مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۳۰۱-۲۹۵)

جدایه‌های *Rhizobium* spp. به عنوان عوامل بیوکنترل مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از *Rhizoctonia solani*

سمانه سماوات[1]*، مسعود احمدزاده[2] و کیوان بهبودی[3]
۱، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ۲، ۳، دانشیار و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۴)

چکیده

در تحقیق حاضر، اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های *Rhizobium* spp. علیه قارچ (AG-4) *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا، تحت شرایط آزمایشگاه و گلخانه با یکدیگر مقایسه شد و توانایی آنها در تولید متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی از جمله هیدروژن سیانید، سیدروفور و پروتئاز بررسی گردید. نتایج نشان داد که جدایه RH3 در بازدارندگی از رشد قارچ بیشترین تأثیر را در شرایط آزمایشگاهی داشت. جدایه‌های RH4، (RH3، RH6) و RH6 به ترتیب از بیشترین توانایی در تولید سیدروفور، پروتئاز و هیدروژن سیانید برخوردار بودند. با استفاده از خاک سترون در شرایط گلخانه تأثیر آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های باکتریایی روی شدت بیماری، درصد کنترل بیماری و شاخص‌های رشدی مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه‌های RH4 و RH5 در افزایش وزن خشک گیاه در حضور بیمارگر بیشترین تأثیر را داشتند. اگرچه هیچ یک از جدایه‌های باکتریایی نتوانستند به طور کامل از بیماری تحت شرایط گلخانه ممانعت نمایند ولی جدایه RH3 بیماری را بیش از ۸۰٪ کنترل نمود. نتایج نشان می‌دهد که توانایی بیوکنترل جدایه‌های *Rhizobium* نه تنها منجر به کاهش بیماری می‌شود بلکه رشد گیاه را نیز تحریک می‌کند. بنابراین چنین جدایه‌های باکتریایی می‌توانند به طور موفقیت آمیز در سیستم‌های تولید کشاورزی پایدار بکار گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: *Rhizoctonia solani*، *Rhizobium*، کنترل بیولوژیک، لوبیا سبز، آنتاگونیست

مقدمه

لوبیا با نام علمی (*Phaseolus vulgaris* L.) نسبت به سایر حبوبات در ایران دارای بالاترین سطح زیر کشت است (Census of Agriculture, 2005). از طرفی دارای بیماریهای متعددی است که از جمله مهمترین آنها می‌توان به بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn. اشاره کرد. این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۵ توسط منوچهری و قنادزاده از اطراف کرج گزارش شد (Etebarian, 2002). جدایه‌های مختلف این گونه عامل بیماری‌های مختلفی نظیر پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه، پوسیدگی ساقه، پوسیدگی ریشه و بلایت برگ و غلاف می‌باشد (Agrios, 2005). Safaee *et al.* (1999) طی بررسی‌های خود بیان نمودند که گروه آناستوموزی AG-4 آن به عنوان عامل اصلی شانکر ریشه و مرگ گیاهچه لوبیا در ایران است. کاربرد سموم بنومیل،

* نویسنده مسئول: سمانه سماوات تلفن: ۰۹۱۲-۳۶۶۱۸۴۳ E-mail: samaneh.samavat@gmail.com

ویتاواکس، تیابندازول، مانکوزب و زینب به صورت تیمار بذر لوبیا قبل از کاشت، به منظور کنترل این بیماری مرسوم است (Okhovvat, 1999). اما کاربرد نامناسب آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی در طی سالیان متمادی منجر به بروز مشکلات عدیده‌ای چون آلودگی خاک اراضی زیر کشت، آلودگی آبهای زیر زمینی و شوری خاک در کشاورزی شده است.

امروزه تلاش در جهت کاهش مصرف چنین ترکیبات شیمیایی به منظور بالابردن کیفیت خاک و تحقق کشاورزی پایدار است که از آن جمله می‌توان به کاربرد باکتری‌ها به عنوان عوامل بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی و کودهای بیولوژیک اشاره کرد. بکارگیری باکتری‌های آنتاگونیست، از جمله روش‌هایی است که در کنترل بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است.

بررسی‌ها نشان داده است که *R. leguminosarum*، *Sinorhizobium meliloti* و *Bradyrhizobium japonicu* به طور موفقیت‌آمیزی علیه بیمارگرهای قارچی متعلق به جنس‌های *Macrophomina*، *Phoma* و *Fusarium* به کار رفتند (Ehteshamul-Haque & Ghaffar, 1993; Ozkoc & Deliveli, 2001). مکانیزم‌هایی که این گروه از باکتری‌ها در کنترل بیماری‌ها به کار می‌گیرند، شامل: رقابت برای کسب آهن از طریق تولید سیدروفورها (Carrillo & Del Rosario, 1992; Arora *et al*., 2001) تولید آنتی‌بیوتیک‌ها (Chakraborty & Purkayastha, 1984; Ehteshamul-Haque & Ghaffar, 1993)، تحریک رشد گیاه (Siddiqui *et al*., 2000; Siddiqui & Mahmoud, 2001) و القای مقاومت سیستمیک (Abdelaziz *et al*., 1996) است.

تحقیق حاضر به منظور دستیابی به اهداف زیر صورت گرفته است:

۱. بررسی تأثیر باکتری‌های جنس *Rhizobium* بر روی قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی
۲. بررسی توان برخی جدایه‌های ایرانی *Rhizobium* spp. در تولید متابولیت‌های ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی
۳. بررسی تأثیر تیمار بذور با باکتری‌های *Rhizobium* spp. در کنترل بیماری مورد نظر در شرایط گلخانه

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

در این تحقیق تعداد پنج جدایه ریزوبیوم متعلق به گونه‌های *R. etli* (RH5) و *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (RH3, RH4, RH6,RH7) و قارچ بیمارگر *R. solani* (AG-4) که بیماریزایی آن روی لوبیا به اثبات رسیده بود و نیز بذور لوبیا سبز رقم گلی (*Phaseolus vulgaris* L. cv. *Goli*) مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌های ریزوبیوم، قارچ بیمارگر و بذور لوبیا به ترتیب از مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهران، کلکسیون قارچشناسی گروه گیاه‌پزشکی و گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران دریافت شد.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری

مطابق روش Hagedorn *et al*. (1989) باکتری‌ها به صورت سه نقطه‌ای با فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA[1] کشت داده شدند. ۴۸ ساعت بعد یک دیسک از پرگنه جوان قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شد. پتری شاهد تنها شامل دیسکی از پرگنه جوان قارچ *R. solani* تحت شرائط یکسان بود. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. برای مقایسه قدرت بازدارندگی جدایه‌ها، قبل از رسیدن ریسه قارچ به لبه پتری شاهد، فاصله کلنی باکتری‌ها تا پرگنه قارچ اندازه‌گیری شد و میانگین آنها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر مقایسه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت.

بررسی توان تولید برخی متابولیت‌های ضد قارچی توسط جدایه‌های ریزوبیوم

برای بررسی توان تولید سیدروفور توسط جدایه‌های ریزوبیوم مورد آزمایش از روش Alexander & Zuberer (1991) استفاده شد. محیط CAS-آگار[2]، در تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری توزیع شد و پلیت‌ها توسط یک

1. Potato dextrose agare
2. Chrome azurol S

لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای تلقیح شدند. پتری‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. نسبت قطر هاله نارنجی اطراف باکتری‌ها به قطر کلنی باکتری‌ها در سه روز متوالی بررسی شد و میانگین سه روز محاسبه و با یکدیگر مقایسه گردید. به منظور بررسی توان تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری‌ها از محیط SMA[1] (۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۹/۱۳ گرم آگار، یک لیتر آب مقطر) و کشت نقطه‌ای باکتری‌ها روی این محیط مطابق روش Maurhofer *et al.* (1995) استفاده شد. تشکیل هاله بیرنگ در اطراف کلنی باکتری‌ها نشانه فعالیت پروتئاز آنهاست. نسبت قطر هاله به قطر کلنی باکتری اندازه‌گیری شد. تعیین توان تولید هیدروژن سیانید (HCN) با استفاده از روش اصلاح شده توسط Alstrom & Burns (1989) انجام گردید. به این منظور از محیط کینگ‌بی (KB) حاوی ۴/۴ گرم گلایسین در هر لیتر محیط و کاغذ های صافی آغشته به محلول معرف مرکب از کربنات سدیم و اسید پیکریک ۰/۵٪ استفاده شد. تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلم مسدود شد و درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید هیدروژن سیانید، کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ اولیه زرد به کرم (I)، قهوه‌ای روشن (II)، قهوه‌ای تیره (III) و آجری تغییر رنگ (IV) می یابد. این آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت و میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ با یکدیگر مقایسه گردید.

آزمایش گلخانه‌ای

بذرهای لوبیا، رقم گلی، به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند و سپس چهار بار در آب مقطر استریل شسته شدند. به منظور همزمانی در ظهور گیاهچه ها، بذور به مدت ۴۸ ساعت بر روی محیط WA[2] در شرایط تاریکی و در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا ریشه‌چه ظاهر شود. به منظور آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های آنتاگونیست از روش Weller & Cook (1986) با کمی تغییراستفاده شد. برای این منظور یک لوپ از کشت ۴۸ ساعته هر یک از جدایه‌های ریزوبیوم مورد آزمایش روی محیط کشت YMA[3] (۱۰ گرم مانیتول، ۰/۱ گرم کلرید سدیم، یک گرم عصاره مخمر، ۰/۲ گرم سولفات منیزیوم، ۰/۵ گرم فسفات دی‌پتاسیم، یک گرم کربنات کلسیم، ۱۵ گرم آگار، یک لیتر آب مقطر) به فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر از محیط YMB[4] منتقل شد و به مدت ۴۸ ساعت در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ (به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰*g*) رسوب داده شدند و دو بار با محلول نمک فیزیولوژیک به منظور رفع باقیمانده محلول غذایی شستشو شدند. سلول‌های باکتریایی با سانتریفوژ مجدد از این محلول جداسازی شد و سوسپانسیون سلولی از آنها با جمعیت 1×10^{9} در محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز تهیه شد. بذور لوبیا درون سوسپانسیون‌های باکتریایی ریخته شده و سپس به مدت یک ساعت روی شیکر با سرعت ۷۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بذور در تیمار شاهد درون محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز فاقد باکتری غوطه ور شدند. بذور آغشته شده در معرض جریان هوای استریل هود خشک شدند.

تهیه مایه تلقیح قارچ *R. solani* مطابق روش Pal *et al.* (2001) صورت گرفت، به این منظور پنج دیسک از کشت سه روزه قارچ بیمارگر روی محیط PDA، در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴ گرم پودر برگ و ریشه لوبیا و ۱۰۰ گرم بذر ارزن خیس خورده و دو بار اتوکلاو شده قرار داده شد. ارلن به مدت دو هفته در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد. در آخر دو گرم از مایه تلقیح حاصل به ازای یک کیلوگرم خاک تندالیزه شده اضافه گردید و در هر گلدان سه عدد بذر با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی کاشته شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

1. Skim milk agar
2. Water agar
3. Yeast mannitol agar
4. Yeast mannitol broth

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده.

بافت خاک	PH	EC (ds/m)	O.C (%)	N (%)	T.N.V (%)	P (mg/Kg)	K (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)
لومی	۷/۶	۱/۴	۰/۶	۰/۰۵	۱۲	۹	۱۸۰	۳	۰/۸

گلدان‌ها به صورت یک روز در میان از بالا آبیاری می‌شدند. بعد از سه هفته ریشه‌ها به ملایمت در زیر آب شسته شدند و شدت بیماری آنها بر اساس روش تغییر یافته Kim *et al.* (1997)، مورد ارزیابی قرار گرفت. مقیاس‌دهی به صورت زیر انجام گرفت.

صفر= گیاهان سالم بدون هیچ علایم آلودگی

۱= کمتر از ۱۰٪ ریشه آلوده است با یک زخم قهوه‌ای آفتاب سوخته به طول کمتر از یک سانتی‌متر روی طوقه.

۲= بیشتر از ۱۰٪ ریشه آلوده است با دوتا سه زخم قهوه‌ای آفتاب سوخته به طول کمتر از یک سانتی‌متر روی طوقه.

۳= کمتر از ۲۰٪ ریشه آلوده است با سه زخم قهوه‌ای آفتاب سوخته به طول دو تا سه سانتی‌متر روی طوقه.

۴= بیشتر از ۲۰٪ ریشه آلوده است با سه زخم قهوه‌ای آفتاب سوخته تیپیک به طول بیشتر از سه سانتی‌متر روی طوقه.

۵= مرگ گیاهچه پس از در آمدن از خاک (Postemergence)، طول گیاهچه کمتر از پنج سانتی‌متر است.

۶= پوسیدگی بذر یا مرگ گیاهچه قبل از در آمدن از خاک (Preemergence).

$$\%DI=\frac{\sum_{i=۱}^{m=۳}(n_i)}{m\times ۵}\times ۱۰۰$$

شاخص بیماری (DI)[1] برحسب درصد با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید که می‌توان با کم کردن آن از عدد ۱۰۰، درصد کنترل بیماری را محاسبه نمود.

n_i: شاخص آلودگی گیاهچه

I: شماره گیاهچه

m: تعداد گیاهچه‌های تکرار

1. Disease index

محاسبات آماری

در تحقیق حاضر مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی در آزمایشگاه و گلخانه به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن به ترتیب در سطح احتمال ($P\leq$ ۰/۰۱) و ($P\leq$ ۰/۰۵) و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTAT C (نسخه ۱/۲، دانشگاه ایالت میشیگان) انجام گرفت.

نتایج و بحث

داده‌های مربوط به نتایج آزمایش‌های صورت گرفته در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به ترتیب در جدول ۲ (در سطح احتمال ۱٪) و جدول ۳ (در سطح احتمال ۵٪) نشان داده شده است.

در میان جدایه‌های مورد بررسی، جدایه RH3 از بیشترین توانایی در بازدارندگی از رشد قارچ درون تشتک پتری برخوردار بود و در سطح احتمال ۱٪ با جدایه‌های RH5 و RH6 اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). این امر بیانگر این مطلب است که جدایه‌های مختلف *Rhizobium* مقادیر مختلفی از ترکیبات ضد قارچی تولید می‌کنند. Arfaoui *et al.* (2006) نشان دادند که کاهش رشد قارچ درون تشتک پتری بوسیله جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش و تشکیل هاله بازدارندگی، ناشی از آزاد کردن ترکیباتی چون آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولی بخصوص آنزیم پروتئاز توسط باکتری‌ها به درون محیط کشت است. بررسی‌های متعددی نشان می‌دهد که تولید ترکیبات ثانویه ضد قارچی همچون سیدروفورها، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده بوسیله باکتری‌های جنس *Rhizobium* spp. منجر به کنترل بیمارگرهای قارچی می‌شود (Ehteshamul-Haque & Ghaffar, 1993; Perdomo *et al*., 1995; Siddiqui *et al*., 2000). در تحقیق حاضر نیز جدایه‌هایی که از نظر تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم پروتئاز برتر بودند، نه تنها

در شرایط آزمایشگاه (*in vitro*) توانایی بیشتری در جلوگیری از رشد قارچ نشان دادند، در شرایط گلخانه نیز بهتر از جدایه‌های دیگر بیماری را کنترل کردند. Bardin *et al.* (2004) نیز نشان دادند که برخی سویه‌های *R. leguminosarum* bv. *viceae* علاوه بر کاربردشان به عنوان کودزیستی در افزایش میزان جوانه‌زنی نخود و نیشکر در قیاس با شاهد، از توانایی کنترل بیماری مرگ گیاهچه پیتیومی نخود نیز برخوردار هستند.

هیدروژن سیانید از دیگر ترکیبات ضد قارچی است، مایه‌زنی گندم با سویه‌های سیانوژن *P. putida* منجر به کنترل قارچ *Septoria tritici* شده است (Flaishman *et al.*, 1996) نتایج حاصل از آزمون نیمه کمی توان تولید هیدروژن سیانید اندازه‌گیری شده در پنج جدایه ریزوبیومی، اولاً ثابت می‌کند که برخی از باکتری‌های ریزوبیومی توان تولید HCN را دارند، لذا می‌توان آنها را در لیست باکتری‌های سیانوژنیک قرارداد. مشابه این نتایج اولین بار توسط Antoun *et al.* (1998) گزارش شده است، ایشان نشان دادند که حدود ۳ درصد از سویه‌های ریزوبیومی توان تولید HCN را دارند. ثانیاً توان تولید این متابولیت (HCN) در بین جدایه‌های ریزوبیومی سیانوژن نیز یکسان نیست. به گونه‌ای که جدایه RH6 از حداکثر این توانایی و جدایه RH5 از حداقل این توانایی برخوردار بود، ولی با توجه به بررسی‌های گلخانه‌ای صورت گرفته احتمالاً این ترکیب نقش کمتری در کنترل قارچ مورد نظر داشت، زیرا بین جدایه‌های قوی و ضعیف از این نظر، در کنترل بیماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. از طرفی با توجه به اثر منفی هیدروژن سیانید بر متابولیسم انرژی ریشه و

جدول ۲- مقایسه جدایه‌های ریزوبیومی مورد آزمایش (RH3-RH7) از نظر میانگین قطر هاله بازدارندگی (mm)، تولید آنزیم پروتئاز (میانگین قطر هاله به قطر کلنی باکتری)، سیدروفور (میانگین قطر هاله به قطر کلنی باکتری در سه روز متوالی) و سیانید هیدروژن

جدایه باکتری	هاله بازدارندگی (mm)	آنزیم پروتئاز	سیدروفور	سیانید هیدروژن
RH3	۹/۳۳ ±۰/۱۶ A	۲/۲۸ ±۰/۱۰ A	۱/ ۵۶±۰/۰۸ B	III
RH4	۷/۶۷ ±۰/۱۵ B	۲/۰۳ ±۰/۰۸ A	۱/ ۷۹ ±۰/۰۹A	III
RH5	۱/۰۷ ±۰/۱۲ D	۰/۰۳ ±۰/۰۰۵ B	۱/۲۷ ±۰/۱۱C	I
RH6	۵/۳۳ ±۰/۲۰ C	۲/۳۰ ±۰/۰۷ A	۱/۳۲ ±۰/۰۵C	IV
RH7	۶/۶۷ ±۰/۱۸ BC	۲/۲۰ ±۰/۰۸ A	۱/۲۸ ±۰/۰۶C	III
LSD	۱/۳۷	۰/۳۸۷	۰/۰۸۷	

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری در سطح احتمال ۱٪ است.

جدول ۳- تأثیر جدایه‌های ریزوبیوم مورد آزمایش (RH3-RH7) بر شدت بیماری مرگ گیاهچه و شاخص‌های رشد لوبیا رقم گلی در حضور قارچ *R. solani*

جدایه باکتری	درصد کنترل بیماری	شدت بیماری	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام‌های هوایی	وزن خشک ریشه
RH3	۸۱/۴۸	۱/۱۱±۰/۰۸c	۳/۱۰±۰/۱۸b	۰/۸۷±۰/۰۶b	۰/۳۰±۰/۰۴bc	۰/۰۷±۰/۰۰۸ab
RH4	۷۷/۷۸	۱/۳۳±۰/۱۱bc	۳/۵۰±۰/۱۵a	۰/۶۴±۰/۰۹c	۰/۳۵±۰/۰۴ab	۰/۰۵±۰/۰۰۴ab
RH5	۷۹/۶۳	۱/۲۲±۰/۰۹bc	۳/۵۲±۰/۱۵a	۱/۱۲±۰/۱۰a	۰/۳۹±۰/۰۳a	۰/۱۰±۰/۰۰۷a
RH6	۷۲/۲۲	۱/۶۷±۰/۱۶b	۲/۹۴±۰/۱۹bc	۰/۹۵±۰/۱۱ab	۰/۲۵±۰/۰۲cd	۰/۰۸±۰/۰۰۸ab
RH7	۷۵/۹۳	۱/۴۴±۰/۱۲bc	۳/۱۱±۰/۱۲b	۱/۰۳±۰/۰۵ab	۰/۳۰±۰/۰۳bc	۰/۰۸±۰/۰۰۶ab
شاهد آلوده	۵/۵۶	۵/۶۷±۰/۲۳a	۰/۳۳±۰/۰۶d	۰/۰۹±۰/۰۱d	۰/۰۴±۰/۰۰۵e	۰/۰۲±۰/۰۰۳b
LSD		۰/۴۳۹	۰/۰۵۲	۰/۱۰۵	۰/۲۳۴	۰/۰۵۲

حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری در سطح احتمال۵٪ است.

رشد گیاه (Defago *et al*., 1990)، جدایه‌های RH6 نسبت به سایر جدایه‌ها توانایی کمتری در افزایش وزن تر اندام‌های هوایی از خود نشان داد، برعکس جدایه RH5 از قابلیت بیشتری از این نظر برخوردار بود (جدول۳). Guerinot (1991) نشان داد که باکتری‌های ریزوبیومی قادرند انواعی از سیدروفورها را تولید کنند. Plessner *et al*. (1993) نشان دادند که برخی سویه‌های *B. japonicum* قادرند از سیدروفورهای تولید شده خود و سیدروفورهای دیگر انواع ریزوباکتریهای خاک استفاده نمایند، به عقیده آنها این توانایی می‌تواند یک ویژگی مثبت برای انتخاب این باکتری‌ها در کنترل عوامل بیمارگر گیاهی و افزایش رشد و عملکرد گیاهان محسوب شود. در تحقیق حاضر نیز به ترتیب جدایه‌های ریزوبیومی RH4 و RH3 از لحاظ تولید سیدروفور از قابلیت بیشتری برخوردار بودند. بررسی‌های گلخانه‌ای هم حاکی از کارآمدی بیشتر این جدایه‌ها در کنترل بیمارگر موردنظر است. مشاهده گردید که جدایه ریزوبیومی RH5 اگرچه از نظر تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم پروتئاز، هیدروژن سیانید و سیدروفورها از قابلیت کمتری نسبت به سایر جدایه‌ها برخوردار بود اما توانست در شرایط گلخانه بیماری را بخوبی کنترل نماید و از نظر شاخص‌های رشدی بهترین نتیجه را منجر شود. طبق بررسی‌های صورت گرفته توسط Chakraborty & Chakraborty (1989) سویه‌های ریزوبیومی که به هاله بازدارندگی ضعیفی از قارچ بیمارگر درون تشتک پتری منجر می‌شوند ممکن است با تحریک سیستم دفاعی گیاه منجر به محافظت از آن در برابر بیمارگر شوند، در حقیقت این سویه‌ها منجر به افزایش تولید فیتوالکسین در گیاه می‌شوند. تخمین زده می‌شود که شایستگی این جدایه نیز به این دلیل است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از تحقیق حاضر حاکی از توانایی جدایه‌های ایرانی ریزوبیوم در کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه ریزوکتونیایی لوبیا است. این امر نشان می‌دهد که جدایه‌های ریزوبیومی می‌توانند در آینده‌ای نزدیک از جایگاه ویژه‌ای به عنوان عوامل بیوکنترل نسبت به سایر عوامل بیوکنترل برخوردار باشند.

سپاسگزاری

از همکاری پرسنل محترم آزمایشگاه کنترل بیولوژیک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abdelaziz, R. A., Radwansamir, M. A., Abdel-kader, M. & Barakat, M. A. (1996). Biocontrol of faba bean root-rot using VA mycorrhizae and its effect on biological nitrogen fixation. *Egyptian Journal of Microbiology*, (31), 273-286.
2. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. (5th ed.). Academic Press, London.
3. Alexander, D. B. & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagent evaluates siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology of Fertility Soils*, (12), 39-45.
4. Alstrom, S. & Burns, R. G. (1989). Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology of Fertility Soils*, (7), 232-238.
5. Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R. & Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and soil*, (204), 57-67.
6. Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I. & Cherif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris*, the causal agent of Fusarium wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, (88), 67-75.
7. Arora, N. K., Kang, S. C. & Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophores-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes rot of groundnut. *Current Science*, (18), 673-677.
8. Bardin, S. D., Huang, H. C., Pinto, J., Amundsen, E. J. & Erickson, R. S. (2004). Biological control of *Pythium* damping-off of pea and suger beet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Canadian Journal of Botany*, (3), 291-296.
9. Carrillo, G. C. & Del Rosario, V. M. (1992). Comparative study of siderophore like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Plant Nutrition*, (15), 579-590.
10. The Ministry of Jahad-e Agriculture. (2005). *Census of Agriculture*. Agricultural Planning Economic and Rural Development Research Institute. Agronomy & Horticulture. 2(1). (In Farsi)

11. Chakraborty, U. & Chakraborty, B. N. (1989). Interaction of *Rhizobium leguminosarum* and *Fusarium solani* f.sp. *pisi* on pea-affecting disease development and phytoalexin production. *Canadian Journal of Botany*, (67), 1698-1702.
12. Chakraborty, U. & Purkayastha, R. P. (1984). Role of Rhizobiotoxine in protecting soybean Glycine-Max roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Canadian Journal of Microbiology*, (30), 285-289.
13. Defago, G., Berling, C. H., Burger, U., Haas, D., Khar, G., Keel, C., Voisard, C., Wirthener, P. H. & Wutrich, B. (1990) Suppression of black root rot of tobacco by a *Pseudomonas* strain. In: D. Hornby (Ed.), *Potential application and mechanisms in biological control of soil-borne plant pathogens*. (pp. 93-108).
14. Ehteshamul-Haque, S. & Ghaffar, A. (1993). Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. *Journal of Phytopathology*, (138), 157-163.
15. Etebarian, H. R. (2002). *Vegetable diseases and their control*. (2nd ed.). Tehran University Press, Iran. (In Farsi).
16. Flaishman, M. A., Eyal, Z., Zilberstein, A., Voisard, C. & Haas, D. (1996). Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, (9), 642-645.
17. Guerinot, M. L. (1991). Iron uptake and metabolism in the rhizobial legume symbioses. *Plant and Soil*, (130), 199-209.
18. Hagedorn, C., Gould, W. D. & Bardinekkii, T. R. (1989). Rhizobacteria of cotton on their repressi on see dlingdisease pathogens. *Applied Environment of Microbiology*, (55), 2793-2797.
19. Kim, D. S., Cook, R. J. & Weller, D. M. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, (87), 551-558.
20. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Defago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology*, (44), 40-50.
21. Okhovvat, M. (1977). Study the effect of some fungicides on Kühn. *Rhizoctonia solani* the causal agent of bean seed rot and damping-off. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 13 (1, 2), 1-8. (In Farsi)
22. Ozkoc, I. & Deliveli, M. H. (2001). In vitro inhibition of the mycelial growth of some root rot fungi by *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* isolates. *Turkish Journal of Biology*, (25), 435-445.
23. Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R. & Singh, C. S. (2001). Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiology Research*, (156), 209-223.
24. Perdomo, F., Echaves, B. R., Ahmed, M. & Schroder, E. C. (1995). *In vitro* evaluation of bacteria for the biological control of *Macrophomina phaseolina*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (11), 183-185.
25. Plessner, O., Klaptch, T. & Guerinot, M. L. (1993). Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied Environment Microbiology*, (59), 1688-1690.
26. Safaee, N., Minasian, V., Rahimian, H. & Bani-Hashemi, Z. (1999). Isolation, recognition and study of the pathogenesis of rhizoctonia species from different plants in Khozestan. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 35, 1-8. (In Farsi)
27. Siddiqui, I. A., Ehteshamul-Haque, S., Zaki, M. J. & Ghaffar, A. (2000). Greenhouse evaluation of rhizobia as biocontrol agent of root infecting fungi in Okra. *Acta Botanica*, (53), 13-22.
28. Siddiqui, Z. A. & Mahmoud, I. (2001). Effects of rhizobacteria and root symbionts on the reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. *Bioresource Technology*, (79), 41-45.
29. Weller, D. M. & Cook, R. J. (1986). Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*, and implication of *Pythium* control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, (8), 328-334.