DOI: http://dx.doi.org/10.22092/bcpp.2016.108153

مطالعه‌ی اثر بیوکنترلی سویه‌های سودوموناس فلورسنت مولد ۲ و ٤- دی استیل فلوروگلوسینول بر نماتد ریشه گرهی در ریزوسفر ارقام گوجه‌فرنگی

سعیده تنها[۱]، فرشته بیات[۱]، فاطمه جمالی[۱]، آیت الله سعیدی‌زاده[۲]

۱- گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه شاهد، تهران

مسئول مکاتبات: فرشته بیات، پست الکترونیک: bayatfereshteh59@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۵/۰۱ ۳۹-۲۷ (۱) ۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

نماتد مولد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* یکی از عوامل مهم بیمارگر گوجه‌فرنگی در کشور به‌شمار می‌رود. در این تحقیق کنترل بیولوژیک این نماتد توسط سویه‌های UTPF68 و UTPF101 باکتری *Pseudomonas fluorescens*، مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا سویه‌ها از نظر دارا بودن ژن *phlD* از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط این باکتری‌ها و تأثیر آن‌ها بر تفریخ تخم و فعالیت لارو سن دوم نماتد در شرایط آزمایشگاه و اثر بیوکنترلی آن‌ها بر فعالیت نماتد در ریزوسفر چهار رقم گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه براساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که هر دو سویه واجد ژن *phlD* بوده و قطعه DNA با طول ۶۲۹ جفت باز در آن‌ها تکثیر شد. سویه‌های باکتریایی قادر به تولید آنتی بیوتیک DAPG، سیانید هیدروژن و پروتئاز در شرایط آزمایشگاهی بودند. سویه UTPF68 نسبت به سویه UTPF101 توانایی بیشتری در عدم تفریخ تخم نماتد داشت، درحالی‌که میزان مرگ و میر لارو سن دوم در هر دو سویه یکسان بوده است. نتایج گلخانه‌ای نشان داد که سویه‌های باکتری موجب افزایش شاخص‌های رشدی ارقام و کاهش فعالیت نماتد در ریزوسفر آن‌ها شدند. میزان افزایش رشد یا کنترل نماتد بسته به رقم گوجه‌فرنگی و سویه باکتری متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، نماتد ریشه گرهی، سودوموناده‌ای فلورسنت، ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوسینول

مقدمه

نماتدهای انگل گیاهان سالیانه موجب خسارت‌های فراوانی به محصولات کشاورزی در سراسر جهان می‌شوند. از این میان، نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت بسیاری بوده و دامنه‌ی وسیعی از محصولات از جمله سبزیجات، گیاهان زراعی، باغی، درختان میوه و علف‌های هرز را آلوده می‌کنند. برای کنترل نماتدهای انگل گیاهی از روش‌هایی نظیر تناوب زراعی، ارقام مقاوم و ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود، اما بعضی از این روش‌ها هزینه‌بر بوده و یا فاقد کارایی لازم هستند (Nitao *et al*., 1999). علاوه براین، ترکیبات شیمیایی دارای سمیت بسیار بالایی بوده و استفاده از آن‌ها مشکلات زیست محیطی فراوانی درپی دارد. سودوموناده‌ای فلورسنت موجب بازدارندگی نماتدهای انگل گیاهی در میزبان‌های مختلف از جمله گوجه‌فرنگی، سویا، ماش، چغندر قند و سیب‌زمینی شده‌اند (Cronin *et al*.,1997; Tian *et al*., 2007). تولید آنتی‌بیوتیک ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG) با فعالیت بیوکنترلی بسیاری از سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* در ارتباط است (Cronin *et al*.,1997; Siddiqui & Shaukat., 2003b). این آنتی بیوتیک می‌تواند رشد و فعالیت برخی بیمارگرهای قارچی و اُامیستی ریشه (Raaijmakers *et al*., 2002) و نیز برخی نماتدهای انگل گیاهی (Cronin *et al*., 1997, Siddiqui & Shaukat, 2003a)

را کاهش دهد و تولید یا بیش‌تولید (Overproduction)آن موجب افزایش فعالیت علیه بیمارگرهای گیاهی می‌شود (Keel *et al*., 1992; Maurhofer *et al*., 1992; Delany *et al*., 2001; Mazzola *et al*., 1995; Cronin *et al*., 1997; Dwivedi & Johri, 2003; Siddiqui & Shaukat, 2003a). سویه‌های *P. fluorescens* مولد DAPG علاوه بر اثر مستقیم روی نماتد، از طریق القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان، قادر به تأثیر غیرمستقیم بر بیمارگر بوده‌اند (Iavicoli *et al*., 2003; Siddiqui & Shaukat, 2003b; 2004b; Weller *et al*., 2004; Van Loon & Bakker, 2005; Bakker *et al*., 2007)، در نتیجه، کاربرد آن‌ها می‌تواند منجر به افزایش عملکرد محصول در شرایط آلودگی گردد (McSpadden Gardener *et al*., 2006a;2006b). کرونین و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند تحرک لاروهای نماتد *Globodera rostochiensis* در شرایط درون شیشه‌ای و خاک، در حضور *P. fluorescens* سویه F113 در مقایسه با شاهد بدون باکتری کاهش یافت. از طرف دیگر، موتانت فاقد توانایی تولید DAPG اثری بر نماتد نداشت ولی همراه کردن (complementation) موتانت با پلاسمید حاوی ژن‌های رمز کننده بیوسنتز DAPG، موجب بازگرداندن فعالیت نماتدایستایی به باکتری شد (Cronin *et al*., 1997).

در مطالعات انجام شده توسط صیدیقی و شوکت مشخص شد، عصاره‌ی کشت *P. fluorescens* سویه‌ی CHA0 (مولد آنتی بیوتیک DAPG) و سویه‌های مشتق شده از این باکتری با توانایی بیش-تولید DAPG، برای لاروهای نماتدهای ریشه گرهی گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* سمیت داشته و تفریخ تخم را کاهش داده‌اند؛ از طرف دیگر، موتانتی از این باکتری که دارای نقص در تولید آنتی‌بیوتیک بود، تأثیری مشابه با شاهد بدون باکتری بر نماتد داشت (Siddiqui & Shaukat, 2003b; 2004a). این محققین در پژوهش دیگری نشان دادند که سویه‌ی CHA0، با خصوصیت بیش-تولید آنتی‌بیوتیک، موجب مرگ و میر بیشتری در لاروهای *M. incognita* نسبت به والد تیپ وحشی خود می‌شود (Siddiqui & Shaukat, 2004c). گالزایی توسط نماتد روی ریشه‌های گوجه فرنگی، در حضور سویه‌ی CHA0 با خصوصیت بیش تولید DAPG کمترین میزان، در حضور سویه‌ی وحشی CHA0 متوسط و در موتانت دارای نقص در تولید آنتی بیوتیک، حداکثر بود (Siddiqui & shaukat, 2003a). مطالعات بعدی نشان دادند که تولید سیانید هیدروژن توسط سویه CHA0 عامل اولیه برای بازدارندگی از تفریخ تخم و کشتن لاروها بوده است (Siddiqui *et al*., 2006). به‌علاوه صدیقی و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که تولید پروتئاز خارج سلولی توسط *P. fluorescens* به‌عنوان یک عامل آنتاگونیستی علیه نماتد *M. incognita* عمل می‌کند (Siddiqui *et al*., 2005a).

هدف از این پژوهش، ردیابی ژن *phlD* (ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز DAPG) در دو سویه *P. fluorescens* و بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی بود. سپس، تأثیر این باکتری‌ها بر کنترل نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه روی چهار رقم گوجه‌فرنگی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، شناسایی و تکثیر نماتد *M. javanica*

ریشه‌های آلوده به نماتد ریشه گرهی از مزارع گوجه‌فرنگی منطقه‌ی دیر استان بوشهر جمع‌آوری شد. تکثیر نماتد با روش تک توده تخم (Single egg mass) روی گوجه‌فرنگی رقم کارون انجام شد و شناسایی گونه‌ی نماتد، مطابق کلید جپسون (Jepson., 1987) صورت گرفت. پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد، جمعیت کافی نماتد خالص *M. javanica* ایجاد شد. استخراج تخم و لارو سن دوم با استفاده از روش هوسای و بارکر (۱۹۷۳) صورت گرفت.

تهیه‌ی سویه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens*

در این مطالعه از باکتری *P. fluorescens*، سویه‌های UTPF101 و UTPF68 استفاده گردید (جدول ۱). با توجه به‌مشخص بودن خصوصیات آنتاگونیستی سویه‌ی UTPF68 (قافله باشی و همکاران، ۱۳۹۳ و احمدزاده و قاسمی، ۱۳۹۱) از این سویه به‌عنوان جدایه استاندارد استفاده شد. باکتری‌ها روی محیط کشت آگار مغذی (NA) تکثیر شدند. برای

تهیه‌ی مایه تلقیح باکتری، پس از کشت آن‌ها در محیط لوریا برتانی براث (LB) به‌مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس، جداسازی سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ کردن در ۳۷۰۰ g، به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در کلیه آزمایش‌ها از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^9 CFU/ml استفاده گردید (Thompson., 1996).

جدول ۱- سویه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* مورد استفاده در مطالعه بیوکنترل.

Table 1. *Pseudomonas fluorescens* strains used for biocontrol study.

Strain	Phenotype or genotype	Reference
UTPF68	Wild type strain : [1]HCN$^+$, [2]PLT$^+$, [3]DAPG$^+$	Jamali *et al*., 2009
UTPF101	Wild type strain : HCN$^+$, PLT$^+$, DAPG$^+$	

1- Hydrogene cyanid
2- *Pyoloturine antibiotic*
3- 2,4- diacetylphloroglucinol

تعیین خصوصیات بیوکنترلی سویه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاه

استخراج و تشخیص آنتی بیوتیک ۲ و ٤- دی استیل فلوروگلوسینول

برای ارزیابی تولید آنتی بیوتیک از محیط کشت YMP (عصاره‌ی مالت سه گرم، عصاره مخمر سه گرم، باکتو پپتون پنج گرم و گلوکز ۱۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. سویه‌ها در ۱۰۰ میلی لیتر از این محیط، در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس بر شیکر با ۱۷۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت، نمونه‌گیری و استخراج آنتی بیوتیک‌ها از ۳۵ میلی لیتر از محیط کشت فوق طبق روش مارهوفر و همکاران صورت گرفت (Maurhofer *et al*., 1992). اتیل استات به‌نسبت مساوی به‌محیط کشت اضافه شد؛ پس از تکان دادن ارلن‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه، فاز آلی از فاز مایع به‌وسیله فیلترهای سیلیکونی جدا و اتیل استات در دستگاه روتاری به‌طور کامل تبخیر شد. باقی‌مانده در یک میلی لیتر متانول مخصوص HPLC حل شد. ردیابی و اندازه‌گیری کمی آنتی بیوتیک‌ها به‌وسیله‌ی دستگاه HPLC مجهز به شناساگر (Hewlett Packard., 1090; Hewlett-Packard Co., Pal Alto, CA) انجام گرفت و از ستون به ابعاد ۱۰۰×۴ میلی متر از نوع Nucleosil 120-5-C18 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) باروش فاز معکوس در دمای ۴۵ درجه‌ی سلسیوس استفاده شد. جهت دستیابی به‌پیک استاندارد، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های خالص هر آنتی‌بیوتیک در ۵۰۰ میکرولیتر متانول مخصوص HPLC حل شد. DAPG، به‌وسیله‌ی جذب اشعه‌ی ماوراء بنفش در طول موج ۲۷۰ ردیابی شد. زمان تأخیر (Retention time) برای آنتی بیوتیک DAPG، برابر با ۸/۷ دقیقه بود. کمیت آنتی بیوتیک براساس پیک استاندارد و زمان تأخیر، بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه شد.

اثر عصاره‌ی کشت سویه‌های باکتری بر تفریخ تخم نماتد در شرایط آزمایشگاه

سویه‌های باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر محیط نوترینت براث (Nutrient broth) (NB) سترون، روی شیکر با ۱۲۰rpm به‌مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. در مرحله‌ی بعد محیط حاوی باکتری رشد یافته با سرعت ۳۷۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و بخش بالایی آن از صافی‌های میکروپور ۰/۲ میکرونی عبور داده شد. عصاره‌ی حاصل به‌میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای منتقل گردید، تخم‌های سترون (محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت دو دقیقه) نماتد به تعداد ۶۰-۷۰ عدد به هرخانه از میکروپلیت اضافه شد و صفحات به مدت ۱۴ روز در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس تعداد تخم‌های تفریخ شده و تفریخ نشده نماتد در هر خانه شمارش گردید. شاهد آب مقطر سترون و بدون باکتری در نظر گرفته شد. این آزمایش با سه تیمار (دو سویه باکتری و آب مقطر به‌عنوان شاهد) و شش تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

اثر عصاره‌ی کشت سویه‌های باکتری بر مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد در شرایط آزمایشگاه

سوسپانسیون تخم نماتد در آب مقطر همانند آزمایش قبل سترون شد. جهت تفریخ تخم ها و خروج لاروها، سوسپانسیون مذکور در انکوباتور با شرایط تاریکی و دمای

۲۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار گرفت. بعد از تهیه‌ی عصاره‌ی باکتری و انتقال آن به میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای (همانند آزمایش قبل)، لاروها به‌تعداد ۵۰-۶۰ عدد در هر خانه قرار داده شدند و صفحات به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید؛ در انتها تعداد لاروهای مرده (براساس تخریب بافت پوست و مری) موجود در هر خانه شمارش شد.

اثر بیوکنترلی سویه‌های باکتری بر نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه

بذور گوجه‌فرنگی ارقام پتوپراید ۲، پتوپراید ۵، زمان (Xaman) و GS12 در سینی‌های نشاء کشت شده و در مرحله‌ی چهار برگی به هر گلدان یک کیلوگرمی حاوی خاک سترون (خاک مزرعه، کود برگ و ماسه به نسبت ۱: ۲: ۱) یک نشا انتقال داده شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۱۸-۲۲ درجه‌ی سلسیوس دمای شب و ۲۵-۳۰ درجه‌ی سلسیوس دمای روز نگهداری شدند (Siddiqui & Shaukat., 2004 c). یک هفته بعد، ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به غلظت 10^9 CFU/ml به ازای ۱۰۰۰ گرم خاک، به‌گلدان‌ها اضافه گردید. پس از هفت روز سه گودال اطراف هر نشاء ایجاد و ۵۰۰۰ لارو سن دو نماتد به‌هر گلدان افزوده شد. شصت روز بعد از مایه‌زنی نماتد، ریشه‌های گوجه‌فرنگی شسته شده و شاخص‌های بیماری‌زایی شامل متوسط تعداد گال به ازاء هر گیاه، متوسط تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه و متوسط تعداد تخم در هر توده تخم محاسبه گردید. همچنین طول و وزن تر و خشک شاخساره و ریشه و تعداد برگ گیاهان اندازه‌گیری شد (Siddiqui & Shaukat., 2004 c). این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل باکتری (UTPF101 و UTPF68 و شاهد بدون باکتری) و ارقام گوجه فرنگی (پتوپراید ۲، پتوپراید ۵، زمان و GS12) بودند.

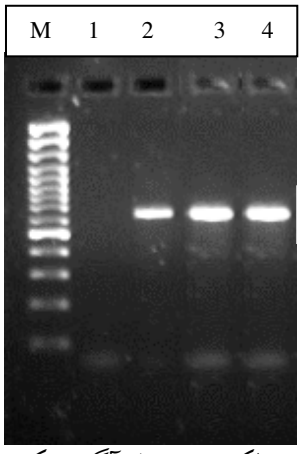
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه وتحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS و به‌روش Proc Anova انجام و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شد.

نتایج

ردیابی ژن *phlD* ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز آنتی بیوتیک DAPG

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با هدف ردیابی ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز آنتی بیوتیک DAPG (*phlD*) در دو سویه‌ی UTPF101 و UTPF68 انجام شد و قطعه DNA به طول تقریبی ۶۲۹ جفت باز، به کمک دو پرایمر *phlD*-اختصاصی B2BF و BPR4 از دسته ژنی *phlACBD* روی ژل آگارز تکثیر گردید و نتایج نشان داد که این جدایه‌ها کماکان واجد ژن تولید آنتی بیوتیک می باشند (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز یک درصد از PCR انجام شده روی ژن *phlD*، با پرایمر اختصاصی (629 bp). M: نشانگر 100 bp DNA، ۱: سویه 2-79 به‌عنوان شاهد منفی، ۲: سویه CHA0 به‌عنوان کنترل مثبت، ۳: باکتری UTPF101، ۴: باکتری UTPF68.

Fig 1. Electrophoresis of PCR product on *phlD* gene with specific primers (629 bp) on agarose gel 1%. M: 100 bp DNA ladder, 1: 2-79 as negative control, 2: CHA0 as positive control, 3: UPTF101, 4: UPTF68.

ارزیابی اثر بیوکنترلی باکتری‌ها بر نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه

نتایج بررسی اثر مستقیم عصاره‌ی کشت سویه‌های باکتری روی تفریخ تخم نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه نشان داد که هر دو سویه باکتری باعث کاهش معنی‌دار تفریخ تخم نماتد در سطح احتمال ۵٪ نسبت به شاهد شده و تأثیر سویه UTPF68 بیش از سویه UTPF101 بود (جدول۳). بررسی اثر عصاره کشت سویه‌ها روی لارو

سن دوم نماتد در شرایط آزمایشگاه نیز نشان داد که دو سویه دارای توان بالایی در کنترل لارو نماتد بوده و به‌طور معنی‌داری تعداد لاروها را نسبت به شاهد کاهش دادند (جدول ۳).

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین تأثیر دو سویه‌ی باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر تفریخ تخم نماتد و مرگ و میر لارو سن دو *M. javanica* در آزمایشگاه.

Table 2. Mean comparison of effects of *Pseudomonas fluorescens* strains on hatching eggs and larvae mortality of nematode *M. javanica* in *in vitro.*

Treatmant	hatching eggs (%)	dead larvae (%)
Control	50.66a	15 b
UTPF101	19.83b	47.33a
UTPF68	14.5c	47.33a
CV*	12.74	10.86

میانگین‌هایی که حروف مشابه دارند تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن با هم ندارند. *cv ضریب پراکندگی داده هاست.

Means with the same letter in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P = 0.05), CV: Coefficient of Variation.

تأثیر دو سویه باکتری بر شاخص‌های رشدی گیاهان آلوده به نماتد

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس (جدول۴) نشان داد که بین ارقام گوجه‌فرنگی، سویه‌های باکتری و اثر متقابل باکتری در رقم از نظر تمام صفات رشدی اندازه‌گیری شده، در سطح پنج یا یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل رقم× باکتری بر شاخص‌های رشدی ارقام گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد (شکل ۲) مشخص نمود که سویه‌های باکتری سبب افزایش طول شاخساره نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد باکتری) شدند، در حالی که در رقم زمان تفاوتی بین تیمار شاهد و کاربرد باکتری مشاهده نشد. بیشترین طول ریشه در رقم GS12 و پتوپراید ۲ تحت تأثیر سویه UTPF68 مشاهده شد. کاربرد سویه UTPF101 در سه رقم پتوپراید ۲، GS12 و زمان از نظر طول ریشه تفاوت معنی داری با شاهد نداشت و تنها در رقم پتوپراید ۵ طول ریشه را نسبت به شاهد افزایش داد. کاربرد سویه UTPF101 در رقم پتوپراید ۵ و هر دو سویه باکتری در رقم پتوپراید ۲، سبب افزایش معنی‌دار تعداد برگ نسبت به تیمار شاهد شد، درحالیکه در دو رقم زمان و GS12، کاربرد باکتری نتوانست تفاوتی با شاهد ایجاد نماید. رقم پتوپراید ۲ تحت تاثیر باکتری UTPF101 نسبت به سایر تیمارها وزن تر شاخساره بیشتری داشت و در مقام بعدی رقم GS12 تیمار شده با هر دو سویه باکتری (به صورت جداگانه) قرار داشت. در رقم زمان کاربرد باکتری تفاوتی را از نظر وزن تر شاخساره نسبت به شاهد باعث نشد. از نظر وزن خشک شاخساره، کاربرد باکتری UTPF101 در رقم پتوپراید ۲ و سویه UPTF68 در رقم GS12 توانست نسبت به شاهد برتری ایجاد نماید. تیمار گیاهان با رقم UTPF68 فقط در رقم GS12 موجب افزایش وزن تر و خشک ریشه نسبت به شاهد گردید و تفاوت معنی داری با شاهد مشاهده گردید (شکل ۲ الف-ز).

جدول۳- میانگین مربعات تأثیر سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* برخصوصیات رشدی ارقام مختلف گوجه فرنگی آلوده به *M. javanica*

Table 3. Mean Square of *Pseudomonas fluorescens* strains on growth factors of tomato varieties infected by *M. javanica.*

Source of variation	df	Shoot lenght (cm)	Root lenght (cm)	Leaf number	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
Block	3	11.13 ns	8.42 ns	5.58*	1.82 ns	0.37 ns	0.712 ns	0.011 ns
Strain	2	335.13**	20.58*	15.43**	66.77**	2.57**	26.22**	0.098**
Tomato	3	414.69 **	217**	40.8**	110.18**	3.05**	21.03**	0.304**
Variety	6	154.78**	30.12**	4.99 **	33.46**	1.19**	18.49**	0.132**
Strain*Variety	33	6.54	5.44	1.37	1.41	0.23	1.50	0.015
Erorr								
Total	47	-	-	-	-	-	-	-
CV	-	6.63	7.36	9.46	8.13	13.75	18.15	18.27

Ns: no significant differences between treatments

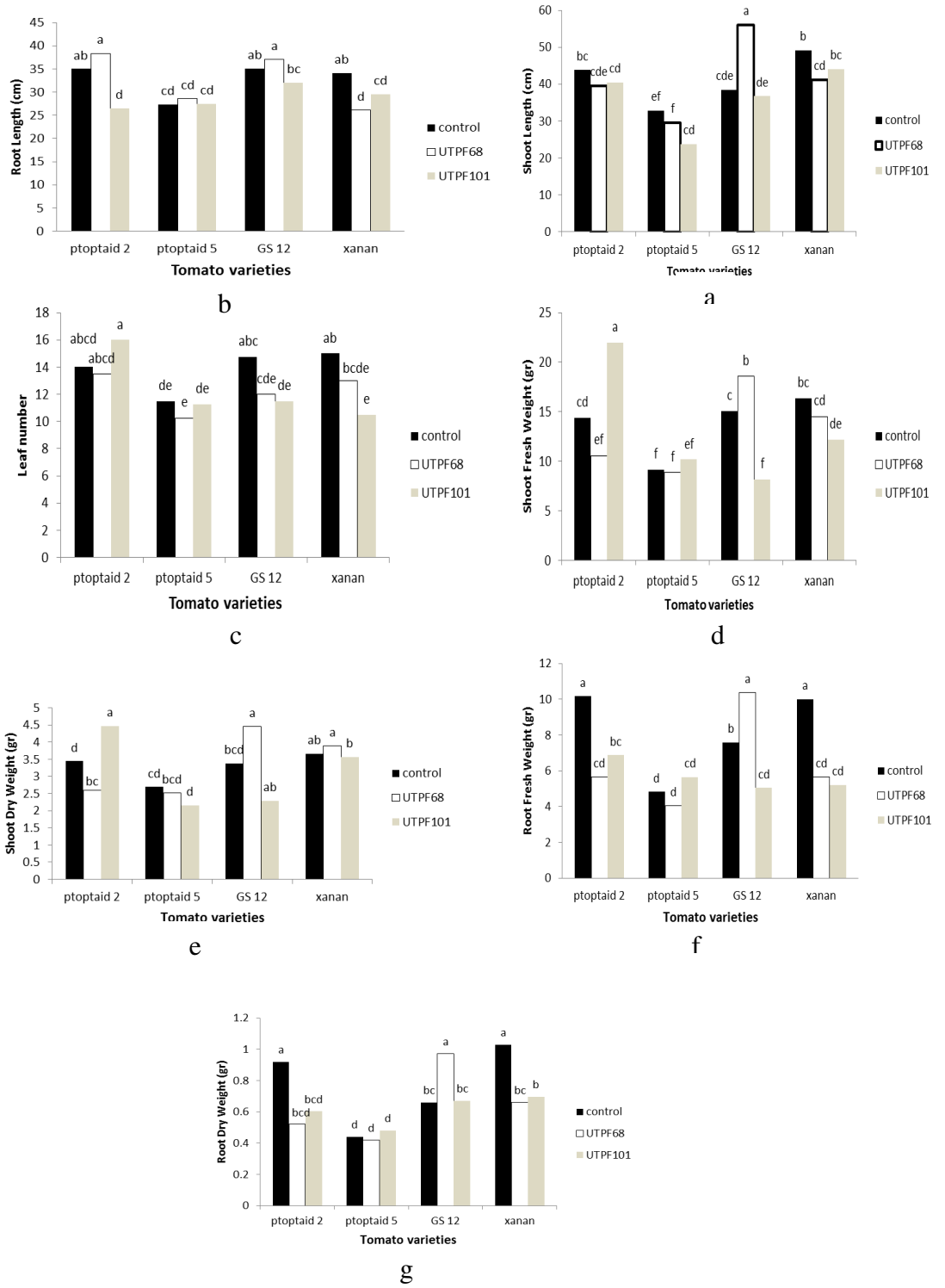
*: no significant differences between treatments at level 0.05

**: no significant differences between treatments at level 0.01

ns = اختلاف معنی‌دار بین تیمارها وجود ندارد.

*= در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار بین تیمارها وجود دارد.

**= در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار بین تیمارها وجود دارد.



شکل ۲- تأثیر کاربرد سویه‌های UTPF68 و UTPF101 روی شاخص‌های رشدی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica* a- طول شاخساره (cm)، b- طول ریشه (cm)، c- تعداد برگ، d- وزن تر شاخساره (گرم)، e- وزن خشک شاخساره (گرم)، f- وزن تر ریشه (گرم)، g- وزن خشک ریشه (گرم).

Fig. 2. effects of UTPF68 and UTPF101 application on some tomato varieties infected by *Meloidogyne javanica*; a) shoot length (cm), b) root length (cm), c) leaf number, d) shoot fresh weight (g), e) shoot dry weight, f) root fresh weight, g) root dry weight.

تأثیر سویه‌های باکتری *P. fluorescens* بر شاخص‌های بیماری در ارقام گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد

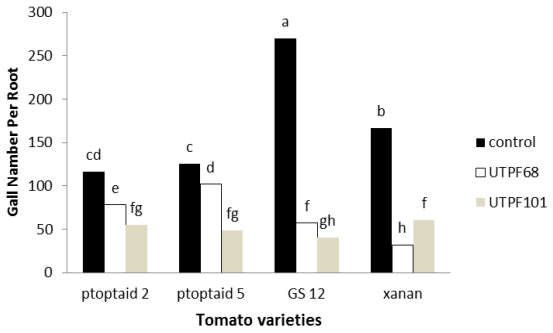
باتوجه به جدول تجزیه‌ی واریانس (جدول ۵) مشاهده می‌شود که اثر باکتری، رقم و اثر متقابل باکتری× رقم در مورد صفات تعداد گال در هر ریشه، متوسط کیسه‌ی تخم روی هر ریشه و تعداد تخم در هر توده تخم معنی‌دار بوده و لذا نشان‌دهنده‌ی تفاوت تیمارها از نظر این صفات می‌باشد.

مقایسه‌ی میانگین تأثیر باکتری‌ها بر تعداد گال ریشه در ارقام گوجه‌فرنگی نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد باکتری) نشان داد که کاربرد باکتری‌ها سبب کاهش این شاخص در همه‌ی ارقام شده است. در بین چهار رقم ارزیابی شده، بیشترین کاهش تعداد گال، در ریشه ی ارقام زمان و GS12 به‌ترتیب تیمار شده با سویه UTPF68 و UTPF101 مشاهده شد (شکل ۳). اما در بررسی هر رقم به‌صورت انفرادی، مشخص شد که سویه UTPF101 در ارقام پتوپراید ۲، پتوپراید ۵ و GS12 تأثیر بیشتری بر میزان کاهش گال روی ریشه‌ها نسبت به UTPF68 داشته است. کاربرد باکتری نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد باکتری) در همه ارقام سبب کاهش تعداد توده تخم در هر ریشه شد.

جدول ۴- میانگین مربعات صفات مرتبط با تأثیر باکتری‌ها بر شاخص‌های بیماری‌زایی در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی آلوده به *M. javanica*

Table 4. Mean square of traits related with bacteria effects on phatogenicity indices in tomato varieties infected with *Meloidogyne javanica.*

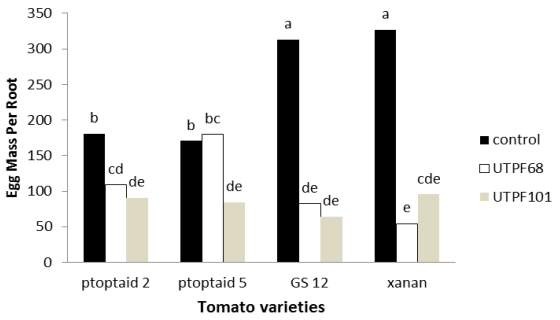
Source of variation	Df	Gall number	Egg mass number	Egg number
Block	3	57.57^{ns}	1709.47^{ns}	41.5^{ns}
Bacteria Strain	2	66132.64^{**}	133863.47^{**}	160844.33^{**}
Tomato variety	3	3878.85^{**}	2985.58^{*}	53390.38^{**}
Variety* Bacteria	6	9897.72^{**}	15353.85^{**}	39867.22^{**}
Erorr		115.50	88.62	123.72
Total	47	-	-	-
CV	-	11.18	20.91	8.91



شکل ۳- تأثیر کاربرد سویه‌های UTPF101 و UTPF68 بر تعداد گال در هر ریشه در ارقام گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Fig. 3. Effects of UTPF68 and UTPF101 application on node number per each root in some tomato varieties infected by *M. javanica.*

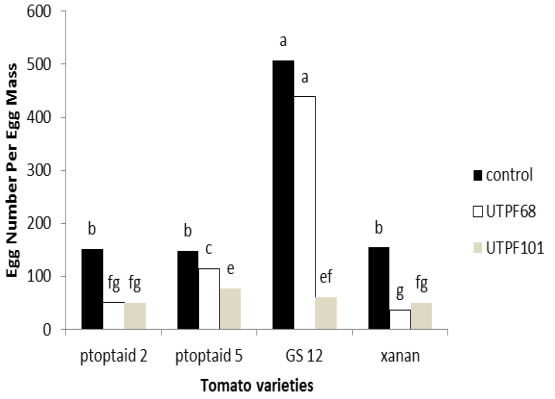
در بین چهار رقم ارزیابی شده، بیشترین کاهش تعداد کیسه در ریشه، در رقم زمان تیمار شده با سویه UTPF68 مشاهده شد (شکل ۴). در بررسی هر رقم به‌صورت انفرادی، مشخص شد که تنها در رقم پتوپراید ۵، سویه‌ی UTPF101 نسبت به سویه‌ی UTPF68 تأثیر بهتری داشته است و در سه رقم دیگر بین دو سویه تفاوت معنی‌داری از نظر تأثیر بر کاهش تعداد توده تخم مشاهده نشد. از نظر شاخص تعداد تخم در هر توده تخم در چهار رقم مورد ارزیابی، بیشترین کاهش در رقم زمان تیمار شده با سویه UTPF68 مشاهده شد.



شکل ۴- تأثیر کاربرد سویه‌های UTPF101 و UTPF68 بر تعداد توده تخم در هر ریشه در ارقام گوجه‌فرنگی آلوده *M. javanica*

Fig. 4. Effects of UTPF68 and UTPF101 application on egg bag per each root in some tomato varieties infected by *M. javanica*.

بررسی هر رقم به‌صورت انفرادی نشان داد که در رقم زمان و پتوپراید ۲، بین دو سویه باکتری از نظر این صفت تفاوتی وجود نداشته و هر دو سویه نسبت‌به تیمار شاهد (عدم کاربرد باکتری) توانستند این شاخص را به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. در رقم پتوپراید ۵ و GS12، سویه UTPF101 کنترل بهتری را نسبت‌به سویه UTPF68 نشان داد (شکل ۵).



شکل ۵- تأثیر کاربرد سویه‌های UTPF101 و UTPF68 برتعداد تخم در توده تخم در هر ریشه در ارقام گوجه فرنگی آلوده به *M. javanica*

Fig. 5. Effects of UTPF68 and UTPF101 application on egg numer of egg bag per each root in some tomato varieties infected by *Meloidogyne javanica.*

بحث

در این مطالعه سویه‌های UTPF68 و UTPF101 از باکتری *P. fluorescens* از نظر توانایی تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی و فعالیت ضدنماتدی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه روی چهار رقم گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفتند. انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی B2BF/BPR4، مجدداً وجود ژن *phlD* (ژن کلیدی در مسیر بیوسنتز DAPG) در هر دو سویه مورد بررسی را اثبات نمود.

در این مطالعه با استفاده از آنالیز HPLC مشخص شد که هر دو سویه UTPF101 و UTPF68، قادر به تولید آنتی‌بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG) بودند. در تحقیقی، مقاومت ایجاد شده در گیاه به‌وسیله‌ی سویه‌ی CHA0 *P. fluorescens* به آنتی بیوتیک 2.4- diacetylphloroglucinol (DAPG) نسبت داده شده است (Siddiqui & Shaukat., 2003 b; Siddiqui *et al*., 2006). فلوروگلوسینول‌ها ترکیبات فنلی هستند که توسط دامنه‌ای از گونه‌های باکتریایی و گیاهی تولید شده و دارای خصوصیت ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدیروسی، ضد کرم‌های حلقوی و گیاه‌سوزی هستند (Thomashow & Weller., 1996). اخیرا، DAPG که توسط سودومونادهای فلورسنت سنتز می‌شود به‌عنوان یک عامل تعیین کننده در کنترل بیولوژیک نماتدها شناخته شده است (Cronin *et al*., 1997; Siddiqui & Shaukat., 2003b). مه‌یر و همکاران (۲۰۰۹) سمیت آنتی بیوتیک DAPG را روی برخی نماتدهای انگل گیاهی از جمله *M. incognita*، مورد مطالعه قرار داده و دریافتند که این ماده در غلظت ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر، موجب ۸۵٪ کاهش تفریخ تخم این نماتد شده ولی روی زنده‌مانی لاروهای سن دوم تأثیری نداشت.

در مطالعات پیشین ثابت شده است که تولید متابولیت‌های ضد میکروبی با کنترل بیماری‌های گیاهی و افزایش رشد گیاه توسط ریزوباکتری‌ها در خاک غیر سترون ارتباط دارند و برخی از آن‌ها در کنترل نماتدهای بیماری‌زای گیاهی نیز نقش مهمی ایفاء می‌کنند (Cronin *et al*., 1997; Siddiqui & Shaukat., 2003b; Siddiqui *et al*., 2005b) . با توجه به اینکه سویه‌های مورد بررسی قادر به تولید متابولیت‌های ضدنماتدی در شرایط آزمایشگاهی هستند احتمال دارد که این خصوصیات با کنترل نماتد در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مرتبط باشد. سیانید هیدروژن یک متابولیت ثانویه است که توسط باکتری‌های گرم منفی که در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی دخالت دارند تولید می‌شود (Voisard *et al*., 1989). Gallagher & Manoil (2001) طی تحقیقی نشان دادند تولید سیانید هیدروژن توسط *P. aeruginosa*، نقشی کلیدی در کشتن لاروهای *Caenorabditis elegans* (نماتد خاکزی) در شرایط درون شیشه‌ای ایفا می‌کند. تولید پروتئاز خارج سلولی توسط سویه‌ی CHA0 *P. fluorescens*، عاملی مؤثر در کنترل نماتد *M. incognita* محسوب می‌شود زیرا موتانت‌هایی که

دارای نقص در تولید این آنزیم بودند قادر به ایجاد مرگ و میر در لاروها در شرایط آزمایشگاهی نبوده و نیز نتوانستند بیماری گره ریشه گیاهان سویا و گوجه‌فرنگی را کنترل نمایند (Siddiqui *et al*., 2005b; Siddiqui *et al*., 2005a).

یکی از روش‌های کاهش جمعیت نماتدها در خاک، مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد و عدم تفریخ تخم است. طی این پژوهش مشخص شد که سویه‌های باکتری، بر عدم تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* تأثیر گذاشته و سبب کاهش آن‌ها می‌گردند. خان و همکاران (۲۰۱۲)، فعالیت چندین سویه سودوموناس فلورسنت را علیه برخی نماتدهای انگل گیاهی از جمله *M. incognita* مورد بررسی قرار دادند و مشخص نمودند که جدایه‌هایی که قادر به تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی از جمله سیدروفور، سالیسیلیک اسید، DAPG، سیانید هیدروژن و پروتئاز بودند از توانایی نماتدکشی بالاتری برخوردار بوده و منجر به کاهش جمعیت نماتد، کنترل ایجاد گال روی ریشه‌های ماش و افزایش وزن ریشه شدند. تیمپر و همکاران (۲۰۰۹) توانایی سویه‌ای از *P. fluorescens* مولد DAPG را علیه برخی نماتدهای ساکن و مهاجر پارازیت گیاهی از جمله *M. incognita* روی پنبه، ذرت و سویا مورد مطالعه قرار داده و دریافتند جمعیت نهایی *M. incognita* زمانی که بذور با باکتری تیمار شده بودند، کمتر بود. باکتری در کنترل نماتد روی ذرت بسیار مؤثر بود و به‌طور متوسط بیماری را ۴۱ درصد کنترل نمود.

نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد سویه‌های باکتری موجب افزایش رشد گیاه و کاهش خسارت ناشی از نماتد ریشه گرهی *M. javanica* در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد شده است و این اثرات در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی متفاوت بود. با توجه به این‌که هر دو سویه قادر به تولید سیانید هیدروژن، سیدروفور و محلول سازی فسفات معدنی هستند (نتایج منتشر نشده) احتمالاً این خصوصیات در افزایش رشد گیاهان گوجه‌فرنگی ایفای نقش می‌کنند. اغلب سودوموناده‌های فلورسنت جدا شده از خاک، با تولید موادی نظیر آنتی بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز موجب جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا شده و نیز با تولید هورمون‌های گیاهی رشد گیاه را افزایش می‌دهند (Keel & Defago., 1997). از طرف دیگر، کاربرد سویه‌های باکتری در کاهش بیماری مؤثر بود و میزان کاهش شاخص‌های بیماریزایی بسته به رقم گیاه، متفاوت بود (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). در کل سویه‌ی UTPF101 نسبت به سویه UTPF68، عملکرد بهتری را در کاهش بیماریزایی و افزایش شاخص‌های رشدی گیاه نشان داد (شکل ۲)، که ممکن است به دلیل تولید متابولیت‌های بیشتر در این سویه در ناحیه ریزوسفر باشد. از طرف دیگر تفاوت در ترکیبات ترشحات ریشه در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی ممکن است بر تولید یا عدم تولید و نیز مقدار متابولیت‌های ثانویه در ناحیه ریزوسفر مؤثر بوده باشد. جمالی (۲۰۰۹) با استفاده از ژن‌های گزارشگر نشان دادند که بیان ژن‌های بیوسنتز HCN و DAPG در ارقام مختلف لوبیا متفاوت است و این امر را به‌تفاوت در ترکیب ترشحات ریشه نسبت دادند. اختصاصی بودن میزبان برای سویه‌های بیوکنترل در هر دو سطح گونه و رقم توسط محققین دیگر نیز به اثبات رسیده است (Maurhofer *et al*., 1995; Smith *et al*., 1997. دافی و دفاگو (۱۹۹۹) نیز ثابت کردند که ترکیبات موجود در ترشحات ریشه بر بیوسنتز متابولیت‌های ضد میکروبی تأثیر دارند. منابع کربنی که عموماً در ترشحات ریشه یافت می‌شوند دارای اثرات متفاوتی بر طیف آنتی بیوتیک‌های تولید شده به وسیله سویه‌های بیوکنترل هستند (Duffy & Défago, 1999).

به‌طور کلی چنین نتیجه‌گیری می‌شود که شرایط خاک بسیار پیچیده‌تر از آزمایشگاه می‌باشد و ترشحات ریشه‌ی گیاه نقش مهمی در واکنش میزبان و بیمارگر اطراف ریشه بازی می‌کنند. علاوه بر این، چون هر باکتری با ترشح مواد بازدارنده علیه مرحله خاصی از زندگی نماتد مؤثر است و تخم، لارو و نماتد بالغ در شرایط خاک ممکن است به‌طور هم‌زمان وجود نداشته باشند بنابراین بین نتایج به‌دست آمده در شرایط آزمایشگاه و گلخانه همیشه هم‌خوانی کامل وجود ندارد. با این‌حال، باتوجه به نقش مؤثر سویه‌های UTPF68 و UTPF101 در کنترل نماتد *M. javanica*،

به‌نظر می‌رسد که تولید متابولیت‌هایی نظیر DAPG، پروتئاز و سیانید هیدروژن توسط این باکتری‌ها نقش مهمی را در بیوکنترل نماتد ایفاء نموده است و پیشنهاد می‌گردد که از سویه‌هایی با توانایی تولید هر سه متابولیت ضد نماتدی در کنترل بیولوژیک نماتدهای ریشه گرهی استفاده شود.

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.

Bakker, P.A. H.M., Pieterse, C.M.J. & van Loon, L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent Pseudomonas spp. Phytopathology, 97: 239–243.

Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D.N. & O'Gara, F. 1997. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interaction of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1357 –1361.

Delaney, S. M., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F. & Thomashow, L.S. 2001. *phzO* – a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. Journal of Bacteriology, 183: 318–327.

Duffy, B.K. & De ´fago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied and Environmental Microbiology, 65: 2429–2438.

Dwivedi, D., & Johri 2003. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. Current Science. 85: 1693–1703.

Gallagher, L.A. & Manoil, C.B.N. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. Journal of Bacteriology, 183: 6207-6214.

Ghafele Bashi, S., Jamali, F., & Ahmadzadeh, M. 2014. Study of biological characteristics and evaluation of biocontrol bacteria *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 against *Phytophthora drechsleri* on cucumber. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 3(2): 105-116.

Hussay, R.S. & Barker, K.R. 1973. A compression of methods of collecting inoculates of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. Plant Disease, 57: 1025-1028.

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. thesis in Plant pathology, College of Agriculture, Tehran University (In Persian).

Jepson, S.B. 1987. Identification of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species). C.A.B. Interactional, 256pp.

Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. & Me ´traux, J.P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Plant Microbe Interactions, 16: 851–858.

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

Keel, C. & Defago, G. 1997. Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens, mechanisms and ecological impact. In: Gange, A.C., and Brown, V.K (Eds) Multitrophic in teraction system. Oxford: Blackwell science, 27-47 pp.

Khan, A,. Shaukat, S.S., Islam, S. & Khan, A. 2012. Evaluation of Fluorescent Pseudomonad isolates for their activity against some plant-parasitic nematodes american-eurasian. J. Agric. and Environ. Sci, 12(11): 1496-1506.

Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. & De ´fago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. Phytopathology, 82: 190–195.

Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Defago, G. 1994. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. Plant pathology, 44: 40-50.

Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., & Défago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology, 44: 40-50.

Mazzola, M., Fujimoto, K., Thomashow, L.S., & Cook, R.J. 1995. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent Pseudomonas spp. and effect on biological control of take-all of wheat. Applied and Environmental Microbiology, 61: 2554–2559.

Meyer, S.L.F., Halbrendt, J.M., Carta, L.K., Skantar, A.M., Liu, T., Abdelnabby, H.M.E., & Vinyard, B.T. 2009. Toxicity of 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to Plant-parasitic and Bacterial-feeding Nematodes. Journal of Nematology, 41(4): 274–280.

Mc Spadden Gardener, B., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S., & Weller, D.M. 2001. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. Phytopathology, 91: 44-54.

McSpadden Gardener, B., Benitez, M.S., Camp, A. & Zumpetta, C. 2006a. Evaluation of a seed treatment containing a phlD+ strain of *Pseudomonas fluorescens* on organic soybeans. Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases Report, 21: FC046.

McSpadden Gardener, B., Kroon van Diest, C. & Beuerlein, J. 2006b. Evaluation of biological seed treatments containing phlD+ strains of *Pseudomonas fluorescens* on soybeans grown in Ohio. Biological and Cultural Tests for Control of Plant Diseases Report, 21: FC045.

Nitao, J.K., Meyer, S.L.F. & Chitwood, D.J. 1999. In-vitro assays of *M. incognita* and *Heterodera glicines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. Journal of Nematology, 31:772-783.

Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. Applied Environmental Microbiology, 63: 881-887.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M. & de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek, 81: 537–547.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2003a. Plant species, host age and host genotype effects on *Meloidogyne incognita* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its genetically-modified derivatives. Journal of Phytopathology, 151: 231–238.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2003b. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: Importance of bacterial secondary metabolic 2, 4-diacetylphloroglucinol. Soil Biology and Biochemistry: 1615-1623.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2004a. Suppression of *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its genetically modified derivatives: II. The influence of sodium chloride. Nematologia Mediterranea, 32: 127–130.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2004c. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. Journal of Phytopathology, 152: 48–54.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2004c. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology, 38: 169-175.

Siddiqui, I.A., Hass, D. & Heeb, S. 2005a. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Applied and Environmental Microbiology, 71: 5646-5649.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., & Dutt, S. 2005b. Expolysaccharide over producing variant of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 enhances tolerance to various environmental stresses *in vitro* but does not improve *Meloidogyne javanica* biocontrol in tomato. International Journal of Biology and Biotechnology, 2: 729-736.

Siddigui, I.A., Shaukat, S.S., Sheikh, I.H. & Khan, A. 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. World J. Microbiol. Biotech., 22: 641-650.

Smith, K.P., Handelsman, J. & Goodman, R.M. 1997. Modeling dose-response relationships in biological control: partitioning host response to the pathogen and biocontrol agent. Phytopathology, 87: 720-729.

Tian, B.O., Yang, J. & Zhang, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action and future prospects. FEMS Microbiology & Ecology, 61: 197-213.

Timper, P., Kone, D., Yin, J., Ji, P. & McSpandden Gardener, B.B. 2009. Evaluation of an Antibiotic-Producing Strain of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of Plant-Parasitic Nematodes. Journal of Nematology, 41(3): 234-240.

Thompson, D.C. 1996. Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer path symptoms in Kentucky blue grass. Plant Disease, 80: 850-862.

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

van Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Siddiqui, Z.A., ed.), Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 39 –66.

Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. EMBO Journal, 8: 351-358.

Wang, C., Ramette, A., Pungasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. & Défago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. FEMS Microbiology Ecology, 37: 105-116.

Weller, D.M., van Pelt, J.A., Mavrodi, D.V., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. & van Loon, L.C. 2004. Induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)-producing *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 94: S108.

Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* strains for biological control of root-knot nematode in some tomato cultivars

Saeedeh Tanha[1], Fereshteh Bayat[1], Fatemeh Jamali[1], Ayat Allah Saeidi Zadeh[2]

1. Plant Breeding, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
2. Plant Protection Department, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Shahed University of Tehran, Iran

Corresponding author: Fereshteh Bayat, email: bayatfereshteh59@gmail.com

Received: July, 23, 2015 4 (1) 27-39 Accepted: Feb., 13, 2016

Abstract

The root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, is one of the major tomato pathogens in Iran. In the current study, *Pseudomonas fluorescens* UTPF101 and UTPF68 strains were evaluated for biological control of the pathogen. The strains were studied in terms of having *phlD* gene through polymerase chain reaction (PCR). The ability of bacteria to produce antimicrobial metabolites and their effect on hatching eggs and larvicidal activity were then studied *in vitro*. Finally, the ability of bacteria to control nematode on four varieties of tomatoes was studied via a factorial experiment in a randomized complete block design with four replications under greenhouse conditions. PCR procedure results showed that both strains contained *phlD* gene and 629 bp DNA fragment was reproduced in both of them. Bacterial strains were capable of producing DAPG antibiotic, hydrogen cyanide and protease in *in vitro* conditions. UTPF68 strain showed a greater impact on the egg hatching compared to strain UTPF101, while in terms of the impact on larvae mortality; both strains performed the same. The greenhouse results indicated that both bacterial strains increased the growth factors and reduced nematode pathogenicity in the infected plants. The rate of growth or controlling nematode was different depending on tomato cultivar or bacterial strain.

Keywords: fluorescent pseudomonads, root-knot nematode, tomato, 2-4-diacetylphloroglucinol