بررسی اثر تلفیقی استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* و قارچکش‌های متالاکسیل و کاپتان در کنترل *Pythium ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی

مسعود احمدزاده[1] و عباس شریفی تهرانی

چکیده

پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه ناشی از گونه‌های مختلف قارچ *Pythium* از بیماری‌های بسیار مهم نخود ایرانی در کشور می‌باشد. در صورتی‌که اقدامات لازم صورت نگیرد بیش از ۸۰ درصد خسارت در عملکرد و تعداد گیاهان سالم ایجاد می‌کند. قارچ جداسازی شده از بذور پوسیده نخود در این پژوهش به‌عنوان *P. ultimum* var. *ultimum* مشخص گردید. درصد مرگ گیاهچه در شرایط گلخانه ۵۷/۷ محاسبه شد. دراین بررسی توانایی چهار باکتری آنتاگونیست در کنترل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین Qz29R جداشده از گندم در امریکا (دریافت ازدانشگاه ایالتی واشنگتن) برای مقایسه در کنترل بیماری مورد استفاده قرار گرفت. عملکرد باکتری‌ها در کنترل بیماری بسته به نوع اینوکولوم و روش کاربرد متفاوت بود. ۹۵ درصد بذوری که با جدایه Pf-2 تیمار شده بودند در حضور عامل بیماری درون تشتک پتری به‌خوبی جوانه زدند. به‌نظر می‌رسد بین تیمار هم‌زمان باکتری و قارچکش متالاکسیل سازگاری وجود دارد به‌نحوی که می‌توانند به‌صورت مخلوط با یکدیگر به‌کار روند. هیچ‌یک از غلظت‌های متالاکسیل باعث بازداری از رشد باکتری مورد آزمایش نشد. قارچکش کاپتان درغلظت یک در هزار موجب بازداری از رشد باکتری شد. درخاک استریل، متالاکسیل درمقایسه با سایر تیمارها اثربهتری روی جوانه‌زنی و وزن تر نخود داشت. جدایه Pf-3 در مقایسه با Pf-2 تاثیر معنی‌داری ($P<0.05$) در تعداد گیاهان سالم داشت.

کلمات کلیدی : نخود ایرانی، آغشته‌سازی بذر، کنترل بیولوژیکی، ریزوباکتری‌ها

۱ و ۲: به ترتیب دانشیار و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.) ازمحصولات با ارزش غذایی به‌شمار می‌رود که دراغلب مناطق کشور کاشته می‌شود. پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه در اثر گونه-های مختلف *Pythium* از بیماری‌هایی است که هر ساله خساراتی را به زارعین تحمیل می‌کند و به دلیل کاهش جوانه‌زنی و مرگ گیاهچه در مراحل اولیه رشد تاثیرات منفی بر عملکرد نهایی وارد می‌کند (احمدزاده و همکاران، ۱۹۹۷؛ کایزر و همکاران، ۱۹۶۸). استفاده از سودوموناس-های فلورسنت برای کنترل این بیماری در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در سال ۱۹۷۸ توسط بور و همکاران، تاثیر افزاینده رشد گیاه توسط برخی سودوموناس‌های فلورسنت گزارش شد که بعداً در مورد تعدادی دیگری از باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر نیز تعمیم یافت تا این‌که نام ریزوباکتری‌های تحریک کننده رشد گیاه برای این قبیل باکتری‌ها پیشنهاد گردید (کلوپر وهمکاران، ۱۹۸۱). خواص آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنت علیه گونه‌های مختلف *Pythium* بیماری‌زا روی پنبه در سال ۱۹۷۹ توسط هاول و استیپانوویچ گزارش شد. در این باکتری‌ها مکانیسم‌های آنتاگونیستی متعددی شناخته شده که آنتی‌بیوز از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشد (فراول، ۱۹۸۸). افزایش کارآیی و ضریب تاثیر عوامل بیولوژیک در کنترل بیماری‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین اهداف مراکز پژوهشی می‌باشد. راه‌کارهای مختلفی برای این امر پیشنهاد شده است (اسپاردو و گولینو، ۲۰۰۵). در حال حاضر کاربرد توام روش‌های زراعی، شیمیایی و بیولوژیکی به‌طور وسیع مورد توجه قرار دارد. مقادیر کاهش یافته سموم شیمیایی با ایجاد استرس می‌تواند موجب ضعیف شدن عامل بیماری و آسیب پذیرتر شدن آن درمقابل عوامل آنتاگونیست شود (هیلژرد و ترانسمو، ۱۹۹۸). این امر هم‌چنین خطر مقاومت در قارچها در مقابل قارچ‌کش‌ها را کاهش می‌دهد. ضدعفونی خاک به-وسیله دی‌سولفید کربن درباغ‌های مرکبات کالیفرنیا در سال ۱۹۱۴ باعث کنترل بهتر *Armillaria mellea* گردید (بیکر، ۱۹۸۷). بعدها دریافتند که دی‌سولفید کربن باعث افزایش حساسیت میسلیوم‌های قارچ بیمارگر در برابر *Trichoderma viride* می‌شود. چنین پدیده‌ای ممکن است در مورد باکتری‌های آنتاگونیست و سموم قارچ‌کش نیز رخ دهد. یک جدایه از قارچ *Trichoderma harzianum* مقاوم به کلروتالونیل، ایپرودیون و بنومیل گزارش شده است که می‌تواند به‌صورت توام و تلفیقی به‌کار برده شوند (بیکر، ۱۹۸۷). نحوه کاربرد باکتری در بسیاری از موارد روی نتایج حاصل از کنترل بیماری در شرایط گلخانه و مزرعه تاثیر بسزایی داشته است. برای مثال نتایج یک تحقیق در مورد قارچ‌های *Pythium ultimum* و *Rhizoctonia solani* روی پنبه نشان داد که اسپری نمودن سوسپانسیون باکتری در شیارهای بذر موثرتر از آغشته نمودن بذر به‌وسیله باکتری بود (هاجدرن و همکاران، ۱۹۸۹). تیمارهای بذر و خاک با استفاده از سوسپانسیون باکتری *P. fluorescens* در کنترل *P. ultimum* روی لوبیا مورد بررسی قرار گرفته است (احمدزاده و همکاران، ۲۰۰۳). شریفی و همکاران در۲۰۰۷ نیز دو روش آغشته‌سازی بذور کلزا به دو جدایه از باکتری *P. fluorescens* را در شرایط گلخانه و مزرعه مورد استفاده قرار دادند. در این پژوهش، روش آغشته‌سازی خاک نسبت به روش آغشته‌سازی بذر در کاهش بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* موثرتر بود.

نتایج چنین پژوهش‌هایی می‌تواند در نحوه فرمولاسیون محصولات بیولوژیک حاوی عوامل آنتاگونیست و شیوه به‌کارگیری آن‌ها در سطح تجاری مورد استفاده قرار گیرد به‌نحوی که به‌توان کارآیی آن‌ها را در مزارع و باغات افزایش داد. در این تحقیق ضمن بررسی تاثیر تعدادی از سودوموناس‌های فلورسنت علیه *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، دو روش مختلف کاربرد باکتری در شرایط گلخانه و هم‌چنین تاثیر قارچکش‌های کاپتان و متالاکسیل روی رشد باکتری، و نیز کاربرد تلفیقی سم کاپتان و باکتری درون خاک طبیعی مزرعه بررسی شده است. دراین بررسی از قارچ‌کش کاپتان در نصف غلظت‌های توصیه شده استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی، شناسایی و نگهداری قارچ عامل بیماری بذر و گیاهچه‌های بیمار از مزرعه تحقیقاتی پردیس

Archive of SID

www.SID.ir

کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ۱۵ روز بعد از کاشت جمع‌آوری گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه با جریان آب معمولی به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه شسته شد، سپس با محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی سطحی گردید و بعد از دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل و قرار دادن روی کاغذ صافی به تشتک‌های پتری حاوی آب آگار ۲ درصد منتقل شد. به این محیط آنتی-بیوتیک ریفامپیسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت در دمای ۲۵درجه از قسمت‌های انتهایی هیف، قطعاتی به محیط کشت سیب‌زمینی هویج آگار منتقل و در یخچال نگهداری شد. این محیط برای سهولت تشکیل اووسپورها بسیار مناسب است. تشخیص گونه بر اساس منوگراف دیک (۱۹۹۰) صورت گرفت. سرعت رشد، رنگ و منظره کلنی، اندازه گیری قطرهای اووگون، اووسپور، اووپلاست و ضخامت دیواره اووسپور، منشاء آنتریدی و نحوه اتصال به اووگون تعیین گردید. شاخص‌های اووپلاست، آپلروتیک و دیواره با استفاده از فرمول‌های دیک محاسبه شد. این قارچ روی محیط سیب-زمینی هویج آگار (PCA) درون یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. آزمایش‌های این پژوهش با بذرهای کرم رنگ رقم جم (شماره ۱۰۰۲۵-۰۷۱-۱۲) که از کلکسیون حبوبات گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران دریافت شده بود انجام گرفت. در آزمایش‌های گلخانه‌ای، استریل کردن خاک به‌وسیله بخار آب ۱۲۱ درجه به‌مدت ۲۵ دقیقه و تهیه مایه تلقیح عامل بیماری به روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) انجام گرفت

جداسازی، شناسایی و نگهداری باکتری‌های آنتاگونیست

برای جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. به این‌ترتیب که بذور پس از ضدعفونی سطحی درگلدان حاوی ۴۰۰ گرم خاک کاشته شد. پس از چهار هفته نگهداری در تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور و رطوبت ۷۰٪، خاک به آرامی از روی ریشه شسته شد. سپس ریشه‌ها درون یک ظرف حاوی آب سترون روی شیکر قرار گرفت و به‌مدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد تیمار شد. ریشه به قطعات یک سانتی‌متری بریده و روی محیط اس‌یک (S1) یا محیط کینگ ب (KMB) قرار گرفت. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا کلنی‌های باکتری ظاهر شود. باکتری‌هایی که زیر نور ماوراء بنفش از خود خاصیت فلورسانس نشان دادند به محیط NA منتقل شدند. پس از اطمینان از خالص سازی هر یک از جدایه‌ها روی محیط آگار مغذی (NA) آزمون‌های افتراقی مطابق روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) برای تشخیص گونه انجام گرفت که ضمن مطابقت با استرین مرجع به‌عنوان سودوموناس‌های فلورسنت شناسایی شدند. در این بررسی باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین Qz29R جداشده از گندم در امریکا (دریافت ازدانشگاه ایالتی واشنگتن) و *P. fluorescens* جداشده از نخود فرنگی در استرالیا برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفتند. براساس بررسی‌های مقدماتی از بین پنج جدایه که دارای خاصیت فلورسنت روی محیط اس‌یک بودند دو جدایه که دارای بیشترین خاصیت آنتاگونیستی بودند برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. برای نگهداری باکتری‌ها در طول مدت آزمایش باکتری‌ها، چند لوپ از باکتری ۴۸ ساعته به لوله‌های سرپوش دار حاوی محلول سولفات منیزیوم یک دهم مولار اضافه و در دمای معمولی آزمایشگاه نگهداری شد.

آماده‌سازی بذر وآغشته‌سازی آن‌ها به باکتری و قارچ‌کش و تعیین جمعیت باکتری روی بذر

آغشته نمودن بذور به قارچ‌کش‌های مورد آزمایش به‌روش کایزر و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد. آغشته نمودن بذور به باکتری‌ها مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۳) با اندکی تغییر صورت گرفت. باکتری‌ها پس از ۴۸ ساعت رشد روی محیط آگار مغذی در پنج میلی-لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شده و سپس به بذور نخود که به‌طور سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضد عفونی شده بودند اضافه گردید (پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون برای ۱۲ گرم بذر). بذور به‌مدت سه ساعت درمعرض جریان هوای استریل گذاشته شد. برای تعیین جمعیت باکتری روی بذور آغشته شده، پنج عدد بذر با ۱۰۰میلی‌لیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷/۲) درون هاون استریل خرد گردید و پس از تهیه سریال رقت، یک دهم میلی‌لیتر از آن به محیط آگار

Archive of SID

www.SID.ir

مغذی منتقل شد. تعیین جمعیت به دو روش شمارش کلنی روی محیط کشت آگار مغذی و نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Instrument T7+) در طول موج ۶۰۰ نانومتر صورت گرفت.

بررسی خصوصیات آنتاگونیستی

الف) **درون تشتک پتری** *(Plate assay)*

برای این آزمایش از روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد به این ترتیب که باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای در اطراف تشتک پتری مایه کوبی شد و به‌مدت چهار روز در دمای ۲۵ درجه نگهداری گردید. پس از این مدت در وسط هر پتری یک قطعه آگار حاوی قارچ قرار داده شد. پس از سه روز وجود هر گونه ناحیه بازدارندگی بدون در نظر گرفتن شعاع آن، به‌عنوان قدرت آنتاگونیستی تلقی گردید.

ب) **در شرایط گلخانه** *(Plant test)*

آغشته نمودن بذور به باکتری‌ها مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۳) انجام شد. در این بررسی‌ها از قارچکش‌های کاپتان و متالاکسیل برای مقایسه با باکتری‌ها استفاده شد. آغشته نمودن بذور به قارچکش‌ها به‌روش کایزر و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد. مایه تلقیح عامل بیماری به‌روش هاجدرون و همکاران (۱۹۸۹) تهیه و به خاک گلدان‌های استریل شده اضافه گردید؛ به این ترتیب که محتویات یک کشت ۴۸ ساعته از قارچ عامل بیماری به محیط سیب-زمینی-هویج-آگار به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شد و به‌مدت ۳۰ ساعت روی دستگاه شیکر قرار گرفت تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل شود (۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر). در هر گلدان ۱۰ عدد بذر کاشته شد و برای هر تیمار سه تکرار به‌کار رفت. سپس در اتاق رشد کنترل شده با دمای ۱۵ درجه و تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری گردید. پس از ۱۵ روز تعداد بذوری که جوانه زده و به‌طور سالم و سر پا از خاک سر بر آورده بودند یادداشت شد. هم-چنین وزن تر بوته‌ها توزین و تجزیه آماری با استفاده از نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت. برای اطمینان بیشتر از نتایج، این آزمایش مجدداً با شرایط یکسان تکرار شد. داده-های مورد بررسی برای هر تیمار، میانگین نهایی هر دو آزمایش می‌باشد.

ج) **مقایسه تاثیر باکتری‌ها و قارچکش مورد استفاده در امکان جوانه‌زنی بذر درون تشتک پتری**

دراین آزمایش که درون تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار صورت گرفت از قارچکش کاپتان به‌میزان سه گرم ماده موثره به ازاء هر کیلوگرم بذر استفاده شد. درون هر تشتک پتری، بذور تیمار شده با جدایه‌های Pf-1 وPf-2 و قارچکش کاپتان و یک عدد بذر ضد عفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد در چهار طرف محیط کشت قرار داده و سپس قطعه شش میلی‌متری از محیط کشت ۴۸ ساعته سیب-زمینی هویج آگار حاوی عامل بیماری در مرکز آن گذاشته شد. پس از ۳۶ ساعت نگهداری در شرایط تاریکی قدرت جوانه‌زنی بذور و امکان پیشروی عامل بیماری بر روی آن‌ها تعیین شد.

بررسی تاثیر کاپتان و متالاکسیل بر روی سودوموناس‌های فلورسنت

به‌منظور بررسی امکان مبارزه تلفیقی و کاربرد توام سموم شیمیایی به‌همراه باکتری‌های آنتاگونیست، تاثیر دو قارچکش‌های کاپتان و متالاکسیل بر روی رشد استرین Qz29R به دو روش زیر صورت گرفت:

الف) روش استفاده از دیسک‌های کاغذی

ابتدا رقت‌های 10^{-3}، 3×10^{-4} ، 10^{-4} و 3×10^{-5} از قارچکش‌های کاپتان و متالاکسیل جداگانه تهیه شد. باکتری مورد نظر روی محیط آگار مغذی کشت داده و پنج عدد دیسک کاغذی درون هر پتری قرار داده شد. سپس غلظت‌های تهیه شده از قارچکش‌ها به دیسک‌ها اضافه گردید به‌طوری‌که به مرز اشباع برسند. به دیسک شاهد که در مرکز تشتک پتری قرار داشت آب مقطر استریل اضافه شد. پس از قرار دادن تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد به مدت دو روز، قطر بازدارندگی بر حسب میلی‌متر برای هر دیسک اندازه‌گیری و رابطه بین غلظت سموم و قطر بازدارندگی با استفاده از نرم افزار SAS تعیین گردید.

ب) روش اختلاط قارچکش با محیط کشت

به‌منظور حصول اطمینان از نتایج به‌دست آمده در آزمایش قبل از روش اختلاط قارچکش با محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا دو میلی‌لیتر از رقت‌های گفته شده در بالا از قارچ‌کش‌های مورد آزمایش، درون تشتک پتری ریخته و ۱۸ میلی‌لیتر محیط کشت سیب-زمینی آگار اضافه گردید و با حرکت‌های ملایم دورانی کاملا یکنواخت شد. پس از انعقاد محیط، یک لوپ از باکتری مورد نظر روی محیط کشت پخش گردید. تشتک-ها در شرایط قبلی نگهداری و پس ازآن‌که باکتری‌های درون تشتک‌های شاهد که فاقد هرگونه قارچ‌کش بود به اندازه کافی رشد کردند، مقایسه نتایج صورت گرفت.

مقایسه تاثیر توام باکتری‌ها و کاپتان در افزایش وزن تر بوته و جوانه‌زنی بذر در خاک استریل نشده

دراین آزمایش از نصف غلظت‌های توصیه شده برای کاپتان به‌همراه باکتری با جمعیت 10^9 سلول در هر میلی‌لیتر استفاده شد. بقیه شرایط آزمایش مشابه قبل صورت گرفت با این تفاوت که خاک جمع‌آوری شده از مزرعه بدون استریل شدن، با عامل بیماری به‌طور مصنوعی مایه کوبی گردید.

تاثیر باکتری‌ها در تحریک رشد گیاه درشرایط نوتوبیوتیک

برای تعیین اثر دو جدایه از سودوموناس‌های فلورسنت روی رشد گیاه به‌خصوص روی توسعه ریشه بوته‌های نخود، آزمایش زیر مطابق روش ردی و پاتریک (۱۹۹۰) با اندکی اصلاح صورت گرفت. درون لوله‌های مخصوصی که در قسمت پایین دارای مخزن آب می‌باشند تا یک سوم آن ماسه استریل شده ریخته شد. سپس ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر یک از لوله‌ها اضافه گردید تا رطوبت لازم برای جوانه‌زنی فراهم شود. آب موجود در قسمت مخزن لوله نیز رطوبت مورد نیاز را در طول دوره آزمایش تامین کرد. در هر لوله یک عدد بذر تیمار شده مطابق روش قبلی قرار گرفت. پس از پوشاندن سرلوله‌ها با پنبه استریل، در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی-گراد قرار داده شد. پس از دو هفته میزان رشد ریشه، رشد بوته و وزن تر آن‌ها بررسی شد.

مقایسه تاثیر دو روش مختلف کاربرد باکتری روی جوانه زنی بذر

در این آزمایش دو اینوکولوم یکی به‌صورت سوسپانسیون‌پاشی روی بذر قبل از ریختن خاک بر روی آن‌ها و دیگری آغشته‌سازی بذر قبل از کاشت توسط باکتری به‌کار رفت. آغشته‌سازی بذور به باکتری و کاشت آن‌ها درون گلدان مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۳) صورت گرفت. سوسپانسیون‌پاشی باکتری روی بذور به روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) انجام گرفت، به این‌ترتیب که پس از قرار دادن بذور در محل‌های کاشت درون گلدان‌ها قبل از ریختن خاک روی آن‌ها یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری از کشت ۴۸ ساعته حاوی 10^9 سلول در هر میلی-لیتر روی هر بذر ریخته شد. تعداد بذوری که ۱۵ روز پس از کاشت جوانه زده و به‌طور سالم سر از خاک بیرون آورده بودند شمارش گردید. برای سوسپانسیون‌پاشی درون شیارهای ایجاد شده به‌منظور کاشت بذور از پی‌پت پیستون‌دار به میزان یک میلی‌لیتر به ازاء هر یکصد گرم خاک استفاده شد. در هر گلدان ده عدد بذر در عمق سه سانتی‌متری کاشته شد و برای کاهش میزان شسته شدن باکتری‌ها ازمحل کاشت بذر، آب پاشی گلدان‌ها در هفته اول هر روز دو مرتبه به‌صورت اسپری با استفاده از آبفشان صورت گرفت. آلوده‌سازی خاک به قارچ عامل بیماری به-روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد.

نتایج

شناسایی عامل بیماری و قدرت بیماری‌زایی

عامل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی به‌عنوان *P. ultimum* var. *ultimum* تعیین گردید. شاخص آپلروتیک ۴۸/۸۴، شاخص دیواره ۴۰/۲۲ و شاخص اووپلاست ۱۹/۵۹ تعیین شد (شکل ۱). این گونه تولید زئوسپور نکرد. درصد مرگ گیاهچه در شرایط گلخانه ۵۷/۷ محاسبه شد. در مواردی‌که سه میلی‌لیتر سوسپانسیون به ازاء هر یکصد گرم خاک اضافه می‌شد (حاوی ۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر) درصد جوانه‌زنی به صفر می‌رسید. هم‌چنین دو جدایه باکتری آنتاگونیست جداشده روی محیط انتخابی اس‌یک که قبلا براساس نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و مقایسه با استرین CHA0 به

Archive of SID

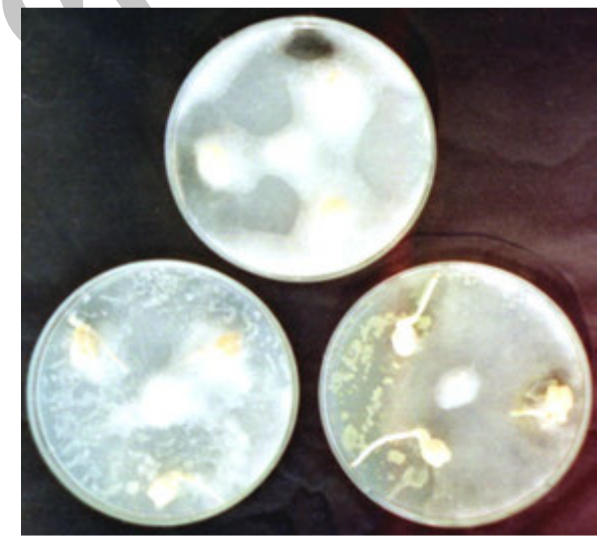
www.SID.ir

عنوان گونه *P. fluorescens* شناسایی شده بودند (احمدزاده و همکاران، ۲۰۰۳) مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی‌های آنتاگونیستی

الف) در آزمایشگاه

نتایج آزمایش درون تشتک پتری و مشاهده ناحیه بازدارنده نشان داد که جدایه‌های به‌کار رفته در آزمایش قدرت جلوگیری از رشد عامل بیماری را دارند. در حقیقت این آزمایش برای غربال نمودن باکتری‌های آنتاگونیست مناسب است، اگرچه عدم وجود ناحیه بازدارندگی همواره به‌معنی عدم قدرت آنتاگونیستی تلقی نمی‌شود. جدایه شماره Pf-3 برخلاف سایر جدایه‌ها، درون تشتک پتری باعث جلوگیری از رشد عامل بیماری نگردید. برای جلوگیری از تغییر احتمالی در قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های مورد استفاده در آزمایش‌های مختلف از باکتری‌های نگهداری شده در لوله‌های سرپوش‌دار حاوی محلول سولفات منیزیوم یک دهم مولار استفاده شد.



شکل ۱: مقایسه باکتری آنتاگونیست و قارچ‌کش کاپتان در محافظت از بذر نخود در حضور عامل بیماری

ب) بررسی‌های گلخانه‌ای بذور تیمار شده در خاک استریل شده

جمعیت باکتری 10^8 تا 10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی برای هر بذر تعیین گردید. در این آزمایش هیچ‌یک از تیمارها نتوانست به‌طور کامل از بیماری جلوگیری نماید ولی در مقایسه با شاهد آلوده اثرات کم، متوسط تا زیادی روی کاهش بیماری، درصد جوانه‌زنی و وزن تر بوته‌ها داشتند. جدایه Pf-4 بهترین تاثیر را در افزایش وزن تر بوته‌ها داشت و کم‌ترین تاثیر متعلق به جدایه Pf-1 بود. متالاکسیل در مقایسه با کاپتان تاثیر بهتری در کاهش بیماری داشت. کاپتان و جدایه Pf-2 تاثیر مشابهی داشتند. جدایه Pf-3 نیز در مقایسه با جدایه Pf-2 تاثیر بهتری داشت. از نظر تاثیر بر روی درصد جوانه زنی بهترین تاثیر متعلق به متالاکسیل و سپس کاپتان بود. از بین باکتری‌های مورد استفاده بهترین تاثیر را جدایه Pf-4 وکم‌ترین تاثیر را جدایه Pf-1 داشت. جدایه‌های Pf-2 و Pf-3 تاثیر یکسانی داشتند. تمامی جدایه‌ها روی جوانه‌زنی تاثیر مثبتی از خود نشان دادند (جدول۱). درصد گیاهان سالم در تیمارهای مختلف نیز مقایسه گردید. اگرچه هیچ‌یک از تیمارهای مورد استفاده نتوانستند به اندازه شاهد سالم باشند ولی در مقایسه با شاهد آلوده تاثیر قابل ملاحظه‌ای داشتند. بهترین اثر به‌ترتیب مربوط به قارچ‌کش‌های متالاکسیل و کاپتان بود. در بین باکتری‌ها بیش‌ترین تاثیر مربوط به جدایه Pf-4 و کم‌ترین اثر در جدایه Pf-1 دیده شد.

ج) مقایسه تاثیر باکتری‌ها و قارچ‌کش مورد استفاده در امکان جوانه‌زنی بذر درون تشتک پتری

۹۵ درصد بذوری که با جدایه Pf-2 پوشش داده شده بودند توانستند در حضور عامل بیماری درون تشتک پتری جوانه‌زنی نمایند (شکل ۱). درنمونه شاهد، بذور نخود به‌وسیله قارچ *P. ultimum* به‌طور کامل پوشانده شد به‌نحوی‌که هیچ‌کدام قادر به جوانه زنی نشدند. روی بذور تیمارشده به‌وسیله باکتری‌ها و قارچ‌کش کاپتان پوشش سفید رنگ قارچ دیده نشد. با توجه به مقایسه حجم قارچ روی بذر و طول ریشه‌چه درون تشتک‌های پتری، تاثیر بهتر باکتری نسبت به قارچ‌کش کاپتان کاملا مشهود بود.

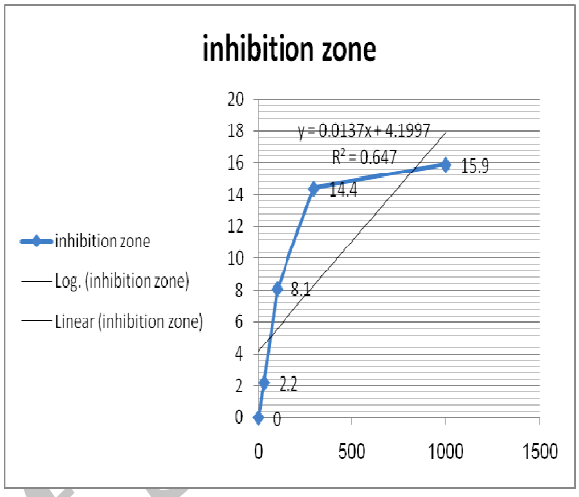
بررسی تاثیر کاپتان و متالاکسیل بر روی سودوموناس‌های فلورسنت

در این بررسی هیچ‌یک از غلظت‌های متالاکسیل باعث بازداری از رشد باکتری مورد آزمایش نشد. رشد باکتری در غلظت یک در هزار متالاکسیل مشابه رشد باکتری در شاهد است. عدم وجود هاله بازدارندگی در

Archive of SID

www.SID.ir

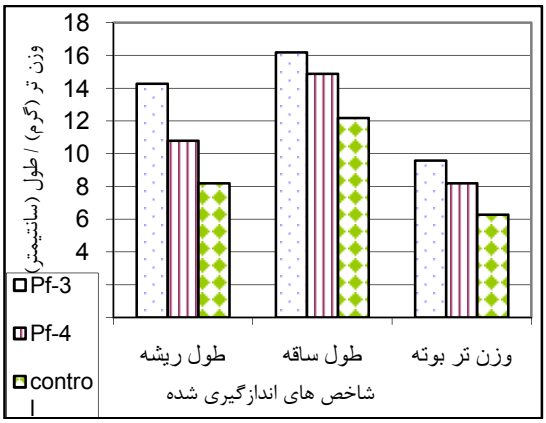
اطراف دیسک حاوی غلظت‌های مختلف این قارچ‌کش نیز بیان‌گر همین نتیجه می‌باشد. قارچ‌کش کاپتان درغلظت یک در هزار موجب بازداری از رشد باکتری گردید (شکل ۲). رقت‌های بعدی تاثیر محسوسی بر روی رشد باکتری مورد آزمایش نداشتند.



شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف کاپتان در جلوگیری از رشد باکتری *Pseudomonas fluorescens*

تاثیر باکتری‌ها در تحریک رشد گیاه درشرایط نوتوبیوتیک

همان‌گونه که در شکل-های شماره ۳ و ۴ مشاهده می‌شود هر دو جدایه مورد استفاده صرف‌نظر از

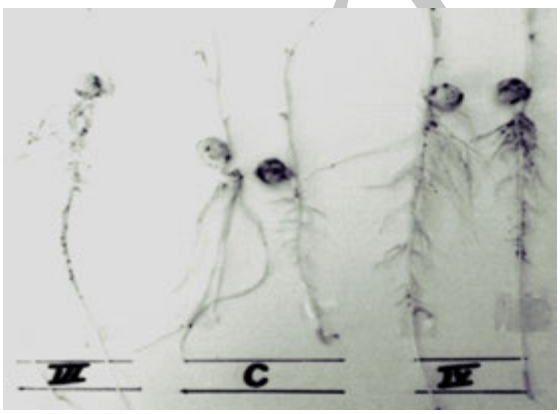


شکل۳: تاثیر دو استرین از باکتری *P. fluorescens* روی رشد گیاه بدون حضور عامل بیماری

خواص آنتاگونیستی تاثیر محسوسی روی شاخص‌های رشد گیاه داشتند و اختلاف معنی‌داری با شاهد (فاقد هر گونه باکتری) داشتند. توسعه ریشه‌های نخود ایرانی (رشد طولی ریشه و افزایش ریشه‌های فرعی) نیز کاملا محسوس و معنی‌دار می‌باشد.

مقایسه تاثیر دو روش مختلف کاربرد باکتری روی جوانه زنی بذر

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد باکتری به‌صورت پاشیدن سوسپانسیون روی بذور تاثیر نسبتا مشابهی با روش آغشته‌سازی بذر در افزایش جوانه‌زنی بذور دارد (جدول۳). درصد جوانه زنی در روش سوسپانسیون پاشی درون شیارهای کاشت بذر ۴۶/۷ درصد و در روش آغشته‌سازی ۳۶/۷ درصد تعیین گردید. درصد جوانه زنی بذوری که سوسپانسیون باکتری روی آن‌ها پاشیده شده بود تقریبا دو برابر درصد جوانه زنی بذوری بود که بدون هیچ‌گونه تیماری در خاک آلوده به قارچ عامل بیماری کاشته شده بودند ولی از نظر آماری با شاهد سالم در یک گروه قرار داشتند.



شکل ۴: تاثیر دو استرین از باکتری *P. fluorescens* روی رشد طولی ریشه و ایجاد ریشه‌های فرعی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: تاثیر باکتری‌ها روی پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه، جوانه زنی و وزن تر بوته‌های نخود در خاک استریل شده

تیمارها	غلظت	درصد جوانه زنی	وزن تر بوته (گرم)	درصد گیاهان سالم
شاهد سالم	یک میلی لیتر آب مقطر	۹۲/۹۶ a	۳/۰۳ a	۹۳ a
کاپتان	۳گرم ماده موثره درکیلوگرم بذر	۸۰/۴۳ ab	۱/۸۲ c	۷۶/۴ b
متالاکسیل	۰/۵گرم ماده موثره درکیلوگرم بذر	۹۳/۲۳ a	۲/۳۱ bc	۸۶/۷ ab
Pf-1	10^9 سلول در میلی لیتر	۴۳/۹۰ c	۰/۹۴ cd	۳۵/۸ d
Pf-2	10^9 سلول در میلی لیتر	۵۵/۱۳ bc	۱/۴۵ c	۴۳/۲ cd
Pf-3	10^9 سلول در میلی لیتر	۵۵/۵۲ bc	۲/۶۳ b	۵۳/۵ c
Pf-4	10^9 سلول در میلی لیتر	۶۰/۱۲ b	۲/۸۶ ab	۶۵/۳ bc
شاهد آلوده	۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی	۲۳/۵۶ d	۰/۷۱ d	۲۶/۵ e
LSD(0.05)		۲/۳۱۴	۱/۰۸۹	۲/۱۲۴

پارامترهای مورد اندازه‌گیری ۱۵ روز پس از کاشت صورت گرفت. استریل کردن خاک به‌وسیله بخار آب ۱۲۱درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ حاوی ۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر به ازاء هر یکصد گرم خاک اضافه شد. دمای متوسط روزانه ۱۵ درجه بود. هر عدد میانگین شش تکرار (دو آزمایش مستقل با شرایط یکسان) است. اعداد هر ستون که دارای حروف مشترکی هستند اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ندارند.

جدول ۲: مقایسه کاربرد تلفیقی باکتری و قارچکش کاپتان روی پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود درخاک استریل نشده آلوده به *P. ultimum*

تیمارها	درصد جوانه زنی	گروه بندی آماری	وزن تر بوته(گرم)	گروه بندی آماری
Pf-2	۹۰	ab	۳۳/۱۱	bc
کاپتان +Pf-2	۹۳/۲۳	a	۴۸/۱۵	a
کاپتان+ Pf-3	۸۳/۳۳	ab	۲۸/۹۳	cd
Pf-3	۷۶/۷۰	ab	۲۷/۹۲	d
کاپتان	۷۰	b	۲۸/۴۹	d
شاهد آلوده	۳۰	c	۱۴/۷۵	e
شاهد سالم	۸۳/۳۳	ab	۲۸/۶۵	cd
LSD(0.01)	۲/۰۱۲		۱/۱۷۶	

جمعیت باکتری برای هر دو اینوکولوم حدود 10^9 سلول در میلی لیتر بود. شمارش نهایی بذور جوانه زده و اندازه‌گیری وزن تر نخود ۱۵ روز پس از کاشت بود. استریل کردن خاک به‌وسیله بخار آب ۱۲۱درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ حاوی ۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر به ازاء هر یکصد گرم خاک اضافه شد. دمای متوسط روزانه ۱۵ درجه بود. هر عدد میانگین شش تکرار (دو آزمایش مستقل با شرایط یکسان) است. اعداد هر ستون که دارای حروف مشترکی هستند اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد ندارند.

جدول ۳: ارزیابی گلخانه ای دو روش مختلف کاربرد باکتری روی جوانه‌زنی بذر نخود ایرانی در خاک آلوده به *P. ultimum*

تیمارها	درصد جوانه‌زنی	گروه‌بندی آماری
شاهد آلوده	۱۶/۷	b
آغشته سازی بذر	۳۶/۷	ab
سوسپانسیون پاشی	۴۶/۷	ab
شاهد سالم	۶۳/۴	a
LSD(0.05)	۳/۷۲۳	

به توضیحات جدول ۲ مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

یکی از روش‌های مناسب برای دستیابی به یک باکتری موثر و کارآمد در کنترل بیولوژیک، جداسازی باکتری‌هایی است که می‌توانند در شرایط مختلف زراعی، به‌خوبی به بذر در حال جوانه‌زنی و ریشه گیاه متصل شوند. روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) که برای جداسازی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت برای این منظور به‌کار می‌رود. با توجه به محدویت-های فراوان در کاربرد موفق عوامل کنترل بیولوژیک در شرایط مزرعه، کاربرد تلفیقی چند عامل، و نیز کاربرد تلفیقی آن‌ها با غلظت‌های کاهش یافته سموم به‌عنوان یک استراتژی پیشنهاد شده است (Spadaro and Gullino, 2005).

براساس نتایج پژوهش حاضر، به‌نظر می‌رسد بین قارچ‌کش متالاکسیل و باکتری مورد آزمایش سازگاری بالایی وجود داشته که می‌توان در مبارزه تلفیقی از آن‌ها استفاده نمود. از مجموع دو روش مورد استفاده می توان گفت که کاپتان در غلظت یک در هزار اجازه رشد به باکتری *P. fluorescens* را نمی‌دهد. خط رگرسیون بین غلظت‌های مختلف کاپتان (شکل ۲) بر اساس نتایج روش استفاده از دیسک‌های کاغذی نشان داده شده است.

یکی از موضوعات مهم و اساسی در استفاده عملی از باکتری‌های آنتاگونیست در مزرعه، نحوه آغشته‌سازی اینوکولوم باکتری به بذر یا خاک و در صورت امکان کاربرد توام باکتری با یک قارچ‌کش مناسب می‌باشد. براساس یک پژوهش، تمام قارچکش‌های استاندارد به استثنای تیرام تاثیر سوئی بر روی رشد و بقاء سودوموناس‌های فلورسنت ندارند (والوات و گودیلات، ۱۹۹۰). درمجموع می‌توان اظهار نمود که مبارزه تلفیقی با استفاده از کاربرد توام سموم قارچ‌کش و باکتری‌های آنتاگونیست نه تنها موجب کاهش مصرف سموم شیمیایی می‌گردد بلکه می‌تواند با تاثیر روی عوامل بیماری‌زای خاکزاد، شرایط را به‌نفع عامل آنتاگونیست تغییر دهد. نتایج یک پژوهش بر روی بیماری‌های پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه ناشی از گونه‌هایی از *Pythium* و *Aphanomyces* روی نخود فرنگی موید این مطلب است که کاربرد توام کاپتان و باکتری تاثیر بهتری دارد (پارک و همکاران، ۱۹۹۱). دراین پژوهش مشخص گردید که درصد جوانه‌زنی بذور دراثر باکتری *P. fluorescens* به تنهایی ۴۰/۸ درصد و به همراه کاپتان ۷۸درصد بود. این میزان برای باکتری *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* به تنهایی ۶۰/۶ درصد و به همراه کاپتان ۸۶ درصد بود (پارک و همکاران، ۱۹۹۱). به عقیده بیکر (۱۹۷۸) استفاده از قارچ‌کش به‌همراه باکتری می‌تواند باعث ضعیف شدن بیمارگر و در نتیجه آسیب‌پذیرتر شدن آن در برابر عامل آنتاگونیست به‌شود. هم‌چنین یکی از روش‌های موثر در افزایش کارآیی مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی استفاده از استرین‌های مختلف اعم از باکتری‌ها و قارچ‌های مناسب می‌باشد. بیکر و کلوپر (۱۹۹۰) ضمن تاکید براین موضوع معتقدند که استفاده از استرین‌های مختلف کاربرد آن‌ها را در شرایط مختلف امکان‌پذیر ساخته و طیف تاثیر باکتری‌ها روی بیمارگرهای مختلف را بیشتر می‌نماید. این عمل هم-چنین ناسازگاری‌های احتمالی مربوط به کاربرد توام سموم با باکتری‌های آنتاگونیست را به‌حداقل می‌رساند. این روش به شرایط طبیعی مزرعه نیز نزدیک‌تر است. الگوی تاثیر تیمارهای مورد استفاده روی وزن تر بوته-های نخود پس از دوهفته اندکی متفاوت با تاثیر روی قدرت جوانه‌زنی بود. برای مثال، کاربرد توام قارچ‌کش به همراه جدایه Pf-3 تاثیر بهتری در افزایش وزن تر بوته‌ها نشان داد.

اگرچه در این آزمایش اختلاف معنی‌داری در روش-های کاربرد اینوکولوم مشاهده نشد ولی با توجه تفاوت عددی بین دو تیمار مورد استفاده به‌نظر می‌رسد روش سوسپانسیون‌پاشی به خاک در صورت بهینه سازی تاثیر بهتری در کاهش بیماری دارد. در بررسی‌های هاجدرون و همکاران (۱۹۸۹) اسپری نمودن سوسپانسیون باکتری درون شیارهای بذر موثرتر از آغشته‌سازی بذر بود. این پژوهش‌گران سه امتیاز برای این روش ذکر نموده‌اند. اولاً می-توان مقادیر بیشتری از باکتری را به بستر بذر اضافه نمود. ثانیاً مشکلات پوشش دادن بذر با باکتری و لزوم کاشت بلافاصله بذر وجود ندارد، و نکته سوم این است که در روش آغشته‌سازی

Archive of SID

www.SID.ir

بذر باید به سازگاری باکتری مورد استفاده و قارچ‌کش‌ها توجه لازم و کافی صورت گیرد درحالی‌که در روش اسپری، این مسئله چندان اهمیت ندارد. به‌نظر می‌رسد جمعیت $۱۰^{۹}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر، جمعیت مناسبی برای سطح قابل قبول کنترل بیماری در شرایط مزرعه باشد. با توجه به عوامل موثر محیطی در قدرت کلنیزاسیون باکتری در شرایط طبیعی لازم است جمعیت اولیه باکتری به اندازه کافی باشد. برخی محققین حداقل جمعیت مورد نیاز برای کنترل موثر بیماری را $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۷}$ می‌دانند (ویپس، ۲۰۰۱). البته موفقیت بیوکنترل تا اندازه زیادی تحت تاثیر شرایط محیطی از جمله انواع میکروارگانیسم‌های موجود در ریزوسفر می‌باشد (هوتینک و بوهم، ۱۹۹۹). در یک پژوهش جداگانه، کارآیی روش تیمار بذر گندم پاییزه با استفاده از تعدادی ازباکتری‌های آنتاگونیست ازجمله *P. fluorescens* و *Burkholderia cepacia* به منظور کنترل پوسیدگی ریشه ناشی از گونه مختلف *Pythium* در شرایط مزرعه بررسی و نتایج قابل ملاحظه‌ای به‌دست آمد (میلوس و راثرک، ۱۹۹۷). در این پژوهش هم‌چنین معلوم شد که آن دسته از باکتری-هایی که در مزرعه قدرت بیوکنترل خوبی داشتند، جدایه‌هایی بودند که در آزمایشگاه به خوبی توانسته بودند که از رشد قارچ ممانعت کنند.

سپاسگزاری

بخشی ازاعتبارات این طرح از محل قطب کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی گروه گیاه پزشکی دانشگاه تهران تامین شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

Ahmadzadeh, A., Sharifi Tehrani, A. and Rahimian, H. 1997. Isolation of antagonistic bacteria from chickpea rhizosphere and study on their repression against *Pythium ultimum* casual agent of seed rot and seedling damping-off (In Persian with English abstract). Iranian Journal of Agricultural Sciences 28 (3): 86-96.

Ahmadzadeh, A., Sharifi Tehrani, A., Hejaroud, G. A., Okhovat, M. and Mohammadi, M. 2003. Effect of fluorescent pseudomonads on *Pythium ultimum* casual agent of seed rot of common bean (In Persian with English abstract). Iranian Journal of Agricultural Sciences 34 (2): 807-822.

Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biologial control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 25: 67-85.

Baker, R., and Kloepper, J. 1990. Recent work on growth promoting and biocontrol. pp 104-106. In Keel, C., Koller, B. and Defago, G. eds. Plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlacen, Switzerland .

Dick, M. W. 1990. Key to *Pythium.* Department of Botany School of plant sciences, University of Reading. 64pp.

Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseaes. Ann. Rev. Phtyopatol 26: 75-91.

Gould, W. D., Hagedorn, C., Bardinelii, T. R. and Zablotowicz, R. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. Microbiol. 49:28 –32.

Hagedorn, C., Gould, W. D. and Bardinelli, T. R. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2793 –2797.

Hjeljord, L. and Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control an overview. In: G.E. Harman and C.P. Kubicek, Editors, *Trichoderma & Gliocladium*— Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, Taylor & Francis Ltd, London, Great Britain (1998), pp. 131–151.

Hoitink, H. and Boehm, M. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. Ann. Rev. Phytopathol. 37:427-Howell, C. R., and R. D. Stipanovic. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced: damping- off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* an its antibiotic pyoluteorin. Phytopathology 70: 712- 715.

Kaiser, W. J., Danesh, D., Okhovat, M. and Mosahebi, G. H. 1968. Diseases of pulse crops (edible legumes) in Iran (In Persian with English abstract). Iranian Journal of Agricultural Sciences 12: 6-11.

Kaiser, W. J., Hannan, R. M. and Weller, D. 1989 .Biological control of seed rot and pre-emergence damping -off of chickpea with fluorescent pseudomonads .Soil Biol .Biochem. 21: 269-273 .

Keel, C. and Defago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gange AC, Brown VK, eds. Multitrophic interactions in terrestrial system. Oxford: Blackwell Science 27-47.

Kloepper, J. W .and Schroth, M. N. 1981. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotics conditions. Phytopathology 71: 642-644.

Milus, E. A. and Rothrock, C. S. 1997. Efficacy of bacteria seed treatments for controlling *Pythium* root rot of winter wheat. Plant Dis. 81: 180-184.

Parke, J. L., Joy, R. E. and King, E .B. 1991. Biological control of *Pythium* damping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomona cepacia* or *P. fluorescens* to seed. Plant Dis. 75: 987-992.

Sharifi Terani, A., Ahmadzadeh, M., Farzaneh, M. and Sarani, S. A. 2007. Effect of powder formulations of two strains of *Pseudomonas fluoresens* for control of rapeseed damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in greenhouse and feild condition (In persian with english abstract). Iranian Journal of Agricultural Sciences 37 (6): 1121-1130.

Spadaro, D. and Gullino, M. L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. Crop Protection 24: 601-613.

Archive of SID

www.SID.ir

Tarpero–Casas, A., Kaiser, W. J. and Ingram, D. M. 1990. Control of *Pythium* seed rot pre-emergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. Plant Disease 74: 563-569.

Valvat, B. and Gaudillat, M. 1990. Interaction between bacterization and pesticidal treatments. p 101. In Keel, C., Koller, B. and Defago, G (eds). Plant growth promoting rhizobacteria.The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlacen, Switzerland.

Waterhouse, G. M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycological papers. Commonwealth Mycological Institude, Kew 109: 1-15.

Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407.

Weller, D. M. and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73: 463-469.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-51.

Archive of SID

www.SID.ir

Study on Effect of *Pseudomonas fluorescens* in Combination with Metalaxyl Against the *Pythium ultimum* Casual Agent of Seed rot and Pre-emergence of Chickpea

Ahmadzadeh[1], M. and Sharifi Tehrani[2], A.

Abstract

Chickpea seed rot and seedling pre-emergence damping-off caused by *Pythium ultimum* is one of the most devastating diseases in Iran. Consequently, growers can expect as much as >80% reduction in stand and yield if measures are not taken to control the disease. The fungus used in this work was isolated from chickpea seeds, and identified as *P. ultimum* var. *ultimum*. It caused a 57.7 percent reduction of seed emergence in greenhouse trials. In the current study, the biocontrol potential of four antagonistic bacteria against the *P. ultimum* were evaluated. *Pseudomonas fluorescens* Qz29R, a well-known biocontrol agent obtained from the Washington State University, was comparatively used as a control. The performance of these bacteria was greatly influenced by different types of inoculation and their application methods. 95% if seeds coated with the biocontrol bacterium *P. fluorescens* isolate Pf-2 could considerably germinate in the prescenc of the *P. ultimum* in the plate assay. It appears to be a compatibility of bacterial treatments with metalaxyl, so that it may be applied in combination with the fungicide. Metalaxyl had no inhibitory effect on bacterial growth at different concentration used in this study. Captan inhibited the bacterial growth at the concentration of 10^{-3}. In sterilized soil, metalaxyl was the most effective treatment, regarding the seedling stand and increased fresh weight of chickpeas. Isolate Pf-3 was considerably more effective than Pf-2, resulting in greater ($P<0.05$) seedling stand.

Keywords: Chickpea, Seed rot, Rhizobacteria, Seed bacterization, Biocontrol

Archive of SID

1 and 2. Associate Professor and Professor respectively, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tehran University

www.SID.ir