مجله علوم كشاورزي ايران
جلد ۳۷، شماره ٤، سال ۱۳۸۵ (۶۸۶-۶۷۱)

# بررسي تاثير باكتريهاي آنتاگونيست بر كنترل بوته ميري سويا در اثر *Phytophthora sojae*

عبداله زبرجد*[۱]، عباس شريفي تهراني[۲]، قربانعلي حجارود[۳] و مجتبي محمدي[٤]
۱، عضو هيئت علمي مركز تحقيقات كشاورزي و منابع طبيعي ايرانشهر
۲، ۳، ٤، اعضاي هيئت علمي پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
(تاريخ دريافت: ۸۳/۷/۲۲ - تاريخ تصويب: ۸٤/۱۲/۱٦)

## چكيده

در اين تحقيق خاصيت آنتاگونيستي ۱۵۸ باكتري جدا شده از ريزوسفر سويا در مقابل ***Phytophthora sojae*** عامل بوته‌ميري سويا به روش كشت متقابل بررسي شد. از اين تعداد ٦٦ جدايه گرم مثبت، ۹۲ جدايه گرم منفي تشخيص داده شدند. براي مطالعات گلخانه‌اي ۱۰۰ جدايه آنتاگونيست كه هاله بازدارندگي ۳ و بيش از ۳ ميليمتر در مقابل ***P. sojae*** ايجاد كرده بودند انتخاب شدند. نتايج آزمايشات گلخانه‌اي كه در قالب طرح فاكتوريل با دو عامل محلول‌پاشي خاك و پوشش بذر انجام شد، نشان داد جدايه‌هاي **B3**، **B80**، **B12**، **B43**، **B51**، **B63** و **B64** در هر دو روش تاثير يكسان يا بيشتري نسبت به فارچكش ريدوميل ام-زد از لحاظ كاهش درصد بيماري داشتند. در روش محلول‌پاشي خاك هر كدام از جدايه‌هاي **B3** و **B43** با ۷۰/۸٤% ، جدايه‌هاي **B63** و **B51** هر كدام با ۵۸/۳٤% جدايه **B12** با ٦٦/٦۷% ، جدايه **B80** با ۵٤/۱۷% و جدايه **B64** با ۵۰% بيشترين تاثير را در كاهش بوته‌ميري سويا داشتند. در روش پوشش بذر هر كدام از جدايه‌هاي **B43**، **B51** و **B63** موجب ۵۰ درصد كاهش بيماري شدند در حاليكه اين ميزان براي جدايه‌هاي **B3**، **B12**، **B80** و **B64** به ترتيب ٦۲/۵، ۵۸/۳٤، ٤۵/۸٤ و ۳۷ درصد بود. نوع روش كاربرد آنتاگونيست‌ها تاثيرات متفاوتي در كاهش درصد بوته‌ميري داشت. دو جدايه **B3** و **B12** در روش محلول‌پاشي خاك تاثير بيشتري در كنترل بيماري نسبت به روش پوشش بذر داشتند. جدايه‌هاي **B43**، **B63**، **B51**، **B80** و **B64** در هر دو روش محلول‌پاشي خاك و پوشش بذر تاثير يكساني در كنترل بيماري داشتند. نتايج حاصل از ضرايب رگرسيون مشخص كرد كه بين قابليت كلونيزاسيون ريشه سويا توسط جدايه‌هاي آنتاگونيست با كنترل بيماري در هر دو روش محلول‌پاشي خاك و پوشش بذر همبستگي بالايي وجود دارد. بر اساس آزمون‌هاي افتراقي جدايه‌هاي **B3** ، **B12** و **B80** در جنس ***Bacillus* spp.** و جدايه‌هاي **B43** ، **B51** ، **B63** و **B64** در جنس ***Pseudomonas* spp.** قرار گرفتند. در بررسي تاثير تركيبات فرار آنتاگونيست‌ها، ۳ جدايه ***Bacillus*** (**B3**، **B12** و **B80**) از رشد كلني ***Phytophthora sojae*** جلوگيري كرده و افزودن ۲% گلوكز به محيط‌كشت‌هاي **PDA** و **NA** اين خاصيت را افزايش داد. ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه‌هاي ***Bacillus*** نيز موجب توقف رشد كلني ***P. sojae*** گرديد. هر ٤ جدايه ***Pseudomonas*** علاوه بر توليد آنتي‌بيوتيك، با توليد تركيبات فرار نيز از رشد ***P. sojae*** جلوگيري كردند. دو جدايه **B43** و **B63** قادر به توليد سيدروفور بودند همچنين هر ٤ جدايه ***Pseudomonas*** سيانيد هيدروژن توليد كردند اما جدايه‌هاي ***Bacillus*** نتوانستند **HCN** توليد نمايند. بررسي كلونيزاسيون ريشه سويا نشان داد كه جدايه‌هاي **B3** ، **B12** ، **B63** ، **B43** ، **B51** ، **B80** و **B64** به ترتيب با ۸۱٤، ۷۷۱، ۷۰۳، ۷۰۰، ٦۹٤، ٦۵۵ و ۵٤۱ برابر كردن جمعيت خود، بيشترين ميزان قابليت كلونيزاسيون ريشه سويا را داشتند.

واژه‌هاي كليدي: سويا، ***Phytophthora sojae*** ، ***Bacillus*** ، ***Pseudomonas***، آنتاگونيست

---

* نويسنده مسئول: عبداله زبرجد
E-mail:roohia2002@yahoo.com

## مقدمه

يكي از مهمترين بيماري‌هاي خاكزاد سويا بوته ميري فيتوفترايي است. اولين گزارش توصيفي اين بيماري از ايالات متحده آمريكا توسط كافمن و ژردمن (۱۹۵۸) ارايه شد. اين بيماري در ايران اولين بار توسط رضايي و عليزاده (۱۳۷۷) از استان لرستان گزارش گرديد. وجود اين بيماري در اغلب مناطق كشت سويا از جمله استان‌هاي لرستان، گلستان و مازندران مشاهده شده است. خسارت اين بيماري در برخي مناطق شديد بوده و يكي از عوامل محدود كننده كشت سويا به شمار مي‌رود (۱).

كاربرد باكتري‌هاي تحريك كننده رشد گياهان در سال ۱۹۵۰ در روسيه آغاز شد اما اعتبار علمي آن در سال ۱۹۷۰ به تاييد رسيد(۳). برادبنت و همكاران (۱۹۷۱) از ميسيليومهاي *Sclerotinia rolfsii* جدايه *Bacillus subtilis* A-13 را جداسازي و عنوان كردند كه اين جدايه غيراختصاصي عمل كرده و عليه بيمارگرهاي متعددي موثر است. هندلسمن و همكاران (۱۹۹۰) در تحقيقي با كاربرد جدايه *Bacillus cereus* UW85 بوته ميري فيتوفترايي يونجه را كاهش دادند. بنكل و همكاران (۱۹۹۸) كاهش شدت بيماري پوسيدگي پيتيومي لوبيا چشم بلبلي به هنگام تيمار با آنتاگونيست‌هاي *B. cereus* و *B. subtilis* را گزارش كردند. هاول و استيپانوويچ (۱۹۷۹) اولين بار به نقش سودوموناسهاي فلورسانت در كنترل بيماري‌هاي گياهي پي بردند و نقش آنتي‌بيوتيك‌هاي پيولوتئورين و پيرول نيترين توليد شده توسط جدايه‌اي از *Pseudomonas fluorescens* را در بازدارندگي از رشد ميسيليومي *Pythium ultimum* به اثبات رساندند. هاجدرون و همكاران (۱۹۸۹) سودوموناسهاي جداسازي شده از ريزوسفر گياهان مختلف را بعنوان موثرترين آنتاگونيست‌ها عليه *Rhizoctonia solani* و *Pythium ultimum* در شرايط آزمايشگاهي معرفي كردند. فريرا و همكاران (۱۹۹۱) نشان دادند كه جدايه‌اي از *B. subtilis* با توليد آنتي بيوتيك مانع از رشد ميسيليومي و جوانه‌زني اسپور *Eutypa lata* مي‌گردد. كاجي مورا و همكاران (۱۹۹۵) آنتي بيوتيك‌هاي باسيلوپپتين آ، ب و ث را از جدايه *B. subtilis* FR-2 استخراج و عنوان كردند باسيلوپپتين ث روي قارچها داراي خواص آنتاگونيستي است. ويرژن-كالروس و همكاران (۱۹۹۶) عنوان كردند ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه *B. circulans* از رشد ميسيليومي و جوانه‌زني كنيديهاي فوزاريوم جلوگيري مي‌كند. فيدامن و روزال (۱۹۹۳) گزارش كردند جدايه‌اي از *B. subtilis* با توليد تركيبات فرار از رشد ميسيليومي *P. ultimum* ممانعت بعمل مي‌آورد. شريفي تهراني و همكاران (۱۹۹۸) نقش آنتي بيوتيك‌هاي 2,4-diacetyl phloroglucinol جدايه‌هاي سودوموناس فلورسانت را در كاهش بيماري پوسيدگي ريشه و طوقه گوجه فرنگي در اثر *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercisi* به اثبات رساندند. كلوير و همكاران (۱۹۸۰) براي نخستين بار به اهميت سيدروفورها بعنوان يكي از مكانيزمهاي مهم بيوكنترل پي بردند. شروث و هنكوك (۱۹۸۲) معتقدند توانايي يك آنتاگونيست در كلونيزه كردن ريشه يك شرط مهم در توانايي آن براي كنترل بيماري‌هاي ريشه است. شر و همكاران (۱۹۸۴) باكتري‌هايي را كلونيزه كننده مي‌دانند كه قادر باشند $۵\times۱۰^{۹}$ واحد تشكيل كلني به ازاي هر گرم ريشه ايجاد نمايند. برخي از محققين معتقد به ممانعت رشد بيمارگرهاي گياهي توسط سيانيد هيدروژن هستند. ووتريخ و دفاگو (۱۹۹۰) عقيده دارند كه سيانيد هيدروژن موجب بروز مقاومت القايي در گياه مي‌گردد.

اين تحقيق با توجه به وجود مشكلات اقتصادي و زراعي در اجراي صحيح تناوب، كاربرد سموم شيميايي در خاك و نگراني‌هاي زيست محيطي ناشي از آن كه موجب ايجاد محدوديت و مشكلات جدي در زمينه كنترل بيماري بوته‌ميري سويا شده است به منظور بررسي امكان كنترل بيولوژيك اين بيماري با استفاده از جدايه‌هاي باكتريايي صورت پذيرفت.

## مواد و روش‌ها

### منبع عامل بيماريزاي قارچي

در اين بررسي از قارچ *Phytophthora sojae* (جدايه لرستان)كه توسط رضايي و عليزاده (۱۳۲۷) از ريشه‌هاي سويا جداسازي شده بود، مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازي و انتخاب باکتري‌هاي آنتاگونيست

خاك منطقه ريزوسفر سويا از مناطق سوياکاري استان گلستان جمع آوري و به آزمايشگاه منتقل شدند. پس از مخلوط کردن خاکها، يك گرم از آن را در ۱۰ ميلي‌ليتر آب مقطر سترون ريخته و غلظتهاي مختلف بطور سريال در محلول يك درصد پپتون تهيه گرديد. به کمك پي‌پت اپندورف ۱۰۰ ميکروليتر از هر رقت به محيط‌کشت‌هاي NA و King's B منتقل و به کمك ميله شيشه‌اي در سطح محيط کشت پخش شدند و پس از ٤٨ ساعت نگهداري در دماي ۲۸ درجه سانتيگراد پرگنه‌هايي که از نظر شکل و رنگ در محيط NA متفاوت بودند انتخاب و درون لوله آزمايش حاوي NA خالص‌سازي و شماره گذاري شدند. در محيط کشت King's B پرگنه‌هايي که رنگدانه فلورسانت ايجاد مي‌کردند با استفاده از نور ماوراء بنفش با طول موج ٣٦٦ نانومتر انتخاب و با استفاده از محيط کشت NA درون لوله آزمايش خالص سازي و شماره گذاري شدند.

جدايه‌هاي باکتريايي بصورت نقطه‌اي درچهار طرف تشتك‌هاي پتري حاوي محيط کشت CMA به فواصل مساوي از مرکز مايه‌کوبي شده و به مدت ٢٤ ساعت دردماي ۲۸ درجه سانتيگراد قرار داده شدند. يك قرص ۵ ميليمتري ازحاشيه کشت ۵ روزه قارچ *Phytophthora sojae* درمرکز تشتك‌هاي پتري قرار داده شدند. در تشتك پتري شاهد آب مقطر سترون درچهار طرف تشتك پتري مايه کوبي شد و درمرکز آن قرص قارچي قرار داده شد. تشتك‌هاي پتري دردماي ۲۵ درجه سانتيگراد نگهداري شده وپس از گذشت ۱۲ روز که حاشيه پرگنه قارچ درتشتك پتري شاهد به ديواره پتري برخورد نموده بود فواصل بازدارندگي بين حاشيه پرگنه جدايه‌هاي باکتريايي و قارچ اندازه‌گيري گرديد. جدايه‌هايي که بيشترين هاله بازدارندگي را باعث شده بودند، براي بررسي‌هاي بعدي انتخاب شدند.

بررسي‌هاي گلخانه‌اي

تهيه مايه تلقيح قارچ ***P. sojae*** روي لوبيا چيتي

مقدار ۱۲۰ گرم لوبيا چيتي شسته شده را درون ارلن مايز با گنجايش ۲۵۰ ميلي‌ليتر ريخته و به آن ۲٤۰ ميلي‌ليتر آب مقطر افزوده شد. سپس ۳ روز متوالي و هر روز به مدت ۱ ساعت در دماي ۱۲۱ درجه سانتيگراد و فشار ۱/۵ کيلوگرم بر سانتيمتر مربع سترون گرديد. قرصي از حاشيه کشت ۵ روزه قارچ در شرايط بدون آلودگي به ارلن فوق‌الذکر اضافه شد.

تهيه مايه تلقيح جدايه‌هاي آنتاگونيست

مطابق روش بر و همکاران (۱۹۷۸) انجام شد. روي محيط‌کشت‌هاي PDA و NA به ترتيب ۱ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون کدر کشت جوان جدايه‌هاي سودوموناس فلورسانت و باسيلوس به وسيله ميله شيشه‌اي پخش گرديد. تشتك‌هاي پتري به مدت ٤٨ ساعت در دماي ۲۸ درجه سانتيگراد نگهداري شدند. کشت ٤٨ ساعته باکتري‌ها با اضافه نمودن ۱۰ ميلي‌ليتر آب مقطر سترون به صورت سوسپانسيون کدر درآمد. سوسپانسيون هر جدايه به درون لوله‌هاي آزمايش منتقل و به آرامي تکان داده شد تا يکنواخت گردد. جهت تعيين جمعيت هر جدايه عمل رقيق سازي بطور سريال انجام شد. بدين ترتيب که ۱۰۰ ميکروليتر از سوسپانسيون کدر هر جدايه به ۹۰۰ ميکروليتر آب مقطر سترون اضافه گرديد و پس از هشت بار رقيق‌سازي بطور سريال، ۱۰۰ ميکروليتر از هر رقت به تشتك‌هاي پتري حاوي NA منتقل و به کمك ميله شيشه‌اي در سطح محيط کشت پخش گرديدند. تشتك‌هاي پتري در دماي ۲۷ درجه سانتيگراد قرار داده شدند و شمارش پرگنه‌هاي باکتريايي بعد از گذشت ٤٨ ساعت انجام شد.

در روش محلول‌پاشي خاك مقدار ۵۰ ميلي‌ليتر از سوسپانسيون هر جدايه حاوي $۵۰\times۱۰^{۱۰}$ واحد تشکيل پرگنه[1] (cfu $۱\times۱۰^{۹}$ به ازاي هر گرم خاك) به هر گلدان مرطوب اضافه شد. در روش پوشش بذر غلظت جدايه‌ها به ميزان cfu $۱\times۱۰^{۹}$ در هر ميلي‌ليتر در صمغ عربي يك درصد تنظيم شد. بذور سوياي رقم ويليامز با هيپوکلريت سديم يك درصد به مدت دو دقيقه سترون شدند. بذور سترون شده به مدت ۱۵ دقيقه در سوسپانسيون هر جدايه غوطه‌ور شدند. آنگاه بذور با پودر تجاري ريزوبيوم به ميزان ۰/۰۱٦ گرم به ازاي هر گرم بذر در شرايط بدون آلودگي آغشته شدند. جهت تنظيم غلظت جدايه‌هاي باکتريايي از فرمول زير استفاده شد.

1. Colony forming unit

غلظت مورد نظر/غلظت موجود=عامل رقت

اگر از عامل رقت عدد يك كسر گردد حجم آب لازم (ميلي‌ليتر) براي اضافه كردن به ١ ميلي‌ليتر غلظت موجود، براي بدست آوردن غلظت مورد نظر حاصل مي‌شود.

بررسي تاثير جدايه‌هاي آنتاگونيست در جلوگيري از بوته ميري فيتوفترايي سويا در شرايط گلخانه

جهت تعيين ميزان تاثير آنتاگونيست‌هاي باكتريايي در كاهش و يا كنترل بوته‌ميري فيتوفترايي سويا در گلخانه ١٠٠ جدايه باكتريايي كه در در بررسي‌هاي آزمايشگاهي هاله بازدارندگي ٣ و بيشتر از ٣ ميليمتر ايجاد كرده بودند انتخاب شدند. براي هر جدايه دو روش كاربرد شامل محلول‌پاشي خاك و پوشش بذر استفاده گرديد. در روش محلول‌پاشي خاك جدايه‌هاي باكتريايي پس از كاشت به خاك مرطوب اضافه شده و ٧٢ ساعت بعد ٣ گرم مايه تلقيح قارچ فيتوفترا با خاك مخلوط گرديد. در روش پوشش بذر ٣ گرم مايه تلقيح قارچ فيتوفترا ٧٢ ساعت بعد از كاشت به خاك افزوده شد. از قارچكش ريدوميل ام-زد جهت مقايسه جدايه‌هاي آنتاگونيست به ميزان يك گرم در متر مربع استفاده شد. در تمامي بررسي‌هاي گلخانه‌اي از گلدان‌هاي پلاستيكي با قطر ١٣ سانتيمتر استفاده شد. هر گلدان مورد آزمايش حاوي ٥٠٠ گرم خاك سترون بود و در هر گلدان ٤ عدد بذر رقم ويليامز در عمق ٤ سانتيمتري كاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه آزمايشگاه كنترل بيولوژيك دانشكده كشاورزي كرج و در حرارت ٣±٢٧ درجه سانتيگراد با تناوب نوري ١٥ ساعت روشنايي و ٩ ساعت تاريكي نگهداري شدند. شرايط آزمايشگاه در تمام مراحل انجام آزمايش از نظر دما و نور يكسان بود. بررسي‌هاي گلخانه‌اي در پنج مرحله جداگانه و در هر مرحله ٢٠ جدايه باكتريايي با دو روش كاربرد شامل محلول‌پاشي خاك و پوشش بذر به صورت طرح كاملاً تصادفي در قالب آزمايش‌هاي فاكتوريل با دو عامل جدايه باكتريايي و روش كاربرد انجام شد. در هر مرحله، تيمار شاهد آلوده حاوي ٣ گرم مايه تلقيح قارچ فيتوفترا در هر گلدان و شاهد غيرآلوده حاوي ٣ گرم لوبيا چيتي سترون شده فاقد مايه تلقيح قارچ فيتوفترا در هر گلدان بود و براي هر تيمار ٤ تكرار در نظر گرفته شد. داده‌هاي بدست آمده از آزمايش (تعداد بوته‌هاي سالم ) پس از چهار هفته مورد تجزيه و تحليل آماري قرار گرفتند. چون در بين داده‌ها عدد صفر وجود داشت از تبديل جذري $\sqrt{x+1}$ استفاده شد. براي تعيين درصد تاثير جدايه‌هاي باكتريايي در كاهش بوته‌ميري از روابط زير استفاده شد.

١٠٠×[تعداد بوته‌هاي سالم در شاهد غيرآلوده / (تعداد بوته‌هاي سالم در تيمار-تعداد بوته‌هاي سالم در شاهد غيرآلوده)] =درصد بوته ميري در تيمار

درصد بوته ميري در تيمار- درصد بوته ميري در شاهد آلوده= درصد كاهش بيماري در تيمار

براي شاهد آلوده ٣ گرم مايه تلقيح قارچ فيتوفترا در هر گلدان و براي شاهد غيرآلوده فقط ٣ گرم لوبيا چيتي سترون شده فاقد مايه تلقيح قارچ فيتوفترا در هر گلدان قرار داده شد. محلول‌پاشي خاك گلدان‌ها نيز با ٥٠ ميلي‌ليتر از قارچكش ريدوميل ام-زد به ميزان يك گرم ماده موثره در متر مربع (١٨/٠٥ ميلي‌گرم در هر گلدان) انجام شد.

آزمون‌هاي افتراقي جهت تشخيص جنس جدايه‌هاي آنتاگونيست

جنس جدايه‌هاي انتخاب شده در بررسي‌هاي گلخانه‌اي (B3 ، B12 ، B43 ، B51 ، B63 ، B64 و B80)، طبق آزمون‌هاي واكنش گرم در پتاس ٣ درصد به روش ساسلو و همكاران (٣٨) آزمون رشد هوازي و بي‌هوازي به روش فهي و همكاران (١٢)، توليد رنگدانه فلورسانت روي محيط كشت King's B، توليد كلني‌هاي زرد يا نارنجي روي محيط كشت YDCو رنگ‌آميزي اسپور به روش شاد (١٩٨٨) شناسايي شد.

بررسي مكانيسم تاثير جدايه‌هاي ***Bacillus*** روي قارچ فيتوفترا در شرايط آزمايشگاه

بررسي تاثير تركيبات فرار ضد قارچي

اين تحقيق مطابق روش فيدامن و روزال (١٩٩٤) انجام شد. جهت انجام اين بررسي، از محيط كشت‌هاي PDA و NA حاوي ٢ درصد دي- گلوكز (NAG) جهت كشت باكتري به شرح زير استفاده شد.

سوسپانسيون كدري از كشت ٧٢ ساعته جدايه‌هاي *Bacillus* (B3 ، B12 و B80) در ٥ ميلي‌ليتر آب مقطر سترون تهيه و مقدار ٢٠٠ ميكروليتر آن روي محيط كشت‌هاي

NAG و PDA به كمك ميله شيشه‌اي پخش گرديد. تشتك‌هاي پتري در دماي ٢٧ درجه سانتيگراد به مدت ٢٤ ساعت نگهداري شدند. در بخش ديگر اين تحقيق، محيط كشت CMA تهيه و مقدار ٢٠ ميلي‌ليتر به هر تشتك پتري اضافه شد. پس از خنك و منعقد شدن محيط كشت، قرص‌هايي به قطر پنج ميلي‌متر از حاشيه كشت پنج روزه قارچ فيتوفترا در مركز هر تشتك پتري قرار داده شد سپس در شرايط بدون آلودگي، تشتك‌هاي پتري حاوي قارچ و باكتري آنتاگونيست روي هم قرار گرفته و توسط نوار پارافيلم كاملاً مسدود و پتري‌ها به مدت يك هفته در دماي ٢٥ درجه سانتي‌گراد نگهداري شدند. در تشتك پتري شاهد، قرص‌هايي به قطر پنج ميليمتر از محيط كشت CMA حاوي قارچ فيتوفترا در مقابل تشتك‌هاي پتري حاوي محيط كشت‌هاي PDA و NAG فاقد جدايه‌هاي آنتاگونيست قرار داده شدند. اين آزمايش در قالب طرح كاملاً تصادفي شامل ٤ تيمار در ٣ تكرار (براي هر نوع محيط كشت) انجام شد. داده‌هاي بدست آمده از آزمايش (قطر رشد كلني) تحت نرم‌افزار آماري SAS مورد تجزيه و تحليل قرار گرفتند. در صد بازداري از رشد كلني فيتوفترا با استفاده از رابطه زير محاسبه شد.

١٠٠×[قطر رشد پرگنه شاهد/( قطر رشد پرگنه تيمار – قطر رشد پرگنه شاهد)]= درصد بازداري از رشد (رابطه١)

بررسي‌تاثير ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه‌هاي ***Bacillus***

اين آزمايش بر اساس روش سينگ و دورال (١٩٨٤) انجام شد. در بخش نخست، محيط كشت مايع با فرمول ٢٥٠ گرم سيب‌زميني، ٢٠ گرم دكستروز، در يك ليتر آب مقطر تهيه گرديد. درون ارلن مايرهاي با گنجايش ٢٥٠ ميلي‌ليتر، مقدار ٥٠ ميلي‌ليتر از محيط مايع فوق را ريخته و در شرايط اتوكلاو سترون شدند. پس از خنك شدن محيط مايع، به هر يك از ارلن مايرها يك لوپ كامل از كشت ٢٤ ساعته باكتري اضافه شد. ارلن مايرهاي حاوي باكتري روي دستگاه تكان دهنده با ٧٠ دور دقيقه در دماي ٢٥ درجه سانتي‌گراد به مدت يك هفته قرار داده شدند و پس از عبور محيط مايع جدايه‌ها از كاغذ صافي واتمن شماره يك و سانتريفوژ در g×٨٠٠٠ به مدت ٢٠ دقيقه، هر يك از جدايه‌ها بطور جداگانه توسط صافي‌هاي ميكروبيولوژيك ٠/٢٢ ميكروني صاف گرديدند و عصاره حاصل از هر يك از جدايه‌هاي مذكور در آزمون بازدارندگي از رشد كلني فيتوفترا بكار برده شد. جهت بررسي تاثير عصاره حاصله ابتدا محيط كشت CMA با حجم‌هاي ١٩، ١٧ و ١٥ ميلي‌ليتر درون لوله ريخته شد و پس از سترون شدن در شرايط اتوكلاو به ترتيب ١ ميلي‌ليتر (غلظت ٥ درصد حجم به حجم)، ٣ ميلي‌ليتر (غلظت ١٥ درصد) و ٥ ميلي‌ليتر(غلظت٢٥ درصد) از عصاره هر يك از آنتاگونيست‌ها به لوله‌هاي CMA با دماي ٤٥ درجه سانتيگراد اضافه و به خوبي مخلوط و در شرايط سترون به تشتك‌هاي پتري منتقل گرديدند. در تيمار شاهد از محيط كشت مايع آرد ذرت فاقد باكتري كه از صافي ٠/٢٢ ميكروني عبور داده شده بود استفاده گرديد. پس از انعقاد محيط كشت، در مركز هر تشتك پتري يك قرص به قطر پنج ميلي‌متر از حاشيه كشت پنج روزه قارچ فيتوفترا كشت داده شد و اندازه‌گيري قطر كلني هر روز و به مدت ١٠ روز پس از كشت قارچ انجام گرفت. اين آزمايش بصورت فاكتوريل با ٢ عامل و با متن كاملاً تصادفي به اجرا در آمد. عامل اول جدايه آنتاگونيست در سه سطح و عامل دوم غلظت در ٤ سطح بود. براي هر يك از غلظت‌ها ٣ تكرار در نظر گرفته شد. قطر رشد كلني در هر غلظت مورد تجزيه و تحليل آماري قرار گرفتند. درصد بازداري از رشد كلني از رابطه ذكر شده در بند ١-٥ محاسبه گرديد.

بررسي مكانيسم تاثير جدايه‌هاي ***Pseudomonas***

بررسي توليد تركيبات فرار ضد قارچي

در اين بررسي از روش كراس و لوپر (١٩٩٠) استفاده شد. ابتدا ٢٠٠ ميكروليتر از سوسپانسيون كدر جدايه‌هاي سودوموناس فلورسانت (B43 ، B51 ، B63 و B64) به كمك ميله شيشه‌اي در سطح محيط كشت PDA و NAG پخش شد و تشتك‌هاي پتري به مدت ٧٢ ساعت در دماي ٢٧ درجه سانتيگراد نگهداري گرديدند. سپس قرص‌هايي به قطر پنج ميلي‌متر از حاشيه كشت پنج روزه قارچ فيتوفترا در مركز تشتك‌هاي پتري حاوي CMA كشت گرديدند، آنگاه در كنار شعله با رعايت شرايط سترون، تشتك‌هاي پتري حاوي قارچ بطور وارونه روي تشتك‌هاي پتري حاوي جدايه‌هاي آنتاگونيست قرار داده شدند و لبه تشتك‌هاي پتري روي هم قرار گرفته، توسط نوار پارافيلم كاملاً مسدود شدند. تشتك‌هاي پتري در دماي ٢٧ درجه سانتيگراد و به مدت يك هفته نگهداري شدند.

در تشتك پتري شاهد فقط قرصي از محيط كشت CMA حاوي قارچ فيتوفترا در مقابل تشتك پتري حاوي PDA و NAG بدون آنتاگونيست قرار داده شد. اين آزمايش در قالب طرح كاملاص تصادفي شامل ٥ تيمار در ٣ تكرار (براي هر نوع محيط كشت) به اجرا درآمد. داده‌هاي بدست آمده از آزمايش(قطر رشد كلني) مورد تجزيه و تحليل آماري قرار گرفتند. درصد بازداري از رشد كلني مطابق بند ١-٥ تعيين گرديد.

بررسي توليد آنتي بيوتيك

اين آزمون مطابق روش كراس و لوپر (١٩٩٠) انجام شد. بدين ترتيب كه ١٠٠ ميكروليتر از سوسپانسيون جدايه‌هاي B43 ، B51 ، B63 و B64 و آب مقطر سترون به عنوان شاهد به محيط كشت CMA اضافه و توسط ميله شيشه‌اي در سطح محيط كشت پخش شد و به مدت ٧٢ ساعت در دماي ٢٧ درجه سانتيگراد نگهداري شدند. پس از اين مدت با استفاده از ميله شيشه‌اي و آب مقطر سترون، جدايه‌ها از سطح محيط كشت شسته و تشتك‌هاي پتري بطور وارونه ٣٠ دقيقه در معرض بخار كلروفرم قرارگرفتند. سپس يك قرص به قطر پنج ميلي‌متر از حاشيه كشت پنج روزه قارچ فيتوفترا با رعايت شرايط بدون آلودگي، در مركز هر تشتك پتري كشت داده شد. تشتك‌هاي پتري در دماي ٢٧ درجه سانتيگراد نگهداري و اندازه‌گيري قطر رشد كلني پس از ١٠ روز انجام گرديد. اين آزمايش در قالب طرح كاملاً تصادفي شامل ٥ تيمار در ٣ تكرار انجام شد و داده‌هاي بدست آمده از آزمايش (قطر رشد كلني) مورد تجزيه و تحليل آماري قرار گرفتند. درصد بازداري از رشد كلني مطابق بند ١-٥ تعيين گرديد.

بررسي توليد سيدروفور

اين بررسي مطابق روش ولر و كوك (١٩٨٣) انجام شد. جدايه‌هاي B43 ، B51 ، B63 و B64 روي محيط كشت King's B حاوي غلظت‌هاي ٥، ٥٠ و ١٠٠ ميكرومول كلريد آهن كشت داده شدند و به مدت ٤٨ ساعت در دماي ٢٥ درجه سانتيگراد نگهداري شدند. سپس سوسپانسيون اسپور قارچ *Geotrichum candidum* از يك كشت ٤٨ ساعته روي محيط كشت PDA بر سطح تشتك پتري حاوي جدايه‌هاي آنتاگونيست افشانه شد. عدم رشد قارچ در اطراف باكتري، نشان دهنده توليد سيدروفور مي‌باشد.

بررسي توليد سيانيد هيدروژن

اين آزمون بر اساس روش كاستريك و كاستريك (١٩٨٣) انجام شد. بدين ترتيب كه سوسپانسيون كدري از كشت ٢٤ ساعته جدايه‌هاي *Pseudomonas* شامل B43 ، B51 ، B63 و B64 و *Bacillus* شامل B3 ، B12 و B80 در آب مقطر تهيه و مقدار ١٠٠ ميكروليتر از هر جدايه در سطح محيط كشت آگار مغذي پخش گرديد. آنگاه قطعاتي از كاغذ صافي به ابعاد ١ ×١ سانتيمتر مربع در محلول حاوي معرف سيانيد هيدروژن شامل ٥ ميلي‌گرم از اتيل استات مس دو ظرفيتي و ٥ ميلي‌گرم (methylen bis-(-N-N- dimethylanilin )-4-4 در دو سانتي‌متر مكعب كلروفرم غوطه‌ور گرديدند. سپس قطعات آغشته به معرف درون درب تشتك پتري قرار گرفته و تشتك‌هاي پتري بطور وارونه در دماي ٢٨ درجه سانتيگراد نگهداري شدند. تغيير رنگ كاغذ صافي از سبز به آبي نشان دهنده توليد سيانيد هيدروژن مي‌باشد.

بررسي كلونيزاسيون ريشه

مطابق روش شر و همكاران(١٩٨٤)انجام شد. سوسپانسيوني از جدايه‌هاي آنتاگونيست ( B3, B12, B43, B46, B51, B63, B80) و دو جدايه B46 و B94 كه در شرايط آزمايشگاهي فاصله بازدارندگي از رشد خوبي داشتند به غلظت $1\times10^{9}$cfu در هر ميلي‌ليتر در صمغ عربي يك در صد تهيه شد. بذور سترون شده سويا به مدت ١٥ دقيقه در سوسپانسيون هر جدايه قرار داده شد و پس از آن روي كاغذ صافي سترون، رطوبت اضافي آنها گرفته شد. تا ارتفاع ٥ سانتيمتري لوله‌هاي آزمايش با ماسه ساحلي پر شده و روي آن با ٣ سانتيمتر از خاك مزرعه پوشانده شد و پس از ريختن ٥ ميلي‌ليتر آب مقطر به هر لوله و بستن هر لوله يك بذر آغشته به جدايه آنتاگونيست در خاك كشت گرديد و به مدت دو هفته در شرايط آزمايشگاه نگهداري شدند. جمعيت جدايه‌هاي باكتريايي قرار گرفته روي بذور با روش تهيه سري رقت روي آگار مغذي تعيين گرديد. براي هر جدايه ٣ بذر انتخاب و با معدل‌گيري جمعيت باكتريهاي قرار گرفته روي بذر بدست آمد. پس از دو هفته، گياهچه‌هاي سويا با دقت از داخل لوله‌ها در آورده شد. قطعات ريشه در داخل بافر فسفات سديم ٢٠ ميلي مولار سترون به وسيله ورتكس به مدت ٢٠ ثانيه به شدت به هم زده شد.

جمعيت باكتري‌هاي موجود در سوسپانسيون حاصل با تهيه رقت روي آگار مغذي و شمارش پرگنه‌ها محاسبه شده و در نهايت جمعيت باكتريهاي قرار گرفته روي ريشه براي هر جدايه بدست آمد.

١٠- بررسي تاثير قارچكش ريدوميل ام- زد روي جدايه‌هاي آنتاگونيست و ريزوبيوم

رقت‌هاي $10^{-1}\times1$، $10^{-2}\times1$ ، $10^{-3}\times1$ ، $10^{-4}\times1$ و $10^{-5}\times1$ از قارچكش در آب تهيه گرديد. جدايه‌هاي آنتاگونيست (B3 ، B12 ، B43 ، B51 ، B63 ، B64 و B80) روي محيط كشت آگار مغذي و ريزوبيوم روي محيط كشت YMAبا فرمول زير كشت گرديدند.

| | |
|---|---|
| K2HPO4 | 0.5g |
| MgSO4. 7H2O | 0.1g |
| NaCL | 0.2g |
| Manitol | 10g |
| Yeast extract | 0.5g |
| Agar | 15g |
| Distilled Water | 1 Lite |

پنج عدد قرص كاغذي به قطر يك سانتيمتر در هر تشتك پتري قرار داده شد. سپس غلظت‌هاي مذكور به گونه‌اي به قرص‌هاي كاغذي اضافه گرديد كه تمام قرص كاغذي به حد اشباع رسيد. به قرص كاغذي شاهد در مركز تشتك پتري، آب مقطر سترون اضافه شد. تشتك‌هاي پتري در دماي ٢٥ درجه سانتيگراد به مدت ٤٨ ساعت نگهداري شدند. سپس قطر بين كاغذهاي صافي و كلني باكتريها تعيين گرديد.

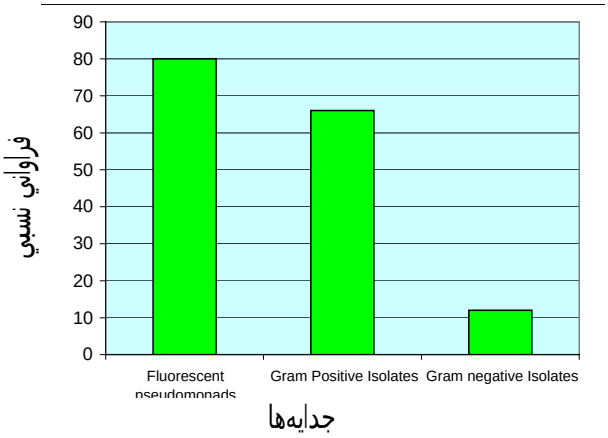
## نتايج

### جداسازي آنتاگونيست‌ها از خاك

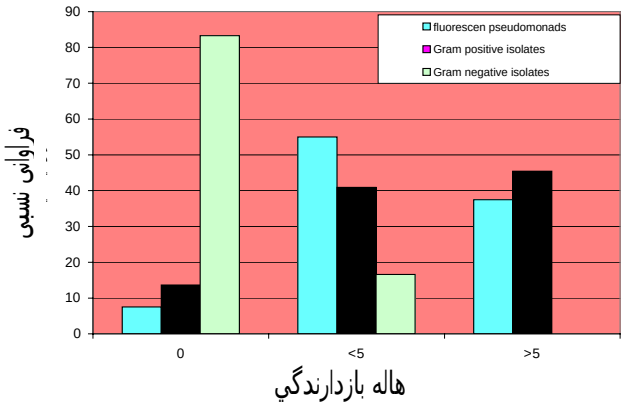
در اين بررسي در مجموع ١٥٨ جدايه باكتريايي جداسازي شدند. نتايج نشان داد كه از بين مجموعه جدايه‌هاي باكتريايي ٨٠ جدايه متعلق به سودوموناسهاي فلورسانت، ٦٦ جدايه متعلق به باكتري‌هاي گرم مثبت و ١٢ جدايه متعلق به باكتري‌هاي گرم منفي بود(شكل١).

نتايج حاصل از تاثير جدايه‌هاي آنتاگونيست در ايجاد فاصله بازدارندگي در مقابل ***P. sojae***

نتايج نشان داد كه از ٨٠ جدايه متعلق به سودوموناسهاي فلورسانت ٧/٥ درصد فاقد فاصله بازدارندگي، ٥٥ درصد داراي فاصله بازدارندگي كمتر از ٥ ميليمتر و ٣٧/٥ درصد داراي بازدارندگي ٥ و بيشتر از ٥ ميليمتر بودند. از ٦٦ جدايه متعلق به باكتري‌هاي گرم مثبت ١٣/٦ درصد فاقد خاصيت بازدارندگي، ٤٠/٩ درصد داراي بازدارندگي كمتر از ٥ ميليمتر و ٤٥/٤ درصد داراي بازدارندگي ٥ و بيشتر از ٥ ميليمتر بودند. از ١٢ جدايه متعلق به باكتري‌هاي گرم منفي ٨٣/٣ درصد فاقد خاصيت بازدارندگي و ١٦/٦ درصد داراي بازدارندگي كمتر از ٥ ميليمتر بودند (شكل٢).




شكل١ - فراواني نسبي باكتريهاي جداسازي شده از ريزوسفر سويا

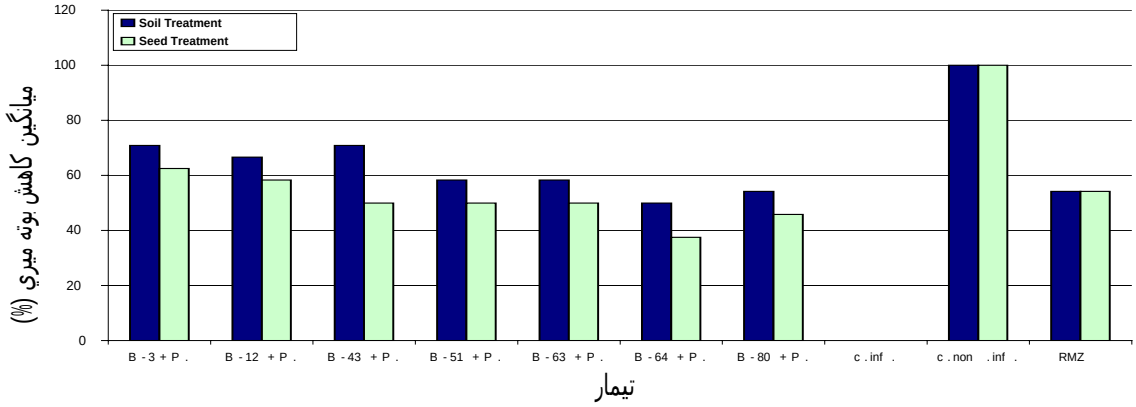



شكل٢- فراواني نسبي جدايه‌هاي باكتريايي در ايجاد هاله بازدارندگي

### نتايج حاصل از بررسي‌هاي گلخانه

در هر ٥ مرحله آزمايش، تيمارهاي باكتريايي و نوع كاربرد باكتري‌ها از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم پس از ٤ هفته در سطح ١% تفاوت معني‌دار داشتند و اثر متقابل تيمارهاي باكتريايي و نوع كاربرد باكتري‌ها در سطح ١% تفاوت معني‌داري نداشتند. در تمامي آزمايش‌هاي گلخانه‌اي تيمار خاك گلدان‌ها با قارچ فيتوفترا به تنهايي (شاهد آلوده) موجب بوته‌ميري كامل

پس از ٤ هفته گرديد و قارچكش ريدوميل ام-زد ميزان بيماري را نسبت به شاهد آلوده ٥٤/١٧ درصد كاهش داد. بر اساس مقايسه ميانگين‌ها و در آزمايش اول در روش محلول‌پاشي خاك دو جدايه از*Bacillus*(B3 و B12) نسبت به شاهد آلوده و قارچكش بطور معني‌داري موجب افزايش تعداد بوته‌هاي سالم گرديدند و دو جدايه از سودوموناس (B27 و B30) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشتند. بقيه جدايه‌هاي باكتريايي از اين نظر پايين‌تر از قارچكش قرار گرفتند. بر اساس مقايسه ميانگين‌ها در روش پوشش بذر *Bacillus*(B3) نسبت به شاهد آلوده و قارچكش بطور معني‌داري باعث افزايش تعداد بوته‌هاي سالم گرديد و *Bacillus*(12) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشت. بقيه تيمارهاي باكتريايي از اين نظر پايين‌تر از قارچكش قرار گرفتند. در آزمايش دوم و در روش محلول‌پاشي خاك جدايه‌هاي *Pseudomonas* (B38 ، B43 ، B51 و B56) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشتند. در روش پوشش بذر دو جدايه *Pseudomonas* (B43 و B51) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشتند. در آزمايش سوم و در روش محلول‌پاشي خاك ٣ جدايه *Pseudomonas* (B63 ، B64 و B78) و *Bacillus*(B80) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشتند. بقيه تيمارهاي باكتريايي از اين نظر پايين‌تر از قارچكش قرار گرفتند. در روش پوشش بذر سودوموناس‌هاي (B63 و B64) و *Bacillus*(B80) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشتند در آزمايش چهارم بر اساس مقايسه ميانگين‌ها و در روش محلول‌پاشي خاك دو جدايه *Bacillus* (B86 و B92) از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير نسبتاً يكساني با قارچكش داشتند بقيه تيمارهاي باكتريايي از اين نظر پايين‌تر از قارچكش قرار گرفتند. در روش پوشش بذر هيچكدام از جدايه‌هاي باكتريايي نسبت به قارچكش موجب افزايش تعداد بوته‌هاي سالم نگرديدند و از اين نظر تمامي جدايه‌هاي باكتريايي پايين‌تر از قارچكش قرار گرفتند. در آزمايش مرحله پنجم بر اساس مقايسه ميانگين‌ها و در هر دو روش محلول‌پاشي خاك و پوشش بذر هيچكدام از جدايه‌هاي باكتريايي نسبت به قارچكش موجب افزايش تعداد بوته‌هاي سالم نگرديدند و از اين نظر تمامي جدايه‌هاي باكتريايي در هر دو روش كاربرد پايين‌تر از قارچكش قرار گرفتند. در مجموع ٣ جدايه *Bacillus* (B3 ، B12 و B80) و ٤ جدايه *Pseudomonas*(B43 ، B51 ، B63 و B64) در هر دو روش كاربرد توانستند از نظر ميانگين تعداد بوته‌هاي سالم تاثير بالاتر و يا نسبتاً يكساني با قارچكش ريدوميل ام-زد داشته باشند بدين ترتيب كه *Bacillus*(B3) و *Pseudomonas*(B43) با ٧٠/٨٤ درصد، *Bacillus*(B12) با ٦٦/٦٧ درصد، دو جدايه *Pseudomonas* (B51 و B63)با ٥٨/٣٤ درصد، *Bacillus*(B80) با ٥٤/١٧ درصد و *Pseudomonas*(B64) با ٥٠ درصد بيشترين تاثير را در كاهش بيماري داشتند. در روش پوشش بذر به ترتيب *Bacillus*(B3) با ٦٢/٥٠ درصد، *Bacillus*(B12) با ٥٨/٣٤ درصد، ٣ جدايه *Pseudomonas* (B43 ، B51 و B63) با ٥٠ درصد، *Bacillus*(B80) با ٤٥/٨٤ درصد و *Pseudomonas*(64) با ٣٧/٥٠ درصد بيشترين تاثير را در كاهش بيماري داشتند (شكل٣).




شكل٣- تاثير جدايه‌هاي آنتاگونيست در كاهش بوته‌ميري فيتوفترايي سويا

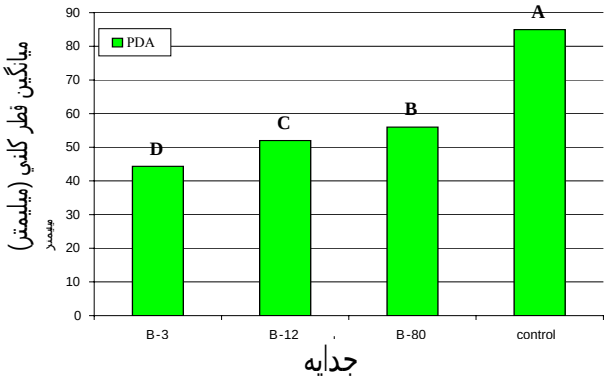
جدايه‌هاي B43 ، B51 ، B63 و B64 از نظر آزمون گرم، منفي و جدايه‌هاي B3 ، B12 و B80 مثبت بودند. عدم استفاده از گلوکز در شرايط هوازي و توليد کلني‌هاي زرد يا نارنجي روي محيط کشت YDC از خصوصيات تمامي جدايه‌ها بود. جدايه‌هاي B43 ، B51 ، B63 و B64 روي محيط کشت King's B رنگدانه فلورسانت توليد کردند. جدايه‌هاي B3,B12,B80 توليد اسپور کرده و فاقد ريسه‌هاي هوايي روي NA بودند. بر اساس آزمون‌هاي فوق جدايه‌هاي B43 ، B51 ، B63 و B64 در جنس *Pseudomonas* sp. وجدايه‌هاي B3 ، B12 و B80 در جنس *Bacillus* sp. قرار گرفتند.

نتايج مکانيزمهاي بازدارندگي ***Bacillus* spp.**

توليد ترکيبات فرار ضد قارچي

الف- نتايج حاصل از محيط کشت **PDA**

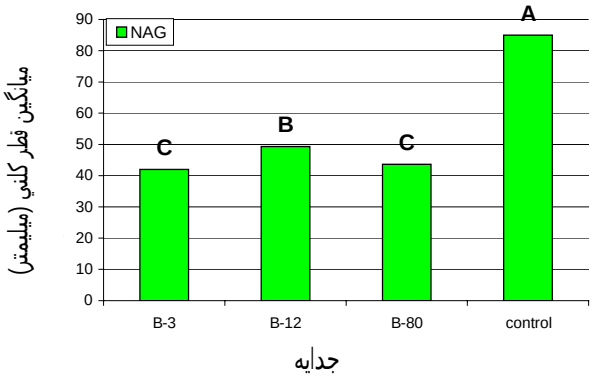
کليه تيمارها در سطح ١% تفاوت معني‌دار داشتند. بر اساس مقايسه ميانگين‌ها جدايه‌هاي B3، B12 و B80 نسبت به شاهد داراي تفاوت معني‌داري در سطح ١% بودند. جدايهB3 با ٤٧/٨٤ درصد و جدايه B80 با ٣٤/١١ درصد به ترتيب داراي بيشترين و کمترين تاثير در جلوگيري از رشد کلني *P. sojae* بودند. جدايه B12 با ٣٨/٨٢ درصد بازداري از رشد بين آن دو قرار گرفت(شکل٤).




شکل٤-تاثير ترکيبات فرار *Bacillus* روي قطر کلني(PDA)

ب- نتايج حاصل از محيط کشت **NAG**

کليه تيمارها در سطح ١% تفاوت معني‌دار داشتند. جدايه‌هاي B3، B12 و B80 نسبت به شاهد داراي تفاوت معني‌داري در سطح ١% بودند. بر اساس مقايسه ميانگين‌ها دو جدايه B3 و B80 بيشترين تاثير را در جلوگيري از رشد کلني *P. sojae* داشته و درصد بازداري از رشد به ترتيب ٥٠/١٩ و ٤٨/٢٢ درصد بود. جدايه B12 با ٤١/٥٠ درصد بازداري از رشد نسبت به شاهد داراي کمترين تاثير بود (شکل٥).

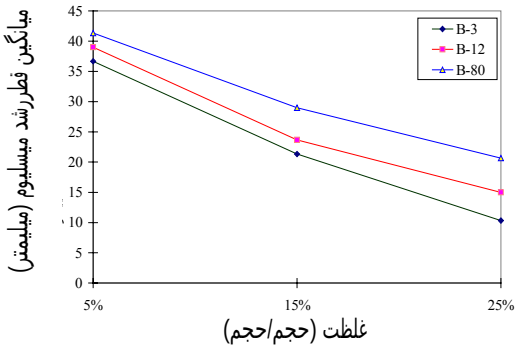



شکل ٥- تاثير ترکيبات فرار *Bacillus* روي قطر کلني(NAG)

تاثير ترشحات مايع برون ياخته‌اي در جلوگيري از رشد کلني ***P. sojae***

اختلاف بين جدايه‌ها و غلظت هر عصاره و اثر متقابل اين دو در بازداري از رشد کلني *P. sojae* در سطح ١% معني‌دار بود. بر اساس مقايسه ميانگين اثر متقابل ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايهB3 در غلظت ٢٥% (حجم به حجم) و ١٥% بيشترين تاثير را در بازداري از رشد کلني داشته و درصد بازدارندگي به ترتيب ٨١/١٠ و ٦٠/٩٧ درصد بود. در اين دو غلظت جدايه‌هاي B12 و B80 از لحاظ درصد بازداري از رشد کلني *P. sojae* در گروه پايين‌تري نسبت به آنتاگونيست B3 قرار گرفته و به ترتيب جدايه B12، ٧٢/٥٥% و ٥٦/٧١% و جدايه B80، ٦٢/٢٠% و ٤٦/٩٤% بازداري از رشد نسبت به شاهد داشتند.

در غلظت ٥% جدايه‌هاي B3 و B80 از لحاظ درصد بازداري از رشد کلني تفاوت معني‌داري نسبت به هم نداشته و درصد بازداري از رشد به ترتيب ٣٢/٩٣% و ٢٤/٣٨% بود. در اين غلظت اين دو جدايه نسبت به جدايه B12 تفاوت معني‌داري در سطح ١% داشتند. در اين غلظت جدايه B12 با ٢٨/٦٤% بازداري از رشد نسبت به شاهد داراي کمترين تاثير در جلوگيري از رشد کلني *P. sojae* بود (شکل٦ ).




شكل٦- تاثير غلظت‌هاي مختلف ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه‌هاي باسيلوس بر ميانگين رشد ريسه‌اي *P. sojae*

نتايج مكانيزمهاي بازدارندگي ***Pseudomonas* spp.**

توليد تركيبات فرار ضد قارچي

الف- نتايج حاصل از محيط‌كشت **PDA**

كليه تيمارها در سطح ١% تفاوت معني‌داري داشتند. بر اساس مقايسه ميانگين‌ها، تركيبات فرار جدايهB51 بيشترين تاثير را داشته و درصد بازداري از رشد ٣٦/٤٠% بود. دو جدايه B63 و B64 داراي كمترين تاثير بوده و به ترتيب ٢٧/٧١% و ٢٦/٦٢% بازداري از رشد نسبت به شاهد داشتند( شكل٧).

ب- نتايج حاصل از محيط كشت **NAG**

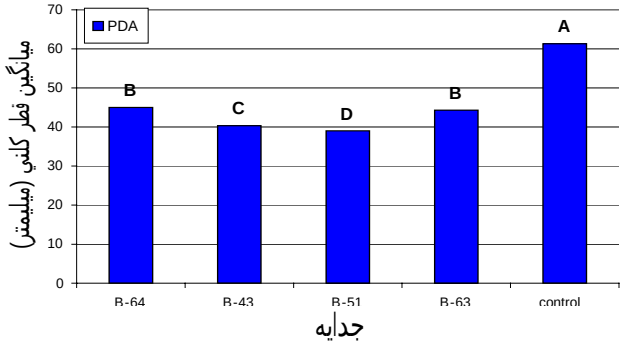
كليه تيمارها در سطح ١% تفاوت معني‌داري داشتند. بر اساس مقايسه ميانگين‌ها، تركيبات فرار دو جدايه B64 و B51 داراي بيشترين تاثير در جلوگيري از رشد كلني *P. sojae* بوده و به ترتيب ٢٦/٥٣% و ٢٤/٣٥% بازدارندگي نسبت به شاهد داشتند. جدايه B63 نيز با ١٥/٦٤% بازدارندگي داراي كمترين تاثير بود.

توليد آنتي‌بيوتيك

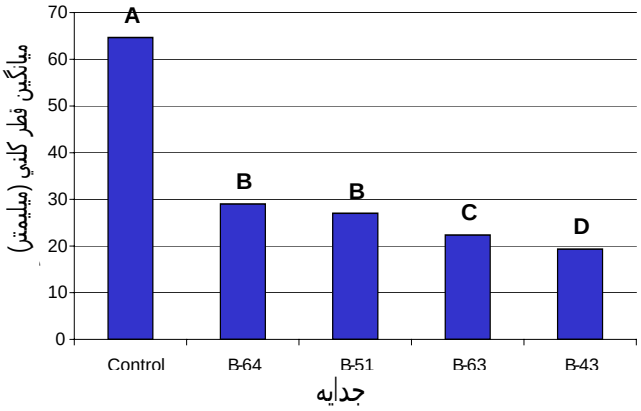
هر ٤ جدايه *Pseudomonas* (B43 ، B51 ، B63 و B64) قادر به توليد آنتي‌بيوتيك بودند. اين جدايه‌ها تفاوت معني‌داري در سطح ١% با شاهد داشتند. بر اساس مقايسه ميانگين ها جدايه B43 با ٧٠/١٠% و جدايه B64 با ٥٥/١٥% به ترتيب بيشترين و كمترين تاثير را در بازداري از رشد داشتند (شكل٨).

توليد سيدروفور

دو جدايه *Pseudomonas*(B63) و *Pseudomonas* (B43) تنها در غلظت ٥ ميكرومول كلريد آهن از رشد قارچ *Geotrichum candidum* جلوگيري كردند. جدايه‌هاي B51 و B64 در محيط King's B و هيچكدام از غلظت‌هاي كلريد آهن از رشد قارچ *Geotrichum candidum* جلوگيري نكردند.چنين بنظر مي‌رسد كه اين دو جدايه قادر به توليد سيدروفور نمي‌باشند.




شكل٧- تاثير تركيبات فرار *Pseudomonas* sp. روي قطر كلني(PDA)




شكل٨-تاثير تركيبات فرار *Pseudomonas* sp. روي قطر كلني(PDA)

توليد سيانيد هيدروژن

جدايه‌هاي *Pseudomonas* (B43 ، B51 ، B63 و B64) موجب تغيير رنگ قطعات كاغذ صافي از سبز به آبي در مقايسه با شاهد گرديدند كه بيانگر توليد HCN مي‌باشد. هيچكدام از جدايه‌هاي *Bacillus* sp. مانندB3 ، B12 و B80 نتوانستند رنگ كاغذ صافي را از سبز به آبي تغيير دهند.

كلونيزاسيون ريشه

همانگونه كه جدول (١) نشان مي‌دهد تراكم جمعيت باكتري‌ها روي بذور تقريباً در مورد اكثر جدايه‌ها يكسان بود. دو هفته بعد از كاشت بذور، اختلاف زيادي از لحاظ جمعيت باكتري‌ها روي ريشه گياهچه‌ها مشاهده شد. در حاليكه جدايه‌هاي B3 ، B12 ، B43 ، B63 ، B64 و B80 بيشترين افزايش جمعيت و قابليت استقرار و تكثير روي ريشه را از خود نشان مي‌دادند. دو جدايه B46 و B94 به ترتيب با ٨ و ١٢ برابر كردن جمعيت خود كمترين افزايش را نسبت به بقيه داشتند.

جدول ١- توانايي كلونيزاسيون ريشه سويا توسط جدايه‌هاي باكتريايي

| جدايه‌هاي باكتريايي | تعداد باكتري‌هاي متصل به بذر | تعداد باكتري‌ها در هر گرم ريشه | افزايش در كلونيزاسيون |
|---|---|---|---|
| B3 | ٩/٧×١٠$^{٥}$ | ٧/٩×١٠$^{٨}$ | ٨١٤/٤٣ |
| B12 | ٩/٢×١٠٥ | ٧/١×١٠$^{٨}$ | ٧٧١/٧٣ |
| B63 | ٩/١×١٠$^{٥}$ | ٦/٤×١٠$^{٨}$ | ٧٠٣/٢٩ |
| B43 | ٩×١٠$^{٥}$ | ٦/٣×١٠$^{٨}$ | ٧٠٠ |
| B51 | ٩/٥×١٠$^{٥}$ | ٦/٦×١٠$^{٨}$ | ٦٩٤/٧٣ |
| B80 | ٩/٣×١٠$^{٥}$ | ٦/١×١٠$^{٨}$ | ٦٥٥/٩١ |
| B64 | ٩/٦×١٠$^{٥}$ | ٥/٢×١٠$^{٨}$ | ٥٤١/٦٦ |
| B94 | ٩/٣×١٠$^{٥}$ | ٩/٨×١٠$^{٦}$ | ١٠/٥٣ |
| B46 | ٩/٧×١٠$^{٥}$ | ٧/٧×١٠$^{٦}$ | ٧/٩٣ |

نتايج بررسي تاثير قارچكش ريدوميل ام-زد روي رشد آنتاگونيست‌ها و ريزوبيوم

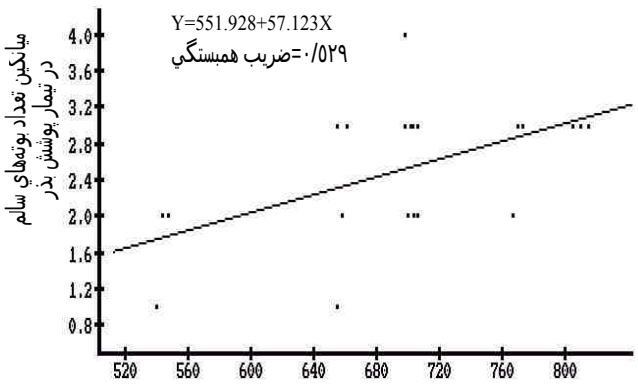
هيچكدام از غلظت‌هاي قارچكش از رشد آنتاگونيست‌ها و ريزوبيوم جلوگيري نكردند. چنين بنظر مي‌رسد كه قارچكش تاثير منفي روي رشد آنتاگونيست‌ها و ريزوبيوم نداشته و مي‌تواند در مديريت تلفيقي بوته‌ميري سويا مورد استفاده قرار گيرد.

در تحقيق انجام شده با آنتاگونيست‌هاي باكتريايي ضريب همبستگي بين روش محلول‌پاشي خاك و روش پوشش بذر ٨٧ درصد و رابطه خطي برآورد شده Y=4.49+1.39X بود. اين رابطه نشان مي‌دهد وقتي آنتاگونيستي در روش پوشش بذر يك واحد بيماري را كاهش مي‌دهد همان آنتاگونيست در روش محلول‌پاشي خاك ١/٣٩ واحد موجب كاهش بيماري مي‌شود و نشان‌دهنده برتري روش محلول‌پاشي خاك نسبت به روش پوشش بذر مي‌باشد. جدول (٢) مشخص كننده ضريب همبستگي صفات آزمايشگاهي با كنترل بيماري در روش محلول‌پاشي خاك توسط جدايه‌هاي آنتاگونيست مي‌باشد.

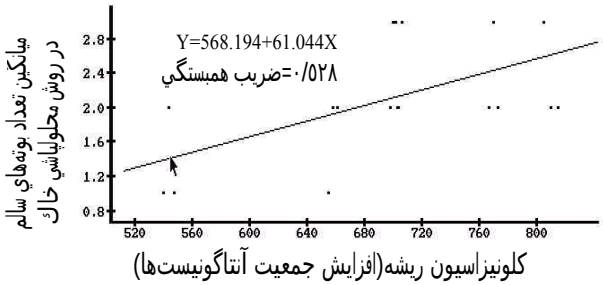
جدول ٢ - ضريب همبستگي صفات آزمايشگاهي با كنترل بيماري در روش محلول‌پاشي خاك

| صفات آزمايشگاهي | ضريب همبستگي |
|---|---|
| كلونيزاسيون ريشه | ٠/٥٢٩ |
| ترشحات مايع برون ياخته‌اي و آنتي‌بيوتيك | ٠/٤٥٩ |
| تركيبات فرار ضد قارچي روي PDA | ٠/٤٣٦ |
| تركيبات فرار ضد قارچي روي NAG | ٠/١٤٠ |
| فاصله بازدارندگي | ٠/٣٦٩ |

همانطور كه از مقايسه ضرايب همبستگي مشخص مي‌شود كلونيزاسيون ريشه، همبستگي بالايي با كنترل بيماري دارد و مي‌تواند شاخص مناسبي براي انتخاب آنتاگونيست‌هاي باكتريايي باشد. رابطه بدست آمده بين كلونيزاسيون ريشه و كنترل بيماري در روش محلول‌پاشي خاك Y=551.928+57.123X بود (شكل ٩). تاثير تركيبات فرار ضد قارچي آنتاگونيست‌ها روي محيط كشت NAG كمترين همبستگي با كنترل بيماري در روش محلول‌پاشي خاك داشت و رابطه برآورد شده Y=26.477+2.444X بود.




شكل٩ – پراكنش همبستگي و خط رگرسيون بين توانايي كلونيزاسيون ريشه و كنترل بيماري در روش محلول‌پاشي خاك




شكل١٠ – پراكنش همبستگي و خط رگرسيون بين توانايي كلونيزاسيون ريشه سويا توسط جدايه‌هاي آنتاگونيست و كنترل بيماري در روش پوشش بذر

از مقايسه ضرايب همبستگي جدول ٣ مشخص مي‌شود كه بين توانايي كلونيزاسيون ريشه و كنترل بيماري در روش پوشش بذر نيز همبستگي نسبتاً خوبي (٠/٥٢٨) وجود دارد (شكل ١٠) و رابطه برآورد شده Y=568.194+61.044X بود. تركيبات فرار آنتاگونيست‌ها روي محيط كشت NAG كمترين همبستگي (٠/١٩٩-) با كنترل بيماري داشت و رابطه برآورد شده Y=40.419-3.711X بود.

جدول٣ - ضريب همبستگي صفات آزمايشگاهي با كنترل بيماري در روش پوشش بذر

| صفات آزمايشگاهي | ضريب همبستگي |
|---|---|
| كلونيزاسيون ريشه | ٠/٥٢٨ |
| ترشحات مايع برون ياخته‌اي و آنتي‌بيوتيك | ٠/٣٢٨ |
| تركيبات فرار ضد قارچي روي PDA | ٠/٣١٤ |
| تركيبات فرار ضد قارچي روي NAG | -٠/١٩٩ |
| فاصله بازدارندگي | -٠/٠٧٩ |

## بحث

در تحقيق انجام شده ١٣٣ جدايه آنتاگونيست از مجموع ١٥٨ جدايه باكتريايي مورد مطالعه توانستند فواصل بازدارندگي از ١ تا ١٠ ميلي‌متر روي محيط كشت CMA از خود نشان دهند كه از اين تعداد ٥٧ جدايه متعلق به باكتري‌هاي گرم مثبت، ٢ جدايه متعلق به باكتري‌هاي گرم منفي و ٧٤ جدايه متعلق به سودوموناس‌هاي فلورسانت بود. انتخاب آزمايشگاهي آنتاگونيست‌ها معمولاً از طريق بررسي اثرات بازدارندگي آنها در مقابل قارچ‌هاي بيماريزا در شرايط آزمايشگاه صورت مي‌گيرد اما رابطه كلي بين توانايي يك آنتاگونيست در كنترل يك عامل بيماريزا در آزمايشگاه و كنترل همان بيماري در گياه وجود ندارد. مطمئناً يك آزمون ساده آزمايشگاهي نمي‌تواند روابط پيچيده حاكم در اطراف ريشه گياه را شبيه‌سازي كند. با اين وجود آزمون‌هاي آزمايشگاهي حداقل به عنوان روش‌هاي سريع انتخاب اوليه آنتاگونيست‌ها قابل استفاده بوده و جدايه‌هايي كه در آزمايشگاه فاقد خاصيت آنتاگونيستي هستند اغلب در گلخانه و مزرعه نيز هيچ اثر بازدارندگي روي بيمارگر ندارند (٣١). برادبنت و همكاران (١٩٧١) نشان دادندكه از ٣٥٠٠ ميكروارگانيزم مولد آنتي‌بيوتيك آن تعدادي كه در خاك مزرعه روي يك يا چند بيمارگر قارچي تاثير بازدارندگي داشتند، همانهايي بودند كه در آزمايشگاه نيز اين اثر را به خوبي نشان داده بودند. فراول (١٩٨٨) معايب و محاسن روش آزمايشگاهي جهت انتخاب باكتري‌ها را توضيح داده و مهمترين عيب اين روش را تفاوت زياد شرايط آزمايشگاهي با شرايط طبيعي مي‌داند كه تعميم مستقيم نتايج را به شرايط طبيعي تا حد زيادي غير ممكن مي‌سازد. لذا هر گونه نتيجه‌گيري عجولانه مي‌تواند گمراه‌كننده باشد. تنها انتظاري كه از اين روش‌ها مي‌توان داشت اين است كه توان بالقوه توليد مواد بازدارنده توسط آنتاگونيست‌ها را در شرايط مساعد مشخص مي‌سازد.

تاثير تركيبات فرار ضد قارچي باسيل‌هاي آنتاگونيست روي رشد كلني *P. sojare* مورد مطالعه قرار گرفت و معلوم شد كه باسيل‌هاي آنتاگونيست روي هر دو نوع محيط كشت PDA و NAG توليد تركيبات فرار ضد قارچ *P. sojae* مي‌نمايند. فيدامن و روزال (١٩٩٣) تاثير تركيبات فرار آنتاگونيست‌هاي باسيل را در بازداري از رشد كلني قارچ‌هاي اميست مشخص كرده‌اند. همچنين در اين تحقيق مشخص شد كه ميزان تاثير تركيبات فرار ضد قارچي توليد شده توسط آنتاگونيست‌هاي *Bacillus* تحت تاثير نوع محيط غذايي است. افزودن ٢% دي-گلوكز به محيط كشت NA موجب افزايش خاصيت بازدارندگي آنتاگونيست‌ها از رشد كلني *P. sojae* در مقايسه با محيط كشت PDA فاقد دي-گلوكز گرديد. قدرت ساخت تركيبات فرار ضد قارچي در جدايه‌هاي باكتريايي توسط گلوكز اداره مي‌شود(٤٠) و چنين قندهايي بيان ژني را كه داراي خواص ضد

قارچي است افزايش مي‌دهند(١٦). فيدامن و روزال(١٩٩٣) نيز در تحقيقي ثابت كردند كه وجود دي-گلوكز در محيط آگار غذايي موجب افزايش فعاليت‌هاي ضد قارچي تركيبات فرار *Bacillus* در مقابل *Rhizoctonia solani* مي‌گردد. در مورد شناسايي نوع تركيبات فرار باسيلوس‌ها تحقيقات زيادي صورت گرفته و تاكنون توليد تركيبات فراري مثل الكل‌ها (ايزوآميل الكل)، آلدئيدها، كتون‌ها و استرها توسط آنتاگونيست‌هاي مختلف *Bacillus* و بازدارندگي مطلوب آنها در جلوگيري از رشد رويشي قارچ‌ها به اثبات رسيده است(١٣).

در بررسي تاثير ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه‌هاي *Bacillus* در بازداري از رشد كلني *P. sojae* مشخص گرديد كه تمامي اين آنتاگونيست‌ها ترشحاتي را توليد مي‌كنند كه تاثير مطلوبي در بازداري از رشد كلني *P. sojae* دارد. تحقيقات مفصلي در مورد نوع تركيبات موجود در ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه‌هاي *Bacillus* صورت گرفته است و يكي از تركيبات مهم آنها آنتي‌بيوتيك‌ها است كه انواعي از آن از قبيل توكسي مايسين، مايكوسوبتيلين، ايتورين‌آ، دي و ايي ، فنجي‌مايسين، باسيليسين، مايكوباسيلين، فونجيستاتين، سابسپورين، باسيلوپپتين‌آ، ب و ث مي‌باشد كه توسط محققين مختلفي از جمله بسون و همكاران (١٩٩٨)، اسوين‌برن و همكاران (١٩٧٥)، مك‌كين و ريلي(١٩٨٨)، شريبر و همكاران (١٩٨٨)، كوروسو و همكاران(١٩٨٧)، كاجي‌مورا و همكاران (١٩٩٥)و فريرا و همكاران (١٩٩١) شناسايي و خالص‌سازي گرديده و اثرات آنها در بازداري از رشد كلني قارچها معلوم شده و وجود آنزيم بتاگلوكاناز را در ترشحات مايع برون ياخته‌اي جدايه‌هاي *Bacillus* با اثبات رساندند.

در بررسي‌هاي انجام شده به روش كاستريك و كاستريك (١٩٨٣) مشخص شد كه آنتاگونيست‌هاي *Bacillus* قادر به توليد سيانيد هيدروژن نبوده و نتيجه اين تحقيق با تحقيقات كاستريك (١٩٧٥) مطابقت داشت.

در آزمايش تاثير تركيبات فرار ضد قارچي آنتاگونيست‌هاي *Pseudomonas* spp. در شرايط آزمايشگاهي مشخص گرديد كه تمامي جدايه‌ها قادر به جلوگيري از رشد كلني *P. sojae* روي هر دو نوع محيط كشت PDA و NAG مي‌باشند.

همچنين مشخص شد كه جدايه‌هاي آنتاگونيست روي محيط‌هاي غذايي مختلف رفتارهاي متفاوتي از نظر ميزان تاثير تركيبات فرار در جلوگيري از رشد كلني *P. sojae* نشان مي‌دهند. افزودن دي-گلوكز به محيط كشت NA به ميزان ٢% در مقايسه با محيط كشت PDA فاقد دي-گلوكز خاصيت بازدارندگي را افزايش داد. يكي از تركيبات فرار مي‌تواند سيانيد هيدروژن باشد كه در بررسي انجام شده به روش كاستريك و كاستريك (١٩٨٣) توليد آن توسط جدايه‌هاي *Pseudomonas* به اثبات رسيد. محققين مختلفي از جمله كراوس و لوپر (١٩٩٠)، كيل و دفاگو (١٩٩٧)، ووتريخ و دفاگو (١٩٩٠) توليد تركيبات فرار توسط جدايه‌هاي *Pseudomonas* را بعنوان يكي از مكانيزم‌هاي كنترل بيماري‌هاي قارچي مي‌دانند.

در آزمايش تاثير آنتي‌بيوتيك آنتاگونيست‌هاي *Pseudomonas* در جلوگيري از رشد كلني *P. sojae* روي محيط كشت CMA مشخص گرديد كه آنتي‌بيوتيك توليد شده توسط آنتاگونيست‌ها موجب بازداري از رشد در مقايسه با شاهد شد. كراوس و لوپر (١٩٩٠) در تحقيق خود گزارش كردند كه جدايه *Pseudomonas fluorescens* pf-5 روي محيط آگار غذايي حاوي گلوكز توليد آنتي‌بيوتيك نمي‌كند اما روي محيط كشت آگاردار فاقد گلوكز قادر به توليد آنتي‌بيوتيك مي‌باشد. همچنين هاول و استيپانوويچ (١٩٧٩) گزارش كردند كه آنتي‌بيوتيك‌هاي پيولوتئورين و پيرول نيترين اين جدايه از رشد كلني قارچ‌هاي *P. ultimum* و *R. solani* جلوگيري مي‌كنند.

سيدروفورها كلاته كننده‌هاي قوي آهن فريك با وزن ملكولي كم بوده كه تحت شرايط كمبود آهن توليد و بعنوان يكي از مكانيزم‌هاي مهم بيوكنترل گزارش گرديده است (٢٤). در بررسي‌هاي انجام شده پيرامون توليد سيدروفور توسط آنتاگونيست‌هاي *Pseudomonas*، دو جدايه B43 و B63 در محيط كشت King'sB و تنها در غلظت ٥ ميكرومول كلريد آهن از رشد قارچ *G. candidum* جلوگيري كردند و جدايه‌هاي B51 و B64 در هيچكدام از غلظت‌هاي بكار رفته در آزمايش نتوانستند سيدروفور توليد كنند. نقش سيدروفور در كنترل بيماري‌هاي مختلفي از جمله پژمردگي فوزاريومي گوجه‌فرنگي و پاخوره غلات به اثبات رسيده است (٢٨) اما تحقيقات لوپر و شراوث (١٩٨٦) نشان مي‌دهد كه سيدروفور توليد شده توسط

جدايه *P. fluorescens* 3553 تاثير چنداني در كنترل مرگ گياهچه پنبه ناشي از *P. ultimum* نداشته است.

كلونيزه كردن ريشه توسط آنتاگونيست‌هاي باكتريايي يك شرط مهم در توانايي آنها براي كنترل بيماري‌هاي ريشه است. توانايي كلونيزه كردن ريشه آنچنان مهم است كه برخي محققين آن را مبناي انتخاب آنتاگونيست برتر در نظر مي‌گيرند (٢٩). در اين تحقيق مشخص گرديد تمامي آنتاگونيست‌هايي كه در مطالعات گلخانه‌اي بالاترين درصد كاهش بيماري را داشتند در مقايسه با دو جدايه باكتريايي كه تاثير كمي در كاهش بيماري داشتند، از قدرت كلونيزاسيون بالايي برخوردار بودند.

كلونيزه كردن ريشه و تغييرات جمعيت آنتاگونيست‌هاي بكار گرفته شده تاكنون توسط محققيني از جمله باهم و شراوث (١٩٨٧) بررسي شده است. گامليل و كاتان (١٩٩٣) تاثير ترشحات ريشه روي جمعيت جدايه‌هاي آنتاگونيست در خاك آفتاب دهي شده را مورد بررسي قرار داده و به اين نتيجه رسيدند كه سازگاري جدايه‌هاي آنتاگونيست نسبت به ترشحات ريشه‌اي، علت استقرار آنها در اطراف ريشه مي‌باشد. تحقيق انجام شده نشان مي‌دهد كه جدايه‌هاي آنتاگونيست انتخاب شده در شرايط گلخانه‌اي از توانايي بالقوه براي تجمع روي ريشه سويا برخوردار هستند و هنگامي كه شرايط فيزيكي، شيميايي و بيولوژيكي خاك مزرعه مناسب باشد، اين توانايي مي‌تواند بصورت بالفعل درآيد.

در آزمايش اثر قارچكش ريدوميل ام- زد روي جدايه‌هاي آنتاگونيست و ريزوبيوم مشخص شد كه اين قارچكش اثر بازدارنده روي اين جدايه‌ها ندارد. بدين جهت مي‌توان از اين قارچكش در مبارزه تلفيقي بوته‌ميري سويا استفاده كرد.

## منابع مورد استفاده **REFERENCES**


١. رضايي، س و ع. عليزاده. ١٣٧٧. بوته‌ميري فيتوفترايي سويا ناشي از قارچ *Phytophthora sojae* در استان لرستان. نشريه بيماري‌هاي گياهي. جلد ٣٤:١٤٣-١٢٢.

2. Bahme, J.B. & M. N. Schroth. 1987. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potatoes. Phytopath. 72:1093-1100.
3. Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biologocal control of plant pathogens. Ann. Rev. Phtopath. 25:67-85.
4. Bankol, S.A. & A. Adebajo. 1998. Efficacy of some fungi and bacterial isolation in controlling of rot disease of cowpea caused by *Pythium aphanidermatum*. Journal of Plant Protec in the Tropic. 11(1):37-43.
5. Besson,F., F. Peypoux, G. Michel, & L. Delcambe. 1976. Characterization of Iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. J. Antibiotics XXIX(10):1043-1049.
6. Broadbent, P., K. F. Baker, & Y. Waterworth. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in australian soils. Austr.J. Biol. 24:925-944.
7. Broadbent, P., K. F. Baker, & Y. Waterworth. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in australian soils. Austr.J. Biol. 24:925-944.
8. Burr, J., M. N. Schroth, & T. Suslow. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*.
9. Campbell, R. 1986. The search for biological control agents against plant pathogens: a pragmatic approach. Biol. Agric. Horticulture 3:317-327.
10. Castric, A. P. 1975. Hydrogen cyanid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeuroginosa*. Can. J. Microbial. 21:613-618.
11. Castric, K.F. & P. Castric. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbial. 45:701-702.
12. Fahy, P.C. & G. J. Persley. 1983. Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. Academic Press. New York.
13. Fiddaman, P.J. & K. Rossal. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 74:119-126.

14. Fiddaman, P. J. & K. Rossal . 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 76:395-405.
15. Ferreira, J.H.S., F. N. Matthee, & A. C. Thomas. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapveine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopath. 81(3):283-287.
16. Fravel, D.R. 1988. Role of antibiotics in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26:75-91.
17. Gamliel, A. & J. Katan. 1993. Influence of seed and root exudates on fluorescent pseudomonads and fungi in soil. Phytopathol. 78:534-542.
18. Hagedron, C., W. D. Gouid, & T. R. Bradinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55(11):2793-2797
19. Handelsman, J., S. Raffael, E. H. Mester, L. Wunderlich, & C. R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedling with *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 56:713-718.
20. Howell, C.R. & R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with antibiotic produced by the bacterium. Phtopathology. 69:480-482.
21. Kajimora, Y., M. Svigiama, & M. Kaneda. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* FR-2. J. Antibiotics 48(10):1095-1103.
22. Kaufmann, M.J. & W. Gerdemann. 1958. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n.sp. Phytopathol. 48:201-208.
23. Keel, C. & G. Defago. 1997. Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanism and echological impact In: Gange, A.C. and Brown, V. K. (eds.). multiroottrophic interaction in terrestrial system pp. 27-46. Blackwell Scientific publishers, London, U.K.
24. Klopper, J.M., J. Leong, M. Teintze, & M. N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. Current Microbiol. 4:317-320.
25. Kraus, J. & J. E. Loper. 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies pp. 175-177. In Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, Interlacen, switzerland.
26. Kurusu, K., K. Ohba, I. Arai, & K. Fukushima. 1987. New peptid antibiotics LIFO3, FO5, FO7 and FO8 produced by *Bacillus polymyxa* Isolation and Characterization. J. Antibiotics. 40 (11). 1056.
27. Lemanceau, P. & C. Alabouvette. 1991. Biological control of *Fusarium* disease by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. Crop. Protec. 10:279-286.
28. Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Ann. Rev. phytopathol. 26:187-209.
29. Loper, J.E. & M. N. Schroth. 1986. Importans of siderophores in microbial interaction in the rhizosphere. Pages 85-89 In : iron, Siderophores, and plant diseases. Swinburn, T.R. (ed.). Plenum Press, New York.
30. McKeen, C.D. & C. Reilly. 1988. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis* .Phytopathol. 76(2) : 136-139.
31. Renwick, A., R. Campbell, & S. Coe. 1991. Assessment of *in vivo* screening system for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. Plant Pathol. 40:524-532.
32. Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. ($2^{nd}$ ed.). A.P.S.St. Paul. Minnesota, U.S.A. 164pp.
33. Scher, S.M., J. S. Ziegle, & J. W. Kloepper. 1984. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. Can. J. Microbiol. 30:151-157.
34. Schreiber, L.R., G. F. Gregory, C. R. Kraus, & J. M. Jehida. 1988. Production, partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolated from *Ulmus americana*. Canadian J. of Botany. 66 : 2336-2346.
35. Schroth, M.N. & J. G. Hancock. 1982. Disease-suppressive soil and root colonizing bacteria. Science 216:1376-1381.

36. Sharifi-Tehrani, A., M. Zala, A. Natsch, Y. Moenn-Loccoz, & G. Defago. 1998. Biological control of soil-borne fungal plant disease by 2,4-diacetyl phloroglucinol producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16s DNA. Eur. J. Plant Pathol. 104:643-651.
37. Singh, V. & B. J. deverall. 1984. *Bacillus subtilis*, as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc. 83(3):487-490.
38. Suslow, T.V. & M. N. Schroth. 1982. Application of a rapid method gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathol. 72:917-918.
39. Swinburn, T.R., J. Barr, & A. E. Brown. 1975. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* and their effect on fungal colonists of apple leaf scares. Trans. Br. Mycol. Soc. 65:211-217.
40. Virgen-Calleros, G., M. Salazar-Godoy, V. Olalde-Portugal, L. Aguilera-Gomez, & R. Hernandez-Delgadillo. 1996. *In vitro* inhibition of *Fusarium* and *Verticillium* sp. with *Bacillus circulans* In: Wenhua, T., Cook, R.J., Rovira, A. Advances in biological control of plant diseases. China Agricultural University Press Beijirg, China.
41. Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26:379-407.
42. Weller, D.M. & R. J. Cook. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathol. 26:379-407
43. Wuthrich, B. & G. Defago. 1990. Suppression of wheat take-all and black root rot of tobacco by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: results field and pot experiments pp. 17-22. In: Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (eds.). Plant Growth Promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlacen, Switzerland. Phytopathol. 68:1377-1383.