مجله کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
شماره اول، ۱۳۹۱ (۶۰-۴۹)

معرفی استرین جدید *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 به عنوان یکی از باکتری‌های مهم بیوکنترل در ایران

مسعود احمدزاده[1] و سلیمان قاسمی[2*]
۱، دانشیار پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران و
۲، دانش‌آموختهٔ کارشناسی‌ارشد دانشگاه تهران و کارشناس ارشد شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۵- تاریخ تصویب: ۹۱/۲/۳)

چکیده

سودوموناس‌های فلورسنت از مهمترین عوامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی هستند که به‌صورت مستقیم، با تولید و ترشح متابولیت‌های بازدارنده و سیدروفورها، سبب محدودکردن یا توقف رشد بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه قارچ‌ها می‌شوند و برخی با تولید هورمون‌های مختلف سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند. هدف از این پژوهش معرفی و بررسی برخی خصوصیات استرین جدید *P. fluorescen* UTPF68 است که از منطقه ریزوسفر گیاه کلزا مزارع دشت ناز در استان مازندران جداسازی شده است. این باکتری یکی از استرین‌های مهم و مؤثر در زمینه بیوکنترل عوامل بیماریزای خاکزاد است که در گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران مورد شناسایی و ارزیابی قرار گرفته است. در این پژوهش خصوصیات و کاربردهای بیوکنترلی این استرین در دو بخش آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در سطح آزمایشگاهی تولید برخی متابولیت‌های مهم در زمینه بیوکنترل مانند سیدروفور، هورمون اکسین، سالسیلیک‌اسید و آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و Plt، سیانیدهیدروژن و برخی از آنزیم‌های مهم مورد ارزیابی قرار گرفتند. در سطح گلخانه، اثر بیوکنترلی این استرین روی بیمارگرهای *Sclerotinia sclerotium*، *Rhizoctonia solani* به‌ترتیب روی گیاهان کلزا و لوبیا و *Fusarium oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر بیوکنترلی این استرین در تلفیق با قارچ آنتاگونیست *Trichoderma virens* مورد ارزیابی قرار گرفت. این پژوهش نشان داد که این استرین هم به‌لحاظ تولید متابولیت‌های بیوکنترلی و هم از نظر قدرت بیوکنترلی در شرایط گلخانه‌ای در جایگاه مطلوبی قرار دارد که می‌توان به‌عنوان یک جدایهٔ با ارزش در جهت اهداف کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی در ایران روی آن سرمایه‌گذاری کرد.

واژه‌های کلیدی: سیدروفور، اکسین، سیانید، سودوموناس‌های فلورسنت، DAPG، Plt، SA

مقدمه

دستیابی و یافتن آن دسته از عوامل بیوکنترل که قابلیت کاربرد و تجاری‌سازی را برای استفاده در سطح مزارع و باغات داشته باشند، از چالش‌های مهم تحقیقات کنترل بیولوژیک به‌شمار می‌رود. جدایه‌هایی که طیف به‌نسبت وسیعی از متابولیت‌های ضدمیکروبی را تولید

* نویسنده مسئول: سلیمان قاسمی تلفن: ۰۹۱۲۴۲۰۵۲۹۰ E-mail:s_ghasemi@alumni.ut.ac.ir

کنند و بتوانند همزمان بیش از یک بیماری را روی یک میزبان گیاهی خاص کنترل نمایند و همچنین دارای مکانیسم‌های افزایش رشد (از راه تولید تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و افزایش جذب برخی ماکرو و میکروالمان‌ها) و القای مقاومت باشند، از اهمیت بسزایی در برنامه‌های کنترل بیولوژیک برخوردارند و می‌توانند برای مرحله تولید (شامل فرمانتاسیون، فرمولاسیون و بسته بندی) مورد توجه و بررسی قرار بگیرند. از طرف دیگر موضوع شایستگی استقرار در ریزوسفر یا فیلوسفر برای عوامل بیوکنترل یک موضوع اساسی و شرط لازم به‌شمار می‌رود. بدیهی است یافتن چنین جدایه‌هایی کار بسیار مشکلی بوده و مستلزم تحقیقات فراوان و دقیق است. شیسلر و اسلیننجر (۱۹۹۷) در مقاله تحلیلی خود، استرین‌های مؤثر را به منظور یافتن عوامل بیوکنترل برتر و کارامد مورد بررسی قرار دادند. برگ و همکاران (۲۰۰۱) استفاده از شاخص بونیتور[1] و امتیازدهی بر اساس برخی شاخص‌های مربوط به تولید انواع متابولیت‌های ضدمیکروبی، افزایش رشد گیاه و جلوگیری از رشد قارچ‌های مهم بیماریزا را برای معرفی جدایه‌های برتر در بین ۲۰ باکتری بیوکنترل مورد استفاده قرار دادند. احمدزاده و شریفی‌تهرانی (۲۰۰۸) نیز این روش را در مورد جدایه‌هایی از سودوموناس‌های فلورسنت مورد استفاده قرار دادند. سودوموناس‌های فلورسنت باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم منفی و متحرکی هستند که معمولا به صورت هوازی رشد کرده و تنوع تغذیه‌ای و اکولوژیکی زیادی دارند (Haas and Defago 2005). این باکتری به‌طور معمول در آب و خاک زیست می‌کنند و از ریشه تعداد زیادی از گیاهان جدا شده و به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سودوموناس‌های فلورسنت به‌وسیله رنگدانه فلورسنت سبز مایل به زردشان قابل تشخیص‌اند. هر چند، تعدادی از این باکتری‌ها چنین رنگدانه‌ای تولید نمی‌کنند.

در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به خصوص باکتری‌های متعلق به سودوموناس‌های فلورسنت از قبیل *pseudomonas putida* و *P. fluorescens* در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیهٔ ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند، گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیک هستند، زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی است (Weller 1988). باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر از گروه سودوموناس‌های فلورسنت به‌طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم‌کننده‌های رشد و نیز به‌صورت غیرمستقیم از راه کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان موجب رشد آنها می‌شوند.

تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک (Fravel 1988, Picard et al. 2000)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین (Leong 1986, Schippers et al. 1987)، سیانید هیدروژن (Voisard et al. 1989) و آنزیم پروتئاز (Keel and Defago 1997) از مهم‌ترین مکانیسم‌های مؤثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتری‌ها به‌شمار می‌رود. به علاوه، تأثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا و همچنین کمک به قدرت جذب مواد معدنی (به خصوص فسفر و ازت) توسط گیاه از دیگر مکانیسم‌های مؤثر در افزایش رشد گیاه است (Keel and Defago 1997). در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در مورد مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های گیاهی انجام گرفته است. در این پژوهش‌ها، پژوهشگران با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست موفق به کنترل مؤثر بیماری‌های گیاهی گردیده‌اند. کلوپر و همکاران در سال ۱۹۸۰ آنتاگونیست‌های زیادی از جمله *P. fluorescens*، *Burkholderia cepacia*، *P. putida* و *Bacillus subtilis* را در این رابطه مورد آزمایش قرار دادند و ثابت کردند که گونه‌های مذکور بطور مؤثری سبب کنترل بعضی از بیمارگرهای گیاهی شده‌اند، همچنین نشان دادند که جدایه *P. fluorescens* H237 می‌تواند درصد زیادی از جمعیت قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp.

1. Bonitur

dianthi را در شرایط مزرعه کاهش دهد (Raaijmakers et al. 1995). احمدزاده و همکاران با کاربرد یک جدایه از باکتری *P. fluorescens* توانستند بیماری مرگ گیاهچه نخود ایرانی ناشی از *Pythium ultimum* را کاهش دهند (Ahmadzadeh et al 1997). هدف از این تحقیق معرفی یکی از استرین‌های مهم و مؤثر در زمینه بیوکنترل عوامل بیماریزای گیاهی است که در گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران جداسازی شده است. جدایه باکتری آنتاگونیست که در این تحقیق معرفی می‌گردد و خصوصیات و کاربردهای بیوکنترلی آن روی تعدادی از بیمارگرهای گیاهی توصیف می‌شود، یکی از استرین های *P. fluorescens* با نام UTPF68 است که از منطقه ریزوسفری گیاه کلزا مزارع دشت ناز در استان مازندران جداسازی شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی، شناسایی و نگهداری باکتری آنتاگونیست: به منظور یافتن مناسب‌ترین جدایه بیوکنترلی، باکتری‌های آنتاگونیست از منطقه ریزوسفر و فیلوسفر گیاه از مزارع کلزا، سویا و برنج در استان مازندران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خاک جمع آوری‌شده از منطقه ریزوسفر، ده گیاه را با هم مخلوط کرده، از هر نمونه خاک مخلوط شده، یک گرم خاک برداشته شده و در ده میلی‌لیتر آب مقطر سترون رقت‌های مختلف آن به‌طور سریال تهیه گردید. صد میکرولیتر از هر رقت با استفاده از میکروپیپت سترون به درون تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت آگار مغذی (NA) منتقل و کشت داده شد. تشتک‌های کشت داده شده در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردیدند.

کلنی‌هایی که از نظر شکل و رنگ متفاوت بودند انتخاب و درون لوله‌های آزمایش حاوی آگار مغذی، خالص‌سازی و نامگذاری شدند. جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت با استفاده از محیط انتخابی S1 و محیط افتراقی KB انجام گرفت. آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مطابق روش شاد (Schaad et al. 2001)، برای تعیین خصوصیات فنوتیپی استرین: برای تعیین خصوصیات فنوتیپی استرین UTPF68 از آزمون حداقل و حداکثر دمای رشد در محیط عصاره مخمر مصرف منابع کربنی با استفاده از محیط پایه، آزمون آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، تولید لوان و احیای نیترات ، لهانیدن برش‌های سیب زمینی و آزمون اکسیداز انجام گرفت.

نگهداری استرین باکتریایی

پنج میلی‌لیتر از محلول سولفات منیزیوم یک‌دهم مولار درون لوله‌های مکارتی ریخته و اتوکلاو شد. مقداری از باکتری رشدیافته روی محیط کشت NA به طور جداگانه درون لوله‌ها منتقل شدند.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی استرین UTPF68 در شرایط آزمایشگاه

کشت متقابل (Dual culture): در این آزمایش استرین باکتری به‌صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک‌های پتری و به فاصله یک سانتی‌متر از حاشیه آنها از چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی شدند.

سپس دیسکی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت ۵ روزه قارچ‌های *S. sclerotiorum*، *R. solani* و *F. oxysporum* به طور جداگانه در مرکز تشتک کشت داده شد. در تشتک‌های پتری شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید. این تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند و پس از این که حاشیه پرگنهٔ قارچ در تشتک‌های پتری شاهد به دیوارهٔ پتری برخورد نمود، فواصل باز دارندگی بین جدایه‌های باکتری و حاشیهٔ پرگنهٔ قارچ اندازه‌گیری شد. بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی استرین در جلوگیری از رشد قارچ *S. sclerotium* به‌روش برگ با کمی تغییرات انجام شد (Berg et al 1995). بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضدقارچی باکتری در جلوگیری از رشد *S. sclerotium* مطابق روش کراس و لوپر انجام گرفت (Kraus and Loper 1990). بررسی تاثیر استرین باکتریایی UTPF68 روی جوانه‌زنی اسکلروت‌های قارچ *S. sclerotium*، مقدارجوانه‌زنی آسکوسپور این قارچ در حضور استرین آنتاگونیست، با استفاده از روش ساوچوک با اندکی تغییر مشخص شد (Savchuck 2002). کشت متقابل تلفیق باکتری با قارچ آنتاگونیست تریکودرما با *S. sclerotium* نیز با استفاده از روش اکسپرت انجام شد

(Expert and Digat 1995). در نهایت، بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی باکتری آنتاگونیست و قارچ تریکودرما به‌تنهایی و به‌صورت تلفیقی در جلوگیری از رشد *S. sclerotium* به‌روش برگ با کمی تغییر انجام شد (Berg et al. 1995).

بررسی خاصیت آنتاگونیستی استرین UTPF68 علیه بیماری اسکلروتینیایی کلزا و آفتابگردان و بیماری ریزوکتونیایی لوبیا در شرایط گلخانه

بررسی گلخانه‌ای اثر باکتری آنتاگونیست روی *S. sclerotiorum* در برگ گیاه کلزا با استفاده از روش استفاده از گلبرگ‌های مایه‌زنی‌شده انجام گرفت (Savchuck *et al.* 2002). آزمایش در دمای گلخانه انجام گرفت و برای تأمین رطوبت بالای ۹۰ درصد از درپوش پلاستیکی بزرگ استفاده گردید و درون ظرف‌های زیر گلدان از آب پر شده بود و نیمی از گلدان‌ها در مرحله گلدهی بودند.

برای تعیین میزان قدرت کنترلی این استرین بر بیماری اسکلروتینیایی روی گیاه آفتابگردان ابتدا مایه تلقیح قارچ بیماریزا تهیه شد و زادمایه استرین مورد نظر نیز آماده شد و بذرها پس از آماده‌سازی با باکتری مورد نظر تیمارشده و برای انجام آزمایش استفاده شدند (Keel *et al.* 1996). بررسی زمان کاربرد آنتاگونیست باکتریایی برای کنترل بیولوژیکی قارچ *S. sclerotiorum* با استفاده از روش گلبرگ‌های مایه‌زنی‌شده انجام گردید تا بهترین زمان کاربرد باکتری آنتاگونیست به‌دست آید. برای بررسی شدت بیماری ناشی از قارچ *R. solani* بر روی لوبیا و فاکتورهای رشدی گیاه در حضور استرین باکتریایی با هدف ارزیابی شدت علایم بیماری ریزوکتونیا بر ریشه‌های گیاه، از روش تغییریافته مک‌دونالد و روویرا (۱۹۸۵) استفاده گردید (Siddiqui and Shaukat 2002).

تولید متابولیت‌های میکروبی

به منظور بررسی تولید سیدروفور، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. به‌مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط سوکسینات به محیط‌های جدید سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به‌مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سانتیگراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف سلول‌ها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (PG instrument $T70^{+}$) قرائت شد. داده‌های حاصله با فرمول $A= \varepsilon BC$ به مول در لیتر تبدیل شد. A = میزان جذب ، ε = ضریب جذب مولی، B = قطر کیوت، C = غلظت شاهد .

سالیسیلیک‌اسید تولیدشده در این باکتری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که پس از کشت باکتری در محیط TSB به‌مدت ۴۸ ساعت، ۲۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را به محیط سوکسینات منتقل می‌کنیم. پس از آن سوسپانسیون باکتری برای ۲۰ دقیقه با دور معادل ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. متعاقبا ۴ میلی‌لیتر از محیط رویی برداشته شد و به کمک HCl نرمال، pH آن روی ۲ تنظیم گردید و سپس با اضافه‌کردن کلروفرم (نسبت ۱:۱)، سالیسیلیک اسید عصاره‌گیری شد. به عصاره به‌دست‌آمده، ۴ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میکرولیتر کلریدآهن (III) ۲ مولار اضافه گردید و با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آن در ۵۲۷ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اسیدسالسیلیک توسط استرین از مقایسه مقدار جذب نور مربوط به آن با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف اسیدسالسیلیک محاسبه شد. برای اندازه‌گیری مقدار تولید هورمون اکسین در این استرین از روش اصلاح شده گوردون و وبر (۱۹۷۵) استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت محیط حاوی باکتری سانتریفوژ (به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g) گردید و یک میلی‌لیتر از آن با معرف سالکوسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر، ۷/۵ میلی لیتر کلرید آهن ۳ آبدار ۰/۵مولار) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و پس از گذشت این زمان با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری آن در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. میزان تولید اکسین با مقایسه جذب نوری آن با منحنی استاندارد تهیه‌شده از ایندول استیک اسید با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش پیشنهادی لورک (۱۹۴۸)، اصلاح شده توسط

آلستروم و بورنر انجام گردید (Alstrom and Burns 1989). بدین منظور ابتدا استرین باکتری به مدت ۴۸ ساعت روی محیط کشت کینگ‌بی (KB) کشت گردید. سپس برای آن ۳ تشتک پتری حاوی محیط KB که دارای ۴/۴ گرم گلایسین در هر لیتر محیط می‌باشد، تهیه شد. هر پتری با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح شد. سپس یک کاغذ صافی آغشته به معرف شامل کربنات‌سدیم ۲ درصد و اسیدپیکریک ۰/۵ درصد در قسمت درب پتری قرار داده شد. یک تشتک پتری هم به عنوان شاهد بدون باکتری در نظر گرفته شد تشتک‌های پتری به وسیله نوار پارافیلم مسدود شد تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی شکل و از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری به‌عمل آید، آنگاه این ظروف به صورت واژگون به‌مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و نهایتا آجری تغییر رنگ می‌یابد. رنگ کرم بین حداقل میزان تولید HCN و رنگ آجری حداکثر تولید HCN را نشان میدهد. بر این اساس، توان تولید HCN بر اساس رنگ کاغذ معرف در ۴ سطح تولید حداقل، نسبتا کم، نسبتا زیاد و زیاد مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج، تشخیص و تعیین کمیت آنتی‌بیوتیک‌های Plt و DAPG در این تحقیق انجام گرفت. استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها به روش مارهوفر و همکاران انجام شد (Maurhofer *et al.* 1992; Notz *et al.* 2001). ردیابی و اندازه‌گیری کمی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌وسیله دستگاه HPLC انجام گرفت. ۲و۴-دی‌استیل‌فلوروگلوسینول (DAPG) و پایولوتئورین (Plt) به‌وسیله جذب اشعه ماورای بنفش به ترتیب در طول موج‌های ۲۷۰ و ۳۳۰ نانومتر ردیابی شدند. کمیت آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس پیک استاندارد و زمان تأخیر، بر حسب میکرومول در میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه گردید. به منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز در این استرین، از محیط SMA مطابق روش مارهوفر و همکاران با کمی تغییر استفاده شد (Maurhofer *et al.* 1995). این آزمایش در سه تکرار انجام گرفت. برای تعیین میزان توانایی این استرین در تولید لیپاز، محیطی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱ گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار و ۱ لیتر آب را تهیه می‌کنیم. ۱۰میلی‌لیتر توین ۸۰ را جداگانه اتوکلاو کرده، به محیط در حال سردشدن می‌افزاییم. پس از اختلاط کامل محیط در پتری، باکتری را به‌صورت خطی کشت می‌دهیم. پس از چند روز هاله رسوبی در اطراف محل رشد باکتری دیده می‌شود که نشان‌دهنده هیدرولیزشدن توین است. ارزیابی تولید آمیلاز به این ترتیب انجام گرفت که به محیط کشت آگار غذایی ۰/۲ درصد نشاسته محلول افزوده شد و پس از اتوکلاو کردن، درون پتری می‌ریزیم و باکتری را به صورت خطی کشت می‌دهیم. پس از چند روز با ریختن محلول لوگول در صورتی‌که باکتری نشاسته را هیدرولیز کرده باشد، هاله بی‌رنگی در اطراف محل رشد باکتری ایجاد می‌شود. برای انجام آزمایش تولید کیتیناز، میزان ۰/۱ درصد کیتین کلوییدی را به محیط آگار غذایی افزوده، سپس ۱۲ میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری را به‌روش لکه‌گذاری روی تشتک‌های حاوی این مواد کشت می‌دهیم و برای مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم. توانایی تولید آنزیم با تشکیل هاله شفاف در اطراف کلونی ارزیابی می‌شود. به‌منظور بررسی تولید بتا-۱و۳-گلوکاناز، محیط کینگ بی به‌نسبت ۱/۱۰ یا TSB به نسبت ۱/۲۰ تهیه می‌شود و ماده لیگنان به نسبت ۰/۱ درصد به این محیط اضافه می‌شود. سپس باکتری را بر روی آن کشت داده و پس از سه روز این محیط را با کنگورد ۰/۳ درصد رنگ‌آمیزی می‌کنیم. تولید این آنزیم با تشکیل هاله در اطراف محل رشد باکتری مشخص می‌شود.تولید سلولاز در محیط M9 که شامل عصاره مخمر به میزان ۱/۲ گرم در لیتر و سلولز به‌میزان ۱۰ گرم در لیتر و ۱۵ گرم آگار است، ارزیابی شد (Miller 1974). بعد از ۸ روز که استرین بر روی محیط اختصاصی در داخل انکوباتور نگهداری شد، (در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد) هاله‌ای شفاف اطراف جدایه‌ای که تولید سلولاز کند، مشاهده می‌شوند.

نتایج

در تلاش برای دستیابی به یک جدایه مفید بیوکنترل، حدود ۸۲ جدایه باکتری جداسازی و خالص‌سازی شد. از این تعداد در حدود ۲۹ جدایه از گروه باکتری‌های گرم

مثبت شناسایی شد و ۵۳ جدایه متعلق به گروه باکتری‌های گرم منفی که شامل ۱۵ عدد سودوموناس غیرفلورسنت و ۳۸ عدد سودوموناس فلورسنت بودند. استرین UTPF68 جداشده از منطقه ریزوسفر گیاه کلزا مزارع دشت ناز در استان مازندران بر اساس آزمون‌های غربالگری اولیه از میان جدایه‌های فلورسنت فوق انتخاب و خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات فنوتیپی استرین آنتاگونیست UTPF68 بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تعیین شد. این استرین از منابع کربنی دی‌گالاکتوز، ال‌آرابینوز، سوربیتول، ام‌اینوزیتول، سوکروز و بتاآلانین استفاده نموده، قادر به احیای نیترات و هیدرولیز ژلاتین بود. این استرین قادر به رشد در دمای ۴۱ درجهٔ سانتی‌گراد نیست، ولی در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد رشد می‌کند. این استرین دارای توانایی تولید رنگدانه آبی پایوسیانین در محیط کینگ آ، لهانیدن سیب‌زمینی و هیدرولیز نشاسته نیست و از نظر تولید لوان، آزمون اکسیداز و آرژینین دهیدرولاز، مثبت است (جدول شماره ۱). بر این اساس خصوصیات این استرین با مشخصات گونه *P. fluorescens* مطابقت دارد (Fahy and Persley 1983, Schaad et al. 2001).

خاصیت آنتاگونیستی استرین UTPF68 در شرایط آزمایشگاه

در بررسی کشت متقابل اثر ۳۸ جدایه باکتری جداسازی شده به همراه ۱۲ باکتری موجود در کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران روی قارچ *S. sclerotium* مورد بررسی قرار گرفت. جدایه UTPF68 در بین جدایه‌های دیگر با داشتن میزان هاله بازدارندگی ۱۰ میلی‌متری و با درجه‌بندی در سطح A به‌عنوان بهترین جدایه از این نظر انتخاب شد.

در مقابل بیمارگر *R. solani* هاله بازدارنده ۱/۵۴ سانتی‌متر را ایجاد کرد که مقدار مناسبی بود. این استرین در مقابل قارچ *F. oxysporum* قادر به تولید هیچ هاله بازدارنده‌ای نبود.

جدول شماره ۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استرین *P. fluorescens* UTPF68

خصوصیت		واکنش استرین
تولید لوان	Levan formation	+
اکسیداز	Oxidase	+
استفاده از مواد قندی		
ال-آرابینوز	L-arabinose	+
دی گالاکتوز	D-galactose	+
سوربیتول	Sorbitol	+
ام-اینوزیتول	M-inositol	+
سوکروز	Sucrose	+
بتا آلانین	β -alanin	+
تارتارات سدیم	Sodium tartarat	+
احیای نیترات	Nitrate reduction	+
لهانیدن سیب زمینی	Pectolytic activity	-
آرژینین دهیدرولاز	Arginine dehydrolase	+
رشد در ۴ درجه	Growth at 4 c°	+
رشد در ۴۱ درجه	Growth at 41 c°	-
هیدرولیز ژلاتین	Gelatine hydrolysis	+
هیدرولیز نشاسته	Starch hydrolysis	-

در بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی در جلوگیری از رشد *S. sclerotiorum* دیده شد که ترشحات مایع خارج سلولی در جلوگیری از رشد میسیلیوم *S. sclerotiorum* در سطح احتمال یک درصد در غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ درصد تفاوت معنی‌داری دارد. استرین UTPF68 با ۶۲/۲ درصد بازدارندگی تاثیر

چشمگیری در جلوگیری از رشد میسلیوم نشان داد. در بررسی تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی باکتری آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم *S. sclerotiorum*، استرین UTPF68 با ۷۴/۴۴ درصد بازدارندگی تاثیر خوبی روی این بیمارگر گذاشت. استرین UTPF68 روی میزان جوانه‌زنی اسکلروت قارچ *S. sclerotium* تاثیرگذار بود، در این آزمایش مشخص شد که این استرین به‌طور کامل از جوانه‌زنی اسکلروت‌های قارچ *S. sclerotiorum* جلوگیری می‌کند. میزان جوانه‌زنی آسکوسپورهای قارچ *S. sclerotium* در حضور استرین UTPF68 مشخص کرد که این استرین باکتری تقریبا به‌طور کامل از جوانه‌زنی آسکوسپورها جلوگیری کرد به طوری که بعد از ۲۴ ساعت تنها ۸/۵ درصد از آسکوسپورها توانستند در حضور این باکتری رشد کنند.

خاصیت آنتاگونیستی استرین UTPF68 در شرایط گلخانه

در بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی *S. sclerotium* در برگ گیاه کلزا، توانایی آنتاگونیستی ۸ جدایه به‌منظور انتخاب جدایه با اثر بازدارندگی بیشتر در شرایط گلخانه‌ای در مقابل قارچ *S. sclerotium* مورد بررسی قرار گرفت. جدایه UTPF68 در این آزمایش بیشترین اثر بازدارندگی را از خود نشان داد. درصد بازدارندگی این جدایه، زیاد و حدود ۷۳/۸۸ درصد بود.

در بررسی بهترین زمان کاربرد این باکتری آنتاگونیست جهت کنترل بیولوژیک *S. sclerotium* در گلخانه نشان داده شد که استفاده از این استرین در تیمارهایی که سوسپانسیون باکتری همزمان با آسکوسپور و یا قبل از آن به گلبرگ‌ها اضافه شده بود، میزان بیماری در کمترین مقدار خود است.

استرین UTPF68 موجب کاهش شدت بیماری در لوبیای آلوده به *R. solani* پس از یک هفته رشد در خاک طبیعی گردید. غربال نهایی باکتری‌ها در گلخانه از طریق تلقیح جدایه‌های آنتاگونیست و قارچ بیمارگر به گلبرگ کلزا (محل ورود آسکوسپور *S. sclerotium*) انجام گرفت که نتایج نشان داد که باکتری آنتاگونیست UTPF68 توانایی بسیار خوبی در کنترل این بیمارگر دارد.

تولید متابولیت‌های میکروبی

در ارزیابی تولید سیدروفور، میزان تولید سیدروفور پایووردین به‌صورت اختصاصی اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست‌آمده از میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب مولی پایووردین خالص به میکرومول پایووردین تبدیل شد. عدد قرائت‌شده برای این استرین ۱/۰۷۲ است. میزان تولید سالسیلیک اسید توسط باکتری ۰/۰۸۹ میلی گرم در لیتر تعیین شد.

نتایج حاصل از تعیین میزان تولید اکسین به‌وسیله استرین UTPF68 و تعیین همبستگی آن با افزایش رشد گیاه نشان داد که میزان تولید اکسین با طول ساقه، ریشه و وزن تر گیاهچه دارای همبستگی مثبت است. این بررسی نشان داد که استرین UTPF68 با تولید ۰/۱۵۳ میلی‌گرم در لیتر اکسین می‌تواند به‌عنوان یکی از استرین‌های برتر از نظر تولید اکسین در نظر گرفته شود. نتایج تست تولید سیانید هیدروژن (HCN) نشان داد که این استرین دارای بیشترین تولید سیانید هیدروژن در مقایسه با ایزوله‌های دیگری که مورد بررسی قرار گرفتند، بود.

بررسی تولید آنتی‌بیوتیک DAPG در استرین UTPF68 و تاثیر برخی شرایط محیطی (محیط کشت و زمان) در تولید آن نشان داد که تولید آنتی‌بیوتیک DAPG دراین استرین صورت می‌پذیرد. تولید آنتی‌بیوتیک در این استرین در زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت افزایش یافته و به ۳۱ میکرومول رسید و پس از ۹۶ ساعت کاهش تولید مشاهده گردید. این استرین در محیط کشت KB قادر به تولید آنتی‌بیوتیک نیست، ولی با افزودن ۱۰ گرم گلوکز به محیط کشت KB به‌عنوان تنها منبع کربن، تولید DAPG در این استرین مشاهده شد.

این استرین در محیط KB قادر به تولید آنتی‌بیوتیک پایولوتورین (Plt) است و مقدار تولید این متابولیت در زمان ۹۶ ساعت رشد به حداکثر خود یعنی ۶۵ میکرومول در میلی‌لیتر محیط کشت رسید.

نتایج حاصل از بررسی تولید آنزیم‌ها به‌این گونه بود که استرین UTPF68 با ایجاد هاله شفاف به قطر ۵ سانتیمتر یکی از استرین های خوب از نظر قابلیت تولید آنزیم پروتئاز است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله

پس از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری در محیط اختصاصی تولید آمیلاز قطر هاله‌ای به مقدار ۰/۷ سانتی‌متر را برای آن نشان داد. این استرین قادر به تولید آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز و لیپاز و بتا - ۱و۳ -گلوکاناز نیست.

بحث

باکتری‌های آنتاگونیست محیط ریشه یکی از گروه‌های مهم باکتری‌های سودمند مسئول کنترل بیمارگرهای خاکزی هستند (Weller 1988). به‌منظور یافتن عوامل بیوکنترل جدید علیه قارچ‌های خاکزی باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* استرین UTPf68 شناسایی و با استفاده از روش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست روی درصد جوانه‌زنی آسکوسپورهای قارچ *S. sclerotiorum* استرین UTPF68 سبب کاهش جوانه‌زنی آسکوسپورها گردید. استرین مذکور تقریبا به‌طور کامل توانست از جوانه‌زنی آسکوسپورها جلوگیری کند که نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج ساوچک و همکاران در سال ۲۰۰۲ مطابقت دارد. استرین UTPF68 دارای توانایی تولید سیانید هیدروژن و پروتئاز می‌باشد و مقدار مناسب و قابل قبولی از این متابولیت‌ها را تولید می‌کند. در این بررسی استرین UTPF68 جهت کنترل قارچ *S. sclerotiorum* معرفی گردید. این جدایه با توجه به اثر بازدارندگی زیادی که روی جوانه‌زنی اسکلروت‌های قارچ *S. sclerotiorum* دارا می‌باشد و با توجه به نقش مؤثر آن در کنترل شدت بیماریزایی در اندام هوایی کلزا، می‌تواند به‌عنوان عامل مؤثر در کنترل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا معرفی گردد. همچنین تلفیق این استرین و قارچ *T. virens* می‌تواند به‌خوبی شدت بیماری را روی اندام هوایی کلزا کنترل نماید. اگرچه این جدایه می‌تواند به‌خوبی با بیمارگر مقابله کند، ولی برای تأیید قدرت آنتاگونیستی این عامل انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای امری ضروری به نظر می‌رسد که در دست انجام است. ساوچک در سال ۲۰۰۲ در بررسی یک جدایه *P. chlororaphis* مشخص کردند که این جدایه نه‌تنها در آزمایشگاه می‌تواند سبب کنترل بیمارگر شود، بلکه در دو سال متوالی در مزرعه توانست قارچ *S. sclerotiorum* را کنترل کند.

یکی از اثرات قابل توجه ریزوباکتری‌ها، تاثیر آنها در افزایش رشد گیاه میزبان است. در باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاهی یا PGPR افزایش رشد گیاه به واسطه تثبیت نیتروژن، حل کردن فسفات و تولید هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین و سیتوکینین و محرک‌های گازی رشد، نظیر اتیلن حاصل می‌شود (Vessey 2003). کاربرد استرین UTPF68 موجب کاهش شدت بیماری در لوبیای آلوده به *R. solani* پس از یک هفته رشد در خاک طبیعی گردید. میزان تولید ترکیب سالیسیلیک‌اسید در این باکتری در حد مناسبی بود. به‌احتمال زیاد، سالسیلیک‌اسید تولیدشده به‌وسیله باکتری *P. fluorescens* در ریزوسفر، در ایجاد پدیده مقاومت ISR (Induced Systemic Resistance) دخالت دارد (Maurhofer *et al.* 1998).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که توان آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنت بر علیه بیمارگرهای خاکزاد به آنزیم‌های تجزیه‌کننده تولیدشده به‌وسیله این باکتری‌ها مربوط است (Meena *et al.* 2001, Velazhahan *et al.* 1999, Lim *et al.* 1991).

در اولین مرحله غربالگری این استرین، هاله بازدارندگی قابل توجهی را در مقابل قارچ‌های *S. sclerotiorum*، *R. solani* به‌ترتیب روی گیاهان کلزا و لوبیای معمولی و *F. oxysporum* به‌وجود آورد. ایجاد هاله بازدارندگی مشخص به‌وسیله این باکتری در مقابل این قارچ‌ها ناشی از تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، متابولیت‌های سمی یا سیدروفورها است که به‌عنوان مکانیسم‌های بیوکنترلی به‌حساب می‌آیند (Swadling and Jeffries 1996). عوامل کنترل بیولوژیک که می‌توانند بیش از یک بیمارگر را کنترل نمایند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. در این پژوهش مشخص شد که این باکتری توان بازدارندگی در مقابل چندین قارچ بیماریزا را دارد.

کشت متقابل تلفیق استرین UTPF68 و قارچ آنتاگونیست با قارچ *S. sclerotiorum* نشان داد که با توجه به شکل کاربرد تلفیقی تریکودرما با باکتری در مقایسه با کاربرد تنهایی تریکودرما از نظر میزان هاله بازدارندگی، کلنیزه‌کردن کلونی قارچ *S. sclerotiorum* و کاهش تولید اسکلروت به‌وسیله بیمارگر تفاوتی وجود ندارد. همچنین مشخص شد که استرین باکتری و قارچ

تریکودرما هیچ گونه اثر بازدارندگی روی یکدیگر ندارند. بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی باکتری آنتاگونیست و قارچ تریکودرما به‌تنهایی و به‌صورت تلفیقی در جلوگیری از رشد *S. sclerotiorum* نشان داد که میزان درصد کنترلی ترشحات مایع خارج سلولی استرین UTPF68 در غلظت ۲۵ درصد به صورت تنهایی (۵۹/۳ درصد) بیشتر از زمانی بود که در تلفیق با قارچ *Trichoderma virens* به‌کار برده شد (۳۷/۷درصد).

دومین پارامتر تکنیک غربالگری یک آنتاگونیست، داشتن قابلیتی برای انتخاب عوامل بیوکنترل با کارایی زیاد پس از غربالگری آزمایشگاهی اولیه می‌باشد. چرا که این‌کار همچنین نحوه فعالیت باکتری را در تجزیه‌کردن دیواره سلولی قارچ از راه تولید آنزیم‌های هیدرولیتیکی مشخص می‌کند. توانایی این باکتری آنتاگونیست در تولید برخی آنزیم‌های پروتئولیتیک در این پژوهش مشخص شد. نتایج حاصل از تولید متابولیت‌ها نشان می‌دهد که استرین‌های مختلف سودوموناس‌های فلورسنت مقادیر مختلفی از ترکیبات ضدقارچی تولید می‌کنند. پارازیتیسم یکی از مکانیسم‌های مهمی است که در کنترل بیولوژیک توسط سودوموناس‌های فلورسنت دخالت دارد. آنزیم‌های مختلف تخریب‌کننده دیواره سلولی مانند کیتیناز، بتا-۱و۳-گلوکاناز در این مرحله از فعالیت باکتری دخالت دارند و مهم هستند.

همچنین پروتئاز تولیدشده به‌وسیله سودوموناس‌های فلورسنت ممکن است موجب غیرفعال‌شدن آنزیم‌های هیدرولاز و فیتوتوکسین‌های تولیدشده به‌وسیله قارچ‌های بیمارگر شده، به‌این ترتیب، سبب کاهش بیماریزایی آنها می‌شود. این موضوع در مورد قارچ *F. oxysporum* به‌اثبات رسیده است. استرین UTPF68 با ایجاد هاله شفاف به قطر ۵ سانتیمتر یکی از استرین‌های خوب از نظر قابلیت تولید آنزیم پروتئاز است. این استرین همچنین قادر به تولید آنزیم آمیلاز است. نتایج حاصل از سنجش سایر آنزیم‌ها در محیط اختصاصی نشان داد. این استرین قادر به تولید آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز و لیپاز و بتا-۱و۳ -گلوکاناز نیست.

بسیاری از باکتری‌های ریزوسفر اثر مثبت مستقیمی روی رشد گیاه دارند و می‌توانند به‌طور مستقیم سلامتی گیاه را تقویت کنند. بررسی در منابع نشان می‌دهد که تولید ایندول‌استیک‌اسید (IAA) توسط باکتری‌های مفید موجب تشدید رشد و توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان خود می‌شوند (Patten and Glick 2002). در این پژوهش استرین UTPF68 توانایی زیادی در تولید هورمون اکسین داشت. این هورمون در تشدید توسعه ریشه و به‌دنبال آن، رشد و تقویت گیاه نقش مهمی ایفا می‌کند. علاوه بر این مشخص شده است که محلول‌سازی آهن از طریق سیدروفورهای میکروبی و حل‌کردن فسفر به‌وسیله آنزیم فسفاتاز سبب افزایش عملکرد محصولات زراعی می‌شوند (Kloepper *et al.* 1988). بررسی‌های انجام‌گرفته در این تحقیق نشان داد که این باکتری آنتاگونیست دارای ظرفیت خوبی در تولید سیدروفور می‌باشد که بر خصوصیت آنتاگونیستی آن روی قارچ‌های بیماریزا اثر بسزایی دارد.

در این تحقیق مشخص شد که استرین UTPF68 جدا شده از ریزوسفر برنج به‌واسطه داشتن خصوصیات تحریک‌کننده رشد گیاه مانند تولید هورمون اکسین، سالیسیلیک‌اسید، سیدروفور، پروتئاز و نداشتن خصوصیات آسیب‌رسان و زیان‌آور (Deleterious) مانند سلولاز و پکتیناز می‌تواند به‌عنوان یک عامل بیوکنترل مؤثر در تحریک رشد گیاه به‌همراه کاهش شیوع بیماری مطرح باشد. اما آزمایشات گلخانه‌ای جهت بررسی کارایی باکتری مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق، فرایند غربالگری منجر به انتخاب باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* استرین UTPf68 شد که توانایی خوبی در کنترل قارچ‌های بیماریزا مانند *S. sclerotiorum* ، *R. solani* دارد.

پیشرفت‌های عظیمی که در سی سال گذشته در زمینه شناسایی مکانیسم‌های کنترل بیمارگرها به‌وسیله سودوموناس‌های فلورسنت حاصل شده است، زیربنایی برای آینده کنترل بیولوژیکی به‌وسیله این باکتری‌های فلورسنت به‌شمار می‌رود. با این‌حال، اطلاعات زیادی در زمینه برهم‌کنش‌های اکولوژیکی که در خاک و محیط ریشه رخ داده و بر تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی تاثیر می‌گذارند، مورد نیاز می‌باشد. با این دانش، استرین‌های بیوکنترل می‌توانند برای استفاده در محیط‌های خاص شناسایی شده و زادمایه‌ای با کارایی بهینه فراهم گردد. با تغییر محیط ریزوسفر نیز می‌توان مکان را برای

استرین‌ها مناسب نماید و یا استرین‌هایی ساخته شوند که مستقل از سیگنال‌های محیطی باشند. بنابراین، اثر آنتاگونیستی این جدایه در مزارع به‌منظور ارائه راه کارهای عملی کنترل بیولوژیکی باید مورد ارزیابی قرار گیرد.

REFERENCES

Ahamadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Rahimian H (1997) Isolation of antagonistic bacteria from chickpea rhizosphere and study on their repression against *Pythium ultimum* casual agent of seed rot and seedling damping-off. Iranian Journal of Agricultural Sciences 28: 81-86.

Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A (2008) Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. Biological Control 48: 101–107.

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

Expert JM, Digat B (1995) Biocontrol of *Sclerotium* wilt of sunflower by *Pseudomonas putida* strains. Canadian Journal of Microbiology 41: 685-691.

Fahy PC, Persley GJ (1983) Plant bacterial diseases. A diagnostic guide. Acad. Press, New York.

Frapolli M, Défago G, Moënne-Loccoz Y (2007) Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas spp*. producing th antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. Environmental Microbiology 9: 1939-1955.

Fravel DR (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology 26: 75-91.

Gould WD, Hagedorn C, Bardinelli TR, Zablotowitz RM (1985) New selective media for enumeration and recovery of flourescent pseudomonads from various habitats. Applied and Environmental Microbiology 49: 28–32.

Haas D and Défago G (2005) Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Review of Microbiolology 3: 307–319.

Keel C Défago G (1997) Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. In: A. C. Gange & V. K. Brown (Eds.), *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems.* (pp. 27-46). The 36th Syposium of the British Ecological Society, Royal Holloway College, University of London, UK, Blackwell Science.

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

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

King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanine and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301–307.

Kloepper JW, Leong J, Teintzte M, Schroth MN (1980) *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. Curr. Microbiol. 4: 317-320.

Kloepper JW, Lifshitz R, Schroth MN (1988) *Psuedomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci.: Animal and Plant Sciences 60-64.

Kraus J, Loper JE (1990) Biocontrol of *Pythium* Damping-off of Cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Mechanistic Studies In: "Plant Growth Promoting Rhizobacteria", (Eds.): Keel C, Koller B, Defago G. The Second International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria, Switzerland, PP. 174-177.

Leong J (1986) Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 24: 187-209.

Lim H Kim Y, Kim S (1991) *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against Fusarium solani, an agent of plant root rot. Applied and Environmental Microbiology 57: 510–516.

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

Maurhofer M, Keel C, Sehnider U, Voisard C, Haas D, Défago G (1992) Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomotuu fluorescent* strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phytopathology 91: 190.

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

Meena B Marimuthu T, Vidhyasekaran P, Velazhahan R (2001) Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. Journal of Plant Disease Protection 108: 369–381.

Miller JH (1974) experiments in molecular genetics. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.

Notz R Maurhofer M, Schnider-Keel U, Duffy B, Haas D, Défago G (2001) Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene phlA in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. Phytopathology 91: 873-881.

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

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

Raaijmakers JM, Leeman M, Schipers B, Baker PA (1995) Dose-response relationships in biological control of radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 85: 1075-1081.

Savchuk S, Fernando WGD (2004) Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. FEMS Microbiology and Ecology 49: 376–388.

Savchuk SC (2002) Evaluation of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola (*Brassica napus*) in the laboratory, in the greenhouse, and in the field. M.Sc., University of Manitoba, pp. 49-83.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria .3rd edition, APS Press, St. Paul, Minn. USA.

Schipper B, Bakker AW, Bakker AHM (1987) Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology 25: 339-358.

Schisler DA, Slininger P J (1997) Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 19: 172–179.

Siddiqui IA, Shaukat SS (2002) Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica.* Journal of Phytopathology 150: 469-473.

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

Swadling IR, Jeffries P (1996) Isolation of microbial antagonists for biocontrol of grey mould disease of strawberries. Biocontrol Science Technology 6: 125-136.

Velazhahan R Samiyappan R, Vidhyasekaran P (1999) Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* strains against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzymes. Journal of. Plant Disease Protection 106: 244-250.

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

Voisard C Keel C, Haas D. and Defago G (1989) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* help suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO Journal 8: 351-358.

Wang C Ramette A, Pungasamarwong P, Zala M, Natsch A, Moenne loccoz Y, Defago G (2001) Cosmopolitan distribution of phlD-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. FEMS Micrbiology and Ecology 37: 105-116.

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

Berg G Fritz, A, Rostock N, and Smalla K (2001) Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. Journal of Applied Microbiology 91: 963-971.

Biological Control of Pests and Plant Diseases,
No. 1, 2012

Introduction of *Pseudomonas fluorescens* as a New Biocontrol Agent in Iran

AHMADZADEH M[1]. AND GHASEMI S.[2]
[1]Department of Plant Protection, University of Tehran
[2] MSc of Plant Pathology, University of Tehran; Researcher in Nature Biotechnology Co.
(Received: January 5, 2011 - Accepted: April 22, 2012)

ABSTRACT

Fluorescent pseudomonads are important biocontrol agents showing capability to restrict or suppress phytopathogens, especially the fungal pathogens via production of some inhibitory metabolites and siderophores directly, and promote the plant growth through some different phytohormones. The objective of this research is to screen and introduce *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 as a new biocontrol and plant growth promoting rhizobacterium that is isolated from the canola rhizosphere in Dashte-Naz (Mazandran province). This strain was evaluated in biocontrol laboratory of Plant Protection Department at University of Tehran, for controlling of soilborne pathogens under *in vitro* and *in vivo* conditions. Production of siderophore, hydrogen cyanide (HCN), salicylic acid (SA), antibiotics diacetylphloroglucinol (DAPG) and pyoluteorin (Plt), and some lytic enzymes were determined. In greenhouse trials, biocontrol effects on *Sclerotinia sclerotiorum* (in canola), *Rhizoctonia solani* (in bean) and *Fusarium oxysporum* were studied. Also, bacterial biocontrol effects in combination with *Trichoderma virens* was evaluated. The results showed that the strain UTP68 is a promising candidate to be commercially applied in Iran. It is worth to be considered further for developing an efficient biopesticide.

Keywords: Fluorescent pseudomonads, Biocontrol, Siderophore, HCN, Auxin, SA, DAPG, Plt,

* Corresponding author: GHASEMI, S. E-mail: s_ghasemi@alumni.ut.ac.ir