Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۲ شماره ۱، شهریور ۱۳۸۳

# بررسی امکان استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست برای کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه

# Investigation on the possibility of using bacterial antagonists for biological control of cotton seedling damping-off in green house

**اصغر حیدری[۱] ، هیوا فتاحی[۲]، حمیدرضا زمانی زاده[۲] ، نادر حسن زاده[۲]، لاله نراقی[۱]**

۱- موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی

۲- واحد علوم و تحقیقات-دانشگاه آزاد اسلامی

## چکیده

دراین تحقیق امکان کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۵۰ جدایه باکتریایی جداشده از خاک و ریزوسفر مزارع پنبه و چغندرقند استان‌های خراسان، سمنان و گلستان از کلکسیون موجود در آزمایشگاه انتخاب و خواص آنتاگونیستی آنها بر علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه برروی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده ۱۷ جدایه از موثرترین جدایه‌ها جهت انجام آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند. جدایه‌های فوق در گلخانه با دو روش پوشش بذری (Seed coating) و افزودن سوسپانسیون به خاک (Soil drench) بر علیه دو شکل بیماری مرگ گیاهچه در حالت قبل و بعد از سر برآوردن گیاهچه ازخاک (Pre- and post emergence damping-off) و در مقایسه با قارچکش‌های یتاواکس و کاربوکسین- تیرام مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده در مجموع ۷ جدایه باکتری موثرترین جدایه‌ها ازنظر کاهش بیماری مرگ گیاهچه در



www.SID.ir

Archive of SID

حالت‌های مختلف بودند. جدایه‌های فوق با استفاده از آزمایش‌های استاندارد باکتری شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند که در نتیجه ۴ جدایه متعلق به جنس *Bacillus* و ۳ جدایه دیگر *Pseudomonas fluoresces* تشخیص داده شدند.

**واژه‌های کلیدی:** پنبه، مرگ گیاهچه، مبارزه بیولوژیک، باکتری، آنتاگونیست

**مقدمه**

از مهمترین بیماری‌های پنبه که هر ساله خسارت فراوانی به کشت و محصول این گیاه وارد می‌آورند بیماری‌های پژمردگی ورتیسیلیومی و بیماری مرگ گیاهچه پنبه می‌باشند که بنا بر گزارش زارعین در اغلب مناطق پنبه کاری ایران مشاهده شده‌اند. بیماری مرگ گیاهچه یکی از مهمترین بیماری‌های پنبه بوده و مهمترین عوامل این بیماری قارچ‌های *Pythium spp.* و *Rhizoctonia solani* می‌باشند(Heydari and Misaghi, 1998, Zaki *et al.*, 1998). بیماری مرگ گیاهچه که در اوایل رشد بوته‌ها حادث می‌شود دارای دو حالت بوده که یکی قبل از سر برآوردن گیاهچه از خاک (Pre-emergence damping-off) می‌باشد که ریشه‌چه و ساقه‌چه در حال جوانه‌زدن مورد حمله قارچ قرار می‌گیرندودر دیگری که بعد از سر برآوردن گیاهچه ازخاک (Post emergence damping - off) می‌باشد بیماری باعث پوسیدگی طوقه و ریشه گشته و نهایتاً ممکن است به مرگ کامل گیاهچه منجر گردد (Zaki *et al.*, 1998).

امروزه ضدعفونی بذر با قارچکش‌های شیمیایی محافظت کننده عمده‌ترین روش شیمیایی مبارزه با بیماری مرگ گیاهچه پنبه می‌باشد. قارچکش‌های مورد استفاده در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه علیرغم موثر بودن دارای معایبی نیز می‌باشند که از آن جمله میتوان به تاثیرات سوء بر روی موجودات غیر هدف، آلوده‌سازی محیط زیست و هزینه‌های فراوان آن‌ها اشاره نمود(Alavi & Ahoonmanesh, 1997, Hassanzadeh, 1992 و Heydari *et al.*,1997). وجود مشکلات فوق لزوم جستجو و آزمایش روش‌های غیرشیمیایی را اجتناب ناپذیر نموده است. یکی از روش‌هایی که اخیرا به عنوان جایگزینی مناسب برای



www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های شیمیایی پذیرفته شده‌است روش مبارزه بیولوژیک می‌باشد. مبارزه بیولوژیک برای محیط زیست و موجودات غیر هدف بی‌خطر بوده و در مقایسه با روش‌های شیمیایی کم هزینه‌تر می‌باشد. در سال‌های اخیر پژوهش‌های چندی در مورد مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های گیاهی انجام شده است. در این پژوهش‌ها پژوهشگران با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست موفق به کنترل موثر بیماری‌های گیاهی گردیده‌اند (Heydari *et al.*,1997, Heydari and Misaghi 1998, Kleopper *et al.*, 1980, Misaghi *et al.*, 1982, Zaki *et al.*, 1998). از جمله قارچ‌ها و باکتری‌هایی که به طور موفقیت‌آمیز در این رابطه مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به قارچ‌های *Trichoderma harzianum*, *T. viride* و همچنین باکتری‌های *Pseudomonas fluorescence*، *P. putida*، *Burkholderia cepacia* و *Bacillus subtilis* اشاره نمود که به طور موثری باعث کنترل بیماری‌های گیاهی گردیده‌اند. هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با بیماری ریزوکتونیایی مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست جهت معرفی یک روش غیرشیمیایی برای کنترل این بیماری بوده است.

**روش بررسی**

**۱- نمونه برداری**

مزارع پنبه گرگان و ورامین برای بررسی در نظر گرفته شد و از گیاهچه‌های پنبه این مزارع که دارای علائم مرگ گیاهچه بودند نمونه‌برداری گردید. نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان جداسازی قارچ در یخچال نگهداری شدند.

**۲ - جداسازی قارچ بیماری‌زا از اندام‌های گیاهی**

طوقه و ریشه گیاهچه‌های آلوده پس از شستشوی ملایم زیر جریان آب شیر به مدت چند دقیقه و ضدعفونی آن با محلول ۱۰ درصد مایع سفید کننده موجود در بازار (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم) به مدت ۱۰ تا ۶۰ ثانیه و سپس سه‌بار



www.SID.ir

Archive of SID

شستشو در سه ظرف جداگانه با آب مقطر استریل و خشک کردن روی کاغذ صافی استریل و یا بوسیله کشیدن پنبه استریل آغشته به اتانل ۹۵ درصد روی منطقه آلوده انجام شد. پس از آن با استفاده از اسکالپل استریل بافت دارای لکه قطعه قطعه شده و قطعات بریده شده از مرز بافت آلوده و سالم انتخاب گردیده و بر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آب آگار (WA) انتقال داده شد. پتری‌ها در انکوباتور (در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند و پس از ۱۲ تا ٤٨ ساعت نگهداری و مشاهده ریسه‌های نظیر رایزوکتونیا در زیر میکروسکوپ نوک ریسه‌ها به محیط کشت تازه PDA انتقال داده شد. نوک ریسه‌ها برای مرتبه دوم برداشته شد تا از خلوص قارچ اطمینان حاصل شود و همچنین نوک ریسه‌ها نیز به لوله‌های آزمایش حاوی PDA منتقل شد. این لوله‌ها در تاریکی و در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳-۲ هفته نگهداری شدند تا کلنی جدایه‌های قارچی کاملاً رشد نموده و در آنها سختینه تولید شود، سپس درب لوله‌ها بوسیله پارافیلم بسته شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به عنوان کشت منبع نگهداری شد. در این جداسازی تعداد ٥ جدایه *R. solani* جدا گردید که با کدهای $R_1$، $R_2$، $R_3$، $R_4$، $R_5$ نامگذاری گردید و برای شناسایی جدایه‌ای با قدرت بیماری‌زایی برتر، هر یک بطور جداگانه در آزمون بیماریزایی ارزیابی شدند.

### ۳- شناسایی عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه

برای شناسایی قارچ *R. solani* یکسری مشاهدات ظاهری و میکروسکوپی انجام و با اطلاعات موجود در منابع مقایسه گردید.

۳-۱-مشاهده ظاهری میسلیوم قارچ: چگونگی رشد و رنگ قارچ روی محیط PDA بصورت روزانه به مدت ۲ هفته مورد بازبینی قرار گرفت.

۳-۲-مشاهدات میکروسکوپی :با استفاده از میکروسکوپ نوری چگونگی انشعاب ریسه‌ها، دیواره عرضی، وجود سختینه‌ها در جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تعلق آنها به گونه *R. solani* مورد تائید قرار گرفت.



www.SID.ir

Archive of SID

**٤-آزمون اثبات بیماری‌زایی:** این آزمون بر طبق اصول کخ انجام گرفت. بدین ترتیب که پس از جداسازی قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه از گیاهچه بیمار روی محیط کشت WA، جدایه جهت خالص‌سازی روی محیط PDA منتقل شد. کشت ۷۲ ساعته قارچ به خاک استریل گلدان‌های حـــاوی بذر پنبه و همچنین گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های ۱۵ روزه پنبه اضـــافه گردید (جهت بررسی دو شکل بیماری Post & Pre-emergence ). مراحل کامل این آزمون به شرح زیر بود.

۴-۱-تهیه مایه تلقیح قارچ (روش اول): برای تهیه مایه تلقیح ۵۰۰ گرم دانـه گنـدم بـه همـراه ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر در داخل یک ارلن یک لیتری ریخته و ۲۴ ساعت نگهداری شد تا آب در بذر نفوذ کند. سپس در ارلن‌ها با پنبه و فویل آلومینیوم پوشانده شد ودوبار، هربار به مدت ۴۰ دقیقه درون اتوکلاو به فاصله ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۱ اتمسفر استریل گردید. پس از خارج کردن ارلن‌ها از اتوکلاو و سرد شدن آن‌ها، تحت شرایط اسـتریل زیر هود قطعاتی از حاشیه کشت ۵ روزه قارچ *R. solani* روی PDA به ارلن‌هـا اضـافه گردیـد. ارلن‌ها حدود ۴-۳ هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هـر چنـد روز یکبار تکان داده می‌شدند تا مایه تلقیح درون ظرف‌ها بصورت توده بهم چسبیده در نیایـد. محتویات ارلن‌ها تحت شرایط استریل خشک شده و توسط دستگاه آسیاب برقی خانگی خـرد گردیدند. سپس مطابق روش (Wilkinson *et al.*, 1985) توسط الـک ذراتـی بـه ابعـاد ۰/۲۵ و ۱ میلی‌متر تهیه گردیده و در تمام آزمون‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

۴-۲- ضدعفونی خاک: خاک تهیه شده از مزارع پنبه، پس از سرندشدن و جدا شدن سنگ‌ها و ذرات درشت آن توسط دستگاه استریل کننده خاک به مدت ۳ ساعت استریل گردید.

-٤-۳- آزمون بیماری‌زایی درحالت قبل ازسربرآوردن گیاهچه از خاک: مایه تلقـیح مـذکور بـا خاک استریل کاملاً مخلوط گردید و در هر گلدان مقدار ۴۰۰ گرم خاک آلوده شـده و ۴ گـرم مایه تلقیح قارچ (۱ در صد وزن خاک)، اضافه گردید و سپس تعداد ۱۰ بذر پنبه رقـم ورامـین بعد از ضدعفونی سطحی با محلول ۱۰ درصد مایع سفیدکننده خـانگی (۵درصـد هیپوکلریـت سدیم) درون خاک هر گلدان قرار داده شد. در این آزمون برای هر تیمار ۴ تکرار و یک شـاهد در نظر گرفته شد و در چارچوب یک طرح کاملاً تصادفی اجرا شـد. آبیـاری گلـدان‌هـا بطـور



www.SID.ir

Archive of SID

یکنواخت برای تمام گلدان‌ها از طریق زیر گلدانی صورت گرفت. در تمام مدت آزمون دمای گلخانه ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. نتایج پس از گذشت یک هفته تا حداکثر یک‌ماه براساس تعداد گیاهچه‌های جوانه‌زده و سالم ارزیابی گردید. در ضمن از گیاهچه‌های بیمار قارچ *R. solani* مجددا جداسازی و شناسایی گردید.

۴-۴- آزمون بیماری‌زایی درحالت بعد از سربرآوردن گیاهچه ازخاک: مشابه روش بالا بذرها پس از ضدعفونی سطحی درون خاک استریل گلدان‌ها قرار داده شد و پس از ظهور گیاهچه خاک مایه تلقیح با دقت با خاک گلدان‌ها با ریختن برروی خاک گلدان در اطراف گیاهچه ها و مخلوط کردن آن با خاک با استفاده از دستکش و یک قاشقک استریل بطوریکه گیاهچه صدمه‌ای نبیند کاملاً مخلوط گردید و بعد از یک هفته لغایت یک‌ماه نتایج بر اساس وجود علائم در طوقه و مرگ گیاهچه پنبه مورد ارزیابی قرار گرفته و عامل بیماری نیز جداسازی و شناسایی گردید.

۴-۵- تهیه مایه تلقیح قارچ جهت اثبات بیماری‌زایی (روش دوم): برای تهیه مایه تلقیح، از کشت ۷۲ ساعته قارچ در محیط PDA استفاده شد بدین ترتیب که برای هر گلدان با وزن ۴۰۰ گرم خاک استریل، ۷ دیسک ۲ سانتی‌متری از حاشیه کلنی قارچ انتخاب و پس از خرد کردن با یک تیغ استریل به دو روش زیر مورد بررسی قرار گرفت. برای آزمون Pre-emergence ابتدا مایه تلقیح فوق با خاک گلدان‌ها کاملاً مخلوط گردید و ۱۰ عدد بذر پنبه در خاک آلوده کاشته شد. سپس بیماری‌زایی بر اساس گیاهچه‌های سبز نشده مورد ارزیابی قرار گرفت. از بذور پوسیده و جوانه نزده قارچ *R. solani* جداسازی گردید. برای آزمون Post-emergence ابتدا بذرها درون گلدان‌ها کاشته شد و پس از رویش گیاهچه ها مایه تلقیح مذکور با خاک سطحی گلدان‌ها کاملاً مخلوط گردید و پس از یک هفته تا یک ماه نتایج براساس تعداد گیاهچه از بین رفته (مرگ گیاهچه) مورد ارزیابی قرار گرفت.در طول هر دو آزمون برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد و گلدان‌ها بطور یکنواخت از طریق زیر گلدانی آبیاری شدند.

**۵-جمع‌آوری و نام‌گذاری جدایه‌های باکتریایی:** برای این کار نمونه‌های مختلفی از خاک‌های مناطق مختلف پنبه‌کاری مورد استفاده قرار گرفتند. این نمونه‌ها از خاک مزارع پنبه و چغندر قند از ناحیه ریزوسفر بوته‌های سالم واقع در مجاورت بوته‌های آلوده جمع‌آوری


www.SID.ir

Archive of SID

و در آزمایشگاه نباتات صنعتی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی تهران بصورت کلکسیون نگهداری گردیدند. کدگذاری جدایه‌های باکتری بر اساس نام میزبان (C برای پنبه و S برای چغندر قند) و منطقه محل جمع‌آوری نمونه‌ها (K برای کارکنده، G برای گرجی محله، Ch برای چناران و Sh برای شاهرود) و شماره جدایه‌ها انجام گردید. مثلا SCh-5 نشان دهنده جدایه شماره ۵ جداشده از مزارع چغندر قند چناران می‌باشد. در ضمن جدایه‌های (Q) از جدایه‌های اهدایی بودند.

**۶-غربال نمودن باکتری‌های آنتاگونیست قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاه:** در طول این آزمون همواره خواص یک آنتاگونیست خوب در نظر گرفته شد. در این جهت آزمون‌هایی چون، آزمون کشت متقابل و آزمون چهارنقطه‌ای و آزمون غربال سریع باکتریهای آنتاگونیست انجام پذیرفت که هر یک از آزمون‌ها به شرح زیر می‌باشد :

۶-۱-آزمون چهار نقطه‌ای: این روش مطابق روش(1983) Weller & Cook به منظور بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفت. در این آزمون ۴ جدایه مختلف با فواصل معین روی پتری‌های حاوی محیط کشت Potato Dextrose Agar(PDA) و King's Medium B (KMB) به‌صورت نقطه کشت گردیدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن یک دیسک به قطر ۶ میلی‌متر از کشت تازه قارچ *R. solani* و از حاشیه کلنی قارچ از روی محیط کشت PDA برداشته شد و بطور وارونه در وسط هر یک از پتری‌های حاوی PDA، KMB قرار داده شد و مجدداً در انکوباتور قرار داده شد. هنگامی که قارچ در پتری‌های شاهد بطور کامل سطح محیط کشت را در مدت ۷۲ ساعت پوشش داد. در پتری‌های دیگر درجه و قدرت بازدارندگی هر یک از باکتری‌های آنتاگونیست با اندازه‌گیری ناحیه بازدارندگی (Inhibition zone) در تیمارها تعیین گردید.

۶-۲-آزمون کشت متقابل: :برای محاسبه دقیق فاصله بازدارندگی هر یک از جدایه‌های باکتری‌های مورد نظر و بدلیل جلوگیری از اثر تداخلی سایر جدایه‌ها همانند آزمون قبلی این روش نیز مورد آزمایش قرار گرفت. بدین ترتیب که هر جدایه باکتری در وسط یک پتری ۹ سانتی‌متری با محیط کشت PDA ، KMB بصورت خطی کشت داده شد و سپس دو دیسک ۶ میلی‌متری از حاشیه کلنی قارچ سه روزه *R solani* با فاصله مساوی از خط باکتری



www.SID.ir

Archive of SID

بصورت وارونه کشت شد. پس از آنکه دو کلنی قارچ در پتری شاهد در مدت ۷۲ ساعت به هم رسیدند میزان باردارندگی در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. این آزمون در ۴ تکرار انجام شد و باکتری‌هایی که درصد خوبی از بازدارندگی را نشان داده بودند برای آزمون گلخانه انتخاب شدند.

**۷-آزمون کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه:** این آزمون به دو روش انجام پذیرفت. روش تیمار بذری و روش محلول پاشی خاک. تهیه خاک، ضدعفونی کردن آن و تهیه مایه تلقیح قارچ و آلوده نمودن مایه تلقیح قارچ با خاک همانند آزمون اثبات بیماری‌زایی در گلخانه صورت پذیرفت و تیمار بذرها یا خاک بصورت زیر انجام شد.

۷-۱- روش تیمار بذری: ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه باکتری روی محیط کشت NBYA کشت گردید. محیط کشت مذکور شامل ۲ گرم Nutrient broth ۲ گرم Yeast extract، ۰/۵ گرم K2HPO4، ۲/۵ گرم KH2PO4 و۱/۵ گرم Glucose در هرلیتر بود. مواد فوق و Agar به یک لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از اتوکلاو شدن به ظروف پتری سترون منتقل شدند پتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از این کشت‌ها و آب مقطر استریل و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر سوسپانسیونی از هر جدایه با غلظت $10^8$ cfu/ml تهیه گردید.از طرف دیگر محلول ۲ درصد متیل سلولز درون فلاسک شیشه‌ای در پیچ‌دار تهیه گردید. برای حل شدن کامل پودر متیل سلولز در آب ، ابتدا آب را گرم کرده، به آرامی پودر مذکور به آن اضافه گردید. پس از یکنواخت شدن محلول و اتوکلاو کردن آن مقدار ۵ میلی لیتر از محلول حاصل به درون هر لوله درپیچ‌دار کوچک منتقل گردید و دو لوپ پر از هر جدایه باکتری به هر لوله اضافه شد. بعد از آن توسط دستگاه ورتکس سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردید و تعداد ۱۰ عدد بذر پنبه را که پیشتر ضدعفونی سطحی شده بودند تحت شرایط استریل از درون لوله‌ها خارج و در پتری‌های استریل پخش شدند و بعد سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شده با متیل سلولز به پتری‌ها اضافه گردید و بذور با عمل تکان دادن به سوسپانسیون باکتری‌ها آغشته گردید. بذور آغشته شده به مدت چند ساعت در زیر هود خشک شده و بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

همچنین قابل ذکر است که در جهت ارزیابی کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه توسط باکتری‌های آنتاگونیست در مقایسه با قارچ کش‌های رایج، قارچکش‌های کاربوکسین- تیرام و



www.SID.ir

Archive of SID

ویتاواکس انتخاب شدند. قارچکش کاربوکسین- تیرام بصورت‌های پودر وتابل ۷۵ درصد و ۲۵ درصد و مایع روان ۲۰ و ۳۷ درصد موجود است و به میزان ۱۵۰-۲۰۰ گرم از ماده موثر در ۱۰۰ کیلو بذر (۱/۵-۲ در هزار) مصرف می‌شود. قارچکش ویتاواکس نیز همانند فرمولاسیون فوق مصرف می‌شود. برای این آزمایش بذرهای تیمار شده با قارچکش‌های فوق از موسسه پنبه تهیه گردید. برای تیمار شاهد نیز، بذرها فقط با محلول متیل سلولز یک درصد پوشش داده شدند. در شاهد منفی بذرها در خاک آلوده شده با مایه تلقیح قارچ *R. solani* کاشته شدند. در صورتیکه در شاهد مثبت بذور در خاک استریل بدون وجود قارچ کاشته شدند. برای تمام تیمارها ۴ تکرار در نظر گرفته شد و گلدان‌های انتخاب شده با عمق ۱۵ سانتی‌متر و قطر دهانه ۱۵ سانتی متر مورد استفاده قرار گرفتند و درون هر گلدان ۱۰ عدد بذر پنبه کاشته شد. بدین ترتیب گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد تا یک‌ماه نگهداری شدند. این آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد ونتایج براساس تعداد گیاهچه سالم و رویش یافته ثبت گردید.

۷-۲: روش محلول پاشی خاک :این آزمون براساس آزمایش‌های انجام شده توسط Weller &Cook, 1983 طراحی گردید، برای این منظور همانند روش مذکور در آزمون تیمار بذری (۷-۱) پس از تهیه سوسپانسیون غلیظ از هر جدایه باکتری درون ارلن‌های ۲۰۰ ml و تعیین میزان جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر برای هر جدایه باکتری با توجه به فرمول‌های ذکر شده ، سوسپانسیون‌هایی با غلظت $10^8$ cfu/ml از هر جدایه تهیه گردید و برای هر گلدان حاوی ۵۰۰ گرم خاک استریل شده ۱۰ عدد بذر پنبه رقم ورامین و ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه در نظر گرفته شد. این آزمون در دو حالت بیماری بصورت پیش از سر برآوردن گیاهچه از خاک و پس از سربرآوردن گیاهچه از خاک انجام گرفت.

حالت اول : ابتدا در هر گلدان مایه تلقیح قارچ *R. solani* با خاک آن کاملاً مخلوط گردید و سپس تعداد ۱۰ عدد بذر پنبه داخل گلدان‌ها کاشته شد و سپس ۵۰ میلی‌لیتراز سوسپانسیون هر جدایه باکتری به خاک گلدان‌ها اضافه شد. به تیمار شاهد اول (مثبت) بدون مایه تلقیح قارچ تنها۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به شاهد دوم (منفی) اینوکولوم قارچ و ۵۰ میلی لیتر آب مقطراضافه گردید. در این آزمایش برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه ودر دمای ۲۰- ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بر حسب نیاز آبیاری



www.SID.ir

Archive of SID

گردیدند. نتایج بر اساس تعداد گیاهچه‌های سالم و سبز شده بعد از ۴۵ روز در تیماهای مختلف تعیین و بررسی گردید.

حالت دوم: در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر پنبه کاشته شد و بعد از گذشت حدود دو هفته تا یک ماه پس از جوانه‌زدن، تعداد ۵ گیاهچه سالم نگهداری و بقیه از گلدان‌ها حذف گردید. این عمل به این علت انجام گردید که تعداد گیاهچه‌ها در تمام تیمارها برابر باشد زیرا تمامی ۱۰ بذر کاشته شده در همه گلدان‌ها سبز نشده بودند. به هر گلدان ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون غلیظ از جدایه هر باکتری پس از مخلوط کردن مایه تلقیح قارچ *R. solani* با خاک هر گلدان اضافه شد. در این آزمون نیز مانند روش اول برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد و در یک تیمار تنها ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل استفاده و به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد و در تیمار بعدی بعد از مخلوط کردن مایه تلقیح قارچ ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و به عنوان شاهد منفی بررسی شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بر حسب نیاز آبیاری گردیدند. نتایج پس از گذشت یک‌ماه با در نظر گرفتن تعداد گیاهچه از بین رفته مورد ارزیابی قرار گرفت.

**۸-شناسایی باکتریهای آنتاگونیست موثر:** شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست با استفاده از آزمایش‌های استاندارد باکتری‌شناسی ذکر شده در منابع انجام گردید(Hassanzadeh, 1995).

## نتیجه و بحث

**۱-آزمون اثبات بیماری‌زایی:** در این آزمون ۵ جدایه قارچ *R. solani* جدا شده از ناحیه طوقه و ریشه گیاهچه‌های بیمار پنبه در دو حالت بیماری (پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک و پس ازسر بر آوردن گیاهچه از خاک) از نظر قدرت بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر دو حالت بیماری جدایه R5 بترتیب با ۸۷,۵ و ۸۵ در صد مرگ و میر گیاهچه‌ها بیماری‌زاترین جدایه بود (جدول ۱و ۲). این جدایه برای بقیه آزمایش‌ها انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت.

**۲-آزمون بازدارندگی از رشد کلنی قارچ در شرایط آزمایشگاه:** در این آزمون حدود ۵۰ جدایه باکتری به روش کشت متقابل (Dual culture ) بر علیه جدایه R5 قارچ *R. solani* مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج بدست آمده



www.SID.ir

Archive of SID

تعداد ۱۷ جدایه که بیشترین خاصیت بازدارندگی را نشان داده بودند جهت آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب گردیدند.

**۳-آزمون کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه:** در این آزمون که به دو روش تیمار بذری (Seed coating) و محلول پاشی خاک (Soil drench) انجام گردید. ۱۷ جدایه باکتری انتخاب شده در دو حالت بیماری مرگ گیاهچه (پیش و پس از سر بر آوردن گیاهچه از خاک) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته و کارآیی آنها با قارچکش‌های کاربوکسین تیرام و ویتاواکس مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این آزمون به شرح ذیل بود:

۳-۱- روش تیمار بذری برای حالت پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک: همانطوریکه جدول ۳ نشان می دهد در این آزمایش از ۱۷ جدایه باکتری و ۲ قارچکش مورد آزمایش ۱۶ جدایه باکتری و هر دو قارچکش باعث کاهش معنی‌دار بیماری (افزایش تعداد گیاهچه‌های جوانه زده و سالم) در مقایسه با شاهد منفی (دارای قارچ تنها) گردیدند. البته میزان تاثیر این باکتری‌ها متفاوت بود بطوریکه جدایه‌های Q97, Q42, CG-4, CK-7, CK-6 همراه با قارچکش‌های کاربوکسین تیرام و ویتاواکس موثرترین و جدایه SCh-11 کمترین تاثیر را داشتند.

۳-۲- روش محلول پاشی خاک برای حالت پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک: نتایج این آزمایش در جدول ۴ آورده شده است. همانطوریکه مشاهده می‌شود در این آزمایش از باکتری‌های استفاده شده ۱۴جدایه همراه با دو قارچکش کاربوکسین تیرام و ویتاواکس بطور معنی‌داری وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه را در حالت pre-emergence در مقایسه با شاهد منفی کاهش دادند. از میان این جدایه ها جدایه‌های Q97, Q42, CG-4, CK-7 موثرترین بوده و جدایه‌های Q71, SCh-3 کمترین تاثیر را داشتند.

۳-۳-روش محلول پاشی خاک برای حالت پس از سر بر آوردن گیاهچه ازخاک: بر طبق جدول ۵ در این آزمایش از بین جدایه‌های مورد استفاده تنها ۸ جدایه باکتری باعث کاهش بیماری (مرگ و میرگیاهچه ها) در مقایسه با شاهد منفی گردیدند. بقیه جدایه‌ها و دو قارچکش مورد استفاده تاثیر معنی‌داری در این مورد نداشتند.



www.SID.ir

Archive of SID

**۴-شناسایی جدایه‌های باکتری:** شناسایی جدایه‌های باکتری با استفاده از روش‌های استاندارد و تست‌های معمول باکتری‌شناسی (Hassanzadeh, 1995) انجام گردید. لازم به ذکر است که از بین جدایه‌های بررسی شده تعداد ۷ جدایه (Q-97, Q-42, CK-9, CK-7, CK-6, SCh-7, CG-4) که بر اساس مجموع نتایج بدست آمده موثرترین بودند جهت شناسایی انتخاب گردیدند. براساس نتایج آزمایشات جدایه‌های SCh-7, CG-4, CK-9 و CK-6 مربوط به جنس *Bacillus* و ۳ جدایه دیگر یعنی CK-7, Q-42 و Q-97 به جنس *Pseudomonas* متعلق بودند. باکتری‌های *Pseudomonas* بر اساس خصوصیات مرفولوژیک بخصوص تولید رنگدانه فلوئورسانس و نیز خواص بیوشیمیایی و بر اساس نتایج آزمایش‌های انجام شده متعلق به گونه *fluorescens* *Pseudomonas* تشخیص داده شدند.

بررسی بیماری‌زایی ۵ جدایه *R. solani* روی گیاهچه پنبه رقم ورامین در گلخانه نشان داد که یکی از جدایه‌ها (R5) قدرت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به دیگر جدایه‌ها دارد. البته این آزمون در هر دو شکل بیماری (Pre-emergence و Postemergence) نتایج مشابهی داشت. در کلیه آزمایشات گلخانه‌ای تنها از جدایه R5 به عنوان عامل بیماری رایزوکتونیایی پنبه استفاده شد.

جدایه‌های باکتریایی در آزمایش‌های اولیه بر روی محیط کشت (بازدارندگی از رشد قارچ) به‌طور متفاوتی عمل کردند. از ۵۰ جدایه آزمایش شده ۱۷ جدایه بطور موثر و معنی‌دار باعث کاهش رشد کلنی قارچ *R. solani* گردیدند.

عدم تاثیر معنی‌دار تعدادی از جدایه‌ها ممکن است به‌علت عدم تولید آنتی بیوتیک‌ها و یا دیگر متابولیت‌های ضدقارچی باشد. همانطوریکه در تحقیقات مختلف در مورد بررسی خواص آنتاگونیستی باکتری‌ها ذکر شده است قابلیت تولید متابولیت‌های ضدقارچی و در نتیجه قابلیت آنتاگونیستی باکتری‌ها متفاوت می‌باشد (Kloepper *et al.*, 1980, Misaghi *et al.*, 1982, Thomashow and Weller 1990,). در بین ۱۷ جدایه انتخاب شده نیز از نظر خاصیت بازدارندگی رشد کلنی قارچ‌ها تفاوت وجود داشت که این می‌تواند به علت تعلق جدایه‌ها به گونه‌های متفاوت و اختلاف در خواص آنها باشد.



www.SID.ir

Archive of SID

در بخش دیگری از تحقیق که در گلخانه انجام گرفت صفات مشخصی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شکل آزمایشی پوشش بذری از میان ۱۷ جدایه باکتریایی مورد آزمایش، ۱۶ جدایه بطور موثر و معنی‌داری باعث افزایش جوانه‌زنی بذرها و افزایش تعداد گیاهچه سالم در مقایسه با شاهد گردیدند. البته تفاوت‌هایی نیز از نظر شاخص‌های مورد بررسی در میان این جدایه‌ها مشاهده شد.همچنین در مقایسه‌ای که میان عملکرد جدایه‌های مذکور با تیمار شاهد و تیمارهای مربوط به قارچکش‌های کربوکسین تیرام و ویتاواکس انجام شد، ملاحظه گردید تعدادی از این جدایه‌ها در سطح آماری مانند قارچکش‌ها و یا بهتر از آنها عمل کردند. با توجه به شناسایی باکتری‌ها مشخص شد که سطوح عملکرد بهتر جداول را باکتری‌های گونه *Pseudomonas fluorescens* اشغال نموده‌اند. البته در بررسی‌هایی که در سال ۱۹۹۰ توسط Thomashow و Weller انجام گرفت، اهمیت تولید آنتی‌بیوتیکی بنام Phenazin -1- Carboxylic acid، توسط این باکتری‌ها مورد تائید قرار گرفته است. عامل دیگر ضدقارچی این گروه از باکتری‌ها بنام Anthranilic acid نیز مورد شناسایی این دانشمندان قرار گرفته است به علاوه اینکه تولید سیدروفور نیز به عنوان عامل دیگر شناسایی شده است.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاعواملی مثل تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور در این آزمایش نقش مهمی داشته است و یا در بررسی‌هایی که به عمل آمده بعضی از باکتری‌های جنس *Pseudomonas* ریشه ها را کلنیزه نموده و باعث افزایش رشد گیاه می شوند. این افزایش رشد با اینکه ممکن است از طریق تولید عوامل رشدی حاصل شود، اما یک دلیل مهم برای این واکنش، شکست رقیبان پاتوژنی در ریزوسفر و متعاقباً حفاظت ریشه‌ها علیه بیماری توسط بعضی باکتری‌ها می‌باشد.

بخش دیگری از آزمایشات گلخانه‌ای به شکل محلول پاشی خاک انجام پذیرفت. در آزمون Pre-emergence از میان ۱۷ جدایه مورد بررسی تعداد ۱۴ جدایه بطور معنی‌داری باعث افزایش تعداد گیاهچه سالم (جوانه‌زده) شدند.

در این ارزیابی نیز نتایج نشان داد که جدایه‌های متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* در بیوکنترل بیماری رایزوکتونیایی گیاهچه پنبه عملکرد بهتری را حتی نسبت به شاهد (بدون قارچ) نشان دادند. به دنبال آن باکتری‌های جنس *Bacillus* با تیمارهای قارچکش در یک سطح آماری قرار گرفتند.



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقایسه قدرت بیماریزایی جدایه‌های مختلف قارچ *Rhizoctonia solani* در آزمون‌های گلخانه‌ای پیش وپس از سر بر آوردن گیاهچه از خاک

Table 1. A comparison among different *Rhizoctonia solani* isolates in pathogenicity on cotton seedlings in pre- and post emergence-damping-off experiments

| ردیف | جدایه قارچ | درصد آلودگی در آزمایش قبل از ظهور گیاهچه | درصد آلودگی در آزمایش بعد از ظهور گیاهچه |
|---|---|---|---|
| No. | Fungal isolate | Percent infection in pre-emergence test | Percent infection in Post emergence test |
| 1 | $R_1$ | 5.0[a] | 5.0 |
| 2 | R2 | 5.0 | 20.0 |
| 3 | R3 | 10.5 | 15.0 |
| 4 | R4 | 12.5 | 15.0 |
| 5 | R5 | 87.5 | 85.0 |
| 6 | Control | 2.5 | 5.0 |

میانگین درصد آلودگی ۴ تکرار = a

a=Averag percent infection of 4 replicates

در آزمون Post emergence نیز که تعداد گیاهچه از پا در آمده ارزیابی گردید از میان ۱۷ جدایه مورد آزمایش ۹ جدایه بطور موثر و معنی‌داری مرگ گیاهچه پنبه را در تیمارهای مختلف کاهش داد. در این آزمون نیز همانند دو آزمون ذکر شده از میان جدایه‌های مذکور باکتری‌های *P. fluorescens* تاثیر بهتری را به لحاظ آماری در مقایسه با دیگر جدایه‌ها همچون گروه‌های باکتریایی *Bacillus* به نمایش گذاردند.

به این ترتیب می‌توان استنباط کرد که باکتری‌های *P. fluorescens* در آزمایشات گلخانه‌ای دارای عملکرد بهتری حتی نسبت به شاهد و تیمارهای قارچ‌کش داشته‌اند و این شاید به این دلیل باشد که تولید مواد ضدقارچی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید سیدروفور، تولید کلنی روی ریشه گیاهچه در رقابت با میکروارگانیسم‌های بیماریزا نسبت به دیگر جدایه‌ها از میزان بیشتری برخوردار باشد.



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری‌هـای آنتاگونیسـت در حالـت پوشـش بـذری بر وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه

Table2. Effect of bacterial isolates used as seed coating on pre-emergence cotton seedling damping-off disease

| ردیف No. | تیمارها Treatments | گیاهچه‌های جوانه‌زده Emerged seedlings | گروه‌بندی آماری Statistical grouping |
|---|---|---|---|
| 1 | Control (-) | 2.25[b] | F |
| 2 | SCh-3 | 3.50 | F |
| 3 | SCh-11 | 5.75 | E |
| 4 | SCh-12 | 6.00 | DE |
| 5 | Q-18 | 6.00 | DE |
| 6 | CG-5 | 6.50 | DE |
| 7 | Q-71 | 6.50 | DE |
| 8 | CK-3 | 6.50 | DE |
| 9 | CK-8 | 7.00 | CDE |
| 10 | CK-5 | 7.50 | BCDE |
| 11 | CG-3 | 7.75 | BCD |
| 12 | SCh-7 | 8.00 | ABC |
| 13 | Vitavax | 8.00 | ABC |
| 14 | Carboxin-thiram | 8.75 | AB |
| 15 | CK-6 | 8.75 | AB |
| 16 | Control(+) | 9.00 | AB |
| 17 | CK-9 | 9.25 | AB |
| 18 | CG-4 | 9.25 | AB |
| 19 | CK-7 | 9.50 | AB |
| 20 | Q-97 | 9.50 | AB |
| 21 | Q-42 | 9.75 | AB |

b = میانگین تعداد گیاهچه‌های سر بر آورده از خاک در ۴ تکرار

b= The average number of emerged seedlings in 4 replicates

همچنین در مقایسه دو روش Seed coating و Soil drench ، محلول پاشی جدایه‌های باکتریایی در خاک گلدان‌های مورد آزمایش نتایج بهتری را به لحاظ کنترل بیماری نشان دادنـد. به نظر می‌رسد به‌کار بردن باکتری‌های آنتاگونیست بصورت سوسپانسیون غلـیظ و پاشـیدن آن روی سطح خاک گلدان‌ها به دلیل افزایش سطح تماس باکتری‌ها بـا بـذرها و سـطوح مختلـف خاک این تفاوت را باعث شده است و این امکان برای باکتری‌های آنتاگونیست فراهم می‌شـود که بتوانند براحتی در رقابت با قارچ عامل بیماری پیروز باشند و نیز مواد ضدقارچی باکتری‌هـا بطور یکنواخت در سطح خاک پخش گردد و می‌تـوان نتیجـه گرفـت کـه دلیـل عـدم توانـایی



www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های دیگر در کنترل این بیماری در این آزمایشات شاید عدم توانایی آنها در کلنیزه کردن ریشه یا تولید پائین آنتی‌بیوتیک‌ها و بطور کلی مواد ضدقارچی است (Weller 1988, Weller and Cook 1983).

به هر حال مکانیزم عمل این ۷ جدایه انتخاب شده در کاهش و جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری به درستی مشخص نمی‌باشد و این امر را میتوان به عوامل احتمالی مختلفی نسبت داد. به عنوان مثال رقابت در اشغال ریشه، رقابت برای جذب مواد غذایی ، تولید سیدروفور (که از خواص سودوموناس‌های فلورسنت می‌باشد) و یا تولید دیگر متابولیت‌های فرار و غیر فرار را می‌توان در این زمینه موثر دانست و محققین دیگر این مطلب را تائید می‌کنند (Defago and Hass 1990, Heydari and Misaghi 1998, Pierson and Weller 1994, Wilkinson et al 1985, Zaspei, 1992).

باید اذعان داشت که موثر بودن جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای دلیلی قاطع بر موفق بودن آنها در شرایط مزرعه نبوده و لازم است که این جدایه ها در شرایط واقعی مزرعه و گیاه مورد بررسی قرار گیرند. زیرا در شرایط واقعی عوامل زیست محیطی تاثیرات به سزایی بر رشد و فعالیت باکتری‌های آنتاگونیست گذاشته و کارایی آنها را تحت تاثیر قرار دهند (Heydari *et al.*, 1997 Heydari and Misaghi 1998). این تحقیق یک بررسی و آزمایش جهت جداسازی، جمع‌آوری و شناسایی تعدادی از جدایه‌های باکتری بر علیه قارچ *R. solani* بوده است که با هدف دست‌یابی به تعدادی باکتری آنتاگونیست جهت استفاده در طرح‌های تحقیقاتی مزرعه‌ای در مبارزه با قارچ فوق که از عوامل بیماری‌زا و خسارت‌زای بسیار مهم بر روی پنبه و بسیاری از گیاهان می‌باشد انجام شده است.



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری‌های آنتاگونیست در حالت افزودن سوسپانسیون به خاک بر وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه در حالت پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک

Table3. Effect of bacterial isolates used as soil drench on pre-emergence cotton seedling damping-off disease

| ردیف No. | تیمارها Treatments | گیاهچه‌های جوانه زده Emerged seedlings | گروه‌بندی آماری Statistical grouping |
|---|---|---|---|
| 1 | Control (-) | 2.0 [c] | F |
| 2 | SCh-3 | 4.25 | EF |
| 3 | SCh-11 | 4.00 | EF |
| 4 | SCh-12 | 4.00 | EF |
| 5 | Q-18 | 4.00 | FE |
| 6 | CG-5 | 6.50 | CD |
| 7 | Q-71 | 4.25 | DE |
| 8 | CK-3 | 5.00 | DE |
| 9 | CK-8 | 6.50 | CD |
| 10 | CK-5 | 7.50 | BC |
| 11 | CG-3 | 7.50 | BC |
| 12 | SCh-7 | 9.25 | AB |
| 13 | Vitavax | 9.25 | AB |
| 14 | Carboxin-thiram | 9.00 | AB |
| 15 | CK-6 | 8.75 | AB |
| 16 | Control(+) | 9.75 | A |
| 17 | CK-9 | 9.00 | AB |
| 18 | CG-4 | 9.50 | A |
| 19 | CK-7 | 9.50 | A |
| 20 | Q-97 | 9.50 | A |
| 21 | Q-42 | 9.50 | A |

C= میانگین تعداد گیاهچه‌های سر بر آورده از خاک در ۴ تکرار

C= The average number of emerged seedlings in 4 replicates



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴. تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری‌های آنتاگونیست در حالت افزودن سوسپانسیون به خاک بر وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه

Table 4. Effect of bacterial isolates used as soil drench on post -emergence cotton seedling damping-off disease

| ردیف No. | تیمارها Treatments | گیاهچه‌های از بین رفته Dead seedlungs | گروه‌بندی آماری Statistical grouping |
|---|---|---|---|
| 1 | Control (-) | 4.00[d] | A |
| 2 | SCh-3 | 2.50 | AB |
| 3 | SCh-11 | 2.25 | BC |
| 4 | SCh-12 | 4.00 | A |
| 5 | Q-18 | 2.25 | BC |
| 6 | CG-5 | 2.50 | AB |
| 7 | Q-71 | 2.25 | BC |
| 8 | CK-3 | 2.25 | BC |
| 9 | CK-8 | 1.75 | CD |
| 10 | CK-5 | 2.25 | BC |
| 11 | CG-3 | 0.50 | CD |
| 12 | SCh-7 | 0.50 | CD |
| 13 | Vitavax | 0.50 | CD |
| 14 | Carboxin-thiram | 0.75 | BCD |
| 15 | CK-6 | 1.75 | BCD |
| 16 | (+)Control | 0.25 | D |
| 17 | CK-9 | 0.50 | CD |
| 18 | CG-4 | 2.50 | AB |
| 19 | CK-7 | 0.50 | CD |
| 20 | Q-97 | 0.25 | D |
| 21 | Q-42 | 0.50 | CD |

d= میانگین تعداد گیاهچه‌های از بین رفته در ۴ تکرار

d= The average number of dead seedlings in 4 replicates.

**سپاسگزاری**

نگارندگان بدینوسیله از همکاری صمیمانه آقای مهندس ابوا لقاسم قاسمی و خانم ساناز صالحی مسؤل و کارشناس آزمایشگاه باکتری شناسی موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی در شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست سپاسگزاری می‌نمایند.

نشانی نگارندگان: دکتر اصغر حیدری و مهندس لاله نراقی، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، دکتر نادر حسن زاده، دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده و مهندس هیوا فتاحی، واحد علوم و تحقیقات- دانشگاه آزاد اسلامی



www.SID.ir