

Fluorescent siderophore 생산균주, TS3-7에 의한 꽃마름병 발병 억제

김지태 · 조홍범 · 김신덕*

서경대학교 생물공학과

Suppression of Bacterial Wilt with Fluorescent Pseudomonads, TS3-7 strain

Ji-Tae Kim, Hong-Bum Cho and Shin-Duk Kim*

Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

Received August 22, 2005; Accepted September 9, 2005

Among the root colonizing and plant growth promoting bacteria isolated from the bacterial wilt suppressive soil, five strains were detected to produce siderophores by CAS agar assay. The most effective isolate, TS3-7 strain induced significant suppression of bacterial wilt disease in tomato and pepper plants. Seed treatment followed by soil drench application with this strain resulted in over 80% reduction of bacterial wilt disease compared with the control. Significant disease suppression by TS3-7 strain was related to the production of siderophore. Besides iron competition, induction of resistance of the host plant with siderophore was suggested to be another mode of action that suppress bacterial wilt, based on the lack of direct antibiosis against pathogen *in vitro*. According to Bergey's Manual of Systemic Bacteriology and 16S rDNA sequence data, TS3-7 strain was identified as *Pseudomonas* sp. TS3-7.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt disease, PGPR, ISR, biocontrol agent, siderophore

서 론

*Ralstonia solanacearum*은 그람음성 세균으로 호기성이며, 수 개의 편모가 있어 운동성이 있으며, 식물 뿌리의 상처를 통해 식물체에 침투하여 토마토, 가지, 고추 감자등 200여종의 작물에 잎이 푸르게 말라죽는 꽃마름병(bacterial wilt)을 유발시켜 막대한 경제적 손실을 초래하는 식물 병원균이다.¹⁾ 세계적으로 꽃마름병에 의한 농작물의 생산 감소가 증가하고 있으며, 우리나라에서도 특히 장마가 지나간 후 고온 다습한 상태에서 발생이 빈번해져 전국적으로 피해가 커졌다.

*Ralstonia solanacearum*의 발병기작이나 생태에 대해 연구되어진 바는 많으나, 이에 대한 확실한 방제법이나 방제제는 아직까지 개발되어있지 않다. 꽃마름병균의 방제 방법으로는 비재배를 이용한 윤작 또는 가지과 작물이 아닌 작물들을 돌려짓기 하여 토양 내 *R. solanacearum*의 밀도를 낮추거나, 훈증제에 의한 토양 소독방법, 그리고 농용 항생제 등의 약제처리 방법등이 있으나 꽃마름병균은 기주식물 없이도 토양이나 물 속

에서 5년 까지 생존이 가능하기 때문에²⁾ 경종적 방제법 만으로는 방제가 어려우며, 또한 토양소독 방법은 방제 효과가 뛰어나거나 경제적인 문제가 있고, 농용 항생제의 사용은 항생제 내성 증가의 문제가 있으며, 유기합성 농약은 약효가 우수하고, 값이 저렴하며, 오랫동안 보관이 가능하다는 장점이 있지만 지하수 및 토양오염, 농산물중의 잔류독성 그리고 생태계 파괴 등의 문제가 있다. 더구나 꽃마름병균은 식물체의 도관조직 속에서 증식하므로 약제의 경엽 살포로는 조직 속까지 약효가 미치지 못하여 효과를 기대할 수 없기 때문에, 토양처리에 의해 병원균의 생존 자체를 불가능하게 하거나, 생존하더라도 활동하지 못하도록 환경조건을 개선하고 저항성 품종의 개발과 더불어 길항미생물을 이용한 생물학적 방제가 시급한 실정이나 꽃마름병의 생물학적 방제는 아직 초보적인 단계이다.³⁾

꽃마름병에 대한 생물학적 방제제를 개발하기 위하여, 본 연구에서는 수년간 꽃마름병 발생이 보고되지 않은 지역 내 토마토와 고추의 근권 토양에서 분리한 균주 중에서 식물 뿌리에 colonization이 잘되며 siderophore를 생산하는 균주에 대해 *in vivo* pot 실험을 실시하여 가장 강한 꽃마름병 발병억제 활성을 보인 균주 TS3-7을 선발하였다. 선발된 TS 3-7균주의 발병억제기작은 siderophore 생산을 통한 철이온에 대한 경쟁과 식물체에 systematic resistance의 유발에 의한 것으로 추정되었으

*Corresponding author

Phone: +82-2-940-7171; Fax: +82-2-919-0345

E-mail: sdkim@skuniv.ac.kr

며, 16S rDNA 염기서열 분석과 배양 및 생화학적 특성에 의거하여 TS 3-7 균주를 *Pseudomonas* sp. TS 3-7로 동정하였다.

재료 및 방법

병원균 확보 및 배양. 본 실험에서 사용된 *R. solanacearum* 은 풋마름병에 감염된 고추와 토마토에서 분리하였다. 시험균주는 20% glycerol을 포함하는 tryptic soy broth(TSB, Difco)에 고정하여 -80°C 에 보관하면서, 0.005% tetrazolium chloride (TZC) 평판배지에 28°C 에서 2일간 배양하여 실험에 사용하였다. 병원균에 의한 풋마름병 발병 확인은 일차적으로 식물체의 잎이 녹색을 유지하면서 하나 둘씩 말라가다가 결국은 모든 잎이 마르는 증상으로 확인하였고, 발병된 식물체의 줄기를 잘라 물에 담그면 줄기에서 우윳빛의 세균액이 나오는 증상과 세균액을 TZC plate에서 배양하였을 때 주위는 우윳빛에 안쪽은 선홍색으로 자라는 특성 등을 통해 이차적으로 검정하였다.⁴⁾

근권 미생물의 분리. 수년간 풋마름병이 발생하지 않은 지역에서 재배한 고추와 토마토 근권 토양에서 미생물을 분리하였다. 뿌리에서 털어낸 흙 1g를 멸균수로 진탕 후 정치하여 상등액 1ml을 취해 순차적으로 희석하여 TSA(tryptic soy agar, Difco) 평판 배지에 도말하여 30°C 에서 2일간 배양하여 single colony를 분리하였다. 분리한 colony는 TSB(tryptic soy broth) 배지로 30°C 에서 24시간 배양한 다음 $6,000\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 멸균수에 현탁하여 600 nm 에서 $\text{OD} = 1(10^9\text{ cfu/ml})$ 로 맞추어 그대로 또는 희석하여 실험에 사용하였다.

Colonization assay. 1% water agar plate에 표면 살균한 고추와 토마토 종자를 올려놓고 각 종자 주위에 열배로 희석한 균체 현탁액 1ml 씩 점적한 후, 28°C 생장고에서 뿌리 생장과 뿌리 주위의 균주의 집락형성을 10일간 관찰하였다. 대조군의 경우는 균체 현탁액 대신 멸균된 TSB를 종자 주위에 처리하였다. 각 처리 당 종자 6개씩 3번 반복실험 하였다.

길항활성. 50°C 의 TSA 배지에 *R. solanacearum* 1 loop를 접종하여, plate에 부어 굳힌 다음 선발균주를 streak 하고 30°C 에서 24시간 배양한 후 생육저해 여부를 확인하였다.

Siderophore 생산균주 선발. siderophore 생산 균주를 Schwyn과 Neilands⁵⁾의 siderophore detection 방법인 Chrome Azurol Sulfonate(CAS, Sigma) assay로 선발하였다. 증류수 50 ml에 CAS 60.5 mg을 녹인 다음 10 ml의 1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM HCl 용액)을 넣고 천천히 저으면서 72.9 mg의 HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium bromide)를 증류수 40 ml에 녹인 용액을 첨가시켜 고압 멸균하여 진한 청색염료 용액을 준비한 다음 H_2O 750 ml, 10X MM9 salt 100 ml, agar 15 g, Pipes 30.24 g, 10% casamino acid 용액 30 ml, carbon source와 vitamin 등을 혼합한 용액(pH 6.8)을 고압 멸균하여 50°C 로 식힌 후 준비해 둔 CAS 염료용액을 거품이 나지 않도록 첨가하여 plate에 분주하여 제조한 CAS 평판배지에 배양액 20 μl 를 점적하고 30°C 에서 2일간 배양한 후 주위에 orange halo zone의 생성을 확인하였다. 또한 탈철화 배지인 King's B 배지에서 배양한 후 형광성 여부를 확인하였다.

종자 처리. Ownley 방법⁶⁾에 의해 선발 균주를 토마토(서광 품종)와 고추(부강품종) 종자에 처리하였다. TSB 배지를 이용하여 선발균주를 30°C 에서 24시간 배양한 후 $6,000\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 회수한 균체를 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 용액에 현탁시킨 후 동량의 2% methylcellulose(Sigma, St. Louis)를 첨가한 박테리아 현탁액을 종자와 잘 혼합하여 무균 상태로 실온에서 건조시키는 방법으로 종자에 박테리아를 코팅하였다.

포트실험. 선발균주에 의한 풋마름병 발병 억제효과는 종자 처리와 토양관주 2가지 방법으로 검정하였다. 지름 10 cm 포트에 바로키 상토(한국농자재 주식회사)를 180 g 채우고 박테리아를 코팅한 종자와 코팅하지 않은 종자들을 각각 파종한 다음 $25\text{-}35^{\circ}\text{C}$ 로 유지되는 하우스에서 재배하여 4엽기가 되었을 때 칼로 뿌리에 상처를 내고 *R. solanacearum* 현탁액 30 ml(10^7 CFU/ml)을 관주처리 하여 발병을 유도하였다. 토양처리 방법은 종자를 파종한 후 고추와 토마토가 4엽기가 되었을 때 선발균주 현탁액을 포트 당 30 ml(10^9 CFU/ml)씩 분주하고, 이틀 후 위와 같은 방법으로 병원균을 처리하여 발병을 유도하였다. 종자 처리만 행한 경우와 토양처리만 행한 경우 및 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 있어서 선발균주에 의한 발병 억제 효과를 4주간 관찰하였다. 대조구는 선발균주 처리 없이 *R. solanacearum* 현탁액 만 처리하였으며, 각 처리 당 10분 씩 3회 반복 실험하였다. 풋마름병 발병률은 식물이 아주 싱싱한 경우는 0, 잎이 약간 시든(25% 미만) 경우는 1, 중간정도(50% 미만) 시든 경우는 2, 심하게(75% 정도) 시든 경우는 3, 완전히 시들어 고사한 경우를 4로 등급을 정하였으며, 발병 억제율은 $(\text{대조구의 발병률} - \text{처리구의 발병률})/\text{대조구의 발병률} \times 100$ 으로 계산하였다.

생균밀도 측정. King's B 배지로 30°C 에서 48시간 배양한 TS3-7 균주 현탁액을 담체와 혼합 하였다. 담체로는 미생물 보존에 널리 사용되는 talc와 vermiculite를 이용하여, Vidhyasekaran과 Muthumilan 방법⁷⁾을 변형하여 행하였다. 균체 현탁액(10^9 CFU/ml) 400 ml에 멸균한 talc 또는 vermiculite 1 kg과 응집제로 carboxymethyl cellulose 10 g을 혼합하고 CaCO_3 15 g를 넣어 pH를 중성으로 맞춘 다음 무균상태로 실온에서 수분함량이 20% 이하가 되도록 건조시켜 폴리에틸렌 백에 넣어 보관하며 일주일 간격으로 생균밀도를 측정하였다. 생균밀도는 시료 2 g을 멸균수 18 ml에 현탁시킨 후 상등액을 10^{-6} , 10^{-7} 로 희석하여 King's B 배지에 도말하여, 24시간 배양하여 형광을 내는 균체수를 계수하였다.

선발 균주의 동정. 선발 균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양적 특성 및 생화학적 특성을 Manual of Methods for General Bacteriology와 Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology에 의거하여 결정하였다. 또한 16S rDNA 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 분석하였다.

결 과

활성균주의 분리. TSA 평판 배지를 이용하여 고추와 토마토의 근권 토양에서 분리한 87균주 중에서 뿌리 주위 agar에 뿌

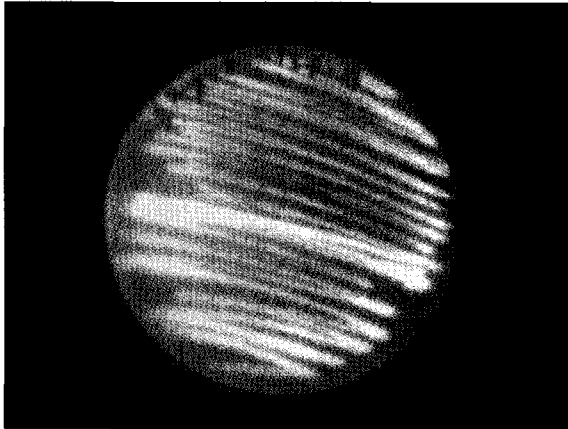


Fig. 1. TS3-7 strain fluoresces on King's medium B under UV.

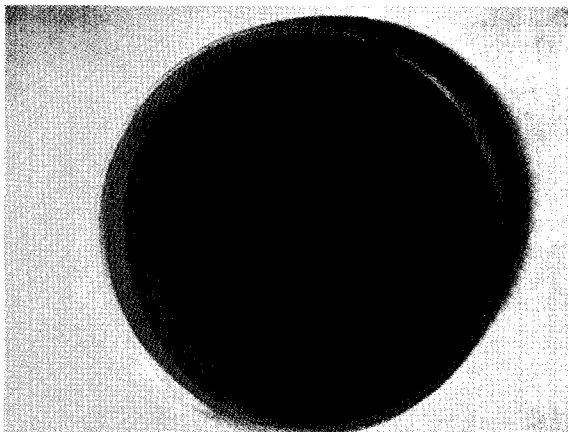


Fig. 2. Production of an orange halo by TS3-7 on CAS agar plate.

열게 집락을 형성하고 대조구에 비해 10% 이상 뿌리의 성장을 촉진시키는 균주 15종을 선발하였다.

Fluorescent siderophore 생산. siderophore를 생산하는 균주의 선발은 CAS를 사용한 정성적인 chromogenic assay로 하였다. CAS agar plate에 well을 만들어 배양액을 넣고 30°C에서 2일간 배양하면 siderophore 생산 균주는 강한 킬레이트인 siderophore가 CAS 용액의 Fe(III)과 결합하여 푸른색이 오렌지색으로의 변화로 확인할 수 있다. 뿌리에 근착이 잘되고 뿌리

성장을 촉진시키는 선발균주 15종 가운데 TS3-7, TS1-5 TS6-4, TS1-2, TS1-3의 다섯 균주가 CAS plate에서 orange halo zone을 형성하여 siderophore 생산균주로 확인되었다. 또한 TS 3-7 균주는 King's B 배지에서 형광을 나타내어(Fig. 1), TS3-7 균주가 fluorescent siderophore(Fig. 2)를 생산함이 확인되었다.

풋마름병 발병억제 효과. 분리된 siderophore 생산 균주의 발병억제 효과를 검정하기 위해 종자처리, 토양처리, 종자와 토양 병행 처리를 포트실험으로 행하였다. Ownley 방법으로 박테리아를 종자에 코팅한 경우 종자 당 10^8 - 10^9 CFU의 미생물 밀도가 유지됨이 단계적 희석방법에 의해 확인되었으며, 2% methylcellulose와 0.02 M phosphate buffer 혼합액만으로 처리한 대조군에서는 박테리아가 검출되지 않았다. 선발균주 현탁액을 종자에 코팅처리, 토양에 관주처리, 그리고 종자처리와 토양처리를 병행한 경우의 발병억제효과를 활성균주의 처리 없이 *R. solanacearum*만 처리한 대조구에 대한 발병 억제율로 나타내었다. *R. solanacearum* 처리 후 고추는 평균적으로 9일 후에 발병증세를 보였고, 토마토는 평균 5일정도만에 발병증세를 보였으며, 발병 후에도 토마토가 고추보다 빠르게 병이 진전됨을 관찰할 수 있었다. 각 처리마다 토마토와 고추를 각각 10주씩 3번 반복 실험하여 평균값을 구하였다(Table 1). 모든 활성균주에 있어서, 토양처리 방법이 종자처리 방법 보다 발병억제 효과가 좋고, 종자 또는 토양의 단독 처리보다 종자처리와 토양처리를 병행한 경우에 방제효과가 높게 나타났다. 특히 TS3-7 균주의 경우 종자처리와 토양처리를 병행한 경우 고추는 80%, 토마토의 경우는 65% 이상의 발병 억제율을 나타내었다.

TS 3-7 균주의 풋마름병균에 대한 길항작용. *in vitro* plate 상에서 TS 3-7 균주와 *R. solanacearum* 균주는 서로에 대해 antagonistic activity를 나타내지 않았다.

TS 3-7 균주의 항균활성. TS 3-7 균주의 항균활성을 paper disc method로 조사한 결과 Gram 음성균인 *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, Gram 양성균인 *Ralstonia solanacearum*, *Staphylococcus aureus*, yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*, fungi인 *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea* 모두에 대해 저해 활성을 나타내지 않았다.

생균 밀도유지. talc와 vermiculite 각각에 9×10^8 CFU/g이 되도록 균체를 섞은 다음 시간 경과에 따른 생균밀도의 변화를

Table 1. Suppression of bacterial wilt of tomato and pepper plants by PGPR strains

Strains	Biocontrol efficacy (%) ^a					
	Seed treatment ^b		Soil application ^c		Seed + Soil treatment	
	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato	Pepper	Tomato
TS1-2	47.6	40.3	57.5	50.3	68.5	65.9
TS1-3	23.5	15.4	35.0	15.2	50.1	49.7
TS1-5	41.2	35.0	47.5	30.8	55.0	40.4
TS3-7	60.0	55.2	75.1	60.0	80.0	65.0
TS6-4	41.2	15.4	42.5	31.3	60.2	44.7

^aData represent means of 10 replications of each treatment. The experiment was repeated three times. Disease severity was rated 14 days after inoculation with *R. solanacearum*. Biocontrol efficacy is based on comparisons to the nonbacterized but pathogen-challenged controls.

^bPepper and tomato seeds were coated with the selected bacterial cell suspension and planted.

^cPlants were grown in potting soil and was drenched with bacterial cell suspension.

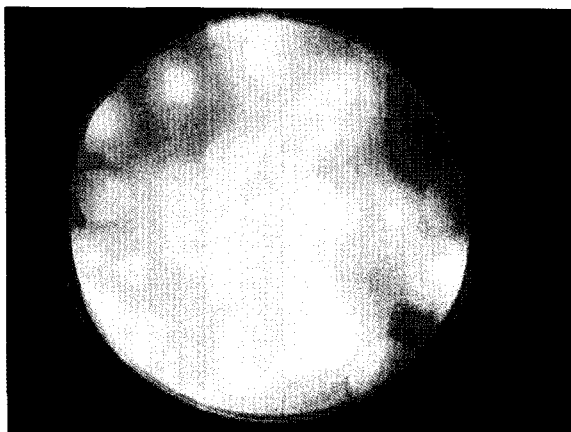


Fig. 3. Colony count of fluorescent *Pseudomonads* TS3-7 strain under UV light.

Table 2. Taxonomical studies of the strain TS 3-7

Morphological characteristics	
Gram reaction	-
Motility	+
Biochemical characteristics	
Catalase reaction	+
Oxidase reaction	+
Gas production from glucose	-
H ₂ S production	-
O/F test	oxidation
Indole production	-
Urease activity	-
Hydrolysis of starch	+
gelatine	-
Utilization of glucose	+
mannose	-
lactose	-
maltose	+
sucrose	-
arabinose	-
inositol	-
mannitol	-
citrate	+

조사하기 위해 일주일 간격으로 시료 현탁액을 단계적으로 희석하여 King' B 배지에 도말하여 형광을 내는 colony 수를 계수하였다(Fig. 3). Talc와 vermiculite 모두의 경우 4주까지는 균체 수가 증가하는 추세를 보였으나, talc의 경우는 4주 이후 급격히 감소하여 8주 이후에는 거의 생균이 확인되지 않은 반면 vermiculite의 경우는 16주까지 균체수의 변화가 없음을 관찰되었다. 미생물을 이용한 생물학적 방제제의 개발 시 가장 큰 걸림돌인, 생균의 짧은 shelf-life를 개선하기 위하여 여러 가지 시도가 진행 중이다.

선발균주의 동정. 선발균주 TS3-7을 동정하기 위하여 형태적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사한 결과(Table 2) Gram-negative의 간균이며, 이동성을 갖고, catalase, oxidase 활성을 갖고, O/F test에 음성을 나타내었다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참조하여, *Pseudomonas fluorescence-*

Table 3. Effects of different carrier on population density of TS3-7 strain

Sample time (w)	log cfu/g ^a	
	talc based formulation	vermiculite based formulation
w0	9.28	9.28
w2	8.97	9.25
w4	7.65	9.18
w6	5.81	8.62
w8	3.63	8.59
w10	-	8.31
w12	-	8.12
w14	-	7.99
w16	-	7.63
w18	-	7.32

^aPopulation density of strain TS3-7 is expressed as log cfu/g inoculated formulation.

Number of cfu were obtained by the method described in the materials and methods. Values are the mean of three replications.

putida 그룹으로 분류하였으며, 또한 16S rDNA의 염기서열을 분석하고 Database를 이용하여 유사도를 분석한 결과 *Pseudomonas fluorescence*와 99%의 유사성을 보여 *Pseudomonas* sp. TS 3-7로 명명하였다.

고 찰

환경오염과 독성문제가 크게 부각되면서 화학농약의 대안으로 생물학적 방제제로서의 미생물 사용에 대한 관심이 높아지고 있다. 식물생장을 촉진시켜, Plant growth promoting rhizobacteria(PGPR)로 불리는 근권미생물들은 식물 성장에 직접 영향을 주는 경우도 있지만 대부분 siderophores, antibiotics와 enzymes등의 생산을 통해 토양 식물병원균을 억제시킴으로 식물 성장 촉진을 가져온다고 알려졌다.^{8,9)}

선발된 TS3-7 균주에 의한 풋마름병의 발병억제 기작이 정확하게 밝혀지진 않았지만 *in vitro* plate 상에서 풋마름병균에 대해 저해활성을 전혀 나타내지 않으므로 직접적인 antibiosis에 의하지 않고, siderophore 생산을 통해 근권에서 병원균과 Fe(III)에 대해 경쟁하여 병원균의 증식을 억제하는 것으로 보인다. PGPR 균주 중에는 식물 병원균에 대해 직접 antibiosis를 나타내지 않으나, 식물 뿌리에 근착되어 식물의 방어 시스템을 활성화시켜, 병원균에 대한 저항성을 유도할 수 있으며 이를 induced systematic resistance(ISR)라 하는데 식물체에 일단 방어 시스템이 활성화되면 곰팡이, 세균, 바이러스 등 다양한 병원균에 대해 저항성을 갖게 될 뿐만 아니라 또한 ISR을 유발시킨 PGPR 균체가 감소하여도 상당히 오랫동안 저항성이 지속된다고 한다.^{10,13)} 따라서, 차세대 생물학적 방제제는 식물생장을 촉진 시키면서 토양 병원균에 대해 억제 능력을 가질 뿐만 아니라, 식물체내 systemic한 방어 체계, ISR을 유발시킬 수 있는 PGPR을 이용함이 바람직하겠다.

ISR은 병원균에 의해 유발되는 systemic acquired resistance (SAR)와는 다른 신호전달 체계에 의하며, siderophore와

lipopolysaccharide의 O-antigen 등이 bacterial determinant로 작용함이 밝혀졌다. 따라서 siderophore 생산 균주는 철에 대한 경쟁을 통하여 근권에서 병원균의 성장을 저해할 뿐만 아니라 siderophore가 직접 식물체에 ISR을 유발시켜 넓은 스펙트럼의 병원균에 대해 식물체가 저항성을 갖도록 하므로 생물학적 방제제 개발에 많이 이용되었다.^{14,16)} fluorescent Pseudomonads인 TS3-7 균주에 의한 풋마름병 발병 억제기작이 철이온에 대한 경쟁과 더불어 ISR의 유도에 의한 것인지를 확인하기 위하여 TS3-7 균주에 의한 풋마름병균 외의 다른 병원균에 대한 발병 억제 효과의 검정과 미생물을 이용한 생물학적 방제제의 가장 큰 단점인 짧은 shelf-life를 개선하기 위한 여러 담체의 혼합, amendments와 binder등의 첨가에 대한 연구가 진행 중이다.

감사의 글

본 연구는 농림기술개발 연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 풋마름병원균을 분양해주시고 여러 조언을 해주신 농업과학기술원의 이영기 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Van Elsas, J. D., Kastelein, P., Van Bekkum, Van der Wolf, J. M., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathol.* **90**, 1358-1366.
2. Van Elsas, J. D., Kastelein, P., de Vries, P. M. and Van Overbeek, L. S. (2001) Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in irrigation water. *Can. J. Microbiol.* **47**, 842-854.
3. Vasse, J., Frey, P. and Trigalet, A. (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 241-251.
4. Schell, M. A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* **38**, 263-292.
5. Schwyn, B. and Neiland, J. B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56
6. Ownley, B. H., Weller D. M. and Thomashow, L. S. (1992) Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathol.* **82**, 178-184.
7. Vidyasekaran, P. and Muthuamilan, M. (1995) Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* **79**, 780-782.
8. Duijff, B. J., Recorbet, G., Bakker, P. A. H., Loper, J. E. and Lemenceau, P. (1999) Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* F 47 and *Pseudomonas putida* WCS 358. *Biol. Control* **89**, 1073-1079.
9. Kloepper, J., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. (1980) Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**, 885-886.
10. Parke, J. (1991) In *The rhizosphere and plant growth, Root colonization by indigenous and introduced microorganism*, Kluwer Academic Publishers, Boston.
11. Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V. and Samiyappan, R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* **20**, 1-11.
12. Bakker, P., Ran, L., Pieterse, C. and Van Loon, L. (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can. J. Plant Pathol.* **25**, 5-9.
13. Van Loon L., Bakker P. and Pieterse M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-483.
14. Pieterse, C. M. J., Van Wees S. C. M., Hoffland, E., Van Pelt J. A. and Van Loon L. C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**, 1225-1237.
15. Scher, F. M. and Baker, R. (1982) Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to fusarium wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**, 1567-1573.
16. Mercado-Blanco, J., Van Der Drift, K., Olsson, P., Thomas-Oates, J., Van Loon, L. and Bakker, P. (2001) Analysis of the pmsCEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore Pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* **183**, 1909-1920.