مجله کشاورزی، دوره ۱۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۸، صص ٤٦-۳۵

بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری ساق سیاه خربزه (*Macrophomina phaseolina*) با استفاده از جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens*

عباس خیری *، حسن‌رضا اعتباریان **، علی روستایی ***، غلام خداکرمیان **** و حشمت‌اله امینیان ***

تاریخ وصول مقاله: ۸۷/۵/۲۸ و تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۲۲

چکیده

به‌منظور بررسی کنترل بیولوژیک بیماری ساق سیاه خربزه (*M. phaseolina*) از تعداد ۱۸۷ جدایه سودوموناس فلورسنت به‌دست آمده از خاک و ریزوسفر گیاهان جالیزی براساس میزان بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری روی محیط کشت، ۱۲ جدایه آنتاگونیست متعلق به بیووارهای I، III و V از باکتری *P. fluorescens* و بیووار B متعلق به *P. putida* جهت بررسی نهایی انتخاب شدند. همه جدایه‌های سودوموناس در روش کشت متقابل، تولید مواد فرار و تولید آنتی‌بیوتیک، رشد عامل بیماری را کاهش دادند و این کاهش رشد در جدایه های مختلف متفاوت بود. درصد کاهش رشد در روش متقابل بین ۱۷/۹ تا ۷۲/۲ درصد، در روش تولید مواد فرار بین ۷/۱ تا ۷۱/۵ درصد و در روش تولید آنتی‌بیوتیک بین ۱۹ تا ۹۱/۹ درصد برای جدایه‌های قارچ متغیر بود. همه جدایه‌ها با تولید سیدروفور از رشد قارچ *M. phaseolina* جلوگیری کردند. آزمایشات گلخانه‌ای از دو روش پوشش بذر و کاربرد سوسپانسیون باکتری در خاک به صورت محلول‌پاشی استفاده شد. در هر دو آزمون تعداد گیاهان سالم در گلدان‌های تیمار شده با جدایه‌های باکتری آنتاگونیست بیشتر از گیاهان شاهد بود و جدایه‌های P3, P5, P6 بیشترین تأثیر در کنترل بیماری داشتند.

کلمات کلیدی: بازدارندگی، پوشش بذر، تولید مواد فرار، خاک، ریزوسفر، کشت متقابل، گلخانه

* – فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، تهران – ایران (**E-mail: abbas_kheiri2005@yahoo.com**)

** – استاد گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران

*** – دانشیار گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران – ایران

**** – استادیار سابق گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران – ایران

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم خربزه بیماری ساق سیاه خربزه می‌باشد که توسط قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid ایجاد می‌شود و به آوندهای چوبی صدمه زده و باعث کاهش محصول می‌شود. این بیماری علاوه بر خربزه به خیار، هندوانه، طالبی، حبوبات، دانه‌های روغنی و سبزی‌های مختلف نیز خسارت وارد می‌کند و مناطق انتشار آن در ایران عبارت از اصفهان، نطنز، کرمان، مشهد، ورامین، ایوانکی، ساوه، یزد، تبریز، اهواز و برازجان می‌باشد (۹).

بارزترین علامت این بیماری قهوه‌ای و سیاه شدن ساقه است که ابتدا به صورت لکه‌ای در نزدیکی طوقه گیاه یا روی ساقه ظاهر می‌شود. این لکه ابتدا زیتونی رنگ و سپس با گذشت زمان کدر شده تا سرانجام قهوه‌ای و سیاه می‌گردد و تا وقتی که تمام طوقه را فرا نگرفته است گیاه به خوبی رشد و نمو می‌نماید. وقتی که لکه‌ها به مرحله قهوه‌ای رسیدند، به‌تدریج شیره گیاه از شکاف‌هایی که در سطح پوست ایجاد می‌گردد خارج شده و در مجاورت هوا به صورت صمغ تیره رنگ باقی می‌ماند و خشک می‌شوند (۸).

روشهای مبارزه شیمیایی با این بیماری علاوه بر هزینه‌های سنگین و خطرات زیست محیطی که به دنبال دارد سبب کاهش میکوفلور مفید خاک می‌شود، از طرف دیگر این نوع مبارزه دارای یک تأثیر موقتی و ناپایدار بر روی قارچ می‌باشد و احتمال ایجاد جدایه‌های مقاوم در برابر سم بسیار زیاد است. بنابراین استفاده از این روش بایستی با دقت و احتیاط فراوان و درصورت امکان تلفیق با روشهای دیگر صورت گیرد. مبارزه بیولوژیکی با عوامل بیماری‌زا از راه‌هایی است که در مورد بسیاری از عوامل بیماری‌زا در سال‌های اخیر مورد استفاده قرار گرفته است. جدایه RC2 باکتری *Pseudomonas fluorescens* Migula جدا شده از ریزوسفر سیب زمینی داری ویژگی آنتاگونیستی علیه دو پاتوژن اصلی گیاهی به نام‌های *Macrophomina phaseolina* (Lib) de Bary و *Sclerotinia sclerotium* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. این جدایه در شرایط آزمایشگاهی بعد از پنج روز نگهداری در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد سبب بازدارندگی از رشد قارچ در آزمون کشت متقابل گردید و رشد قارچ‌های فوق را به‌ترتیب تا ۸۰/۱ درصد و ۷۳/۵ درصد کاهش داد (۱٤). پتانسیل کنترل ۱۷۲ جدایه *Pseudomonas fluorescens* جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان نخود، روی قارچ *M. phaseolina* مورد بررسی قرار گرفت، ماکزیمم کنترل ۷۳ و مینیمم کنترل ۱۰ درصد بود (۱٦). ۸۸ جدایه *Pseudomonas fluorescens* موجب مقاومت سیستمیک در برابر پوسیدگی زغالی نخود شدند. گیاهانی که با این جدایه‌ها تیمار شدند، سطح کیتیناز و گلوکاناز در آنها افزایش یافت و مقاومت گیاهان تا ۳۳ درصد افزایش یافت (۲۲).

این مطالعات، موید این مطلب است که کنترل بیولوژیک بر علیه بیماری ساق سیاه مؤثر و با کمک عوامل آنتاگونیستی می‌توان مدیریت مناسبی جهت پیش‌گیری از بروز بیماری طراحی نمود. از این رو هدف از این تحقیق جداسازی آنتاگونیست‌ها از خاک و محیط اطراف ریشه،

شناسایی و بررسی تأثیر آنها در جلوگیری از رشد قارچ *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاه و نیز توقف رشد و یا کاهش فعالیت آن در بروز بیماری در شرایط گلخانه می‌باشد.

مواد و روشها

اثبات بیماری‌زایی قارچ *M. Phaseolina*

بیماری‌زایی دو جدایه از قارچ *M. phaseolina* جداسازی شده از خربزه‌های آلوده مناطق گرمسار و ایوانکی به روش زیر اثبات گردید. زادمایه جدایه‌های قارچ عامل بیماری که روی مخلوط آرد ذرت و ماسه به نسبت ۱:۹ بدست آمد به نسبت وزنی یک درصد با خاک سترون مخلوط گردید و سپس، شش عدد بذر داخل هر گلدان کاشته شد و پس از ظهور علائم بیماری ساق سیاه، قارچ عامل بیماری بر روی محیط PDA کشت داده شد و با روش نوک ریسه (Hyphal-Tip) روی محیط WA خالص‌سازی و جهت بررسی میکروسکوپی نمونه‌برداری گردید.

جدایه‌های آنتاگونیست به‌کار رفته

۱۸۷ جدایه سودوموناس فلورسنت از ریزوسفر و خاک مزراع جالیز گرمسار و ایوانکی با روش سری رقت‌سازی روی محیط King'sB جدا شدند. تأثیر این جدایه‌ها بر رشد با استفاده از آزمون چهار نقطه‌ای بررسی شد. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها پس از سه روز براساس فاصله‌ای که بین حاشیه پرگنه جدایه‌ها و قارچ (Inhibition Zone) ایجاد شده بود، اندازه‌گیری شد (۲۵). باکتری‌های با توانایی بازدارندگی با آزمون چهار نقطه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی شدند. داده‌های به‌دست آمده تجزیه و تحلیل شدند (۲۰). با استفاده از مقایسه میانگین داده‌ها، ۱۲ جدایه برای آزمون‌های بعدی آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب شدند. این ۱۲ جدایه براساس خصوصیات فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی توصیه شده تشخیص داده شده‌اند. تست‌هایی مانند اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین و آرژنین دی‌هیدرولاز احیای نیترات، تولید لوان از سوکروز، لهانیدن سیب‌زمینی، رشد در چهار و ۴۱ درجه سانتی‌گراد، استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، آدونیتول، اتانول، دی-آلانین، ال-آرابینوز، دی زایلوز، دی-گالاکتوز و غیره به عنوان منابع کربن استفاده شده‌اند (۳، ۱۱، ۱۹ و ۲۱).

بررسی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری در کشت متقابل

در این آزمایش، اثر ۱۲ جدایه باکتری روی جدایه قارچ با استفاده از روش کشت متقابل مورد بررسی قرار گرفت (٦). ابتدا در نیمی از تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA جدایه‌های باکتری به صورت چمنی کشت گردید و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس یک قطعه به قطر پنج میلی‌متر از کشت سه روزه قارچ در طرف مقابل تشتک به فاصله پنج میلی‌متر از لبه آن کشت داده شد. در تشتک شاهد به جای کشت جدایه باکتری، از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک‌های پتری مجدداً به انکوباتور منتقل شدند. مساحت پرگنه قارچ تا روز سوم و پس از رسیدن قارچ شاهد به وسط تشتک اندازه‌گیری شد. درصد کاهش رشد درمقایسه با شاهد روز سوم

در تیمارهای مختلف طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد کاهش رشد پرگنه} = \frac{\text{مساحت رشد پرگنه در هر تیمار - مساحت رشد پرگنه در شاهد}}{\text{مساحت رشد پرگنه در شاهد}} \times 100$$

بررسی تولید مواد فرار توسط باکتری‌های آنتاگونیست

۱۲ جدایه باکتری آنتاگونیست به صورت چمنی در محیط NutrientAgar کشت داده شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از ۲٤ ساعت تشتک حاوی قارچ عامل بیماری سه روزه به صورت وارونه در روی تشتک حاوی کشت ۲٤ ساعته باکتری قرار گرفته و محل اتصال لبه‌های دو تشتک با پارافیلم کاملاً مسدود شد و پس از گذشت سه روز در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد مساحت پرگنه بیمارگر در تشتک اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد درمقایسه با شاهد طبق فرمول بالا محاسبه گردید (۱۲).

تولید آنتی‌بیوتیک توسط باکتری های آنتاگونیست

۱۲ جدایه باکتری آنتاگونیست در سه نقطه از فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA در فواصل مساوی در یک خط مدور به صورت یک خط یک سانتی‌متری کشت گردیدند. پس از نگهداری این تشتک‌ها در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت، پرگنه باکتری به کمک میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون از روی محیط کشت پاک شده و توسط بخار کلروفرم کشته شدند. سپس یک قطعه پنج میلی‌متری از کشت فعال جدایه‌های قارچ عامل بیماری در مرکز این محیط کشت قرار داده شد و پس از سه روز در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد مساحت پرگنه بیمارگر در تشتک اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد درمقایسه با شاهد طبق فرمول بالا محاسبه گردید (۲۵).

تولید سیدروفور

در این آزمون، ابتدا محیط کشت King'sB حاوی غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول کلریدآهن ($Fecl_3$) تهیه گردید، سپس جدایه‌های *P. fluorescens* روی سه نقطه از تشتک پتری حاوی محیط کشت به صورت نقطه‌ای کشت شد. بعد از ٤۸ تا ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پر گنه‌های باکتری با پنبه و الکل سترون از روی محیط کشت پاک گردید و سپس دو تا سه قطره کلروفرم درون تشتک پتری (به صورت وارونه) قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه جهت از بین رفتن آنتی‌بیوتیک ها تشتک‌های پتری به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیونی از قارچ ماکروفومینا تهیه و روی محیط ریخته شد و تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت نگهداری گردیدند. عدم رشد قارچ در اطراف توده باکتری به عنوان وجود سیدروفور تلقی گردید (۵).

آزمایشات مربوط به کشت متقابل، مواد فرار و تولید آنتی‌بیوتیک در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲٤ تیمار و سه تکرار صورت پذیرفت و داده‌ها پس از تبدیل به $\text{ArcSin}\sqrt{Y}$ (درصد بازدارندگی = y) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۲۰).

آزمایشات گلخانه‌ای

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر روی

بیماری ساق سیاه خربزه در شرایط گلخانه‌ای با استفاده از دو روش تیمار بذر و تیمار خاک ارزیابی گردید. همچنین در هر دو روش، تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر روی رشد بوته‌های خربزه در عدم وجود قارچ عامل بیماری نیز بررسی شد. در آزمایشات گلخانه‌ای از دو جدایه قارچ و ۱۲ جدایه باکتری استفاده شد. برای تهیه ماده آلوده‌کننده قارچ *M. phaseolina* طبق روش شرح داده شده در قسمت اثبات بیماری‌زایی از محیط کشت ماسه و آرد ذرت به نسبت ۱:۹ استفاده شد. در مرحله بعدی، زادمایه تهیه شده به نسبت یک درصد وزنی با خاک استریل مخلوط گردید. تعداد شش عدد بذر خربزه ضدعفونی شده جهت آزمون خاک در هر گلدان کاشته شد آزمون‌ها به صورت فاکتوریل با دو فاکتور و در قالب طرح کاملا تصادفی و چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور A شامل سه سطح، دو جدایه قارچ *M. phaseolina* و شاهد بدون قارچ و فاکتور B شامل ۱۳ سطح شاهد بدون باکتری و جدایه‌های P1، P2، ... و P12 بود.

در آزمون تیمار خاک و بذر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری با رقت ۱۰۷ سلول در میلی‌لیتر (۱۰۰ سی‌سی برای هر گلدان) استفاده گردید (۲٤). پس از گذشت ۳۰ روز از کاشت، ارتفاع بوته‌ها، وزن خشک اندام هوایی، ریشه و شدت بیماری محاسبه گردید. شدت بیماری با نمرات صفر تا سه (۰ = گیاه سالم، ۱ = قهوه‌ای شدن قسمت طوقه، ۲ = امتداد قهوه‌ای تا بالا ساقه و پژمرده شدن برگ‌ها و ۳ = خشک شدن و مرگ گیاه) ارزیابی گردید.

نتایج و بحث

بیماری‌زا بودن *M. phaseolina* روی گیاهچه‌های خربزه به اثبات رسید، علائم بیماری (قهوه‌ای رنگ شدن ساقه و مرگ گیاه) یک هفته پس از مایه‌زنی مشاهده گردید (شکل ۱). قارچ جدا شده از این بوته‌ها با قارچ مایه‌زنی شده کاملاً یکسان بود.

از مجموع ۱۸۷ جدایه سودوموناس فلورسنت در آزمون کشت چهار نقطه‌ای بر روی محیط PDA، ۳۱ جدایه، علیه این بیمارگر هاله بازدارنده ایجاد کردند. قطر هاله بازدارنده در جدایه‌های مختلف از ۰/۷۵ تا ۱/۸ سانتی‌متر متغیر بود (جدول ۱). براساس تجزیه و تحلیل آزمون کشت چهار نقطه‌ای به روش MSTAT-C از بین ۳۱ جدایه آنتاگونیست ۱۲ جدایه برای آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند (جدول ۲).

بررسی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه

جدایه‌های سودوموناس در روش متقابل، تولید مواد فرار و تولید آنتی‌بیوتیک رشد قارچ *M.phaseolina* را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش دادند. همان‌طورکه از جدول (۲) استنباط می‌گردد در روش کشت متقابل، جدایه‌های P4، P1، P9، P10، P5، P6 و P8 بیشترین تأثیر در کاهش رشد قارچ داشتند. بیشترین درصد کاهش رشد (۷۲/۲ -٦٦/٥٢ درصد) مربوط به جدایه P10 (*P. fluorescens* biovIII) وکمترین درصد کاهش رشد (۲۲/۷٦-۱۷/۹٦ و۲٦/۸۸-۲٦/٤ درصد) به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های P11(*P. fluorescens* biovIII) و P3 (*P.fluorescens* biov B) بود. فسفات غیرآلی از

تولید آلکالین و اسید فسفاتاز که برای تشکیل متابولیت‌های ثانویه لازم می‌باشند، جلوگیری می‌کند و غلظت‌های بیش از یک میلی‌مولار فسفات غیرآلی شدیداً برای متابولیسم ثانویه سودوموناس بازدارنده است (۷ و ۲۶). محیط کشت PDA چون میزان فسفات غیرآلی آن پایین است این مزیت را دارد که یک محیط غذایی مناسب جهت تولید متابولیسم ثانویه و آنتی‌بیوتیک فراهم می‌کند ولی درصورت داشتن آهن زیاد مانع از تولید پیگمانت فلورسنت می‌شود (۲۷).

در آزمایش تولید مواد فرار همه جدایه‌ها موجب کاهش رشد قارچ شدند. جدایه P10 (*P. fluorescens* biov III) بیشترین تأثیر را در کاهش رشد قارچ بیمارگر داشت (۷۱/۵۴–۶۵/۸۶ درصد)، و جدایه P3 (*P. putida* biovB) کمترین اثر را نشان داد (۷/۱۵–۵/۱۲). محققین در ارتباط با مواد فرار تولید شده در شرایط طبیعی ابراز داشته‌اند که مواد ارگانیک از گیاه و حیوانات زنده یا مرده به درون خاک وارد می‌شود. از این مواد آنچه که در خاک محلول است، ترشحات و آنچه که در اتمسفر خاک و به فرم گاز است، مواد فرار نامیده می‌شود. مواد فرار اثرات قابل ملاحظه‌ای بر میکروبیولوژی خاک‌ها دارند (۱۳). مشاهدات مختلف در شرایط آزمایشگاهی نیز موید پدید آمدن چنین موادی در محیط کشت می‌باشند. در ارتباط با تولید مواد فرار در جنس سودوموناس، بیشترین توجه به گاز بسیار سمی سیانید هیدروژن معطوف گردیده است. تولید ترکیبات فرار یکی از مکانیسم‌های بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست سودوموناس می‌باشد (۲).

در آزمایش تولید آنتی‌بیوتیک، جدایه‌های P9، P5، P6 و P10 بیشترین تأثیر در کاهش رشد جدایه-های قارچ داشتند. بیشترین درصد کاهش رشد (۹۱/۹–۸۵ درصد) مربوط به جدایه (*P. fluorescens* biovIII) P10 و کمترین درصد کاهش رشد (۱۹/۲۸–۱۹/۰۱ درصد) مربوط به جدایه (*P.fluorescens* biovIII) P11 بود. تحقیقات مشخص کرد که جدایه‌های D و ۱۰۸۳ باکتری *P.fluorescens* با تولید آنتی‌بیوتیک از رشد میسلیوم‌های قارچ *Phytophthora capsici* در شرایط آزمایشگاه جلوگیری به عمل می‌آورد (۱۸). بیشتر جدایه‌های سودوموناس قابلیت تولید متابولیت‌های ضدقارچی از دسته لیپوپپتیدهای حلقوی از قبیل Viscozinamid و Tenzin را دارند Viscozinamid از آلودگی چغندرقند به *Pythium ultimum* جلوگیری می‌کند (٤).

جدایه‌های P1، P2، ... و P12 بر روی محیط King's B حاوی غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلریدآهن ($FeCl_3$) از رشد قارچ *M. phaseolina* جلوگیری کردند، اما در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول کلریدآهن ($FeCl_3$) مانع رشد قارچ نشدند که نشان‌دهنده تولید سیدروفور توسط این جدایه‌ها می‌باشد، این مواد، تحت شرایط کمبود آهن تولید شده و آهن موجود در خاک را از دسترس سایر میکروارگانیسم‌ها خارج نموده و باعث اختلال در واکنش‌های حیاتی آنها می‌شود (۲۵). باکتری‌های گروه سودوموناس فلورسنت علاوه بر سیانید هیدروژن، پروتئاز و ترکیبات آنتی‌بیوتیک، سیدروفور نیز تولید می‌نمایند (۱۷).

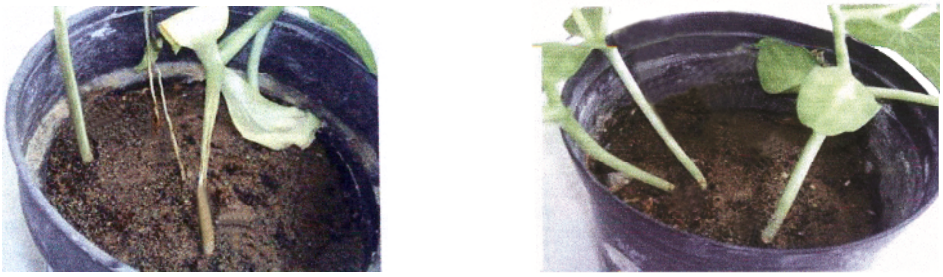
جدول ۱ – میزان بازدارندگی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* از رشد قارچ عامل بیماری

Table 1 - Inhibition amount of *Pseudomonas fluorescens* isolates of growth of *M . phaseolina*

شماره جدایه	ناحیه بازدارندگی از رشد قارچ (سانتی‌متر) Inhibition Zone (cm)		شماره جدایه	ناحیه بازدارندگی از رشد قارچ (سانتی‌متر) Inhibition Zone (cm)	
	جدایه ایوانکی (M1)	جدایه ایوانکی (M2)		جدایه گرمسار (M1)	جدایه ایوانکی (M2)
1	1.50 ef	1.60 cd	17	1.30 ij	1.55 de
2	1.11 l	1.45 fg	18	1.40 gh	1.50 ef
3	1.65 bc	1.68 bc	19	1.45 fg	1.60 cd
4	1.55 de	1.45 fg	20	1.35 hi	1.55 de
5	1.60 cd	1.65 bc	21	1.40 gh	1.55 de
6	1.45 fg	1.65 bc	22	1.55 de	1.70 b
7	1.55 de	1.70 b	23	1.30 ij	1.45 fg
8	1.65 bc	1.45 fg	24	1.40 gh	1.60 cd
9	1.50 ef	1.45 fg	25	1.25 jk	1.40 gh
10	1.45 fg	1.65 bc	26	1.35 hi	1.50 ef
11	1.57 cd	1.55 de	27	1.31 ij	1.45 fg
12	1.65 bc	1.70 b	28	1.35 hi	1.50 ef
13	1.20 kl	0.81 n	29	1.40 gh	1.45 fg
14	1.05 m	0.81 n	30	1.80 a	1.80 a
15	1.30 ij	1.45 fg	31	0.75 n	0.75 n
16	1.50 ef	1.60 cd	–	–	–

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار می‌باشد. اعداد که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌دار دارند.

Text numbers of table are mean of four repetition. Numbers with different characters have significant difference in Duncan's test (P<.0.5).



شکل ۱ – علائم قهوه‌ای شدن ساقه و درنهایت مرگ گیاه خربزه در اثر قارچ *M . phaseolina* (سمت چپ)، گیاه سالم (سمت راست) در آزمون اثبات بیماری‌زایی

Fig. 1 . Browning signs of stem and plant death by *M . phaseolina* (left), health plant (right) in pathogenicity test

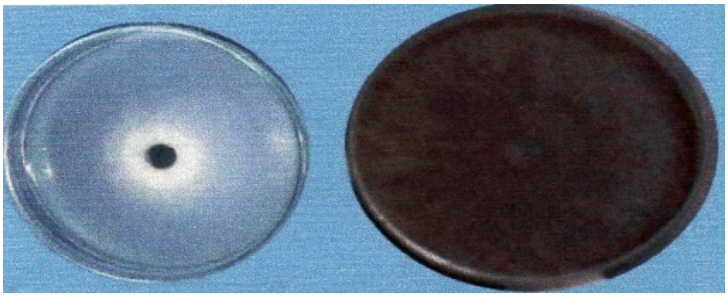
جدول ۲ – میانگین درصد کاهش رشد قارچ *M. phaseolina* توسط جدایه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens* در آزمایشگاه

Table 2 - Growth reduction mean of *M. phaseolina* by different isolates of *P.fluorescens* in laboratory

تولید سیدروفور Siderophore production	آزمایش تولید آنتی‌بیوتیک Culturefilterate test		آزمایش تولید مواد فرار Volatile test		آزمایش کشت متقابل Dual culture test		جدایه باکتری
	جدایه M2	جدایه M1	جدایه M2	جدایه M1	جدایه M2	جدایه M1	
+	52.79 efgh	40.16 hi	41.74 h	33.24 i	60.34 abcd	60.34 abcd	P1
+	48.48 fgh	49.07 fgh	21.39 j	15.50 k	55.90 abcd	53.59 bcd	P2
+	40.66 ghi	46.16 fgh	5.12 l	7.15 l	26.88 e	26.40 e	P3
+	76.27 abcd	65.41 cdef	48.35 efgh	41.36 h	62.89 abcd	52.61 bcd	P4
+	86.06 ab	73.00 bcde	54.68 def	47.26 fgh	59.81 abcd	52.16 bcd	P5
+	88.57 ab	87.78 ab	56.35 cde	63.04 bc	63.04 abcd	55.33 abcd	P6
+	56.92 defgh	76.80 abcd	59.72 bcd	52.23 defg	55.07 abcd	46.47 cd	P7
+	22.69 ij	34.48 hij	59.52 bcd	18.56 jk	65.89 ab	52.12 bcd	P8
+	85.99 ab	77.81 abcd	14.66 k	65.86 ab	64.61 abc	56.64 abcd	P9
+	84.99 abc	91.92 a	71.54 a	65.86 ab	72.20 a	66.52 ab	P10
+	19.28 j	19.01 j	58.69 bcd	53.31 def	22.76 e	17.96 e	P11
+	64.53 cdefg	52.04 fgh	44.53 gh	41.00 h	47.50 bcd	43.83 d	P12

اعداد متن جدول میانگین ۳ تکرار است. تیماری‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده است با آزمون دانکن ($p< ۰/۰۵$) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. M1 جدایه قارچ ۱، M2 جدایه قارچ ۲، P1 (*P. fluorescens biovI*)، P4 (*P.fluorescens biov V*)، P7,P6,P5,P2,P8,P9,P10,P11,P12 (*P. fluorescens* biov III)، P3 (*P. putida* biov B)

Text numbers of table are mean of three replications. Treatments with different characters have significant difference in Duncan's test (P< 0.5). M_1 (isolate Garmsar), M_2 (isolate Eivanckey).



شکل ۲ – تأثیر مواد فرار جدایه P_{10} باکتری سودوموناس فلورسنت در کاهش رشد جدایه گرمسار قارچ *M. phaseolina* (سمت چپ) درمقایسه با شاهد (سمت راست)

Fig. 2 . Volatile effect of P_{10} isolate of *P. fluorescens* in growth reduction of Garmsar isolate of *M. phaseolina* (left), Witness (right)

اثر آنتاگونیست‌ها در کنترل بیماری ساق سیاه خربزه در گلخانه

در هر دو تیمار خاک و بذر هنگامی که خاک گلدان‌ها با عامل بیماری و جدایه‌های سودوموناس تیمار شد، درصد گیاهان زنده بیشتر از تیماری بود که خاک فقط با قارچ عامل بیماری مخلوط شده بود و جدایه‌های P3 و P5, P6 (*P. fluorescens* biov III) (*P. putida* biov B) بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری داشتند (جدول ۳). اندازه‌گیری ارتفاع بوته نشان داد که تیمارهای مختلف باکتری روی جدایه‌های قارچ عامل بیماری تقریباً اثر مشابهی دارند و ارتفاع گیاهان شاهد بدون قارچ نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچ بیشتر بود. وزن خشک اندام هوایی در شاهد بدون قارچ در همه تیمارها نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچ بیشتر بود و جدایه P3 و P6, P10 , P11, P5, (*P. putida* boiv B) (*P. fluorescens* biov III) بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک اندام هوایی داشتند. همچنین اندازه‌گیری وزن خشک ریشه نیز نشان داد که جدایه‌های P10,P5,P6, (*P. fluorescens* biov III) بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک ریشه داشتند. وزن خشک ریشه در شاهد بدون قارچ در همه تیمارها بیشتر از گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچ بود. این نشان می‌دهد قارچ عامل بیماری باعث کوتاه شدن گیاهان و کاهش وزن آنها شد (۲٤). در آزمایشات گلخانه واکنش جدایه‌های M1 (جدایه گرمسار) و M2 (جدایه ایوانکی) تقریباً در همه تیمارها مشابه بوده و با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. این امر بیان‌گر این حقیقت است که باکتری‌های مختلف تأثیر یکسانی روی جدایه‌های قارچ دارند و اگر یک باکتری روی قارچ جدا شده در همان منطقه تأثیر داشته باشد می‌تواند روی جدایه‌های قارچ مناطق دیگر نیز اثر کند که این امر نیاز به تحقیقات بیشتر و به‌کارگیری چندین جدایه از مناطق مختلف دارد.

در آزمایشات گلخانه‌ای جدایه P10 (*P. fluorescens* biov III) جزو جدایه‌های مؤثر بود ولی نتایج توان آنتاگونیستی جدایه P3 (*P. putida* biov B) و P11 (*P.fluorescens* biovIII) در گلخانه با نتایج آزمایشگاه مطابقت نداشت و این دو نیز جزو جدایه‌های مؤثر بودند. دلیل این امر می‌تواند کلونیزاسیون خوب باکتری در ریزوسفر باشد (۲٤). تولید آنتی‌بیوتیک به فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی خاک بستگی دارد و علاوه بر آنتی‌بیوتیک، مکانیسم‌های دیگری مثل رقابت برای منابع کربن و ازت، مکان مناسب روی ریشه و کلونیزاسیون آن نیز اهمیت دارند. در هر دو آزمون میزان شدت بیماری در تیمار M1 (جدایه گرمسار) بیشتر از تیمار M2 (جدایه ایوانکی) بود که خود می‌تواند دلیل بر بیماری‌زایی بیشتر جدایه M1 (جدایه گرمسار) نسبت به M2 (جدایه ایوانکی) و یا کنترل بهتر جدایه M2 (جدایه ایوانکی) توسط باکتری‌های آنتاگونیست باشد. از طرفی این تفاوت میزان شدت بیماری، در همه تیمارها به‌خصوص تیمار شاهد بدون باکتری (P0) مشاهده شد و بنابراین فرضیه بیماری‌زایی بیشتر جدایه M1 (گرمسار) قابل قبول می‌باشد.

جدایه‌های (*P. fluorescens* biov III) P5,P6 و (*P. putida* biov B) P3 بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری داشتند. این جدایه‌ها کاهش معنی‌داری را در شدت بیماری و افزایش معنی‌داری را در شاخص‌های دیگر نشان دادند و جدایه (*P. fluorescens* biov III) P12 اثر ضعیفی نشان داد.

جدول ۳ – مقایسه میانگین اثر تیمارهای خاک و بذر با جدایه‌های باکتری آنتاگونیست بر روی ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و شدت بیماری *M. phaseolina*

Table 3 - Mean comparison of seed and soil treatments with antagonist bacteria isolates on plant height, root and shoot droughty weight and disease severity of *M. phaseolina*

آزمون تیمار بذر (Seed treatment test)				آزمون تیمار خاک (Soil treatment test)				
وزن خشک ریشه (gr) Root droughty weight	وزن خشک اندام هوایی(gr) Shoot droughty weight	ارتفاع گیاه (cm) Plant height	درجه‌بندی شدت آلودگی (۰-۳) Disease severity	وزن خشک ریشه (gr) Root droughty weight	وزن خشک اندام هوایی (gr) Shoot droughty weight	ارتفاع گیاه (cm) Plant height	درجه‌بندی شدت آلودگی (۰-۳) Disease severity	تیمار
1.50 abcde	5.46 abc	65.50 a	0 k	2.00 abcde	6.76 abc	64.90 b	0 k	$M_0 + P_0$
1.76 abc	5.96 a	65.50 a	0 k	2.34 abc	7.34 a	68.50 a	0 k	$M_0 + P_1$
1.65 abcde	5.50 abc	65.50 a	0 k	2.08 abcde	7.20 ab	68.50 a	0 k	$M_0 + P_2$
1.76 abc	6.30 a	68.00 a	0 k	2.34 abc	7.60 a	71.00 a	0 k	$M_0 + P_3$
1.65 abcde	5.90 ab	65.50 a	0 k	2.15 abcde	6.80 abc	68.50 a	0 k	$M_0 + P_4$
1.95 a	6.16 a	65.50 a	0 k	2.45 a	7.46 a	71.00 a	0 k	$M_0 + P_5$
1.95 ab	6.30 a	68.00 a	0 k	2.45 a	7.60 a	71.00 a	0 k	$M_0 + P_6$
1.50 abcde	5.50 abc	65.50 a	0 k	2.00 abcde	6.80 abc	68.45 a	0 k	$M_0 + P_7$
1.78 abcd	6.16 a	68.00 a	0 k	2.28 abcd	7.46 a	68.50 a	0 k	$M_0 + P_8$
1.78 abcd	5.90 ab	65.50 a	0 k	2.28 abcd	7.20 ab	68.50 a	0 k	$M_0 + P_9$
1.93 ab	6.16 a	65.50 a	0 k	2.43 ab	7.46 a	68.50 a	0 k	$M_0 + P_{10}$
1.76 abc	6.16 a	65.50 a	0 k	2.34 abc	7.46 a	68.50 a	0 k	$M_0 + P_{11}$
1.50 abcde	5.50 abc	61.90 a	0 k	2.15 abcde	6.80 abc	68.50 a	0 k	$M_0 + P_{12}$
0.78 e	3.24 d	56.00 de	2.62 a	0.98 e	4.44 d	56.00 g	2.82 a	M1 + P0
1.40 abcde	4.95 abcd	58.50 cd	1.62 f	1.60 abcde	5.95 abcd	61.50 cde	1.82 f	M1 + P1
1.06 abcde	4.41 abcd	56.80 cde	2.00 cde	1.16 cde	5.60 abcd	60.60 cde	2.32 bcd	M1 + P2
1.40 abcde	5.03 abcd	58.70 cd	0.80 hij	1.60 abcde	6.03 abcd	61.70 cde	1.00 hij	M1 + P3
1.20 abcde	4.35 abcd	57.60 cd	2.12 bcd	1.40 abcde	5.41 abcd	59.80 def	2.32 bcd	M1 + P4
1.50 abcde	5.34 abcd	58.40 cd	0.80 hij	1.70 abcde	6.34 abcd	62.85 bc	1.00 hij	M1 + P5
1.60 abcde	6.22 abcd	61.00 cde	0.80 hij	1.60 abcde	6.22 abcd	61.00 cde	1.00 hij	M1 + P6
0.96 cde	3.78 bcd	56.00 de	2.12 bcd	0.98 e	4.75 cd	59.00 ef	2.32 bcd	M1 + P7
1.25 abcde	5.03 abcd	58.00 cd	0.89 hi	1.45 abcde	5.80 abcd	61.40 cde	1.09 hij	M1 + P8
1.35 abcde	4.60 abcd	56.80 cde	2.12 bcd	1.55 abcde	5.45 abcd	59.80 def	2.20 cde	M1 + P9
1.19 bcd	5.10 abcd	59.20 bcd	1.12 gh	1.39 bcd	6.10 abcd	62.20 bcd	1.32 gh	M1 + P10
1.40 abcde	4.80 abcd	59.90 bc	1.12 gh	1.60 abcde	6.03 abcd	62.90 bc	1.32 gh	M1 + P11
0.78 e	3.55 cd	53.00 f	2.37 ab	1.46 abcde	4.98 bcd	59.00 ef	2.57 ab	M1 + P12
0.83 de	3.47 cd	57.60 cd	2.42 ab	1.03 de	4.47 cd	57.50 fg	2.62 ab	M2 + P0
1.50 abcde	4.84 abcd	59.20 bcd	1.25 g	1.75 abcde	5.84 abcd	62.20 bcd	1.45 g	M2 + P1
1.01 abcde	4.64 abcd	58.70 cd	1.70 ef	1.15 cde	5.84 abcd	60.60 cde	2.15 de	M2 + P2
1.55 abcde	5.22 abcd	59.50 bc	0.51 j	1.68 abcde	6.22 abcd	62.50 bcd	0.72 j	M2 + P3
1.37 abcde	4.70 abcd	57.60 cd	1.93 def	1.37 abcde	5.64 abcd	61.70 cde	2.13 def	M2 + P4
1.48 abcde	5.19 abcd	58.00 cd	0.53 j	1.68 abcde	6.19 abcd	62.00 cd	0.73 j	M2 + P5
1.50 abcde	5.38 abc	59.00 bcd	0.50 j	1.70 abcde	6.38 abc	62.00 cd	0.70 j	M2 + P6
0.95 cde	3.59 cd	57.00 cde	2.00 cde	1.05 de	4.98 bcd	60.00 cdef	2.20 cde	M2 + P7
1.37 abcde	5.22 abcd	59.00 bcd	0.75 ij	1.37 abcde	5.99 abcd	60.60 cde	0.95 ij	M2 + P8
1.41 abcde	4.84 abcd	58.00 cd	1.95 de	1.61 abcde	5.70 abcd	62.50 bcd	1.90 ef	M2 + P9
1.29 abcde	5.10 abcd	59.50 bc	0.75 ij	1.49 abcde	6.10 abcd	62.50 bcd	0.95 ij	M2 + P10
1.48 abcde	4.99 abcd	59.50 bc	0.75 ij	1.70 abcde	6.22 abcd	61.00 cde	0.95 ij	M2 + P11
0.84 de	3.78 bcd	54.50 ef	2.30 bc	1.41 abcde	4.79 cd	61.00 cde	2.50 bc	M2 + p12

اعداد متن جدول میانگین ٤ تکرار است. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده است، با آزمون دانکن ($p<$ ۰/۰۵) داری اختلاف معنی‌دار می‌باشد. M0 شاهد بدون قارچ M1 جدایه قارچ ۱، M2 جدایه قارچ ۲، P0 تیمار بدون باکتری (*P. fluorescens* biov I) P1 (*P. fluorescens* biov V) P4، P2,P5,P6,P7,P8,P9,P10,P11,P12 (*P. fluorescens* biov III) P3 (*P. putida* biov B)

Text numbers of table are mean of three repetition .treatments with different characters have significant difference in dunkan's test (P< 0.5). M0 (without fungus), M_1 (isolate Garmsar), M_2 (isolate Eivanckey), P0 (without bacteria).

جدایه‌های STL,A20,A22,A15 از باکتری *Streptomyces* sp. به‌طور مؤثری قارچ عامل بیماری پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی را در آزمایشگاه و گلخانه کنترل کرد (۱۰). همچنین جدایه‌های فوق روی قارچ *Phytophthora derchesleri* عامل بوته میری جالیز و *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه در مناطق ورامین و گرمسار در شرایط گلخانه و مزرعه مؤثر بوده است (۱ و ۱۵). درصورت آزمایشات بیشتر با کاربرد توام باکتری‌های Streptomyces، *P. fluorescens* و قارچ تریکودرما می‌توان بعضی از عوامل بیماری‌زا را روی خربزه کنترل نمود. باتوجه به اینکه کشت گیاهان جالیزی در گلخانه مرسوم شده است بنابراین این‌گونه آنتاگونیست‌ها می‌توانند در گلخانه کاربرد داشته باشند، ولی کاربرد آنها در مزرعه نیاز به تحقیقات بیشتر دارد و مستلزم تهیه فرمولاسیون مناسبی از این آنتاگونیست‌ها می‌باشد. هر عامل بیوکنترل که دارای ظرفیت کاهش بیماری می‌باشد برای حصول نتیجه ثابت بایستی با یک روش مناسب به‌کار گرفته شود (۱۳). بنابراین نکته بسیار بااهمیت در ارتباط با کاربرد این جدایه‌ها در شرایط طبیعی پیدا نمودن یک ماده همراه خوب و تهیه یک فرمولاسیون تجارتی مناسب از آنها می‌باشد.

References

1 . Ashrafizadeh A, Etebarian HR and Zamanizadeh H (2002) Investigation of *Trichoderma* and *Streptomyces isolates* for biological control of melon fusarium wilt.Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah. 174 p.

2 . Benizri E, Courtade A, and Guckett A (1995) Fate of two microorganism in maize simulated rhizosphere under hydroponic and steril conditions. Soil Biology and Biochemistry 27: 71-77.

3 . Bossis E, Lemanceau P, Latour X and Gardan L (2000) The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie 20: 50-63.

4 . Bourges HD (1998) Formulation of Microbial Biopesticide. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 512 p.

5 . Defago G and Hass D (l990) Pseudomonas as an antagonist of soilborn plant pathogens: Mode of action and genetic analysis. Soil Biochemistry 16: 397-403.

6 . Dianese JC, and Webster NW (1982) Isolation and characterization of inner and outer membranes of *X. campestris pv campestris*. Phytopathology 72: 1284-1289.

7 . Dufy BK and Defago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied Environmental Microbiolgy 65: 2429-2438.

8 . Ershad D and Shirzadi G (1971) Melon charcoal rot disease. Iranian Journal of Plant Pathology 5(1): 1-7.

9 . Etebarian HR (2002) Vegetable Diseases and Their Control. 2th Ed. University of Tehran Press. 554 p.

10 . Etebarian HR, Scott ES and Wicks TJ (2003) Evaluation of Streptomyces strains as potential biocontrol agents of *Phytophthora erythroseptica*. Iranian Journal of Plant Pathology 39: 49-63.

11 . Fahy PC and Persley GJ (1983) Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia. 351 p.

12 . Fidaman PJ and Rossau S (1993) The production of antifungal volatiles by Bacillus subtilis. Journal of Applied Bacteriology 74: 119-126.

13.Gilbert RG and Griebel GE (1969) The influence of volatile substance from alfalfa on *Verticillum dahliae* in soil. Phytopathology 59: 1400-1403.

14 . Gupta CP, Dubey RC, Kang SC and Maheshwari DK (2001) Antibiosis-mediated necrotrophic effect of *Pseudomonas* GRC2 against two fungal plant pathogens. Current Science (18): 91- 94.

15 . Haedari SH, Etebarian HR and Zamanizadeh H (2002) Investigation of Streptomyces isolates for biobgical control of melon damping off. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah. 181 p.

16 . Jana TK, Srivastva AK, Csery KD and Karora DK (2000) Agglutination potentional of *Pseudomonas flourescens* in relation to energy stress and colonization of *Macrophomina phaseolina*. Soil biology and Biochemistry 32: 511-519

17 . Keel CD, Weller M, Natsch A, Defago G, Cook RJ and Thomashow LS (l996) Conservation of the 2, 4 diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescens pseudomonas strains from diverse geographic locations. Applied Environmental Microbiology 62: 552-563.

18 . Ommati F, Sharifi A, Mohammadi M, Hajarood GH and Zad G (2002) Effect of *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates on *Phytophthora capsici*. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah. 175 p.

19 . Palleroni NJ (1984) Gram - negative aerobic rods and cocci: Family I Pseudomonadaceae. 141-168. In: Krieg NR and Holt JG (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. William and Wilkins, Baltimore.

20 . Samadi Yazdi B, Rezaei GH and Valizadeh M (1997) Statistical Metrhods in agriculture Researchs. University of Tehran Press. 746 p.

21 . Schaad NW, Jones IB, and Chun W (200l) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria 3th Ed. American Phytopathological Society. Minnesota. USA. 373 p.

22 . Srivastava AK,Tanuja S, Jana TK, Arora DK, and Singh T (2001) Induced resistance and control of charcoal rot in *Cicer arietinum* (chickpea) by *Pseudomonas flourescens*. Canadian Journal of Botany 79: 787-795.

23 . Vidhyasekaran P, Rabindran R, Muthamilan M, Nayar K, Rajappan K, Subramanian N and Vasumathi K (1997) Development of powder formulation of *Pseudomonas flourescens* for control of rice blast. Phytopathology 46: 29'7-297.

24 . Weller DM and Cook RJ (1993) Suppression of take-all of wheat by seed treatment with *Pseudomonas fluorescent*. Phytopathology 73: 463-469.

25 . Weller DM (l988) Biological control of soil borne plant pathogens in rhizosphere.Annual Review of Phytopathology 26: 379-407.

26 . Weinberg ED (1997) Mineral element control of microbial secondary metabolism, pp. 286-316. In: Weinberg, ED (Ed) Microorganisms and Mineral. Marcel Dekker Inc., New York.

27 . Xu GW and Gross DF (1986) Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppression of potato seed piece decay. Phytopathology 76: 414-422.

Study of possibility of biological control of charcoal rot on melon (*Macrophomina phaseolina*) by *Pseudomonas fluorescens* isolates

A. Kheiri [*], H. R. Etebarian [**], A. Roustae [***], Gh. Khodakaramian [****] and H. Aminian[***]

Abstract

To study of biological control of charcoal rot of melon caused by *Macrophomina phaseolina*, 187 isolates of fluorescens pseudomonas isolated of rhizosphere and soil of melon plants. Then 12 isolates belong to I, III and V biovars of *P. fluorescens* and B biovar of *P. putida* were selected for greenhouse experiments based on inhibition amount. Pseudomonas isolates inhibited mycelial growth significantly of *M. phaseolina* in Dual culture, volatile and culture filtrates test. Percentage of growth inhibition in Dual culture test was by 17.9 to 72.2% in Volatile test 7.1 to 71.5% and in culture filtrates 19 to 91.9% for fungus isolates. Mycelial growth of *M. phaseolina* decreased by all of the pseudomonas isolates according to siderophore production test. Greenhouse experiments were made by seedcoating and soil methods. The results of greenhouse experiments in soil and seed treatments showed that when soil of pots inoculated with pseudomonas, percentage of healthy plants were significantly greater than in those of pathogen control ($p< 0.05$). Isolates P6, P5 (*P. fluorescens* biov III) and P3 (*P. putiada* biov B) caused less incidence of disease.

Keywords: Dual culture, Greenhouse, Inhibition, Rhizosphere, Seedcoating, Soil, Volatile production

[*] - Former M.Sc. Student, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, Tehran University, Tehran - Iran

[**] - Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, Tehran University, Tehran - Iran

[***] - Associate Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, Tehran University, Tehran - Iran

[****] - Assistant professor, Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran - Iran