

کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه ریزوکتونیایی کلزا با استفاده از باکتری *Burkholderia cepacia*

شیراحمد سارانی^۱، عباس شریفی تهرانی^۲، مسعود احمدزاده^۳ و محمد جوان نیکخواه^۴

۱- نویسنده مسئول: عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل (shirahmad_sarani@yahoo.com)

۲و۳- به ترتیب استاد و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۱۹

چکیده

کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای خاکزاد با استفاده از میکروارگانیسم های آنتاگونیست مورد توجه قرار گرفته اند. به خصوص جدایه های باکتری *Burkholderia cepacia* Burkholder شدیداً به عنوان عوامل بیولوژیک مورد تحقیق هستند. هدف این تحقیق شناسایی یک عامل موثر کنترل بیولوژیک علیه بیماری مرگ گیاهچه کلزا ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* Kuehn می باشد. مرگ گیاهچه ریزوکتونیایی یکی از بیماری های مهم این گیاه صنعتی می باشد. کلیه جدایه های انتخابی در آزمایشگاه با استفاده از روش کشت متقابل علیه قارچ عامل بیماری بررسی شدند. دو جدایه دارای خاصیت آنتاگونیستی در آزمون های گلخانه ای مورد بررسی های تکمیلی قرار گرفتند. بر اساس آزمون های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک، جدایه Bu1 به *Burkholderia cepacia* تعلق داشت. جدایه Bu1 *B. cepacia* بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه مرگ گیاهچه کلزا نشان داد. تیمار بذر و خاک با باکتری باعث کاهش مرگ گیاهچه به ترتیب با ۵۶ و ۶۲ درصد گردید. نتایج مطالعه بر روی مکانیسم های بیوکنترل جدایه ها نشان داد که جدایه Bu1 تولید آنتی بیوتیک و متابولیت های فرار می کند. همچنین این جدایه قادر به تولید سیدروفور، آنزیم پروتئاز و سیانید هیدروژن می باشد. این جدایه یک کلونیزه کننده قوی ریشه کلزا بوده و باعث افزایش رشد گیاه کلزا به طور معنی داری در مقایسه با شاهد می گردد.

کلید واژه ها: کنترل بیولوژیک، *Burkholderia cepacia*، مرگ گیاهچه، کلزا، کلونیزاسیون

مقدمه

وسیع، قدرت بیماریزایی شدید تحت شرایط اقلیمی مساعد و هم چنین مقاومت بسیار زیاد اسکروت های این قارچ در شرایط نامساعد موجب گردیده است تا در بسیاری از گیاهان زراعی به عنوان بیمار گر بسیار خطرناک مطرح بوده و یکی از قارچ های محدود کننده کشت کلزا محسوب می شود (۳ و ۴). در سال های اخیر امکان کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی با استفاده از میکروارگانیسم های آنتاگونیست از قبیل

گیاه کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. از تیره شب بو (Brassicaceae) از مهم ترین گونه های تولیدکننده دانه روغنی در جهان می باشد. افزایش کشت کلزا عمدتاً برای تولید روغن بوده است که کشت تجاری آن در اواسط قرن بیستم در کشور کانادا آغاز گردید. یکی از بیماری های مهم آن مرگ گیاهچه در اثر *Rhizoctonia Kuehn solani* می باشد (۲). این قارچ یکی از قارچ های پلی فاژ بیماریزای گیاهی است. داشتن دامنه میزبانی

بیماری های ریشه است (۲۹ و ۳۰). کاهش بیماری بوته میری نخود فرنگی در اثر *Pythium ultimum* به وسیله *B. cepacia* با افزایش جمعیت باکتری روی ریشه گیاه همبستگی معنی داری داشته است (۲۵). تاثیر *B. cepacia* در کلونیزاسیون ریشه از دیگر باکتری ها اثر بهتری دارد. این باکتری دارای ترکیبات فرار ضد قارچی بوده و توانایی افزایش رشد و کلونیزه کردن ریشه ذرت را دارد و هم چنین علیه قارچ های بیماریزای خاکزی ذرت دارای قدرت بازدارندگی می باشد. این باکتری علیه قارچ های بیماریزای *R. solani* و *P. ultimum* گیاه پنبه بکار رفته و دارای خاصیت بازدارندگی زیاد بوده است (۱۰). هدف این تحقیق شناسایی یک عامل موثر کنترل بیولوژیک علیه بیماری مرگ گیاهچه کلزا ناشی از قارچ *R. solani* می باشد.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی قارچ *Rhizoctonia*

solani از خاک و گیاهچه های آلوده

گیاهچه های آلوده که دارای علائم شانکر در ناحیه طوقه و مرگ گیاهچه بودند پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو به مدت ۳۰ دقیقه زیر جریان ملایم آب شیر، با محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳ دقیقه ضد عفونی سطحی گردیدند و پس از دو بار شستشو با آب مقطر سترون و رطوبت زدایی روی کاغذ خشک کن سترون به قطعات کوچک تر بریده شدند. سپس به محیط آب آگار ۲ درصد درون تشتک پتری منتقل و تشتک ها به صورت وارونه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای جلوگیری از رشد باکتری ها از آنتی بیوتیک سولفات استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. بعد از ۲ روز تشتک ها به کمک استریومیکروسکوپ دو چشمی بررسی و قارچ هایی که خصوصیات عمومی

Burkholderia cepacia مورد توجه قرار گرفته است (۲۵). این باکتری در مزارع نخود آلوده به قارچ *Aphanomyces* عامل پوسیدگی ریشه دارای پتانسیل بیوکنترل بوده و جدایه AMMP باکتری باعث افزایش محصول نخود در مزرعه شده و از شدت علائم و خسارت بیماری جلوگیری نموده است (۲۵). گزارش شده که تاثیر باکتری *B. cepacia* در مقایسه با سم متالاکسیل تفاوت زیادی نداشته ولی در مقایسه با تیمار شاهد آلوده و بذر تیمار نشده تفاوت معنی دار داشته و کنترل باکتری در حد ۹۰ درصد بوده است (۲۵). چهار جدایه این باکتری را بر روی محیط کشت PDA و KB بر علیه برخی از عوامل بیماریزای مهم گیاهی مورد بررسی قرار داده و مشاهده گردید که میانگین قطر هاله بازدارنده برای هر یک از این جدایه ها متفاوت می باشد و میزان آن در محیط کشت KB کمتر از PDA بود و از قارچ هایی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند می توان به *Macrophomina phaseolina* Tassi *Sclerotium*، *Pythium ultimum* Trow *Fusarium oxysporum*، *rolfsii* Sacc *Rhizoctonia solani* Schlecht و Kuehn. اشاره نمود (۶). باکتری *B. cepacia* تولید ترکیبات پیروول نیتروژن، بیولوژیک و التریسیدین می نماید که در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای برگ، خاکزی و همچنین بیماری های پس از برداشت مؤثرند (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴). این باکتری هم چنین تولید سیدروفور سپاباکتین^۱ و پیوکلین^۲ می نماید. نقش اصلی این ترکیبات تأمین آهن برای سلول است (۲۲). سیدروفورها ضمن افزایش رشد گیاه، در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی نیز مؤثرند. توانایی یک آنتاگونیست در کلونیزه کردن ریشه یک شرط مهم در توانایی آن برای کنترل

1- Cepabactin

2- Pyocholin

درصد کاهش بیماری در تیمار = درصد تلفات گیاهچه
در شاهد آلوده - درصد تلفات گیاهچه در تیمار

از بذر کلزا رقم هایولا (تهیه شده از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال) برای انجام آزمایش ها استفاده شد.

جداسازی و شناسایی باکتری های موجود در خاک با استفاده از محیط کشت

جداسازی باکتری موجود در خاک با استفاده از روش هاجدرون و همکاران^۱ (۹) و در محیط کشت اختصاصی TB-T انجام گردید. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از رقت باکتری به محیط TB-T منتقل و به کمک میله شیشه ای بر سطح محیط پخش شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد پرگنه هایی که از نظر شکل و رنگ تفاوت داشتند، انتخاب شده و بر روی محیط NA جهت کشت خالص منتقل گردید. خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه های باکتری شامل، واکنش گرم، احیای نیترات، لهانیدن سیب زمینی، آرچی نین دی هیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین و نشاسته، تولید اسپور، رشد هوازی و بی هوازی، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King B تشکیل پرگنه زرد یا نارنجی در محیط YDC و تولید مسیلیوم هوایی، تولید لوان و ایندول با استفاده از کلیدهای (۲۸) و روش (۸) بررسی شد.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری

برای بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچهای بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش (۱۷) استفاده شد. به این ترتیب که باکتری به صورت نقطه ای روی محیط کشت NA+PDA و NA به فاصله ۰/۵ سانتی متر از لبه تشتک کشت داده شد و سه روز بعد قطعه ای از محیط کشت حاوی قارچ مورد نظر در وسط تشتک پتری قرار گرفت. برای هر

ریزوکتونیا را نشان دادند به تشتک های حاوی محیط کشت PDA منتقل شدند. کشت های خالص قارچ با جداسازی نوک هیف ها از حاشیه پرگنه بدست آمد. این کشت ها درون لوله آزمایش حاوی محیط PDA در دمای ۴ درجه سانتی گراد (درون یخچال) نگهداری و هر ۲ ماه یکبار تجدید کشت شدند. برای شناسایی قارچ از کلیدهای (۲۴)، (۳۱ و ۲۶) و روش (۳) استفاده شد. صفات مورد اندازه گیری عبارت بودند از (۱) تعیین قطر هیف (۲) اندازه گیری رشد شعاعی پرگنه قارچ (۳) بررسی خصوصیات مرفولوژیکی (۴) رنگ آمیزی هسته ها (۵) تعیین گروه آناستوموزی که برای انجام آن از روش (۲۷) استفاده شد.

تهیه مایه تلقیح بیمارگر و اثبات بیماریزایی آن روی کلزا در شرایط گلخانه

برای تهیه مایه تلقیح قارچ از روش (۲۳) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا قارچ روی محیط کشت PDA به مدت ۳ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد کشت گردید. سپس ۵ قطعه ۵ میلی متری از این محیط کشت حاوی قارچ در یک فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ گرم بذر ارزن اتوکلاو شده و مقدار ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون قرار داده شد. این فلاسک به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس دو گرم بذر ارزن به ازای یک کیلوگرم خاک اضافه و در هر گلدان ۴ عدد بذر کاشته شد. پس از دو تا هفت روز علائم بصورت شانکرهای تیره رنگ ظاهر گردید که در ابتدا بخشی از طوقه را فرا گرفت و سپس، مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه رخ داد. برای هر تیمار ۴ تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی بکار رفت و درصد تلفات گیاهچه محاسبه گردید (۱).

تعداد گیاهچه سالم در تیمار شاهد غیر آلوده - تعداد گیاهچه سالم در تیمار = درصد تلفات گیاهچه در تیمار

تعداد گیاهچه های سالم در تیمار شاهد غیر آلوده

طرح کاملاً تصادفی بود و هر تیمار در سه تکرار انجام شد و داده‌های بدست آمده (رشد میسلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک درصد انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ محاسبه گردید.

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

این آزمایش مطابق روش (۲۱) انجام گرفت. در مرحله اول، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ جدایه‌های باکتری توسط میله شیشه‌ای بر سطح محیط‌های کشت PDA و NGA پخش شد و تشتک‌های پتری به مدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. در مرحله دوم، حلقه‌هایی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ در مرکز تشتک پتری حاوی PDA کشت گردید. سپس در کنار شعله با رعایت شرایط سترون تشتک‌های پتری حاوی به‌طور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی باکتری‌های انتاگونیست قرار داده شد و توسط نوار پارافیلیم کاملاً مسدود گردیدند. ظروف کشت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷-۳ روز نگهداری شدند. در تشتک پتری شاهد فقط حلقه‌ای از محیط PDA حاوی قارچ در مقابل تشتک‌های پتری حاوی PDA و NGA بدون باکتری قرار داده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی بود و هر تیمار در سه تکرار انجام گرفت و داده‌های بدست آمده از آزمایش (رشد میسلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک درصد انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ پس از ۷-۳ روز محاسبه گردید.

تیمار سه تکرار بکار رفت. تشتک‌های پتری بمدت ۲ تا ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی به عنوان واکنش مثبت بازداری از رشد قارچ تلقی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله پرگنه باکتری تا میسلیوم قارچ اندازه‌گیری و میانگین آنها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۵٪ مقایسه شد.

نگهداری باکتری‌ها

برای نگهداری طولانی مدت از روش (۳۲) استفاده گردید. چند لوپ از کشت جوان جدایه *B. cepacia* رشد یافته روی محیط NA به درون لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت NA کشت گردید. سپس زیر پارافین مایع سترون نگهداری گردید. همچنین از روش نگهداری در آب مقطر سترون حاوی محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم و تجدید کشت متناوب نیز استفاده گردید.

بررسی تولید متابولیت‌های باکتریایی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

تولید آنتی‌بیوتیک

این آزمون بر اساس روش (۲۱) انجام گرفت. با استفاده از پی‌پت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری و آب مقطر سترون (شاهد) به محیط PDA اضافه و پخش شد و بمدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از این مدت با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، پرگنه باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شد. آنگاه پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (به صورت وارونه) قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه تقریباً تمام باکتری‌ها از بین رفتند. سپس یک حلقه به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ با رعایت شرایط سترون در وسط هر تشتک پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از ۷-۳ روز اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ انجام گردید. این آزمایش در قالب

تولید سیدروفور

صورت واژگون در دمای ۲۷ سانتی گراد در انکوباتور به مدت یک هفته نگهداری شدند. در صورت تولید HCN توسط باکتری، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و آجری دیده می شود که نشانه تفاوت در تولید HCN توسط باکتری می باشد. رنگ کرم بیانگر حداقل مقدار تولید HCN و رنگ آجری مبین حداکثر تولید HCN است.

تعیین قوه نامیه بذرها

برای تعیین قوه نامیه بذر از روش های استاندارد استفاده گردید. بر این اساس ۴۰۰ عدد بذر کلزا رقم هایولا به طور تصادفی انتخاب و در هر تشتک پتری ۹ سانتی متری حاوی کاغذ صافی مرطوب تعداد ۲۰ عدد بذر به فاصله حدود ۲ سانتی متر از یکدیگر قرار داده شد. ظروف پتری در دمای 20 ± 3 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. اولین شمارش بذره‌های جوانه زده در روز دوم و شمارش نهایی در روز هفتم انجام گردید. به این ترتیب قدرت جوانه زنی بذور تعیین شد.

بررسی اثر باکتری های آنتاگونیست در کاهش بیماری در شرایط گلخانه

برای انجام این آزمایش از روش (۱۸) بشرح زیر استفاده شد: پس از تهیه مایه قارچ بیماریزا روی بذر ارزن و اضافه کردن آن به خاک (دو گرم بذر ارزن به ازای یک کیلوگرم خاک) در روش آغشته سازی خاک (سترون و غیر سترون) مقدار ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون هر جدایه حاوی 10^9 سلول باکتری در هر گرم خاک در متیل سلولز یک درصد (شمارش باکتری از روش سری رقت) استفاده شد. در روش آغشته سازی بذر، بذور سترون شده کلزا به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون هر جدایه حاوی 10^9 سلول باکتری (cfu)^۴ در میلی لیتر غوطه ور شدند. تهیه مایه تلقیح باکتری مطابق روش (۷) انجام شد

برای بررسی تولید سیدروفور از روش (۳۰) استفاده شد. در این روش از محیط^۱ CAS استفاده گردید. در صورتی که باکتری تولید سیدروفور کند، باعث تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی می شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS می باشد. اندازه هاله ایجاد شده در اطراف پرگنه باکتری با میزان سیدروفور رابطه مستقیمی دارد. میانگین بدست آمده برای هر باکتری با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک درصد با یکدیگر مقایسه شد.

تولید پروتئاز

با توجه به نقش پروتئاز به عنوان یکی از مکانیسم های کنترل بیولوژیکی، بررسی تولید آنزیم پروتئاز بر اساس روش (۲۳) صورت گرفت. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت SMA^۲ شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی^۳ و ۱۳/۵ گرم آگار باکتریولوژیک تهیه و درون اتوکلاو سترون شد. تشتک های حاوی محیط کشت SMA در ۲۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. تشکیل یک هاله بی رنگ در اطراف پرگنه باکتری نشانه فعالیت پروتئاز است.

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش (۵) استفاده گردید. ابتدا برای هر جدایه ۳ تشتک پتری حاوی محیط NA تهیه شد. داخل هر پتری ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و ۵٪ اسید پیکریک) در قسمت درب پتری قرار داده شد. درب پتری با نوار پارا فیلم چسبانده شد تا از خروج هرگونه متابولیت فرار و گاز از جمله HCN جلوگیری شود. آنگاه پتری ها به

1- Chrome Azurol S

2- Skim Milk Agar

3 - Blood Agar Base

4- Colony forming unit

۴۸ ساعت نگهداری شده و پس از خشک شدن بلافاصله وزن شدند). برای هر تیمار از چهار تکرار استفاده شد. در تیمار شاهد از بذر معمولی که ضد عفونی سطحی شده بود استفاده گردید. در روش آغشته سازی خاک، خاک گلدان ها با ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جدایه باکتری حاوی 1×10^9 سلول در هر گرم خاک و در روش آغشته سازی بذر از غلظت 1×10^9 سلول در میلی لیتر استفاده شد. با توجه به اینکه برای هر گرم خاک تعداد 1×10^9 واحد تشکیل دهنده پرگنه استفاده می شود بنابراین ابتدا بر اساس وزن خاک، جمعیت مورد نیاز باکتریایی تعیین شد و بر اساس حجم و وضعیت رطوبتی گلدان ها، مقدار آب متناسب برای آنها مشخص شد به نحوی که پس از افزودن این مقدار آب از زیر گلدان بیش از چند قطره خارج نشود.

بررسی اثر باکتری آنتاگونیست بر کاهش بیماری در شرایط خاک غیر سترون

این آزمایش بصورت آغشته سازی خاک غیر سترون آلوده به قارچ *R. solani* با باکتری آنتاگونیست انجام گرفت. در روش آغشته سازی خاک، ابتدا خاک در هر گلدان با مایه تلقیح قارچ مخلوط شد. سپس خاک گلدان ها با ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جدایه باکتری حاوی 1×10^9 سلول در هر گرم خاک مخلوط شد. تعداد ۴ بذر در هر گلدان کاشته شد. پارامترهای مورد ارزیابی تعداد بذور جوانه زده و گیاهان سالم پس از چهار هفته بود. این آزمایش دو مرتبه در شرایط یکسان تکرار شد. در هر مرتبه سه تکرار برای هر تیمار، در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی بکار رفت. گلدان ها در گلخانه نگهداری شده و یک روز در میان آبیاری شدند. تیمارها عبارت بودند از: شاهد آلوده حاوی ۲ گرم مایه تلقیح قارچ در هر گلدان، شاهد غیر آلوده حاوی ۲ گرم ارزن فاقد مایه تلقیح قارچ در هر گلدان، آغشته سازی خاک گلدان ها با قارچ کش بنومیل + ۲ گرم مایه تلقیح قارچ و آغشته سازی

و دو نحوه تیمار بذر و تیمار خاک با مایه تلقیح مقایسه شدند. از قارچ کش بنومیل مطابق روش (۱۵) در آزمایش های گلخانه ای جهت مقایسه با اثر باکتری های آنتاگونیست استفاده شد. در هر گلدان ۴ عدد بذر کاشته شد. از گلدان هایی به قطر ۱۳ سانتی متر استفاده شد و آبیاری گلدان ها به طور منظم هر ۴۸ ساعت انجام گرفت. پارامترهای مورد ارزیابی تعداد بذور جوانه زده پس از چهار هفته (نگهداری در شرایط گلخانه) بود. برای هر تیمار سه تکرار در یک طرح بلوک کامل تصادفی بکار رفت. این آزمایش دو مرتبه در شرایط یکسان تکرار شد.

بررسی کلونیزاسیون ریشه کلزا توسط باکتری های آنتاگونیست

برای انجام این بررسی از روش (۱۶) استفاده شد. دو هفته پس از کاشت بذور آغشته به باکتری های آنتاگونیست در آزمایش گلخانه ای برای هر تیمار سه گیاهچه انتخاب و ریشه های آنها توزین گردید. ریشه ها به قطعات کوچک تر بریده شد و درون ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ۰/۸۵ درصد نمک طعام ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. رقت های مناسب تهیه و با استفاده از پی پت پاستور مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط کشت کینگ ب حاوی آنتی بیوتیک سولفات کانامایسین و محیط کشت NA پخش گردید. پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت شمارش باکتری صورت گرفت. جمعیت اولیه باکتری $10^6 \times 6/5$ بود.

بررسی اثر باکتری در افزایش رشد کلزا در شرایط عاری از قارچ *R. solani*

این آزمایش به دو روش آغشته سازی خاک و بذر انجام گرفت. در این روش فاکتورهای رشدی گیاه شامل، وزن تر و خشک اندام های هوایی و وزن تر و خشک ریشه پس از ۴ هفته بررسی شد (برای اندازه گیری وزن خشک اندام های هوایی و ریشه نمونه ها در آون ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت

خصوصیات جدایه Bu1 بورخولدیریا بر اساس آزمون های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

جدایه Bu1 قادر به رشد در PH ۵/۷ و ۶/۸ و نمک طعام ۳۱ درصد می باشد. این جدایه گرم منفی و دارای رشد هوازی و پیگمان غیرفلورسنت و قادر به احیای نیترات می باشد. جدایه اکسیداز و آرچینین دی هیدرولاز مثبت بود. از منابع کربن آل آرابینوز، دی گالاکتوز، تری هالوز، سوربیتول، ام اینوزیتول، ساکارز، بتا آلانین، آدونیتول استفاده نموده، ولی قادر به هیدرولیز نشاسته و ژلاتین نبود (جدول ۱). خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه Bu1 با خصوصیات ذکر شده برای باکتری گونه *Burkholderia cepacia* (۸ و ۲۸) مطابقت داشت.

مکانیسم های بازدارندگی در جدایه *B. cepacia*

این جدایه قادر به تولید آنتی بیوتیک، ترکیبات فرار، سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز می باشد (جدول ۲).

بررسی قدرت کلونیزاسیون ریشه های کلزا توسط باکتری آنتاگونیست

نتایج حاصل از شمارش کلنی باکتری های رشد یافته روی محیط کشت مربوط به ریشه های کلزا درون خاک آلوده پس از دو هفته نشان داد که جمعیت باکتری از $10^6 \times 6/5$ به $10^8 \times 2/8$ (کلونی بر گرم ریشه) رسید.

مقایسه نحوه کاربرد مایه تلقیح باکتری در گلخانه

قوه نامیه بذور کلزا در حدود ۹۶ درصد تعیین گردید. میزان تاثیر جدایه باکتری در روش آغشته سازی خاک (۶۲ درصد) بهتر از روش آغشته سازی بذر (۵۶ درصد) بود (شکل ۱).

خاک گلدان ها با سوسپانسیون جدایه Bu1 حاوی 1×10^9 سلول در هر گرم خاک + ۲ گرم مایه تلقیح قارچ.

نتایج

مشخصات قارچ *R. solani*

جدایه ریزوکتونیایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت متعلق به گروه آناستوموزی AG۲-۱ بوده که علاوه بر پوسیدگی ریشه، روی هیپوکوتیل گیاهچه بلافاصله بالای سطح خاک شانکرهای فرورفته بیضی شکل ایجاد نمود که با ویژگی های ارائه شده برای این گروه آناستوموزی مطابقت دارد (۲۴ و ۲۷). رنگ پرگنه قارچ در ابتدا سفید است و بعداً به رنگ سفید مایل به کرم، قهوه ای روشن تا قهوه ای تیره تغییر می یابد. اسکروت ها به طور منفرد و در بعضی از موارد به صورت پراکنده و در بعضی از موارد به صورت مجتمع در سطح زیرین در تشتک و یا در سطح محیط کشت تشکیل شدند. اندازه آنها ۰/۴ تا ۲/۵ میلی متر است. انشعابات هیف ها هم با زاویه حاده و هم با زاویه قائمه بوده و در قاعده انشعابات دارای فرورفتگی مشخص بودند. کمی بالاتر از محل فرورفتگی در انشعابات دیواره عرضی تشکیل شد که فاصله دیواره عرضی از محل فرورفتگی در جدایه های مختلف با هم متفاوت بود و بطور کلی ۳ تا ۲۵ میکرومتر بود. طول سلول های هیف به اندازه ۲۵ تا ۲۹۰ میکرومتر است. سلول های مونیلیوتید به صورت زنجیره های ساده و یا منشعب تشکیل شده بود و رنگ آنها قهوه ای روشن تا قهوه ای است و اندازه آنها ۲۸-۱۲×۱۶-۹ میکرومتر است. تعداد هسته در سلول های هیف ۳ تا ۱۲ عدد می باشد. قطر هیف ها ۵/۸ تا ۹/۴ میکرومتر بوده و دمای بهینه برای این جدایه ۲۴ تا ۲۷ درجه سانتی گراد و میزان رشد شعاعی روزانه قارچ ۱۷ میلی متر است.

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه *B. cepacia*

خصوصیات	خصوصیات جدایه Bu1
آزمون گرم	-
تولید لوان	+ Levan formation
اکسیداز	+ Oxidase
احیای نیترات	+ Nitrate reclusion
لهانیدن سیب زمینی ^۱	+ Potato rot
آرچی نین دی هیدرولاز	- Arginin dihydrolase
واکنش فوق حساسیت در شمعدانی	- HR
رشد در ۴ درجه سانتی گراد	+ Growth at 4 °C
رشد در ۴۱ درجه سانی تگراد	+ Growth at 41 °C
هیدرولاز ژلاتین	- Gelatin hydrolysis
هیدرولیز نشاسته	- Starch hydrolysis
استفاده از	Utilization of
ال-آرابینوز	+ L-Arabinose
دی - گالاکتوز	+ D-Galactose
تری هالوز	+ Trehalose
سوربیتول	+ Sorbitol
ام - اینوزیتول	+ M-Inositol
ساکارز	+ Sucrose
بتا-آلانین	+ B-alanine
آدونیتول	+ Adonitol
تارتارات سدیم	- Sodium tartarate

۱- این لهیدگی برای گیاه کلزا مضر نیست.

جدول ۲- بررسی تعدادی از مکانیسم های آنتاگونیستی در بازداری از رشد بیمارگر

جدایه	تولید ^{(۵)(۶)} آنتی بیوتیک	ترشحات فرار روی محیط PDA ^{(۵)(۶)}	ترشحات فرار روی محیط NGA ^{(۵)(۶)}	سیدروفور ^(۱)	پروتناز ^(۲)	سیانید هیدروژن ^(۳)	بازدارندگی علیه قارچ ^{(۴)(۵)}
Bu1	۳۹/۲	۲۵/۹	۲۵/۳	+	+	+	۱۱

(۱) ایجاد هاله نارنجی اطراف باکتری روی محیط CAS نشانه تولید سیدروفور می باشد.

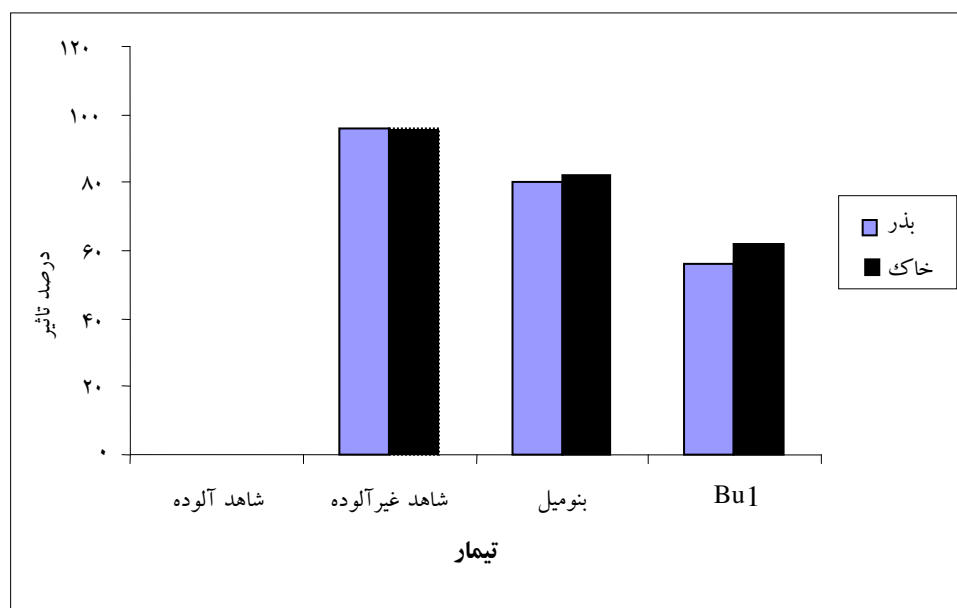
(۲) فعالیت پروتناز بر اساس بیرنگ نمودن محیط SMA تعیین شد.

(۳) تولید سیانید بر اساس میزان تغییررنگ کاغذصافی آغشته به معرف تعیین شد.

(۴) فاصله بین میسلیم قارچ و کلنی باکتری روی پتری بر حسب میلی متر

(۵) درصد تاثیر جدایه در جلوگیری از رشد قارچ در سطح یک درصد نسبت به شاهد

(۶) هر عدد میانگین سه تکرار است.



شکل ۱- مقایسه نحوه کاربرد مایه تلقیح باکتری به دو روش آغشته سازی بذر و خاک در شرایط گلخانه

تأثیر جدایه آنتاگونیست بر فاکتورهای مختلف

رشدی در شرایط عاری از عامل بیماری

این جدایه موجب افزایش رشد گیاه کلزا (افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام های هوایی) در مقایسه با شاهد در روش آغشته سازی خاک و روش آغشته سازی بذر گردید (جدول ۴).

بررسی در شرایط خاک غیر سترون

همه تیمارها از نظر میانگین تعداد گیاهچه های سالم در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار داشتند. آلوده نمودن خاک گلدان ها با قارچ (تیمار شاهد) موجب ۹۶ درصد تلفات گیاهچه های کلزا گردید (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر جدایه آنتاگونیست در کاهش مرگ گیاهچه های کلزا در شرایط خاک غیر سترون

تیمار	میانگین تعداد گیاهچه های سالم	درصد تلفات	درصد تأثیر تیمارها ^۲	گروه بندی تیمار (۵٪) ^(۱)
شاهد آلوده	۰/۰۴	۹۶	-	a
شاهد غیر آلوده	۱	-	۱۰۰	c
بنومیل	۰/۸۰	۱۶	۸۰	b
Bu1	۰/۶۶	۳۰	۶۶	b

(۱) اعداد هر ستون با حروف یکسان در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار ندارند.

(۲) هر عدد میانگین سه تکرار است.

جدول ۴- تأثیر جدایه های آنتاگونیست بر وزن تر و خشک اندامهای هوایی و وزن تر و خشک ریشه، در روش آغشته سازی بذر و روش آغشته سازی خاک در شرایط عاری از عامل بیمارگر

تیمارها	وزن تر اندام های هوایی (گرم)	گروه بندی تیمارها	وزن خشک اندام های هوایی (گرم)	گروه بندی تیمارها	وزن تر ریشه (گرم)	گروه بندی تیمارها	وزن خشک ریشه (گرم)	گروه بندی تیمارها
Bu1 (بذر)	۲/۹۹	a	۰/۳۴۳	a	۰/۵۷	a	۰/۲۱۱	a
شاهد (بذر)	۲/۹۵	b	۰/۳۱۰	b	۰/۵۶	b	۰/۱۹۲	b
Bu1 (خاک)	۳/۶۶	a	۰/۳۵۳	a	۰/۶۶۰	a	۰/۲۳۷	a
شاهد (خاک)	۳/۳۴	b	۰/۳۴	b	۰/۶۳۳	b	۰/۲۲۰	b

۱- اعداد ستون که با حروف یکسان در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار ندارند.

(هر عدد میانگین سه تکرار است).

بحث

قارچ *R. solani* در اغلب مناطق جهان به عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشت محصولات زراعی مختلف از جمله کلزا محسوب شده و باعث ایجاد خسارت زیادی به محصول می شود. در استرالیا و کانادا این قارچ باعث پوسیدگی هیپوکوتیل و مرگ گیاهچه شده است (۱۹). جدایه باکتری مورد آزمایش تأثیر زیادی در شرایط گلخانه به روش آغشته سازی خاک و بذر داشت ولی روش آغشته سازی خاک با سوسپانسیون باکتری نتیجه بهتری نسبت به آغشته سازی بذر ایجاد کرد که این با نتایج تحقیق احمدزاده و همکاران (۱) مطابقت دارد. در آزمایش تأثیر آنتی بیوتیک تولید شده از جدایه Bu1 در محیط کشت PDA مشخص گردید که آنتی بیوتیک تولید شده توسط این باکتری، باعث بازداری از رشد در مقایسه با شاهد می شود. جدایه *B. cepacia* 5.5 B با تولید آنتی بیوتیک های پیروول نیتروین و فنازین باعث کنترل *R. solani* می شود. تولید آنتی بیوتیک یکی از مهم ترین مکانیسم های کنترل بیولوژیک استرین AMMDR1 باکتری *B. cepacia* می باشد که منجر به کاهش بوته میری پیتیومی و کاهش شدت

پوسیدگی ریشه نخود فرنگی در اثر قارچ *Aphanomyces* می گردد (۶). بررسی پیرامون تولید سیدروفور نشان داد که جدایه Bu1 تولی سیدروفور می کند. برای نخستین بار کلوپر و همکاران^۱ (۲۰) بر اهمیت سیدروفورها به عنوان یکی از مکانیسم های مهم آنتاگونیستی باکتری ها علیه بیمارگرهای گیاهی پی بردند. باکتری *B. cepacia* تولید سیدروفور پیوکلین و سپاباکتین می نماید. نقش اصلی این ترکیبات تأمین آهن برای سلول است (۲۲). سیدروفورها ضمن افزایش رشد گیاه، در کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی نیز مؤثرند. در مورد تولید آنزیم پروتئاز، جدایه Bu1 تولید پروتئاز روی محیط کشت SAM کرد. تولید آنزیم پروتئاز از مکانیسم های مؤثر در کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی توسط باکتری ها بشمار می رود (۱۸). یکی از اثرات قابل توجه باکتری های آنتاگونیست، تأثیر آنها روی افزایش رشد گیاه می باشد. جدایه Bu1 مورد استفاده افزایش معنی داری در رشد ریشه ها و وزن تر اندام های هوایی کلزا داشت. باکتری های موجود در ناحیه

سلولی بود (۱۰). بررسی‌ها نشان داد که باکتری‌های آنتاگونیست به طور فعال در خاک‌های مزارع مناطق مختلف وجود داشته و احتمالاً عامل کاهش طبیعی برخی از بیماری‌های خاکزاد می‌باشند. باکتری آنتاگونیست جدا شده از ریزوسفر کلزا از نظر خواص آنتاگونیستی در آزمایشگاه و گلخانه اثرات قابل توجهی از خود نشان داد. بر اساس مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده تاکنون در ایران در خصوص کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه ناشی از بیمارگر *R. solani* روی کلزا با استفاده از باکتری آنتاگونیست *B. cepacia* هیچ گونه فعالیت پژوهشی صورت نگرفته است و این تحقیق برای اولین بار صورت گرفته است.

سپاسگزاری

هزینه این تحقیق با استفاده از اعتبارات معاونت محترم پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تامین شده، که بدینوسیله نهایت سپاس به عمل می‌آید. هم‌چنین از آقایان دکتر رحیمیان، دکتر روحانی و دکتر افشاری آزاد و دکتر اعتباریان به خاطر رهنمودهای ارزنده‌شان صمیمانه قدردانی می‌شود.

ریزوسفر به طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و نیز به صورت غیر مستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آنها می‌شوند (۳۲). جدایه *B. cepacia* AMMP باعث افزایش محصول نخود در مزرعه شده است (۲۵). بر اساس نتایج محاسبه جمعیت اولیه باکتری‌ها روی بذور و تعیین جمعیت باکتری‌های روی ریشه پس از دو هفته در خاک آلوده می‌توان گفت که جدایه قادر به کلونیزه کردن ریشه بود و نه تنها جمعیت اولیه خود را حفظ کرد بلکه از ۶/۳ (محاسبه لگاریتمی میزان واحد تشکیل دهنده کلنی) به حدود ۸/۴۵ برساند. معمولاً توانایی یک باکتری برای کلونیزاسیون ریشه شرط لازم برای فعالیت کنترل بیولوژیکی علیه قارچ‌های بیمارگر به شمار می‌رود (۱۸). کاهش بیماری بوتیه میری نخود فرنگی در اثر قارچ *Pythium ultimum* بوسیله *B. cepacia* با افزایش جمعیت باکتری روی ریشه گیاه همبستگی معنی‌داری داشت (۲۰). باکتری *B. cepacia* در کلونیزاسیون ریشه از دیگر باکتری‌های سودوموناس اثر بهتری داشت، یعنی دارای سرعت رشد بالا، تولید مواد ضد میکروبی، استفاده از طیف وسیعی از منابع کربنی و تولید آنزیم‌های خارج

منابع

۱. احمدزاده، م.، شریفی‌تهرانی، ع. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۶. جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه. مجله علوم کشاورزی ایران جلد ۲۸، صص ۸۱-۸۶.
۲. افشاری آزاد، ه. ۱۳۸۱. شناسایی عوامل بیماریزای قارچی کلزا در مناطق مختلف کشور و تعیین اهمیت آنها. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، ۱۷ص.
۳. زمانی، م. ر. ۱۳۶۸. تعیین گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* Kuhn. پایان‌نامه فوق لیسانس دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، ۹۹ص.

۴. ناصری، ف. ۱۳۷۰. دانه های روغنی (ترجمه). آستان قدس رضوی مشهد، ۸۲۳ ص.

5. Alstrom, S. 1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant Soil*, 102: 3-9
6. Baligh, M., Delgado, M.A., and Conway, K.E. 1999. Evaluation of *Burkholderia cepacia* strains: Root colonization of *Catharanthus roseus* and *in-vitro* inhibition of selected soil-borne fungal pathogens, Department of Entomology and Plant Pathology, Oklahoma State University. Proceeding of the Oklahoma Academy of Science, 79:19-27
7. Burr, J., Schroth, M.N., and Suslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Phytopathology*, 68:1377-1383.
8. Coenye, T., Vandamme, P.V., Govan, J.R.W., and Lipuma, J.J. 2003. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2797-2798
9. Hagedron, C., Gould, W.D., and Bardinelli, T.R. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 55 (11): 2793 –2797.
10. Hebbar, K.P., Davey, A.G., Merrin, J., McLoughlin, T.J., and Dart, P.J. 1992. *Pseudomonas cepacia*, potential suppressor of maize soil-borne disease-seed inoculation and maize root colonization. *Soil Biology and Biochemistry*, 24:999-1007.
11. Homma, Y., Sato, Z., Hirayama, F., Konno, K., Shirahama, H., and Suzui, T. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biology and Biochemistry*, 21:723-728.
12. Hwang, J., and Benson, D.M. 2001. Role of pyrrolnitrin produced by *Burkholderia cepacia* in biocotrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. *Phytopathology* 91, s41, Abstract.
13. Hwang, J., and Benson, D.M. 2002. Biocotrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*. *Plant disease*, 86:47-53.
14. Janisiewicz, W.J., Yourman, L., Redman, J., and Pears Machone, L. 1991. Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Disease*, 75:490-494.
15. Kaiser, W. J., Hannan, R.M., and Weller, D.M. 1989. Biological control of seed rot and pre-emergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. *Soil Biology and Biochemistry*, 21: 269-273.

16. Keel, C., Voisard C., Berling, C.H., Kahr, G., and Defago, G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 79: 584-589.
17. Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Defago, 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 Environmental Microbiology*, 62:552-563
18. Keel, C., and Defago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In Gange, A.C., Brown, V.K. (eds) *Multitrophic interactions in terrestrial system*. Oxford: Blackwell Science, pp: 27-47.
19. Khangura, R., Barbetti, M.J., and Sweetingham, M.W. 1999. Role of *Rhizoctonia* species in Damping off of Canola. *Proceeding of the 10th International Rapeseed Congress*. Canberra, Australia.
20. Klopper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286: 885-886.
21. Kraus, J., and Loper, J. 1990. Biocontrol damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: mechanistic studies. In Keel, C., Koller, B., and Defago, G. (eds) *Plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria*. Interlachen, Switzerland. pp:172-175
22. Leong, J. 1986. Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 187-209.
23. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1994. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology*, 44:40-50.
24. Ogoshii, A.K. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and interspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuehn. *Annual Review of Phytopathology*, 23:23-45.
25. Parke, J.L., Joy, A.E., and King, E.B. 1991. Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Disease*, 75:987-992.
26. Parmeter, J.R.Jr., and Whitney, H.S. 1970. Taxonomy and Nomenclature of the imperfect state In Parmeter, J.R.Jr. (ed) *Biology and Pathology of Rhizoctonia solani* University of California Press, Berkeley, pp: 7-19.
27. Robert, F.A., and Sivasithamparam, K. 1986. Identity and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with bare patch disease of cereals at a field site in Western Australia. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 92:185-195.
28. Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press, 373 pp.

29. Schroth, M.N., and Hancock, J.G. 1982. Disease -suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*, 216: 1376-1381.
30. Schwyn, B., and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Annals of Biochemistry*, 160:47-56.
31. Sweetingham, M.W. 1996. Integrated control of *Rhizoctonia* species. In Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., and Dijst, G (eds) *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease control, pp: 549-558.
32. Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379 –407.