

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^۱ 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. در این بررسی توانایی چهار باکتری آنتاگونیست در کنترل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین Qz29R جداسازی شده از گندم در آمریکا (دریافت از دانشگاه 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 در غلظت یک در هزار موجب بازداری از رشد باکتری شد. در خاک استریل، متالاکسیل در مقایسه 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

مقدمه

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 در ۲۰۰۷ 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. در این 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

نخود ایرانی (*Cicer arietinum* L.) از محصولات با ارزش غذایی به‌شمار می‌رود که در اغلب مناطق کشور کاشته می‌شود. پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه در اثر گونه‌های 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 سودوموناس‌های فلورسنت برای کنترل این بیماری در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در سال ۱۹۷۸ توسط بور و همکاران، تاثیر افزایش 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 (کلپر و همکاران، 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 در مقابل عوامل آنتاگونیست شود (هیلزرد و ترانسمو، ۱۹۹۸). این امر هم‌چنین خطر مقاومت در قارچ‌ها در مقابل قارچ‌کش‌ها را کاهش می‌دهد. ضدعفونی خاک به‌وسیله دی‌سولفید کربن در باغ‌های 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

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 جداسازی شده از گندم در امریکا (دریافت از دانشگاه ایالتی واشنگتن) و *P. fluorescens* جداسازی شده 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 لوب از باکتری ۴۸ ساعته به لوله‌های سرپوش دار حاوی محلول سولفات منیزیم یک دهم مولار اضافه و در دمای معمولی آزمایشگاه نگهداری شد.

آماده‌سازی بذور و آغشته‌سازی آن‌ها به باکتری و قارچ‌کش و تعیین جمعیت باکتری روی بذور

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 بذور). بذور به‌مدت سه ساعت در معرض جریان هوای استریل گذاشته شد. برای تعیین جمعیت باکتری روی بذور آغشته شده، پنج عدد بذور با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (اسیدیته ۷/۲) درون هاون استریل خرد گردید و پس از تهیه سریال رقت، یک دهم میلی‌لیتر از آن به محیط آگار

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 ضد عفونی 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 ۲۵ درجه 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 قطره‌های اووگون، اووسپور، اووپلاست و ضخامت دیواره اووسپور، منشاء آنتریدی و نحوه اتصال به اووگون تعیین گردید. شاخص‌های اووپلاست، آپروتیک 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 بذورهای 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 این ترتیب که بذور پس از ضد عفونی سطحی در گلدان 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

های مورد بررسی برای هر تیمار، میانگین نهایی هر دو آزمایش می‌باشد.

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

در این 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 و Pf-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

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 هاجدرن 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-

مقایسه تاثیر دو روش مختلف کاربرد باکتری روی جوانه زنی بذر

در این آزمایش دو اینوکولوم یکی به صورت سوسپانسیون پاشی روی بذر قبل از ریختن خاک بر روی آنها و دیگری آغشته سازی بذر قبل از کاشت توسط باکتری به کار رفت. آغشته سازی بذر به باکتری و کاشت آنها درون گلدان مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۳) صورت گرفت. سوسپانسیون پاشی باکتری روی بذر به روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) انجام گرفت، به این ترتیب که پس از قرار دادن بذر در محل های کاشت درون گلدان ها قبل از ریختن خاک روی آنها یک میلی لیتر 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 به طور سالم سر از خاک بیرون آورده بودند شمارش گردید. برای سوسپانسیون پاشی درون شیارهای ایجاد شده به منظور کاشت بذر از پی پت پیستون دار به میزان یک میلی لیتر به ازاء هر یکصد گرم خاک استفاده شد. در هر گلدان ده عدد بذر در عمق سه سانتی متری کاشته شد و برای کاهش میزان شسته شدن باکتری ها از محل کاشت بذر، آب پاشی گلدان ها در هفته اول هر روز دو مرتبه به صورت اسپری با استفاده از آبفشان صورت گرفت. آلوده سازی خاک به قارچ عامل بیماری به روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد.

نتایج

شناسایی عامل بیماری و قدرت بیماری زایی

عامل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی به عنوان *P. ultimum* var. *ultimum* تعیین گردید. شاخص آپروتیک 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 مواردی که سه میلی لیتر سوسپانسیون به ازاء هر یکصد گرم خاک اضافه می شد (حاوی ۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر) درصد جوانه زنی به صفر می رسید. هم چنین دو جدایه باکتری آنتاگونیست جدا شده روی محیط انتخابی اس یک که قبلا براساس نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی و مقایسه با استرین CHA0 به

استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا دو میلی لیتر از رقت های گفته شده در بالا از قارچ کش های مورد آزمایش، درون تشتک پتری ریخته و ۱۸ میلی لیتر محیط کشت سیب-زمینی آگار اضافه گردید و با حرکت های 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 از آن که باکتری های درون تشتک های شاهد که فاقد هرگونه قارچ کش بود به اندازه کافی رشد کردند، مقایسه نتایج صورت گرفت.

مقایسه تاثیر توام باکتری ها و کاپتان در افزایش وزن تر بوته و جوانه زنی بذر در خاک استریل نشده

در این آزمایش از نصف غلظت های توصیه شده برای کاپتان به همراه باکتری با جمعیت 10^9 سلول در هر میلی لیتر استفاده شد. بقیه شرایط آزمایش مشابه قبل صورت گرفت با این تفاوت که خاک جمع آوری شده از مزرعه بدون استریل شدن، با عامل بیماری به طور مصنوعی مایه کوبی گردید.

تاثیر باکتری ها در تحریک رشد گیاه در شرایط نوتوبیوتیک

برای تعیین اثر دو جدایه از سودوموناس های فلورسنت روی رشد گیاه به خصوص روی توسعه ریشه بوته های نخود، آزمایش زیر مطابق روش ردی و پاتریک (۱۹۹۰) با اندکی اصلاح صورت گرفت. درون لوله های مخصوصی که در قسمت پایین دارای مخزن آب می باشند تا یک سوم آن ماسه استریل شده ریخته شد. سپس ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل به هر یک از لوله ها اضافه گردید تا رطوبت لازم برای جوانه زنی 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 سرلوله ها 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.

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 و کم‌ترین 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 (جدول ۱). 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 به ترتیب 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). در نمونه شاهد، بذور نخود به وسیله قارچ *P. ultimum* به طور کامل پوشانده شد به نحوی که هیچ‌کدام قادر به جوانه زنی نشدند. روی بذور تیمار شده به وسیله باکتری‌ها و قارچ-کش 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 کاملاً مشهود بود.

بررسی تاثیر کاپتان و متالاکسیل بر روی سودوموناس-های فلورسنت

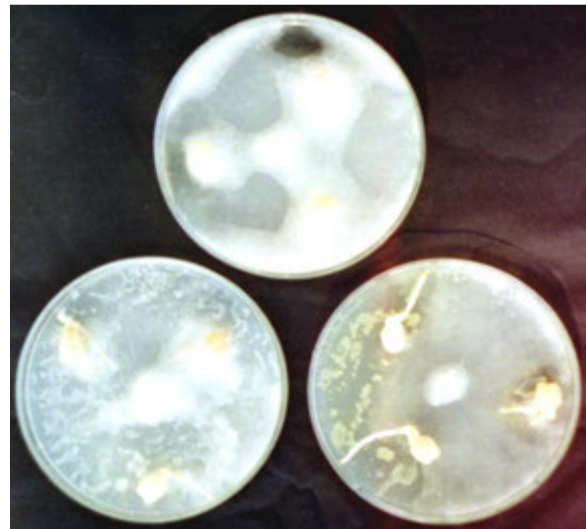
در این بررسی هیچ‌یک از غلظت‌های متالاکسیل باعث بازداری از رشد باکتری مورد آزمایش نشد. رشد باکتری در غلظت یک در هزار متالاکسیل مشابه رشد باکتری در شاهد است. عدم وجود هاله بازداری در

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 بازداری نشان داد که جدایه‌های به کار 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 بازداری همواره به معنی 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 منیزیم 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

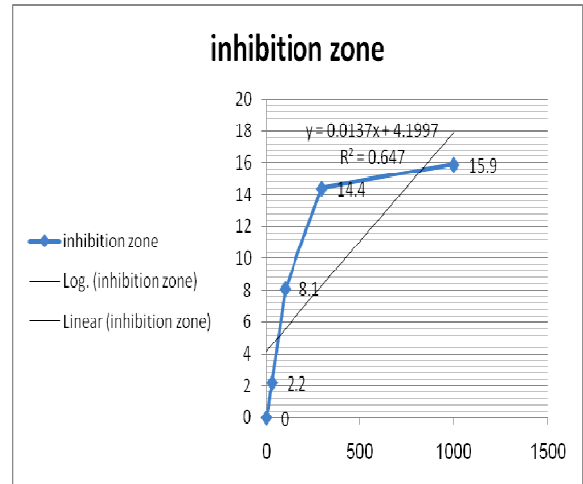
جمعیت باکتری 10^8 تا 10^9 واحد تشکیل دهنده کلنی برای هر بذر تعیین گردید. در این آزمایش هیچ‌یک از تیمارها نتوانست به طور کامل از بیماری جلوگیری نماید ولی در مقایسه با شاهد آلوده اثرات کم، متوسط تا زیادی روی کاهش بیماری، درصد جوانه‌زنی و وزن تر بوته‌ها

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 کاملاً محسوس و معنی‌دار می‌باشد.

مقایسه تاثیر دو روش مختلف کاربرد باکتری روی جوانه زنی بذر

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد باکتری به صورت پاشیدن سوسپانسیون روی بذور تاثیر نسبتاً مشابهی با روش آغشته‌سازی بذر در افزایش جوانه‌زنی بذور دارد (جدول ۳). 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 تقریباً 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.

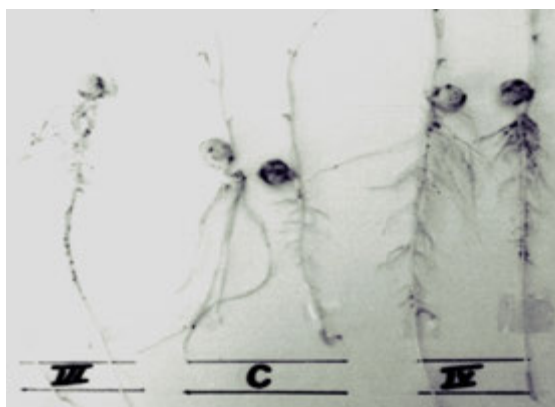
اطراف دیسک حاوی غلظت‌های مختلف این قارچ‌کش نیز بیان‌گر همین نتیجه می‌باشد. قارچ‌کش کاپتان در غلظت یک در هزار موجب بازداری از رشد باکتری گردید (شکل ۲). رقت‌های بعدی تاثیر محسوسی بر روی رشد باکتری مورد آزمایش نداشتند.



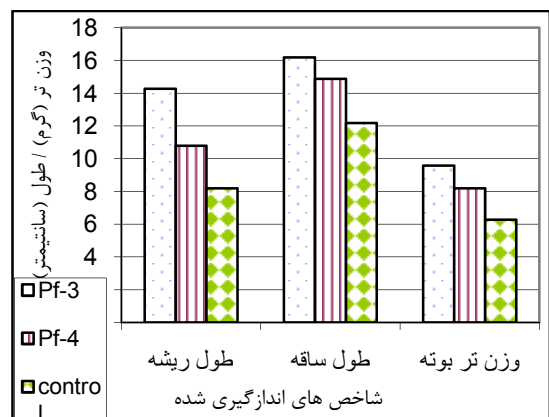
شکل ۲: تاثیر غلظت‌های مختلف کاپتان در جلوگیری از رشد باکتری *Pseudomonas fluorescens*

تاثیر باکتری‌ها در تحریک رشد گیاه در شرایط نوتوبیوتیک

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



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



شکل ۳: تاثیر دو استرین از باکتری *P. fluorescens* روی رشد گیاه بدون حضور عامل بیماری

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

تیماها	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	۳ گرم ماده موثره در کیلوگرم بذر	۸۰/۴۳ ab	۱/۸۲ c	۷۶/۴ b
متالاکسیل	۵/۰ گرم ماده موثره در کیلوگرم بذر	۹۲/۲۳ a	۲/۳۱ bc	۸۶/۷ ab
Pf-1	۱۰ ^۹ سلول در میلی لیتر	۴۳/۹۰ c	۰/۹۴ cd	۳۵/۸ d
Pf-2	۱۰ ^۹ سلول در میلی لیتر	۵۵/۱۳ bc	۱/۴۵ c	۴۳/۲ cd
Pf-3	۱۰ ^۹ سلول در میلی لیتر	۵۵/۵۲ bc	۲/۶۳ b	۵۳/۵ c
Pf-4	۱۰ ^۹ 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)
				۲/۱۲۴
				۱/۰۸۹
				۲/۳۱۴

پارامترهای مورد اندازه‌گیری ۱۵ روز پس از کاشت صورت گرفت. استریل کردن خاک به‌وسیله بخار آب ۱۲۱ درجه به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ حاوی ۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر به اِزاه 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 در خاک استریل نشده آلوده به *P. ultimum*

تیماها	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

جمعیت باکتری برای هر دو اینوکولوم حدود ۱۰^۹ 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 ۱۲۱ درجه به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ حاوی ۴۰۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر به اِزاه 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*

تیماها	درصد جوانه‌زنی	گروه بندی 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.

بحث

بهتری دارد (پارک و همکاران، ۱۹۹۱). در این پژوهش مشخص گردید که درصد جوانه‌زنی بذور در اثر باکتری *P. fluorescens* به تنهایی ۴۰/۸ درصد و به همراه کاپتان ۷۸ درصد 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 به همراه باکتری می‌تواند باعث ضعیف شدن بیمارگر و در نتیجه آسیب‌پذیرتر شدن آن در برابر عامل آنتاگونیست به‌شود. هم‌چنین یکی از روش‌های موثر در افزایش کارایی مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی استفاده از استرین‌های مختلف اعم از باکتری‌ها و قارچ‌های مناسب می‌باشد. بیکر و کلپر (۱۹۹۰) ضمن تاکید بر این 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 به حداقل 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 سوسپانسیون پاشی به خاک در صورت بهینه‌سازی 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 می‌توان 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

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 محدودیت-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 می‌توان 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). در مجموع 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

استفاده از تعدادی از باکتری‌های آنتاگونیست از جمله *Burkholderia cepacia* و *P. fluorescens* به منظور کنترل پوسیدگی ریشه ناشی از گونه مختلف *Pythium* در شرایط مزرعه بررسی و نتایج قابل ملاحظه‌ای به دست آمد (میلوس و راترک، ۱۹۹۷). در این پژوهش هم‌چنین معلوم شد که آن دسته از باکتری‌هایی که در مزرعه قدرت بیوکنترل خوبی داشتند، جدایه‌هایی بودند که در آزمایشگاه به خوبی توانسته بودند که از رشد قارچ ممانعت کنند.

سپاسگزاری

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

بذر باید به سازگاری باکتری مورد استفاده و قارچکش‌ها توجه لازم و کافی صورت گیرد درحالی‌که در روش اسپری، این مسئله چندان اهمیت ندارد. به نظر می‌رسد جمعیت 10^9 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 10^6 تا 10^7 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

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 biological 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 diseases. Ann. Rev. Phytopatol 26: 75-91.
- Gould, W. D., Hagedorn, C., Bardinelli, T. R. and Zablutowicz, 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.

- 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 Institute, 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.
-

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

Ahmadzadeh¹, M. and Sharifi Tehrani², 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% of seeds coated with the biocontrol bacterium *P. fluorescens* isolate Pf-2 could considerably germinate in the presence 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

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