مقاله تحقیقی

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل عامل پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طبق پیاز در منطقه خمین

مهسا مشیدی ★[۱،۲]، محمد جواد سلیمانی [۲]، غلامرضا خداکرمیان [۲]

۱- دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، همدان، ایران
۲- دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، همدان، ایران

★**مسؤول مکاتبات**: مهسا مشیدی، لاهیجان، خیابان شهید بهشتی، کوچه ۱۸، پلاک ۹۵، شماره تماس: ۰۹۱۸۱۶۲۲۵۶۱، ۰۱۴۱-۲۲۴۲۰۷۹، پست الکترونیکی: r_mahsa2004@yahoo.com

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه دانشکده کشاورزی بوعلی سینا همدان

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۸

چکیده

در این تحقیق، تأثیر آنتاگونیستی باکتری‌های جداسازی شده از مزارع پیاز استان مرکزی در منطقه خمین علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. cepae که عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز است، مورد بررسی قرار گرفت. پانزده جدایه منتخب قادر به ایجاد هاله بازدارندگی در محیط کشت روی قارچ فوق بودند. باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از ناحیه ریزوسفر پیاز، به چهار گونه مختلف *Bacillus laterosporus*، *Pseudomonas fluorescent* ، *P. putida* bv. *B* و *P. aeroginosa* تعلق داشتند. در آزمون مربوط به ترکیبات فرار، قدرت بازدارندگی جدایه‌های MM-19، MM- j_1 و MM-260 از رشد رویشی قارچ *F. oxysporum* به ترتیب به میزان ۶۶/۶۷، ۴۵/۳۸ و ۳۹/۸۲ درصد بود. ترشحات خارج‌سلولی جدایه‌های آنتاگونیست انتخابی در غلظت‌های مختلف، سبب بازداری رشد رویشی قارچ مذکور شد و اغلب با افزایش غلظت‌ها، بازداری رشد قارچ نیز افزایش یافت. همه جدایه‌های آنتاگونیست قادر به تولید آنتی‌بیوتیک بودند و به خوبی از رشد قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کردند. دو استرین MM-19 و MM-B در کلیه تست‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بیشترین تاثیر را در کاهش بیماری داشتند.

واژه‌های کلیدی: پیاز، آنتی‌بیوتیک، *F. oxysporum*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، بازدارندگی رشد

مقدمه

پیاز (*Allium cepae* L.) از جمله محصولات مهم در سطح جهان به شمار می‌آید. در مقایسه با سایر سبزیجات، پیاز نسبت به تعداد زیادی از قارچ‌هایی که به اندام‌های هوایی گیاه مثل برگ و یا اندام زیرزمینی مثل سوخ و ریشه حمله می‌نمایند، حساس است که این امر منجر به کاهش کیفیت و کمیت محصول می‌شود. از مهم‌ترین بیماری‌هایی که باعث کاهش کیفیت و کمیت محصول می‌شوند، بیماری‌های ریشه هستند. بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پیاز است که خسارت قابل‌توجهی به این محصول وارد می‌سازد، از آن جایی که گونه‌های فوزاریوم در ایجاد بیماری نقش دارند،

شناسایی این گونه‌ها روی پیاز، حایز اهمیت است. تاکنون، چندین گونه عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز از نقاط مختلف جهان گزارش شده است. اولین بار عامل این بیماری در سال ۱۹۱۰ تحت نام *Fusarium cepae* از روی پیاز توسط سلبی (۲۳) از آمریکا گزارش شد. بعد از آن در سال ۱۹۱۴ (۱۷) و سپس در سال ۱۹۱۶ (۱۰) عامل بیماری را *F. cepae* گزارش کردند. هانزاوا گزارش کرده است که عامل بیماری تحت نام *F. zonatum form* 1 قرار می‌گیرد (۱۷). واکر و تایمز در سال ۱۹۲۴ و بعد از آن در سال ۱۹۲۶ علائم پوسیدگی طبق توسط *F. oxysporum* روی پیازهای انباری را در آمریکا گزارش کردند (۳۰). سه گونه *F. solani*، *F. oxysporum* و *F. acuminatum* در آمریکا به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز جداسازی و گزارش شده‌اند. گونه *F. oxysporum* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز در آمریکا جداسازی و گزارش شده است (۲۸). در فلوریدای آمریکا *F. solani* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز گزارش شده است (۵). پوسیدگی ریشه و طبق پیاز توسط گونه *F. oxysporum* f. sp. *cepae* به همراه بیماری ریشه سرخی (Pink root) از ایالت Idaho در آمریکا جداسازی و گزارش شد.

در ایران، گونه *F. solani* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز همراه با قارچ‌های *Sclerotium* و *Botrytis* جداسازی شد (۶). سه گونه *F. solani*، *F. oxysporum* و *F. acuminatum* نیز در آذربایجان‌شرقی به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز، جداسازی و گزارش شد (۱) که گونه‌های *F. solani* و *F. oxysporum* تقریباً در تمام نقاط پیازکاری استان آذربایجان شرقی انتشار دارد، *F. oxysporum* بیشترین تعداد جدایه را داشت و هر سه گونه جدا شده روی پیاز بیماری‌زا بودند.

در ایران بعد از بیماری پوسیدگی خاکستری پیاز با عامل *Botrytis allii* Mumm. با ۱۰۰ درصد خسارت در انبار، بیماری ریشه سرخی و سپس پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طبق، مهم‌ترین بیماری‌ها به شمار می‌آیند. این دو بیماری با پوساندن ریشه‌های پیاز و در نهایت، با پوسیدگی کامل پیاز باعث خسارت به محصول می‌شوند که خسارت بسیار زیادی را به کشاورز با پائین‌آوردن بازارپسندی غده‌های پیاز وارد می‌سازند. با وجود تأثیر مثبت برخی روش‌های زراعی چون تناوب زراعی، شخم‌زدن، تناوب طولانی مدت و آفتاب‌دهی خاک جهت مبارزه با فرم زمستان‌گذران و استفاده از ارقام مقاوم در کاهش خسارت ناشی از این بیماری‌ها، در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است.

از جمله این میکروارگانسیم‌ها، برخی از باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر هستند که در مواردی به عنوان باکتری‌های افزاینده رشد (Plant growth promoting bacteria) نیز محسوب می‌شوند که با گیاهان زراعی و درختان رابطه متقابلی دارند و ضمن تأثیر مستقیم روی رشد آن‌ها باعث جلوگیری از حمله با کاهش خسارت بیمارگرها نیز می‌شوند (۳۲،۲۲،۱۸،۱۵،۱۱،۹،۸).

تاکنون باکتری‌های متعددی از جنس *Agrobacterium*, *Alcaligens*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyhizobium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafinia*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*، *Streptomyces* و *Xanthomonas* به عنوان ریزوباکترهای افزاینده رشد شناخته شده‌اند (۳۲). در این میان، جدایه‌های پسودوموناس، یکی از فعال‌ترین و غالب‌ترین باکتری‌ها با خاصیت آنتاگونیستی هستند و باسیلوس‌ها نیز به دلیل تولید اندوسپور و در نتیجه تحمل بیشتری نسبت به گرما و خشکی، از اهمیت به‌سزایی برخوردارند. نقش جدایه‌هایی از پسودوموناس از قبیل *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* و تعدادی از گونه‌های جنس باسیلوس مانند *Bacillus subtilis*، *B. cereus*، *B. megaterium*، *B. pumilus* و *B. polymyxa* در کنترل بیماری‌های قارچی و

باکتری‌های گیاهان زراعی به طور مستقیم یا غیرمستقیم به اثبات رسیده است (۷،۲۵،۲۶،۳۲). برای برخی جدایه‌های پسودوموناس، فعالیت آنتاگونیستی بر اساس تولید آنتی‌بیوتیک است، در حالی که برای دیگر پسودوموناس‌ها مانند *P. putida*، جدایه WCS358 فعالیت آنتاگونیستی بر اساس رقابت برای عنصر آهن است (۲۹). در این تحقیق، میزان تاثیر و نحوه عملکرد تعدادی از جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از منطقه ریزوسفر بوته‌های آلوده پیاز به عامل بیماری‌زای طوقه و ریشه پیاز جهت کنترل عامل بیماری، مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ عامل بیماری

جهت جداسازی قارچ عامل بیماری، از هر مزرعه تعداد ۱۰ گیاه به‌طور تصادفی، انتخاب و ریشه‌های آن‌ها به‌طور جداگانه شستشو داده شد و ذرات درشت شن و خاک از آن‌ها جدا گردید. برای جداسازی قارچ عامل بیماری‌زا بدین ترتیب عمل شد که ریشه‌ها بعد از شسته‌شدن در آب، در محلول الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت ۳ دقیقه در محلول کلراکس ۱۰ درصد تجاری ضدعفونی سطحی گردید و بعد از خشک شدن روی کاغذ خشک‌کن سترون، به قطعات کوچک ۳-۲ میلی‌متری تقسیم و در تشتک‌های حاوی PDA که برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها پس از اتوکلاو کردن محیط کشت، به ازای هر ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت، یک قطره اسید لاکتیک ۱۰ درصد اضافه شده بود، کشت گردید و به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. سه تا پنج روز بعد، کلنی‌های غالب، از سایر کلنی‌ها و یا آلودگی باکتریایی جدا شد و در تشتک‌های پتری جداگانه کشت داده شد. علاوه بر ریشه‌ها، طبق‌ها، فلس‌ها و برگ مرکزی پیاز نیز به روش قبلی، ضدعفونی سطحی شده و جداسازی قارچ عامل بیماری از آنها انجام گرفت.

مطالعه بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium*

این بررسی شامل تهیه زادمایه،کشت گیاهان سالم، مایه‌زنی، ظهور علائم یا عدم ظهور علائم بیماری و جداسازی مجدد قارچ عامل بیماری است. برای تهیه مایع تلقیح از روش اباوی و لوربیر با تغییراتی انجام شد (۴). برای این منظور در ارلن-های ۲۵۰ میلی‌لیتر، مقدار ۲۰۰ گرم ماسه همراه ۱۰ گرم آرد ذرت، مخلوط گردید و با مقداری آب، مرطوب گردید، سپس در اتوکلاو در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه سترون گردید، این عمل ۳ بار در ۳ روز متوالی انجام گرفت تا از استریل بودن خاک اطمینان حاصل شود. پس از خنک شدن محیط‌ها، یک قرص از حاشیه کلنی‌های ۷ روزه جدایه‌ها به آن‌ها اضافه شد و در حرارت ۲۵-۲۴ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. پس از رشد قارچ روی محیط، هر یک الی دو روز، یک‌بار ارلن‌ها با دست تکان داده شدند، تا هنگامی که تمام سطح خاک و ذرت با قارچ پوشیده شد. تهیه گیاه سالم، به دو صورت کاشت بذر و کاشت پیاز تولید شد. قبل از آلوده کردن گیاهچه‌ها، ابتدا ریشه‌ها زیر آب روان شسته شد و در هر گلدان حاوی ماسه و خاک زراعی سترون شده، مقدار ۶۵ گرم از محیط کشت حاوی قارچ مخلوط شد، سپس در هر گلدان، سه گیاهچه کشت گردید و پنج دیسک از محیط کشت به قطر ۵ میلی‌متر حاوی قارچ مورد نظر قرار داده شد و سطح آن با خاک پوشانده شد، سپس گلدان‌ها آبیاری شدند. برای هر جدایه، سه گلدان تیمار و یک شاهد در نظر گرفته شد. در تیمار شاهد غیرآلوده، از مخلوط ماسه و ذرت سترون استفاده شد. پس از مدت یک ماه، گیاهچه‌های پیاز از خاک، خارج و پس از عمل ضدعفونی سطحی ریشه‌هایی که علائم بیماری را نشان می‌دادند، اقدام به جداسازی مجدد قارچ عامل بیماری روی محیط کشت PDA گردید.

شناسایی

برای شناسایی قارچ‌های جدا شده از پیاز، ابتدا قارچها خالص گردید و پس از اثبات بیماری‌زایی

طبق اصول کخ، جهت بررسی بیشتر، روی Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Carrot Agar (PCA), Special Nutrient Agar (SNA), Carnation Leaf Agar (CLA) کشت داده شد. بر اساس کلید قارچ‌شناسی نلسون و همکاران (۲۰) و بررسی ساختارهای رویشی و زایشی، اقدام به شناسایی جدایه‌های قارچی گردید.

تهیه جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست

نمونه‌های خاک ناحیه ریزوسفر از منطقه پیازکاری شهرستان خمین در استان مرکزی، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. هر ۳ نمونه خاک که از اطراف یک بوته پیاز برداشت شده بود، با یکدیگر مخلوط و سپس ۲۰ گرم خاک با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، کاملا مخلوط شد و به روش سریال رقت تا پنج مرحله این مخلوط رقیق شد، به کمک سمپلر، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به محیط کشت مغذی (NA) منتقل شد و به کمک میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش شدند و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌هایی که از نظر شکل و رنگ در محیط آگار مغذی متفاوت بودند، انتخاب و درون لوله آزمایش حاوی آگار مغذی، خالص‌سازی گردید و کدگذاری شدند. همه باکتری‌های جداشده در شرایط یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

بررسی ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باکتریایی

از کشت جوان جدایه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای در چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA به فواصل مساوی از مرکز، مایه‌زنی شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. آن‌گاه یک حلقه از حاشیه پنج میلی‌متری از حاشیه کشت تازه قارچ بیمارگر بر مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شدند. در تشتک پتری شاهد، آب مقطر سترون در چهار طرف تشتک پتری، مایه‌زنی شد و در مرکز آن قارچ قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگهداری شدند. پس از این که حاشیه پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد به دیواره پتری برخورد نمود، فواصل بازدارندگی بین حاشیه پرگنه جدایه‌های باکتریایی و قارچ اندازه‌گیری گردید (۱۶).

ویژگی‌های ضد میکروبی عوامل بیوکنترل تولید مواد فرار ضدقارچی

بدین منظور، مطابق روش فیدامن و روزال (۱۹۹۳) جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست، در محیط آگار مغذی، کشت و همزمان، یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری در محیط PDA کشت داده شد. سپس تشتک حاوی قارچ عامل بیماری به صورت وارونه در روی تشتک حاوی باکتری قرار گرفت و محل اتصال لبه‌ها در تشتک با پارافیلم، کاملا مسدود شد و تشتک‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند (۱۳). در تشتک پتری شاهد، حلقه‌هایی به قطر پنج میلی-متر از محیط کشت PDA حاوی قارچ عامل بیماری در مقابل تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آگار مغذی فاقد جدایه‌های آنتاگونیست قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی، شامل ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

۱۰۰* (قطر رشد پرگنه شاهد/ (قطر رشد پرگنه تیمار – قطر رشد پرگنه شاهد))= درصد بازدارندگی از رشد.

تولید سیدروفور

این بررسی مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۳) انجام شد (۳۱). جدایه‌های باکتریائی روی محیط کشت کینگ ب (King B) حاوی غلظت‌های ۵۰، ۵ و ۱۰۰ میکرومول کلریدآهن III کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی-

گراد درون انکوباتور نگهداری شدند.

سپس سوسپانسیون اسپور قارچ *Geotrichum candidum* از یک کشت ۴۸ ساعته روی محیط PDA بر سطح تشتک پتری حاوی جدایه آنتاگونیست افشانه شد. عدم رشد قارچ در اطراف باکتری، نشان‌دهنده تولید سیدروفور است.

بررسی تولید آنتی‌بیوتیک

این آزمون مطابق روش کراس و لوپر (۱۹۹۰) انجام شد (۱۹). بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری و آب مقطر سترون به عنوان شاهد به محیط کشت PDA اضافه و در سطح محیط کشت، پخش شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از این مدت با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، جدایه‌ها از سطح محیط کشت، شسته و تشتک‌های پتری به‌طور وارونه به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس یک حلقه به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت تازه قارچ با رعایت شرایط بدون آلودگی، در مرکز هر تشتک پتری، کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، نگهداری و اندازه‌گیری قطر رشد ریسه پس از ۱۰ روز انجام گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی، شامل ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد و داده‌های به‌دست آمده از آزمایش (قطر رشد میسیلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS قرار گرفتند. درصد بازداری از رشد ریسه‌ای، مطابق بند فوق تعیین گردید.

ترشحات خارج سلولی

این آزمایش مطابق روش سینگ و دورال (۱۹۸۴) انجام شد (۲۷). در بخش نخست، مطابق کشت مایع با فرمول ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، در یک لیتر آب مقطر تهیه گردید. درون فلاسک‌های با گنجایش ۲۵۰ میلی‌لیتر، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط مایع فوق، ریخته و با استفاده از اتوکلاو، سترون شد. پس از خنک شدن محیط مایع، به هر یک از فلاسک‌ها یک لوپ کامل از کشت ۲۴ ساعته باکتری اضافه شد. فلاسک‌ها حاوی باکتری روی شیکر دورانی با ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار داده شد و پس از عبور محیط مایع جدایه‌ها از کاغذ صافی واتمن شماره یک و سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه، هریک از جدایه‌ها به طور جداگانه توسط صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی صاف گردید و عصاره حاصل از هر یک از جدایه‌های مذکور در آزمون بازدارندگی از رشد ریسه‌ای قارچ‌ها به‌کار برده شد. جهت بررسی تأثیر عصاره حاصله، ابتدا محیط کشت PDA به حجم‌های ۱۵، ۱۷ و ۱۹ میلی‌لیتر درون لوله ریخته شد و پس از سترون شدن در شرایط اتوکلاو، به ترتیب ۱ میلی‌لیتر (غلظت ۵ درصد حجم به حجم)، ۳ میلی‌لیتر (غلظت ۱۵ درصد حجم به حجم) و ۵ میلی‌لیتر (غلظت ۲۵ درصد حجم به حجم) از عصاره هر یک از آنتاگونیست‌ها به لوله‌های PDA با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و به خوبی مخلوط و در شرایط سترون به تشتک‌های پتری سترون، منتقل گردید. در تیمار شاهد، از محیط کشت مایع فوق بدون باکتری که از صافی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شده بود، استفاده گردید. پس از انعقاد محیط کشت، در مرکز هر تشتک پتری، یک حلقه به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت تازه قارچ، کشت داده شد. اندازه گیری قطر میسیلیوم، هر روز و به مدت ۱۰ روز پس از کشت قارچ انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل با ۲ عامل و کاملا تصادفی به اجرا درآمد. عامل اول جدایه آنتاگونیست در ۵ سطح و عامل دوم غلظت در ۳ سطح بود. برای هریک از غلظت‌ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. قطر رشد میسیلیوم در هر غلظت، مورد تجزیه و تحلیل آماری به‌وسیله مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS قرار گرفت.

آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های منتخب، بر اساس خصوصیات مهم مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، مورد شناسایی قرار گرفتند. این آزمایش‌ها شامل واکنش گرم به روش شاد (۲۴)، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش فهی و پرسلی (۱۲)، تولید رنگدانه فلورسانت روی محیط کشت KB شاد (۲۴)، تولید لوان فهی و پرسلی (۱۲)، آزمون لهیدگی سیب‌زمینی فهی و پرسلی (۱۲)، آرژنین دی‌هیدرولیز فهی و پرسلی (۱۲)، آزمون نیترات شاد (۲۴)، آزمون دهیدرولیز ژلاتین فهی و پرسلی (۱۲)، آزمون هیدرولیز نشاسته شاد (۲۴) و مصرف قندها به روش شاد (۲۴) انجام گردید.

بررسی‌های گلخانه‌ای

بررسی تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از پوسیدگی ریشه و طبق و ریشه سرخی پیاز در شرایط گلخانه

جهت تعیین میزان تأثیر جدایه‌های باکتریایی در کاهش و یا کنترل عوامل بیماری‌زا در گلخانه، جدایه‌های باکتری (جدایه باکتریایی با وجود هاله بازدارندگی در بررسی‌های آزمایشگاهی بود) مورد مطالعه قرار گرفتند. در روش آغشته‌سازی خاک، جدایه‌های باکتریایی پس از کاشت نشاءهای پیاز به خاک مرطوب اضافه شدند و پس از ۷۲ ساعت، قارچ عامل بیماری به نسبت ۱۰ درصد حجمی، با خاک گلدان مخلوط گردید. از قارچ‌کش بنومیل جهت مقایسه با جدایه‌های آنتاگونیست به میزان یک گرم در متر مربع استفاده گردید. در تمامی بررسی‌های گلخانه‌ای، از گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتی‌متر استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه و در حرارت ۳±۲۷ درجه سانتی‌گراد با تناوب نور ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بررسی‌های گلخانه‌ای در قالب طرح آماری بلوک کامل تصادفی انجام شد. پس از مدت یک هفته تلقیح قارچ، علائم بیماری در شاهد آلوده (*Fusarium oxysporum*) کاملاً مشهود شد.

نتایج

ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* این گونه با استفاده از محیط کشت Nash & Snyder از اندام‌های ذکر شده گیاهان فوق جدا شد. میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، برابر ۸ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه این قارچ در جدایه‌های مختلف، بسیار متنوع بود. رنگ پرگنه از سطح زیرین روی محیط کشت PDA از سفید، بنفش متمایل به ارغوانی تا بنفش تیره متغیر بود. ریسه‌های هوایی روی محیط کشت، نسبتاً فراوان و به صورت پنبه‌ای ابتدا سفید بوده، سپس به صورتی رنگ تا بنفش کم‌رنگ، تغییر می‌کند. البته در بعضی از جدایه‌ها، ریسه‌های هوایی به مقدار بسیار کمی تشکیل شد. روی محیط کشت‌های PDA و CLA به سادگی و پس از ۲-۳ روز اسپوردهی کرد. ابتدا از فیالیدهای جانبی کوتاه واقع روی ریسه‌های هوایی فقط تولید میکروکنیدیوم کرد که به صورت سورهای دروغین بودند، ولی بعداً ماکروکنیدیوم‌ها نیز تولیدکرد. کنیدیوفورها دارای یاخته‌های کنیدیزای منوفیالیدی منشعب و غیرمنشعب هستند. کنیدیوفورهای اولیه که به صورت جانبی و کوتاه روی ریسه‌های هوایی تولید می‌شوند، ابتدا غیرمنشعب بوده و بعداً ممکن است منشعب شوند. یاخته‌های کنیدیزای منوفیالید در مقایسه با گونه *F. solani* کوتاه هستند. میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی و به صورت سرهای دروغین تشکیل شده و تک‌یاخته‌ای و دو یاخته‌ای‌اند. به شکل‌های بیضوی، تخم‌مرغی تا تقریباً چماغی‌شکل دیده می‌شوند، ولی غالباً بیضوی هستند. دو انتهای ماکروکنیدیوم‌ها کمی باریک شده، یاخته انتهایی آن‌ها کمی نوک تیز بوده و یاخته پایه‌ای آن‌ها نسبتاً ساقه‌دار است. البته یاخته پایه‌ای بعضی از جدایه‌ها به طور مشخص پاشنه‌ای شکل است و بعضی دیگر کاملاً پاشنه‌ای شکل نبود. اغلب ماکروکنیدیوم‌ها سه‌جداره‌ای هستند، ولی گاهی ۴ جداره‌ای هم وجود دارد. اندازه کنیدیوم‌ها به شرح زیر است:

- میکروکنیدیوم‌های ۱ یاخته‌ای: (۳-۲)×۲/۲ (۵/۱۰-۴) ۶/۵ میکرومتر
- میکروکنیدیوم‌های ۲ یاخته‌ای: (۳/۲-۲)۲/۴×(۲/۱۱-۳/۴)۷/۲ میکرومتر
- ماکروکنیدیوم‌های ۳ جداره‌ای: (۲/۴-۴/۳)۳/۷×(۴۰-۲۰)۳۵ میکرومتر
- ماکروکنیدیوم‌های ۴ جداره‌ای: (۳/۴-۴/۳)۳/۸×(۴۲-۳۰)۳۸ میکرومتر
- ماکروکنیدیوم‌های ۵ جداره‌ای: (۳/۴-۴/۳)۳/۸×(۴۸-۳۶)۴۱ میکرومتر

کلامیدوسپورهای ریسه‌ای و کنیدیومی به فراوانی و به صورت میانی و انتهایی تشکیل می‌شوند. در بیشتر جدایه‌ها سطحی صاف دارند، ولی در برخی هم سطحی خشن و ناصاف دارند. به شکل کروی و به صورت منفرد، جفتی، زنجیره‌های کوتاه و گاهی به صورت توده‌ای تشکیل می‌شوند.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که از ۳۸۰ جدایه باکتریایی مورد بررسی، ۴۰ جدایه روی قارچ *F. oxysporum* دارای اثر بازدارندگی بودند. از این تعداد تنها ۱۵ جدایه باکتری، دارای توانایی ایجاد هاله بازدارندگی به میزان ۱ تا ۶ میلی‌متر روی قارچ عامل بیماری بودند که در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جدایه MM- B و MM- F گرم مثبت و جدایه‌های MM-240 ، MM-239، MM-243، MM-278، MM-276، MM-196، MM-252، MM-260، MM-194، MM-I$_2$، MM-263، MM- j$_1$ و MM-19 گرم منفی بودند. شرایط رشد تمام جدایه‌ها هوازی بود. تنها جدایه‌های MM-276، MM- F و MM- B در محیط کشت King B تولید رنگدانه فلورسنت نکردند. جدایه‌های MM-B و MM-F دارای اسپور بودند. بر اساس آزمون‌های انجام شده، جدایه‌های MM-B و MM-F در جنس *Bacillus* و بقیه جدایه‌ها در گروه *Pseudomonas*ها قرار داده شدند. بر اساس آزمون‌های تفکیکی، باکتری‌های MM-B و MM-F در سطح گونه *B. laterosporus* نامگذاری شدند، بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی شاد و همکاران (۲۴) مطابق جدول‌های (۱،۲)، مشخصات استرین‌های آنتاگونیست قارچ *Fusarium oxysporum* نشان داده شده است.

در آزمایش‌های مربوط به ترکیبات فرار ضدقارچی جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری روی محیط NA مشخص شد که کلیه جدایه‌ها در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با شاهد دارند. جدایه MM-19 و *P .fluorescents* bv.1 با ۶۶/۶۷ درصد و جدایه‌های MM- j$_1$ و MM-260 به ترتیب با ۴۵/۳۸ و ۳۹/۸۲ درصد بیشترین تاثیر بازدارندگی و جدایه MM-252 با ۵/۵۵ درصد کمترین تاثیر را در بازدارندگی رشد میسیلیوم قارچ *F. oxysporum* از خود نشان دادند. استرین MM-۲۶۳ گونه *Pseudomonas fluorescent* bv. IV قادر به تولید سیدروفور در غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن III روی محیط کشت King-B بودند، کلرید آهن III از رشد قارچ *Geotrichum candidum* جلوگیری نمود که این امر بیانگر تولید سیدروفور است، ولی در سایر استرین‌ها این وضعیت مشاهده نشد و در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن قارچ روی محیط KB رشد کرد، زیرا غلظت بالای آهن از تولید سیدروفور جلو گیری نمود. نتایج تجزیه واریانس تاثیر آنتی‌بیوتیک استرین‌های آنتاگونیست روی رشد ریسه‌ای قارچ *F. oxysporum* نشان داد که تیمارها در سطح ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند، ولی در مقایسه با شاهد، دو جدایه MM-239 و MM-276 در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری نداشتند و در یک گروه قرار گرفتند. در این آزمایش، جدایه MM-I$_2$ با میزان ۷۶/۲۰ درصد بیشترین میزان بازداری از رشد ریسه‌ای قارچ عامل بیماری‌زا را داشت. ترشحات خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست در غلظت‌های مختلف ۲۵، ۱۵ و ۵ درصد، سبب بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری گردید. با افزایش غلظت ترشحات خارج سلولی اغلب افزایش بازداری از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری مشاهده شد.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تفاوت میان غلظت‌های مختلف و همچنین میان جدایه‌های آنتاگونیست، معنی‌دار بود و اثرات متقابل آن‌ها نیز معنی‌دار گردید. در این آزمایش، جدایه $MM\text{-}I_2$ (*Pseudomonas fluorescents*) در غلظت ۲۵درصد بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *F. oxysporum* از خود نشان داد. در بررسی تأثیر استرین‌ها روی قارچ *F. oxysporum* در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک، شدت بیماری به ترتیب در استرین‌های MM-19 و MM-B برابر بود با ۱/۳۵ و ۲/۵۳ که نسبت به شاهد آلوده با شدت بیماری ۲۱/۵۸، کمترین شدت بیماری را در شرایط گلخانه نشان دادند و استرین MM-240 با شدت آلودگی ۱۳/۷۴، بیشترین شدت آلودگی را نشان داد. در بررسی تأثیر این استرین‌ها در مقابل بیمارگر *F. oxysporum* روی وزن خشک پیاز در روش آغشته‌سازی سوسپانسیون باکتری به خاک، استرین‌های MM-19 و MM-B با وزن خشکی معادل ۷/۶۰ و ۸/۴۱ بیشترین وزن خشک را بعد از تیمار شاهد سالم داشتند. بررسی‌های انجام شده روی وزن تر و طول گیاه پیاز در مقابل این بیمارگر و استرین‌های تاثیرگذار نشان داد که در مقابل قارچ *F. oxysporum* استرین‌های MM-19 و MM-B بیشترین وزن تر و طول گیاه را دارند و از لحاظ آماری در سطح بالاتری نسبت به شاهد آلوده قرار می‌گیرند.

جدول ۱ –خصوصیات بیوشیمیایی استرین‌های آنتاگونیست قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز.

جدایه واکنش جدایه‌های آنتاگونیست	MM-240	$MM\text{-}J_1$	MM-239	MM-260	MM-B	MM-252	MM-263
رنگ آمیزی گرم	–	–	–	–	+	–	–
رشد هوازی در محیط کشت O/F	+	+	+	+	+	+	+
تولید رنگدانه فلورسانت	+(blue)	+	–	+	–	+(blue)	+
فوق حساسیت	–	+	–	–	–	–	–
تولید اسپور	–	–	–	–	+	–	–
لهانیدن سیب زمینی	–	–	–	–	–	–	–
دهیدرولیز آرژنین	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوان	+	–	–	–	–	+	–
هیدرولیز نشاسته	–	–	–	–	–	–	–
هیدرولیز ژلاتین	+	+	–	–	+	+	+
استفاده از منابع قندی :گلوگز	+	+	+	+	+	+	+
دی-گالاکتوز	+	–	+	+	–	+	+
ترهالوز	+	–	–	+	–	+	+
سوکروز	+	–	+	+	–	+	+
زایلوز	–	–	–	–	–	–	–
مانیتول	–	–	–	–	+	–	–
آرابینوز	–	–	–	–	+	–	–

ادامه جدول ۱

جدایه واکنش جدایه‌های آنتاگونیست	MM-196	MM-278	MM-243	MM-19	MM-F	$MM-I_2$	MM-194	MM-276
رنگ آمیزی گرم	−	−	−	−	+	−	−	−
رشد هوازی در محیط کشت O/F	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید رنگدانه فلورسانت	(blue)+	+	(blue)+	+	−	(blue)+	+	−
فوق حساسیت	−	−	−	−	−	−	−	−
تولید اسپور	−	−	−	−	+	−	−	−
لهانیدن سیب زمینی	−	−	+	−	−	+	−	−
دهیدرولیز آرژنین	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوان	+	+	+	+	−	+	−	−
هیدرولیز نشاسته	−	−	−	−	−	−	−	−
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+	+	+	−	−
استفاده از منابع قندی :گلوگز	+	+	+	+	+	+	+	+
دی-گالاکتوز	+	+	+	+	−	+	+	+
ترهالوز	+	+	+	+	−	+	+	−
سوکروز	+	+	+	+	−	+	+	+
زایلوز	−	−	−	−	−	−	−	−
مانیتول	−	−	−	−	+	−	−	−
آرابینوز	−	−	−	−	+	−	−	−

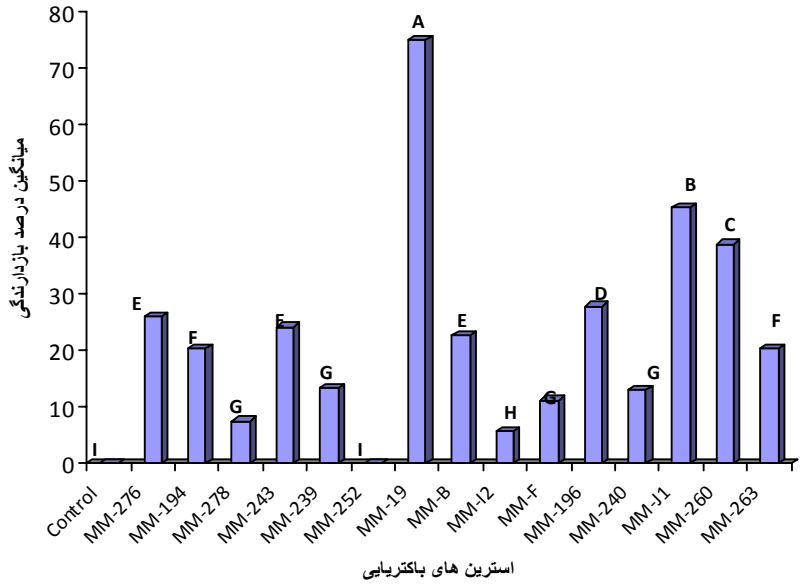
جدول ۲- مشخصات باکتری‌های آنتاگونیست قارچ *Fusarium oxysporum*.

استرین باکتریایی	مشخصات استرین
MM-240	*Pseudomonas fluorescent* bv. IV
MM-239	*P. putida* bv. B
MM-243	*P. fluorescent* bv. IV
MM-19	*P. fluorescent* bv. I
MM-278	*Pseudomonas fluorescent* bv. I
MM-276	*P. putida* bv. B
MM-260	*P. fluorescent* bv. V
MM-252	*P. fluorescent* bv. IV
MM-196	*P. fluorescent* bv. IV
MM-194	*P. fluorescent* bv. V
MM-263	*P. fluorescent* bv. III
$MM-J_1$	*P. aeroginosa*
$MM-I_2$	*P. fluorescent* bv. IV
MM-B	*Bacillus laterosporus*
MM-F	*B. laterosporus*

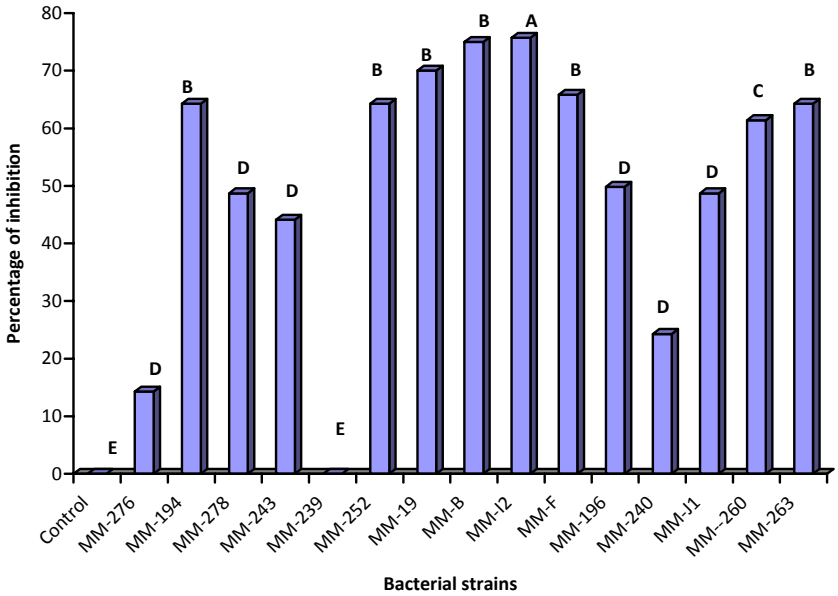
بحث

گونه‌های فوزاریوم، از جمله قارچ‌های سریع-الرشد هستند که در مدت کوتاهی تمام پتری را پر می‌کنند. پوسیدگی فوزاریومی طبق، از جمله بیماری‌هایی است که به مزارع پیاز خسارت وارد می‌کند. این بیماری زمانی که به عنوان بیماری ثانویه در مزارع آلوده به ریشه سرخی مطرح باشد، به دلیل ضعیف شدن گیاه و آمادگی ریشه جهت هجوم بیمارگرهایی مثل *Fusarium oxysporum* خسارت بیشتری وارد می‌کند. اهمیت *F. oxysporum* فقط منحصر به مزرعه نیست، چرا که فوزاریوم قادر است پس از برداشت، در انبار نیز به فعالیت خود ادامه دهد و بیماری را گسترش دهد. در گزارش لک (۲)، پنج جدایه *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. equiseti*

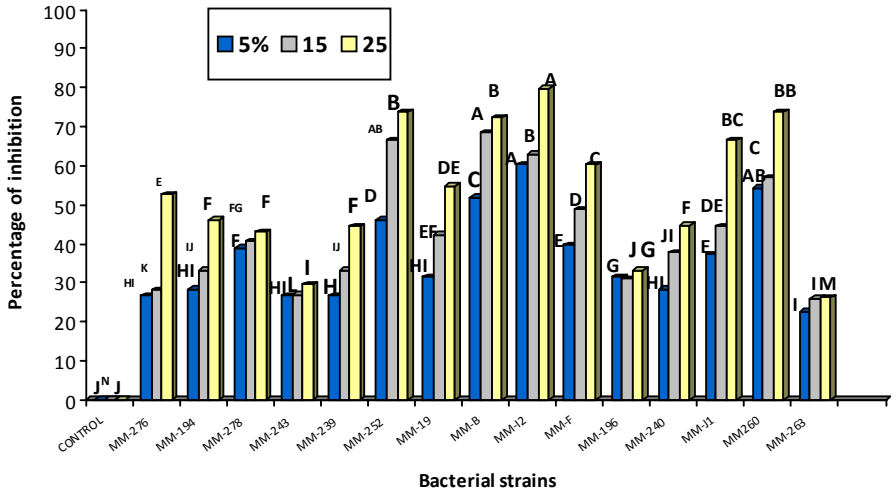
F. chlamydosporum، *F. proliferatum* در استان مرکزی از مناطق پیازکاری جدا گردیده است که میزان فراوانی قارچ *F. oxysporum* بیشتر از بقیه بود. درصد آلودگی در مناطق مختلف، از ۷ تا ۳۹ درصد متغیر بوده است.



نمودار ۱- درصد بازدارندگی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست از رشد میسلیوم *F. oxysporum* عامل پوسیدگی پیاز در اثر ترکیبات فرار.



نمودار ۲- درصد بازدارندگی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست از رشد میسلیوم *F. oxysporum* عامل پوسیدگی طبق پیاز در اثر ترکیبات خارج سلولی قابل پخش.



نمودار ۳- تاثیر متابولیت‌های مایع خارج سلولی فیلتر شده استرین‌های باکتریایی بر میـزان بازدارنـدگی رشـد پرگنـه قارچ *F. oxysporum* عامل پوسیدگی طبق پیاز.

حروف داخل نمودار گروهبندی تیمارهای باکتریایی در تجزیه آماری است.

در مورد کنترل بیماری‌های مورد بحث، یکی از روش‌های مرسوم، یافتن ارقام مقاوم، انتخاب و جدا کردن ارقام مقاوم به بیماری تحت شرایط مزرعه است (۲۱). در مزرعه آلوده به ریشه سرخی و پوسیدگی فوزاریومی طبق به علت تنوع ژنتیکی، برخی از پیازها علائم بیماری را نشان نداده یا کمتر نشان می‌دهند. در ایران، ارقام اسحاقی نیشابور، محلی ساری به عنوان مقاوم‌ترین ارقام به بیماری ریشه سرخی معرفی شده‌اند (۳). در مبارزه بیولوژیک از آنتاگونیست‌های قارچی، مانند *Trichoderma virida, T. psudokoningii, T. harizianum, T. hamatum, T. konigii* و آنتاگونیست‌های باکتریایی، مانند *Pseudomonas flourescens, Bacillus subtilis* استفاده شده است که بر روی *F. oxysporum* f. sp.*cepae* موثر واقع شده‌اند. معالجه بذرها با استفاده ترکیبی از *Trichoderma viridae* و *Pseudomonas flourescens* پوسیدگی طبق در پیاز را کاهش می‌دهد (۲۲). عوامل بیوکنترل باکتریایی با تولید متابولیت‌های خارج سلولی، از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها (فنازین، پیرول، باکتریوسین‌ها) سیدروفورها و مکانیزم‌هایی مانند کلنیزه کردن ریشه، ایجاد مقاومت القایی و تحرک رشد گیاهی در کاهش بیماری‌های گیاهی نقش دارند. اهمیت نسبی هر یک از این مکانیزم‌ها بر اساس شرایط ریزوسفر و همچنین در میان استرین‌ها تا حد زیادی متفاوت است (۳۲). آنتی-بیوتیک ها اغلب نقش اساسی را در کاهش بیماری توسط برخی باکتری‌ها ایفا می‌کنند (۱۴). نتایج حاصل از بررسی اثرات آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل باکتریایی جداسازی شده از مزارع پیاز استان مرکزی در منطقه خمین نشان داد که آن‌ها از قدرت تولید آنتی‌بیوز بالایی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار هستند. ۱۵ استرین باکتری آنتاگونیست قادر به ایجاد هاله بازدارندگی روی قارچ عامل بیماری به میزان ۱ تا ۶ میلی‌متر در محیط کشت PDA بودند. تاثیر ترکیبات فرار ضدقارچی جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست روی رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری، مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که سه جدایه MM-19,MM- j_1 و MM-260 با بیشترین میزان بازدارندگی از رشد، روی محیط کشت NA تولید ترکیبات فرار ضدقارچی می‌کنند که در کنترل قارچ عامل بیماری موثرند. تولید مواد

ضدقارچی نیز یکی از مکانیزم‌های بیوکنترل عوامل باکتریایی محسوب شده که می‌تواند سرعت رشد میسیلیومی و فعالیت آنزیمی را تحت‌تاثیر قرار دهد. پاسخ میزبان به ترکیبات فرار باکتریایی همزمان به گونه، محیط، سن رشدی میزبان و عوامل بیوکنترل بستگی دارد (۱۳). استرین‌های آنتاگونیست دارای قدرت تولید آنتی‌بیوتیک در محیط NA هستند که از رشد رویشی قارچ عامل بیماری جلوگیری می‌کنند. در بررسی آزمایشگاهی آنتی‌بیوتیک تولید شده توسط جدایه‌های باکتری، کنترل بسیار خوبی در جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ عامل بیماری داشت. در بررسی تاثیر ترشحات خارج سلولی باکتری‌های انتخابی روی رشد میسیلیومی قارچ عامل بیماری، اغلب با افزایش غلظت مایع خارج سلولی، افزایش میزان بازداری از رشد رویشی مشاهده گردید. البته در بعضی از جدایه‌ها افزایش غلظت از ۵ به ۱۵ درصد، هیچ‌گونه تاثیر معنی‌داری روی قارچ نداشت. با توجه به نتیجه حاصل از بررسی‌های آزمایشگاهی که نشان‌دهنده قدرت بالای تولید آنتی‌بیوزیز اکثر جدایه‌های آنتاگونیست است، تلاش برای کاربرد مستقیم یا مواد مستخرج از جدایه‌های آنتاگونیست جهت کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز در آزمایش‌های مزرعه‌ای توصیه می‌گردد. باکتری‌های جدا شده در این تحقیق پس از شناسایی و آزمایش‌های آنتاگونیستی تکمیلی جهت کاربرد روی پیاز در شرایط گلخانه انتخاب شدند. در شرایط گلخانه، استرین‌های آنتاگونیست روی رقم حساس آذر شهر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که بعضی از استرین‌ها توانستند علاوه بر کاهش در میزان شدت بیماری، سبب افزایش وزن پیاز و در نتیجه افزایش عملکرد محصول گردند. در مطالعه تأثیر استرین‌های آنتاگونیست روی فاکتورهای رشدی، نتایج نشان داده است که استرین‌ها در مقابل بیمارگر *F. oxysporum* روی وزن خشک پیاز در روش آغشته‌سازی سوسپانسیون باکتری به خاک، استرین‌های MM-۱۹ و MM-B بیشترین وزن خشک را بعد از تیمار شاهد سالم داشتند.

تقدیر و تشکر

از جناب آقای مهندس حسن‌پور مسؤول محترم آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک و جناب آقای مهندس مجدآبادی و اسدی مدیریت و کارشناس محترم بخش اصلاح نباتات جهاد کشاورزی استان مرکزی که در بعضی از مراحل انجام این تحقیق با ما همکاری نمودند، تشکر و قدرانی می‌نماییم.

منابع مورد استفاده

۱- بهروزین، م، اسدی، پ. ۱۳۷۳. معرفی سه گونه فوزاریوم عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز خوراکی و تعیین فراوانی آنها در آذربایجان شرقی. بیماری های گیاهی، جلد ۳۰، صفحه: ۴۱ تا ۴۶.

۲- لک، م ر، زارع، ر، حق شناس، م، ۱۳۸۵. شناسایی و پراکنش فوزاریوم‌های عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز در شهرستان خمین. هجدهمین کنگره گیاه پزشکی، شهریور ۱۳۸۷، همدان، ایران.

۳- نصر اصفهانی،م، ۱۳۷۸. بررسی و شناسایی عامل بیماری ریشه سرخی پیاز در اصفهان. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۵ : ۱۶۵-۱۷۶.

4- Abawi, G. S., Lobber, J. W., 1971. Pathological histology of four onion cultivars infected by *Fusarium oxysporum f.sp. cepae*. Phytopath 61: 1164-116.

5- Alfieri, S. A., Langdon, H. R., Wellsburg, C., Kimbroug, J. W., 1984. Index of plant disease in Florida dept Agric Consumer Services. Division of Plant Industry Bull: 11.

6- Assadi, P., Izadyar, M., 1974. Root and bulb root of onion. Proc 5th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran.

7- Baker, K. F., 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathol 25: 67-85.

8- Bloembergen, G. V., Lautenberg, B. J. J., 2001. Molecular basis of plant growth promotion and bio-control by

rhizobacteria. Current Opinion in Plant Biol 4: 343-350.

9- Cook, R. J., 1988. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS. Press St Paul Mn USA. Pp. 539.

10- Clinton, S. K., 1916. Diseases of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*A. sativum* L.). Common names of plant diseases. The American Pathological Society. Accessed April 2008. Online athttp://www.apsnet.org/online/common/comment/onion.asp

11- De Freitas, J. R., Grmida, J. J., 1992. Growth promotion of winter wheat by *fluorescent pseudomonads* under field condition. Soil Biol Bioch 24: 1137-1146.

12- Fahy, P. C., Persley, G. J., 1983. Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. Academic Press. New York.

13- Fiddaman, P. J., Rossall, S., 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J Appl Bacteriol 74: 119-126.

14- Fravel, D. R., 1988. Role of antibiosis of plant disease. Annual Review of Phytopathol 26: 75-91.

15- Glick, B. R., Penrose, D. M., Ma, W., 2001. Bacterial promotion of plant growth (Meeting report). Biotech ADV 19: 135-138.

16- Hagderon, C., Gould, W. D., Bardinelli, T. R., 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appi Environ Microbiol 55: 2743-2797.

17- Hanzawa, H. F., 1914. First report of bulb decay of onion by *Fusarium oxysporum* in Colorado. Plant Disease 84: 808.

18- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintzw, M., Schroth, M. N., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286: 885-886.

19- Kraus, J., Loper, J. E., 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *fluorescens* pf-5. Mecanistic studies pp. 177. 175. In: Keel, C. Koller, B. International workshop on plant growth promoting rhizobacteria, Inerlacen, Switzerland.

20- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Marasas, W. F. O., 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, Univ. Park and London. Pp 193.

21- Netzer, D., Rabinowitch, H. D., Weintal, C. H., 1985. Green house technique to evaluate onion resistance to pink-root. Euphytica 34: 385-391.

22- Raupach, G. S., Kloepper, J. W., 1998. Mixture of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathol 88: 1158-1164.

23- Selby, F. M., 2003. First report of *Fusarium oxysporum* causing rot of onion bulbs in North America. Plant Pathology 52: 426.

24- Schaad, N. W., 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (2nd ed). A. P. St. Paul. Minnesota. U. S.A. pp164.

25- Schreiber, L. R., Gregry, G.F., Krause, C. R., Jchida, J. M., 1988. Production, partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolate from ulmus. American Canadian Journal of Botany 66: 2338-2346.

26- Shoda, M., 2000. Bacterial control of plant disease. J Bioengin 89: 515-521.

27- Sing, V., Deverall, B. J., 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogen of citrus fruit. Transaction of British Mycological Society 832: 487-490.

28- Sumner, D. R., Gay, J. D., 1984. Basal rot of onion caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in Georgia. Plant Disease 68: 450.

29- Vidhyseakaran, P., Muthamilan, M., 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. Biocontrol Science and Technology 8: 67-74.

30- Walker, J. C., Times, E. C., 1924. A Fusarium bulb-root of onion and the relation of environment to its development. J Agar Research 28: 638-694.

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

32- Weller, D. M., 1988. Biological control of soil-born plant pathogen in the rhizosphere with Bacteria. Annual Review of Phytopathol 26: 379-40.