مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۶۳-۱۵۱)

بررسی اثر فرمولاسیون‌های پودری جدایه *Bacillus subtilis* M36 در کنترل *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* عامل پوسیدگی ریشه لوبیا

پریسا میرزائی قمی[۱]، حمیدرضا زمانی‌زاده[۲]، روح اله صابری ریسه[۳] و محمدرضا لک[٤]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۳، عضو هیأت علمی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، ٤، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، اراک
(تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲٦ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۰)

چکیده

در این بررسی توان آنتاگونیستی ۱۹۴ جدایه باکتریایی گرم مثبت جداسازی شده از مزارع لوبیای استان مرکزی و ۴۱ جدایه آنتاگونیست *Bacillus subtilis* متعلق به کلکسیون گروه پژوهشی کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران، بر اساس ناحیه بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* در آزمون سه نقطه ای بررسی شد و در نهایت هشت جدایه برتر *B. subtilis* جهت آزمایش‌های گلخانه ای مقدماتی انتخاب شدند. نتایج نشان داد که جدایه آنتاگونیست *B. subtilis* M36 جدا شده از مزارع لوبیای استان مرکزی بیشترین اثر را در کاهش بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا داشت. پس از بررسی اثر ۹ فرمولاسیون ساخته شده پودر تالک جدایه مذکور در شرایط گلخانه معلوم شد، فرمولاسیون تهیه شده در محیط کشت M1 به همراه چسباننده صمغ عربی با ۶۸/۴۲٪ کنترل، در کاهش بیماری بهترین اثر را داشت و حتی از دو قارچکش رورال تی اس و تریکومیکس اچ وی به ترتیب با ۵۶/۱۴٪ و ۵۴/۳۸٪ کنترل در کاهش پژمردگی ریشه لوبیا مؤثرتر بود. بررسی جمعیت جدایه آنتاگونیست مذکور به صورت فرمولاسیون‌های پودر تالک طی دوره نگهداری ۱۵۰ روزه در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس کاهش نشان داد و شدت کاهش در ۲۵ درجه سلسیوس بیشتر بود. ماندگاری فرمولاسیون تهیه شده در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ عربی در دمای ۴°C، طی دوره نگهداری از بقیه فرمولاسیون‌ها بیشتر بود. نوع محیط کشت بر جمعیت و بقاء باکتری تأثیر قابل توجهی گذاشت و محیط کشت M1 بیشترین اثر را داشت.

واژه‌های کلیدی: ***Fusarium solani* f. sp. *phaseoli***، **لوبیا، کنترل بیولوژیک، *Bacillus subtilis*، فرمولاسیون.**

مقدمه

بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا ناشی از قارچ *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* از جمله بیماری‌های لوبیا است که در سال‌های اخیر خسارات قابل توجهی به محصول لوبیای کشور وارد کرده است. از علائم بیماری این است که ریشه اصلی کمی قرمز و به تدریج تیره‌تر

* نویسنده مسئول: پریسا میرزائی قمی تلفن: ۰۹۱۸-۳۶۳۰۸۹۴ E-mail: p_mirzaee485@yahoo.com

شده و تقریباً تمام ریشه اصلی را می‌پوشاند بعد این رنگ قرمز متمایل به قهوه‌ای شده که غالباً با شکاف‌های طولی همراه است. استفاده از واریته‌های مقاوم، اقدامات بهداشتی و تناوب زراعی از فاکتورهای مهم در کنترل بیماری است (Etebarian, 2002). کنترل بیماری‌هایی که توسط قارچ‌های خاکزی ایجاد می‌شوند مشکل و گاه بی‌تأثیر است (Cook & Baker, 1983). استفاده از مواد شیمیایی برای کنترل آفات و بیماری‌ها در طول سه دهه اخیر مشکلات اکولوژیکی را افزایش داده است، در سال‌های اخیر توجه دانشمندان به سوی تحقیق درباره توانایی میکروارگانیزم‌های مفید کنترل‌کننده آفات و بیماری‌های گیاهی معطوف شده است (Keel & Defago, 1997). تهیه یک فرمولاسیون مؤثر با حداکثر توان و گسترش آن به صورت یک محصول تجاری، با جدا سازی دقیق میکروارگانیسم‌ها شروع شده، با به کار بردن روش‌های تولید انبوه که کمیت و کیفیت آن را افزایش می‌دهند، پیش رفته و با ساخت فرمولاسیونی مناسب، با ماندگاری طولانی و کاربرد آسان که تأثیر عامل کنترل زیستی را افزایش می‌دهد، پایان می یابد. یک محصول میکروبی فرموله شده به معنای محصولی متشکل از توده زنده عامل کنترل زیستی و موادی است که دوام و تأثیر محصول را بهبود می‌بخشند (Lumsden *et al*., 1995).

استفاده از فرمولاسیون یک عامل بیوکنترل میکروبی در گلخانه یا مزرعه توسط ماندگاری و تکنولوژی کاربرد آن تعیین می‌شود (Boyetchko *et al*., 1999). فرمولاسیون‌های جامد (گرانول‌ها و پودرها) به علت ماندگاری زیاد و سهولت حمل یا انبار، معمولاً بر فرمولاسیون‌های مایع ارجحیت دارند (Sabaratnam & Traquair, 2002)، علاوه بر این اکثر فرمولاسیون‌های پودری می‌توانند در صورت نیاز به اسپری کردن و یا خیساندن ریشه و خاک، به صورت سوسپانسیون‌های مایع در آیند (Lumsden *et al*., 1995). فرمولاسیون‌های میکروبی که در دمای ۴°C نگهداری می‌شوند معمولا با دوامتر از فرمولاسیون‌هایی هستند که در دمای ۲۵°C نگهداری می‌شوند (Bora *et al*., 2004; Sabaratnam & Traquair, 2002). فرمولاسیون‌های پودر تالک دو جدایه از *Bacillus subtilis* درکنترل *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه کلزا در گلخانه و مزرعه مؤثر بودند (Sharifi-Tehrani *et al*., 2007). فرمولاسیون‌های پودر تالک جدایه‌های ۳۰ و ۱۸۰ از *Pseudomonas putida* در شرایط گلخانه و مزرعه در کنترل پژمردگی فوزاریومی خربزه مؤثر بودند (Bora *et al*., 2004). فرمولاسیون‌های پودر تالک دو جدایه *Pseudomonas fluorescens* در کنترل *Rhizoctonia solan*i عامل مرگ گیاهچه کلزا در گلخانه و مزرعه مؤثر بودند (Sharifi-tehrani et al., 2007). فرو بردن نهال *Phyllantus amarus* در فرمولاسیون تالک (BSCEB4) *B. subtilis* و یا*P. chlororaphis* به مدت ۳۰ دقیقه، بلایت ساقه را کاهش داد (Mathiuazhagan *et al*., 2004). هدف از این تحقیق دستیابی به برخی جدایه‌های باکتریایی *B. subtilis* از محیط اطراف ریشه و بررسی اثر آنها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه در جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا و فرموله کردن باکتری مؤثر به صورت پودر، برای سهولت انتقال و انبار داری، افزایش میزان ماندگاری، پوشش جایگاه هدف و چسبندگی بیشتر به آن و بهبود بخشیدن اثر آنها در کنترل پوسیدگی ریشه لوبیا در گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ بیمارگر *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*

جدایه بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* که توسط Noori (2008) از مزارع لوبیای خمین (استان مرکزی) جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شده بود و نیز بیماریزایی آن روی لوبیا به اثبات رسیده بود از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی دریافت گردید.

تهیه جدایه‌های آنتاگونیست

۴۲۴ جدایه از ناحیه ریزوسفر گیاهچه‌های لوبیا در مناطق مختلف کشت لوبیا در استان مرکزی (شهرستان‌های خمین، شازند و اراک) جداسازی گردید. بدین منظور در تابستان ۱۳۸۶، بازدیدهای متعددی از مناطق عمده کشت لوبیا در استان مرکزی صورت گرفت. نمونه‌برداری به شکل تصادفی از هر مزرعه و به صورت M (زیگزاکی) انجام شد (Kim *et al*., 1997). نمونه‌های جمع‌آوری شده درون کیسه فریزر نگهداری و پس از

نصب برچسب مشخصات لازم به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس جداسازی باکتری‌ها از خاک، طوقه و ریشه لوبیا انجام گرفت. ۴۱ جدایه آنتاگونیست نیز از کلکسیون گروه پژوهشی کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران توسط Shahrokhi (2008) دریافت گردید.

بررسی قدرت بازدارندگی برخی جدایه‌های باکتریایی از رشد بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* درون پتری‌دیش[1]

برای بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش Hagedorn *et al*. (1989) استفاده شد. بدین ترتیب هر یک از جدایه‌های مختلف باکتریایی به صورت ۳ نقطه ای با فاصله ۰/۵ سانتی‌متری از لبه پتری حاوی PDA کشت داده شدند، پس از ۲۴ ساعت یک حلقه از کشت جوان قارچ بیمارگر در وسط پتری دیش قرار گرفت. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور قرار گرفتند. برای مقایسه قدرت بازدارندگی باکتری‌ها، فاصله کلونی باکتری‌ها تا فاصله کلونی قارچ (وقتی که قارچ در قسمت شاهد که فاقد باکتری است تا نزدیک به لبه پتری رشد کرد) با خط کش اندازه گیری شد و برخی جدایه‌های دارای توان بازدارندگی بالا جهت شناسایی و انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست مؤثر

جدایه‌های انتخاب شده بر اساس آزمون‌های زیر مورد مقایسه قرار گرفتند:

واکنش گرم در پتاس سه درصد و آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش Schaad *et al.* (2001)، تولید رنگدانه فلورسنت و رشد روی محیط کینگ ب، به روش King (1954)، رشد روی محیط D-1 آگار به روش Koda (1970)، تولید کلونی‌های زرد یا نارنجی روی محیط NAG، YDC و رنگ‌آمیزی اسپور نیز به روش Schaad *et al.* (2001) انجام شد.

آزمون‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مورفولوژیک جهت شناسایی گونه جدایه‌های باسیلوس

آزمون کاتالاز به روش Lilliot *et al.* (1984)، آزمون لیسیتیناز، تولید اندول، هیدرولیز کازئین، ژلاتین، نشاسته، تحمل نمک طعام (۷-۲٪)، تولید اسید از کربوهیدرات‌ها، استفاده از سیترات، رشد غیرهوازی در محیط مایع گلوکز و آزمون حداقل و حداکثر دمای رشد در محیط غذایی مایع (Nutrient broth) بر اساس روش Schaad *et al.* (2001) انجام شد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

آزمایشات در گلخانه مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی با دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس انجام شد. خاک مورد استفاده در آزمایشات شامل یک قسمت خاک معمولی، دو قسمت ماسه و دو قسمت کود برگ بود. خاک‌ها قبل از استفاده به فاصله ۲۴ ساعت دو بار اتوکلاو شدند. برای انجام این آزمایش هشت جدایه برتر *Bacillus subtilis* (سه جدایه اول جداسازی شده از مزارع لوبیای خمین و پنج جدایه بعدی، دریافتی از گروه پژوهشی کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران بود) که در روش کشت سه نقطه‌ای بیشترین هاله بازدارندگی را در مقابل بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* نشان دادند، برای تست مقدماتی گلخانه انتخاب شدند. بذر لوبیا چیتی محلی خمین از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی دریافت گردید.

تهیه مایه تلقیح بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli*

۱۲۵ گرم بذر سورگوم (دریافتی از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی) به همراه ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری در دو روز متوالی اتوکلاو گردید. بعد از این که بذور خنک شدند زیر هود استریل، قطعاتی از کشت جوان قارچ*F. solani* f. sp. *phaseoli* که روی محیط PDA کشت شده بودند، به طور جداگانه به درون هر ارلن انتقال یافت و ارلن‌ها به مدت سه هفته درون انکوباتور، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و به منظور جلوگیری از چسبندگی بذور به یکدیگر، ارلن‌ها هر روز یکبار تکان داده شدند بعد از گذشت زمان لازم، مایه تلقیح بدست آمده زیر هود استریل خشک و سپس توسط دستگاه مخلوط‌کن خرد شد و در گلدان‌های مورد نیاز به نسبت ۱ به ۱۰ به خاک اضافه شد (Cho *et al*., 2001).

1. Plate assay

تهیه مایه تلقیح جدایه‌های آنتاگونیست *Bacillus subtilis*

مطابق روش Bora *et al.* (2004) برای تهیه مایه تلقیح جدایه‌های آنتاگونیست *B. subtilis* از کشت ۴۸ ساعته این جدایه‌ها که روی محیط NA رشد داده شدند به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری تهیه شد و به ارلن حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع KB منتقل شد و به مدت ۳۶ ساعت درون دستگاه شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس) قرار گرفت. سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریوفوژ (به مدت ۲۰ دقیقه در g ۶۰۰۰) از محیط های مایع جدا شدند و برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی در محلول ۰/۱۵ مولار نمک طعام شستشو شدند، سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریوفوژ مجدد از این محلول جداسازی شد و از آنها در۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه شد و پس از رقیق‌سازی، جمعیت آنها با استفاده از سری رقت تعیین گردید.

روش آغشته سازی بذر به باکتری‌های آنتاگونیست

از جدایه‌های باکتریایی به مقدار 10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون تهیه شد. سپس بذور ضد عفونی شده در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد در آب مقطر شستشو شدند و برای آغشته‌سازی، بذور به مدت سه ساعت در سوسپانسیون تهیه شده غوطه‌ور شدند سپس سوسپانسیون اضافی خارج گردید و بذور وقتی که به حالت نیمه خشک در آمدند جهت کاشت استفاده شدند (Weller & Cook, 1983).

بررسی خواص بازدارندگی باکتری‌های آنتاگونیست در گلخانه علیه بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli*

در آزمایشات گلخانه‌ای اولیه در هر گلدان (حاوی خاک استریل) چهار بذر کاشته شد، تیمارها شامل شاهد سالم، شاهد آلوده و هشت جدایه باکتری آنتاگونیست همراه با اینوکلوم قارچ بیمارگر بود که در گلخانه در شرایط مناسب رشد قرار گرفتند و یک روز در میان به مدت یک هفته آبیاری شدند و پس از آن به محض خشک شدن سطح خاک، آبیاری صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ده تیمار و چهار تکرار صورت پذیرفت. پس از گذشت شش هفته، شدت پوسیدگی ریشه بر اساس مقیاس Spigel & Hall (1982) تعیین گردید که به شرح زیر است:

الف) هیپوکوتیل‌ها بدون لکه و هیچگونه تغییر رنگ=۱

ب) لکه‌های کوچک و جدا از هم که حدود ۲۵ درصد هیپوکوتیل را پوشانده=۲

ج) لکه‌های بهم پیوسته که حدود ۲۵ تا ۵۰ درصد هیپوکوتیل را پوشانده=۳

د) لکه‌ها در ناحیه پوست عمیق بوده و حدود ۵۰ تا ۷۵ درصد هیپوکوتیل را پوشانده=۴

هـ) لکه‌ها از حالت قبل عمیق‌تر بوده و گاه تا استوانه مرکزی می‌رسد و بیش از ۷۵ درصد هیپوکوتیل را پوشانده=۵.

تهیه فرمولاسیون

برای تهیه فرمولاسیون باکتری از روش Bora *et al.* (2004) استفاده شد. در این روش از ۳۰ میکرولیتر کشت ۳۰ ساعته (در دمای ۲۸ درجه سلسیوس) جدایه *B. subtilis* M36 در هر یک از محیط‌های کشت M1، NBY و KB به طور مجزا استفاده شد و سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریوفوژ (به مدت ۲۰ دقیقه در g ۶۰۰۰) جداسازی شدند و برای حذف باقیمانده محیط کشت، رسوب حاصله در ۳۰ میکرولیتر بافر نمک کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار حل شد. سپس سلول‌های باکتری‌هایی با استفاده از سانتریوفوژ (به مدت ۵ دقیقه در g ۶۰۰۰) از بافر نمک کلرید سدیم جداسازی شده و از آنها در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم[1] سوسپانسیون تهیه شد. گلیسرول[2] به نسبت ۱۰٪ به این سوسپانسیون اضافه شد. به سوسپانسیون حاصل، هم حجم آن، محلول سدیم آلجینات[3] ۲W/V٪ اتوکلاو شده (در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر و به مدت ۱۵ دقیقه) اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق ورتکس[4] شد. مخلوط باکتری-سدیم آلجینات به پودر تالک[5] سترون مخلوط باچسباننده به نسبت ۱ به ۴ اضافه گردید و کاملا با هم مخلوط شدند. در این

1. Mgso4
2. Glyserol
3. Sodium alginate
4. Vortex
5. Talc

بررسی از سه چسباننده کربوکسی متیل سلولز[1]، صمغ زانتان[2] و صمغ عربی[3] استفاده شد. صمغ عربی به نسبت ۵٪، کربوکسی متیل سلولز به نسبت ۱٪ و صمغ زانتان به نسبت ۲٪ نسبت به حجم پودر تالک اضافه شدند. مخلوط حاصل درون پتری در زیر هود به مدت ۱۲ ساعت خشک گردید تا رطوبت آن برای آسیاب کردن مناسب شود. فرمولاسیون حاصل در مخلوط کن پودر شد و درون ظروف مک کارتنی[4] در دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) و دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شدند.

ماندگاری فرمولاسیون پودر تالک در طی مرحله انبارداری

ماندگاری باکتری آنتاگونیست در حامل پودر تالک که درشرایط دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) و دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) نگهداری شدند، هر ۳۰ روز یکبار در دوره زمانی ۱۵۰ روزه طبق روش Sabartanam & Traquair (2002) محاسبه شد. جمعیت باکتری یکبار پس از تهیه فرمولاسیون باکتری و نیز یکبار به فاصله ۲ هفته از انجام فرمولاسیون محاسبه شد. یک گرم از هر فرمولاسیون باکتری به ۹ میلی متر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ۱۰ سری رقت تهیه شد. از رقت‌های ۷، ۸ و ۹ سوسپانسیون پودر تالک *B. subtilis* M36 روی محیط آگار مغذی به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر تشتک پتری با میله شیشه‌ای خم شده، پخش شد و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت تا کلونی‌ها ظاهر شدند. سه تکرار برای هر رقت به کار رفت و تعداد سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیون با شمارش کلونی‌های ظاهر شده در رقت‌های ۷، ۸ و ۹ و معدل‌گیری در میان آنها محاسبه شد.

بررسی اثر فرمولاسیون تهیه شده از *B. subtilis* M36 در کنترل *F. solani* f. sp. *phaseoli* در گلخانه

پس از ساخت فرمولاسیون‌های پودری از *B. s* M36، طبق روش Sabartanam & Traquair (2002) تعیین جمعیت سلول‌های باکتری در پودر فرمولاسیون‌ها انجام شد و مقداری از هر فرمولاسیون که حاوی 10^9 سلول باکتری بود محاسبه شد (که این میزان به ازای هر گرم بذر لوبیا بدین قرار است:

M1-CMC = 0.16g
NBY-AG = 0.62g
M1-AG = 0.1g
NBY-XG = 0.62g
KB-XG = 0.25g
NBY-CMC = 0.62g
KB-AG = 0.2g
KB-CMC = 0.31g
M1-XG =0.12g

و هر یک از مقادیر حاصل درون پتری ریخته شد و بذور (که ضد عفونی و در آب مقطر سترون شستشو شده بودند) به تعداد مورد نیاز در پتری حاوی پودر فرموله قرار گرفتند و به مدت سه ساعت زیر هود استریل ماندند و در این مدت بذور غلطانده شدند تا خوب به پودر فرمولاسیون آغشته گشتند (Nandakumar *et al*., 2001). تیمارها شامل شاهد سالم، شاهد آلوده، باکتری آنتاگونیست به تنهایی (سوسپانسیون 10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر)، باکتری آنتاگونیست همراه با مایه تلقیح بیمارگر (سوسپانسیون 10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر و مایه تلقیح بیمارگر با نسبت ذکر شده)، مواد فرمولاسیون به تنهایی (بدون باکتری) و نه فرمولاسیون (که از ترکیب سه محیط کشت KB، M1 و NBY و سه چسباننده کربوکسی متیل سلولز، صمغ زانتان و صمغ عربی ساخته شدند) و همچنین دو تیمار کود سمی بیولوژیک تجاری تریکومیکس اچ وی[5] (۱ در ۱۰۰) و قارچکش رورال تی اس[6] (۲ در ۱۰۰۰) به همراه بیمارگر بودند. سپس گلدانها در شرایط مناسب رشد گلخانه قرار گرفتند و یک روز در میان به مدت یک هفته آبیاری شدند پس از آن به محض خشک شدن سطح خاک، آبیاری صورت گرفت و بعد از گذشت شش هفته، شدت پوسیدگی ریشه بر اساس مقیاس Spigel & Hall (1982) محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به اجرا در

1. Carboxy methyl cellulose
2. Xantan Gum
3. Arabic Gum
4. McCarteny
5. Trichomix-HV
6. Rovral-TS

آمدند. به منظور تجزیه و تحلیل آماری اعداد برای فاکتورهای مورد ارزیابی و تجزیه واریانس از نرم‌افزار (SAS 6.2, 1997) استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ یا ۵٪ انجام گرفت. برای رسم جداول و نمودارها از نرم‌افزار اکسل (Excel, 2003) استفاده شد.

نتایج

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

در این بررسی هشت جدایه آنتاگونیست که در آزمون کشت سه نقطه‌ای بیشترین تأثیر را در مقابل بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* از خود نشان دادند جهت مراحل بعد انتخاب شدند (جدول ۱)، که در بین آنها جدایه M36 با هاله بازدارندگی ۱۳ میلیمتر مؤثرترین بود (شکل ۱).

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

بر اساس روش Schaad *et al.* (2001) جدایه‌های آنتاگونیست مؤثر، *Bacillus subtilis* تشخیص داده شدند (جداول ۲ و ۳). لازم به ذکر است که از این هشت باکتری آنتاگونیست چهار جدایه M36, M38, M25 و M21 از باکتری‌های جداسازی شده از ریزوسفر لوبیا در استان مرکزی بودند که نیاز به شناسایی داشتند و چهار جدایه دیگر جز *B. subtilis* های آنتاگونیست دریافتی از بخش بیوکنترل بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران بودند.

تأثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست در کنترل پوسیدگی ریشه لوبیا در گلخانه

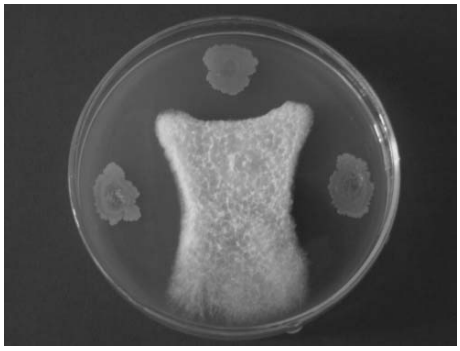
در آزمایش گلخانه‌ای مقدماتی که تعداد ۸ باکتری *B. subtilis* در روش تیمار بذر علیه بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* به کار رفت، جدایه *B. s* M36 با ۵۵/۱۷٪ کنترل بیشترین تأثیر را در کاهش شدت پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ عامل بیماری نشان داد و در نهایت جهت انجام فرمولاسیون و بکارگیری آن در شرایط گلخانه علیه بیمارگر انتخاب شد (جدول ۴).

تأثیر فرمولاسیون‌های پودر تالک جدایه *B. s* M36 در کنترل پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا در گلخانه

در بررسی اثر فرمولاسیون‌های ساخته شده علیه بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا در شرایط گلخانه پس از ۶ هفته، نتایج نشان داد که اختلاف

جدول ۱- اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست برتر در جلوگیری از رشد بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli*

باکتری	هاله بازدارندگی از رشد (میلی متر)
M36	۱۳
M38	۱۲/۵
M25	۱۲
B2	۱۱
K2	۱۰
J2	۹
M21	۶/۵
N2	۶/۴



شکل ۱- تأثیر جدایه باکتریایی M36 در جلوگیری از رشد میسیلیومی بیمارگر *F. solani* f. sp. *phaseoli* در آزمون کشت سه نقطه‌ای

جدول ۲- خصوصیات افتراقی باکتری‌های آنتاگونیست گرم مثبت

خصوصیت	واکنش جدایه‌ها			
	M36	M38	M21	M25
کلنی زرد یا نارنجی در محیط YDC و NAG	–	–	–	–
تولید رنگ فلورسنت روی محیط KB	–	–	–	–
رشد بی هوازی/ هوازی	بی هوازی / هوازی	بی هوازی / هوازی	بی هوازی / هوازی	بی هوازی / هوازی
تشکیل اسپور	+	+	+	+

علامت + نشان دهنده مثبت بودن واکنش و علامت – نشان دهنده منفی بودن واکنش است.

جدول ۳- خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باسیلوس

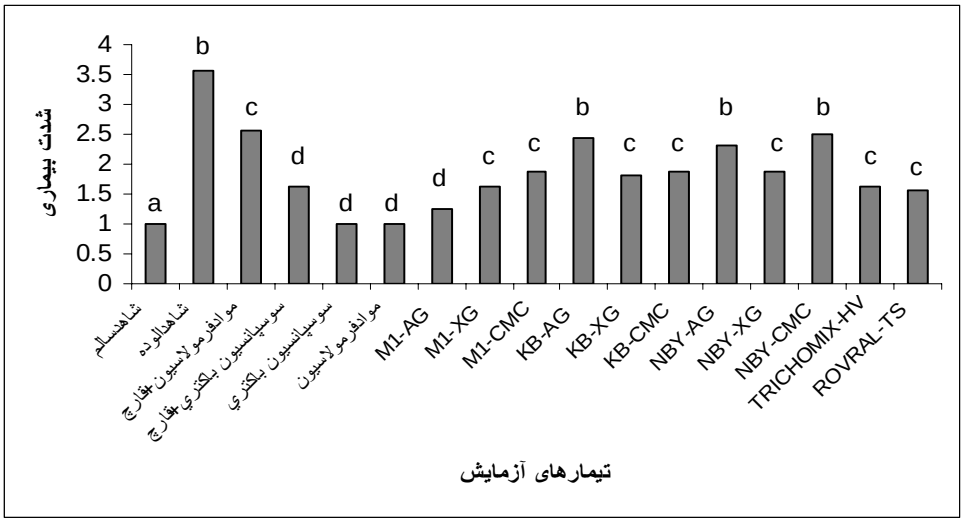
واکنش (Reaction)				Characteristic	خصوصیات
M36	M38	M21	M25		
<۱	<۱	<۱	<۱	Cell diameter>1µm	قطر سلول> ۱ میکرون
+	+	+	+	Motility	تحرک
مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی	Spore position	موقعیت اسپور
				Acid from:	تولید اسیداز:
+	+	+	+	D-Glucose	دی گلوکز
+	+	+	+	L-Arabinose	ال ارابینوز
+	+	+	+	D-Xylose	دی زایلوز
+	+	+	+	D-Manitol	دی مانیتول
+	+	+	+	Gelatin hydrolase	هیدرولیز ژلاتین
+	+	+	+	Starch hydrolase	هیدرولیز نشاسته
+	+	+	+	Casein hydrolase	هیدرولیز کازئین
-	-	-	-	Indole formation	تولید اندول
+	+	+	+	Catalase	کاتالاز
+	+	+	+	Nitrat reduction	احیای نیترات
-	-	-	-	Growth at 5°C	رشد در ۵ درجه سلسیوس
+	+	+	+	Growth at 45°C	رشد در ۴۵ درجه سلسیوس
				Growth at pH	رشد در PH:
+	+	+	+	5.7	۵/۷
+	+	+	+	6.8	۶/۸
				Growth at NaCl	رشد در نمک طعام:
+	+	+	+	2%	٪۲
+	+	+	+	5%	٪۵
+	+	+	+	7%	٪۷
+	+	+	+	Utilization of citrate	استفاده از سیترات
-	-	-	-	Anaerobic growth in glucose broth	رشد غیر هوازی در محیط مایع گلوکز

جدول۴- مقایسه میانگین‌های تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست در کاهش شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا در گلخانه پس از ۶ هفته

تیمار	میانگین شدت بیماری
شاهد آلوده	۳/۶۲۵۰
شاهد سالم	۱/۰۰۰۰
B. s M36	۱/۶۲۵۰
B. s M25	۱/۸۷۵۰
B2	۲/۰۰۰۰
B. s M38	۲/۰۶۲۵
J2	۲/۲۵۰۰
N2	۲/۱۲۵۰
B. s M21	۲/۴۳۷۵
K2	۲/۱۸۷۵

تیمارهای مورد ارزیابی در کاهش شدت بیماری در سطح ۱٪ معنی دار است و ضریب تغییرات (CV) در این آزمایش ۱۰/۶۴۵۷۳ می‌باشد و اما از لحاظ مقایسه میانگین‌ها (که در شکل ۲ آمده است)، تمام فرمولاسیون‌ها در مقایسه با شاهد آلوده در کاهش شدت بیماری مؤثر بوده اند. فرمولاسیون انجام شده در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ عربی (M1-AG) با ۶۸/۴۲٪ کاهش درشدت بیماری، بیشترین تأثیر را نشان داد و از دو قارچکش رورال تی اس با ۵۶/۱۴٪ کنترل و تریکومیکس اچ وی (یک نماینده از عوامل بیوکنترل تجاری است) با ۵۴/۳۸٪ کنترل مؤثرتر بود و نسبت به دو تیمار مذکور داری اختلاف معنی دار بود. فرمولاسیون M1-AG با شاهد سالم در یک گروه و نسبت به شاهد آلوده در گروه آماری مجزایی قرار گرفت (لازم به ذکر است، چون شدت پوسیدگی ریشه در این آزمایش بر

اساس مقیاس اسپیگل و هال (۱۹۸۲)، بین ۱ تا ۵ ارزش گذاری شد، پس به شاهد سالم طبق این روش عدد ۱ تعلق میگرد نه صفر، که عدد ۱ نشانه بیمار بودن نیست).



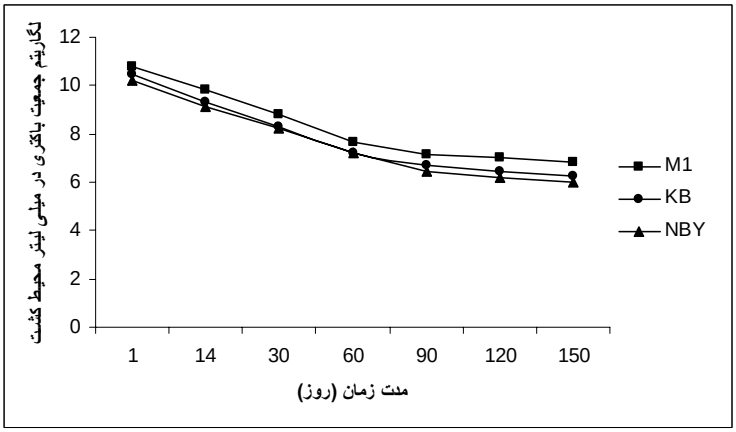
شکل ۲- مقایسه میانگین‌های تأثیر تیمارها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا در گلخانه پس از ۶ هفته
میانگین‌هایی که با حروف مشابه در هر ستون نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

بررسی تأثیر نوع محیط کشت در بقاء باکتری در فرمولاسیون

جدایه *B. s* M36 درمحیط‌کشت M1 با $۶/۳۳\times۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر محیط کشت، بیشترین میزان جمعیت باکتریایی را نشان داد. محیط‌های کشت KB و NBY به ترتیب با $۳/۱۸\times۱۰^{۱۰}$ و $۱/۱۶\times۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر محیط کشت، در مرتبه بعدی بودند. محیط کشت M1 طی دوره ۱۵۰ روزه بیشترین میزان جمعیت باکتریایی را نشان داد و محیط کشت NBY کمترین میزان جمعیت را نشان داد. میانگین تأثیر هر یک از محیط‌های کشت بر جمعیت باکتری در فرمولاسیون‌ها حاصل میانگین دماهای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد (شکل ۳).

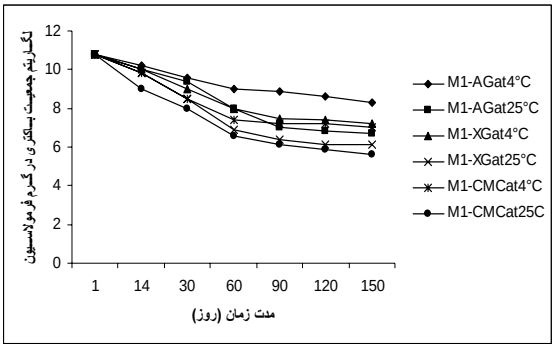
بررسی ماندگاری باکتری فرموله شده در حامل پودر تالک

بررسی ماندگاری باکتری *B. s* M36 فرموله شده در حامل پودر تالک درشرایط دمایی ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس، نشان داد که جمعیت اولیه این باکتری در فرمولاسیون‌های مختلف از سه محیط کشت M1، KB و NBY و سه چسباننده صمغ عربی، صمغ زانتان و

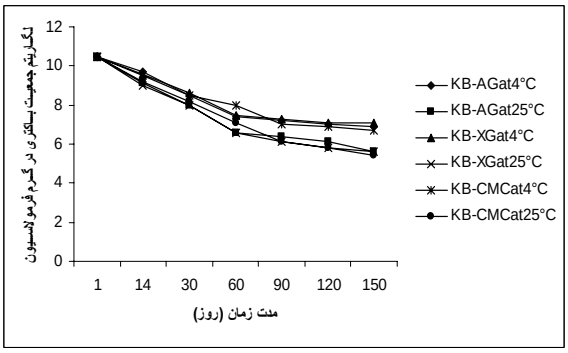


شکل ۳- تأثیر نوع محیط کشت بر جمعیت باکتری درفرمولاسیون طی مدت نگهداری

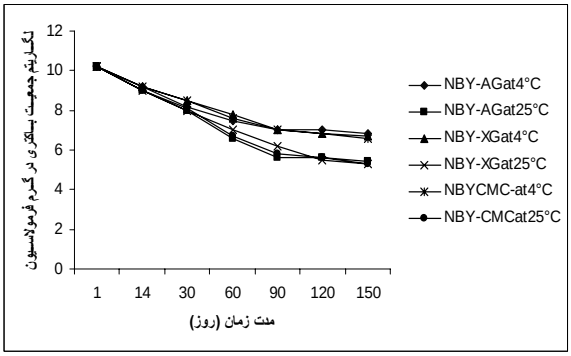
کربوکسی متیل سلولز طی مدت نگهداری حفظ نشده بود و جمعیت باکتری کاهش یافته بود (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).



شکل ۴- ماندگاری جمعیت باکتری *B. s* M36 درفرمولاسیون پودر تالک در محیط کشت M1 طی مدت نگهداری



شکل۵- ماندگاری جمعیت باکتری *B. s* M36 در فرمولاسیون پودر تالک در محیط کشت KB طی مدت نگهداری



شکل۶- ماندگاری جمعیت باکتری *B. s* M36 در فرمولاسیون پودر تالک درمحیط کشت NBY طی مدت نگهداری

البته کمترین میزان کاهش مربوط به فرمولاسیون انجام شده در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ عربی و در دمای ۴ درجه سلسیوس بود و در یک دوره ۱۵۰ روزه نگهداری جمعیت آن از $۶/۳۳\times۱۰^{۱۰}$ به ۲×۱۰^{۸} سلول باکتری در گرم فرمولاسیون کاهش پیدا کرد و جمعیت قابل قبولی از باکتری را در این شرایط در خود حفظ کرد و فرمولاسیون انجام شده در محیط کشت NBY با چسباننده کربوکسی متیل سلولز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بیشترین میزان کاهش در جمعیت باکتری را نشان داد بطوریکه در دوره نگهداری ۱۵۰ روزه جمعیت آن از $۱/۶\times۱۰^{۱۰}$ به $۵/۰۳\times۱۰^{۵}$ سلول باکتری در گرم فرمولاسیون کاهش پیدا کرد.

بحث

اگرچه کنترل بیولوژیک توسط ریزوباکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR) دستاوردی قابل قبول است اما مقدار ثبت عوامل کنترل زیستی برای استفاده تجاری بسیار کم است. تکنولوژی هنگامی پویا می‌شود که یافته های آزمایشگاهی به مزرعه منتقل شوند اما استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست ممکن است تحت شرایط مزرعه در کنترل بیماری‌ها تأثیری متوسط داشته یا بدون اثر باشد. برای رفع این مشکل سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست باید در حامل‌های معینی تثبیت شده و به صورت فرمولاسیون‌هایی برای کاربرد آسان، سهولت حمل و نقل، نگهداری طولانی مدت، حفظ قدرت حیات و افزایش کارایی در مزرعه و تجاری‌سازی مورد استفاده قرار گیرند (Nakkeeran *et al*., 2005). تهیه یک فرمولاسیون میکروبی مؤثر و ارائه آن به صورت یک محصول تجاری با جداسازی دقیق میکروارگانیسم آنتاگونیست شروع شده، با بکارگیری روشهای تولید انبوه که کمیت و کیفیت میکروارگانیسم را بهبود می‌بخشند ادامه پیدا می‌کند و با ساخت فرمولاسیونی مناسب، با ماندگاری طولانی مدت و کاربرد آسان که تأثیر عوامل بیوکنترل را افزایش می‌دهد پایان می‌پذیرد (Schisler *et al*., 2004).

تحقیقات نشان داده است که فرمولاسیون پودری (Lumsden *et al*., 1995; Sabaratnam & Traquair, 2002; Schisler *et al*., 2004) وبه خصوص پودر تالک (Sharifi-Tehrani *et al*., 2007; Bernhar & Burges, 1998; Bora *et al*., 2004; Sharifi-Tehrani *et al*., 2007) بهترین اثر را در بقا و پایداری باکتری

آنتاگونیست داشته است. فرمولاسیون بر پایه پودر تالک می‌تواند به شکل پودر وتابل باشد که حمل و نقل و نگهداری آن آسان بوده و کاربرد آن در مزرعه با توجه به تجهیزات موجود امکان‌پذیر است (Klopper & Schroth, 1981). از خواص خوب پودر تالک این است که از نظر شیمیایی بی‌اثر بوده و توازن رطوبتی بسیار کمی دارد. ضمن افزایش شدت اثر باکتری‌های آنتاگونیست، دوره انبارداری محصول فرموله شده را افزایش داده و همچنین این پودر در دسترس و مقرون به صرفه می‌باشد (Klopper & Schroth, 1981). در این بررسی پس از دستیابی به جدایه آنتاگونیست مؤثر *B. s* M36، نه فرمولاسیون بر پایه پودر تالک، از سه چسباننده صمغ عربی، صمغ زانتان و کربوکسی متیل سلولز در سه محیط کشت M1، KB و NBY مذکورساخته شد و تأثیرآنها بر کاهش شدت بیماریزایی قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* در گیاهچه لوبیا نشان داد که تمامی فرمولاسیون‌ها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا مؤثر بوده‌اند. فرمولاسیون‌های آزمایشی باکتری‌های آنتاگونیستی که بر اساس پودر تالک بوده و در کاهش بیماری‌های گیاهی مؤثر بوده اند در مقالات متعددی گزارش شده است که با نتایج این بررسی مطابقت دارد: Chiou & Wu (2003) کاربرد فرمولاسیون *B. amyloliquefaciens* B190 در کنترل کپک خاکستری ناشی از قارچ *Botrytis elliptica* را در شرایط گلخانه مؤثر دانستند. Sharifi-Tehrani (2006) در آزمایشی نشان دادند که فرمولاسیون‌ها با پایه پودرتالک دو استرین B1 و B2 باکتری *Bacillus subtilis* به طور جداگانه در تیمار بذر و تیمار خاک در شرایط گلخانه و مزرعه علیه بیماگر *Rhizoctonia solani* روی کلزا بسیار مؤثر بودند. Sallam *et al.* (2009) نشان دادند که بکارگیری فرمولاسیون پودری عوامل آنتاگونیست *B. subtilis*، *Trichoderma* spp. و *Conithyrium minitans* علیه پوسیدگی سفید ریشه پیاز ناشی از *Sclerotium cepivorum* در شرایط گلخانه مؤثر است و استفاده از فرمولاسیون پودری باکتریایی *B. subtilis* در دو هفته قبل از نشاکاری بیشترین تأثیر را در کاهش وقوع بیماری داشت. Lee *et al.* (2006) از فرمولاسیون پودری جدایه *Bacillus licheniformis* N1 در شرایط آزمایشگاه و گلخانه علیه بیماری کپک خاکستری گوجه فرنگی ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* استفاده کردند. نتایج نشان داد که فرمولاسیون مذکور در کاهش بیماری از مخلوط قارچ‌کش کاربندازیم و دی اتیوفنکارپ به نسبت ۱:۱ مؤثرتر است و همچنین در حضور این فرمولاسیون رشد گیاه، سایز محصول و وزن آن افزایش داشت. نتایج بدست آمده از تحقیق ما نشان داد فرمولاسیون پودر تالک انجام شده در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ عربی در روش آغشته‌سازی بذر در شرایط گلخانه پس از شش هفته با ۶۸/۴۲٪ کاهش در شدت بیماری پژمردگی پوسیدگی لوبیا به عنوان مؤثرترین فرمولاسیون شناخته شد و جالب اینکه از سوسپانسیون باکتری و دو قارچکش رورال تی اس و تریکومیکس اچ وی به ترتیب با ۵۴/۳۸٪، ۵۶/۱۴٪ و ۵۴/۳۸٪ کنترل مؤثرتر عمل کرد و دارای اختلاف معنی‌دار با سه تیمار مذکور بود که این مورد می‌تواند از نقاط امیدوارکننده این پژوهش برای پژوهش‌های آینده باشد و تکثیر اولیه باکتری آنتاگونیست *B. s* M36، همچنین درصد بقا و پایداری آن در محیط کشت M1 بیشتر بود پس نوع محیط کشت در افزایش جمعیت مؤثر نشان داد. لازم به ذکر است استفاده از محیط کشت M1[1] در جهت فرمولاسیون برای اولین بار بود که در دنیا بررسی گردید و نتایج نشان داد این محیط کشت نسبت به محیط هایی از جمله NBY و KB که بیشتر در پژوهش ها استفاده گردیده بودند دارای تأثیر بالاتری است. این نتیجه یکی از دستاوردهای عملی این تحقیق به شمار می رود. همانطور که گفته شد فرمولاسیون جدایه *B. s* M36 با چسباننده صمغ عربی تأثیر بهتری نشان داد. در حالی که در پژوهش‌های انجام شده توسط Krishnamurthy & Gnanmanickam (1998)، چسباننده کربوکسی متیل سلولز به عنوان مؤثرترین چسباننده در فرمولاسیون باکتری آنتاگونیست معرفی شد. بعد از فرمولاسیون M1-AG، فرمولاسیون*B. s* M36 تکثیر یافته در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ زانتان (M1-XG) و سپس فرمولاسیون باکتری مذکور

۱. یک لیتر محیط کشت مایع M1 حاوی $0.98g\ K_2HPO_4 - 0.4g\ MgSO_4$ – 0.4g CaCO3 - 3g Yeast extract – 10g Socrose) می‌باشد.

تکثیر یافته در محیط کشت KB با چسباننده صمغ زانتان (KB-XG)، در قیاس با سایر چسبانندهها جمعیت بیشتری از باکتری را در طی یک دوره ۱۵۰ روزه نگهداری کردند (مقادیر جمعیت در نمودارهای بخش نتایج آورده شده است) و در کاهش شدت بیماری نیز مؤثر تر بودند. بنابراین یک چسباننده در یک محیط می‌تواند بالاترین کارایی را داشته باشد حال آنکه در محیط‌های کشت دیگر اثری کاملاً متفاوت داشته باشند. به عبارت دیگر یک محیط کشت یا چسباننده لزوما بهترین و یا بدترین نمی‌توانند باشند. پس بایستی اثرات متقابل فاکتورهای دخیل در فرمولاسیون‌ها از جمله محیط کشت، چسباننده و دما در نظر گرفته شود. زیرا بطور کلی صرفاً در ارتباط با یک جزء از اجزاء موجود در یک فرمولاسیون نمی‌توان قضاوت صحیح و کلی داشت و تداخل عمل آن جزء با سایر اجزاء موجود در یک فرمولاسیون بررسی‌های بیشتری را می‌طلبد که تاکنون در این مورد بررسی مدونی توسط پژوهشگران کنترل بیولوژیک انجام نشده است. نتایج این تحقیق در مورد ماندگاری فرمولاسیون در طی دوره انبارداری ۱۵۰ روزه نشان داد که جمعیت زیاد اولیه جدایه آنتاگونیست *B. s* M36 در فرمولاسیون‌های پودر تالک طی نگهداری به مدت ۱۵۰ روز در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس، کاهش می‌یابد و در دمای ۴ درجه سلسیوس میزان کمتری از این کاهش دیده می‌شود که این نتایج با یافته‌های Bora *et al.* (2004) و Sabaratnam & Traquair (2002) مطابقت دارد. آگاهی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محیطی که فرمولاسیون میکروبی در آن استفاده می‌شود، گامی ضروری در جهت انتقال فرمولاسیون، پوشش هدف، افزایش چسبندگی و کاهش بیماری است زیرا این اطلاعات عامل تعیین‌کننده در انتخاب نوع فرمولاسیون و مواد تقویتی اضافه شده به فرمولاسیون می‌باشد (Schisler *et al.*, 2004). از جمله مواد دیگری که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند، سولفات منیزیم، گلیسرول و سدیم آلجینات بودند. نقش سولفات منیزیم در پایداری و نگهداری باکتری‌ها در مقالاتی به اثبات رسیده است (Bora *et al.*, 2004). گلیسرول در حفاظت و نگهداری از سلول‌های باکتری و همچنین چسبندگی نقش دارد و سدیم آلجینات یک پلی ساکارید است که محیط مناسبی برای نگهداری سلول‌های زنده می‌باشد و با افزایش ویسکوزیته باعث پایداری فرمولاسیون شده و همچنین در چسبندگی و ماندگاری فرمولاسیون نقش دارد. مزیت مهم این پلیمر سازگاری با محیط زیست و تجزیه‌پذیری در محیط زیست می باشد بدون اینکه مواد سمی و مضر برای میکروارگانیسم‌های خاک تولید کند (Bashan *et al.*, 2000). فرمولاسیون‌ها به روش‌های مختلفی انتقال می‌یابند. هدف از تحقیق انجام شده بکارگیری عملی روش‌های بیوکنترلی مؤثر در کشاورزی می‌باشد. بنابراین به منظور نزدیکی به استانداردهای تجاری سازی و با در نظر گرفتن معیارهای کشاورزی عملی در مزرعه، در این بررسی از روش آغشته‌سازی بذر (تیمار بذر) به فرمولاسیون باکتری آنتاگونیست استفاده شد. هم چنین نوع و مقدار مواد بکار رفته در فرمولاسیون باعث حفظ قدرت حیات و کارایی جدایه آنتاگونیست طی مدت انبارداری شده و همچنین ضمن سهولت انتقال، موجب حفظ شدت اثر آنها در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا در شرایط گلخانه شدند.

در پایان پیشنهاد می‌شود که این محیط‌های مؤثر در محیط فرمانتور نیز بررسی شوند همچنین آزمایش مزرعه‌ای لازم است تا مشخص شود که آیا این جدایه می‌تواند در مزارع این بیماری مهم را کنترل کند. مطالعه بقا باکتری درخاک، ریزوسفر و فهمیدن نیازهای غذایی آن برای بهبود خاصیت کنترلی آنها نیز می‌تواند مفید باشد.

REFERENCES

1. Bashan, Y., Hernandez, J. P., Leyva, L. A. & Bacilio, M. (2000). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth - promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soil*, 33, 359-368.
2. Bernhard, K. & Burges, H. D. (1998). A catalogues of formulation additives. *Formulation of Microbial Biopestisides*, 333-365.
3. Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E. & Aslan, E. (2004). Bological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulation of two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology*, 152, 471-475.

4. Boyetchko, S. M., Pedersen, E., Punja, Z. & Reddy, M. (1999). Formulation of biopestisides methods. In: F.R. Hall and J.T. Menn (Ed.) Method in Biotechnology. *Biopesticides: Use and Delivery*. (Vol.5). (pp.487-508). Humana Press Totowa.
5. Chiou, A. I. & Wu, W. S. (2003). Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of Lily Gery Mould (*Botrytis elliptica*). *Phytopathology*, 151, 13-18
6. Cho, J. H., Rupe, J. C., Cummings, M. S. & Gbur, E. E. (2001). Isolation and identification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from soil on modified Nash and Snyder's medium. *Plant Disease*, 85, 256-260.
7. Cook, R. J. & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogen*. A. P. S. Press. St. Plan. M. N. USA. 539 pp.
8. Etebarian, H. (2002). *Vegetable diseases and their control*. (Ed.), University of Tehran Publishers.
9. Hagedorn, C., Gould, W. D. & Bradinelli, R. T. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2793-2797.
10. Keel, C. & Defago, G. (1997). Interaction between benefical soil bacteria and root pathogens. Mechanisms and ecological impact. In: *Multitrophic Interaction in Terrestrial System*. A. C, Gonge, & V. K., Brown, (eds). Blackwell Scientific Publishers, London. pp. 27-46.
11. Kim, D. S., Cook, R. J. & Weller, D. M. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87, 551-558.
12. King, K. W. (1954). Comparisons of two media proposed for the isolation of rumen bacteria. *Journal of Bacteriology*, 70, 726-729.
13. Klopper, J. W. & Schroth, M. N. (1981). Development of powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pices. *Phytopathology*, 71, 590-592.
14. Koda, M. (1970). Biological control of *Eutypa lata* in grapevine by antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 81, 283-287.
15. Krishnamurthy, K. & Gnanmanickam, S. S. (1998). Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain PF7-140: Evaluation of a marker gene and formulation. *Biological Control*, 13, 158-165.
16. Lee, J. P., Woolee, S., Kim, C. S., Son, H., Song, J. H., Lee, K. Y., Kim, H. Y., Jung, S. J. & Moon, B. J. (2006). Evaluation of formulations of *Bacillus subtilis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37, 329-337.
17. Lilliot, S. B., Muthamilan M. & Candela, M. E. (1984). Influence of formulation additive and transposon mutagenesis on the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* and *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, 149, 437-445.
18. Lumsden, R. D., Lewis, J. A. & Fravel, D. R. (1995). Formulation and delivery of biocontrol agents for using against soilborne plant pathogens. In: *Bioratiotinal pest control agents*. Hall, F. R. & J. W. Barry, (Eds). Am. Chem. Soc. Washington, DC., pp. 166-182.
19. Mathiuazhagan, S., Kavitha, K., Nakkeeran, S., Chandrasekar, G., Manian, K., Renukadevi, P., Krishnamoorthy, A. S. & Fernando, W. G. D. (2004). PGPR mediated management of stem blight of *Phyllathus amarus* (Schum & Thonn) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) wei. Arch. Phytopathology. *Plant Protectection*, 33, 183-199.
20. Nakkeeran, S., Dilantha Fernando, W. G. & Siddiqui, Z. A. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria formulation and its scope in commericilization for the management of pests and disease. Z. A. Siddiqui (ed), PGPR: *Biocontrol and Biofertilization*, Springer, Dordercht, The Netherlands, pp. 257-296.
21. Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheela, J., Raguchander, T. & Samiyappan, R. (2001). A new bio-formulation containing plant growth promting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *Biocontrol*, 46, 493-510.
22. Noori, F. (2008). Bilogical control of bean fusarium Root-Rot by using different *Bacillus species*. M.Sc. dissertation. Aboureyhan Campus of Tehran University, Iran.
23. Sabaratnam, S. & Traquair, A. J. (2002). Formulation of *Sterptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctiona* daming - off in tomato transplants. *Biological Control*, 23, 245-253.
24. Sallam, N., Abd Elrazik, A. A., Hassan, M. & Koch, E. (2009). Powder formulations *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp. and *Conithyrium minitans* for biocontrol of Onion White Rot. *Phytopathology and Plant Protection*, 42 (2), 142-147.
25. Saravanan, T., Bhaskaran, R. & Muthusamy, M. (2004). *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt disease. *Journal of Plant Pathology*, 3(2), 72-80.
26. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chum, W. C. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. (3rd ed.). APS Press. 374pp.
27. Schisler, D. A., Slininger, D. J., Behle, R. W. & Jakson, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for

biological control of plant disease. *Phytopathology*, 94, 1267-1271.

28. Shahrokhi, A. (2008). *Study on the possible use of bacillus bacteria producing fnjicin antibiotic for the control of Rhizoctonia solani the casual agent of sugarbeet root rot*. Ph. D. dissertation. University of Tehran, Iran.
29. Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Farzaneh, M. & Sarani, S. (2007). Powder, formulation, of two strains of *Bacillus subtilis* for control of rape seed damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *Communications in Agricultural Applied Biological Science*, 71(2), 131-140.
30. Shrifi-Tehrani, A., Ahmad Zadeh, M., Farzaneh, V & Sarani, S-A. (2007). Evaluating the effect of powdery formulation of two isolates of *Pseudomonas fluorescens* in controlling the Rhizoctonia solani the casual agent of *Brassica* spp damping-off in field and greenhouse. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 37 (6), 1121-1130. (In Farsi).
31. Spigel, Y. & Hall, R. (1982). Effects of pathogen species, inoculum concentration, temperature and soil moisture on bean root rot and plant growth. *Canadian Journal. Plant pathology*, 4, 1-7.
32. Weller, D. M. & Cook, R. J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 73, 463-469.