع لوبیای‌آلوده در شهرستان خمین جمع‌آوری شده بود، توسط آزمون‌های کشت‌متقابل، چهارنقطه‌ای، تولید ترکیبات‌فرار و غیرفرار بررسی و جدایه‌یP13 با بیشترین تاثیر در بازدارندگی از رشد بیمارگر برای ادامه‌ی پژوهش انتخاب شد. پس از آن جمعیت باکتری در ۱۵،۳۰،۴۵ روز پس از کاشت در اندوریزوسفر و اکتوریزوسفر ریشه‌ی لوبیا اندازه‌گیری و تاثیر آن در میزان شدت بیماریزایی بیمارگر ،ارتفاع بوته، وزن‌خشک و تر گیاه اندازه‌گیری شد. پس از کاهش جمعیت اولیه‌ی باکتری در ریزوسفر در روز پانزدهم، جمعیت باکتری در روزهای سی‌ام و چهل‌وپنجم در اندوریزوسفردر حال کاهش و در اکتوریزوسفر رشد صعودی داشت. در روز چهل‌وپنجم در اندوریزوسفر و اکتوریزوسفر به‌ترتیب در خاک سالم $۳/۲\times۱۰^{۵}$ و $۱/۱\times۱۰^{۷}$ (cfu/g fresh root) و در خاک آلوده به بیمارگر، $۲/۸\times۱۰^{۵}$ و $۱/۰۶\times۱۰^{۶}$ (cfu/g fresh root) سلول باکتری در وزن‌تر ریشه بازیابی شد. جمعیت بالایی از جدایه‌ی P13 در روز چهل و پنجم از اندوریزوسفر و اکتوریزوسفر لوبیا باعث کاهش معنی‌دار شدت بیماری و افزایش پارامترهای رشدی گیاه شد. نتایج نشان داد جدایه‌یP13 *P. fluorescens* می‌تواند به‌صورت معنی دار، از رشد *R. solani* جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی : بوته‌میری، کنترل‌بیولوژیک، اندوریزوسفر، اکتوریزوسفر

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: karoon_kh@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۲، تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۰۳/۱۵

مقدمه

از بیماری‌های لوبیا می‌توان به پوسیدگی فوزاریومی ریشه‌ی لوبیا ناشی از *Fusarium solani*، زردی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum*، پوسیدگی ریشه‌ی لوبیا ناشی از *Rhizoctonia solani*، سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا ناشی از *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ، ویروس موزاییک معمولی لوبیا، ویروس موزاییک زردی لوبیا و ویروس موزاییک خیار اشاره نمود (Behdad, 2006). در این میان پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* یکی از شایع‌ترین و مهمترین بیماری‌های آن است. براساس گزارش‌های موجود، جنس *Rhizoctonia*، ۳ درصد کل بیماری‌های گیاهی دنیا را تشکیل می‌دهد (Behdad, 2006). این بیمارگر می‌تواند خسارات جدی به محصولات کشاورزی از قبیل پنبه، لوبیا و سیب زمینی وارد کند که موجب پوسیدگی ریشه، طوقه و سوختگی در اندام‌های هوایی گیاه می‌شود (Azad Disfani *et al*., 2011). بررسی‌های فراوانی مبنی بر کاربرد باکتری‌های مفید در کاهش شدت بیماری‌های قارچی در لوبیا انجام شده است. باکتری‌های تحریک‌کننده‌ی رشدگیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (PGPR) به گروهی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که بر اساس ترشحات ریشه‌ی گیاهان با آن‌ها سازگارمی‌شوند و به این ترتیب از سایر باکتری‌ها که نمی‌توانند کلونیزاسیون مؤثری را بر ریشه داشته باشند جدا می‌شوند (Bakker *et al*., 2007). در سال‌های اخیر موضوع کنترل‌بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های فلورسنت از قبیل *Pseudomonas fluorescens* در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه‌ی گیاهان زراعی مطرح شده است. میکروارگانیسم-هایی که در ناحیه‌ی ریزوسفر (rhizospher) گیاهان زندگی می‌کنند گزینه‌ی مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیک هستند زیرا ریزوسفر اولین پل دفاعی ریشه علیه بیمارگرهای خاکزی است (Weller, 1988). باکتری‌های کلونیزه‌کننده‌ی ریشه نقش برجسته‌ای در ناحیه‌ی ریزوسفر دارند (Schippers,1987). باکتری *P. fluorescens* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های کنترل بیولوژیک خاک است که با تولید آنتی بیوتیک‌های مختلف مانند آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG) 2,4 D- acetyl phloroglosinol (Keel *et al*, 1992) ، (Shanahan *et al*., 1992)، فنازین (Phenasin) (Brisbane *et al*., 1987)، (Mazzola *et al*., 1992) ، پیرول‌نیترین (Pyrrolnitrin) (Chancey *et a*l, 2002) ، پایولوتئورین (Pyoluteorin) (Howell & Stipanovic, 1980) و ترکیباتی مانند سیانید هیدروژن (HCN)، سبب حفاظت گیاهان در برابر عوامل مختلف قارچی‌می‌شود. *P. fluorescens* با تولید سیدروفور(Siderophore) اقدام به جذب آهن می‌کنند(Pierson *et al*, 1995). سیدروفورها ترکیبات خارج سلولی با وزن مولکولی پایین هستند که در شرایط دسترسی کمبود آهن توسط باکتری‌ها تولید شده و می‌توانند آهن را به

فرم Fe^{+3} کلاته کرده و به داخل سلول باکتری منتقل کنند(Neilands & Nakamura,1991). در دهه‌های اخیر مطالعات زیادی بر روی مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک صورت گرفته که نشان می‌دهد یکی از اصلی‌ترین دلایل موفقیت برخی عوامل بیوکنترل، کلونیزاسیون موثر و بلند مدت ریشه است که منجر به افزایش رقابت ریزوسفری شده و اثرات بیوکنترلی عوامل کنترل بیولوژیک اعم از اثرات مستقیم آنها بر روی بیمارگر و یا اثرات غیرمستقیم آن‌ها تحت تاثیر تبادل سیگنال میان ریشه و عامل بیوکنترل است که منجر به القای مقاومت و تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌گردد (Weller, 1988). در پژوهشی ۲۵۷ جدایه‌ی باکتری از ریزوسفر و ریشه‌ی کلزای سالم و آلوده به قارچ *R. solani* در استان‌های گلستان، مازندران، گیلان و تهران جدا شد. نتایج نشان داد ۶۰ جدایه، دارای خاصیت آنتاگونیستی می‌باشد. در نهایت از میان جدایه‌ها، جدایه‌ی P3 بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی و هم‌چنین در شرایط گلخانه نشان داد. (Sarani *et al*. 2007) در پژوهشی دیگر به منظور بررسی تاثیر تعدادی از جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست علیه *R. solani* روی برنج در استان گیلان، ۸ جدایه از باکتری *P. fluorescens* که در مقابل قارچ مذکور خاصیت آنتاگونیستی داشت را مورد استفاده قرار دادند. نتایج نشان داد که کلیه جدایه‌ها در ممانعت از جوانه‌زنی و لیزشدن اسکلروت‌های قارچ موثر هستند (Kazemzadeh *et al*., 2012). به‌دلیل استفاده‌ی بیش از حد سموم و مشکلات عدیده‌ای که برای خاک و انسان ایجاد می‌کنند و بی نتیجه ماندن مبارزات شیمیایی علیه قارچ‌های خاکزی و پلی‌فاژ مانند *R. solani*، از این‌رو لزوم کاربرد روش‌های کنترل بیولوژیک به‌چشم می‌خورد. هدف از این تحقیق جداسازی مؤثرترین جدایه‌ی باکتری *Pseudomonas fluorescens* و بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی و نیز مطالعه‌ی توانایی بیوکنترل مؤثرترین جدایه علیه *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بود، همچنین بررسی تأثیراین جدایه از لحاظ فعالیت تحریک کنندگی رشد گیاهی و شاخص‌های رشدی از جمله وزن تر، وزن خشک، ارتفاع بوته و میزان کلونیزاسیون اکتوریزوسفر و اندوریزوسفر ریشه‌ی لوبیا توسط این باکتری بیوکنترل در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم مورد استفاده

تهیه‌ی جدایه‌ی Pseudomonas fluorescens

هشت جدایه‌ی *P. fluorescens* به نام‌های UTPf104, UTPf105, UTPf106, UTPf110, UTPf120, UTPf125, P13, UTPf127 از کلکسیون کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران دریافت و در آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه‌ی بیمارگر

در بازدیدهایی که در تابستان ۱۳۹۴ از مزارع آلوده‌ی لوبیا در شهرستان خمین به عمل آمد، با مشاهده‌ی علائم بیماری در هر مزرعه نمونه‌برداری صورت گرفت. به منظور جداسازی بیمارگر، از قسمت‌های مختلف بوته‌ی آلوده‌ی لوبیا از جمله ساقه، طوقه، ریشه‌ی اصلی و ریشه‌های فرعی که علائم شانکر و پوسیدگی را داشتند، نمونه‌هایی به طول ۶-۴ میلی‌متر از محل بین بافت سالم و آلوده تهیه گردید. سپس این قطعات گیاهی به مدت ۱/۵ تا ۲ دقیقه در محلول هیپوکلریدسدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سپس در سه مرحله به ترتیب به مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه با آب مقطر سترون شسته شدند. برای خالص سازی *R. solani* از روش نوک ریسه یا کشت انتهایی ریسه (Hyphal tip) در محیط کشت (WA) آب-آگار استفاده شد و سپس با انتقال به محیط کشت PDA (سیب‌زمینی، دکستروز، آگار)، کشت‌خالص آن تهیه شد(Nelson *et al*.,1983; Booth, 1971)، آزمون اثبات بیماریزایی جدایه‌های قارچی انجام شد. تقریباً دو هفته پس از جوانه‌زنی بذرهای لوبیای رقم محلی خمین، پژمردگی تدریجی اندام‌های هوایی کاملاً قابل مشاهده بود، همچنین چهار هفته پس از مایه‌زنی، میکرواسکلروت‌ها در ناحیه‌ی طوقه مشاهده شدند، در روز سی‌ام بر اساس جدول شدت بیماریزایی(جدول ۱) با استفاده از رتبه‌بندی (شاخص ۵ درجه) (Assunção *et al*., 2011)، شدت بیمایزایی جدایه‌ها ارزیابی شده و جدایه‌ای که شدت بیماریزایی بیشتری داشت برای ادامه‌ی آزمایشات انتخاب شد. در پایان، بوته‌ی آلوده به آزمایشگاه منتقل و بافت‌های آلوده مجددا روی محیط PDA کشت و سپس خالص‌سازی شدند. شناسایی عامل بیماری بر اساس کلید پارمتر و وایتنی انجام شد(Parmeter, 1970) .

آزمون‌های بیوکنترل برای بررسی کارایی جدایه‌های Pseudomonas fluorescens علیه R. solani در شرایط آزمایشگاهی

آزمون کشت چهار نقطه‌ای : به این منظور ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر(cfu/ml) (این غلظت با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۲۰ نانومتر به‌دست آمد)، در چهار نقطه به فاصله ۳ سانتی‌متر از مرکز تشتک پتری حاوی PDA (Potato Dextrose Agar) + NA (Nutrient Agar) (به نسبت ۱:۱) کشت داده شد. سپس قرصی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر حاوی کشت ۵ روزه‌ی قارچ در مرکز آن قرار داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۳ روز در دمای C ۲۶ در داخل انکوباتور نگهداری شدند. سپس فاصله بین پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری و باکتری‌های آنتاگونیست اندازه-گیری شده و میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی تعیین شد(Expert & Digat, 1995). آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرار انجام شد.

آزمون کشت متقابل: ابتدا هر کدام از تشتک‌های پتری ۹ سانتیمتری با ماژیک به دو قسمت مساوی تقسیم شد. سپس درون هر تشتک پتری به میزان ۱۵ میلی لیتر محیط کشت PDA + NA (به نسبت ۱:۱) ریخته شد. پس از جامد شدن محیط ابتدا در یک نیمه از تشتک پتری، به کمک سمپلر ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) از باکتری رشدیافته به مدت یک روز در محیط کشت مایع نوترینت براث(NB) ، پخش شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت در فاصله‌ی یک سانتیمتری از لبه نیمه دیگر تشتک پتری قرصی از محیط کشت قارچ جوان قرار داده شد. در تشتک شاهد به جای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۵ روز در دمای C ۲۶ داخل انکوباتور قرار داده شدند. پس از اینکه در تیمار شاهد قارچ به خط وسط تشتک پتری رسید، میزان رشد شعاعی جدایه‌ی قارچ اندازه‌گیری و سپس مساحت پرگنه‌ی قارچی محاسبه شد. (Dennis & Webster, 1971). در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد(Etebarian, 2005).

$$n = (a - b) / a \times 100$$

n : درصد بازدارندگی رشد عامل بیماری، a : مساحت پرگنه‌ی عامل بیماری در تشتک پتری شاهد، b : مساحت پرگنه‌ی عامل بیماری در تشتک پتری بیمار

بررسی اثر ضد قارچی ترکیبات فرار باکتری علیه بیمارگر

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml)، روی محیط کشت آگار مغذی پخش گردید. هم‌زمان یک قرص میسلیومی از کشت ۵ روزه‌ی قارچ روی محیط کشت PDA کشت داده شد. آنگاه دو تشتک پتری حاوی باکتری و قارچ در زیر هود و شرایط سترون به‌طوری که تشتک حاوی قارچ در بالا قرار گرفت، مقابل هم قرار گرفته و به‌وسیله‌ی نوار پارافیلم کاملا مسدود شد. در تیمار شاهد از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون باکتری استفاده شد. تشتک‌ها به مدت ۷ روز در دمای C ۲۶ در داخل انکوباتور نگهداری شدند. درصد کاهش رشد کلونی بیمارگر نسبت به شاهد که فاقد باکتری بود به عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضدمیکروبی ترکیبات فرار مورد استفاده قرار گرفت (Fiddaman & Rossall, 1993).

۱۰۰× (قطر پرگنه در پتری شاهد/ قطر پرگنه در پتری تیمار)− ۱ = درصد کاهش رشد پرگنه نسبت به شاهد

بررسی اثر ضد قارچی ترکیبات غیر فرار باکتری علیه بیمارگر

این آزمون به روش کراس و لوپر انجام شد (Kraus & Loper, 1990). ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) روی محیطPDA+NA (به نسبت ۱:۱) پخش شد و پس از ۷۲ ساعت رشد در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، توسط میله شیشه‌ای باکتری‌ها از سطح محیط جدا شدند و با استفاده از پنبه

سترون سطح محیط کشت به‌خوبی پاک شدند. تشتک‌های پتری به‌صورت وارونه به مدت ۳۰ دقیقه در معرض کلروفرم زیر جریان هوای هود قرار گرفتند. سپس به مدت ۱/۵ ساعت در پتری‌ها به‌صورت نیمه باز قرار گرفت تا کلروفرم کاملا تبخیر شود. آنگاه یک دیسک ۰/۵ سانتی‌متری از کشت ۵ روزه‌ی قارچ در مرکز پتری قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای C ۲۶ به مدت ۷ روز نگهداری و اندازه‌گیری زمانی انجام شد که پرگنه‌ی قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد به انتهای پتری رسید. تیمار شاهد فاقد باکتری و کلروفرم در نظر گرفته شد. درصد کاهش رشد کلونی بیمارگر نسبت به شاهد، که فاقد باکتری بود، به عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضد قارچی ترکیبات غیر فرار باکتری مورد استفاده قرار گرفت این درصد بر اساس رابطه زیر تعیین شد:

۱۰۰× (قطر کلونی در پرگنه شاهد/ قطر پرگنه در پتری تیمار)− ۱ = درصد کاهش رشد پرگنه نسبت به شاهد

تهیه‌ی جهش یافته‌ی باکتری

به منظور بررسی توانایی کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری‌های بیوکنترل، جهش یافته‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل ($۱۰۰\mu\ mL^{-}$) در محیط کشت KB تهیه شد. کلونی‌های به‌دست آمده، دوباره روی محیط KB^{+} بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شد.جدایه‌هایی که فنوتیپ مشابه با جدایه‌ی وحشی و سرعت رشد بالاتر روی این محیط‌کشت را داشتند برای آزمایشات گلخانه-ای انتخاب شدند.

تهیه‌ی زادمایه‌ی قارچ روی دانه گندم

ابتدا بذور گندم به مدت ۲۰ ساعت در آب خیسانده شد.پس از آن ۱۶۰ گرم از بذر خیسانده شده، در ارلن یک لیتری ریخته و در دو روز متوالی در دمای C ۱۲۱ و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت یک ساعت درون اتوکلاو سترون شد. سپس محتویات فلاسک‌ها به‌صورت یک لایه بذر به پتری انتقال یافته و با *R. solani* مایه‌زنی شده و به مدت سه هفته در دمای C ۲۶ در انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت زمان پتری‌ها با در باز به مدت ۵ ساعت در محیط سترون زیر هود لامینار درمعرض جریان هوای فن و حرارت چراغ مطالعه خشک شدند. سپس محتویات درون پتری‌ها آسیاب شده و پودر حاصل در کاغذ صافی سترون در محیط خشک و به دور از رطوبت نگهداری شدند (Weller & Cook,1983).

مطالعات گلخانه‌ای

تیمار بذر لوبیا

مطالعات گلخانه‌ای از بذور رقم محلی خمین که به این بیمارگر حساس است، استفاده شد. ابتدا بذوردرون هیپوکلرید سدیم ۵٪ به مدت ۳ دقیقه غوطه‌ور و سپس در سه مرحله به ترتیب به

مدت ۱، ۲ و ۳ دقیقه با آب مقطرسترون شسته شدند. به‌منظور جوانه زنی بذرها، ۱۰ گرم بذر روی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار گرفت. تشتک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای C ۲۶ نگهداری شدند. بذور جوانه زده با سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) جدایه‌ی *Pseudomonas fluorescens* P13 مقاوم به آنتی‌بیوتیک، مایه‌زنی شدند. مخلوطی ازخاک مزرعه و شن و خاک برگ به نسبت وزنی ۱:۱:۱ تهیه شده و در سه روز متوالی به مدت یک ساعت در دمای C ۱۲۱ اتوکلاو شده و در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۲۰ سانتی‌متر ریخته شد. زادمایه‌ی *R. solani* به نسبت ۲ درصد وزنی به‌طور یکنواخت با خاک مخلوط و داخل گلدان‌های پلاستیکی با دهانه‌ی ۲۰ سانتی‌متری ریخته شد. در نیمی از گلدان‌ها از خاک سترون بدون زادمایه‌ی قارچ به‌عنوان شاهد استفاده شد. پنج بذر مایه‌زنی شده‌ی لوبیا در سطح خاک قرار گرفت و به‌وسیله‌ی دو سانتی‌متر خاک سترون پوشانده شد. گلدان‌های شاهد حاوی بذوری بودند که با سوسپانسیون باکتری مایه‌زنی نشده بودند. گیاهان در دمای C ۲۴ با ۱۶ ساعت روشنایی در گلخانه نگهداری شدند.گیاهان در دمای C ۲۴ با ۱۶ ساعت روشنایی در گلخانه نگهداری شدند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار برای هر تیمار انجام شد (Maghsoudlou *et al*., 2007) .

بررسی کلونیزاسیون اکتوریزوسفر لوبیا توسط باکتری‌های بیوکنترل

به منظور اندازه‌گیری جمعیت *Pseudomonas fluorescens* در اندوریزوسفر ریشه‌ی لوبیا، گیاهچه‌ها در ۴۵،۳۰،۱۵ روز پس از کاشت جمع‌آوری شدند. یک گرم از ریشه و خاک فراریشه‌ای به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم- ۰/۱ مولار سترون منتقل و به کمک دستگاه ورتکس مخلوط شد. در ادامه سری رقت تهیه و رقت‌های مناسب روی محیط‌کشت انتخابی KB^{+} کشت داده شد. برای هر رقت ۴ تکرار(هر تکرار شامل ۵ گیاه) در نظر گرفته شد. پتری ها در دمای C ۲۷ به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از آن کلونی‌ها شمارش شده و تعداد باکتری در گرم وزن تر ریشه برآورد شد (Mazzolla *et al*., 1992).

بررسی کلونیزاسیون اندوریزوسفر لوبیا توسط باکتری‌های بیوکنترل

به‌منظور اندازه‌گیری جمعیت *Pseudomonas fluorescens* در اندوریزوسفر ریشه‌ی لوبیا، گیاهچه‌ها در ۴۵،۳۰،۱۵ روز پس از کاشت جمع‌آوری شدند. گیاهچه‌های لوبیا از گلدان خارج شده و ریشه‌ی آنها پس از شستشو با آب جاری، به مدت ۵ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و یک دقیقه با هیپوکلرید سدیم ۱٪ و توئین ۲۰ (۰/۰۱٪) غوطه‌ور شده و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شد. یک گرم از ریشه‌ها در هاون چینی سترون حاوی یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم۰/۱مولار به مدت یک دقیقه خرد شدند. از این سوسپانسیون سری رقت تهیه و

رقت‌های مناسب در محیط کشت انتخابی کشت داده شد، پس از آن کلونی‌ها شمارش شده و تعداد باکتری در گرم وزن تر ریشه برآورد شد(Compant *et al.*, 2005).

ارزیابی شدت بیماری

مطالعات اندازه‌گیری بر اساس درجه بندی (Indexing) شدت بیماری از مقیاس ۰ تا ۴ (شاخص ۵ درجه) به شرح زیراست (جدول۱)، (Assunção *et al.*, 2011) :

جدول۱- ارزیابی شدت بیماری، مقیاس بین ۰ تا ۴ است.

Table 1. Evaluation of pathogenicity, score scale ranging from 0 to 4

Degree	Symptom
0	No symptoms
1	Hypocotyl with small lesions
2	Hypocotyl with big lesions, without constriction
3	Completely constricted hypocotyl, showing damping-off
4	Non-germinated seeds and/or non-emerged seedlings

بررسی اثرات متقابل بیمارگر و جدایه‌های باکتری در فاکتورهای رشدی گیاه

به منظور بررسی اثرات متقابل بیمارگر و جدایه‌های باکتری در فاکتورهای رشدی گیاه مانند وزن خشک و تر، ارتفاع گیاه اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد. اندازه‌گیری در سه دوره‌ی زمانی ۱۵،۳۰،۴۵ روز پس از کاشت انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

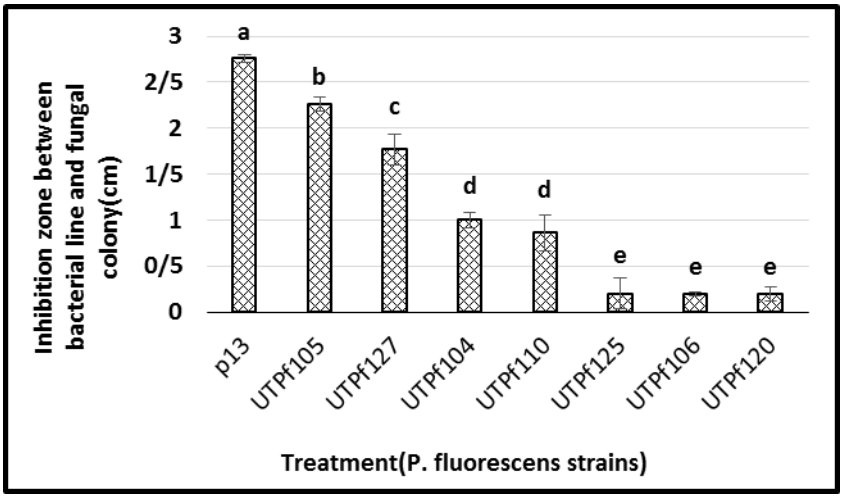
تمامی آزمایشات در چهار تکرار انجام شد. مطالعات گلخانه‌ای بر اساس طرح فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمون‌های بیوکنترل درون تشتک پتری و آزمون‌های بیماریزایی در آزمایشگاه در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد، همچنین برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح ۱ و ۵ درصد استفاده شد. کلیه‌ی تجزیه‌های آماری و محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه۹/۲ انجام شد و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام شد.

نتایج

آزمون‌های بیوکنترل برای بررسی کارایی جدایه‌های P. fluorescens علیه R. solani در شرایط آزمایشگاهی

دراین پژوهش توانایی بیوکنترلی هشت جدایه‌ی *P. fluorescens* به نام‌های UTPf104, UTPf105, UTPf106, UTPf110, UTPf120, UTPf125, P13, UTPf127 در برابر عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی لوبیا *R. solani* درون تشتک پتری در آزمون کشت

چهارنقطه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ی P13 با ایجاد هاله‌ی بازدارنده به اندازه‌ی ۲/۸ سانتی‌متر بیشترین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه‌ی بیمارگر را سبب شد. در پایان این آزمون چهار جدایه‌ی UTPf127, UTPf105, UTPf110 و P13 که قدرت بیوکنترل بالاتری داشتند برای ادامه آزمایشات انتخاب شدند (شکل۱).



شکل ۱- تاثیرجدایه‌های آنتاگونیست بر بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* در آزمون کشت چهار نقطه‌ای. هر ستون در نمودار میانگین ۴ تکرار است. اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، در آزمون LSD ($P \leq 0.01$) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند.

Figure 1. Effect of antagonist strains on growth inhibition of *R. solani*. Each column is the average of 4 replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly ($P<0.01$) according to LSD test.

آزمون‌های بیوکنترل کشت متقابل، ترکیبات فرار و ترکیبات غیر فرار انجام شد. در آزمون‌های کشت متقابل و ترکیبات فرار، بین تیمارها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ مشاهده شد. در آزمون ترکیبات غیرفرار بین تیمارها تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ مشاهده شد (جدول ۱). در آزمون کشت متقابل جدایه‌ی P13 با ۶۱/۵٪ بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را نسبت به ۳ تیمار دیگر نشان داده و بنابراین در کنترل *R. Solani* موفق‌تر بود. در آزمون ترکیبات فرار جدایه UTPf105 ، با ٪ ۵۰/۵ بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را به‌خود اختصاص داده و در کنترل قارچ عامل بیماری موفق‌تر بود. در آزمون ترکیبات غیرفرار جدایه‌یUTPf127 با ٪ ۴۰/۵ بالاترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ را به خود اختصاص داد (جدول ۲). هر چند هر چهار جدایه‌ی مورد بررسی از قدرت بیوکنترل بالایی برخوردار بودند، اما چون میزان بازدارندگی جدایه‌ی P13 بیش از سایرین بود، بنابراین در شرایط آزمایشگاهی جدایه‌ی مذکور برای ادامه‌ی تحقیق و مطالعات گلخانه‌ای انتخاب گردید.

جدول ۲- مقایسه میانگین بازدارندگی از رشد قارچ توسط آنتاگونیست های منتخب

Table 2. Comparison of means to inhibit fungal growth by selected antagonists

Biocontrol bacteria	Biocontrol test		
	The percent of the growth inhibition in dual culture test	The percent of antifungal activity of volatile metabolites of the bacterial strains	The percent of fungal growth inhibition by bacterial in non-volatile compounds
P13	61/5a	42/75b	37/5b
UTPf105	51/25b	50/5a	34c
UTPf127	39/5c	39/25c	40/5a
UTPf110	42c	30d	20d

هر عدد در جدول میانگین ۴ تکرار است. اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، در آزمون های کشت متقابل و ترکیبات فرار، آزمون LSD ($P\leq0.01$) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند و در آزمون ترکیبات غیرفرار ،آزمون LSD ($P\leq0.05$) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند.

Each number is the average of 4 replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly ($P<0.01$) in dual culture tests and volatile compounds and ($P\leq0.05$) in non-volatile test compounds according to LSD test.

مطالعات گلخانه‌ای

بررسی الگوی کلونیزاسیون اکتوریزوسفرریشه‌ی لوبیا توسط جدایه‌ی باکتری بیــوکنترل P. fluorescens P13 در خاک سالم و آلوده به زادمایه‌ی R. solani

بذور جوانه زده‌ی لوبیای رقم محلی خمین پیش از کشت با سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) باکتری P13 مقاوم به آنتی‌بیوتیک، مایه‌زنی شدند سپس جمعیت این جدایه باکتری در اکتوریزوسفر۱۵،۳۰،۴۵ روز پس ازکاشت بذرهای لوبیا درگلخانه انجام شد. با توجه به نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها بیشترین جمعیت باکتریP13 اکتوریزوسفر در روز چهل و پنجم ارزیابی شد. جمعیت باکتری P13 در خاک سالم و آلوده به ترتیب در روز پانزدهم $۶/۳۵\times۱۰^{۶}$ و $۶/۸۵\times۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه ارزیابی شد که نسبت به جمعیت اولیه‌ی مایه زنی شده به‌طور چشمگیری کاهش یافت اما پس از آن در روزهای سی‌ام و چهل و پنجم جمعیت باکتری P13 در خاک سالم و در خاک آلوده به زادمایه‌ی قارچ *R.solani* روند صعودی داشت و میانگین تعداد کلونی‌ها پس از روز پانزدهم افزایش یافت (جدول ۳). هر چند که در روزهای نمونه برداری شده، اختلاف معنی‌داری میان جمعیت باکتری در خاک آلوده و سالم دیده نشد اما در روز پانزدهم جمعیت باکتری در خاک آلوده بیشتر از خاک سالم بود و در روزهای سی‌ام و چهل و پنجم جمعیت باکتری در خاک سالم بیشتر از خاک آلوده اندازه‌گیری شد. به طوری که در روز چهل و پنجم جمعیت باکتری در خاک سالم $۱/۱\times۱۰^{۷}$ و در خاک آلوده $۱۰/۶\times۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه بود (جدول ۳). در مورد تیمار شاهد و قارچ *R. solani* طی سه دوره‌ی زمانی ذکرشده همان‌طور که قابل انتظار بود هیچ‌گونه کلونی باکتری تشکیل نشد.

جدول ۳- تراکم جمعیت (سلول باکتری در گرم وزن تر ریشه) جدایه‌ی P13 سودموناس فلورسنت در اکتوریزوسفر لوبیا در خاک سالم و آلوده به بیمارگر طی سه دوره رشدی (هر دوره رشدی ۱۵ روز است)

Table 3. Population density(cfu/g fresh root) *Pseudomonas fluorescens* P13 in ectorhizospher of beans on healthy soil and contaminated with the pathogen, During three periods of growth (each period is 15 days)

Treatment	Day			
	The initial population inoculated (cfu/g fresh root)	15thday (cfu/g fresh root)	30thday (cfu/g fresh root)	45thday (cfu/g fresh root)
P. fluorescens P13	1×10^{8}a	$6/35\times10^{6}$d	$8/7\times10^{6}$cd	$1/1\times10^{7}$b
P. fluorescens P13 + *R. solani*	1×10^{8}a	$6/85\times10^{6}$d	$8/5\times10^{6}$c	$10/6\times10^{6}$b

هر عدد در جدول میانگین ۴ تکرار است.اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD ($P\leq0.01$) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Each number is average of 4 replicants. Treatments with the same letters do not differ significantly ($p<0.01$) according to LSD test.

بررسی الگوی کلونیزاسیون اندوریزوسفرریشه‌ی لوبیا توسط جدایه‌ی باکتریبیوکنترل P. fluorescens P13 در خاک سالم و آلوده به زادمایه‌ی R. solani

در این آزمایش تعداد کلونی‌های باکتری در سه فاصله‌ی زمانی در روزهای ۳۰،۱۵ ، ۴۵ روز پس ازکاشت بذرهای لوبیا در گلخانه مورد شمارش قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بررسی کلونی‌های اندوریزوسفر تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ بین تیمارها وجود دارد. با توجه به نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها جمعیت باکتری در اندوریزوسفر لوبیا در خاک سالم و آلوده در طول سه دوره‌ی ۱۵ روزه رشد نزولی داشت به طوری که در روز چهل و پنجم به کمترین میزان خود رسید (جدول ۴). جمعیت باکتری در این زمان در خاک سالم $۳/۲\times۱۰^{۵}$ و در خاک آلوده به زادمایه قارچ $۲/۸\times۱۰^{۵}$ بود که جمعیت قابل توجهی ارزیابی شد. هر چند جمعیت باکتری کاهش یافت اما جمعیت قابل ملاحظه و مناسبی در روز چهل و پنجم بازیابی شد (جدول ۴). در مورد تیمار شاهد و قارچ *R. solani* همان‌طور که انتظار می‌رفت در طی سه بازه‌ی زمانی ذکرشده، کلونی باکتری تشکیل نشد.

ارزیابی قدرت بیوکنترل جدایه‌ی P. fluorescens P13 در مقابل قارچ R. solani در شرایط گلخانه‌ای

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بررسی ارزیابی قدرت بیوکنترل تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ بین تیمارها وجود دارد. در گیاهان شاهد لوبیای چیتی رقم محلی خمین که با آب مقطر سترون و گیاهانی که تنها با باکتری بیوکنترل مایه‌زنی شده بودند هیچ‌گونه علائم بیماری مشاهده نشد. یک هفته پس از مایه‌زنی، اولین علائم بیماری در گیاهان تیمار ظاهر شد. این علائم ابتدا به صورت پژمردگی تدریجی، سیاه شدن طوقه و ریشه مشاهده شد. با گذشت

زمان علائم بیشتری از بیماری در گیاه مشاهده شد به طوری که چهل و پنج روز بعد از مایه زنی، در گیاهان تیمارشده با *R. solani* میانگین شدت بیماری چهار بود، بدین معنی که در بعضی از گلدان‌ها هیچ بذری جوانه نزد (شکل۲). درگیاهانی که با جدایه‌ی P13 *P. fluorescens* همراه با زادمایه‌ی *R. solani* تیمار شده بودند، اولین علائم ۱۰ روز پس از مایه زنی به‌صورت ضعیف‌تر از گیاهانی که به تنهایی با *R. solani* تیمار شده بودند ظاهر شد. علائم به‌صورت پژمردگی و رنگ‌پریدگی و ایجاد ضایعات کوچک در پایین طوقه مشاهده شد. شدت بیماری در این تیمارها در روز چهل و پنجم، درجه‌ی ۲ ارزیابی شد که معادل ۲۵٪ آلودگی در ناحیه طوقه و ریشه و ایجاد ضایعات بزرگ روی محور زیر لپه بود (شکل۲). این نتایج نشان داد که جدایه‌ی P13 *P. fluorescens* قادر به کاهش معنی‌دار شدت بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی لوبیا در شرایط گلخانه است.

اثرات متقابل بیمارگر و جدایه‌های باکتری در فاکتورهای رشدی گیاه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بررسی وزن تر گیاه تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪بین تیمارها وجود دارد. مقایسه‌ی میانگین‌های شاخص های رشدی نشان داد بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه‌ی گیاهچه‌ها، مربوط به تیمار شاهد در روز چهل و پنجم بود که معادل ۲۶/۷۲ گرم ارزیابی شد. این افزایش به‌صورت معنی‌داری در طول سه دوره قابل مشاهده بود. کمترین وزن تر مربوط به تیمار با *R. solani* بود. همچنین جدایه‌ی P13 در روز چهل و پنجم باعث افزایش وزن ترگیاهچه‌ی لوبیا شد (جدول۴). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بررسی وزن خشک گیاه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪بین تیمارها وجود دارد. بیشترین وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ی گیاهچه‌ها نیز مربوط به تیمار شاهد در روز چهل و پنجم معادل ۳/۳ گرم بود و افزایش وزن خشک به صورت معنی‌داری در طول سه دوره قابل مشاهده بود و تیمار قارچ *R. solani* کمترین وزن خشک را به خود اختصاص داد. همچنین جدایه‌ی P13 در روز چهل و پنجم باعث افزایش وزن خشک گیاهچه‌ی لوبیا شد که افزایش به صورت معنی‌داری در طول سه دوره قابل مشاهده بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در بررسی ارتفاع بوته‌ی لوبیا تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪بین تیمارها وجود داشت، به‌طوری که بیشترین ارتفاع گیاهچه‌ها در روز چهل و پنجم در تیمار شاهد با ارتفاع ۸۷ سانتی متر اندازه-گیری شد. در تمامی تیمارها ارتفاع بوته به‌صورت معنی‌داری (در سطح ۱٪) با گذشت زمان افزایش یافت. کمترین ارتفاع مربوط به تیمار قارچ *R. solani* بود. حضور P13 *P. fluorescens* در خاک سالم و آلوده به زادمایه بیمارگر باعث افزایش ارتفاع بوته‌ها نسبت به تیمار فاقد آن (حضور *R. solani* به تنهایی) شد. گیاهچه هایی که تنها با زادمایه *R. solani* تیمار شده بودند در هر سه دوره‌ی ۱۵ ،۳۰ ،۴۵ روز پس از کاشت، نسبت به بقیه‌ی تیمارها ارتفاع کمتری

داشتند به‌طوری که کمترین ارتفاع گیاهچه‌ها در روز پانزدهم در این تیمار با ارتفاع ۱۳ سانتی‌متراندازه‌گیری شد (جدول۵).

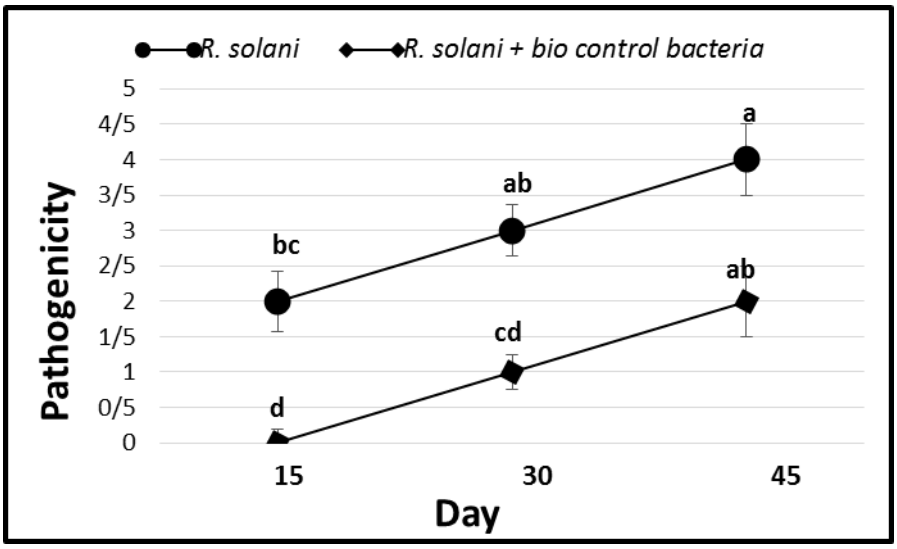
جدول ۴- تراکم جمعیت (سلول باکتری در گرم وزن تر ریشه) جدایه‌یP13 سودموناس فلورسنت مورد مطالعه طی سه دوره رشدی در اندوریزوسفر لوبیا (هر دوره رشدی ۱۵ روز است)

Table 4. Population density(cfu/g fresh root) *Pseudomonas fluorescens* P13 in endorhizospher of beans on healthy soil and contaminated with the pathogen, During three periods of growth (each period is 15 days)

Treatment	Day			
	The initial population inoculated (cfu/g fresh root)	15thday (cfu/g fresh root)	30thday (cfu/g fresh root)	45thday (cfu/g fresh root)
P. fluorescens P13	1×10^{8}a	$1/61\times10^{6}$b	$0/8\times10^{6}$c	$3/2\times10^{5}$de
P. fluorescens P13 + *R. solani*	1×10^{8}a	$1/52\times10^{6}$b	$6/9\times10^{5}$cd	$2/8\times10^{5}$e

هر عدد در جدول میانگین ۴ تکرار است.اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD (P≤0.01) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Each number is average of 4 replicants. Treatments with the same letters do not differ significantly (p<0.01) according to LSD test.



شکل ۲- ارزیابی قدرت بیوکنترل جدایه‌ی *P. fluorescens* P13 در کاهش شدت بیماریزایی قارچ *R. solani*در شرایط گلخانه (با استفاده از شاخص ۵ درجه‌ای). هر نقطه در نمودار خطی میانگین ۴ تکرار است. نقاطی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD (P≤0.01) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 2. Evaluation of biocontrol ability of *P. fluorescens* P13 in reducing of disease severity of *R. solani* in greenhouse (with 5 degree index). Each number is average of 4 replicants. Treatments with the same letters do not differ significantly (p<0.01) according to LSD test.

جدول ۵- تأثیر کابرد جدایه‌ی *P. fluorescens* P13 بر روی فاکتورهای رشدی لوبیا مانند وزن خشک، وزن تر، تعداد گره‌های ریشه و ارتفاع بوته در خاک سالم و آلوده به *R. solani* در شرایط گلخانه

Table 5. Effect of *P. fluorescens* P13 on growth factors of beans such as Fresh weight and dry weight, number of root nodule and plant height in healthy soil and contaminated with *R. solani* in the greenhouse conditions.

	Growth index	fresh weight (gr)			Dry weight (gr)			Plant height (cm)		
Control	Day	15	30	45	15	30	45	15	30	45
	Treatment	5/35h	22/34c	26/72a	0/68g	2/64c	3/3a	2727/5g	67c	87a
R. solani		4/66i	11/6g	15/64e	0/63g	1/15f	1/47e	14h	37f	45e
P. fluorescen P13		3/84i	15/92e	18/43d	0/41h	1/45e	2/97b	16h	58d	73b
R. solani + *P. fluorescen* P13		4/8i	12/2f	25/6b	0/53gh	1/84d	3/17a	18h	58b	72b

هر عدد در جدول میانگین ۴ تکرار است. اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، در بررسی وزن تر و ارتفاع در آزمون LSD (P≤0.01) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند و در بررسی وزن خشک در آزمون LSD (P≤0.05) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Each number is the average of 4 replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly (P<0.01) in study of fresh weight and plant height and (P≤0.05) in dry weight according to LSD test.

بحث

بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه‌ی لوبیا از لحاظ اقتصادی یکی از مهمترین بیماری‌های ریشه و محور زیر لپه‌ی (هیپوکوتیل) لوبیا است که همه ساله خسارت زیادی را به لوبیا کاری‌های شهرستان خمین در استان مرکزی وارد می‌کند. کنترل‌شیمیایی این بیمارگر به‌دلیل خاکزاد بودن و دامنه‌ی میزبانی بالا بسیار مشکل است. کاربرد عوامل بیوکنترل باکتریایی از راهکارهای بسیار مفید در کنترل این بیماری است (Rajabi, 2009). عامل بیماری از پا افتادگی و شانکر طوقه‌ی لوبیا یا بوته‌میری، قارچ *Rhizoctonia solani* است (Behdad, 2006). میسلیوم قارچ مذکور، دارای قطری معادل ۸ الی ۱۲ میکرومتر و به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره است (Sneh *et al*., 1991). با مشاهده‌ی علائم بیماری در مزارع آلوده‌ی لوبیا در شهرستان خمین نمونه‌برداری صورت گرفت. *R. solani* از بافت‌های آلوده جداسازی و به‌منظور شناسایی دقیق آن از کلیدهای موجود استفاده شد (Parmeter, 1970). در آزمون اثبات بیماریزایی دو هفته پس از جوانه‌زنی بذر، پژمردگی تدریجی اندام‌های هوایی در تیمارها مشاهده شد. بوته‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل و مجددا، اقدام به جداسازی و خالص سازی عامل بیماریزا روی محیط PDA گردید. از میان جدایه‌های باکتری مورد استفاده چهار جدایه‌ی P13, UTPf110, UTPf105, UTPf127 که نسبت به بقیه‌ی جدایه‌ها رشد *R. solani* را به میزان بیشتری روی محیط کشت PDA مهار کردند، انتخاب شدند. این جدایه‌ها دارای هاله‌ی بازدارندگی بین ۰/۲ تا ۲/۸ سانتی‌متر بودند که جدایه‌ی P13 با هاله‌ی بازدارندگی ۲/۸ سانتی‌متر، مؤثرترین جدایه تشخیص داده شد. Abdollahipuor *et al.* (2015) در پژوهشی نشان دادند که جدایه‌های P73 و P173 از *P. fluorescens* در بازدارندگی از رشد *R. solani* بیشترین تاثیر را داشته و تا حد مناسبی می توانند از رشد *R. solani* جلوگیری کنند. تولید

ترکیبات فرار توسط جدایه های *P. fluorescens* یکی از مکانیسم های مهم کنترل بیماری های قارچی است (Kraus & Loper, 1992; Laville *et al*., 1998). از جمله ترکیبات فرارشایعی که توسط باکتری های بیوکنترل تولید می شود می توان به سیانید هیدروژن اشاره کرد که تولید آن توسط جدایه های *P. fluorescens* به اثبات رسیده است (Castric & Castric,1983). سیانید هیدروژن تولید شده سیستم تنفسی قارچ ها را مختل می‌کند و باعث توقف رشد آن‌ها می‌شود (Castric, 1977).

در پژوهشی دیگر (Castric & Castric, 1983) مشخص کرد که *P. fluorescens* در محیط کشت آگارمغذی(NA) توانست ترکیبات فرار ضد قارچی را تولید کند. باکتری رشد یافته در محیط کشت آگارمغذی(NA) از رشد میسلیومی *Phytophthora drechsleri* جلوگیری کند. آنتی بیوتیک‌های کلیدی تولید شده توسط *P. fluorescens* از قبیل ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (2-4, D- acetyl pheloroglosinol)، فنازین (Phenasin)،پیرول‌نیترین (Pyrrolnitrin)، پایولوتئورین (Pyoluteorin)، به‌عنوان یکی از متابولیت‌های مؤثر ضدمیکروبی تولیدی توسط این باکتری‌ها مطرح شده و نقش این آنتی بیوتیک‌ها در کنترل قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه و مرگ گیاهچه به اثبات رسیده است(Madloo *et al*., 2013). این آنتی بیوتیک‌ها روی فعالیت طیف وسیعی از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها اثر بازدارندگی دارند (Bloemberg & Lugtenberg, 2003). همچنین Bagheri *et al*. (2015) نشان دادند جدایه‌ی*P. fluorescens* UTPf5 با تولید آنتی‌بیوتیک به میزان ۸۷٪ از رشد قارچ *R. solani* جلوگیری می‌کند. یافته‌های بیان شده در آزمون‌های بیوکنترل در شرایط آزمایشگاهی با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر مطابقت دارد. به‌طورکلی با در نظر گرفتن تمامی آزمون‌های بیوکنترل انجام شده در شرایط آزمایشگاهی، جدایه‌یP13 عملکرد بهتری نسبت به بقیه‌ی جدایه‌ها داشت، بنابراین برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شد. آزمون‌های بیوکنترل در شرایط آزمایشگاهی نمی توانند معیار مطمئنی برای ارزیابی قابلیت بیوکنترلی آن ها در شرایط طبیعی باشند. در این گونه موارد بهتر است کارایی جدایه‌ی برتر در شرایط گلخانه‌ای ارزیابی شود تا بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به کاربرد آن ها اقدام کرد (Fravel, 1988). شدت بیماری بر اساس شاخص پنج درجه (مقیاس صفر تا چهار) ارزیابی شد (Assunção *et al*., 2011). با بررسی ارزیابی شدت بیماری مشخص شد که شدت بیماری در گیاه تیمارشده با جدایه‌ی P13 در خاک سالم و آلوده به بیمارگر *R. solani*. در روز چهل و پنجم دو بود و ۲۵٪ آلودگی در ناحیه طوقه و ریشه ایجاد شد و فقط ضایعات بزرگ روی محور زیر لپه مشاهده شد، این امر نشان دهنده‌ی این بود که جدایه ی *P. fluorescens* P13 به عنوان باکتری آنتاگونیست در شرایط گلخانه موجب کاهش معنی‌دار پوسیدگی رایزوکتونیایی طوقه و ریشه ی لوبیا در سطح ۱٪ شد. Ghafelebashi *et al*. (2014) نشان دادند که کاربرد استرین *P. fluorescens*

UTPf68 باعث کاهش شدت بیماری در لوبیای آلوده به *R. solani* پس از یک هفته رشد در خاک طبیعی گردید.این یافته با نتیجه‌ی به‌دست آمده در پژوهش حاضر مطابقت دارد. توانایی یک باکتری در کلونیزاسیون ریشه شرط لازم برای فعالیت کنترل بیولوژیک علیه قارچ‌های بیمارگر به‌شمار می‌رود (Hajmalek Zanjani *et al*., 2011). ریشه‌ی گیاهان ظرفیت معینی را از نظر میزان کلونیزاسیون دارند (Vincent *et al*., 1991). سودوموناس‌های فلورسنت ریشه را با جمعیت $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه کلونیزه می‌کنند و جمعیت‌های کمتر از این مقدار نمی‌توانند تاثیر مثبتی روی گیاه و بیوکنترل داشته باشند (Weller *et al*., 2002). در مطالعات گلخانه‌ای، بررسی میزان کلونیزاسیون جدایه‌ی P13 نشان داد که این جدایه قادر به کلونیزاسیون ریشه بوده و تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ میان جمعیت آن در روزهای مختلف نمونه‌برداری در خاک سالم و آلوده به زادمایه‌ی *R. solani* وجود داشت. بررسی میزان کلونیزاسیون جدایه‌ی P13 در اندوریزوسفر در شرایط گلخانه‌ای در شرایطی صورت گرفت که جمعیت اولیه ی مایه زنی شده با $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (cfu/ml) این باکتری انجام شد. با گذشت زمان در روز پانزدهم جمعیت باکتری بیوکنترل در خاک سالم و آلوده به ترتیب در $۱/۶۱\times۱۰^{۶}$ و $۱/۵۲\times۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه ارزیابی شد که نسبت به جمعیت اولیه ی مایه زنی شده به‌طور چشمگیری کاهش نشان داد. به نظر می‌رسد این کاهش جمعیت به دلیل از بین رفتن تعدادی از سلول‌های باکتری یا ناتوانی آن‌ها در چسبندگی و استقرار روی بذر باشد. این روند همچنین در روزهای سی‌ام و چهل و پنجم ادامه یافت به‌طوری که در روز چهل و پنجم در خاک سالم و آلوده به ترتیب در $۳/۲\times۱۰^{۵}$ و $۲/۸\times۱۰^{۵}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه بازیابی شد که نسبت به جمعیت پانزدهم وسی‌ام روند نزولی کاملا مشخص است.(Ghafelebashi *et al*. (2014 بیان کردند که بعد از گذشت ۲۱ روز میزان جمعیت باکتری کلونیزه کننده در اندوریزوسفر ریشه‌ی خیار سیر نزولی را نشان می دهد و ازسطح جمعیت $۵/۴۲\times۱۰^{۹}$ در انتهای هفته‌ی دوم به $۲/۱۱\times۱۰^{۸}$ تقلیل می یابد که با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر مطابقت دارد. در بررسی میزان کلونیزاسیون جدایه‌ی P13 در اکتوریزوسفر ریشه‌ی لوبیا در شرایط گلخانه‌ای، جمعیت اولیه ی مایه زنی شده با $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر (c/ml) بود که با گذشت زمان در روز پانزدهم جمعیت باکتری بیوکنترل در خاک سالم و آلوده به ترتیب در $۶/۳۵\times۱۰^{۶}$ و $۶/۸۵\times۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه بازیابی شد که نسبت به جمعیت اولیه ی مایه زنی شده به‌طور چشمگیری کاهش یافت، اما پس از آن در روزهای سی‌ام و چهل و پنجم جمعیت باکتری P13 در خاک سالم و در خاک آلوده به زادمایه‌ی *R. solani* روند صعودی داشت به طوری که در روز چهل و پنجم در خاک سالم و آلوده به ترتیب در $۱/۱\times۱۰^{۷}$ و $۱/۰۶\times۱۰^{۷}$ باکتری در هر گرم ریشه بازیابی شد. افزایش میانگین تعداد کلونی‌ها از روز پانزدهم تا روز سی‌ام و چهل و پنجم

به‌صورت مشهودی قابل مشاهده بود. جمعیت اولیه‌ی مستقرشده روی ریشه و تعدادکلونی‌های تشکیل شده با گذشت زمان در اکتوریزوسفرافزایش یافته و باکتری در روزهای سی‌ام و چهل و پنجم نه تنها قادر به حفظ جمعیت خود بود بلکه با توانایی کلونیزاسیون بالا توانست جمعیت خود را در اکتوریزوسفر لوبیا نسبت به روز پانزدهم افزایش دهد.

همچنین Shahbazi *et al*. (2015) بیان کردند که بعد از گذشت ۴۲ روز از کاشت گیاهچه‌ی گندم میزان جمعیت باکتری کلونیزه کننده در اکتوریزوسفرریشه‌ی گندم کاهش می‌یابد که نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش حاضر مطابقت ندارد. این تغییرات در جمعیت باکتری بیوکنترل در اکتو و اندوریزوسفر لوبیا می‌تواند به‌دلیل حضور باکتری‌های ریشه‌ی لوبیا باشد. وجود این باکتری‌ها در ریشه با ایجاد یک برهمکنش با باکتری آنتاگونیست و یا تغییر در ترکیبات ترشحی ریشه‌ی الگوی کلونیزاسیون باکتری بیوکنترل را تغییر می‌دهد، به‌طوری که سبب استقرار و افزایش جمعیت باکتری بیوکنترل در اکتوریزوسفر شده و از طرفی درون ریشه با بروز رقابت سبب کاهش جمعیت باکتری در اندوریزوسفر می شود (Hajmalek Zanjani *et al*., 2011). هر چند در تمامی روزهای اندازه‌گیری شده جمعیت باکتری در اندوریزوسفر و اکتوریزوسفر خاک آلوده به بیمارگر کمتر از خاک سالم بود اما در تمامی تیمارها باکتری با جمعیت مناسبی تا روزچهل و پنجم ردیابی شد. در این تحقیق جدایه‌ی*P. fluorescens* P13 خاصیت تحریک رشد گیاه (PGPR) را دارا بود که علاوه بر قدرت آنتاگونیستی در افزایش تمام پارامترهای رشدی گیاه از جمله وزن خشک و تر گیاه و ارتفاع اندام‌های هوایی مؤثر بود. نتایج به‌دست آمده در مورد شاخص‌های رشدی در این پژوهش، یافته‌های مطالعات قبلی را تایید می‌نماید. بررسی‌های انجام شده توسط محققان نشان داده است که *P. fluorescens* از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند رقابت تغذیه‌ای و مکانی ، کلونیزاسیون ریشه ، تولید آنتی‌بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی در گیاه میزبان، تولید سیدوفور سبب افزایش جذب آب و موادغذایی و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و در نهایت افزایش و تحریک رشد گیاه می‌شود (Weller *et al*., 1983). طبق پژوهشی تیمار بذر با *P. fluorescens* باعث کاهش شدت بیماری پوسیدگی ریشه و افزایش عملکرد می‌گردد (Da Luz, 1994). باکتری *R. solani* سبب کاهش وزن تر گیاهچه‌های لوبیا نسبت به شاهد می شود و حضور *P. fluorescens* میزان رشد و نهایتا وزن تر گیاهچه را افزایش می دهد (Thomashow & Weller, 1996; Weller *et al*,. 2002; De La Fuente *et al*., 2004). درپژوهشی دیگر مشخص شد تیمارهای آلوده به *Fusarium culmorum* و تیمار قارچ به‌همراه *P. fluorescens* کمترین وزن خشک را داشتند (Hajimashaalah *et al*., 2013). همچنین در پژوهشی دیگر نشان داده شدکه حضور *P. fluorescens* سبب افزایش ۸۰٪ رشد گیاهچه‌های بیمار نسبت به تیمارهای آلوده به قارچ می‌گردد (Thomashow & Weller, 1996; Weller *et al*,. 2002; De La Fuente *et al*.,)

2004). به طور کلی احتمالا یکی از مهمترین مکانیسم‌های مؤثر در بیوکنترل قارچ بیمارگر مذکور، قدرت بالای بیوکنترل جدایه‌ی P13 در کلونیزاسیون موفق اندو و اکتوریزوسفر است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، جدایه‌ی باکتریایی P13 *P. fluorescens* هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط گلخانه‌ای به میزان موثری قادر به کنترل قارچ *R. solani* بود، به‌طوریکه تا روز سی‌ام هیچگونه علائمی از بیماری مشاهده نشد و در روز سی‌ام میزان شدت بیماری درجه‌ی۱ و در روز چهل و پنجم میزان شدت بیماری درجه۲ ارزیابی شدکه با اختلاف معنی‌داری سبب کاهش شدت بیماری نسبت به تیمار شاهد بیمار شد. P13 به دلیل دارا بودن قدرت کلونیزاسیون بالا در اندو و اکتوریزوسفر تا روز چهل و پنجم، در شرایطی که قارچ بیمارگر سبب کاهش وزن‌تر، خشک و ارتفاع بوته‌هادر گیاهچه‌ی لوبیا شد، علاوه بر کاهش شدت بیماریزایی بیمارگر با ویژگی محرک رشد، سبب افزایش وزن تر و خشک و ارتفاع بوته شده و جبران خسارت بیمارگر را به دنبال داشت. با توجه به ویژگی‌های برتر بیوکنترلی جدایه‌ی P13 در مطالعات قبلی و کنترل *R. solani* توسط این جدایه و عمل کردن این باکتری به عنوان یک محرک رشد پیشنهاد می‌گردد مکانیسم‌های بیوکنترل جدایه‌ی باکتری مذکور مورد بررسی بیشترقرار گیرد و در صورت مناسب بودن نتایج آزمایشات گلخانه ای، فرموله کردن باکتری‌های آنتاگونیست و تجاری سازی آن اعمال شود.

منابع

Abdollahipuor, F. Z., Shirzad, A. & Mohammadi, H. 2015. Evaluation of *Rhizoctoni solani* control in cotton by *Pseudomonas fluorescens* isolates. *Journal of Biological Control of Plant Diseases*, 4 (1): 23-36.

Assunção, I. P., Nascimento, L. D., Ferreira, M. F., Oliveira, F. J., Michereff, S. J., & Lima, G. S. 2011. Reaction of faba bean genotypes to *Rhizoctonia solani* and resistance stability. *Horticultura Brasileira*, 29(4): 492-497.

Azad Disfani, F., Rohani, H., Falahati Rastegar, M. & Mahdikhani Moghaddam 2011. Cotton immune responses to *Trichoderma* species and its effect on the control of damping off caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection* 27: 1-10.

Bagheri, A., Mahmudi, A. A. & Ghezeli, F. 2001. *Common Beans*, Research for Crop Improvement. Jihad-e-daneshgahi of Mashhad.

Bakker, P. A., Pieterse, C. M., & Van Loon, L. C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2): 239-243.

Behdad, E. 2006. *Phytopathology and Important Plant Disease in Iran*. Atr-e-Etrat Publication, Tehran, Iran [in Persian].

Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas bacteria*. *New Phytologist*, 157(3): 503-523.

Booth, C. 1971. *Methods in Microbiology*, vol. 4, Academic Press, USA.

Brisbane, P. G., Janik, L. J., Tate, M. E., & Warren, R. F. 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from Pseudomonas fluorescens 2-79 (NRRL B-15132). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(12): 1967-1971.

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

Castric, K. F., & Castric, P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2): 701-702.

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

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium Burkholderia sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4): 1685-1693.

De La Fuente, L., Thomashow, L., Weller, D., Bajsa, N., Quagliotto, L., Chernin, L., & Arias, A. (2004). *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology*, 110(7): 671-681.

Dennis, C., & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: (III. Hyphal interaction) *Transactions of the British Mycological Society*, 57(3): 363-369.

Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C., & Sayler, R. J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(7): 591-598.

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

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

Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual review of Phytopathology*, 26(1): 75-91.

Ghafelebashi, S. S., Jamali, F.& Ahmadzadeh, M. 2014. Study biological properties of *Pseudomonas fluorescens* UTPF68, biocontrol agent against *Phytophthora drechsleri*. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 3(2): 105-116.

Hajimashaalah, S., Razavi, M. & Ghasemi, A. 2014. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for biological control of wheat crown and root rot disease (*Fusarium culmorum*). *Journal of Biocontrol in Plant Protection*,1(2):1-16.

Hajmalek Zanjani, M., Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehran, A., Behboudi, K. & Saberi, R.R. 2011. Effects of *Rhizoctonia solani* on Root Colonization of Canola by *Pseudomonas fluorescens* Strain UTPF86. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 42(1): 163-170.

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

Kazemzaeh, M., Roostaii, A., Padasht, F. & Khodakaramian, Kh. 2012. Investigation of Biological Control of *Rhizoctonia solani* Rhizobacterium Burn disease by Some Antagonists in Guilan Province. *Journal of Plant Protection (Agriculture Sciences and Technology)*, 26 (1): 54-44.

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

Kraus, J., & Loper, J. E. 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf :Mechanistic studies pp. 175-177. In: *The second international workshop on plant growth promoting Rhizobacteria*. Interlaken, Switzerland.

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

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

Da Luz, W. C. 1994. Effect of seed microbiolization on grain yield and on controlling common root rot and seed-borne pathogens of wheat. *Fitopatologia Brasileira*, 19(2): 144-148.

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

Maghsoudlou, R., Taheri, A. A. H., & Rahnama, K. 2007. Identification and pathogenicity of Fusarium spp. isolated from root and crown of wheat in Gorgan area.. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 14: 178-189.

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

Neilands, J. B., & Nakamura, K. 1991. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates. pp. 1-14. In: Winkelmann, G. (Ed.) *Handbook of Microbial Iron Chelates.* CRC Press, Boca Raton, Florida.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marassas, W. F. O. 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park. New York, 193 pp.

Parmeter, J. R. 1970. *Rhizoctonia solani, biology and pathology*. University of California Press, USA.

Pierson, C. F., Ceponis, M. J., & McColloch, L. P. 1971. *Market diseases of apples, pears, and quinces.* (376). Washington, USA: US Government Printing Office.

Rajabi, A.2009. *Bean Diseases*, Tehran University Publication Center, Iran.

Sarani, S., Sharifi Tehrani, A., Ahmadzadeh, M.& Nikkhah, M.J. 2007. Efficiency of *Pseudomonas* bacteria in biological control of *Rhizoctonia solani* caused by Rapeseed Seedling Death. *Journal of Soil and Water Sciences (Science and Technology of Agricultural Resources*, 11(42):261-270.

Schippers, B., Bakker, A. W., & Bakker, P. A. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual review of Phytopathology*, 25(1): 339-358.

Shahbazi, H., Behboudi, K., Nikkhah, M. J. & Ahmadzadeh, M. 2015. Detection of hcnAB and phlD genes in *fluorescent pseudomonads* biological control agent *of Fusarium graminearum* and studying their ability to ectorhizosphere colonization of wheat. *Journal of Biological Control of Plant Diseases*, 4(2): 143-155.

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

Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. 1991. *Identification of Rhizoctonia species*. APS Press. USA.

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

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

Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1): 379-407.

Weller, D. M., & Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73(3): 463-469.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1): 309-348.