مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۳۷، شماره ٤، سال ۱۳۸۵ (۷۱۷-۷۰۷)

بررسي امكان كنترل بيولوژيك بيماري سياهك پنهان معمولي گندم توسط برخي ازجدايه هاي سودوموناس

پژمان خدايگان*[۱]، حسن رضا اعتباريان[۲]، غلام خداكرميان[۳] و محمد ترابي[٤]
۱، دانشجوي سابق كارشناسي ارشد پرديس ابوريحان دانشگاه تهران و مربی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
۲، ۳، استاد و استاديار پرديس ابوريحان دانشگاه تهران ٤، استاد پژوهش موسسه اصلاح و تهيه نهال و بذر كرج
(تاريخ دريافت:۸۲/۹/۱۵ - تاريخ تصويب: ۸٤/۹/۲)

چكيده

چهارصد جدايه باكتري از خاك ناحيه ريزوسفر گندم جدا و بر اساس قدرت آنها در ممانعت از تندش تليوسپورهاي نژاد**L10** قارچ ***Tilletia laevis*** مورد ارزيابي قرار گرفتند. تعداد ۱۷ جدايه نماينده گروههاي مختلف آنتاگونيستي در آزمايشات گلخانه‌اي مورد استفاده قرار گرفت. در بررسيهاي آزمايشگاهي، قدرت آنتاگونيستي جدايه‌ها در محيط مايع و جامد، بر مبناي توليد مواد فرار گازي، آنتي بيوتيك، سيدروفور و توانائي رشد جدايه‌ها در حضور سم كاربوكسين - تيرام ارزيابي شد. جدايه‌هاي باكتريائي با روش‌هاي معمول باكتري شناسي تا حد گونه شناسائي شد و سپس آزمايشهاي گلخانه‌اي براي بررسي اثر باكتريهاي آنتاگونيست به همراه تيمار پودر شير كم چربي عليه بيماري سياهك پنهان معمولي گندم انجام شد. نتايج نشان داد كه متابوليتهاي مترشحه جدايه‌هاي ***Pseudomonas fluorescens*** **bio I B9,*P.fluorescens*** **bioIII D22, *P.putida*** ***P.fluorescens*** **bioV E2 , *bio*A E16 *P.fluorescens* bioV D23,** توانائي كاهش درصد جوانه‌زني تليوسپورها را داشتند. جدايه‌هاي ***P.fluorescens*** **bioIII D22** و***P.fluorescens*** **bio I B9** با توليد مواد فرار ممانعت كننده، از تندش تليوسپور جلوگيري كردند. در آزمايش توليد سيدروفور جدايه‌هاي ***P.putida*** **bioA E16** و ***P.fluorescens*** **bioV E2** با توليد سيدروفور، داراي خواص بازدارندگي از رشد بودند.در بررسيهاي گلخانه‌اي جدايه ***P .fluorescens*** **bioIII D22** داراي توان قابل ملاحظه‌اي در كاهش درصد آلودگي بوته‌هاي گندم بود. پودر شير در كليه تيمارها به عنوان بستري مناسب براي فعاليت جدايه‌هاي آنتاگونيست عمل نمود.

واژه‌هاي كليدي: مبارزه بيولوژيك، سياهك پنهان معمولي گندم، سودوموناس

مقدمه

بيماري سياهك پنهان معمولي گندم (Common Bunt) از جمله مهمترين بيماريهاي گندم مي‌باشد. اين بيماري باعث كاهش محصول و كيفيت دانه‌ها مي‌گردد ودانه‌هاي آلوده به اسپور قارچ عامل بيماري، بوي ماهي گنديده مي‌دهد و سياهرنگ مي‌شود، ارزش تجاري آنها كاهش يافته و بازارپسندي خود را از دست مي‌دهند. ميزان خسارت بيماري در شمال غربي امريكا پنج تا هفت درصد (١٤) و در غرب آسيا و شمال افريقا نيز پنج تا هفت درصد (۱۹) و در هندوستان ۱۵درصد گزارش شده است (۲۱). جهت كنترل اين بيماري از برخي سموم نظير كاربوكسين ـ تيرام و ارقام نسبتا مقاومي نظير P1 178383 استفاده مي‌گردد (۲۷). به علت مشكلات زيست محيطي ناشي از كاربرد سموم شيميائي و همچنين كمبود ارقام مقاوم و شكسته شدن مقاومت آنها، يكي از روشهاي كنترل اين بيماري،

* نويسنده مسئول: پژمان خدايگان تلفن: ۰۳۹۱ -۳۲۰۲۰۲۶ E-mail:Pkhodaygan@mail.vru.ac.ir

مبارزه بيولوژيك است. بورگن و دوانلو (۹) در آزمايشي جدايه MA342، از باكتري *Pseudomonas chlororaphis* را درغلظتي معادل 10^9 CFU/ml عليه جدايه *Tilletia tritici* مورد استفاده قرار دادند. نتايج نشان داد كه اين جدايه باعث كاهش ۹۶/۲درصدي بيماري گرديده است. محققاني ديگر در سال ۱۹۹۸ نتايج متشابهي به دست آوردند كه در آن استفاده از پودر شير كم چرب آلودگي سياهك را تا ۹۷درصد كاهش داده بود (۷). النعيمي و همكاران (۲۰۰۰) عنوان مي‌دارند كه پودر شير كم چربي و آرد گندم باعث افزايش تعداد و فعاليت ميكروارگانيسم‌هاي آنتاگونيست خاكزاد نظير جنسهاي *Bacillus*، *Pseudomonas*، مخمرها و بسياري از قارچ‌هاي جنس *Mucor* و *Rhizopus* ،شده و سبب بازدارندگي مستقيم از جوانه‌زني كلاميدوسپور *T. tritici* مي‌گردد. اينگونه به نظر مي‌رسد كه وجود اين منابع غني غذائي در اطراف ريشه سبب فعاليت شديدتر عوامل مفيد خاكزاد و ممانعت از تندش تليوسپورهاي عامل بيماري مي‌گردد. در بررسي ديگر مشخص شد كه *P.chlororaphis* MA342 مي‌تواند آلودگي توسط *T.laevis* را در شرايط گلخانه كاهش دهد (۱۵). اين تحقيق به منظور ارزيابي امكان كنترل بيولوژيك بيماري سياهك پنهان معمولي گندم توسط برخي عوامل آنتاگونيست باكتريائي صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهيه جدايه قارچ ***Tilletia laevis*** و تعيين درصد جوانه‌زني تليوسپورها

نژادL_{10} قارچ *Tilletia laevis* كه داراي بيماريزائي مناسب براي انجام آزمايشات بود (۱)، از واحد بيماري شناسي غلات، مؤسسه تحقيقات، اصلاح و تهيه نهال و بذر كرج دريافت شد. قارچ عامل بيماري براساس روش پيشنهادي ويلكوگسون و ساري (۲۷)، پس از ضد عفوني سطحي دانه هاي گندم آلوده بر روي محيط كشت آب-آگار(WA) و به منظور بررسي خصوصيات مرفولوژيك كشت شد. تشتك‌هاي پتري فوق براي رشد به انكوباتور و دماي ۲ ± ۱۵ درجه سانتي‌گراد منتقل گرديد و از روز اول تا نهم جهت بررسي درصد جوانه‌زني توسط ميكروسكوپ مورد مشاهده قرار گرفته و نتايج ثبت شد.

نمونه‌برداري از خاك مزارع گندم جهت جدا سازي جدايه هاي آنتاگونيست

براي اين منظور در طول سالهاي ۱۳۷۹ و ۱۳۸۰ (در فصل تابستان و پائيز) نمونه‌هايي از مزارع گندم استان تهران، مازندران، گلستان، قم و مركزي جمع‌آوري گرديد. خاك ريزوسفر به وسيله يك برس به دقت از سطح ريشه جدا گرديده و نمونه خاك‌هاي جمع‌آوري شده از هر مزرعه با يكديگر كاملاً مخلوط شد. براساس روش شاد و همكاران (۲۰۰۱)يك گرم از هر نمونه خاك به دقت توزين شده و به وسيله آب مقطر سترون حجم آن به ۱۰ ميلي‌ليتر رسانيده شد و سپس به وسيله روش سري رقتها (Serial dilution)، رقتهاي مختلف سوسپانسيون خاك تهيه گرديد.اين رقتها به مدت ۲۰ دقيقه جهت تهيه يك سوسپانسيون يكنواخت و آزاد شدن باكتريها از كلوئيدهاي خاك، برروي شيكر (۱۰۰دور در دقيقه) قرار گرفت و سپس به وسيله يك پيپت سترون يك ميلي‌ليتر از رقت‌هاي 10^{-3} ، 10^{-4} و 10^{-5} بر روي محيط كينگز ـ ب (King's B) افزوده و به وسيله لوپ سترون در سطح محيط كشت پخش گرديد.

بررسي اثر آنتاگونيستي باكتري هاي جدا شده روي جوانه‌زني قارچ***Tilletia laevis***

براي‌تعيين قدرت آنتاگونيستي ٤۰۰ جدايه‌هاي خالص‌سازي شده، مطابق روش ولر و همكاران (۱۹۸۵) تست چهار نقطه‌اي صورت پذيرفت. محيط كشت سيب زميني – دكستروز – آگار (PDA) تهيه و تليوسپورهاي سياهك برروي محيط كشت فوق به صورت كاملاً يكنواخت، پخش گرديد، هر تشتك پتري به وسيله يك تيغ سترون به چهار قسمت مساوي تقسيم و در حاشيه سه قسمت آن، يك جدايه باكتري كشت گرديد. قسمت چهارم به عنوان شاهد در هر تشتك پتري در نظر گرفته شد. بعد از كشت و ثبت مشخصات براي هر چهارصد جدايه، تشتك‌هاي فوق در شرايط مناسب(دماي۲ ± ۱۵ درجه سانتي‌گراد) به مدت يك هفته نگهداري گرديدند. بررسي ميزان جوانه‌زني تليوسپورها در اطراف هر پرگنه باكتري صورت

پذيرفت. به اين صورت كه، در روز هفتم به وسيله ميكروسكوپ و با بزرگنمائي ٤٠٠، تعداد ١٢٠ تليوسپور شمارش و درصد جوانه‌زني آنها محاسبه گرديد.

شناسايي جدايه‌هاي آنتاگونيست

شناسائي جدايه‌هاي آنتاگونيست با انجام آزمايشات معمول باكتري بر اساس روش شاد و همكاران (٢٠٠١) و با تهيه الگوي پروتئيني بر اساس روش ناپيوسته لاملي (١٩٧٠) و مقايسه آن با جدايه هاي مرجع صورت پذيرفت (٢) .

بررسي توليد تركيبات بازدارنده خارج سلولي توسط جدايه‌هاي مختلف آنتاگونيست به روش كراس ولوپر

براي بررسي توليد تركيبات بازدارنده خارج سلولي از روش كراس ولوپر (١٩٩٠) استفاده شد. بدين ترتيب كه تشتكهاي حاوي محيط كشت PDA تهيه و چند لوپ از هريك از جدايه‌ها به صورت كاملاً يكنواخت بر سطح محيط فوق كشت داده شد و به مدت سه روز در دماي ٢٥ درجه سانتي‌گراد نگهداري گرديد. پس از سه روز، به كمك گوش پاك‌كن و آب مقطر سترون، پرگنه باكتري از سطح محيط شسته و يك قطعه پنبه آغشته به كلروفورم، درون درب تشتك قرار داده شد و تشتك وارونه گرديد. پس از گذشت ٢٠ دقيقه و اطمينان از كشته شدن باكتري‌هاي فوق، درب پتري در شرايط سترون حدود پنج دقيقه به حالت نيمه باز قرار داده شد و براي اطمينان از عدم وجود بقاياي كلروفورم درب پتري‌هاي آلوده برداشته و با دربهاي تميز سترون جايگزين شد. بر روي هر كدام از تشتكها سوسپانسيوني از تليوسپورهاي قارچ عامل سياهك كشت گرديده و براي مدت يك هفته در دماي ١٥ درجه سانتي گراد نگهداري و سپس از نظر ميزان جوانه زني تليوسپورها مورد بررسي قرار گرفت. شاهد در اين آزمايش، تشتك پتري فاقد باكتري بودكه كليه مراحل، مشابه ساير تيمارها بر روي آن صورت پذيرفت.

تأثير غلظتهاي مختلف ترشحات مايع خارج سلولي اتوكلاو شده بر جوانه زني تليوسپورها

براي بررسي تاثير دماي اتوكلاو بر ترشحات مايع خارج سلولي باكتريها از روش پيشنهادي سينگ و دورال (١٩٨٤) استفاده شد. ابتدا محيط كشت عصاره سيب زميني- دكستروز، فاقد آگار (PDB) تهيه گرديده و پنج ميلي‌ليتر از آن درون لوله‌هاي دريوش‌دار ريخته و اتوكلاو گرديد. پس از اينكار يك لوپ از كشت ٢٤ ساعته هر جدايه به لوله‌ها اضافه و با ثبت مشخصات به مدت چهار روز در دماي اتاق (٣ ± ٢٤ درجه سانتي‌گراد) بر روي شيكر (١٠٠ دور در دقيقه) قرار گرفت. اين لوله‌ها سپس درون سانتريفوژ به مدت ٢٠ دقيقه (در ٥٠٠٠ دور در دقيقه) قرار گرفت. سه ميلي‌ليتر از عصاره رويي، به وسيله ميكروپيپت برداشته و به يك لوله سترون ديگر منتقل گرديد. اين لوله‌ها به مدت ٢٠ دقيقه در دماي ١٢١ درجه سانتي‌گراد و فشار يك اتمسفر اتوكلاو گرديد. براي بررسي تأثير عصاره‌هاي حاصل، ابتدا محيط كشت آب-آگار (WA) تهيه و از آن حجمهاي ١٩، ١٧ و ١٥ ميلي‌ليتر درون لوله‌هاي درپيچ‌دار ريخته و اتوكلاو گرديد. بعد از سترون شدن و در مرحله انجماد (دماي حدود ٣٠ درجه سانتي‌گراد) نسبت‌هاي يك (غلظت ٥% حجم به حجم)، سه (غلظت ١٥% حجم به حجم) و پنج (غلظت ٢٥% حجم به حجم) هريك از عصاره‌ها به لوله‌هاي حاوي محيط WA اضافه و توسط حركت دست با محيط فوق مخلوط گرديدند و به اين ترتيب بعد از انتقال محيط جديد به تشتك‌هاي پتري و ثبت مشخصات مربوط به غلظت هر عصاره در پشت تشتك، تليوسپورهاي قارچ بر روي محيط فوق كشت داده و در دماي ١٥ درجه سانتي‌گراد براي يك هفته نگهداري شد. ثبت نتايج در روز هفتم انجام گرفت. براي شاهد از محيط كشت فاقد باكتري با در نظر گرفتن كليه شرايط استفاده شد.

بررسي تركيبات فرار ضدقارچي

بررسي تركيبات فرار ضدقارچي مطابق روش فيدامن و روزال (١٩٩٤) صورت پذيرفت. ابتدا محيط كشت PDA و WA تهيه و اتوكلاو گرديده و مقدار ٢٠ ميلي‌ليتر از هريك به تشتك‌هاي پتري منتقل شد. برروي محيط WA، دو ميلي‌ليتر از سوسپانسيون تليوسپور قارچ و برروي محيط PDA نيز، جدايه‌هاي هر باكتري به صورت يكنواخت كشت گرديد. تحت شرايط سترون درب تشتك‌هاي پتري برداشته و در كنار شعله، تشتك حاوي باكتري بر روي تشتك حاوي قارچ قرار داده شد و لبه‌هاي آنها به وسيله نوار پارافيلم كاملاً مسدود گرديد تا ارتباط هوايي آن با محيط خارج قطع گردد. از تشتك فاقد باكتري به عنوان شاهد استفاده شد.تشتك‌هاي فوق سپس براي مدت يك

هفته در دماي ۲ ± ۱۵ درجه سانتي گراد نگهداري و بعد از گذشت زمان مذكور مورد بررسي قرار گرفت.

تأثيرغلظتهاي مختلف قارچكش كاربوكسين – تيرام برروي جدايه‌هاي آنتاگونيست

بررسي تأثير قارچكش كاربوكسين – تيرام برروي جدايه‌هاي آنتاگونيست مطابق روش دينگرا و سينكلر (۱۹۹۵) صورت گرفت. در ابتدا غلظتهاي ۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰ ،۲۵۰ و۱۰۰۰ پي‌پي‌ام از قارچكش مذكور در آب مقطر سترون تهيه گرديد. محيط كشت آگار غذائي (NA) نيز تهيه و اتوكلاو گرديد. بعد از اتوكلاو، ۲۰ ميلي‌ليتر از محيط فوق در دمايي حدود ۳۵ درجه سانتي‌گراد به تشتك‌هاي پتري سترون منتقل گرديد و دو ميلي‌ليتر از سوسپانسيون مكدر هر باكتري به آن اضافه شد. سپس با حركات دست و لغزاندن تشتك، اين سوسپانسيون كاملاً با محيط فوق مخلوط شد. پس از سرد شدن كامل، شش عدد ديسك كاغذي از جنس كاغذ صافي و به قطر ۱۵ ميلي‌متر كه قبلاً در آون سترون گرديده بود، به وسيله يك پنس ضدعفوني شده برروي محيط مذكور قرار گرفت. ديسك‌هاي كاغذي با فاصله‌اي مساوي در حاشيه تشتك و يك ديسك در وسط آن قرارگرفته و به وسيله لبه پنس قدري در محيط فشرده شد.سپس با استفاده از سرنگ سترون به هر ديسك يك غلظت از سم موردنظر اضافه گرديده و به ديسك مركزي نيز آب مقطر سترون اضافه شد. اين كار تا مرز اشباع شدن آنها صورت پذيرفت. تشتكهاي فوق در دماي ۳ ± ۲۵ درجه سانتي‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداري گرديد. ديسك مركزي هر تشتك نيز كه تنها با آب مقطر سترون تيمار شده بود به عنوان شاهد درنظر گرفته شد.

بررسي توليد سيدروفور

بررسي توليد سيدروفور براساس روش ولر وكوك (۱۹۸۳) انجام شد.محيط كشت King’s B حاوي غلظتهاي صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ٤۰۰ ميكرومول كلريد آهن سه ظرفيتي تهيه شد. هر يك از باكتريها نيز بر روي محيطهاي حاوي آهن كشت و در دماي ۳ ± ۲۵ درجه سانتي‌گراد به مدت ٤۸ ساعت نگهداري شد. سوسپانسيوني از اسپور قارچ *Geotrichum candidum* در محيطPDA، تهيه و به وسيله يك سرنگ سترون بر روي تشتك‌هاي حاوي باكتري پاشيده شد. رشد و يا عدم رشد قارچ مذكور بعد از ۲٤ ساعت نگهداري در دماي ۲٤ درجه سانتي‌گراد بررسي گرديد.

بررسي‌هاي گلخانه‌اي

گندم فلات به عنوان رقم نيمه بهاره حساس به بيماري سياهك پنهان معمولي گندم انتخاب گرديد. بررسي در قالب آزمايش فاكتوريل با طرح پايه كاملاً تصادفي و با پنج تكرار صورت پذيرفت. جدايه‌هاي آنتاگونيست در قالب۳٦ تيمار مورد استفاده قرار گرفتند. شاهد در اين آزمايش بذرهاي گندم بود كه با تليوسپورهاي قارچ آغشته گرديده بود. هريك از جدايه‌هاي باكتري، بر روي چهار عدد تشتك پتري حاوي محيط NA به صورت يكنواخت كشت داده شد. باكتري‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دماي۳ ± ۲۵ درجه سانتي‌گراد نگهداري شده و جهت تيمار بذر با قارچ بيماريزا از روش بورگن و دوانلو (۲۰۰۰) استفاده گرديد. براي تيمار بذر با باكتريهاي آنتاگونيست ابتدا چند ميلي‌ليتر آب مقطر به هر تشتك حاوي باكتري اضافه و سلولهاي باكتري در آب سوسپانسيون و در ٤۵۰۰ دور در دقيقه، به مدت ۱۰ دقيقه رسوب داده شد. پس از رسوب كردن باكتريها مايع روئي دور ريخته شده و مجددا با آب مقطر استريل سوسپانسيوني ديگر از باكتريها تهيه گرديد. سوسپانسيون مذكور درون درب تشتك‌ها با بذور مخلوط شد. براي تيمارهاي پودر شير (Skimmed milk - ساخت شركت مرك آلمان) نيز از نسبت ۸۰ گرم به ازاي هر كيلوگرم بذر استفاده شد (۹). در اين تيمار ميزان مورد نظر از پودر شير، به وسيله ترازو به دقت توزين شده و به سوسپانسيون باكتري و بذر اضافه شد. كليه مراحل مذكور در شرايط سترون انجام گرفته و بعد از انجام مراحل فوق بذرها به مدت يك ساعت كاملاً هوادهي و خشك گرديد. كشت در گلخانه تحقيقاتي مؤسسه اصلاح بذر و تهيه نهال كرج كه مجهز به دستگاه‌هاي تنظيم دما و نور بود صورت گرفت و نتايج پس از ۹۰ روز ثبت گرديد. دماي گلخانه از زمان كشت تا پنجه زني بوته‌ها ۱٤ درجه سانتي‌گراد و بعد از آن ۲۲ درجه سانتي‌گراد بود و گياهان در طول روز در معرض ۱۸ ساعت روشنائي قرار داشتند. بعد از به سنبله رفتن و رسيدن كامل گندم‌ها (مرحله سفت شدن دانه) كليه سنبله‌هاي هر

تكرار شمارش و تعداد سنبله‌هاي آلوده به سياهك مشخص و درصد سنبله‌هاي آلوده هر تكرار تعيين گرديد.

محاسبات آماري

به منظور تجزيه و تحليل آماري اعداد براي پارامترهاي مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحني توزيع يكنواختي واريانس، از نرم‌افـزار MSTATC (MSTATC software Version, 2.1) استفاده گرديد. براي مقايسه ميانگين‌ها از آزمون چند دامنه دانكن در سطوح يك درصد استفاده شد. به دليل نرمال نبودن داده‌هاي به دست آمـده از آزمايـشات، تبديل داده با استفاده از فرمول $y = A\sin\sqrt{x}$ (x درصد تندش تليوسپورهاي قارچ ودر آزمايش گلخانه‌اي درصد آلودگي سنبله‌ها مي باشد) انجام گرفت (۳).

نتايج

شناسائي جدايه ها

با توجه به آزمايشات انجام شده و همانگونه كه در مطالب قبلي ذكر گرديده است جدايه‌ها به گونه*fluorescens Pseudomonas* تعلق داشته و بيووار آنها نيز تعيين گرديد. لازم به ذكر است كه شناسائي تنها براي جدايه‌هائي صورت پذيرفت كه توان آنتاگونيستي مطلوبي از خود نشان دادند. ساير جدايه‌ها تنها در سطح جنس شناسائي شده و در جداول به صورت *Pseudomonas*. sp و با كدهاي جداگانه نشان داده شده‌اند (۲).

بررسي توليد تركيبات بازدارنده خارج سلولي توسط جدايه‌هاي مختلف آنتاگونيست به روش كراس ولوپر

پس از مقايسه ميانگين داده‌ها، معين گرديد كه جدايه *Pseudomonas fluoresence* bioI B9 داراي بيشترين اثر در كاهش درصد جوانه زني تليوسپورهاي سياهك مي‌باشد و جدايه‌هاي *Pseudomonas*.sp D4 ، *P.fluorescenc* bioV C 15 و*Pseudomonas*.sp D11 نيز تفاوت معني‌داري با شاهد نداشته و فاقد قدرت در كاهش درصد جوانه‌زني تليوسپورها بودند (جدول-۱).

بررسي تركيبات فرار ضدقارچي

بر اساس مقايسه ميانگين داده‌ها معين گرديد كه جدايه *Pseudomonas fluorescens* bioI B9 داراي بيشترين اختلاف معني‌دار با شاهد بوده و قوي‌تر از ساير‌ين مي‌باشند و جدايه*Pseudomonas*.sp B29 ضعيف‌ترين آنها محسوب مي‌گردد (جدول-۱).

تأثير غلظتهاي مختلف ترشحات مايع خارج سلولي اتوكلاو شده

با توجه به جدول مقايسه ميانگين مي‌توان ابراز داشت كه در غلظت پنج درصد جدايه *Pseudomonas fluorescens* bioIII C21، بيشترين و جدايه‌هائي نظير، *Pseudomonas*.sp.D7، *Pseudomonas*.sp B29،كمترين، در غلظت ۱۵ درصد جدايه‌هاي *Pseudomonas fluorescens* bioIII D22و*Pseudomonas.putida* bio AE16 ،بيشترين و جدايه*Pseudomonas*.sp.D7، كمترين اثر را دركاهش درصد جوانه‌زني تليوسپورها از خود نشان داد.در ارتباط با غلظت ۲۵ درصد جدايه *P.fluorescens* bioIII D22 از قويترين‌ها و جدايه*Pseudomonas*.sp F13 ضعيف‌ترين آنها بود (جدول۲).

تأثيرغلظتهاي مختلف قارچكش كاربوكسين – تيرام برروي جدايه‌هاي آنتاگونيست

در آزمايش مذكور رشد يا عدم رشد هر جدايه با علامت مثبت و منفي نمايش داده شده است. اين آزمون جهت پي بردن به امكان تلفيق جدايه‌هاي آنتاگونيست مناسب با اين سم كه در كنترل سياهك پنهان معمولي گندم كاربرد دارد، انجام گرفت. نتايج حاصل نشان داد كه جدايه‌هاي برتر آنتاگونيست قادر به رشد درهيچ غلظتي از سم مورد استفاده نمي‌باشند و بنابراين امكان كاربرد تلفيقي آنها با سم مذكور وجود ندارد (جدول ـ۳).

بررسي توليد سيدروفور

نتايج به دست آمده نشان مي‌دهد كه قارچ *candidum Geotrichum* در برخي از تشتكهاي حاوي باكتري، كه به آن مقدار ٤٠٠ ميكرومول آهن اضافه شده بود، جوانه زد. همچنين در هيچيك از تشتكهائي كه فاقد آهن بودند جوانه زني مشاهده نگرديد. نتايج تاثير ساير غلظتهاي آهن در جدول درج شده است. علامت مثبت در جدول به معناي جوانه‌زني قارچ *Geotrichum candidum* و علامت منفي به معناي عدم جوانه‌زني آن مي‌باشد (جدول-٤).

جدول ۱- اثر بازدارندگي ترشحات مايع خارج سلولي و تركيبات فرار جدايه هاي مختلف *Pseudomonas* بر جوانه‌زني تليوسپورهاي *T.laevis* عامل سياهك پنهان گندم

جدايه	درصدجلوگيري از جوانه زني تليوسپورها ،(ترشحات مايع خارج سلولي جدايه هاي آنتاگونيست)	درصدجلوگيري از جوانه زني تليوسپورها، (تركيبات فرار جدايه هاي آنتاگونيست)
شاهد	۰a	۰a
Pseudomonas.sp D4	۰a	۸۲i
P.fluorescens bioIII C15	۰a	۳۵c
Pseudomonas.sp D11	۰a	۳۵/۷۵c
Pseudomonas.sp D7	٤۱b	۷٤/۵۰h
Pseudomonas.sp E10	٤۳/۲۵b	۵۸/۷۵g
Pseudomonas.sp F13	٤۵bc	۵٦f
Pseudomonas.sp B14	٤۵/۲۵bc	۳۵c
Pseudomonas.sp F25	٤٦bc	۳۳/۵۰bc
P.fluorescens bioIII F8	٤٦/۲۵cd	٤٦de
Pseudomonas.sp B29	۵۲/۲۵d	۲۷/۵۰b
P.fluorescens bioIII C21	۷۰/۵۰e	۳۸/۲۵d
P.fluorescens bioV D23	۷۳/۲۵ef	۵۰/۷۵ef
P.fluorescens bioV E2	۷٤ef	۵٤/۷۵ef
P.putida bioA E16	۷۵/۲۵f	۳۵c
P.fluorescens bioIII D22	۷٦f	۸۸/۵۰j
P.fluorescens bioIII E6	۷٦/۷۵f	٦۰/۷۵h
P.fluorescens bioI B9	۸۱/۷۵g	۸۵ij

اعداد درج شده در جدول ميانگين چهار تكرار هستند و اعداديكه در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون چند دامنه‌اي دانكن ($p<۰/۰۱$) با يكديگر تفاوت معني دار دارند.اعداد ستون دوم از سمت راست جدول در مقايسه با شاهد كه درصد جوانه زني آن ٦۹/۲۵ بوده است سنجيده شده اند. اعداد ستون سوم از سمت راست جدول در مقايسه با شاهد كه درصد جوانه زني آن ۷٤/۷۵ بوده است سنجيده شده اند.

جدول ۲- اثر غلظتهاي مختلف ترشحات مايع خارج سلولي اتوكلاو شده جدايه هاي *Pseudomonas* بر جوانه زني تليوسپورهاي *T.laevis* عامل سياهك پنهان گندم

جدايه	درصد جلوگيري از جوانه زني تليوسپورها (ترشحات مايع خارج سلولي اتوكلاو شده آنتاگونيستها)		
	غلظت ۵ درصد	غلظت ۱۵ درصد	غلظت ۲۵ درصد
شاهد	۰a	a۰	۰a
Pseudomonas.spF13	۰a	۳٤/۵۰b	۰a
Pseudomonas.spB29	۰a	۳۵/۵۰bc	۰a
Pseudomonas.spD11	۰a	۳٤/۲۵b	۰a
P.fluorescens bioIII-C15	۳۳/۲۵b	۳۷/۵۰bcd	۳۳/۵۰cd
Pseudomonas.spB14	۳٤bc	۳۵/۲۵bc	۰a
Pseudomonas.spD7	۳٤/۲۵bc	۳۳/۷۵b	۰a
P.putidas bioA E16	۳۹cd	٤۹g	۰a
P.fluorescens bioIII-E6	٤۰cde	٤۳e	۳۰/۵۰bc
Pseudomonas.spD4	٤۱def	۳۳/۷۵b	۰a
P.fluorescens bioV-D23	٤۳/۵۰defg	٤۲de	۳۱/۷۵bcd
P.fluorescens bioIII-F8	۳۸/۷۵efg	٤۷/۲۵cde	۰a
P.fluorescens bioV-E2	٤٦/۷۵fg	٤٤ef	۰a
Pseudomonas.spF25	٤۷/۲۵fg	۳٤/۲۵b	۲۸/۲۵bc
Pseudomonas.spE10	٤۸/۲۵gh	۳۵/۵۰bc	۰a
P.fluorescens bioI-B9	۵۰ghi	۳۷/۲۵bcd	۰a
P.fluorescens bioIII-C21	۵٤/۲۵hi	٤۰cde	۳۷/۲۵d
P.fluorescens bioIII-D22	۵٦/۵۰i	٤۸/۲۵fg	۲۸/۵۰bc

اعداد درج شده در جدول ميانگين چهار تكرار هستند.اعداديكه در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون چند دامنه اي دانكن (۰۱/ p<۰) با يكديگر تفاوت معني داردارند. اعداد ستون دوم ازسمت راست در مقايسه با شاهد كه درصد جوانه زني در آن ۷۲/۷۵ بوده است سنجيده شده اند.اعداد ستون سوم از سمت راست در مقايسه با شاهد كه درصد جوانه زني در آن ۷۷ بوده است سنجيده شده اند.اعداد ستون چهارم از سمت راست در مقايسه با شاهد كه درصد جوانه زني در آن ۷٦/۲۵ بوده است سنجيده شده اند.

جدول ۳-اثر غلظتهاي مختلف سم كاربوكسين – تيرام بر رشد (+) يا عدم رشد (-) جدايه هاي *Pseudomonas*

جدايه	۲۵ppm	۵۰ ppm	۱۰۰ ppm	۲۵۰ppm	۱۰۰۰ppm
P.fluorescens bioV.E2	-	-	-	-	-
Pseudomonas.sp D4	+	+	-	-	-
P.fluorescens bioIII C21	+	+	-	-	-
P.fluorescens bioIII E6	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spD7	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioIII F8	+	+	+	+	+
P.fluorescens bioI B9	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spE10	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spD11	+	-	-	-	-
Pseudomonas.spF13	+	+	+	+	+
Pseudomonas.spB14	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioIII C15	-	-	-	-	-
P.putida bioA E16	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioIII D22	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioV D23	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spF25	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spB29	-	-	-	-	-

جدول ٤- اثر سيدروفور توليد شده توسط جدايه هاي *Pseudomonas* در غلظتهاي مختلف آهن ، بر رشد(+) يا عدم رشد(-) قارچ *Geotichum candidum*

جدايه	غلظت آهن اضافه شده به محيط كشت (ميكرومول)					
	٠	٢٥	٥٠	١٠٠	٢٠٠	٤٠٠
P.fluorescens bioV E2	-	-	+	+	+	+
Pseudomonas.spD4	-	-	+	+	+	+
P.fluorescens bioIII E6	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spD7	-	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioIII F8	-	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioI B9	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spE10	-	-	+	+	+	+
Pseudomonas.sp D11	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas.spF13	-	-	+	+	+	+
Pseudomonas.spB14	-	-	+	+	+	+
P.fluorescens bioIII C15	-	-	-	-	-	-
P.puyida bioA-E16	-	-	+	+	+	+
P.fluorescens bioIII C21	-	-	+	+	+	+
P.fluorescens bioIII D22	-	-	-	-	-	-
P.fluorescens bioV D23	-	-	-	+	+	+
Pseudomonas.spF25	-	-	+	+	+	+
Pseudomonas.spB29	-	-	+	+	+	+

جدول٥- اثر جدايه هاي *Pseudomonas* بر كاهش ميزان آلودگي سنبله هاي گندم بوسيله قارچ *T.laevis* عامل سياهك پنهان گندم

كد جدايه	ميانگين درصد خوشه هاي آلوده نشده بر اثرفعاليت آنتاگونيست	كد جدايه	ميانگين درصد خوشه هاي آلوده نشده بر اثرفعاليت آنتاگونيست
شاهد(بذر+تليوسپور)	٠a	*P*.E6	١٨/٥٠def
P.B29	٠a	*P*.E10+پودر شير	١٨/٥٠efg
P.E2	١٧/٢٥abc	*P*.E2+پودر شير	١٨/٧٥fgh
شاهد+پودر شير	١٧/٢٥abc	*P*.F13+پودر شير	١٨/٧٥fghi
P.E10	٠a	*P*.C4+پودر شير	١٨/٧٥fghi
P.D7	٠a	*P*.B29+پودر شير	١٨/٧٥fghi
P.D23	٠a	*P*.D7+پودر شير	١٩fghij
P.C4	٠a	*P*.B14+پودر شير	١٩fghij
P.F13	٠a	*P*.F8+پودر شير	١٩fghij
P.D11	٠a	*P*.D11+پودر شير	١٩fghij
P.E16	١٨/٢٥bcde	*P*.C15+پودر شير	١٩fghij
P.C21	١٨/٢٥bcd	*P*.F25+پودر شير	١٩/٥٠fghij
P.D22	١٨/٢٥bcd	*P*.E16+پودر شير	١٩/٥٠ghijk
P.B14	١٨/٢٥bcd	*P*.B9+پودر شير	١٩/٥٠hijk
P.F25	١٨/٢٥bcde	*P*.E6+پودر شير	١٩/٧٥ghijk
P.F8	١٨/٢٥bcde	*P*.D23+پودر شير	٢٠ijk
P.B9	١٨/٢٥def	*P*.C21+پودر شير	٢٠jk
P.C15	١٨/٥٠cde	*P*.D22+پودر شير	٢٠/٢٥k

اعداد درج شده در جدول ميانگين پنج تكرار هستند.اعداديكه با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون چند دامنه اي دانكن ($p<٠/٠١$) با يكديگر تفاوت معني‌دار دارند. اعداد ستون دوم و چهارم از سمت راست جدول در مقايسه با شاهد كه درصد آلودگي در آن ٧٥/ ٧٢بوده است سنجيده شده اند.

E16 = *P.putida* bio A ; D22 = *P.fluorescens* bio III ; B9 = *P.fluorescens* bio I
D23 =P.fluorescens bio V ; C21 = P.fluorescens bio III ; E2 = P.fluorescens bio V
F8 =*P.fluorescens* bio III ; E6 = *P.fluorescens* bio III ; C15 = *P.fluorescens* bio III

ساير جدايه ها به جنس *Pseudomonas*. sp تعلق دارند .

بررسي تاثير جدايه‌هاي آنتاگونيست برکاهش ميزان آلودگي بوته هاي گندم

نتايج حاصل از اين آزمايش بعد از تجزيه و تحليل نشان داد كه ميان جدايه‌ها و همچنين ميان وجود و عدم وجود پودر شير، در سطح يك درصد اختلاف معني‌دار وجود دارد. با توجه به معني‌دار بودن اثر فاكتور شيراينگونه استنباط مي‌گردد كه كليه جدايه‌ها همراه با پودر شير اثرات بهتري از خود نشان دادند. اين مسئله بعد از مقايسه ميانگين داده‌ها با آزمون چند دامنه دانكن و معين شدن اين كه افزودن پودر شير به جدايه‌هاي آنتاگونيست سبب افزايش توان آنها در جهت كاهش درصد آلودگي بوته‌هاي گندم مي‌گردد ،مورد تائيد قرار گرفت. با توجه به جدول مقايسه ميانگين داده‌ها، جدايه *P.fluorescens* bioIII D22 زمانيكه همراه با پودر شير مورد استفاده قرار گرفته است، بيشترين اختلاف معني‌دار را با شاهد نشان مي‌دهد. در حاليكه همين جدايه بدون پودر شير، توان بالائي در جهت كاهش درصد آلودگي از خود نشان نداده است (جدول-۵).

بحث

از نكات حائز اهميت در اين بررسي توان بالاي جدايه‌هاي *Pseudomonas* در توليد مواد ممانعت‌كننده مايع در محيط مي‌باشد. اين مسئله با تحقيقات ديگر محققين كه در آن اظهار نمودند سودوموناسها داراي اثرات ضدقارچي قوي، حتي در درجه حرارت‌هاي پائين هستند، مطابقت دارد (۸). همچنين به طور كلي يكي از دلايل عدم جوانه‌زني تليوسپورها را نيز مي‌توان به توليد مواد آنتي‌بيوتيكي و فعاليت آنتي‌بيوز اين آنتاگونيست‌ها نسبت داد. در ارتباط با ماهيت و نقش متابوليت‌هاي ثانويه مترشحه توسط جدايه‌هاي *Pseudomonas* برخي دانشمندان دخالت آنتي‌بيوتيك فنازين را در كاهش عامل پاخوره گندم پيشنهاد كردند (٦). در ارتباط با بيماري سياهك پنهان معمولي گندم نيز عنوان شده است كه جدايه 79-2 از باكتري *P.fluorescens* كه توليد آنتي‌بيوتيك فنازين مي‌نمايد، توانايي ممانعت از تندش تليوسپورهاي *Tilletia laevis* را دارد در حاليكه با ايجاد يك جهش در اين جدايه توانايي توليد اين آنتي‌بيوتيك از باكتري گرفته شد (۲۰). بنابراين باتوجه به نتايج حاصل از اين تحقيق و مطالعات ساير محققين، مي‌توان نقش هريك از آنتي‌بيوتيك‌هاي مترشحه توسط جدايه‌هاي *Pseudomonas* را درکاهش درصد جوانه‌زني تليوسپورها، مورد بررسي قرار داد.

در يك تحقيق عنوان شده است كه بيشتر جدايه‌هاي سودوموناس توليد متابوليتهاي مايع خارج سلولي ضدقارچي به نام فنازين، پيرولنيترين، پيولوتئورين و*2,4-diacetyl phloroglueinol* مي‌نمايند (۱۰).

جدايه‌هاي مورد استفاده در اين تحقيق پس از اتوكلاو شدن ترشحات مايع خارج سلولي نيز، تأثيراتي بر كاهش درصد جوانه‌زني تليوسپورهاي سياهك از خود نشان دادند. آنچه مسلم است با كاهش غلظت مواد مترشحه خارج سلولي، درصد بازدارندگي از تندش تليوسپور، براي همه جدايه‌ها كاهش مي‌يابد كه اين مسئله با ماهيت آزمايش همخواني دارد. با توجه به توليد متابوليت‌هاي ثانويه متعدد توسط باكتري‌ها كه عمده آنها تركيباتي با ساختمان پروتئيني هستند (٢٤)، و ذكر اين نكته كه اغلب تركيبات نظير قندها، آمينواسيدها، ويتامين‌ها، نوكلئوتيدها و قريب‌به اتفاق آنتي‌بيوتيك‌ها، در دما و فشار اتوكلاو تجزيه مي‌شوند (۱۸) مي‌توان نتيجه گرفت كه از بين رفتن برخي از متابوليت‌هاي حساس به دما و فشار، در شرايط اتوكلاو، سبب مي‌گردد تا از توان آنتاگونيستي جدايه‌هاي مولد، كاسته شود و باكتري‌هايي كه پس از اتوكلاو شدن عصاره‌شان، كماكان قدرت خود را حفظ نموده‌اند، قطعاً توليد كننده موادي مي‌باشند كه اين شرايط را تحمل مي‌نمايد.

نتايج حاصل از اين پژوهش نشان داد كه تمامي جدايه‌ها قادر به توليد تركيبات فرار در محيط كشت مي‌باشند. برخي محققين گاز سيانيد هيدروژن توليد شده توسط سودوموناس را عامل مهمي در كنترل قارچ *Thielaviopsis basicola* عامل پوسيدگي سياه ريشه توتون مي‌دانند (۵).

كليه جدايه‌هاي مورد استفاده در اين تحقيق قادر به توليد رنگدانه‌هاي فلورسنت بر سطح محيط كشت King’s B بودند و با افزايش مقادير ۲۰۰ و ٤۰۰ ميكرومول، كلريد آهن سه ظرفيتي، به محيط كشت مذكور، توليد سيدروفور توسط آنها

متوقف گرديد. علاوه برآن قارچ*Geotrichum candidum* در شرايطي كه آهن به محيط كشت اضافه شده بود، تندش ننمود، اما پس از افزودن ۲۰۰ ميكرومول آهن و توقف توليد سيدروفور توسط برخي جدايه‌ها، قارچ مذكور قادر به جوانه‌زني مي‌باشد. بنابراين اينگونه استنباط مي‌گردد كه در اين جدايه‌ها، توليد سيدروفور باعث ممانعت از تندش آرتروسپورهاي قارچ مي‌گردد، در حاليكه ساير جدايه‌ها احتمالاً علاوه بر توليد سيدروفور داراي مكانيسمي ديگر، نظير توليد آنتي بيوتيك بوده كه آن فرآورده سبب ممانعت از جوانه‌زني اين قارچ بر سطح محيط مي‌گردد. اين نتايج با مطالعات ساير محققين مطابقت دارد.

دربررسي‌هاي گلخانه اي مشخص گرديد كه جدايه *Pseudomonas fluorescens* bioI B9 بيشترين اثر را در كاهش ميزان آلودگي بوته‌هاي گنده داشته است. با توجه به نتايج بررسي هاي آزمايشگاهي ملاحظه مي‌گردد كه اين جدايه در آزمايشات توليد آنتي بيوتيك و توليد مواد مايع بازدارنده داراي اثرات قابل ملاحظه‌اي در كاهش درصد جوانه‌زني تليوسپورها بوده است. اما اتوكلاو نمودن اين ترشحات سبب گرديد تا كاهش محسوسي در توان آنتاگونيستي اين جدايه پديد آيد.بنابراين مي‌توان اينگونه استنباط نمود كه اكثر مواد بازدارنده توليد شده توسط اين باكتري از جنس موادي است كه به حرارت و فشار اتوكلاو حساس هستند و در ضمن اين مواد داراي تاثيرات مثبت در شرايط خاك بوده‌اند.در ارتباط با توليد مواد فرار نيز اين جدايه داراي بيشترين تاثير در مقايسه با ساير سودوموناس‌هاي به كار رفته در اين آزمايش مي‌باشد. بنابراين قابليت آنتاگونيستي جدايه‌هاي به كار رفته در اين تحقيق را نيز مي‌توان در ارتباط با وجود مكانيسم‌هاي مختلف بازدارندگي آنها، مرتبط دانست (۲۷). در اين آزمايش مشخص گرديد كه استفاده از تيمار پودر شير سبب كاهش درصد آلودگي بوته‌هاي گندم مي‌گردد. ساير محققين نيز قبلا به تاثير اين ماده بر كاهش بيماري اشاره نموده‌اند (۹، ۱۲). از آنجائيكه اين ماده بستري مناسب جهت پرورش جدايه‌هاي باكتري و بالطبع توليد متابوليتهاي متعدد توسط آنها مي‌باشد، خاصيت ممانعت كنندگي آن قابل توجيه است، و همينطور هنگاميكه اين ماده به تنهائي نيز به كار رفته است با جذب كردن ميكروارگانيسمهاي موجود در خاك به سمت خود، محيط را به نفع آنها و به ضرر قارچ عامل بيماري تغيير داده است. اين مطالب نيز قبلا توسط برخي محققين عنوان گرديده است. بنابراين مي‌توان عنوان نمود كه چشم‌اندازي روشن در ارتباط با كنترل بيولوژيك بيماري سياهك پنهان معمولي گندم وجود دارد كه تحقيقات گسترده‌تري را مي طلبد.

منابع مورد استفاده REFERENCES

۱. اعتباريان، ح.، پ. خدايگان.، ح. روحاني و م. ترابي. ۱۳۸۱ ارزيابي جدايه‌هاي *Trichoderma* در كنترل بيولوژي بيماري سياهك معمولي پنهان گندم. خلاصه مقالات پانزدهمين كنگره گياهپزشكي ايران، كرمانشاه.

۲. خدايگان، پ. ۱۳۸۲. بررسي امكان كنترل بيولوژيك بيماري سياهك پنهان معمولي گندم توسط برخي عوامل آنتاگونيست باكتريائي .پايان نامه كارشناسي ارشد بيماري شناسي گياهي . مجتمع آموزش عالي ابوريحان ، دانشگاه تهران .

۳- يزدي صمدي، ب.، غ. رضايي و م. وليزاده. ۱۳۷٦. طـرح‌هـاي آماري در پژوهش‌هاي كشاورزي. انتشارات دانشگاه تهران. ۷٤٦ صفحه.

4. Askeland,R.A. & S.M,Morrison.1983.Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*.Applied and Enviromental Microbiology.45,1802-1807.

5. Baker, K. F. 1987. Evolvoing Concepts of biological conrtrol of plant pathogenes. Annual Review of Phytopathology, 25: 67-85.

6. Bakker, P. A. H. M., R. V, Peer. & B ,Schippers. 1991. Suppression of soilborn plant pathogenes by fluorescent pseudomonas mechanism and prospect. In Biotic intraction and soilborn disease. Elsevier Sciens Publisher, 1991. USA.

7. Becker, J & H, Weltzien. 1998. Biological control of common wheat bunt (*Tilletia caries*) through stimulation of antagonists by seed treatment with nutrients. Smut fungi 98 Meeting Abstract.

8. Berg, G. & B, Ballin. 1995. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* kleb. Phytopathology. 141: 99-110.

9. Borgen, A. & M, Davanlou. 2000. Biological control of common bunt in organic agriculture. Journal of crop production. 3(5): 159-147.
10. Burges,H.D.1998.Formulation of Microbiol Biopesticides.Beneficial Microorganism, Nematodes, and Seed Treatment.Kluwer Academic publisher,Dordrecht.512pp.
11. Dhingra, O. O. & J. B, Sinclair. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. Bocaraton, Florida, 432pp.
12. EL-Naimi, M., R. Hala .& O.F, Mamluk. 2000. Organic seed treatment as a substitute for chemical seed-treatment to control common bunt of wheat. European Journal of Plant Pathology. 106: 433-437.
13. Fiddaman, P. J. & S, Rossal. 1994. Effect of substrate on the production of antifungall volatiles from *Bacillus subtilis*. J. App. Bacteriol. 76: 395-405.
14. Hoffmann, J. A. 1982. Bunt of wheat. Plant Disease. 66: 979-987.
15. Johnsson ,L., M,Hokeberg. & B,Gerhadson.1998.Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA342 against cereal seed-borne disease in field experiments.Eur.Journal of Plant Pathology.104:701-711.
16. Kraus,J. & J.E,Loper.1990.Biolocontrol of Pytium damping-off cucunber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5:Mechanistic study.pp:172-175.In Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriology T_4. Nature, 227: 680-685.
17. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriology T_4. Nature, 227: 680-685.
18. Liu, H., X, Pan., X, Zhang. & J, Wang. 1995. Experiments on *Bacillus* strain producting antagonistic protein. Chinese Journal of Biological Control, 11: 160-164.
19. Mamluk,O.F. & A,Zahour,1993.Differential distribution and prevalence of *Tilletia foetida* and *T.caries* Tul on bread wheat and durum wheat .Phytopathology.32:25-32.
20. Mcmanus, P., A, Ravenscroft. & D, Fulbright. 1993. Inhibition of *Tilletia laevis* teliospore germination and suppression of common bunt of wheat by *P fluorescens* 2-79. Plant Disease. 77: 1012-1015.
21. Niemann,E.1956.Taxonomy and germination of physiology of the *Tilletia* species of cereals and wild grasses .Phytopathology.Z.28:113-166.
22. Schaad, N. W., J. B, Jones. & W, Chum. 2001. Labratory Guid for Identification of Plant Pathogenic bacteria. Thrid eds. Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul Minnesota. USA397 pp.
23. Singh, V. & B. J, Deverall. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc, 83(3): 487-490.
24. Vidavaer,A.K.1983.Bacteriocins:the lure and the reality.Plant Disease.67:471-475.
25. Weller,D.M. & R.J,Cook .1983.Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescens pseudomonas .Phytopathology .73:463-469.
26. Weller,D.M., B. X ,Zhang. & R. J, Cook. 1985. Application of rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take–all of wheat. Plant Disease. 69: 710-713.
27. Wilcoxson, R. O. & E. E, Saari. 1996. Bunt and Sumt Diseases of Wheat Concepts and Methods of Disease Manegment . Mexico, D. F. CIMMYT. 66 pp.