نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (۱۱۶-۱۰۵)

بررسی ویژگی‌های زیستی باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 و ارزیابی توان بیوکنترلی آن علیه *Phytophthora drechsleri* روی خیار

۱. سمیه سادات قافله‌باشی؛ ۲. فاطمه جمالی؛ ۳. مسعود احمدزاده*
۱ و ۳. دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد و استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲. استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۲/۲)

چکیده

در این تحقیق از باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68، عامل کنترل بیولوژیک، علیه *Phytophthora drechsleri* استفاده شد. ترکیبات فرّار سویهٔ UTPF68 در سه محیط کشت NA، NAG و PDA به‌ترتیب ۸۴/۴۴ درصد، ۸۳/۵۵ درصد و ۶۷/۳۳ درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی *P. drechsleri* را در برداشت. نتایج نشان داد که متابولیت‌های خارج‌سلولی تولیدشده توسط سویهٔ UTPF68 در محیط کشت PDA به‌طور کامل از رشد *P. drechsleri* ممانعت و در محیط کشت CMA به میزان ۹۳/۳ درصد از رشد بیمارگر جلوگیری کرد. سلول و عصارهٔ سویهٔ UTPF68 در سه غلظت ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد، درون محیط مایع، به‌طور کامل از رشد *P. drechsleri* جلوگیری کرد. همچنین، این باکتری توانست هر سه آنتی‌بیوتیک DAPG، MAPG و Plt را در محیط کشت KBG تولید کند. نتایج نشان داد که این باکتری می‌تواند هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* را به کنترل *P. drechsleri* درآورد؛ به‌طوری که، کاربرد غلظت $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر از این باکتری در خاک، خسارت ناشی از این بیمارگر را تا ۶۰ درصد کاهش داد. مایه‌زنی این باکتری با خاک در حضور و نبود بیمارگر باعث بهبود فاکتورهای رشدی گیاه تحت شرایط گلخانه شد. به‌طوری که از این لحاظ با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری نشان داد. بررسی کلنیزاسیون ریشهٔ خیار نشان داد که این باکتری بعد از گذشت دو هفته، توانست منطقهٔ ریزوسفر با جمعیت $۲/۳\times۱۰^{۹}$ در گرم ریشه را کلنیزه کند.

کلیدواژگان: آنتی‌بیوتیک، عصارهٔ سلولی، کلنیزاسیون، کنترل بیولوژیک، متابولیت‌های خارج‌سلولی.

مقدمه

عوامل بیوکنترل مناسب به‌منظور کنترل عوامل بیماریزای هوازاد و خاکزاد باید بتوانند در منطقهٔ ریزوسفر و فیلوسفر حضور و بقا داشته باشند. از میان انواع عوامل بیوکنترل، سودوموناس‌های فلورسنت به‌خوبی می‌توانند در مناطق ریزوسفر و در فیلوسفر بقا یابند (Rabindran and Vidhysaekaran 1996).

در این پژوهش از سویهٔ بیوکنترل *P. fluorescens* UTPF68 به‌عنوان یکی از باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی استفاده شد. این سویه به‌واسطهٔ داشتن خصوصیات تحریک‌کنندگی رشد گیاه، مانند تولید هورمون اکسین، سالیسیلیک اسید، سیدروفور، پروتئاز و نداشتن خصوصیات زیان‌آور[1] برای گیاه مانند سلولاز و پکتیناز، به‌عنوان یک باکتری مؤثر در تحریک رشد گیاه به همراه

* تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۲۵۵۱۷
E-mail: ahmadz@ut.ac.ir
1. Deleterious

توانایی کاهش بیماری مطرح است (Ahmadzadeh and Ghasemi 2012). تحقیقات نشان داده است که این سویه در سطح گلخانه می‌تواند بیمارگر *Sclerotinia sclerotium* در گیاه کلزا و بیمارگر *Rhizoctonia solani* در گیاه لوبیا را کنترل کند (Ahmadzadeh and Ghasemi 2012).

بیماری بوته‌میری جالیز یکی از بیماری‌های مهم گیاهان جالیزی است که هرساله خسارت‌های جبران‌ناپذیری به محصولات در مزرعه و همچنین، به محصول خیار درختی در گلخانه‌ها وارد می‌کند. اولین‌بار عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشهٔ خیار (*Phytophthora drechsleri*) را توکر جداسازی، شناسایی و نام‌گذاری کرد و خصوصیات آن را شرح داد (Tucker 1931). در ایران، اولین‌بار این بیماری را شریف، در اصفهان، از روی خربزه گزارش کرد (Ershad and Mostofipour 1969). ولی بررسی جدی دربارهٔ این بیماری از سال ۱۳۴۲ شروع شد (Ershad and Mostofipour 1969) این بیماری در نقاط مختلف ایران مانند خوزستان، فارس، کرمان، یزد، اصفهان، تهران، مرکزی، قزوین، مازندران و آذربایجان شیوع دارد (Alavi 1973).

P. drechsleri در تمام مراحل رشد گیاه میزبان می‌تواند به آن حمله کند. عامل بیماری، به‌دلیل خاک‌زادبودن، ابتدا به ریشه و طوقهٔ گیاه حمله می‌کند و در صورت مناسب بودن شرایط محیطی، گیاه میزبان در مدت کوتاهی پژمرده می‌شود و سپس، از بین می‌رود (Alavi 1973). در مرحلهٔ گیاهچه، محل حملهٔ قارچ باریک و نرم و باعث پژمرده‌شدن و افتادن گیاه می‌شود (Hwang and Beneson 2005). بنابراین، استفاده از عامل بیوکنترل مناسب علیه این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق بررسی برخی ویژگی‌های زیستی سویهٔ *P. fluorescens* UTPF68 و میزان تأثیر آن علیه *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

تهیهٔ جدایهٔ *P. drechsleri*

در این بررسی از *P. drechsleri* استفاده شد که از طوقه‌های گیاه خیار جداسازی شده بود. این جدایه از مرکز تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. بعد از انتقال به آزمایشگاه، مجدد آزمون بیماریزایی روی گیاه خیار در گلخانه انجام شد (Ghafelebashi 2012).

تهیهٔ باکتری آنتاگونیست

باکتری *P. fluorescens* UTPF68 از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست بخش بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران، تهیه شد.

بررسی برخی خصوصیات آنتاگونیستی باکتری

تأثیر باکتری *P. fluorescens* UTPF68 در بازدارندگی از رشد بیمارگر درون تشتک پتری

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر (*P. drechsleri*) در شرایط آزمایشگاه از روش Hagedron *et al.* (1989) استفاده شد. به این صورت که باکتری به‌صورت نقطه‌ای روی محیط کشت PDA+NA و به فاصلهٔ ۰/۵ سانتی‌متر از لبهٔ تشتک پتری کشت داده شد. همچنین، محیط کشت‌های PDA+NA حاوی و بدون عامل آنتاگونیست به‌عنوان تشتک پتری شاهد در نظر گرفته شد. ۴۸ ساعت بعد، قرصی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از محیط کشت حاوی *P. drechsleri* مورد نظر در وسط تشتک پتری قرار گرفت. تشتک‌های پتری به‌مدت یک هفته، در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. وجود هالهٔ بازدارندگی به‌عنوان واکنش مثبت بازداری از رشد بیمارگر تلقی شد. برای مقایسهٔ قدرت بازدارندگی، فاصلهٔ کلونی باکتری تا میسلیوم بیمارگر اندازه‌گیری شد. آزمایش در چهار تکرار انجام شد.

تأثیر ترکیبات فرّار ضد قارچی باکتری علیه بیمارگر

۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰۸ CFU/ml از سویهٔ باکتری با میلهٔ شیشه‌ای در سطح محیط کشت NAG، NA و PDA پخش شد و تشتک‌های پتری به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس، قرص‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ کشت پنج روزهٔ فیتوفترا در مرکز تشتک‌های پتری حاوی CMA کشت شدند. آنگاه، در کنار شعله با رعایت شرایط سترون، تشتک‌های پتری حاوی *P. dreshsleri* به‌طور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های آنتاگونیست

قرار داده شدند و لبهٔ تشتک‌های پتری روی هم قرار گرفته و با نوار پارافیلم کاملاً مسدود شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس و به‌مدت یک هفته نگه‌داری شدند. در تشتک پتری شاهد CMA حاوی فیتوفتورا در مقابل تشتک پتری حاوی محیط کشت NAG، NA و PDA بدون آنتاگونیست قرار داده شد (Kraus and Loper 1992). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سه تیمار در سه تکرار برای هر نوع محیط کشت اجرا شد. داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش (قطر رشد کلونی) تجزیه و تحلیل آماری شدند.

$$(B-A)/B\times ۱۰۰=C$$

A: قطر رشد پرگنهٔ تیمار

B: قطر رشد پرگنهٔ شاهد

C: درصد بازداری از رشد بیمارگر

تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی باکتری *P. fluorescens* UTPF68 روی بیمارگر

این آزمون مطابق روش کراس و لوپر انجام شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری و آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد به محیط کشت اضافه و با میلهٔ شیشه‌ای در سطح محیط کشت PDA و CMA پخش شد و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس، با استفاده از میلهٔ شیشه‌ای و آب مقطر سترون، باکتری از سطح محیط کشت شسته شد و تشتک‌های پتری به‌طور وارونه ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس، یک قرص به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ کشت پنج روزهٔ بیمارگر با رعایت شرایط سترون، در مرکز هر تشتک پتری کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند و قطر رشد کلونی پس از رسیدن میسلیوم فیتوفتورای شاهد به انتهای تشتک پتری اندازه‌گیری شد (Kraus and Loper 1992). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل چهار تیمار در سه تکرار انجام شد (دو تیمار شامل آب مقطر و قارچ در دو محیط کشت PDA و CMA و دو تیمار دیگر شامل سوسپانسیون باکتری در دو محیط کشت PDA و CMA) و داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش (قطر رشد کلونی) تجزیه و تحلیل آماری شدند.

$$(B-A)/B\times ۱۰۰=C$$

A: قطر رشد پرگنهٔ تیمار

B: قطر رشد پرگنهٔ شاهد

C: درصد بازداری از رشد بیمارگر

تأثیر سلول باکتری در جلوگیری از رشد میسلیومی *P. drechsleri* در محیط مایع

درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت PDB ریخته شد. پس از سترون‌شدن ارلن‌ها، ۵۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری درون محیط TSB، درون ارلن‌ها ریخته شد و هم‌زمان پنج دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ کلونی چهار روزهٔ فیتوفتورای رشدیافته روی محیط CMA، درون ارلن‌ها ریخته شد. برای این آزمایش دو شاهد در نظر گرفته شد. یک شاهد فیتوفتورا که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محیط TSB سترون بدون باکتری و پنج دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ کلونی چهار روزهٔ فیتوفتورای رشدیافته روی محیط CMA بود، درون ارلن‌ها ریخته شد و شاهد دیگر که ۵۰۰ میکرولیتر از محیط TSB سترون بدون باکتری و پنج دیسک ۵ میلی‌متری از محیط کشت CMA بدون بیمارگر در ارلن ریخته شد. سپس، ارلن‌ها درون شیکر با دور ۲۱۰ دور در دقیقه به‌مدت یک هفته قرار داده شد. بعد از گذشت یک هفته، وزن خشک میسلیومی فیتوفتورا اندازه‌گیری شد. به این صورت که ابتدا، کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۴/۱، روی ترازوی حساس وزن شد و سپس، کاغذ صافی درون قیف روی پمپ خلأ قرار گرفت و محیط حاوی فیتوفتورا روی آن ریخته شد؛ پس از جداشدن محیط از میسلیوم فیتوفتورا، کاغذ صافی حاوی میسلیوم فیتوفتورا به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. سپس، با ترازوی حساس وزن شد. برای شاهدها هم از روش مذکور استفاده شد.

وزن خشک میسلیوم = وزن کاغذ صافی ـ کاغذ همراه با میسلیوم

تأثیر عصارهٔ باکتری در جلوگیری از رشد میسلیومی *P. drechsleri* در محیط مایع

یک لوپ از باکتری تازه کشت‌شده روی KB درون محیط کشت TSB ریخته شد و به‌مدت ۷۲ ساعت روی

شیکر با دور ۲۱۰ دور در دقیقه قرار داده شد، بعد از گذشت ۷۲ ساعت، ۸۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری درون ۲ فالکون (در هر فالکون ۴۰ میلی‌لیتر) ریخته شد و درون سانتریفیوژ با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. فاز رویی برداشته و از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. برای این منظور، از سه غلظت عصارهٔ باکتری ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد استفاده شد. سپس، درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت PDB ریخته شد و هم‌زمان پنج دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ کلونی چهار روزهٔ فیتوفتورای رشدیافته روی محیط CMA، درون ارلن‌ها ریخته شد. برای شاهد فقط محیط TSB سترون بدون باکتری در سه غلظت ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد در نظر گرفته شد و پنج دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ کلونی چهار روزهٔ فیتوفتورای رشدیافته روی محیط CMA، درون ارلن‌ها ریخته شد و شاهد دیگر که تنها محیط TSB سترون بدون باکتری در سه غلظت ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد و پنج دیسک ۵ میلی‌متری از محیط کشت CMA بدون بیمارگر در ارلن ریخته شد. سپس، ارلن‌ها درون شیکر با دور ۲۱۰ دور در دقیقه به‌مدت یک هفته قرار داده شدند. بعد از گذشت یک هفته، وزن خشک میسلیومی فیتوفتورا طبق روش قبل اندازه‌گیری شد. این آزمون با دو تیمار در سه غلظت و سه تکرار انجام شد.

انحلال فسفات معدنی توسط باکتری

برای اندازه‌گیری کیفی توانایی باکتری UTPF68 در انحلال فسفات معدنی از محیط کشت Sperber مطابق روش اسپربر استفاده شد (Sperber 1958). محیط کشت پس از سترون‌شدن، درون تشتک‌های پتری با قطر ۸ سانتی‌متری ریخته شد. محیط کشت در حین انتقال به تشتک‌های پتری به‌طور مرتب با هم‌زن سترون هم زده شد تا تری‌کلسیم فسفات در تمام حجم محلول به‌طور یکنواخت پخش شود. ۵ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری برداشته شد و به‌صورت نقطه‌ای روی محیط اسپربر کشت شد. پس از آن، تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس و در شرایط تاریکی منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت قطر پرگنه و هالهٔ شفاف اطراف آن اندازه‌گیری شد که نشان‌دهندهٔ خاصیت حل‌کنندگی فسفات آن است و نسبت قطر هاله به قطر پرگنه محاسبه شد. اندازه‌گیری در چهار نوبت و به‌صورت یک روز در میان انجام شد.

استخراج و تشخیص آنتی‌بیوتیک

استخراج آنتی‌بیوتیک‌های Plt, MAPG, DAPG

سویهٔ باکتری از نظر تولید آنتی‌بیوتیک با استفاده از کروماتوگرافی مایع کارا (HPLC) در محیط کشت مایع بررسی شد. استخراج آنتی‌بیوتیک به روش Maurhofer *et al.* (1992) و Notz *et al.* (2001) انجام شد.

سویهٔ باکتری UTPf68 در محیط کشت King B broth غنی‌شده با ۱۰ گرم گلوکز (KBG) در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس بر شیکر با دور ۱۶۰ دور در دقیقه کشت داده شدند.

نمونه‌گیری و استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پس از ۴۸ ساعت انجام شد. pH محیط با استفاده از HCl دو نرمال بین دو و سه تنظیم شد. سپس، اتیل‌استات به نسبت ۱:۱ به محیط کشت اضافه شد. در ارلن‌های حاوی محیط کشت و اتیل‌استات با درپوش بسته و به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌شدت تکان داده شدند. فاز آلی حاوی آنتی‌بیوتیک از فاز مایع حاوی باکتری‌ها و مواد معدنی به کمک فیلترهای با پوشش سیلیکونی (Macherey-Nagel 5160 Düren, Germany) جدا شد. اتیل‌استات در دستگاه Rotary evaporator (HETOVAC; Heto Lab Equipment, Allerod, Denmark) به‌طور کامل تبخیر شد و باقیمانده در ۱ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC حل شد. این محلول پس از ۳۰ دقیقه نگه‌داری در ۲۰- درجهٔ سلسیوس، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، محلول رویی به فلاسک‌های HPLC منتقل شد.

تشخیص و تعیین کمیت آنتی‌بیوتیک‌ها

ردیابی و اندازه‌گیری کمی آنتی‌بیوتیک‌ها با دستگاه HPLC مجهز به شناساگر (Hewlett Packard 1090; Hewlett Packard 1090 Co; Pal Alto, CA) انجام شد و از ستونی به ابعاد ۱۰۰×۴ میلی‌متر از نوع Nucleosil 120-5-C18

(Macherey-Nagel, Düren, Germany) با روش فاز معکوس در دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس استفاده شد.

برای دستیابی به پیک استاندارد، ۱۰۰ میکروگرم از نمونه‌های خالص هر آنتی‌بیوتیک در ۵۰۰ میکرولیتر متانول مخصوص HPLC حل شد. نمونه‌ها (۱۰ میکرولیتر) با سه شیب خطی متانول ۲۳۱-۱۸ درصد (صفر تا پنج دقیقه)، از ۵۳-۲۳ درصد (پنج تا شش دقیقه) و از ۶۸-۵۳ درصد (۶-۱۵ دقیقه) در ۴۳ درصد ارتو فسفریک اسید آنالیزشده و جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود.

۲و۴- دی‌استیل‌فلوروگلوسینول (DAPG)، منواسیل‌گلوسینول (MAPG) و پیولوتئورین (Plt) از طریق جذب ماورای بنفش به‌ترتیب در طول موج‌های ۲۷۰، ۲۹۰ و ۳۳۰ ردیابی شدند. زمان تأخیر برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر به‌ترتیب ۸/۷، ۷/۴ و ۱/۸ دقیقه بود. کمیت آنتی‌بیوتیک‌ها براساس پیک استاندارد و زمان تأخیر، برحسب میکرومول در لیتر محیط کشت محاسبه شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

تهیهٔ مایهٔ تلقیح *P. drechsleri*

۵۰ گرم لوبیا سفید معمولی، کاملاً تمیز و شسته و درون ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و در سه روز متوالی، هر روز به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و در فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع سترون شد. در شرایط کاملاً سترون، چهار قرص به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ کشت جوان (چهار روزه) *P. drechsleri* رشدیافته روی محیط کشت BA به ارلن اضافه شد. ارلن به‌مدت ۲۰ روز در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور نگه‌داری شد.

تهیهٔ مایهٔ تلقیح باکتری

یک لوپ از باکتری رشدیافته روی محیط آگار غذایی (NA) به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتری محیط کشت NB (nutrient broth) منتقل شد و به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. این محیط تحت شرایط سترون درون چهار فالکون سترون ریخته شد. درون هر فالکون ۵۰ میلی‌لیتر، ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. سپس، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g) از محیط مایع NB جدا شدند و فاز رویی بیرون ریخته شد و برای برطرف‌شدن باقیماندهٔ محیط غذایی، به رسوب به‌دست‌آمده سرم فیزیولوژیک به میزان ۲۵ میلی‌لیتر اضافه شد. سپس، سلول‌های باکتری از طریق سانتریفیوژ مجدد، از این محلول جدا شدند و از آن‌ها سرم فیزیولوژیک سوسپانسیون تهیه شد. سپس، به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جمعیت باکتری در ۱۰۸CFU/ml تنظیم شد.

تأثیر کنترل‌کنندگی باکتری علیه بیمارگر در شرایط گلخانه

در بررسی گلخانه‌ای از گلدان‌های پلاستیکی با گنجایش ۳۰۰ گرم خاک سترون استفاده شد. در هر گلدان چهار عدد بذر خیار، رقم کشمیر، در عمق ۳ سانتی‌متری خاک کاشته شد. گلدان‌ها در دمای ۱±۲۷ درجهٔ سلسیوس با تناوب نوری ۱۵ ساعت روشنایی و نه ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. شرایط آزمایش در تمام مراحل از نظر نور و دما یکسان بود.

۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری ۱۰۸ CFU/ml پای هر گلدان مرطوب (گیاهان در مرحله دو برگی) ریخته شد. ۷۲ ساعت بعد، ۲ گرم از مایهٔ تلقیح فیتوفتورا به خاک اضافه شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار اجرا شد. در این آزمایش، تیمار شاهد آلوده حاوی ۲ گرم مایهٔ تلقیح فیتوفتورا در هرگلدان و شاهد غیرآلوده حاوی ۲ گرم لوبیا سفید سترون‌شده بدون مایهٔ تلقیح فیتوفتورا در هر گلدان بود. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد.

ارزیابی شدت بیماری

گلدان‌ها به‌صورت یک روز در میان آبیاری شدند. بعد از سه هفته، ریشه‌ها به ملایمت در زیر آب شسته شدند و شدت بیماری آن‌ها براساس مقیاس صفر تا پنج، ارزیابی شد (Kim and Hwang 1992). مقیاس‌دهی به‌صورت زیر انجام شد:

۰= گیاهان سالم بدون هیچ علائم آلودگی

۱= کمتر از ۳۰ درصد بیماریزایی. وجود لکه‌های کوچک و جزئی در ناحیهٔ طوقه

۲= بیماریزایی ۵۰ـ۳۱ درصد. پوسیدگی کم در ناحیهٔ طوقه

۳= بیماریزایی ۷۰ـ۵۱ درصد. لکه‌های قهوه‌ای آب‌سوخته در محل طوقه، همراه با پیشرفت پوسیدگی و ایجاد فرورفتگی در محل طوقه

۴= بیماریزایی ۹۰ـ۷۰ درصد. فرورفتگی شدید در محل طوقه و نازک‌شدن ناحیهٔ طوقه و زردشدن برخی برگ‌ها

۵= بیماریزایی ۱۰۰ درصد. گیاه کاملاً از بین‌رفته (مرگ گیاه).

شاخص بیماری (DI=disease index) برحسب درصد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد که می‌توان با کم‌کردن آن از عدد ۱۰۰، درصد کنترل بیماری را محاسبه کرد (Liu *et al*. 1995).

تأثیر باکتری در افزایش رشد گیاه خیار در گلخانه

مطابق روش مذکور بذرهای خیار در گلدان‌ها کاشته و نگه‌داری شدند. سپس، ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری ۱۰۸ CFU/ml پای هر گلدان مرطوب (گیاهان در مرحلهٔ دوبرگی) ریخته شد. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. سپس، طول ریشه و ساقه و وزن تر و خشک گیاه محاسبه شد.

الگوی کلنیزاسیون ریشهٔ خیار توسط سویهٔ UTPF68

این آزمایش مطابق روش Yan *et al*. (2003) اجرا شد. به این ترتیب که بذور خیار با ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱۰۸ سترون UTPF68 مایه‌زنی شدند. در گلدان‌هایی کاشته شدند که خاک آن‌ها در دمای ۱۲۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت چهار ساعت در دو روز متوالی سترون شده بودند. نمونه‌برداری از ریشه‌ها به‌ترتیب در ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از کاشت بذور انجام شد و در طی چهار هفته، مقدار جمعیت باکتری روی ریشه و میزان کلنیزاسیون ریشه بعد از چهار هفته به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS و مقایسهٔ میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطح ۰/۰۱ انجام شد.

نتایج و بحث

قدرت بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر درون تشتک پتری

باکتری درون تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA توانست *P. drechsleri* را کنترل کند و هالهٔ بازدارندگی به قطر ۱/۷ سانتی‌متر ایجاد کرد. وجود هالهٔ بازدارندگی نشان‌دهندهٔ تولید متابولیت‌های بازدارنده از سوی باکتری است.

تأثیر ترکیبات فرّار ضد قارچی باکتری بر بیمارگر

بررسی‌ها نشان داد که باکتری در هر سه محیط NA، NAG و PDA توانست ترکیبات فرّار ضد قارچی را تولید کند. باکتری رشدیافته در هر سه محیط کشت توانست از رشد میسلیومی *P. drechsleri* جلوگیری کند. از جمله ترکیبات فرّاری که توسط جدایه تولید می‌شود، می‌تواند سیانید هیدروژن باشد که تولید آن توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنس به اثبات رسیده است (Castric and Castric 1983). تولید ترکیبات فرّار توسط جدایه‌های *P. fluorescens* یکی از مکانیسم‌های کنترل بیماری‌های قارچی است (Wuthrich and Defago 1990, Kraus and Loper 1992, Keel *et al*. 1997).

همان‌طور که در شکل ۱ آمده است ترکیبات فرّار ضد قارچی تولیدشده از باکتری رشدیافته در محیط کشت NA، توانایی بیشتری در بازدارندگی از رشد *P. drechsleri* داشت (۸۴/۴۴ درصد). افزودن ۲ درصد گلوکز به محیط کشت NA تأثیری در افزایش بازدارندگی از رشد *P. drechsleri* نشان نداد. ترکیبات فرّار ضد قارچی تولیدشدهٔ باکتری *P. fluorescens* UTPF68 در محیط کشت PDA، نسبت به دو محیط قبلی در بازدارندگی از رشد بیمارگر تفاوت معنی‌دار نشان داد و تأثیر کمتری در بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر را داشت (شکل ۱).

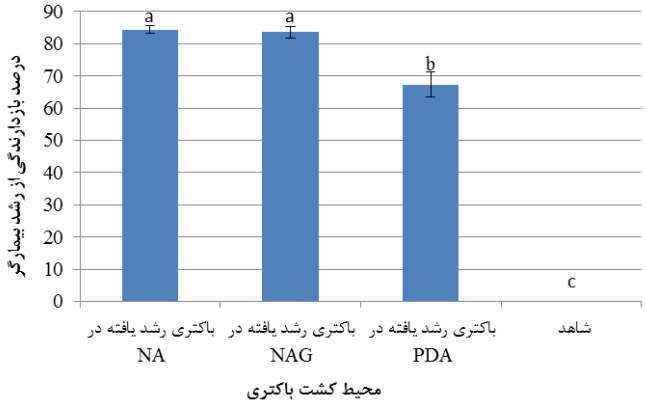
تأثیر متابولیت‌های خارج‌سلولی باکتری *P. fluorescens* UTPF68 روی بیمارگر

متابولیت‌های تولیدشده توسط سویهٔ UTPF68 در محیط کشت PDA بعد از ده روز، به‌طور کامل مانع از

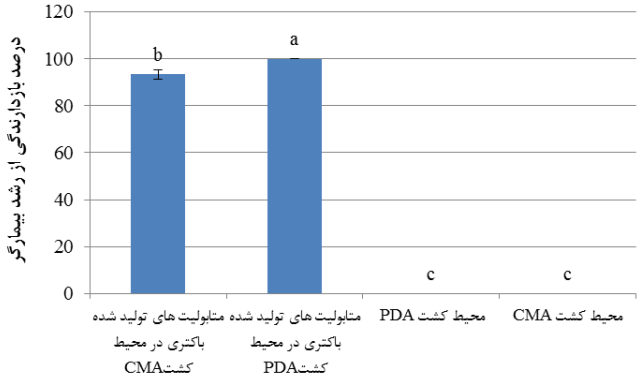
رشد میسلیومی *P. drechsleri* شد. در محیط کشت CMA، کلونی *P. drechsleri* به مقدار اندکی توانست رشد کند، اما به لحاظ آماری با محیط کشت PDA تفاوت معناداری نداشت (شکل ۲).

تأثیر سلول باکتری در جلوگیری از رشد میسلیومی *P. drechsleri* در محیط مایع

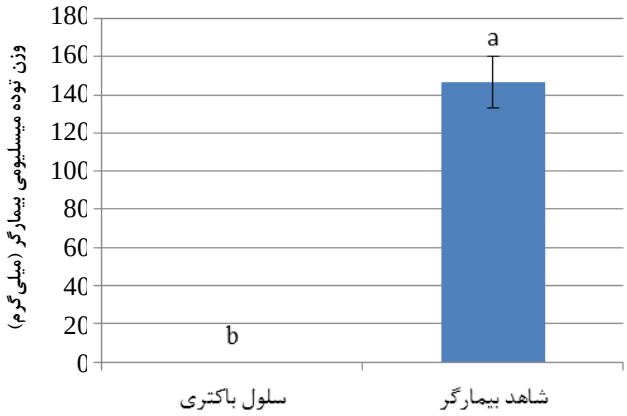
سلول باکتری درون محیط مایع به‌طور کامل از رشد *P. drechsleri* جلوگیری کرد (شکل ۳).



شکل ۱. تأثیر ترکیبات فرّار باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 رشدیافته در محیط کشت‌های مختلف بر جلوگیری از رشد *Phytophthora drechsleri*



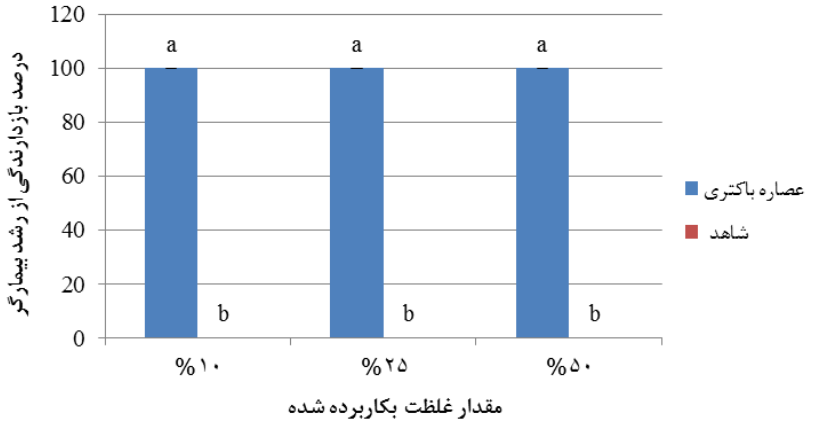
شکل ۲. تأثیر متابولیت‌های تولیدشده باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 در دو محیط کشت جامد (CMA, PDA) در جلوگیری از رشد *Phytophthora drechsleri*



شکل ۳. تأثیر سلول باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 روی رشد میسلیومی *Phytophthora drechsleri* در محیط مایع

تأثیر عصارهٔ باکتری در جلوگیری از رشد میسلیومی *P. drechsleri* در محیط مایع

عصارهٔ باکتری در هر سه غلظت ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد در محیط مایع به‌طور کامل مانع از رشد *P. drechsleri* شد (شکل ۴). تحقیقات مفصلی در مورد نوع ترکیبات موجود در ترشحات مایع برون‌یاخته‌ای *P. fluorescens* انجام و مشخص شده است که یکی از ترکیبات مهم آن‌ها آنتی‌بیوتیک‌هاست که انواعی از آن‌ها جدایه‌هایی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌های فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید، ۲ هیدروکسی-فنازین ۱-کربوکسیلیک اسید، ۲-هیدروکسی-فنازین، ۲و۴ دی‌استیل‌فلوروگلوسینول، پیولوتئورین و پیرول‌نیترین توسط محققان مختلفی از جدایه‌های *P. fluorescens* گزارش شد و تأثیرات آن‌ها در بازداری از رشد ریسهٔ قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها به اثبات رسیده است (Chin-A-Woeng *et al.* 1997, Savchuk *et al.* 2001).



شکل ۴. تأثیر عصارهٔ برون‌سلولی فیلترشدهٔ باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 روی رشد میسلیومی *Phytophthora drechsleri* (درصد بازداری از وزن خشک تودهٔ میسلیومی نسبت به شاهد آزمایش)

انحلال فسفات معدنی

نتایج نشان داد که باکتری در محیط کشت اسپربر می‌تواند فسفات معدنی را حل کند (جدول ۱). یکی از تأثیرات قابل توجه ریزوباکتری‌ها، تأثیر آن‌ها در افزایش رشد گیاه میزبان است. در باکتری‌های افزایش‌دهندهٔ رشد گیاهی یا PGPR، افزایش رشد گیاه به‌واسطهٔ حل‌کردن فسفات و تولید هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین و سیتوکینین حاصل می‌شود (Vessey 2003).

جدول ۱. میزان حل‌کنندگی فسفات معدنی باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 در محیط اسپربر در روزهای مختلف

زمان (روز)	روز دوم	روز چهارم	روز ششم	روز هشتم
میزان حل‌کنندگی فسفات توسط باکتری	۱/۲cm	۱/۵cm	۱/۷cm	۲/۱cm

استخراج و ردیابی آنتی‌بیوتیک‌ها

سویهٔ UTPf-68 از نظر تولید آنتی‌بیوتیک‌های ۴ـ۲ دی‌استیل‌فلوروگلوسینول (DAPG)، مونواسیل‌گلوسینول (MAPG) و پایولوتورین (Plt) در محیط KBG با روش HPLC بررسی شد و بر مبنای پیک استاندارد و زمان تأخیر، میزان آنتی‌بیوتیک تولیدشده بر حسب میکرومول در میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد. سویهٔ مورد بررسی توانایی تولید هر سه آنتی‌بیوتیک را داشت.

بررسی تولید سه آنتی‌بیوتیک DAPG، MAPG و Plt در محیط کشت KBG با سویهٔ UTPf-68

سویهٔ UTPf-68 توانایی تولید هر سه آنتی‌بیوتیک DAPG، MAPG و Plt را در محیط کشت KBG داشت. آنتی‌بیوتیک MAPG بیشترین میزان تولید را نشان داد. آنتی‌بیوتیک Plt کمترین میزان تولید را نسبت به دو آنتی‌بیوتیک دیگر در محیط KBG داشت (جدول ۲).

جدول ۲. میزان تولید آنتی‌بیوتیک باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 در محیط کشت KBG

آنتی‌بیوتیک‌های سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* UTPF68	میزان تولید در محیط کشت KBG برحسب میکرومول در لیتر
آنتی‌بیوتیک MAPG	۱۵۵
آنتی‌بیوتیک DAPG	۱۶/۲
آنتی‌بیوتیک Plt	۱/۸

تحقیقات نشان داده است که میزان تولید یک آنتی‌بیوتیک در سویه‌های مختلف یک گونه متفاوت است. میزان تولید آنتی‌بیوتیک‌های MAPG و DAPG در سویهٔ *P. fluorescens* UTPF101 در محیط کشت KBG بعد از گذشت ۴۸ ساعت، به‌ترتیب، ۹۷ و ۶ میکرومول در لیتر گزارش شده است (Jamali 2009). عواملی که موجب تحریک تولید DAPG می‌شوند، بر تولید MAPG که پیش‌مادهٔ آنتی‌بیوتیک و همچنین، مادهٔ حاصل از تجزیهٔ این آنتی‌بیوتیک است (Bangera and Thomashow 1999) نیز تأثیر دارند (Duffy and Defago 1999). آنتی‌بیوتیک‌های پیولوتئورین و پیرول‌نیترین جدایهٔ pf-5 گونهٔ *P. fluorescens* توانایی جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ‌های *Pythium ultmium* و *Rhizoctonia solani* را دارند (Howell and Stipanovic 1980). آنتی‌بیوتیک DAPG در بیوکنترل چند بیماری در گندم و خیار نقش دارد و در کرفس و توتون، آنتی‌بیوتیک Plt نقش کلیدی را در بیوکنترل دارد (Maurhofer *et al*. 1994, Lemanceau *et al*. 1995).

تأثیر باکتری در افزایش رشد در گیاه خیار و میزان کنترل *P. drechsleri* در شرایط گلخانه

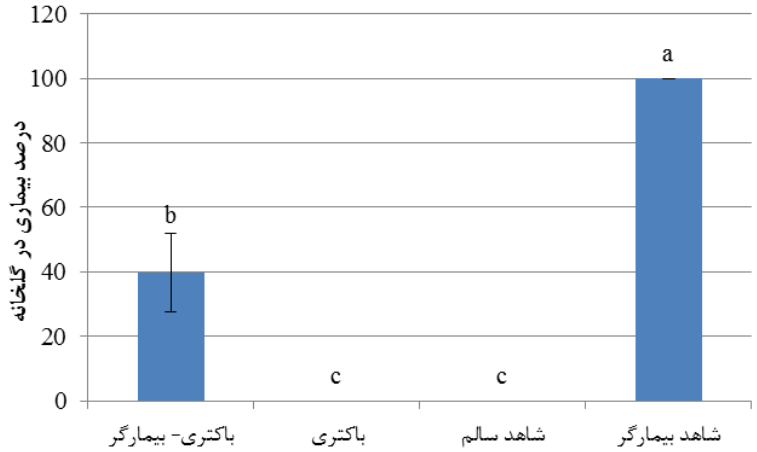
بررسی تأثیر سویهٔ باکتری در میزان کنترل بیمارگر و افزایش رشد گیاه، بعد از گذشت سه هفته از مایه‌زنی بیمارگر، انجام شد. فاکتورهای مورد ارزیابی شامل میزان درصد بیماریزایی، طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک گیاه، وزن تر گیاه بودند. گیاهانی که تنها با باکتری *P. fluorescens* UTPF68 تیمار شده بودند افزایش رشد زیادی در مقایسه با شاهد سالم نشان دادند. فاکتورهای رشدی گیاه نیز در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین، گیاهانی که هم با باکتری و هم با بیمارگر تیمار شده بودند، نسبت به شاهد افزایش رشد معنی‌دار نشان دادند. نتایج حاصله نشان داد که استفاده از این سویه هم در کنترل *P. drechsleri* می‌تواند مؤثر واقع شود و هم در افزایش رشد گیاه خیار می‌تواند به‌عنوان یک محرک رشدی باشد. بررسی‌ها نشان داد هنگامی که سویهٔ UTPF68 در غلظت $۱۰^{۸}$CFU/ml درون خاک گلدان مایه‌زنی شد، توانست ۶۰/۲۵ درصد *P. drechsleri* را کنترل کند (شکل‌های ۵، ۶ و ۷). تیمارکردن گیاه خیار با باکتری باعث بهبود فاکتورهای رشدی در گیاه خیار شد (Azad Disfani 2000).

کلنیزاسیون بذر خیار توسط باکتری

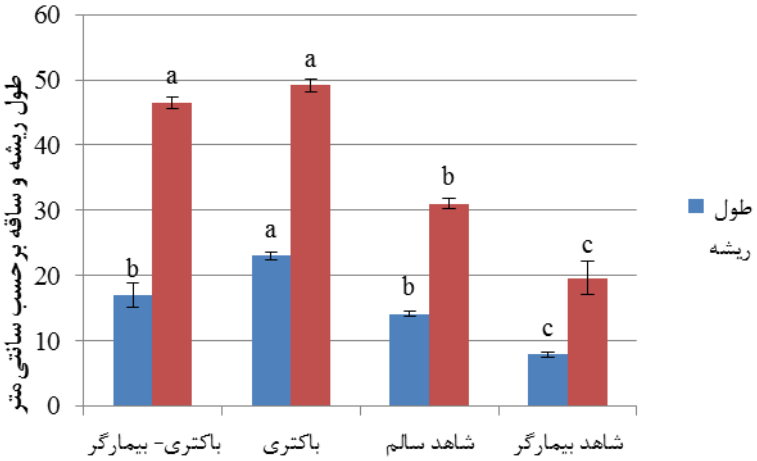
نتایج حاصل از کلنیزاسیون نشان داد که این باکتری بعد از گذشت دو هفته، می‌تواند منطقهٔ ریزوسفر با جمعیت $۲/۳\times۱۰^{۹}$ را کلنیزه کند. کلنیزه‌کردن ریشه توسط آنتاگونیست‌های باکتریایی، یک شرط مهم در توانایی آن‌ها برای کنترل بیماری‌های ریشه است. توانایی کلنیزه‌کردن ریشه به‌حدی مهم است که برخی محققان آن را مبنای انتخاب آنتاگونیست برتر در نظر می‌گیرند (Kraus and Loper 1992). تاکنون، کلنیزه‌کردن ریشه و تغییرات جمعیت آنتاگونیست‌های به‌کار گرفته‌شده توسط محققان زیادی بررسی شده است (Baligh *et al*. 1999, De Lafuente *et al*. 2001).

الگوی کلنیزاسیون ریشهٔ خیار توسط باکتری

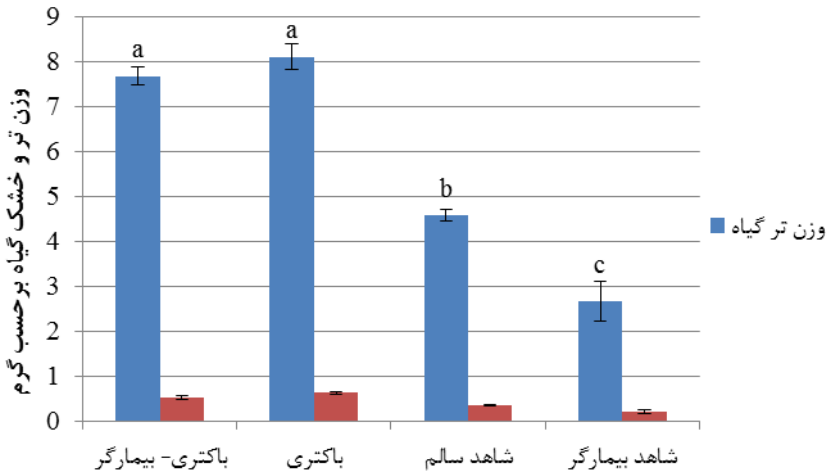
مقایسهٔ میانگین‌های به‌دست‌آمده از الگوی کلنیزاسیون ریشهٔ خیار در طی چهار هفته مشخص کرد تراکم جمعیت باکتری پس از طی یک هفته دارای افزایش چشمگیری بود و جمعیت باکتری از $۲/۳\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری بر گرم بذر که بذر خیار را کلنیزه کرده بود به $۳/۴۱\times۱۰^{۹}$ سلول باکتری بر گرم ریشهٔ خیار رسید. پس از اتمام هفتهٔ دوم، باکتری دارای تراکم جمعیت $۵/۴۲\times۱۰^{۹}$ بود و افزایش کمی را نشان داد. بعد از گذشت ۲۱ روز، میزان کلنیزاسیون باکتری روی ریشهٔ خیار سیر نزولی نشان داد و از سطح جمعیت $۵/۴۲\times۱۰^{۹}$ در انتهای هفتهٔ دوم، به $۲/۱۱\times۱۰^{۸}$ تقلیل یافت (شکل ۸).



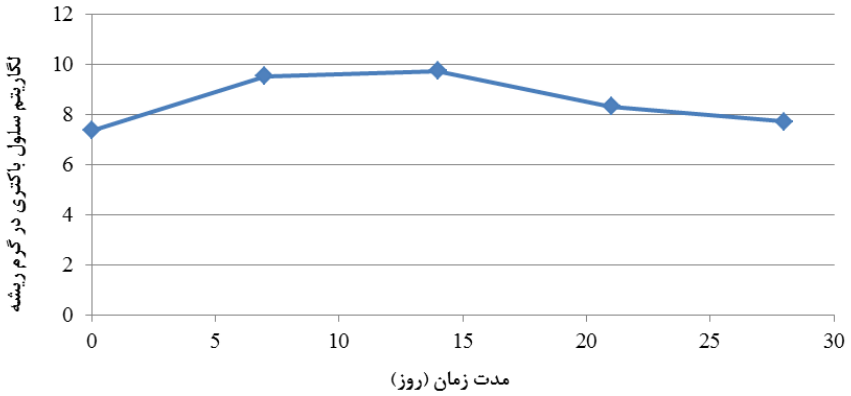
شکل ۵. میزان کنترل‌کنندگی باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 علیه *Phytophthora drechsleri* روی گیاه خیار در شرایط گلخانه



شکل ۶. تأثیر کاربرد سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 علیه بیمارگر *Phytophthora drechsleri* روی دو فاکتور طول ریشه و طول ساقهٔ گیاه خیار در شرایط گلخانه



شکل ۷. تأثیر کاربرد سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 علیه بیمارگر *Phytophthora drechsleri* روی دو فاکتور وزن تر و خشک گیاه خیار در شرایط گلخانه



شکل ۸. الگوی کلنیزه‌کردن ریشهٔ خیار با سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 در طی چهار هفته

باکتری *P. fluorescens* UTPF68 به‌عنوان یک باکتری قوی در بیوکنترل مطرح است و با توجه به خصوصیات و ویژگی‌های بررسی‌شده، می‌توان محیط کشت مناسب و اقتصادی برای باکتری مذکور تعریف کرد و از این باکتری به‌عنوان یک پروبیوتیک گیاهی در سطح وسیع استفاده کرد.

REFERENCES

Ahmadzadeh M, Ghasemi S (2012) Introduction of *Pseudomonas fluorescens* as a new biocontrol agent in Iran. Biological Control of Pests and Plant Diseases 1: 49-60. (In Persian).

Alavi A (1973) Root rot disease of cucumbers. Iranian Journal of Plant Pathology 9: 37-49 (In Persian).

Azad Disfani F (2001) Effect of some antagonistic bacteria against *Verticillium dahlia*, Cotton wilt disease. M.Sc., Tehran University, University College of Agricultural and Natural Resources, Iran. (In Persian).

Bangera MG, Thomashow LS (1999) Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Journal of Bacteriology 181(10): 3155-3163.

Baligh M, Delgado MA, Conway KE (1999) Evaluation of *Burkholderia cepacia* strains: Root colonization of *Catharanthus roseus* and *in vitro* inhibitation of selected soil-born fungal pathogens. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science 79: 19-27.

Castric KF, Castric P (1983) Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 45: 701-702.

Chin-A-Woeng TFC, Priester AJV, Lugtenberg BJJ (1997) Description of colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 10: 79-86.

De Lafuente L, Quagliotto L, Bajsa N, Fabiano E, Altier N, Arias A (2001) Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. Soil Biology and Biochemistry 34: 545-548.

Duffy BK, Défago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied & Environmental Microbiology 65(6): 2429-2438.

Ershad J, Mostofipour P (1969) Root rot of cucurbits in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 5: 38-45 (In Persian).

Ghafelebashi S (2012) Optimization of culture conditions of *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 using the response surface methodology. M.Sc., University of Tehran, University College of Agricultural and Natural Resources, Iran. (In Persian).

Hagedron C, Gould WD, Bradinelli RT (1989) Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology 55: 279-2797.

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

Hwang J, Beneson DM (2005) Identification, sensitivity and compatibility types of *Phytophthora* spp. attacking floricultur crops in North Carolina. Plant Disease 89: 185-190.

Jamali F (2009) Influence of some biotic factors on the expression of hydrogen cyanide- and 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes in *Pseudomonas fluorescens* on bean rhizosphere. Ph. D., dissertation, University of Tehran, University College of Agricultural and Natural Resources, Iran, (In Persian).

Keel C, Defago G (1997) Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanism and ecological impact In: Gange, A.C. and Brown, V. K. (eds.). multitrophic interaction in terrestrial system pp. 27-46. Blackwell Scientific publishers, London, U.K.

Kim E, Hwang BK (1992) Virulence to Korean pepper cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from different geographic areas. Plant Disease 76: 486-489.

Kraus L, Loper JE (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.

Lemanceau P, Corberand T, Gardan L, Latour L, Laguerre G, Boeufgras J M, Albouvette C (1995) Effect of two plant species flax (*Linum usitatissinum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. Applied & Environmental Microbiology 61(3): 1004-1012.

Liu L, Kloepper JW, Tuzun S (1995) Introduction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology. 85: 695-698.

Maurhofer M, Keel C, Schnider U, Voisard C, Défago G (1992) Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathology 82(2): 190-195.

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G (1994) Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress, but not cucumber. European Journal of Plant Pathology 100(3, 4): 221-232.

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(9): 873-881.

Rabindran R, Vidhysaekaran P (1996) Development for formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. Crop Protection 15(8): 715- 721.

Savchuk S, Fernando WGD, Park PS (2001) Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. Canadian Journal of Plant Pathology 23:205.

Sperber JI (1958) The incidence of apatite-solubilizing oranisms in the rhizorsrhere and soil. Australian Journal of Agriculture Reearch 9: 778.

Tucker CM (1931) Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. University of Missouri Agricultural Experimental Station Research Bulletin 153- 158 pp.

Vessey KJ (2003) Plant growth- promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-580.

Wuthrich B, Defago G (1990) Suppression of wheat take-all and black root rot of tobacco by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: results field and pot experiments pp. 17-22. In: Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (eds.). Plant Growth Promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlacen, Switzerland. Phytopatholgy 68:1377-1383.

Yan Z, Reddy MS, Kloepper JW (2003) Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. Canadian Journal of Microbiology 49: 383-389.