نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۳ شمارهٔ۲، صفحهٔ ۶۴-۵۵، نیمهٔ دوم ۱۳۹۱

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 3, No. 2, 2012, p. 55-64

تأثیر آنتاگونیستی جدایه های سودوموناس فلورسنت علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris

زهرا ابراهیمی کاظم‌آباد[1*]، حمید روحانی[2]، فاطمه جمالی[3] و عصمت مهدیخانی‌مقدم[4]

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب، دانشجوی دورهٔ کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۰۳/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۳۰

چکیده

پژمردگی فوزاریومی نخود با عامل *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه در ایران به‌شمار می‌رود. به‌منظور شناسایی عوامل کنترل بیولوژیکی این بیماری، سودوموناس‌های فلورسنت از فرایشهٔ نخود با استفاده از محیط کشت کینگ‌ب(KB) در مزارع استان خراسان، جداسازی و شمارش شدند. فعالیت ضدقارچی ۸۰جدایهٔ باکتریایی علیه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در دو محیط کشت کینگ‌ب(KB) و سیب‌زمینی دکستروز آگار(PDA) بررسی شد. نتایج نشان داد که از بین ۸۰جدایهٔ مورد بررسی، ۸۱/۲۵درصد استرین‌ها در محیطKB و ۹۴/۳۷درصد در محیطPDA دارای توانایی بازدارندگی از رشد قارچ بودند. بین تولید متابولیت‌های ضدقارچی با کاهش بیماری، همبستگی مشاهده شد؛ ولی در مورد تولید سیدروفور، هیچ‌گونه همبستگی مشاهده نگردید. درآزمایش‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های M2-15، Pf-5 وK-15، بهترین اثر را بر وزن تَرِ ریشه و جدایهٔ M2-15 بهترین اثر را بر وزن تَرِ بخش‌های هوایی داشتند. در بین جدایه‌های مورد بررسی، جدایهٔM2-15 موجب کاهش معنی‌دار شدت بیماری در مقایسه با سایر جدایه‌ها گردید.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک، پژمردگی فوزاریومی نخود، سودوموناس فلورسنت، سیدروفور، کنترل بیولوژیک

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) گیاهی است یکساله، خودگشن و دیپلوئید که از نظر اهمیت در میان بقولات، رتبهٔ سوم دنیا و جایگاه نخست در آسیا و شمال آفریقا را به‌خود اختصاص داده است. پژمردگی آوندی نخود که توسط قارچ *F. oxyosporum* f. sp. ciceris ایجاد می‌شود، مهم‌ترین بیماری خاکزاد این گیاه به‌شمار می‌رود که نخستین‌بار توسط Padwick در سال ۱۹۴۰ توصیف گردید و از آن به‌بعد از چندین کشور، گزارش شده است. این بیماری در شش قارهٔ جهان گسترش یافته است. کاهش عملکرد سالیانهٔ نخود در اثر این بیماری، از ۱۰ تا ۱۵درصد متغیر است؛ ولی بیماری می‌تواند در حالت طغیان، همهٔ محصول را از بین ببرد (Navas-Cortes *et al.*, 2000). این بیماری توسط منوچهری و مصری، برای اولین‌بار در سال۱۳۴۲ از برخی مناطق نخودکاری ایران گزارش شد و خسارت آن را تا ۲۲درصد در بعضی مناطق، برآورد کرده‌اند (Jamali *et al*., 2005; Parsa & Bagheri,2008).

بیماری پژمردگی فوزاریومی، به‌طور معنی‌داری باعث کاهش باروری در محصولات زراعی می‌شود و قارچ‌کش‌ها و مقاومت میزبان، اغلب برای کنترل آن کافی و مناسب نیست. از آنجا که عوامل پژمردگی آوندی احتمالاً از راه بافت‌های جوان ریشه وارد گیاه می‌شوند، این امر موفقیت استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت با قابلیت فعالیت در محیط ریشه را در مهار بیولوژیکی بیماری مذکور، توجیه می‌نماید (Alavi & Ahunmanesh, 1376; Nagarajkumar *et al.*, 2004). بدین‌جهت در سال‌های اخیر، استفاده از روش‌های بیولوژیک به‌ویژه استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست برای مبارزه با بیماری‌های خاکزاد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. Hervas *et al,* (1997) باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس را به‌عنوان عوامل زیستی کنترل‌کنندهٔ پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی معرفی نمودند. نامبردگان اظهار داشتند که کاربرد رایزوباکترها در مبارزهٔ تلفیقی به‌همراه ارقام زراعی مقاوم و تنظیم تاریخ

* **نویسنده مسئول:** یزد، میبد، مهرآباد، خیابان آیت‌الله خامنه‌ای، پلاک۶۵، کُد پستی: ۸۹۶۵۱-۵۳۱۹۸، همراه: ۰۹۱۳۲۵۶۸۵۰۲،
ebrahimi.zahra20@gmail.com

کاشت، می‌تواند در مدیریت بیماری مؤثر باشد. Kaur *et al*, (2007) نیز نشان دادند که جدایه‌های سودوموناس فلورسنت در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در مقایسه با تیمار شاهد، به‌طور معنی‌داری باعث افزایش جوانه‌زنی بذر، کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی و بهبود رشد گیاه نخود شدند.

باکتری سودوموناس فلورسنت دارای انتشار وسیع بوده و به‌فراوانی در آب و خاک و به‌ویژه در فرایشهٔ گیاهان وجود دارد. مطالعات فراوانی در مورد این باکتری صورت گرفته است. محققان از جدایه‌های سودوموناس به‌علت رشد سریع، آسان‌بودن کشت و تغییرپذیری متابولیکی آنها، به‌طور وسیع در تحقیقات استفاده می‌کنند. همچنین دستکاری‌های ژنتیکی در این باکتری‌ها، بیشتر از باکتری‌های دیگر صورت می‌گیرد (Velusami *et al.*, 2006).

سودوموناس‌ها توانایی ممانعت از بیمارگرهای قارچی خاکزاد را دارند. این باکتری‌ها، مکانیسم‌های مؤثری در کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای گیاهی دارند؛ ازجمله: توانایی تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک (Raaijmakers & Weller, 2001)، سیدروفورها (O' Sullivan & O,Gara ,1992)، سیانیدهیدروژن (Owen & Zlor, 2001) و ترشح آنزیم‌های خارج سلولی مانند کیتیناز، بتا۱و۳-گلوکاناز (Nagarajkumar, 2004)، پروتئاز و لیپاز (Keel & Defago, 1997)، رقابت برای مواد غذایی و اشغال جایگاه‌های میکروبی در فرایشه و القای مقاومت سیستمیک (Hass & Defago, 2005; Suresh *et al.*, 2010).

Thomashow & Weller (1996) مکانیسم اولیه کنترل بیمارگرها توسط سودوموناس‌های فلورسنت را تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بیان کردند.

در بیشتر سیستم‌های بیوکنترل، یک یا چند آنتی‌بیوتیک در ممانعت از عامل بیماری نقش ایفا می‌کنند. تاکنون تعدادی از ترکیبات آنتی‌بیوتیک که به‌وسیلهٔ سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌شوند، از نظر ساختمان شیمیایی شناسایی شده‌اند که اغلب آنها از گروه فنازین‌ها، پیرول‌ها و برخی مشتقات اندول می‌باشند (فنازین۱-کربوکسیلیک‌اسید، پایولوتئورین و پیرول‌نیترین). تعدادی آنتی‌بیوتیک که حاوی نیتروژن نیستند نیز شناخته شده‌اند که ترکیب ۲،۴-دی‌استیل فلوروگلوسینول از مهم‌ترین آنها می‌باشد (Delani *et al.*, 2000). آنتی‌بیوتیک‌ها با نفوذ به درون سلول، موجب به‌هم‌ریختگی ساختمان پروتوپلاسم و تخریب سریع سلول می‌گردند (Alavi & Ahunmanesh, 1376). این آنتی‌بیوتیک‌ها قادرند در رقابت بین میکروارگانیسم‌ها شرکت نموده و بیمارگرهای ریشهٔ گیاه را سرکوب کنند. بنابراین، باکتری‌هایی که آنتی‌بیوتیک تولید می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان وسیله‌ای عملی جهت کنترل بیماری‌های گیاهی به‌طور موفقیت‌آمیزی عمل کنند.

یکی دیگر از مکانیسم های مهم آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنت علیه بیمارگرهای گیاهی، سیدروفور است. سیدروفورها مواد کلاته‌کنندهٔ آهن سه‌ظرفیتی با وزن مولکولی کم هستند که تحت شرایط کمبود آهن، تولید شده و با یون آهن، کمپلکس تشکیل می‌دهند. این کمپلکس به‌وسیلهٔ پروتئین‌های گیرنده در غشای سلول باکتری به‌طور اختصاصی شناسایی و جذب می‌گردد؛ در نتیجه آهن را از دسترس بیمارگر خاکزاد خارج می‌کند و محیطی را فراهم می‌کند که برای بیمارگر، نامساعد است. این ترکیب برای اولین بار در خاک‌های قلیایی به عنوان یک مکانیسم مهم در بازدارندگی از قارچ بیمارگر *F. oxysporum* بیان شد.

این تحقیق به‌منظور بررسی توانایی باکتری‌های آنتاگونسیت جداشده از خاک ناحیهٔ فرایشه، در کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی و بررسی تولید متابولیت‌های ضدقارچی و سیدروفور در سودوموناس‌های فلورسنت جداشده از فرایشهٔ نخود انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع نخود

در اواخر خرداد و نیمهٔ اول تیرماه سال۱۳۸۸، طی بازدید از مزرعهٔ ارقام مختلف نخود در استان‌های خراسان رضوی و شمالی، با حرکت تصادفی در طول و عرض مزرعه، نمونه‌های نخود همراه با خاک اطراف ریشه، برداشت شده و درون کیسه‌های نایلونی، به‌منظور جداسازی و شناسایی بعدی باکتری‌ها ظرف مدت زمان معین، در یخچال نگهداری شد.

جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت

جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت با استفاده از محیط افتراقی کینگ‌بی(KB) (۱/۵گرم فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، ۱/۵گرم سولفات‌منیزیم،۲۰گرم پپتون، ۱۵گرم آگار و ۱۵میلی‌لیتر گلیسرول در یک‌لیتر آب) صورت پذیرفت. ریشه‌های نخود و خاک اطراف آن (۲ تا ۳ میلی‌متر منطقهٔ ریزوسفر) به قطعات کوچک تقسیم گردید و۱۰گرم از آن پس از توزین درون۹۰میلی‌لیتر آب پپتون سترون یک‌درصد ریخته شد. ارلن حاوی ریشه‌ها بر روی شیکر به‌مدت ۳۰ تا ۴۵دقیقه قرار داده شد و سپس از هر نمونه، سریِ رقت تهیه گردید. ۱۰۰میکرولیتر از هر رقت، به محیط کینگ‌بی منتقل و با لوپ سترون، پخش گردید.

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

جهت شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت، با استفاده از کلید شناسایی Jacques (1994) و Bosiss (1995) به‌ترتیب آزمون گرم، آزمون تولید رنگدانهٔ فلورسنت، آزمون آرژنین، آزمون اکسیداز، آزمون فوق حساسیت به توتون و آزمون متابولیسم اکسیداتیو(O/F)، آزمون لوان، آزمون نیترات، آزمون قند آرابینوز و آزمون قند سوربیتول انجام گرفت (Bosiss *et al.*, 2000; Botelho & Mendonca-Hagler, 2006)

آزمون کشت متقابل

برای این آزمایش، از روش Keel *et al*, (1996) استفاده شد. به این ترتیب که باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی دو محیط کشت KB و PDA به‌فاصلهٔ ۰/۵سانتی‌متر از لبهٔ تشتک، کشت داده شدند و یک روز بعد از آن، قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ *F. oxyosporum* f. sp. *ciceris* در وسط تشتک پتری قرار گرفت. برای هر تیمار، سه تکرار به‌کار رفت. پتری‌ها به‌مدت ۴ تا ۶روز در دمای ۲۴درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای مقایسهٔ قدرت بازدارندگی، فاصلهٔ کلنی باکتری تا میسلیوم قارچ اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل پانزده تیمار و سه تکرار انجام گردید. داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش، پس از تجزیه و تحلیل آماری، با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد، مقایسه شدند.

بررسی متابولیت‌های قابل‌نفوذ در آگار (تولید آنتی‌بیوتیک)

این آزمون براساس روش Kraus & Loper (1992) انجام گرفت. سوسپانسیون باکتری از کشت تازهٔ هر یک از جدایه‌های باکتری تهیه گردید و۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری و آب‌مقطر سترون (شاهد) به محیط PDA اضافه و پخش شد و پس از آن، به‌مدت سه‌روز در دمای ۲۵ تا ۲۷درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از مدت زمان فوق، باکتری‌ها به‌کمک پنبهٔ سترون، از سطح پتری جمع‌آوری شدند. پس از آن، پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری به‌صورت وارونه قرار داده شد. تشتک پتری‌ها به‌مدت۳۰دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند و سپس تهویه به‌مدت یک‌ساعت در زیر هود با بازگذاشتن دَرِ تشتک‌ها، انجام شد. به‌دنبال آن، یک دیسک پنج‌میلی‌متری از حاشیهٔ کشت سه‌روزهٔ قارچ با رعایت شرایط سترون در مرکز هر تشتک پتری، قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ تا ۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و اندازه‌گیری رشد میسلیومی قارچ در مقایسه با شاهد، پس از پنج‌روز انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردید و داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش، پس از تجزیه وتحلیل آماری با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک‌درصد، مقایسه شدند. درصد بازداری از رشد میسلیوم با استفاده از رابطهٔ زیر برای هر تیمار محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{میزان رشد قارچ درون پتری حاوی باکتری} - \text{میزان رشد قارچ درون پتری شاهد}}{\text{میزان رشد قارچ درون پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکترفتومتر

این آزمون بر اساس روش Castaneda *et al*, (2005) انجام گرفت. مقدار۱۰۰میکرولیتر از کشت ۲۴ساعتهٔ باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات (K2HPO4; 6.0 g/l,KH2PO4; 3.0g/l; MgSO4. 7H2O; 0.2g/l,NH4SO4; 1.0g/l, Succinic acid; 4.0g/l) به ارلن‌های۱۰۰میلی‌لیتری حاوی ۴۰میلی‌لیتر محیط کشت تازهٔ سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به‌مدت۴۰ساعت در دمای ۲۷درجه سانتی‌گراد و۱۲۰دور در دقیقه روی شیکر، نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژکردن در g ۱۰۰۰ به‌مدت۱۰دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری، میزان جذب مایعِ رویی در طول موج۴۰۰نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. داده‌های حاصله با استفاده از فرمول A=eBC به مول در لیتر تبدیل شدند (Castanda *et al.*, 2005) که در این فرمول:

A= میزان جذب　　e= ضریب جذب مولی

B= قطر کوت　　C= غلظت ماده

روش آغشته‌سازی بذر با باکتری‌های آنتاگونیست

بذرهای نخود رقم کرج (MCC358)، تهیه‌شده از پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، به‌مدت سه‌دقیقه با هیپوکلریت سدیم۲/۵درصد کلر فعال، ضدعفونی سطحی شدند و با چهار بار شستشو در آب‌مقطر، هیپوکلریت آن زدوده شد. به‌منظور آغشته‌سازی بذر به استرین‌های

آنتاگونیست از روش Weller *et al*, (1983) استفاده شد. یک لوپ کامل از کشت ۴۸ساعتهٔ هر استرین آنتاگونیست روی محیط کینگ‌بی، به فلاسک‌های حاوی۱۰۰میلی‌لیتر محیط مایع کینگ‌بی منتقل شد و به‌مدت ۴۸ساعت روی شیکر با ۱۲۰دور در دقیقه در دمای ۲۷درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سلول‌های باکتریایی به‌مدت۱۰دقیقه در g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ و چندبار با محلول نمک فیزیولوژیک ۰/۱۴مول NaCl برای برطرف‌شدن باقیماندهٔ محیط غذایی، شستشو شدند. سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ مجدد، از این محلول، جداسازی شدند و سوسپانسیون $10^9 \times 1$ آنها با استفاده از منحنی استاندارد با روش اسپکتروفتومتری درمحلول یک‌درصد کربوکسی‌متیل سلولز تهیه گردید.

بذر نخود درون سوسپانسیون‌های باکتریایی ریخته شده و به‌مدت نیم‌ساعت روی شیکر۱۲۰دور در دقیقه قرار داده شدند. در تیمار شاهد، بذر درون کربوکسی‌متیل سلولز یک‌درصد فاقد باکتری، غوطه‌ور شدند. بذرهای آغشته‌شده، در معرض جریان هوای استریل هود گذاشته شدند تا خشک شوند.

بررسی اثر تیمار بذور نخود توسط جدایه‌های باکتری در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود در شرایط گلخانه

برای بررسی گلخانه‌ای از روش Thomashow (1988) & Weller با کمی تغییر استفاده شد؛ به‌گونه‌ای که از گلدان‌های۸۰۰گرمی استفاده شد. مایه‌تلقیح (نژاد Foc6) به نسبت ۵درصد وزنی با خاک استریل مخلوط شد. خاک آلوده به مایه‌تلقیح بین دو لایه سنگریزه در سطح زیرین گلدان و ماسه در سطح بالایی قرار داده شد. بذور آغشته به باکتری، بر روی خاک قرار داده شدند و با لایهٔ نرم ماسه پوشانیده شدند. برای هر ۱۶تیمار، چهار تکرار درنظرگرفته شد و این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دامنهٔ دمایی ۲۰ تا ۲۵درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند.

پس از چهار تا شش هفته، علایم بیماری مشاهده گردید و با مرطوب‌کردن گلدان‌ها، بوته‌های بیمار از هر تیمار خارج گردید. پس از بررسی ریشه‌ها، جهت ارزش‌گذاری شدت بیماری از شاخص Arora & Pandey (1989) به‌شکل زیر استفاده شد: ۱: بدون تغییر رنگ؛ ۲: ناحیه قهوه‌ای‌شدن به‌صورت خطوط فشرده و برابر با ۵ تا ۱۰میلی‌متر؛ ۳: ناحیهٔ قهوه‌ای‌شدن به‌صورت خطوط فشرده و برابر با ۱۰ تا ۱۵میلی‌متر؛ ۴: ناحیه قهوه‌ای‌شدن کاملاً فشرده و برابر با ۱۰ تا ۱۵میلی‌متر.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسهٔ میانگین صفات، با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT-C و روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج وبحث

جداسازی و شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست سودوموناس فلورسنت

در مجموع،۲۰۰باکتری از فراریشه بازیافت و خالص‌سازی شد. جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از آزمون افتراقی نظیر گرم در پتاس سه‌درصد، رشد هوازی و بی‌هوازی و تولید پیگمان‌های فلورسنت روی محیط کینگ‌بی تفکیک شدند. از بین۲۰۰جدایه،۸۰جدایه متعلق به باکتری‌های گرم‌منفی از جنس سودوموناس بودند. خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های سودوموناس نظیر اکسیدازی، تولید لوان، ذوب ژلاتین، احیای نیترات، آرژنین دهیدرولازی و کاتالازی و آزمون لوان، آزمون قند آرابینوز و آزمون قند سوربیتول جدایه‌های *P. fluorescens* تشخیص داده شدند (جدول ۱) (Botelho & Mendonca-Hagler, 2006).

بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* بر روی رشد قارچ *F. oxysporum* f.sp *ciceris* در شرایط آزمایشگاه

در این بررسی، توانایی آنتاگونیستی۱۴جدایهٔ باکتریایی در شرایط آزمایشگاه بر اساس روش کشت متقابل در تشتک پتری روی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* مورد مطالعه قرار گرفت. جدایهٔ Pf-5 با هالهٔ بازدارندگی۱/۸۳سانتی‌متر، بیشترین تأثیر و جدایهٔ T55-1 با هالهٔ بازدارندگی۰/۵۳سانتی‌متری، کمترین تأثیر را روی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در محیط کشت PDA داشتند. جدایه‌های CH2-7 و T90 به‌ترتیب با هاله‌های بازدارندگی ۱ و ۰/۹۶سانتی‌متر، بیشترین تأثیر در محیط KB و جدایه‌های T55-1 و T40 با هالهٔ بازدارندگی ۰/۱سانتی‌متری کمترین تأثیر را روی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* داشتند (جدول ۲).

آزمون تولید آنتی‌بیوتیک

جدایه‌های آنتاگونیست از نظر تولید آنتی‌بیوتیک در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در سطح یک‌درصد، تفاوت معنی‌داری نشان دادند. دامنهٔ رشد قارچ در این آزمایش، بین عدم رشد یعنی صفر تا رشد بالا یعنی ۴۰/۴میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- شناسایی بیووارهای جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

Table 1. Identification of biovars of *Pseudomonas fluorescens*

Bacteria isolates	Fluorecent pigmant	Gram Reaction	Nitrate to N_2	Growth at 41^{0c}	Growth at 4^{0c}	Levan	Tobacco HR	Arginin dihyrolase	Catalase	Oxidase	Growth on L-arabinose	Growth on sorbitol
T90 *P.fluorescens* bv.IV	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
T40 *P.fluorescens bv.III*	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
M2-15 *P.fluorescens bv* .I	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
T17-4 *P.fluorescens bv* .I	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
K-15 *P.fluorescens bv.III*	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
T59 *P.fluorescens* bv.IV	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
T55-1 *P.fluorescens bv.III*	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
T *P.fluorescens bv* .I	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
T68-3 *P.fluorescens bv* .I	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
T3 *P.fluorescens* bv.IV	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
CH2-7 *P.fluorescens* bv.IV	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
M2-21 *P.fluorescens* bv.IV	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
T12-2 *P.fluorescens* bv.IV	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+

جدول ۲- گروه‌بندی تیمارها بر اساس قطر هالهٔ بازدارندگی در محیط PDA و KB

Table 2. Classification of *Pseudomonas flourescens isolates* based on inhibition zone diameter in PDA and KB culture media

Inhibition zone diameter in KB (cm)	Inhibition zone diameter in PDA (cm)	Treat
0.96 a	1.06 bcde	T90
0.1 cd	0.6 e	T40
0.43 abcd	1.66 ab	M2-15
0.1 cd	1.5 abc	T17-4
0.76 ab	0.86 cde	K15
0.46 abcd	1.43 abc	T59
0.73 abc	1.83 a	Pf-5
0.1 cd	0.53 ef	T55-1
0.43 abcd	1.5 abc	T
0.86 ab	1.33 abcd	T68-3
0.83 ab	0.76 de	T3
1 a	1.06 bcde	CH2-7
0.86 a	1.36 abcd	M2-21
0. 4 abcd	1.03 bcde	T12-2
0 d	0 f	شاهد

هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>0.05$).

Values are mean of three replications. Different letters in table indicate significant differences at a *P* value of 0.01, as determined by Duncan statistical test.

جدایه‌های آنتاگونیست از نظر تولید آنتی‌بیوتیک در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در سطح یک‌درصد، تفاوت معنی‌داری نشان دادند. دامنهٔ رشد قارچ در این آزمایش بین عدم رشد یعنی صفر تا رشد بالا یعنی ۴۰/۴میلی‌متر

اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، جدایه‌های Pf-5 و T26 با ۱۰۰درصد کاهش رشد، بیشترین و جدایهٔ T59 با ۵۷درصد کاهش رشد، کمترین تأثیر را در کاهش رشد میسلیومی قارچ داشتند (جدول ۳).

بررسی تولید سیدروفور

در این روش به‌صورت اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایوردین قابل ارزیابی است. نتایج به‌دست‌آمده از میزان جذب مایع رویی در طول موج۴۰۰نانومتر با استفاده از ضریب مولی پایوردین خالص به میکرومول پایوردین تبدیل شد.

از مجموع ۱۴جدایهٔ باکتریایی آنتاگونیست که در مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت، تمامی آنها قادر به تولید سیدروفور بودند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر قدرت تولید سیدروفور، اختلاف معنی‌داری در سطح یک‌درصد وجود دارد. مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که جدایهٔ CH2-7 با تولید ۲۷/۲۵میکرومول پایوردین، بیشترین و جدایهٔ M2-21 با تولید ۲/۸۵میکرومول پایوردین، کمترین مقدار تولید سیدروفور را در بین جدایه‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور داشتند (جدول۳).

آزمایش‌های گلخانه‌ای

اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و شاخص نکروز ریشهٔ نخودهای آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در تیمارهای مختلف به‌عنوان شاخص‌هایی برای کارآیی کنترل بیولوزیکی به‌شرح زیر بررسی شد.

شاخص وزن تر و خشک اندام‌های هوایی

نتایج حاصل از بررسی نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، تفاوت معنی‌داری در سطح یک‌درصد وجود دارد.

جدول۳-گروه‌بندی جدایه‌های سودو موناس فلورسنت براساس تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور

Table 3. Classification of *Pseudomonas flourescens* isolates based on antibiotic and sidrophore production

Sidrophore production (µm/ l)	Antibiotic production (inhibition percentage)	Antagonist isolates
16.05 e	44.4 cde	T90
15.73 e	54.4 c	T40
4.3 e	81.07 b	M2-15
21.7 c	49.4 cd	T17-4
22.05 c	37.73 de	K15
25 b	32.73 e	T59
25.45 b	100 a	Pf-5
13.8 f	36.63 de	T55-1
17.55 d	37.2 de	T
15.95 e	40 cde	T68-3
17.85 d	54.97 c	T3
27.25 a	44.43 cde	CH2-7
2.85 h	49.97 cd	M2-21
4.25 h	49.4 cd	T12-2
0 i	0 f	شاهد

هر عدد میانگین سه تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>0.01$).

Values are mean of three replications. Different letters in table indicate significant differences at a P value of 0.01, as determined by Duncan statistical test.

براساس نتایج، وزن تر گیاه در جدایهٔ M2-15 در مقایسه با شاهد سالم، تفاوت معنی‌داری نداشت. جدایه‌های T17-4، T و T55-1 از نظر وزن تر با شاهد آلوده، تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. جدایهٔ M2-15، از نظر وزن‌خشک بخش‌های هوایی در مقایسه با شاهد سالم، تفاوت معنی‌داری نداشت ولی وزن خشک گیاهان تیمارشده با جدایهٔ T55-1 در مقایسه با شاهد آلوده، به‌نحو معنی‌داری کاهش نشان داد (جدول ۴).

شاخص وزن تر و خشک ریشه

نتایج نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، تفاوت معنی‌داری در سطح یک‌درصد وجود داشت. بر اساس نتایج، وزن تر ریشهٔ جدایه‌های M2-15، Pf-5 و K-15، تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد سالم داشت و بیشتر بود. در مورد جدایه‌های T90، T55-1، T17-4 و M2-21 نیز مشاهده شد که وزن تر ریشه در این جدایه‌ها با

گیاه شاهد آلوده، تفاوت معنی‌داری نداشت. بررسی وزن‌خشک ریشه‌ها نشان داد جدایه‌های M2-15، Pf-5 و K-15 تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد سالم داشتند. جدایه‌های M2-21 و T55-1 نیز وزن خشک ریشهٔ کمتری نسبت به گیاه شاهد آلوده داشتند که از نظر آماری، با شاهد آلوده، متفاوت بود (جدول ۴).

شاخص درصد نکروز ریشه

نتایج حاصل از بررسی این شاخص نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست بر روی درصد نکروز ریشه، تفاوت معنی‌داری در سطح یک‌درصد وجود دارد. بر اساس نتایج، جدایهٔ M2-15 با گیاه شاهد سالم از نظر آماری، تفاوت معنی‌داری نشان نداد و جدایه‌های T، T17-4، CH2-7 و T55-1 با گیاه شاهد آلوده، تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۴).

در تحقیق حاضر، جدایه‌های *P. fluorescens* با فعالیت آنتاگونیستی علیه *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* از فرایشهٔ نخود ایرانی جداسازی شدند؛ به‌خاطر این‌که جداسازی باکتری‌ها از منطقهٔ فرایشهٔ یک محصول، به‌منظور دستیابی به عوامل آنتاگونیست با توانایی بیوکنترل بالا، امری ضروری به‌نظر می‌رسد. توانایی آنتاگونیستی این جدایه‌ها علیه بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه بررسی گردید.

در بررسی‌های انجام‌شده طی این تحقیق، همبستگی معنی‌داری بین تولید متابولیت‌های ضدقارچی جدایه‌های باکتری با کاهش بیماری مشاهده شد.

در امر کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زا، تولید آنتی‌بیوتیک (Howell & Stipanovic, 1979) و سیدروفورها توسط ریزوباکترها بسیار حایز اهمیت است.

جدول ۴- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر فاکتورهای مختلف رشدی و شدت بیماری پس از آغشته‌شدن با خاک آلوده به *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در شرایط گلخانه

Table 4. Effect of antagonist isolates on different growth factors and severity of disease after inoculation with infected soils with *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* in greenhouse condition

Fresh total weight (g)	Root Necrosis	Dry shoot weight (g)	Fresh shoot weight (g)	Dry root weight (g)	Fresh root weight (g)	Treat
4.682 c	1.977 gh	0.315 cd	2.41 c	0.306 ab	2.272 a	T90
3.349 ef	2.588 cde	0.241 fg	1.85 d	0.201 cdef	1.525 bcde	T40
6.581 a	1.355 ij	0.563 a	4.244 a	0.309 ab	2.337 a	M2-15
2.156 h	3.043 bc	0.175 hi	0.892 fg	0.15 efg	1.263 def	T17-4
5.212 b	1.668 hi	0.382 b	2.877 b	0.309 ab	2.335 a	K15
3.612 e	2.475 defg	0.249 efg	1.878 d	0.229 cd	1.735 bc	T59
4.331 cd	2.043 fgh	0.308 cde	2.685 b	0.265 bc	1.898 b	Pf-5
1.56 i	3.555 a	0.091 j	0.689 f	0.116 gh	0.869 g	T55-1
2.352 h	3.32 a	0.14 hi	1.059 f	0.171 defg	1.443 bcd	T
3.372 ef	2.688 cd	0.232 gh	1.755 de	0.215 cde	1.618 bcd	T68-3
3.434 ef	2.538 cdef	0.246 efg	1.857 d	0.208 cde	1.578 bcd	T3
2.966 fg	2.963 bcd	0.203 gh	1.535 e	0.189 def	1.431 cde	CH2-7
2.806 g	2.142 efgh	0.303 cdef	1.949 d	0.075 h	0.857 g	M2-21
4.108 d	2.043 fgh	0.298 def	2.242 c	0.246 bcd	1.856 b	T12-2
5.521 b	1 j	0.578 a	4.362 a	0.153 efg	1.159 efg	شاهد سالم
2.01 h	3.375 ab	0.127 ij	0.959 f	0.139 fg	1.05 fg	شاهد آلوده

هر عدد میانگین چهار تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>0.01$).
Values are mean of four replications. Different letters in table indicate significant differences at a *P* value of 0.01, as determined by Duncan statistical test.

در آزمون، بررسی تولید آنتی‌بیوتیک در همهٔ جدایه‌های آنتاگونیست به‌کاررفته هالهٔ بازدارنده در مقابل قارچ پاتوژن مشاهده شد؛ درصورتی‌که در پتری شاهد پاتوژن به‌صورت یکنواخت رشد کرد. این امر، نشان‌دهندهٔ تولید یک یا چند آنتی‌بیوتیک توسط باکتری‌های آنتاگونیست می‌باشد. سودوموناس‌های فلورسنت، متابولیت‌های ثانویهٔ مختلفی از جنس آنتی‌بیوتیک‌ها تولید می‌کنند که فنازین۱- کربوکسیلیک‌اسید(pca)، ۲و۴-دی‌استیل فلوروگلوسینول (phl)، پیولوتئورین (plt) و پیرول نیترین (prn) تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط آنها می‌باشند. نقش بعضی از این آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل قارچ‌های *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل پاخورهٔ گندم، *Thielaviopsis basicola* عامل بیماری پوسیدگی سیاه ریشهٔ توتون، *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی،

Pythium ultimum عامل مرگ گیاهچهٔ خیار و *Rhizoctonia solani* روی پنبه، به اثبات رسیده است (Weller *et al.*, 2007).

جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست منتخب در این مطالعه، قادر به تولید سیدروفور نیز بودند که از این میان، جدایهٔ CH2-7، بیشترین توانایی را در تولید سیدروفور از خود نشان داد. بررسی‌ها نشان‌دهندهٔ عدم وجود همبستگی معنی‌دار بین تولید سیدروفور با کاهش بیماری بود. سیدروفورها، موادی با وزن مولکولی کم هستند که در شرایط کمبود آهن، تولید شده و دارای قدرت جذب بالایی در جذب آهن فریک (Fe^{3+}) می‌باشند. با توجه به نقش مهم سیدروفورهای میکروبی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد، امکان تأمین آهن مورد نیاز گیاه و همچنین پتانسیل بالای سودوموناس‌های فلورسنت برای کلونیزاسیون ریشه و استقرار در فراریشه، ضرورت داشت تا توانایی سیدروفور استرین‌های آنتاگونیستی موردنظر، ارزیابی شوند. سیدروفورهای تولیدشده توسط سودوموناس‌های فلورسنت از نوع سودوباکتین یا پایوردین است که نسبت به سیدروفورهای سایر میکروارگانیسم‌های خاک، قدرت و رقابت آنها بیشتر است؛ زیرا میل ترکیبی سیدروفورهای سودوموناس‌های فلورسنت بیشتر از سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد.

در این پژوهش، ملاحظه گردید که جدایه‌های باکتریایی در خاک‌های آلوده به قارچ، موجب افزایش رشد بوته‌های نخود شدند. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در این بررسی، الگوی عمومی توان بازدارندگی استرین‌ها در شرایط گلخانه با گروه‌بندی استرین‌ها از نظر توانایی بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه، مطابقت داشت؛ ولی بعضی از استرین‌هایی که در آزمایشگاه از نظر هالهٔ بازدارندهٔ رشد در گروه‌های آماری متفاوت بودند، در شرایط گلخانه در یک گروه قرار گرفتند. این پدیده در بسیاری از نتایج کنترل بیولویک ارائه‌شده توسط محققان دیگر نیز به‌چشم می‌خورد (Fravel, 1988).

به‌طورکلی باکتری‌های محرک رشد گیاه به دو روش مستقیم و غیرمستقیم روی رشد گیاه و میزان تولید در واحد سطح، تأثیر می‌گذارند. این باکتری‌ها در روش مستقیم با سنتز یک‌سری از مواد (مانند فیتوهورمون‌ها، سیدروفور و...) و تسهیل جذب عناصر غذایی از محیط توسط گیاه، باعث افزایش رشد گیاه و تولید محصول در واحد سطح می‌شوند (Glick *et al.*, 1999). در روش غیرمستقیم نیز با تولید یک‌سری از مواد مانند آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن و... یا افزایش مقاومت گیاه میزبان نسبت به عوامل بیماری‌زا، اثر آن را خنثی یا تعدیل می‌کنند (Chancey *et al.*, 2002). این باکتری‌ها، طیف وسیعی از مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم را برای افزایش رشد گیاه و تولید محصول استفاده می‌کنند. در تحقیق حاضر، جدایهٔ M2-15 به لحاظ تأثیر مثبت بر تعدادی از شاخص‌های رشد و کاهش شاخص بیماری، اختلاف معنی‌داری با شاهد منفی داشت. هرچند این جدایه، میزان کمی سیدورفور تولید می‌کند، ولی ممکن است به روش غیرمستقیم، مثلاً تولید آنتی‌بیوتیک یا افزایش مقاومت گیاه نسبت به عامل بیماری‌زا، باعث تأثیر مثبت در کاهش بیماری موردنظر شده باشد که بررسی این مکانیسم‌ها به مطالعات بیشتر در تحقیقات آینده نیاز دارد. با توجه به این نتایج، استفاده از جدایهٔ مذکور به‌عنوان باکتری محرک رشد گیاه نخود و کاهش‌دهندهٔ شاخص بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود در آزمایش‌های مزرعه‌ای، پیشنهاد می‌شود. در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از جدایهٔ آنتاگونیست مناسب در مبارزهٔ تلفیقی همراه با ارقام مقاوم و تعیین زمان مناسب برای کاشت و نیز تناوب و آفتاب‌دهی خاک، در کنترل پژمردگی فوزاریومی نخود، مؤثر می‌باشد.

منابع

1. Alavi, A., and Ahunmanesh, A. 1376. Biological control of soil borne pathogen. Tehran. Nashr Azmun Keshavarzi Publication.
2. Arora, D.K., and Pandey, A.K. 1989. Effect of soil solarization on Fusarium wilt of chickpea. Phytopathology 124: 13-22.
3. Bossis, E., Lemanceau. P., Latour, X., and Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Journal of Bacteriology 20: 51-63.
4. Botelho, G.R., and Mendonca-Hagler, L.C. 2006. Fluorescent Pseudomonas associated with the rhizosphere of crops-an overview. Journal of Microbiology 37: 401-416.
5. Castaneda, G.C., Munoz, T.J.J., and Videa, J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. Journal of Microchemical 81: 35-40.
6. Delany, I., Sheehan, M.M., Fenton, A., Bardin, S., Aarons, S., and O Gara, F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* Fl13: genetic analysis of phlF as a transcriptional repressor. Journal of Microbiology 146: 537-546.

7. Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. Journal of Phytopathology 26: 75-91.
8. Hass, D., and Defago, W. 2005. Biological control of soil-borne-pathogens by *fluorescent* pseudomonads. Nature Reviews Microbiology 3: 307-319.
9. Hervás, A., Landa, B., and Jiménez-Díaz, R.M. 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. On protection from Fusarium wilt by treatment with non- pathogenic *Fusarium oxysporum*. European Journal of Plant Pathology 103: 631-642.
10. Howell, C.R., and Stipanovic, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by bacterium. Phytopathology 69: 480-482.
11. Jamali, F., Sharifi Tehrani, A., Okhovva, M., and Zakeri, Z. 1384. Effect of antagonistic bacteria on the control of fusarium wilt of Chickpea caused by *Fusarium oxysporum* under greenhouse conditions. Journal of Plant Pathology 3: 711-717. (In Persian with English Summary).
12. Kaur, R., Singh, R.S., and Alabouvette, C. 2007. Antagonistic activity of selected isolates of fluorescent pseudomonas against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. Asian Journal of Plant Science 6: 446-454.
13. Keel, C., and Defago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: A.C. Gange and V.K. Brown (Eds). Multitrophic Interactions in Terrestrial System. Oxford: Blackwell Science.
14. Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., D´efago, G., Cook, R.J., and Thomashow, L.S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations. Applied and Environmental Microbiology 62: 552-563.
15. Kraus, J., and 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: 264-271.
16. MSTAT-C. Version 1.42. R.D. Freed and S.P. Eisensmith. Crop and Soil Sciences Department. Michigan State University.
17. Nagarajkumar, M., Bhashkaran, R., and Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by pseudomonas fluorescens in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice, sheath blight pathogen. Microbiology 159: 73-81.
18. Navas-Cortes, J.A., Hau, B., and Jimenez-Diaz, R.M. 2000. Yield loss in chickpeas in relation to development of Fusarium wilt epidemics. Phytopathology 11: 1269-1278.
19. O' Sullivan, D.J., and O Gara, F. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. involved in suppression of plant root pathogen. Microbiology 56: 662-676.
20. Owen, A., and Zlor, R. 2001. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and Corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemented Glycine. Soil Biochemectry 33: 801-809.
21. Parsa, M., and Bagheri, A. 1387. Pulses. Iranian Academic Center for Education, Culture and Research Mashhad.
22. Raaijmakers, J.M., and Weller, D.M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas sp*. characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strains Q8r1-96. Applied and Environmental Microbiology 67: 2545-2554.
23. Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Praveen Kumar, V., Jeevan Chandra, S., and Ram Reddy, S. 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonas associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Research 14: 1491-1494.
24. Thomashow, L.S., and Weller, D.M. 1988. Role of Phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Journal of Bacteriology 170: 3499-3508.
25. Velusamy, P.J., Immanuel, E., Gnanamanickam, S.S., and Thomashow, L. 2006. Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. Journal of Microbiology 52: 56-65.
26. Weller, D.M., and Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with *Fluorescent pseudomonads*. Phytopathology 78: 463-469.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 3, No. 2, 2012, p. 55-64

Antagonistic effect of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris

Ebrahimi Kazemabad[1*], Z., Rohani[2], H., Jamali[3], F. & Mahdikhani Moghadam[4], E.

1,2&4- Graduate Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Khalij Fars University of Bushehr

Received: 15 June 2011
Accepted: 20 January 2012

Abstract

Fusarium wilt of chickpea, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris, is one of the most important diseases of this plant in Iran. In order to control this disease biologically, fluorescent pseudomonas were isolated from the rhizosphere of chickpea plants and enumerated using King'S medium B (KB). Antifungal activity of 80 bacterial isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris was evaluated on KB and potato dextrose agar (PDA) media. Results revealed that from 80 isolates tested, 81.25% of isolates in KB and 94.37% in PDA showed the ability to inhibit fungal growth. There was a correlation between production of antifungal metabolites and disease reduction, however, no correlation was observed between Siderophore production and metabolite production. Under greenhouse conditions, results showed that only M2-15 isolate reduced Fusarium wilt of chickpea significantly, with the rest having positive effects on chickpea growth factors. In greenhouse experiment, M2-15 ، Pf-5 and K-15 isolates caused a significant increase in growth factors including dry and fresh root and shoot weights compared to control plants. Among isolates studied in this research, M2-15 decreased the severity of chickpea wilt under greenhouse conditions, significantly.

Key words: Antibiotic, Biological control, Fusarium wilt, *Pseudomonas fluorescens,* Siderophore

* **Corresponding Author:** ebrahimi.zahra20@gmail.com, Mobile: 09132568502