Archive of SID

مکانیسم‌های آنتاگونیستی باکتری‌های آنتاگونیست پوسیدگی زغالی سویا در آزمایشگاه

یلدا واصبی[1]، عزیز اله علیزاده[2] و ناصر صفایی[2]*

تاریخ دریافت : 87/12/4 تاریخ پذیرش: 88/4/20

۱- دانشجوی سابق گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
۲- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
*مسئول مکاتبه E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

چکیده

بیماری پوسیدگی زغالی با عامل *Macrophomina phaseolina*، یکی از مهم ترین بیماری‌های سویا می‌باشد. به منظور بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل این بیماری، 280 جدایه باکتری از ریزوسفر، اندام‌های هوایی و گره‌های ریشه سویا جدا و خالص سازی شد. از این میان، 89 جدایه خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند که نه جدایه شامل هفت جدایه *Bacillus* spp.، یک جدایه (synonym: *Erwinia herbicola*) *Pantoea agglomerans* و یک جدایه، *Pseudomonas fluorescens* biov.I با بازدارندگی بالای 50 درصد برای آزمون‌های درون شیشه‌ای انتخاب شدند. نتایج نشان داد که در آزمون تولید ترکیبات فرار، جدایه *P. agglomerans* (ENA) با 34/5 درصد، در آزمون تولید آنتی بیوتیک، جدایه‌های BDQ, *Bacillus* (BIN, BIA, BL) با 100 درصد و در آزمون تولید ترشحات مایع برون یاخته‌ای جدایه *Bacillus* (BL) با 75/29 درصد بیشترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیومی *M. phaseolina* دارا بودند. در آزمون تولید سیدروفور جدایه ENA با تولید هاله نارنجی‌ای به قطر 23/8 میلی‌متر بیشترین توانایی را در تولید سیدروفور نشان داد. در آزمون تولید ایندول استیک اسید، تنها جدایه *P. fluorescens* (P2FB) توانایی تولید آن را دارا بود. به منظور ردیابی و پایش جمعیت آنتاگونیست‌ها در طول آزمایش‌های گلخانه‌ای، ژنوتیپ‌های جهش یافته مقاوم به آنتی بیوتیک تهیه گردید. آزمون‌های ارزیابی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها، عدم تفاوت معنی دار بین تیپ والدی و ژنوتیپ جهش یافته را نشان داد. استفاده از آغازگرهای اختصاصی PrnAF/PrnAR در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای ردیابی ژن کد کننده آنتی بیوتیک پیرول نیترین در جدایه‌های والدی و جهش یافته *Bacillus* (BIN) و *P. agglomerans* (ENA)، نشان داد که تنها جدایه والدی و جهش یافته ENA ژن کد کننده پیرول نیترین را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های آنتاگونیست، پوسیدگی زغالی سویا، جدایه‌های والدی و جهش یافته، کنترل بیولوژیک، *Macrophomina phaseolina*

www.SID.ir

Archive of SID

Antagonistic Mechanisms of Bacterial Antagonists of Soybean Charcoal Rot in vitro

Y Vasebi[1], A Alizadeh[2] and N Safaie[2]*

[1]Formessor MSc Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2] Professor and Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
*Corresponding author: E-mail: (nsafaie@modares.ac.ir)

Abstract

Charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*, is considered to be one of the important diseases of soybean. Two hundred eighty strains of bacteria were recovered from rhizosphere, phylosphere and nodules of soybean and purified on NA media. Eighty nine of these strains displayed antagonistic ability using dual-culture tests against pathogen, of which, nine strains with high antagonistic effect (>50%), seven strains as *Bacillus* spp., one strain each belonging to *Pantoea agglomerans* and *Pseudomonas fluorescens* biov. I, were selected for *in vitro* tests. Results of volatile metabolites assays indicated that *P. agglomerans* (ENA) isolate with 34.5%, in antibiotic test, BIA, BL, BDQ and BIN (*Bacillus* spp.) isolates with 100% and in cell free culture test *Bacillus* (BL) isolate with 75.29%, were the most efficient isolates in reducing mycelial growth of the pathogen. Siderophore test showed that ENA isolate produced the highest amount of siderophore (23.8 mm in diam). *P. fluorescens* (P2FB) isolate was the only isolate produced IAA. To determine the population dynamics of antagonists during greenhouse experiments, mutants of antibiotic resistant were obtained. In antagonistic assays, mutants and wild types were not significantly different. Using specific primers (PrnAF/PrnAR) in wild types and mutants of *Bacillus* BIN and *P. agglomerans* ENA for detecting antibiotic-encoding genes of pyrrolnitrin indicated that the ENA strain carried gene for encoding pyrrolnitrin

Keywords: Antagonistic bacteria, Biological control, Charcoal rot of soybean, *Macrophomina phaseolina*, Mutant isolates, Wild type

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از مهمترین عوامل بیماریزای سویا که ریشه و طوقه را مورد حمله قرار می‌دهد قارچ خاکزاد *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid، عامل پوسیدگی زغالی می‌باشد. به دلیل ماهیت بیماری، خاکزی بودن قارچ بیمارگر و توان بالای ساپروفیتی آن در خاک، استراتژی‌های کنترلی کمی برای آن وجود دارد و روش‌های کنترلی بکار گرفته شده، همچون تناوب زراعی، کاهش تراکم سویا در مزرعه و حفظ رطوبت خاک، نوعا برای کاهش میزان میکرواسکلروت در خاک و به حداقل رساندن تماس اینوکلوم با ریشه میزبان می‌باشد (دهینگرا و سینکلایر 1975 و لهدا و همکاران 2003). استفاده از مواد شیمیایی به دلیل عدم وجود عوامل شیمیایی مناسب که بتواند گیاه را از صدمه بیمارگر حفظ نماید عملی نبوده است (پیرسون و همکاران 1984، سینگ و کایزر 1995 و وراتر و کندیگ 1998). با توجه به مشکلات متعددی که در زمینه کنترل این بیمارگر وجود دارد، استفاده از عوامل طبیعی بخصوص باکتری‌های آنتاگونیست مورد توجه محققین قرار گرفته و موفقیت‌هایی نیز در این زمینه به دست آمده است. باکتری‌های محرک رشد گیاه[1]، صدمات وارده به گیاهان از سوی بیمارگرهای گیاهی را توسط چند نوع مکانیسم مختلف به صور مستقیم یا غیر مستقیم از جمله: تثبیت نیتروژن، سنتز هورمون‌های گیاهی، ترشح سیدروفورهایی مانند پزودوباکتین[2] و پیووردین[3]، سنتز آنتی‌بیوتیک‌هایی چون 2 و 4 –دی استیل فلوروگلوسینول[4]، فنازین‌ها[5]، پیرول نیترین[6] و پیولوتئورین[7]، سنتز متابولیت‌های ضد قارچی با وزن مولکولی پایین مانند سیانید هیدروژن[8] در گیاه کاهش داده یا مهار می‌کنند (چت و همکاران 1990). پسال و همکاران (2001) بیماری پوسیدگی زغالی ناشی از *M. phaseolina* را در ذرت، توسط جدایه‌های *Pseudomonas* sp. EM85 و MR-11(2) و *Bacillus* sp. MRF در شرایط آزمایشگاهی کنترل کردند. مکانیسم‌های بیوکنترلی استفاده شده توسط جدایه *Pseudomonas* sp. EM85 تولید آنتی بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پیگمان‌های فلورسنت، جدایه *Bacillus* sp. MR-11(2) تولید آنتی بیوتیک، سیدرفور و مواد فرار ضد قارچی و جدایه MRF *Bacillus* sp. تولید سیدروفور و آنتی بیوتیک بیان شد. مکانیسم‌های بازدارندگی جدایه‌های *Rhizobium meliloti* بر علیه *M. phaseolina* جدا شده از گیاهان بادام زمینی توسط آرورا و همکاران (2001) تولید ایندول استیک اسید و سیدروفور معرفی گردید. گوپتا و همکاران (2002) تاثیر آنتاگونیست *P. fluorescens* در افزایش رشد گیاه بادام زمینی و کاهش بیماری ناشی از *M. phaseolina* را به دلیل تولید سیدروفور هیدروکسامات، سیانید هیدروژن و ایندول استیک اسید بیان کردند. بر این اساس هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست موثر بر علیه *M. phaseolina* از ریزوسفر، اندام‌های هوایی و گره‌های ریشه سویا، شناسایی برخی مکانیسم‌های آنتاگونیستی این جدایه‌ها، نشاندار کردن جدایه‌های آنتاگونیست با ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک برای پایش جمعیت آن‌ها در طی آزمون‌های گلخانه‌ای و بررسی وجود ژن کد کننده آنتی بیوتیک پیرول نیترین در آنتاگونیست‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه بیمارگر

در این تحقیق از جدایه قارچی *M. phaseolina* (M21) جدا شده از گیاه سویا و منطقه حسین آباد گرگان استفاده گردید، که در آزمون بیماریزایی انجام

[1] Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)
[2] Pseudobactin
[3] Pyoverdin
[4] 2,4-Diactyle phloroglucinol (2,4-DAPG)
[5] Phenazine
[6] Pyrrolnitrin
[7] Pyoluteorin
[8] Hydrogen cyanide (HCN)

www.SID.ir

Archive of SID

شده به عنوان یکی از بیماریزاترین جدایه قارچی شناخته شد (واصبی 1387).

جدا و خالص سازی باکتری‌های آنتاگونیست

بدین منظور از خاک ناحیه ریزوسفر بوته‌های سالم، اندام‌های هوایی و گره‌های ریشه سویا نمونه برداری شد. از نمونه‌های خاک موجود رقت‌های سریالی تهیه شده و روی محیط آگار مغذی ، نوترینت آگار[1]، پخش شد. برای جداسازی باکتری‌ها از اندام‌های هوایی، برگ و ساقه سویا در فلاسک‌های حاوی آب مقطر سترون به مدت یک ساعت روی شیکر با 150 دور در دقیقه نگهداری شدند، سپس سوسپانسیون حاصله روی محیط نوترینت آگار پخش شد. برای جداسازی باکتری-ها از گره‌های ریشه، پس از شستن و ضد عفونی سطحی ریشه‌ها، گره‌ها در تشتک سترون له شده و محتویات آن‌ها روی محیط نوترینت آگار پخش شد. تشتک‌های پتری به مدت 24 تا 48 ساعت در دمای 1±26 درجه سلسیوس نگهداری شده و مشخصات پرگنه باکتری‌ها ثبت گردید (شاد و همکاران 2001). بعد از ظهور پرگنه‌های باکتریایی در سطح محیط کشت، پرگنه‌هایی که از نظر شکل، رنگ و مرفولوژی عمومی تفاوت نشان می‌دادند با سه بار مخطط کردن روی محیط نوترینت آگار خالص سازی شدند.

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست

برای انتخاب نژادهای آنتاگونیست، آزمون کشت متقابل[2] مقدماتی قارچ با جدایه‌های باکتری به صورت چهار نقطه‌ای انجام گرفت.

آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های باکتری

جدایه‌های آنتاگونیست مورد استفاده در آزمون‌های درون شیشه‌ای بر اساس آزمون‌های گرم در پتاس سه درصد، تشکیل اندوسپور، رشد هوازی و بی‌هوازی، تشکیل میسلیوم‌های هوایی، تولید پرگنه‌های زرد یا نارنجی روی محیط YDC[3]، تولید پیگمان فلورسنت روی محیط کینگ ب[4] ، احیای نیترات، تولید لوان از سوکروز، هیدرولیز نشاسته، ذوب ژلاتین، مصرف آرژنین، کاتالاز، مصرف سیترات، تحمل نمک طعام 2، 5، 7 و 10 درصد و رشد در pH برابر 5/7 و 6/8 تا سطح جنس و گونه تشخیص داده شدند (شاد و همکاران 2001).

آزمون کشت متقابل تکمیلی

این آزمون با هدف بررسی میزان بازدارندگی و تعیین مدت زمان پایداری هاله بازدارنده رشدی توسط هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست، به دو روش 24 و 72 ساعته انجام گرفت. تشتک‌های پتری به مدت 21 روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شده، میزان رشد شعاعی قارچ در تیمار حاوی آنتاگونیست و شاهد در روزهای سوم، ششم، نهم، دوازدهم، پانزدهم و بیست و یکم کشت قارچ، اندازه گیری شده و درصد کاهش رشد میسلیومی قارچ با استفاده از رابطه یک برای هر جدایه محاسبه گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با 10 تیمار و سه تکرار انجام شد. میانگین داده‌های به دست آمده از آزمایش با استفاده از آزمون LSD[5] در سطوح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شد. این آزمون دو بار تکرار گردید.

$$IG = [\ (C-T)/C\ ] \times 100 \qquad [1]$$

IG = درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ

C = قطر پرگنه قارچ در شاهد

T = قطر پرگنه قارچ در تیمار

[1] Nutrient agar (NA)
[2] Dual culture
[3] Yeast extract -dextrose $CaCO_3$ (YDC)
[4] Kings B
[5] Fishers protected least significant difference (LSD)

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی باکتری‌های جدا شده در شرایط آزمایشگاهی

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی آزمون مطابق روش فرناندو و همکاران (2005 ب) انجام گرفت. تشتک‌های پتری در دمای 28 درجه سلسیوس به مدت سه روز نگهداری شدند. در تیمار شاهد به جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید. درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ با استفاده از رابطه یک به دست آمد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با 10 تیمار و سه تکرار انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌های به دست با استفاده از آزمون LSD در سطوح یک و پنج درصد انجام گرفت و تیمارها بر این اساس گروه بندی شدند. آزمون دو بار تکرار شد.

تولید آنتی بیوتیک

بررسی تولید متابولیت‌های قابل نشت در آگار توسط جدایه‌های آنتاگونیست مطابق روش کراوز و لوپر (1990) انجام گرفت. تشتک‌های پتری به مدت سه روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و قطر حلقه رشدی قارچ پس از این مدت اندازه گیری شد. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با ده تیمار و سه تکرار انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *M. phaseolina* با استفاده از رابطه (1) محاسبه گردید. داده‌های به دست آمده تجزیه و تحلیل شده و مقایسه تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطوح احتمال یک و پنج درصد صورت پذیرفت. آزمون فوق دو بار تکرار گردید.

تولید مواد خارج سلولی

برای انجام این آزمون باکتری‌های رشد کرده در محیط نوترینت براس[1]، به مدت 20 دقیقه با 6000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. رونشین[2] به دست آمده توسط فیلترهای میکروبیولوژیک 0/22 میکرومتری سترون شد (سینگ و دورلا 1984). برای بررسی تاثیر عصاره‌های به دست آمده، محیط‌های سیب زمینی-دکستروز-آگار[3] با غلظت 25 درصد عصاره‌های باکتریایی تهیه شد. سپس دیسک‌هایی از حاشیه فعال سه روزه قارچ به قطر پنج میلی متر در وسط تشتک‌های پتری کشت گردید. در شاهد به جای عصاره باکتریایی از محیط نوترینت براس فیلتر شده استفاده شد. کشت‌ها به مدت سه روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از سپری شدن زمان فوق درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ محاسبه شد. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با 10 تیمار و سه تکرار انجام گرفت. میانگین‌های تیمارها توسط آزمون LDS در سطوح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شدند. آزمون دو بار تکرار شد.

تولید سیدروفور

این آزمون بر اساس روش اصلاح شده الکساندر و زوبرر (1991) انجام شد. در این آزمون از محیط کروم آزورل اس آگار[4] استفاده گردید و تشتک‌های پتری به مدت 96 ساعت در دمای 26 درجه سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور با تغییر رنگ محیط آبی به نارنجی مشخص شده و قطر هاله نارنجی اطراف پرگنه هر جدایه اندازه گیری گردید. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با 10 تیمار انجام گرفت و میانگین‌های حاصل توسط آزمون LSD در سطوح احتمال یک و پنج درصد مقایسه شدند. آزمون دو بار تکرار شد.

تولید ایندول استیک اسید

آزمون بررسی تولید ایندول استیک اسید مطابق روش گوپتا و همکاران (2002) انجام گرفت. در این

[1] Nutrient broth (NB)
[2] Supernatant
[3] Potato dextrose agar (PDA)
[4] Chrome azorol s agar (CAS –agar)

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون از عصاره‌های باکتریایی تهیه شده در آزمون مواد خارج سلولی استفاده شد. آزمون با اضافه کردن دو الی چهار قطره ارتو فسفوریک اسید[1] به یک میلی لیتر از عصاره باکتریایی آماده شده، با 10 تیمار و سه تکرار به مورد اجرا گذاشته شده و دو بار تکرار گردید.

تهیه جدایه‌های جهش یافته

به منظور ردیابی و پایش جمعیت جدایه‌های آنتاگونیست در آزمون‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های جهش یافته با ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک، از طریق مخطط نمودن باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار حاوی مقادیر مختلف آنتی بیوتیک به دست آمد. برای این منظور ابتدا مقاومت جدایه‌ها به آنتی بیوتیک ریفامپیسین[2] بررسی شد. به این ترتیب که غلظت‌های افزایشی5، 10، 35، 50، 100، 135، 150 و 200 پی پی ام از این آنتی بیوتیک تهیه گردید. پرگنه‌های مقاوم در هر کدام از غلظت‌ها به محیط‌های حاوی غلظت‌های بالاتر منتقل شده و مخطط شدند. پرگنه‌های مقاوم و رشد کرده در غلظت 200 پی پی ام برای القاء مقاومت به آنتی بیوتیک دوم مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت‌های مورد استفاده و روش کار برای آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید[3] دقیقا مشابه با آنتی بیوتیک ریفامپیسین بود. جدایه‌های مقاوم به غلظت 200 پی پی ام نالیدیکسیک اسید، روی محیط‌های حاوی غلظت 200 پی پی ام از هر دو آنتی بیوتیک، جهت بررسی مقاومت شان آزمایش شدند. به منظور اطمینان از ثبات جهش القاء شده در جدایه‌های مورد آزمایش، جدایه‌های مقاوم در محیط نوترینت براس فاقد آنتی بیوتیک کشت گردیدند. کشت‌ها در دستگاه شیکر انکوباتور با 150 دور در دقیقه در دمای 26 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت نگهداری شدند. سپس یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به محیط نوترینت براس فاقد آنتی بیوتیک منتقل شده و مجددا به مدت 24 ساعت روی شیکر انکوباتور نگهداری شدند. این عمل ده بار تکرار شد. پس از پایان این مرحله، باکتری‌های جهش یافته بسته به جدایه مورد نظر، برای بررسی ثبات مقاومت القاء شده و توانایی رشدشان در محیط آنتی بیوتیک دار، مجددا در محیط نوترینت آگار حاوی غلظت 200 پی پی ام یک و یا هر دو آنتی بیوتیک کشت داده شدند.

ردیابی ژن رمز کننده آنتی بیوتیک

با هدف بررسی وجود ژن کد کننده آنتی بیوتیک پیرول نیترین در جدایه‌های والدی و نشاندار شده ENA و BIN، دی ان آی ژنومی باکتری‌ها استخراج شد. بدین منظور یک سی سی از کشت 24 ساعته باکتری‌ها در محیط TSB[4]، به میکروتیوب یک و نیم سی سی منتقل شده، به مدت چهار دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس با 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. رونشست حاصله دور ریخته شده، یک سی سی آب مقطر سترون به میکروتیوب اضافه شده و بعد از ورتکس ترکیب، دوباره سانتریفیوژ به روش قبل انجام گرفت. یک سی سی آب مقطر سترون و 25 میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم سه درصد به رسوب حاصله از سانتریفیوژ اضافه شد. سپس محتویات میکروتیوب به مدت دو دقیقه در آب 95 درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت به مدت 10 دقیقه با 10000 دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ انجام شد. مایه رویی جمع‌آوری شده و برای ادامه آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تکثیر دی ان آ ژنومی از آغازگرهای اختصاصی آنتی بیوتیک پیرول نیترین PrnAR (5´-TGCCGGTTCGCGAGCCAGA-3´) و PrnAF (5´-GTGTTCTTCGACTTCCT-3´) استفاده شد (ژانگ 2004). تکثیر دی ان آ در حجمی

[1] Phosphoric acid 0-
[2] Riphampicine
[3] Nalidixic acide
[4] Triptych soy broth

www.SID.ir

Archive of SID

معادل 20 میکرولیتر از مخلوط واکنش چرخه‌ای پلی مراز[1] شامل: 12/4 میکرولیتر آب دیونیزه، دو میکرولیتر بافر پی سی آر 10 غلظتی، 0/5 میکرولیتر محلول 50 میلی مول $MgCl_2$، 0/5 میکرولیتر از محلول 10 میلی مول dNTPs حاوی 2/5 میلی مول از هر یک از dNTPها، 0/5 میکرولیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم Taq DNA polymerase، یک میکرولیتر از محلول حاوی 10 پیکو مول از هر یک از آغازگرهای PrnAR و PrnAF و دو میکرولیتر از دی ان آی الگو صورت گرفت. برنامه حرارتی واکنش چرخه‌ای پلی مراز با 25 چرخه به صورت مرحله واسرشتگی مقدماتی: 95 درجه سلسیوس، دو دقیقه، مرحله واسرشتگی: 95 درجه سلسیوس، یک دقیقه، مرحله اتصال: 55 درجه سلسیوس، یک دقیقه، مرحله گسترش: 72 درجه سلسیوس، یک دقیقه و مرحله گسترش نهایی: 72 درجه سلسیوس، پنج دقیقه مطابق با روش ژانگ (2004) برای دستگاه ترموسایکلر مدل اپگرادینت[2] ساخت شرکت اپن درف آلمان تنظیم شد. برای مشاهده محصول پی سی آر و ردیابی قطعه دی ان آی تکثیر شده، الکتروفورز با ژل آگارز 0/8 درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

نتایج

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست

بر اساس آزمون کشت متقابل مقدماتی، از مجموع 280 جدایه باکتری جدا و خالص سازی شده، 89 جدایه خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند. از این میان، 39 جدایه آنتاگونیست، بازدارندگی بالای 50 درصد داشتند که نه جدایه برای آزمون‌های بعدی انتخاب شدند (جدول 1).

جدول 1- فهرست نه باکتری آنتاگونیست استفاده شده در آزمون‌های درون شیشه‌ای

شماره جدایه	کد جدایه	میزبان و محل جمع آوری
1	BIA	ریزوسفر سویا – اردبیل – مغان
2	BDR	ریزوسفر سویا – لرستان – الشتر
3	BDQ	ریزوفر سویا – لرستان – اشتر
4	B2HI	ریزوسفر سویا – اردبیل – مغان
5	BIN	ریزوسفر سویا – اردبیل - مغان
6	BII	ریزوسفر سویا – اردبیل – مغان
7	ENA	گره‌های ریشه سویا – گلستان – گرگان
8	P2FB	ریزوسفر سویا - لرستان – الشتر
9	BL	اندام‌های هوایی سویا – گلستان - گرگان

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، ویژگی جدایه‌های BIA، BIN، BDQ، BDR، B2HI، BII و BL با *Bacillus* spp.، جدایه ENA با *Pantoea agglomerans* (synonym: *Erwinia herbicola*) و جدایه P2FB با *Pseudomonas fluorescens* biov.I مطابقت داشت (جدول 2).

کشت متقابل تکمیلی

نتایج به دست آمده از آزمون نشان داد که میزان بازدارندگی و پایداری هاله بازدارنده رشدی توسط آنتاگونیست‌ها در زمان‌های مورد آزمون متفاوت بوده (شکل 1) و بین جدایه‌ها اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود داشت. مقایسه میانگین داده‌ها، نشان داد که در هر دو آزمون جدایه *Bacillus* (BL) به ترتیب با 88/88 و 88/09 درصد بیشترین و جدایه‌های P2FB و B2HI به ترتیب در آزمون‌های 24 و 72 ساعته با 51/66 و 34/76درصد، کمترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیومی بیمارگر دارا بودند (شکل‌های 2 و 3).

[1] PCR Master mix
[2] Epgradient

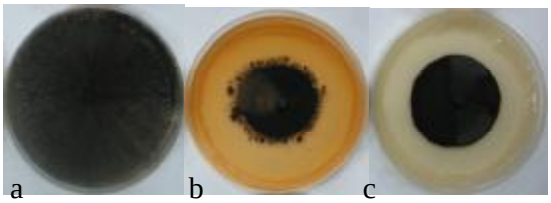
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- ویژگی‌های افتراقی باکتری‌های آنتاگونیست

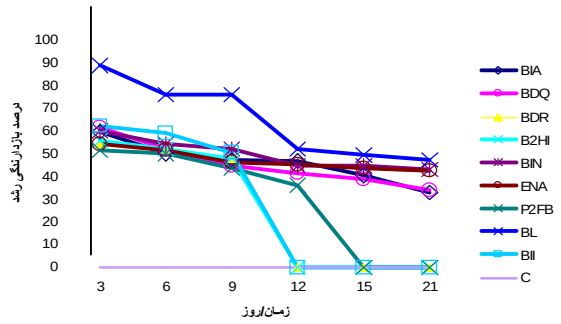
خصوصیت	جدایه								
	BII	B2HI	BL	BDQ	BDR	BIN	BIA	P2FB	ENA
واکنش گرم	+	+	+	+	+	+	+	-	-
تولید رنگ فلورسنت	-	-	-	-	-	-	-	+	-
اندوسپور	+	+	+	+	+	+	+	*	*
رشد بی هوازی	-	-	-	-	-	-	-	-	+
میسلیوم هوایی	-	-	-	-	-	-	-	*	*
تولید لوان از سوکروز	*	*	*	*	*	*	*	+	-
ذوب ژلاتین	*	*	*	*	*	*	*	+	+
هیدرولیز نشاسته	-	-	+	+	-	+	+	*	*
احیا نیترات	*	*	*	*	*	*	*	_	+
زایلوز	-	-	-	-	-	-	-	*	*
آرژنین دهیدرولاز	*	*	*	*	*	*	*	+	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	*	*
مصرف سیترات	-	+	-	-	-	-	-	-	+
تولید رنگ زرد در محیط YDC	-	-	-	-	-	-	-	+	-
تولید رنگ متالیک روی EMB	*	*	*	*	*	*	*	-	*
تحمل نمک طعام									
2 درصد	+	+	+	+	+	+	+	*	*
5 درصد	+	+	+	+	+	+	+	*	*
7 درصد	+	+	+	+	+	+	+	*	*
10 درصد	+	-	-	-	-	-	-	*	*
رشد در pH									
5/7	+	+	+	+	+	+	+	*	*
6/8	+	+	+	+	+	+	+	*	*

+: واکنش مثبت - : واکنش منفی *: آزمون انجام نشد

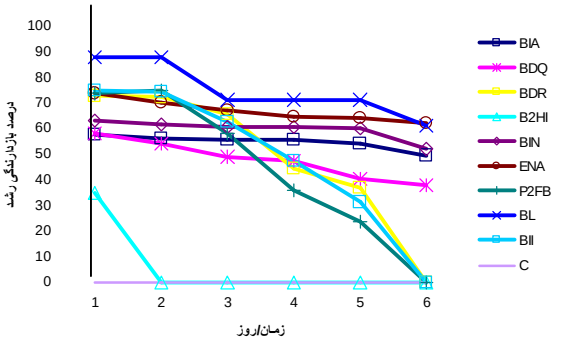


شکل 1- هاله بازداری از رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل تکمیلی

a: شاهد b: جدایه P2FB c: جدایه ENA.



شکل 2- میزان بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست در رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل تکمیلی 24 ساعته در مدت 21 روز



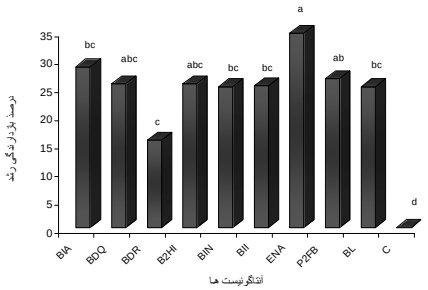
شکل 3- میزان بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست در رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل تکمیلی 72 ساعته در مدت 21 روز

مکانیسم‌های بازدارندگی باکتری‌های آنتاگونیست در آزمایشگاه تولید متابولیت‌های فرار

تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (داده-ها درج نشده‌اند). جدایه ENA با اعمال بازدارندگی 34/5 درصد و جدایه BDR با 15/45 درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیومی قارچ بیمارگر داشتند (شکل 4).

www.SID.ir

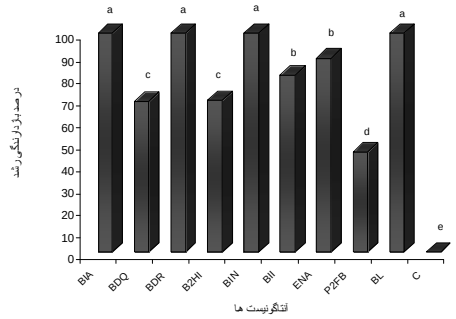
Archive of SID



شکل 4- مقایسه میانگین درصد کاهش رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون تولید متابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست

تولید آنتی بیوتیک

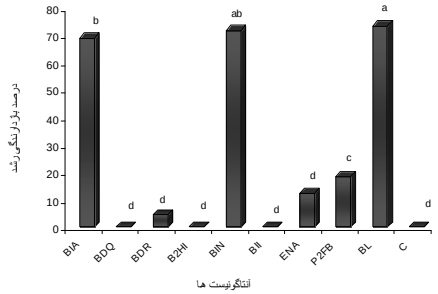
بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه‌ها در پنج گروه مجزا طبقه بندی شدند که جدایه‌های BIA، BL، BDQ و BIN با بازدارندگی 100 درصد از رشد میسلیومی بیمارگر بیشترین و جدایه P2FB با 45/55 درصد کمترین تاثیر را دارا بودند (شکل 5).



شکل 5- مقایسه میانگین درصد کاهش رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون تولید آنتی بیوتیک جدایه‌های آنتاگونیست

تولید مواد خارج سلولی

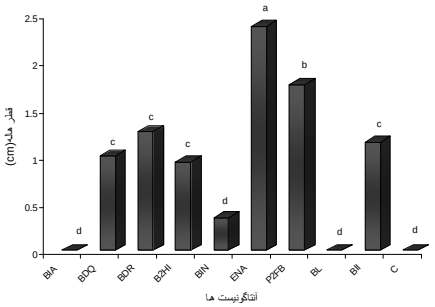
نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین آن‌ها نشان داد که در بین جدایه‌ها در بازداری رشد میسلیومی قارچ در سطح یک درصد اختلاف معنی داری وجود داشت (شکل 6). جدایه BL با بازدارندگی 75/29 درصد بیشترین و جدایه‌های BDQ، BII و B2HI با بازدارندگی صفر درصد کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد قارچ *M. phaseolina* دارا بودند.



شکل 6- مقایسه میانگین درصد کاهش رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون تولید ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست

تولید سیدروفور

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر تولید سیدروفور اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از آن است که جدایه ENA با تولید هاله‌ای به قطر 23/8 میلی متر بیشترین و جدایه‌های BL و BIA بدون تشکیل هاله نارنجی، کمترین توانایی را در تولید سیدروفور در بین جدایه‌های آنتاگونیست داشتند (شکل 7).



شکل 7- مقایسه میانگین مربوط به توانایی باکتری‌های آنتاگونیست در تولید سیدروفور با ایجاد هاله نارنجی در محیط CAS-agar

www.SID.ir

Archive of SID

تولید ایندول استیک اسید

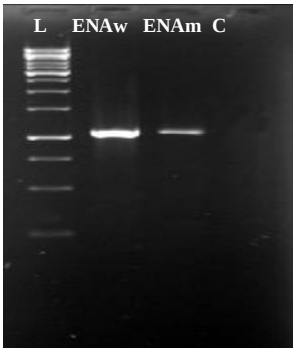
بررسی‌ها نشان داد که تنها جدایه P2FB قادر به تولید ایندول استیک اسید بوده و عصاره باکتریایی آن با اضافه کردن اورتوفسفوریک اسید به رنگ صورتی تغییر رنگ یافت. بقیه تیمارها از تولید ایندول استیک اسید ناتوان بودند و در حضور اورتوفسفوریک اسید رنگ عصاره آن‌ها تغییر نکرد.

نشاندار کردن باکتری‌های آنتاگونیست

از نه جدایه مورد بررسی تمامی جدایه‌ها تا غلظت 200 پی پی ام آنتی بیوتیک ریفامپیسین قادر به رشد بودند. اما تنها سه جدایه ENA، P2FB و B2HI توانستند تا غلظت 200 پی پی ام آنتی بیوتیک دوم نیز رشد کنند (جدول 3). نتایج حاصل از آزمون‌های بررسی خواص مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و آنتاگونیستی، عدم تفاوت معنی‌دار بین جدایه‌های مادری و نشاندار را نشان دادند.

ردیابی ژن رمزکننده آنتی بیوتیک در جدایه‌های آنتاگونیست والدی و نشاندار شده

نتایج حاصله از آزمون‌های مولکولی جهت ردیابی ژن رمز کننده آنتی بیوتیک پیرول نیترین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PrnAF/PrnAR نشان داد که جدایه‌های والدی و نشاندار شده ENA، ژن رمز کننده پیرول نیترین را دارا بوده و قطعه‌ای به طول 1050 bp توسط آغازگرهای فوق در هر دو جدایه تکثیر می‌یابد (شکل 8). در جدایه BIN والدی و مقاوم به آنتی‌بیوتیک علی‌رغم داشتن خاصیت آنتی بیوز و در جدایه غیر آنتاگونیست DS این ژن ردیابی نشد.



شکل 8- نقوش الکتروفورزی ژن رمز کننده آنتی بیوتیک پیرول نیترین در جدایه والدی و جهش یافته آنتاگونیست
L: نشانگر (یک کیلو جفت باز) ENAw: جدایه والدی ENAm: جدایه مقاوم به آنتی بیوتیک C: جدایه DS غیر آنتاگونیست (کنترل منفی)

جدول 3- عکس العمل جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی در غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید

جدایه	غلظت (پی پی ام)															
	200		200		150		100		50		35		10		5	
	r+n	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	
BIA	*	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
BIN	*	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
BII	*	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
B2HI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
P2FB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ENA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
BDQ	*	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
BDR	*	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
BL	*	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	

+: رشد -: عدم رشد r: ریفامپیسین n: نالیدیکسیک اسید، و * آزمون انجام نشد

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

کنترل پوسیدگی ریشه در گیاهان مختلف توسط عوامل میکروبی متعددی گزارش شده است (پال و همکاران 2001، کیشور و همکاران 2005 و فرناندو و همکاران 2007). در این تحقیق 280 جدایه باکتری از ریزوسفر و اندام‌های هوایی و گره‌های ریشه سویا جدا و خالص سازی شد که از این میان، 31/78 درصد جدایه‌ها با اعمال بازدارندگی 14/28 الی 88/89 درصد، توانایی آنتاگونیستی علیه قارچ را در آزمایشگاه نشان دادند. از این میان، نه جدایه برای آزمون‌های آنتاگونیستی انتخاب شدند که با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، هفت جدایه گرم مثبت متعلق به جنس *Bacillus* spp. و دو جدایه گرم منفی یکی *Pseudomonas fluorescens* و دیگری *Pantoea agglomerans* شناسایی شد. این مطالعه نشان داد که جدایه‌های آنتاگونیست متعلق به باسیلوس نسبت به سایر باکتری‌های آنتاگونیست از فراوانی بیشتری در ناحیه ریزوسفر سویا برخوردار هستند و این احتمالا به دلیل تولید اندوسپور در باسیلوس‌ها می‌باشد که آن‌ها را نسبت به شرایط نامساعد مخصوصا خشکی و گرما مقاوم تر می‌سازد (ویپس 2001). بررسی آزمون‌های متقابل تکمیلی نشان داد که جدایه‌های *Bacillus* بازدارندگی بیشتری بر رشد میسلیومی قارچ اعمال می‌نمایند (شکیبا 1384، صدیقی و همکاران 2001، پال و همکاران 2001 و والینته و همکاران 2007) . میزان بازدارندگی در جدایه‌هایی که بعد از گذشت 21 روز همواره هاله بازدارنده رشدی را دارا بودند، در آزمون 72 ساعته نسبت به آزمون 24 ساعته بیشتر می‌باشد به طوری که بیشترین بازدارندگی در آزمون 24 ساعته برای جدایه BL با 47/3 درصد و در آزمون 72 ساعته برای جدایه ENA با 61/9 درصد ثبت شد. صدیقی و همکاران (2001) توانایی آنتاگونیستی چند جدایه *Pseudomonas aeruginosa* و *B. subtilis* جدا شده از ریزوسفر و ریزوپلان چهار گیاه وحشی را بر علیه *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که باکتری‌های جنس باسیلوس دارای قطر هاله بازدارندگی بزرگتری نسبت به سودوموناس-های فلورسنت می‌باشند.

تولید آنتی بیوتیک توسط تمامی جدایه‌های مورد آزمایش و اعمال بازدارندگی، حاکی از اهمیت و قدرت آنتی بیوز آن‌ها در مهار بیمارگر مورد نظر می‌باشد. وجود ژن رمز کننده آنتی بیوتیک پیرول نیترین در جدایه‌های والدی و جهش یافته *P. agglomerans* با تکثیر قطعه‌ای به اندازه 1050 bp، بر کارهای انجام شده توسط هامر و همکاران (1999)، در جهت بررسی ژن‌های کد کننده آنتی بیوتیک در یکی دیگر از جنس‌های خانواده Enterobacteriaceae (*Enterobacter agglomerance*) تایید مثبت بود. ژانگ (2004) از پرایمرهای PrnAF/RF، PRND1/D2 و PenCf/Cr برای شناسایی ژن رمز کننده پیرول نیترین در جدایه‌های آنتاگونیست *P. fluorescens* Pf-5 و *P. chlororaphis* PA-23 استفاده کرد. پیرول نیترین یک آنتی‌بیوتیک فنیل پیرول کلریناتی تولید شده توسط سودوموناس‌های فلورسنت و غیر فلورسنت می‌باشد که اولین بار از *Burkholderia pyrrocinia* جدا شده بود (آریما و همکاران 1964). تولید پیرول نیترین از *P. flourescens*، *P. chlorraphis*، *P. aureofaciens*، *Burkholderia cepacia*، *Enterobacter agglomerans* و *Serratia* sp. گزارش شده است (فرناندو و همکاران 2005 الف). عدم تکثیر قطعه مورد نظر در جدایه والدی و جهش یافته BIN نشان دهنده عدم وجود ژن رمز کننده پیرولنیترین در جدایه‌ها می‌باشد. تاثیر تولید متابولیت‌های فرار ضد

www.SID.ir

Archive of SID

قارچی در رشد میسلیومی قارچ مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که جدایه‌های آنتاگونیست علاوه بر تولید آنتی بیوتیک، توانایی تولید ترکیبات فرار را نیز دارند. فرناندو و همکاران (2005 ب) از جدایه *P. chlororaphis* (PA23) جدا شده از ریزوسفر سویا مواد فرار آلدئیدی، الکلی، کتونی و سولفیدی جدا و خالص سازی نمودند. در آزمون بررسی تاثیر ترشحات برون یاخته‌ای جدایه‌ها در بازداری رشد میسلیومی قارچ مذکور در شرایط آزمایشگاه مشخص شد که در غلظت 25 درصد تعداد کمی از جدایه‌ها قادر به بازداری رشد رویشی بیمارگر هستند. در تحقیق انجام شده توسط شکیبا (1384)، در بین غلظت‌های پنج، 15 و 25 درصد عصاره‌های برون یاخته‌ای جدایه‌های باسیلوس، غلظت 25 درصد عصاره‌ها بالاترین درصد بازدارندگی را بر *Tiarosporella phaseolina* اعمال نموده است. صدیقی و همکاران (2001) گزارش کردند که ترشحات مایع خارج سلولی *B. subtilis* از رشد رویشی *M. phaseolina* جلوگیری می‌کند. سینگ و همکاران (2008) مهار رشد میسلیومی *M. phaseolina* توسط ترشحات برون یاخته‌ای *B. subtillis* BN1 را به غلظت این ترکیبات وابسته دانسته و اعلام کردند که در میان غلظت‌های 40، 50 و 60 درصد، غلظت 60 درصد به طور کامل رشد قارچ را مهار می‌کند. طبیعت ترشحات برون یاخته‌ای آنتاگونیست‌ها در این تحقیق با توجه به نوع آنتاگونیست‌ها و بیمارگر می‌بایستی مشابه با موادی باشد که صدیقی و همکاران (2001) و سینگ و همکاران (2008) گزارش نموده‌اند. در آزمون تولید ایندول استیک اسید مشخص شد که تنها جدایه P2FB *P. fluorescens* قادر به تولید ایندول استیک اسید می‌باشد. گوپتا و همکاران (2002) در تحقیقی گزارش کردند که تولید ایندول استیک اسید یکی از مکانیسم‌های بازدارندگی *P. flourescens* GRC2 علیه *M. phaseolina* می‌باشد. در این مطالعه از مجموع نه آنتاگونیست مورد بررسی، هفت جدایه در محیط CAS-agar سیدروفور تولید کردند که جدایه *P. agglomerans* نسبت به جدایه‌های *Bacillus* spp. و *P. fluorescens* از توانایی بالاتری در تولید سیدروفور برخوردار بود. تحت شرایط کمبود آهن باسیلوس‌ها نیز تولید سیدروفور می‌کنند. به طور کلی میزان سیدروفور باسیلوس‌ها کمتر از سودوموناس‌ها می‌باشد (شودا 2000). در تحقیق سینگ و همکاران (2008) تنها 30 درصد باسیلوس‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند.

تهیه جدایه‌های آنتاگونیست مقاوم به آنتی بیوتیک با هدف نشاندار کردن جدایه‌ها جهت ردیابی و بررسی روند تغییرات جمعیت آنتاگونیست‌ها در گلخانه با موفقیت انجام شد. آنتی بیوتیک‌های ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید متداول ترین آنتی بیوتیک‌ها برای نشاندار کردن باکتری‌ها جهت ردیابی و تعیین جمعیت آن‌ها در خاک می‌باشد. زیرا باکتری‌های مقاوم به این آنتی بیوتیک‌ها در خاک طبیعی کمتر وجود دارند (پائولیتز و بلنگر 2001). جدایه مقاوم حاصله از ENA قادر به رشد تا غلظت‌های 200 پی پی ام آنتی بیوتیک-های ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید بوده اما جدایه BIN تنها تا غلظت 200 پی پی ام ریفامپیسین رشد کرده ولی نتوانست در غلظت پائین نالیدیکسیک اسید (10 پی پی ام) رشد نماید. در آزمون‌های مختلف انجام شده، جدایه‌های مقاوم تفاوت معنی داری با جدایه‌های مادری نشان ندادند. وجود ژن کد کننده آنتی بیوتیک Prn در هر دو جدایه والدی و نشاندار ENA موید عدم تغییر این صفات در این جدایه‌ها بود. سینگ و همکاران (2008) جهت ردیابی باکتری آنتاگونیست *B. subtillis* BN1 در خاک های آلوده به *M. phaseolina*،

www.SID.ir

Archive of SID

آنتاگونیست فوق را با آنتی بیوتیک ریفامپیسین نشاندار کرده و تغییرات جمعیتی آن را بررسی نمودند. گوپتا و همکاران (2002) از جدایه *Pseudomonas* GRC2 نشاندار شده با استرپتومایسین برای بررسی کلنیزاسیون ریشه بادام زمینی توسط این جدایه در حضور و عدم حضور *M. phaseolina* استفاده کردند.

با توجه به اهمیت سویا در دنیا و خسارت قابل توجهی که توسط بیمارگر مذکور بر آن وارد می‌شود تدابیر مدیریتی جهت کنترل بیماری و کاهش خسارت آن اجتناب ناپذیر است. اما در کل به دلیل ماهیت بیماری، خاکزی بودن قارچ بیمارگر و توان بالای ساپروفیتی آن در خاک، استراتژی کنترلی محدودی برای پوسیدگی زغالی وجود دارد. میکروارگانیسم‌های ریزوسفر خط دفاعی اولیه در برابر حمله بیمارگرها در ریشه را فراهم می‌کنند و برای استفاده در بیوکنترل ایده آل هستند (ولر 1988). استفاده از باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک به طور مکرر توصیه شده است، زیرا از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی بیشتر آنالیز شده‌اند. از سوی دیگر تولید انبوه باکتری‌ها یا تولیدات باکتریایی نسبت به عوامل قارچی آسان‌تر بوده و لذا توسعه و پیشرفت عوامل کنترل کننده باکتریایی نسبت به عوامل قارچی خیلی بیشتراست (شودا 2000). باکتری‌های غیربیماریزا با توانایی آنتاگونیستی روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، یک جایگزین مناسب برای قارچ‌کش-های شیمیایی بوده و از مهم‌ترین عوامل موثر در برقراری پایداری در سیستم‌های کشاورزی به شمار می‌روند.

منابع مورد استفاده

شکیبا م، 1384. بررسی اثر باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Tiarosporella phaseolina* عامل پوسیدگی زغالی سویا. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

واصبی ی، 1387. کنترل بیولوژیکی پوسیدگی زغالی سویا با عامل *Macrophomina phaseolina* با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست جهش یافته. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

Alexander DB and Zuberer DA, 1991. Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility Soils 12: 39-45.

Arima K, Imanaka I, Kusaka M, Fukuta A and Tamura G, 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. Agriculture Biology Chemistry 28: 575-576.

Arora NK, Kang SC and Maheshwari DK, 2001. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Current Science 81: 673-677.

Chet I, Ordentligh R, Shapira R and Oooenheim A, 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. Plant and Soil 129: 85-92.

Dhingra OD and Sinclair JB, 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil, effects of soil moisture, carbon, nitrogen rations, carbon source and nitrogen concentrations. Phytopathology 65: 236-240.

www.SID.ir

Archive of SID

Fernando D, Kievit TD, Zhang Y, Poritsanos N, Nakkeeran S, Habibian R and Ramarathnam R, 2007. Bacterial secondary metabolites in disease suppression and their mechanisms in plant health promotion. Second Asian Congress of Mycology and Plant Pathology – 'Microbial Diversity for Asian Prosperity', 19–22 December, Hyderabad, India. P. 232.

Fernaddo DWG, Nakkeeran S and Zhang Y, 2005a. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant disease. Springer, Nethrlands.

Fernaddo DWG, Ramarathnam R, Krishnamoorthy A and Svchuk SC, 2005b. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biology & Biochemistry 37: 955-964.

Gupta CP, Dubey RC, Kang SS and Maheshwari DK, 2002. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. Biology and Fertility of Soil 35: 399-405.

Hammaer PE, Burd W, Hill DS, Ligon JM and Vanpee KH, 1999**.** Conservation of the pyrrolnitrin gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. FEMS Microbiology 180: 39-44.

Kishore GK, Pande S and Podile AR, 2005. Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. Canadian Journal of Microbiology 51: 123–132.

Kraus J and Lopper JE, 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies. Pp 172-175. In: Keel C, Koller B and Defago G (Eds). Plant Growth Promoting Rhizobacter. The Second International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Interlaken, Switzerland.

Lohda S, Sharma SK, Mathur BK and Aggarwal RK, 2003. Integration sublethal heating with *Brassica amendments* and summer irrigation for control of *Macrophomina phaseolina*. Plant Soil 256: 423-430.

Pal KK, Tilak KVBR, Saxena AK, Dey R and Singh CS, 2001. Suppression of maize root disease caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliform* and *Fusarium graminearu*m by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiology Research 156: 209-223.

Paulitz TC and Belanger RR, 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 90: 103-133.

Pearson CAS, Schwenk FW, Crowe FJ and Kelley K, 1984. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 68: 1086-1088.

Schaad NW, Jones JB and Chum W, 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.Third edition. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. Pp. 373.

Shoda M, 2000. Bacterial control of plant disease. Journal of Bioscience and Bioengineering 89: 515-521.

Siddiqui A, Ehteshamul-Haque S and Shaukat S, 2001. Use of Rhizobacteria in the control of root rot-knot disease, complex of mungbean. Phytopathology 149: 337-346.

www.SID.ir

Archive of SID

Singh V and Deverella BJ, 1984. ***Bacillus subtilis***, as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans Br Mycol Soc 83: 487-490.

Singh RDN and Kaiser SAKM, 1995. Evaluation of some systemic and non systemic fungicides against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina* of maize. J Trop Agric 33: 54-58.

Singh N, Pandey P, Dubey RC and Maheshwari DK, 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburgii* (Sarg.) by rhizospher competent *Bacillus subtilis* BN1. World Journal Microbiol Biothechnol 1669-1679.

Valinte C, Diaz K, Gacitua S and Martinez M, 2007. Control of charcoal root rot in *Pinus radiata* nurseries with antagonistic bacteria. World Journal Microbiol Biotechnol 557-568.

Weller D, 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytophatology 26: 379-407.

Whipps JM, 2001. Microbiol interactions and biological control in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-511.

Wrather JA and Kendig SR, 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. Plant Disease 82: 247-250.

Zhang Y, 2004. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot of canola by bacterial antagonists and study of biocontrol mechanisms involved. Msc Thesis, Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

www.SID.ir