کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی آوندی میخک با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* به وسیله استرین‌های باسیلوس و سودوموناس جدا شده از فراریشه میخک

ابراهیم کریمی[۱]، حمید روحانی[۱]، دوستمراد ظفری[۱]، غلام خداکرمیان[۲] و میثم تقی نسب[۳]

چکیده

جهت کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی آوندی میخک، ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp . *dianthi*، اثر آنتاگونیستی ۱۴۱ باکتری جدا شده از فراریشه (ریزوسفر) میخک علیه قارچ بیمارگر به روش کشت متقابل مورد بررسی قرار گرفت. از این تعداد، ۱۶ استرین دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند که ۷ استرین با بیشترین هاله بازدارندگی برای آزمون‌های بعدی انتخاب شدند. بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی استرین‌های E31 و E57 به عنوان *Bacillus cereus*، استرین‌های E76، E93، E102 و E121 به عنوان *Bacillus subtilis* و جدایه E130 به عنوان *Pseudomonas fluorescens* bv. III شناسایی شدند. در آزمون‌های آزمایشگاهی تمامی استرین‌ها نسبت به شاهد، با تولید متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های مایع خارج سلولی از رشد میسلیومی بیمارگر جلوگیری کردند. این پدیده همراه با بعضی تغییرات مرفولوژیکی در هیف‌ها مشاهده گردید. متابولیت‌های استخراجی این استرین‌ها نیز باعث کاهش تعداد کنیدیوم و توانایی جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر شدند. در بررسی‌های صورت گرفته در شرایط کنترل شده با استفاده از خاک سترون و غیرسترون، تأثیر استرین‌های باکتریایی به دو روش آلوده‌سازی خاک و آغشته‌سازی ریشه به باکتری‌ها روی شدت بیماری، درصد گیاهان سالم و فاکتورهای رشدی مورد ارزیابی قرار گرفت. استرین‌های E57 و E121 به هر دو روش آلوده‌سازی خاک و آغشته‌سازی ریشه و جدایه E130 فقط به روش آغشته‌سازی ریشه، بیشترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری و افزایش درصد گیاهان سالم از خود نشان دادند. استرین‌های E57 و E121 و E130 نسبت به شاهد به طور معنی‌داری وزن خشک گیاه را افزایش دادند. بیشترین وزن خشک در روش آلوده‌سازی خاک مربوط به جدایه E57 و در روش آغشته‌سازی ریشه مربوط به جدایه E130 بود.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، کنترل بیولوژیکی، پژمردگی آوندی، میخک

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) دارای بیماری‌های متعددی است که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به بیماری پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *dianthi* (Prill & Delacr) W.C. Snyd. & H.N. Hans. اشاره کرد. پژمردگی ایجاد شده معمولاً از یک طرف بوته آغاز می‌شود.

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج
۳. مربی بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

بوته‌های جوان در یک سمت کوتاه و پیچیده می‌گردند و رنگ سبز برگ‌ها و ساقه‌ها به رنگ خاکستری روشن و در نهایت به رنگ زرد کاهی در می‌آید (۱).

تاکنون تأثیر رایزوباکترهای آنتاگونیست به‌ویژه گروه سودوموناس‌های فلورسنت و برخی گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان گزارش شده است (۲۶). استرین‌هایی از *B. subtilis* نیز گزارش شده‌اند که در حفاظت محصول در برابر *Fusarium* و *Rhizoctonia* بسیار مؤثر بوده و به میزان زیادی رشد گیاه را افزایش داده‌اند (۲۶). تسی و زازرینی (۲۴) با افزودن باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *Pseudomonas fluorescens* به خاک و پوشش دادن بذر به وسیله آنها، زنگ گلرنگ با عامل *Puccinia carthami* را کنترل نمودند. استفاده از *Pseudomonas* sp. WCS417 توانست میخک را در برابر پژمردگی فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* حفاظت کند (۲۵). میشاقی و همکاران (۱۶) اظهار کردند که استرین CHAO *P.fluorescens* با تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در کنترل پوسیدگی سیاه ریشه توتون ناشی از *Thielaviopsis basicola* نقش دارد. در این مطالعه تأثیر استرین‌هایی از رایزوباکترهای متعلق به سودوموناس‌های فلورسنت و باسیلوس‌ها، جدا شده از فاریشه میخک، روی قارچ عامل پژمردگی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱. جداسازی قارچ بیمارگر و اثبات بیماری‌زایی آن

در طی نمونه برداری‌ها، گیاهان با علائم پژمردگی و پوسیدگی آوندی انتخاب و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. قطعاتی از ریشه و ساقه آلوده تهیه و قارچ بیمارگر مطابق با روش‌های معمول، روی محیط کشت PDA جداسازی شد (۲۲). جهت رعایت اصول کخ، آزمون بیماری‌زایی استرین‌ها به روش اباوی و لوربیر (۲) با اندکی تغییر به صورت مایه‌زنی خاک گلدان با مایه قارچ بیمارگر که روی دانه‌های گندم کشت داده شده بود انجام شد. برای ارزیابی شدت بیماریزایی استرین‌های قارچی، از شاخص بیماری دمینک و همکاران (۵) استفاده شد (۰ = بدون نشانه، ۱ = بدون نشانه خارجی، قهوه‌ای شدن خفیف آوندها، ۲ = بدون نشانه خارجی، قهوه‌ای شدن متوسط آوندها، ۳ = چندین برگ رنگ پریده یا پژمرده، قهوه‌ای شدن زیاد آوندها و ۴ = پژمردگی شدید).

۲. جداسازی استرین‌های باکتریایی از خاک فراریشه

خاک اطراف ریشه گیاهان سالم از گلخانه‌های مختلف میخک‌کاری محلات جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس خاک هر منطقه مخلوط شد و یک گرم از خاک در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و غلظت‌های مختلف به طور سریال در محلول یک درصد پپتون تهیه گردید. سپس رقت 10^{-4} و 10^{-5} به روش مخطط کردن روی محیط آگار غذایی (NA) کشت گردیدند. پس از ۲۴ ساعت نگه‌داری در دمای $25^{\circ}C$ تک پرگنه‌های رشد یافته، براساس تفاوت در رنگ، شکل، اندازه و حاشیه پرگنه انتخاب و روی محیط کشت NA به روش مخطط کردن خالص سازی شدند. جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت نیز با استفاده از محیط انتخابی S_1 (۷) انجام شد. پس از خالص سازی، استرین‌ها به آب مقطر دوبار سترون انتقال و در دمای $4^{\circ}C$ نگه‌داری شدند (۱۸).

۳. غربال استرین‌های آنتاگونیست باکتریایی

۱۴۱ استرین به دست آمده از فراریشه میخک، به روش کشت متقابل استرین‌های باکتریایی با قارچ بیمارگر در محیط کشت PDA تحت دمای $25^{\circ}C$ از لحاظ بررسی توان آنتاگونیستی نگه‌داری شدند. پس از این مدت استرین‌هایی که در تقابل با بیمارگر، هاله بازدارندگی ایجاد کرده بودند برای مراحل بعدی انتخاب شدند (۸). این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازدارندگی استرین‌ها از رشد میسلیومی بیمارگر نسبت به شاهد تصحیح و محاسبه شد.

۴. بررسی تولید متابولیت‌های میکروبی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

۴. ۱. آزمون تولید پروتئاز

با توجه به نقش پروتئازها به عنوان یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی،

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

این آنزیم براساس روش مارهوفر و همکاران (۱۵) بررسی شد. تشتک‌های حاوی محیط کشت SMA به صورت لکه‌ای توسط استرین‌های باکتریایی تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°C نگه‌داری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف پرگنه باکتری در طول این مدت نشانه فعالیت پروتئازی استرین‌ها می‌باشد.

۴. ۲. آزمون تولید سیانید هیدروژن (HCN)

قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر در محلول معرف HCN شامل ۵ میلی‌لیتر اتیل استواستات مس، ۵ میلی‌گرم ۴ و۴ (متیلن بیس- (N- -N- دی متیل آنیلین) و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم، غوطه‌ور گردید. سپس قطعات کاغذ صافی آغشته به معرف مذکور درون تشتک حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار گرفته و به صورت وارونه در ۲۸°C نگه‌داری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ آبی، پس از ۱۸-۳ ساعت نشانه تولید سیانید هیدروژن می‌باشد (۴).

۴. ۳. آزمون تولید متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار

این آزمون بر اساس روش کراس و لوپر (۱۱) با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا استرین‌های باکتریایی با غلظت 1×10^{7} باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه گردیده و روی محیط کشت PDA پخش کرده و سه روز در دمای ۲۵°C نگه‌داری شد. سپس پرگنه باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته و پنبه سترون آغشته به کلروفرم، درون تشتک به صورت وارونه قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه، یک حلقه از حاشیه کشت قارچ بیمارگر در وسط هر تشتک کشت داده شد. پس از ۱۰ روز درصد بازداری از رشد بیمارگر محاسبه شد.

۴. ۴. آزمون تولید متابولیت‌های فرار ضد قارچی

این آزمون بر اساس روش فیدامن و روزال (۶) انجام شد. ابتدا سوسپانسیون کدری از استرین‌های باکتریایی با غلظت 1×10^{7} باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از این رقت روی محیط کشت آگار غذایی حاوی دو درصد گلوکز (NGA) اضافه و به وسیله پیپت پاستور سترون پخش شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C نگه‌داری گردید. سپس یک حلقه از کشت قارچ بیمارگر در وسط محیط کشت PDA تلقیح شد. در شرایط سترون، درب تشتک‌های کشت باکتری و قارچ بیمارگر برداشته و دو تشتک را بر روی یکدیگر قرار داده و با استفاده از نوار پارافیلم، منفذ میانی تشتک‌ها مسدود شد. سپس تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵°C نگه‌داری شدند. درصد بازداری از رشد میسلیومی بیمارگر برای هر یک از استرین‌ها اندازه‌گیری و محاسبه شد.

۴. ۵ . آزمون تولید سیدروفور

این آزمون بر اساس روش ولر و کوک (۲۷) انجام شد. روی محیط کشت King's B حاوی ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III استرین‌های باکتریایی E31، E57، E76، E93،E102، E121 و E130 به همراه استرین *P. fluorescens* CHAO به عنوان استرین استاندارد، کشت و به مدت ۵ روز در دمای ۲۵°C نگه‌داری شدند. سپس سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ *Geotrichum candidum* Link (کشت ۵ روزه) در آب مقطر سترون تهیه و روی کشت‌های باکتریایی پاشیده شد. عدم رشد قارچ در اطراف سلول‌های باکتری نشانه مثبت بودن تولید سیدروفور است.

۵ . آزمون تأثیر متابولیت‌های مایع خارج سلولی با دو روش سترون‌سازی

۵ .۱. تأثیر متابولیت‌های فیلتر شده با میکروپور

این آزمون بر اساس روش برگ و همکاران (۳) با اندکی تغییر انجام گردید. برای این کار به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع Potato Dextrose Broth (PDB) را در ارلن ریخته و در اتوکلاو (دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه) سترون شد. پس از آن به هر ارلن یک حلقه کامل از کشت ۲۴ ساعته استرین‌های باکتریایی، اضافه شد. سپس ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۷°C و ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت یک هفته قرار داده شد. سپس محیط‌های کشت از کاغذ

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

صافی واتمن شماره یک عبور داده و با سانتریفوژ در ۴۰۰۰×g به مدت ۵ دقیقه و متعاقب آن با سانتریفوژ در ۸۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه صاف شد. بعد از این مراحل عصاره‌های به دست آمده از میکروپور جهت سترون‌سازی عبور داده شدند. برای بررسی تأثیر ضد قارچی عصاره‌های به دست آمده، ابتدا محیط کشت PDA با حجم‌های ۱۵، ۱۷ و ۱۹ میلی‌لیتر درون لوله‌ها ریخته شد و پس از سترون کردن آنها و هم‌چنین رسیدن دمای آنها به ۵۰ °C به ترتیب ۵، ۳ و ۱ میلی‌لیتر (به ترتیب غلظت‌های ۲۵٪، ۱۵٪ و ۵٪ حجمی) از عصاره هر یک از باکتری‌ها به لوله‌های مذکور اضافه شد و پس از اختلاط کامل به تشتک‌ها ریخته شدند. برای هر یک از غلظت‌های عصاره ۳ تکرار تهیه گردید. پس از انجماد محیط کشت، در وسط هر تشتک یک حلقه از قارچ بیمارگر تلقیح شد. میزان بازداری از رشد میسلیومی بیمارگر، قابلیت کنیدیوم‌زایی و نرخ جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها پس از ۱۰ روز یادداشت شد. این آزمون به صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی (عامل اول استرین‌های باکتریایی و عامل دوم غلظت عصاره‌ها) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

۵ .۲. تأثیر متابولیت‌های اتوکلاو شده

این آزمون به منظور بررسی اثر دما روی ترکیبات بازدارنده موجود در ترشحات خارج سلولی باکتری‌ها صورت گرفت. تمامی مراحل، مشابه آزمون ۵-۱ بوده با این تفاوت که سترون سازی با اتوکلاو صورت پذیرفت نه با میکروپور.

۶. بررسی‌های گلخانه‌ای

۶. ۱. تهیه مایه تلقیح قارچ بیمارگر و استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست

جهت آلوده‌سازی خاک گلدان‌ها به قارچ، مایه تلقیح آن به روش اباوی و لوربیر (۲) روی دانه‌های گندم تهیه گردید. در مورد مایه تلقیح استرین‌های باکتریایی به روش کیم و همکاران (۱۰) روی محیط NBY تهیه شد. با توجه به این که برای هر گرم خاک تعداد ۱×۱۰^{۹}cfu باکتری استفاده می‌گردد؛ بنابراین ابتدا بر اساس وزن خاک، جمعیت مورد نیاز باکتریایی را به دست آورده و سپس بر اساس حجم و وضعیت رطوبتی گلدان‌ها، 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.

۶. ۲. بررسی تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست

در این بررسی، تأثیر استرین‌ها روی شدت بیماری، درصد گیاهان سالم و فاکتورهای رشدی به دو روش آلوده‌سازی خاک به باکتری و آغشته‌سازی ریشه‌ها به باکتری به کمک صمغ‌عربی، در دو حالت خاک سترون و غیرسترون مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی تأثیر استرین‌ها روی شدت بیماری و درصد گیاهان سالم، تیمارها به صورت مایه تلقیح قارچ بیمارگر بعلاوه استرین باکتریایی به همراه دو شاهد مثبت (تلقیح شده با مایه قارچی) و منفی (بدون تلقیح با مایه قارچی) در نظر گرفته شدند. برای بررسی تأثیر استرین‌ها روی فاکتورهای رشدی، تیمارها بدون مایه تلقیح قارچی و فقط با استرین‌های باکتریایی چیده شدند. آزمون‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی (عامل اول استرین‌های باکتریایی و عامل دوم روش به کارگیری استرین‌ها) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار به انجام رسید. داده برداری‌ها پس از شش هفته انجام شد و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد ($P<۰/۰۱$) انجام گرفت.

در تمامی‌آزمون‌ها برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده، با توجه به وجود عدد صفر در میان داده‌ها و هم‌چنین نرمال کردن داده‌ها جهت توزیع نرمال، از تبدیل جذری $\sqrt{x+۰/۵}$ استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (۱۳) و در سطح یک درصد ($P<۰/۰۱$) با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت.

نتایج

در میان دوازده جدایه قارچ بیمارگر جداسازی شده از میخک، جدایه F12 نسبت به دیگر جدایه‌ها بیماری‌زاتر بود و هم‌چنین از ۱۴۱ استرین باکتریایی ۱۶ استرین نسبت به جدایه F12 دارای خاصیت بازدارندگی بودند که پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین درصد بازدارندگی، استرین‌های

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

E31، E57، E76، E93،E102 ، E121 و E130 جهت بررسی اثرات آنتاگونیستی روی *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انتخاب شدند. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی، مشخصات استرین‌های E31 و E57 با *Bacillus cereus*، استرین‌های E76، E93، E102 و E121 با *Bacillus subtilis* و مشخصات جدایه E130 با *Pseudomonas fluorescens* bv. III مطابقت داشت.

بررسی‌های آزمایشگاهی

تمامی استرین‌ها پس از ۴۸ ساعت با توجه به تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه باکتری، پروتئاز مثبت در نظر گرفته شدند. در بررسی توانایی استرین‌ها در تولید سیانید هیدروژن، فقط جدایه E130 در تولید HCN مثبت بوده و استرین‌های دیگر در تولید آن منفی بودند. تمامی استرین‌های E31،E57، E76، E93،E102، E121 و E130 در آزمون کشت متقابل در برابر *Fusarium oxysporum* دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند. جدایه E121 *B. subtilis* با ۵۸/۱ درصد کاهش در رشد میسلیومی بیمارگر، دارای بیشترین بازدارندگی بود (جدول ۱). در بررسی‌های میکروسکوپی، تمامی استرین‌ها باعث تغییرات مرفولوژیکی از قبیل پیچیده شدن هیف و تشکیل وزیکل در نزدیک به انتها و در طول هیف و هم‌چنین روشن شدن نوک هیف بیمارگر شدند. متابولیت‌های فرار تمامی استرین‌ها به‌ویژه جدایه E130 *Pseudomonas fluorescens* bv. III با ۹۰/۸۳ درصد بازدارندگی، روی بیمارگر تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد میسلیومی بیمارگر شدند (جدول ۱). در مورد متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار، جدایه E121 با ۶۰/۵ درصد بازدارندگی، نسبت به سایر استرین‌ها بیشترین تأثیر را روی بیمارگر گذاشت (جدول ۱). فقط جدایه E130 در غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن III روی محیط کشت King's B، از رشد *Geotrichum candidum* جلوگیری کرد ولی در سایر استرین‌ها این وضعیت مشاهده نشد.

در بررسی تأثیر دو روش سترون‌سازی متابولیت‌های مایع خارج سلولی (میکروپور و اتوکلاو) در هر دو روش، با افزایش غلظت عصاره درصد بازداری از رشد میسلیومی بیمارگر نیز توسط استرین‌های باکتریایی افزایش یافت که استرین‌های E57 و E121 دارای بیشترین بازدارندگی بودند (جدول ۲). در مورد تعداد کنیدیوم‌های تولیدی بیمارگر تمامی استرین‌ها باعث کاهش در تعداد کنیدیوم‌ها شدند و در این میان، استرین E121 تأثیر بیشتری داشت (جدول ۳). عصاره این استرین‌ها، درصد جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر را نیز تحت تأثیر قرار داده و میزان آن را نسبت به شاهد کاهش داد (جدول ۴).

بررسی‌های گلخانه‌ای

تأثیر استرین‌های باکتریایی در روش آلوده‌سازی خاک

در خاک سترون، تنها استرین‌های E57 و E121 توانستند شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۰/۶۷ و ۰/۲۲ کاهش دهند. همچنین فقط استرین‌های E57 و E121 به ترتیب ۳۳ و ۷۸ درصد توانستند نسبت به شاهد درصد گیاهان سالم را افزایش دهند (جدول ۵). در مورد اثر استرین‌ها روی فاکتورهای رشدی نیز، استرین‌های E57 و E121 به طور معنی‌داری مقدار وزن خشک کل میزبان را افزایش دادند (جدول ۶). اما در خاک غیرسترون، استرین‌های باکتریایی در تمامی موارد بی تأثیر بودند (جدول ۵ و ۶).

تأثیر استرین‌های باکتریایی در روش آغشته‌سازی ریشه‌ها

در خاک سترون، استرین‌های E57، E121 و E130 شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۰/۷۸، ۰/۶۷و ۰/۶۷ کاهش دادند. همچنین استرین‌های E57 و E121 و E130 به ترتیب ۲۲، ۳۳ و ۳۳/۳۳ درصد در مقایسه با شاهد درصد گیاهان سالم را افزایش دادند (جدول ۵). در مورد اثر استرین‌ها روی فاکتورهای رشدی نیز، استرین‌های E57 و E130 به طور معنی‌داری مقدار وزن خشک کل میزبان را افزایش دادند (جدول ۶). اما در خاک غیرسترون، استرین‌های باکتریایی در تمامی موارد بی تأثیر بودند (جدول ۵ و ۶).

بحث

در این مطالعه تمامی استرین‌های باکتریایی، باعث کاهش رشد میسلیومی *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* شدند. استرین‌های

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7] [Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۱. اثر متابولیت‌های مترشحه استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

استرین باکتریایی	متابولیت‌های فرار		متابولیت‌های قابل نفوذ در آگار		کشت متقابل	
	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی
Bacillus cereus E31	۱۵/۶۷	۶۰/۸۳ b	۱۹	۵۵/۸ b	۲۰	۵۳/۵ a
Bacillus cereus E57	۱۹/۶۷	۵۰/۸۳ d	۲۵	۴۱/۹ d	۲۵/۶۷	۴۰/۳ b
Bacillus subtilis E76	۲۶	۳۵ f	۲۵/۶۷	۴۰/۳ e	۲۷/۳۳	۳۶/۴۳ c
Bacillus subtilis E93	۱۸	۵۵ c	۲۳	۴۶/۵ c	۲۴	۴۴/۲ b
Bacillus subtilis E102	۱۸/۳۳	۵۴/۱۷ c	۲۳/۳۳	۴۵/۷۳ c	۲۴	۴۴/۲ b
Bacillus subtilis E121	۲۲/۳۳	۴۴/۱۷ e	۱۷	۶۰/۵ a	۱۸	۵۸/۱ a
P.fluorescens E130	۳/۶۷	۹۰/۸۳ a	۳۰	۳۰/۲ f	۳۰/۶۷	۲۸/۷۳ d
شاهد	۴۰	۰ g	۴۳	۰ g	۴۳	۰ e

* : اعداد جدول میانگین سه تکرار است. * : تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۲. اثر غلظت‌های مختلف عصاره کشت حاوی متابولیت‌های مایع خارج سلولی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست سترون شده با میکروپور و اتوکلاو روی رشد میسلیومی *Fusaium oxysporum* f.sp. *dianthi*

استرین باکتریایی	سطوح غلظت عصاره									
	٪۵				٪۱۵				٪۲۵	
	روش میکروپور		روش اتوکلاو		روش میکروپور		روش اتوکلاو		روش میکروپور		روش اتوکلاو	
	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی	قطر پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی
Bacillus cereus E31	۲۵/۵	۴۰/۷۴ f	۳۲/۸۳	۲۳/۶۳ g	۲۳/۹	۴۴/۴۴ e	۳۰/۳۸	۲۹/۳۳ e	۱۹/۴	۵۴/۸۱ b	۲۶/۲۶	۳۸/۹۲ b
Bacillus cereus E57	۱۹/۱	۵۵/۵۵ b	۲۸/۷۱	۳۳/۲۱ d	۱۹/۱	۵۵/۵۵ b	۲۷/۲۳	۳۶/۶۶ c	۱۶/۳	۶۲/۲۲ a	۲۴	۴۴/۱۸ a
Bacillus subtilis E76	۳۳/۱	۲۲/۹۶ j	۳۷/۲۷	۱۳/۳۲ i	۳۰/۶	۲۸/۸۸ i	۳۴/۷۸	۱۹/۱ h	۲۸/۷	۳۳/۳۳ h	۳۲/۸۲	۲۳/۶۶ g
Bacillus subtilis E93	۲۴/۵	۴۲/۹۶ fe	۳۲/۲۸	۲۴/۹۲ g	۲۱/۳	۵۰/۳۷ c	۲۸/۷	۳۳/۲۴ d	۱۹/۱	۵۵/۵۵ b	۲۶/۰۴	۳۹/۴۴ b
Bacillus subtilis E102	۲۸	۳۴/۸۱ h	۳۴/۳۱	۲۰/۱۹ h	۲۷/۱	۳۷ g	۳۲/۴۹	۲۴/۴۴ g	۲۶/۸	۳۷/۷۷ g	۳۱/۴۶	۲۶/۸۲ f
Bacillus subtilis E121	۲۵/۲	۴۱/۴۸ f	۳۲/۶۳	۲۴/۱ g	۱۹/۴	۵۴/۸۱ b	۲۷/۴۴	۳۶/۱۷ c	۱۶/۲	۶۲/۲۲ a	۲۴	۴۴/۱۸ a
P.fluorescens E130	۲۸	۳۴/۸۱ h	۳۴/۳۱	۲۰/۱۹ h	۲۶/۸	۳۷/۷۷ g	۳۲/۲۸	۲۴/۹۳ g	۲۲/۶	۴۷/۴ d	۲۸/۵۳	۳۳/۶۵ d
شاهد	۴۳	۰ k	۴۳	۰ j	۴۳	۰ k	۴۳	۰ j	۴۳	۰ k	۴۳	۰ j

* : اعداد جدول میانگین سه تکرار است. * : تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7] [Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۳. اثر غلظت‌های مختلف عصاره کشت حاوی متابولیت‌های مایع خارج سلولی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست سترون شده با میکروپور و اتوکلاو روی قابلیت کنیدیوم‌زایی *Fusaium oxysporum* f.sp. *dianthi*

استرین باکتریایی	سطوح غلظت عصاره											
	٪۵				٪۱۵				٪۲۵			
	روش میکروپور		روش اتوکلاو		روش میکروپور		روش اتوکلاو		روش میکروپور		روش اتوکلاو	
	تعداد کنیدیوم‌ها	گروه‌بندی تیمارها	تعداد کنیدیوم‌ها	گروه‌بندی تیمارها	تعداد کنیدیوم‌ها	گروه‌بندی تیمارها	تعداد کنیدیوم‌ها	گروه‌بندی تیمارها	تعداد کنیدیوم‌ها	گروه‌بندی تیمارها	تعداد کنیدیوم‌ها	گروه‌بندی تیمارها
Bacillus cereus E31	۳/۵	f	۷/۵۷	ed	۲/۶۷	h	۶/۲۳	j	۲	i	۴/۴۳	m
Bacillus cereus E57	۳	g	۷/۱	g	۲/۶۷	h	۶/۱	k	۲	i	۴/۳	n
Bacillus subtilis E76	۶/۳۳	b	۸/۵۳	b	۶	b	۷/۹	c	۴/۶۷	dc	۷/۵	e
Bacillus subtilis E93	۴/۶۷	dc	۷/۶۷	d	۴/۵	d	۷	g	۴	e	۶/۲۳	j
Bacillus subtilis E102	۶	b	۸	c	۵	c	۷/۲۷	f	۵	c	۶/۳۷	i
Bacillus subtilis E121	۲	i	۴/۳۳	n	۱/۵	j	۳	o	۱/۵	j	۲/۵	p
P.fluorescens E130	۵	c	۷/۶۳	d	۴/۵	d	۶/۶۳	h	۳/۶۷	f	۵/۶۳	i
شاهد	۹	a	۹	a	۹	a	۹	a	۹	a	۹	a

* اعداد جدول میانگین سه تکرار است. * اعداد جدول به صورت cfu 10^6 × کنیدیوم می‌باشند. * تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۴. اثر غلظت‌های مختلف عصاره کشت حاوی متابولیت‌های مایع خارج سلولی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست سترون شده با میکروپور و اتوکلاو روی درصد جوانه‌زنی کنیدیوم‌های *Fusaium oxysporum* f.sp. *dianthi*

استرین باکتریایی	سطوح غلظت عصاره											
	٪۵				٪۱۵				٪۲۵			
	روش میکروپور		روش اتوکلاو		روش میکروپور		روش اتوکلاو		روش میکروپور		روش اتوکلاو	
	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی تیمارها	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی تیمارها	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی تیمارها	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی تیمارها	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی تیمارها	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی تیمارها
Bacillus cereus E31	۵۹/۳۴	c	۸۶	c	۴۹/۱۸	ih	۷۵/۶۷	g	۳۲/۵۱	p	۵۴/۱۸	k
Bacillus cereus E57	۵۹/۵۷	c	۸۶/۳۳	c	۴۹/۴	h	۷۶	g	۴۵/۲	j	۷۵/۳۳	g
Bacillus subtilis E76	۶۰/۴	b	۸۷/۵۴	b	۵۴/۸۱	f	۸۴	d	۴۸/۸۲	i	۸۱/۳۷	f
Bacillus subtilis E93	۵۶/۲۷	e	۸۱/۵۵	f	۴۸/۹۷	ih	۷۵/۳۳	g	۴۲/۲۷	l	۷۰/۴۵	h
Bacillus subtilis E102	۵۸/۱۹	d	۸۴/۳۳	d	۴۳/۱۲	k	۶۶/۳۳	i	۳۹/۶	n	۶۶	i
Bacillus subtilis E121	۴۰/۹۴	m	۵۹/۳۳	j	۳۸/۵۶	o	۵۹/۳۳	j	۳۰/۶	q	۵۱	l
P.fluorescens E130	۵۹/۳۴	c	۸۶	c	۵۴/۱	g	۸۳/۱۴	e	۴۸/۹۳	ih	۸۱/۵۵	f
شاهد	۹۰/۷۱	a	۹۰/۷۱	a	۹۰/۷۱	a	۹۰/۷۱	a	۹۰/۷۱	a	۹۰/۷۱	a

* : اعداد جدول میانگین سه تکرار است. * : تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7] [Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۵. تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست و روش به کارگیری آنها روی شدت بیماری و درصد گیاهان سالم در تیمار با *Fusaium oxysporum* f.sp. *dianthi* در شرایط خاک سترون و غیر سترون به دو روش آلوده‌سازی خاک و آغشته‌سازی ریشه

استرین باکتریایی	شدت بیماری				درصد گیاهان سالم			
	خاک سترون		خاک غیرسترون		خاک سترون		خاک غیرسترون	
	آلوده‌سازی	آغشته‌سازی ریشه	آلوده‌سازی	آغشته‌سازی ریشه	آلوده‌سازی	آغشته‌سازی ریشه	آلوده‌سازی	آغشته‌سازی ریشه
Bacillus cereus E31	۴ a	۴ a	۴ a	۴ a	۰ c	۰ c	۰ b	۰ b
Bacillus cereus E57	۰/۶۷ b	۰/۷۸ b	۴ a	۴ a	۳۳ b	۲۲ b	۰ b	۰ b
Bacillus subtilis E76	۴ a	۴ a	۴ a	۴ a	۰ c	۰ c	۰ b	۰ b
Bacillus subtilis E93	۴ a	۴ a	۴ a	۴ a	۰ c	۰ c	۰ b	۰ b
Bacillus subtilis E102	۴ a	۴ a	۴ a	۴ a	۰ c	۰ c	۰ b	۰ b
Bacillus subtilis E121	۰/۲۲ c	۰/۶۷ b	۴ a	۴ a	۷۸ a	۳۳ b	۰ b	۰ b
P.fluorescens E130	۴ a	۰/۶۷ b	۴ a	۴ a	۰ c	۳۳/۳۳ b	۰ b	۰ b
شاهدسالم	۰ d	۰ d	۰ b	۰ b	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a
شاهدآلوده	۴ a	۴ a	۴ A	۴ a	۰ c	۰ c	۰ b	۰ b

* اعداد جدول میانگین سه تکرار است. * تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول ۶. تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست و روش به کارگیری آنها روی وزن خشک کل گیاهچه‌های میخک در تیمار با *Fusaium oxysporum* f.sp. *dianthi* در خاک سترون و غیرسترون به دو روش آلوده‌سازی خاک و آغشته‌سازی ریشه

استرین باکتریایی	خاک سترون		خاک غیرسترون	
	آلوده‌سازی	آغشتگی ریشه	آلوده‌سازی	آغشتگی ریشه
Bacillus cereus E31	۵/۵۷ de	۵/۰۳ hg	۵ a	۴/۷۳ a
Bacillus cereus E57	۷/۴۷ a	۵/۹ dc	۵ a	۴/۹ a
Bacillus subtilis E76	۵/۱۳ fg	۵ hg	۴/۸۳ a	۴/۶۷ a
Bacillus subtilis E93	۴/۷۷ hg	۴/۶۳ h	۴/۸۳ a	۴/۷۷ a
Bacillus subtilis E102	۴/۹۳ hg	۴/۶۷ h	۴/۹۳ a	۴/۶ a
Bacillus subtilis E121	۶/۷۷ b	۵/۴۳ fe	۴/۹۳ a	۴/۹۳ a
P.fluorescens E130	۵/۴۷ fe	۶/۲۳ c	۴/۹ a	۴/۸۶ a
شاهد	۴/۶۳ h	۴/۷ H	۴/۷۳ a	۴/۶۷ a

* : اعداد جدول میانگین سه تکرار است. * : تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

مربوط به جنس *Bacillus* به‌ویژه *Bacillus subtilis* E121 در مقایسه با سایر استرین‌ها تأثیر بیشتری نشان دادند. استرین *Pseudomonas fluprescens* E130 نیز از این نظر تأثیر قابل توجه‌ای (۲۸/۷۳ درصد) از خود بروز داد. در بین استرین‌های مختلف *B subtilis* نیز اختلافاتی از نظر درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر مشاهده شد. در بررسی انجام شده توسط رومانکو و آلیمو (۱۷) استرین‌های *B. subtilis* نسبت به سایر استرین‌های آنتاگونیستی مورد آزمایش تأثیر بیشتری در کاهش رشد میسلیومی *Bipolaris sorokiniana* داشتند. اختلاف در بین استرین‌های مختلف یک گونه، از نظر تولید مواد ممانعت کننده از رشد قارچ‌ها توسط سینگ و دورال (۲۱) و برگ و همکاران (۳) گزارش شده است. در بین استرین‌های آنتاگونیست این پژوهش نیز تفاوت‌هایی از لحاظ تولید متابولیت‌های بازدارنده دیده شد که می‌تواند مرتبط با تفاوت‌های مشاهده شده در خاصیت آنتاگونیستی آنها علیه قارچ بیمارگر باشد. تمام استرین‌ها با تولید مواد فرار، رشد میسلیومی بیمارگر را کاهش دادند و استرین E130 بالاترین تأثیر را داشت. فیدامن و روزال (۶) در مورد نحوه بازداری از رشد میسلیومی قارچ‌های رده االومیست و بازیدیومیست توسط استرین‌های *B. subtilis* علاوه بر تولید آنتی‌بیوتیک، مکانیسم دیگری را تحت عنوان متابولیت‌های فرار ضد قارچی مطرح ساخت. مشخص گردید که یکی از متابولیت‌های فرار استرین E130 گاز سیانید هیدروژن می‌باشد. نتایج تحقیقات استاتز و همکاران (۲۳) نشان داد که مکانیسم کنترل بیماری ناشی از *Thieloviopsis brasicola* در توتون توسط جدایه *P. fluorescens* CHAO تولید گاز سیانید هیدروژن است. تولید این گاز در جدایه E130 می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های بازداری از رشد قارچ بیمارگر به حساب آید. مطالعات مختلف، نقش سیدروفور رایزوباکترها را در بیوکنترل بیماری‌های گیاهی ثابت نموده است (۱۲، ۱۹ و ۲۶). نتایج آزمون تولید سیدروفوردر این پژوهش نیز نتایج فوق را تأیید می‌کند.

بررسی تأثیر متابولیت‌های مایع خارج سلولی نشان داد که تمامی استرین‌ها در هر دو روش سترون‌سازی متابولیت‌ها با میکروپور و اتوکلاو، در کاهش رشد میسلیومی، قابلیت کنیدیوم‌زایی و درصد جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر مؤثر بوده‌اند. این بازدارندگی با افزایش غلظت متابولیت‌ها، در هر دو روش افزایش نشان می‌دهد. در مقایسه دو روش سترون‌سازی، میزان بازدارندگی در روش میکروپور بالاتر از روش اتوکلاو می‌باشد. در مورد ترکیبات موجود در متابولیت‌های مایع استرین‌های باسیلوس تحقیقات زیادی صورت گرفته است و مشخص شده است که استرین‌های باسیلوس طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید میکنند. شریبر و همکاران (۲۰) بیان داشتند که بیشتر مواد ضد قارچی تولید شده توسط *B. subtilis* دارای ساختمان پلی پپتیدی می‌باشد. با در نظر گرفتن ماهیت پپتیدی بیشتر متابولیت‌های باکتری‌های آنتاگونیست، کاهش خاصیت بازدارندگی متابولیت‌ها در روش اتوکلاو نسبت به روش میکروپور، می‌تواند با این موضوع ارتباط داشته باشد. از آنجا که پپتیدها در دماهای بالا ساختار فعال خود را از دست می‌دهند می‌توان یک کاهش در نرخ بازدارندگی متابولیت‌های اتوکلاو شده را انتظار داشت. حفظ خاصیت آنتاگونیستی در متابولیت‌ها پس از اتوکلاو، این موضوع را اثبات می‌نماید که مواد غیر پپتیدی (مثل توکسین‌ها) نیز در آنتاگونیسم شرکت داشته باشند.

نتایج به دست آمده در حالت خاک سترون و غیرسترون در شرایط کنترل شده نشان داد که توانایی آنتاگونیستی استرین‌های باکتریایی در شرایط خاک غیرسترون بر خلاف شرایط خاک سترون، حفظ نشد. تغییر شرایط محیطی و اثر آن روی قابلیت رقابت، دوام و پایداری آنتاگونیست می‌تواند یکی از دلایل مهم در کاهش توان آنتاگونیستی به شمار رود. بسیاری از ویژگی‌های باکتریایی در رقابت اکولوژیکی فراریشه دخیل‌اند و فقدان هریک می‌تواند توانایی باکتری را در استقرار یا انجام وظیفه‌اش در مجاورت یا سطح ریشه، کاهش دهد (۲۶).

مطالعات نشان داده استرین‌های باکتریایی فراریشه با مکانیسم‌های گوناگونی چون رقابت بر سر غذا و مکان، کلنیزاسیون ریشه ، تولید آنتی‌بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی در گیاه میزبان و تولید متابولیت‌های مشابه اکسین و سیتوکینین سبب

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

افزایش جذب آب و مواد غذایی و تحمل به تنش‌های محیطی و در نهایت، باعث افزایش رشد گیاه می‌گردد (۹، ۱۴ و ۲۶). در استرین‌های باکتریایی مورد بررسی این پژوهش، افزایش وزن خشک مشاهده شده در تیمار با این استرین‌ها نشان از دخالت تولید چنین متابولیت‌های در افزایش وزن خشک دارد.

به نظر می‌رسد مطالعه و بررسی بیواکولوژی و ویژگی‌های باکتریایی دخیل در قابلیت آنتاگونیستی این عوامل، برهمکنش‌های موجود در میان این عوامل با میزبان، بیمارگر و میکروفلور و هم‌چنین بستر خاک کمک شایانی در بیوکنترل نماید. استفاده از علم بیوتکنولوژی نیز در راستای اصلاح کاستی‌ها و بهبود توانایی‌های عوامل بیوکنترلی، جهت استفاده آنها در شرایط طبیعی و همچنین بررسی فرمولاسیون های مختلف سازگار با محیط، عوامل بیوکنترلی و میزبان می‌تواند چشم انداز روشنی از کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی در پیش روی قرار دهد.

منابع مورد استفاده

۱. اعتباریان، ح. ۱۳۷۵. بیماری پژمردگی فوزاریومی آوندی میخک در ورامین. بیماری‌های گیاهی ۳۲: ۲۲۳-۲۳۲

2. Abawi, G. S. and J. W. Lorbeer. 1972. Several aspects of the ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cepae*. Phytopathol. 62: 870-876.
3. Berg, G., C. Knaap, G. Ballin and D. Seidel. 1994. Biological control of *Verticillium dahliae* Kleb. by natural occurring rhizosphere bacteria. Arehol. Phytopathol. 29: 249-262.
4. Castric and Castric, P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 45(2): 701-702.
5. Demmink, J. F., R. P. Baayen and L. D. Sparnaaij. 1989. Evaluation of the virulence of race 1, 2 and 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in carnation. Euphytica 42: 55-63.
6. Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1993. The production of antifungal volatiles from Bacillus subtilis. Appl. Bacteriol. 74: 119-126.
7. Gould. W. D., C. Hagedron, T. R. Bardinelli and R. M. Zablaowicz. 1985. New selective media for enumaration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. Microbiol. 49: 28-32.
8. Hagedron, C., W. D. Gould and T. R. Bardinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55(11): 2743-2797.
9. Kilian, M. V., B. Steiner, H. Krebs, G. Junge, L. Schmiedeknecht and R. Hain. 2002. FzB24 *Bacillus subtilis*. Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenchuts Nachrichten Bayer (1): 72-79.
10. Kim, D. S., D. M. Weller and R. J. Cook. 1997. Population dynamics of Bacillus sp. L324-92 R_{12} and Pseudomonas fluorescens 2-70RN_{10} in the rhizosphere of wheat. Phytopathol. 87: 559- 567.
11. Kraus, J. and J. E. Loper. 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies PP.172-175. *In*: Keel, C. Koller, B. and G. Defago, (Eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacter. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlaken, Switzerland.
12. Leong, J. 1986. Siderophores, their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogen. Annu. Rev. Phytopathol. 24: 187-209.
13. Little, T. M. and F. J. Hills. 1978. Agricultural Experimentation Design and Analysis. John Willey and Sons, Inc. NewYork, USA.
14. Loper, J. E. and M. N. Schroth. 1986. Influence of bacterial sources of indole 3- acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathol. 76: 386-389.
15. Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas and G. Defago. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phytopathol. 82: 190-195.
16. Misaghi, I. J., T. J. Stowell, R.G. Grogan and L.C. Spearman. 1982. Fungistatic activity of water soluble fluorescent pseudomonads. Phytopathol. 72: 33-36.
17. Romanenko, V. M. and D. M. Alimov. 2000. Ability of representatives of *Pantoea agglomerans* as well as *Bacillus subtilis* and some species of *Pseudomonas* genus to inhibit growth of phytopathogenic bacteria and micromycetes and regulate the plant growth. Microbiologlchnii Zhurnal 62: 29-37.
18. Schaad, N. W.W., J. B. Jones and W. Chum. 2001. Labratory guide for identification of plany pathogenic bacteria. Third ed., Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul Minnesota. USA. 373 PP.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]

19. Scher, F. M. and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in a *Fusarium* suppressive soil. Phytopathol. 70: 412-417.
20. Schrieber, L. R., G. F. Gregry, C. R. Krause and J. M. Jchida. 1988. Production, partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolates from *Ulmus Americana*. Can. J. Bot. 60: 2338-2346.
21. Singh, V. and B. J. Deverall 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc. 83(3): 487-490.
22. Stack, R. W. 1992. *Fusarium*. PP. 94-97. *In*: Singleton, L. L., J. D. Mihail and Ruch (Eds.), Amer. Phytopathol. Soc. Press., St. Paul Minnesota, USA.
23. Stutz, E., G. Defago and H. Kern. 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. Phytopathol. 76: 181-185.
24. Tosi, l. and A. Zazzerini. 1994. Evaluation of some fungi and bacteria for potentioal control of safflower rust. J. Phytopathol. 142: 131-140.
25. Van Peer, R. and B. Schippers. 1992. Lipopolysaccharides of plant growth promoting *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r induced resistance in carnation to *Fusarium* wilt. Neth. J. Plant Pathol. 98: 129-39.
26. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 379-407.
27. Weller, D. M. and R. J. Cook. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*. Phytopathol. 73: 463-469.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.41.25.7]