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)

۲،۳و۴ - به ترتیب استاد و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۵

چکیده

کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای خاکزاد با استفاده از میکروارگانیسم های آنتاگونیست مورد توجه قرار گرفته اند. به خصوص جدایه های باکتری Burkholder *Burkholderia cepacia* 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 Kuehn *Rhizoctonia solani* 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 مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، 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

گیاه کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. از تیره شب بو (Brassicaceae) از مهم ترین گونه‌های تولیدکننده دانه روغنی در جهان می‌باشد. 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 solani* Kuehn می باشد (۲). این قارچ یکی از قارچ های پلی فاژ بیماریزای گیاهی است. داشتن دامنه میزبانی وسیع، قدرت بیماریزایی شدید تحت شرایط اقلیمی مساعد و هم چنین مقاومت بسیار زیاد اسکلروت 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 و۴). در سال های اخیر امکان کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی با استفاده از میکروارگانیسم های آنتاگونیست از قبیل

Archive of SID

www.SID.ir

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 علایم 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 می‌باشد و میزان آن در محیط کشت KB کمتر از PDA بود و از قارچ هایی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند می‌توان به *Macrophomina phaseolina* Tassi، *Pythium ultimum* Trow، *Sclerotium rolfsii* Sacc، *Fusarium oxysporum* Schlecht و *Rhizoctonia solani* Kuehn. اشاره نمود (۶). باکتری *B.cepacia* تولید ترکیبات پیرول نیترین، پیولوتئورین و التریسیدین می نماید که در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای برگی، خاکزی و همچنین بیماری های پس از برداشت مؤثرند (۱۱، ۱۲، ۱۳و ۱۴). این باکتری هم چنین تولید سیدروفور سپاباکتین[1] و پیوکلین[2] 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 بیماری های ریشه است (۲۹ و۳۰). 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 می‌باشد. 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 گیاهچه‌های آلوده

گیاهچه‌های 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 ضدعفونی 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 ۱۰۰میلی گرم در لیتر استفاده شد. بعد از ۲ روز تشتک ها به کمک استریومیکروسکوپ دو چشمی بررسی و قارچ هایی که خصوصیات عمومی

1- Cepabactin
2- Pyocholin

Archive of SID

www.SID.ir

ریزوکتونیا را نشان دادند به تشتک‌های 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 سانتی‌گراد (درون یخچال) نگهداری و هر ۲ ماه یکبار تجدید کشت شدند. برای شناسایی قارچ از کلیدهای (۲۴، ۲۶و۳۱) و روش (۳) استفاده شد. صفات مورد اندازه گیری عبارت بودند از ۱) تعیین قطر هیف ۲) اندازه‌گیری رشد شعاعی پرگنه قارچ ۳) بررسی خصوصیات مرفولوژیکی ۴) رنگ آمیزی هسته‌ها 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 سانتی‌گراد کشت گردید. سپس ۵ قطعه ۵ میلی‌متری از این محیط کشت حاوی قارچ در یک فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ گرم بذر ارزن اتوکلاو شده و مقدار ۲۰ میلی لیترآب مقطر سترون قرار داده شد. این فلاسک به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد 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).

درصد تلفات = تعداد گیاهچه سالم در تیمار شاهد غیر آلوده– تعداد گیاهچه سالم در تیمار / تعداد گیاهچه های سالم در تیمار شاهد غیر آلوده

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[1] (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 جدایه‌های باکتری شامل، واکنش گرم، احیای نیترات، لهانیدن سیب زمینی، آرجی 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 بازداری از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری

برای بررسی قدرت بازداری 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 سانتی‌متر 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

1- Hagedron *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

تیمار سه تکرار بکار رفت. تشتک های پتری بمدت ۲ تا ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد 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 ۵٪ مقایسه شد.

نگهداری باکتری ها

برای نگهداری طولانی مدت از روش (۳۲) استفاده گردید. چند لوپ از کشت جوان جدایه *B. cepacia* رشد یافته روی محیط NA به درون لوله های 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 منیزیوم و تجدید کشت متناوب نیز استفاده گردید.

بررسی تولید متابولیت های باکتریایی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

تولید آنتی بیوتیک

این آزمون بر اساس روش (۲۱) انجام گرفت. با استفاده از پی پت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه های باکتری و آب مقطر سترون (شاهد) به محیط PDA اضافه و پخش شد و بمدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از این مدت با استفاده از میله شیشه ای و آب مقطر سترون، پرگنه باکتری ها از سطح محیط کشت شسته شد. آنگاه پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (به صورت وارونه) قرارداده شد. پس از ۳۰ دقیقه تقریباً تمام باکتری ها از بین رفتند. سپس یک حلقه به قطر ۰/۵ سانتی متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ با رعایت شرایط سترون در وسط هر تشتک پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. تشتک های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد و پس از ۷-۳ روز اندازه گیری قطر پرگنه قارچ انجام گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی بود و هر تیمار در سه تکرار انجام شد و داده های 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 جدایه های باکتری توسط میله شیشه ای برسطح محیط های کشت PDA و NGA پخش شد و تشتک های پتری به مدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شد. در مرحله دوم، حلقه هایی به قطر ۰/۵ سانتی متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ در مرکز تشتک پتری حاوی PDA کشت گردید. سپس در کنار شعله با رعایت شرایط سترون تشتک های پتری حاوی قارچ به طور وارونه روی تشتک های پتری حاوی باکتری های انتاگونیست قرار داده شد و توسط نوار پارا فیلم کاملا مسدود گردیدند. ظروف کشت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷-۳ روز نگهداری شدند. در تشتک پتری شاهد فقط حلقه ای از محیط PDA حاوی قارچ در مقابل تشتک های پتری حاوی PDA و NGA بدون باکتری قرارداده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی بود و هر تیمار در سه تکرار انجام گرفت و داده های 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.

Archive of SID

www.SID.ir

تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور از روش (۳۰) استفاده شد. در این روش از محیط CAS[1] استفاده گردید. در صورتی که باکتری تولید سیدروفور کند، باعث تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی می‌شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS می‌باشد. 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[2] شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی[3] 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 پتری۱۰۰ 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 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 بذرکلزا 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 ۳±۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. اولین شمارش بذرهای 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 میلی‌لیتر 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)[4] در میلی‌لیتر غوطه ور شدند. تهیه مایه تلقیح باکتری مطابق روش (۷) انجام شد

1- Chrome Azurol S
2- Skim Milk Agar
3 - Blood Agar Base
4- Colony forming unit

Archive of SID

www.SID.ir

و دو نحوه تیمار بذر و تیمار خاک با مایه تلقیح مقایسه شدند. از قارچکش بنومیل مطابق روش (۱۵) در آزمایش های گلخانه‌ای جهت مقایسه با اثر باکتری های آنتاگونیست استفاده شد. در هر گلدان ۴ عدد بذر کاشته شد. از گلدان هایی به قطر ۱۳ سانتی‌متر 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 ریشه‌های آنها توزین گردید. ریشه‌ها به قطعات کوچک تر بریده شد و درون ۱۰۰ میلی‌لیتر 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 $۶/۵ \times ۱۰^{۶}$ بود.

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

این آزمایش به دو روش آغشته‌سازی 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 نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 ضدعفونی سطحی شده بود استفاده گردید. در روش آغشته‌سازی خاک، خاک گلدان ها با ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جدایه باکتری حاوی ۱×۱۰^{۹} سلول در هر گرم خاک و در روش آغشته سازی بذر از غلظت ۱×۱۰^{۹} سلول در میلی لیتر استفاده شد. با توجه به اینکه برای هر گرم خاک تعداد ۱×۱۰^{۹} واحد تشکیل دهنده پرگنه استفاده می‌شود 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 آغشته‌سازی خاک غیر سترون آلوده به قارچ *R.solani* با باکتری آنتاگونیست انجام گرفت. در روش آغشته‌سازی 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 ۱×۱۰^{۹} 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 غیرآلوده حاوی ۲ گرم ارزن فاقد مایه تلقیح قارچ در هر گلدان، آغشته‌سازی خاک گلدان ها با قارچکش بنومیل + ۲ گرم مایه تلقیح قارچ و آغشته‌سازی

Archive of SID

www.SID.ir

خاک گلدان ها با سوسپانسیون جدایه Bu1 حاوی ۱×۱۰^{۹} 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، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره تغییر می‌یابد. اسکلروت‌ها 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 میلیمتر است. انشعابات هیف‌ها 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 جدایه‌های مختلف با هم متفاوت بود و بطورکلی ۳ تا ۲۵ میکرومتر بود. طول سلول های هیف به اندازه ۲۵ تا۲۹۰ میکرومتر است. سلول های مونیلیوئید به صورت زنجیره‌های ساده و یا منشعب تشکیل شده بود و رنگ آنها قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای است و اندازه آنها ۲۸-۱۲×۱۶-۹ میکرومتر است. تعداد هسته در سلول های هیف ۳ تا ۱۲ عدد می‌باشد. قطر هیف ها ۵/۸ تا ۹/۴ میکرومتر بوده و دمای بهینه برای این جدایه ۲۴تا۲۷ درجه سانتی‌گراد و میزان رشد شعاعی روزانه قارچ ۱۷ میلی‌متر است.

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

جدایه Bu1 قادر به رشد در PH ۵/۷ و ۶/۸ و نمک طعام ۱و۳ درصد می باشد. این جدایه گرم منفی و دارای رشد هوازی و پیگمان غیرفلورسنت و قادر به احیای نیترات می باشد. جدایه اکسیداز و آرجی‌نین‌دی هیدرولاز مثبت بود. از منابع کربن ال آرابینوز، دی گالاکتوز، تری هالوز، سوربیتول، ام اینوزیتول، ساکارز، بتاآلانین، آدونیتول استفاده نموده، ولی قادر به هیدرولیز نشاسته و ژلاتین نبود (جدول ۱). خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایهBu1 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 (جدول۲).

بررسی قدرت کلونیزاسیون ریشه‌های کلزا توسط باکتری آنتاگونیست

نتایج حاصل از شمارش کلنی باکتری های رشد یافته روی محیط کشت مربوط به ریشه‌های کلزا درون خاک آلوده پس از دو هفته نشان داد که جمعیت باکتری از $۶/۵ \times ۱۰^{۶}$ به $۲/۸\times۱۰^{۸}$ (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 (شکل۱).

Archive of SID

www.SID.ir

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

خصوصیات	خصوصیات جدایه Bu1	
آزمون گرم		–
تولید لوان	Levan formation	+
اکسیداز	Oxidase	+
احیای نیترات	Nitrate recluction	+
لهانیدن سیب زمینی[1]	Potato rot	+
آرجی 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]	پروتئاز[۲]	سیانید هیدروژن[۳]	بازدارندگی علیه قارچ[۴][۵][۶]
Bu1	۳۹/۲	۲۵/۹	۲۵/۳	+	+	+	۱۱

۱) ایجاد هاله نارنجی اطراف باکتری روی محیط CAS نشانه تولید سیدروفور می‌باشد.

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

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

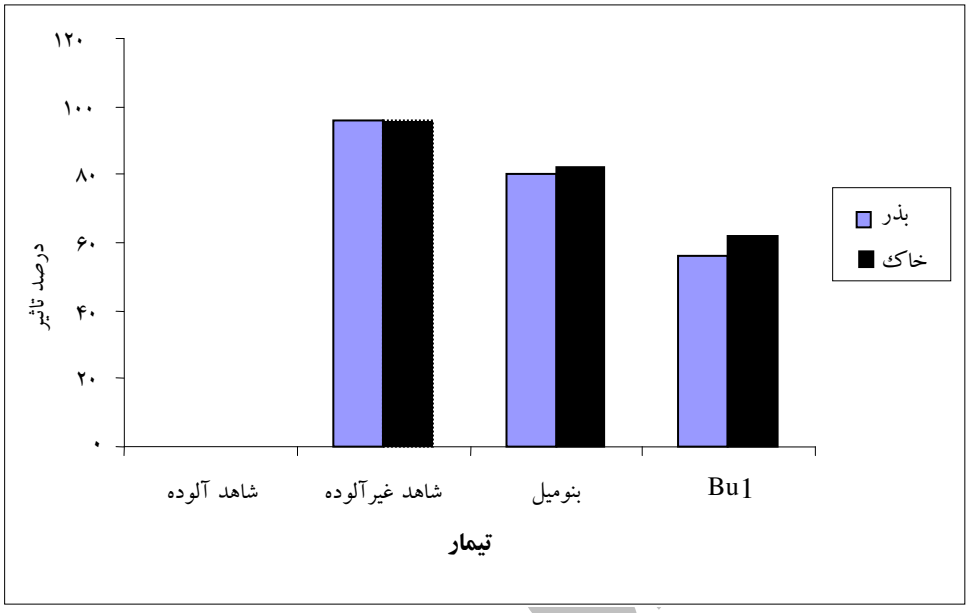
۴) فاصله بین میسلیوم قارچ و کلنی باکتری روی پتری بر حسب میلی‌متر

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

۶) هر عدد میانگین سه تکرار است.

Archive of SID

www.SID.ir



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

بررسی در شرایط خاک غیر سترون

همه تیمارها از نظر میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. آلوده نمودن خاک گلدان ها با قارچ (تیمار شاهد) موجب۹۶ درصد تلفات گیاهچه‌های کلزا گردید (جدول۳).

تأثیر جدایه آنتاگونیست بر فاکتورهای مختلف رشدی در شرایط عاری از عامل بیماری

این جدایه موجب افزایش رشد گیاه کلزا (افزایش وزن تر وخشک ریشه و اندام های هوایی) در مقایسه با شاهد در روش آغشته سازی خاک و روش آغشته سازی بذر گردید (جدول۴).

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

تیمار	میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم	درصد تلفات	درصد تأثیر تیمارها[۲]	گروهبندی تیمار(۵٪)[(۱)]
شاهد آلوده	۰/۰۴	۹۶	-	a
شاهد غیرآلوده	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.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٤- 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 [1] 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 می‌شود. در استرالیا و کانادا این قارچ باعث پوسیدگی هیپوکوتیل و مرگ گیاهچه شده است (۱۹). جدایه باکتری مورد آزمایش تاثیر 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 تاثیر 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 پیرول نیترین و فنازین باعث کنترل *R. solani* می شود. تولید آنتی‌بیوتیک یکی از مهم ترین مکانیسم های کنترل بیولوژیکی 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[1] (۲۰) بر اهمیت سیدروفورها به عنوان یکی از مکانیسم‌های 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 بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی نیز مؤثرند. در مورد تولید آنزیم پروتئاز، جدایه Bu1 تولید پروتئاز روی محیط کشت SAM کرد. تولید آنزیم پروتئاز از مکانیسم‌های مؤثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی توسط باکتری ها بشمار می‌رود (۱۸). یکی از اثرات قابل توجه باکتری های آنتاگونیست، تأثیر آنها روی افزایش رشد گیاه می‌باشد. جدایه Bu1 مورد استفاده افزایش معنی داری در رشد ریشه ها و وزن تر اندام های هوایی کلزا داشت. باکتری های موجود در ناحیه

1- Klopper *et al.*

Archive of SID

www.SID.ir

ریزوسفر به طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم کننده های رشد گیاه و نیز به صورت غیر مستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آنها می شوند (۳۲). جدایه *B. cepacia* AMMP باعث افزایش محصول نخود در مزرعه شده است (۲۵). بر اساس نتایج محاسبه جمعیت اولیه باکتری ها روی بذور و تعیین جمعیت باکتری های روی ریشه پس از دو هفته در خاک آلوده می توان 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 قارچ های بیمارگر به شمار می رود (۱۸). کاهش بیماری بوته میری نخود فرنگی در اثر قارچ *Pythium ultimum* بوسیله *B. cepacia* با افزایش جمعیت باکتری روی ریشه گیاه همبستگی معنی داری داشت (۲۰). باکتری *B. cepacia* در کلونیزاسیون ریشه از دیگر باکتری های سودوموناس اثر بهتری داشت، یعنی دارای سرعت رشد بالا، تولید مواد ضد میکروبی، استفاده از طیف وسیعی از منابع کربنی و تولید آنزیم های خارج سلولی بود (۱۰). بررسی ها نشان داد که باکتری های آنتاگونیست به طور فعال در خاک های مزارع مناطق مختلف وجود داشته و احتمالاً عامل کاهش طبیعی برخی از بیماری های 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 بررسی های 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 می آید. هم چنین از آقایان دکتر رحیمیان، دکتر روحانی و دکتر افشاری آزاد و دکتر اعتباریان به خاطر رهنمودهای ارزنده شان صمیمانه قدردانی می شود.

منابع

۱. احمدزاده، م.، شریفی تهرانی، ع. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۶. جداسازی باکتری های 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 بیماری های گیاهی، ۱۷ص.

۳. زمانی، م. ر. ۱۳۶۸. تعیین گروه های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* Kuhn . پایان نامه فوق لیسانس دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، ۹۹ ص.

Archive of SID

www.SID.ir

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* inhibitation of selected soil-borne fungal pathogens, Deparrtment 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 spesific 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 Idetification 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 reprression 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 siolborne 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 poinsetta with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*.Plant disease,86:47-53.

14. Janisiewicz, W.J., Yourman, L., Redman, J., and Pears Machone, L. 1991. Postharvast 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.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Keel, C., Voisard C., Berling, C.H., Kahr, G., and Defago, G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobaco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnobiotic 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 Sweetngham, 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 plantgrowth-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 interational workshop on plant growh promoting rhizobacteria.Interlacen, 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 interaspecific 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 *Pseudomona 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. Netherland 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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 sidrophores.Annals of Biochemistry, 160:47-56.

31. Sweetngham, M.W. 1996. Integrated contol 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.

Archive of SID

www.SID.ir