مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۲۹۲-۲۸۳)

کنترل بیولوژیکی عوامل مهم پوسیدگی ریشه باقلا توسط باکتری‌های آنتاگونیست فرا ریشه

سمانه گلپایگانی[1]*، دوستمراد ظفری[2] و غلام خداکرمیان[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۲ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۲/۴)

چکیده

در سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از مزارع باقلا در استان لرستان از گیاهان مشکوک به پوسیدگی ریشه و طوقه باقلا، نمونه‌برداری شد و در مجموع ۱۲۱ جدایه قارچ و کرومیستا جدا شد. در این بررسی مشخص شد که فراوانی قارچ *Fusarium solani* که موجب پوسیدگی ریشه باقلا می‌شود، از سایر جدایه‌ها بیشتر و خسارت ناشی از آن در مزارع استان زیاد است و بعد از آن بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به گونه‌های *F. oxysporum*، *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Pythium* sp. بود. در بین این عوامل *Macrophomina phaseolina* و *Pythium* به عنوان عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه باقلا برای اولین بار از ایران گزارش شدند. علاوه بر عوامل بیماری‌زای اشاره شده، ۵۷ استرین باکتریایی نیز از فرا ریشه گیاه باقلا در مزارع یاد شده، جدا شدند و برای اثبات خاصیت آنتی بیوزی آزمایش شدند و استرین‌های بازدارنده با تشکیل هاله بازدارندگی در حضور بیمارگرها، انتخاب شدند. استرین‌های غربال شده با کمک صفات بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شناسایی شدند. استرین‌های R10 و R14 به عنوان جنس *Rhizobium* و استرین‌های P42، P38، P34 و P8 به عنوان جنس *Pseudomonas* تشخیص داده شدند. این استرین‌ها به دو صورت خاک کاربردی و آغشته‌سازی بذور باقلا علیه عوامل بیماری‌زا به کار رفتند. نتایج نشان داد که در حالت اضافه کردن سوسپانسیون باکتری به خاک در حضور *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* وزن خشک گیاه به ترتیب ۱، ۰/۳۶ و ۰/۳۷ گرم بود. در حالت آغشته‌سازی بذور، گیاهانی که آلوده به *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* بودند به ترتیب وزن خشکی برابر با ۰/۴۱، ۰/۴۳ و ۰/۳۴ گرم داشتند، که این نتایج حاکی از آن است که فاکتورهای رشدی در گیاه در اثر بیوکنترل روی دو جدایه *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* در حالت آلوده‌سازی خاک افزایش یافت اما در مورد جدایه *Macrophomina phaseolina* این فاکتورها فقط در حالت آغشته‌سازی بذور بیشتر شده بود. در مجموع نتایج حاصل از این بررسی مشخص نمود که استرین‌های P42، P34، P38 و P8 باعث افزایش معنی دار وزن خشک گیاه می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*.

* نویسنده مسئول: سمانه گلپایگانی تلفن: ۰۹۱۲-۸۱۲۷۰۴۸ E-mail: sgolpayegani@gmail.com

مقدمه

باقلا یکی از حبوبات مهم زراعی است که در ایران در استان‌های شمالی، جنوب و جنوب غربی کشت می‌شود. منشا احتمالی باقلا توسط Bond (1985) جنوب غربی آسیا گزارش شده است. Mckenzie & Morrall (1975) قارچ‌های فوزاریوم و رایزوکتونیا را عوامل پوسیدگی ریشه باقلا معرفی نمودند، آنها اظهار داشتند که پوسیدگی فوزاریومی ریشه در تمام فصل زراعی در مزرعه وجود دارد اما پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه در انتهای فصل بیشتر است. Azimi *et al.* (2004) مطالعاتی روی فوزاریوم‌های ریشه باقلا انجام دادند که در بین عوامل جدا شده، گونه‌های *F. solani*، *F. moniliform* و *F. oxysporum* بیشترین و گونه‌های *F. proliferatum*، *F. semitectum* و *F. equiseti* کمترین تعداد را داشتند. Ahmadzade (2003) استرین‌هایی از جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* را علیه بیمارگر *Pythium ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه لوبیا مؤثر دانست. Akbari *et al.* (2006) قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* را از ریشه‌ی لوبیا جدا کرده و اثرعوامل بیوکنترل به نام‌های *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* را روی آن مورد بررسی قرار دادند. Afsharmanesh *et al.* (2006) نشان دادند با استفاده از جدایه‌هایی از *Pseudomonas fluorescens* می‌توان بیماری ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* را که عامل مرگ گیاهچه لوبیاست کنترل کرد. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی قارچ‌های مهم عامل پوسیدگی ریشه باقلا و کنترل بیولوژیکی آنها توسط باکتری‌های آنتاگونیست در استان لرستان بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی

جهت جداسازی قارچ‌های بیمارگر، در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ به طور تصادفی از طوقه و ریشه گیاهان مشکوک به آلودگی و خاک مزارع باقلا در استان لرستان نمونه‌برداری انجام گرفت. بر اساس روش Sneh *et al.* (1991) نمونه‌های گیاهی شسته شده و سپس ضد عفونی سطحی انجام شد. قطعات بعد از خشک شدن، روی محیط‌های کشت PDA و CMA کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت جداسازی ریزوباکترهای ریشه باقلا (هدف اصلی جداسازی رایزوبیوم و سودوموناس بود)، خاک هر منطقه مخلوط شد و یک گرم از خاک در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و غلظت‌های مختلف به طور سریال تهیه گردید وبه روش مخطط کردن روی محیط آگار غذایی NA (Nutrient Agar) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تک پرگنه‌های رشد یافته، بر اساس تفاوت در رنگ، شکل، اندازه و حاشیه پرگنه انتخاب و روی محیط PDA به روش مخطط کردن خالص سازی شدند.

آزمون بیماری‌زایی

تعداد سی و سه جدایه قارچ فوزاریوم، سه جدایه قارچ رایزوکتونیا، دو جدایه قارچ ماکروفومینا و دو جدایه پی‌تیوم، بعد از شناسایی برای بررسی میزان بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه مایه تلقیح قارچ‌های فوزاریوم و رایزوکتونیا از دانه‌های گندم به روش Abawi (1989)، برای ماکروفومینا از دانه‌های برنج به روش Gomez & Gomez (1984) و برای پی‌تیوم نیز از میسلیوم های رشد کرده بیمارگر استفاده شد. در ارلن‌های یک لیتری مقدار ۱۰۰ گرم گندم (خیساندن گندم به مدت ۴۸ ساعت در آب) و در ارلن‌های یک لیتری دیگر نیز مقدار ۱۰۰ گرم برنج ریخته شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت نیم ساعت در دو روز متوالی سترون شدند. در روز دوم، به هر ارلن سه حلقه به قطر یک سانتی‌مترمربع از کشت تازه قارچ‌های مورد نظر اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پوشیده شدن کامل دانه‌های گندم و برنج به وسیله قارچ‌ها، هر جدایه قارچی از ارلن خارج و در دمای محیط به مدت ۷۲ ساعت خشک شده و به خاک سترون گلدان‌ها اضافه شدند. خاک سترون به صورت مخلوطی از خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی به نسبت ۲: ۱: ۱ به کار رفت و

تعداد ۳ تا ۵ بذر باقلا در هر گلدان کاشته شد. در مورد تیمار شاهد از گندم و برنج سترون تلقیح نشده استفاده شد. گلدان‌ها در یک هفته ابتدای تلقیح هر روز و سپس هر هفت روز یک بار آبیاری شدند. بعد از ظهور علائم از بوته‌های بیمار نمونه‌برداری شد و روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و پس از رشد قارچ خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری وزن خشک کل گیاه پس از ظهور علائم و برداشت گیاهان آلوده و شاهد، ۲۴ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس وزن شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل شش تیمار و سه تکرار انجام شد، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام گرفت، در آزمونی که در سطح یک درصد اختلاف معنی دار وجود نداشت، میانگین‌ها در سطح پنج درصد مقایسه شدند. شاخص شدت بیماری براساس جدول ۱ محاسبه شد.

برای محاسبه درصد وقوع بیماری از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{درصد وقوع بیماری} = \frac{\text{تعداد گیاهان آلوده در هر تیمار}}{\text{تعداد کل گیاهان در هر تیمار}} \times ۱۰۰$$

جدول ۱- شاخص اندازه‌گیری شدت بیماری گیاهان باقلای آلوده به قارچ‌های *Fusarium* sp، *R. solani* و *M. phaseolina*

شاخص شدت بیماری برای *Fusarium* sp. (دمینک و همکاران، ۱۹۸۹)	شاخص شدت بیماری برای *R. solani* (مویلو و همکاران، ۱۹۹۳)	شاخص شدت بیماری برای *M. phaseolina* (پرات و همکاران، ۱۹۹۸)	
بدون نشانه	۰ ریشه بدون زخم با طول نرمال	۱ بی رنگی ریشه از ۰ تا ۲ میلی‌متر	۰
بدون نشانه خارجی، قهوه‌ای شدن خفیف آوندها	۱ بی رنگی بافت ریشه بدون ایجاد زخم	۲ بی رنگی ریشه از ۲ تا ۵ میلی‌متر	۱
بدون نشانه خارجی، قهوه‌ای شدن متوسط آوندها	۲ بروز زخم در ریشه با طول نرمال	۳ تغییر رنگ ریشه به تیرگی از ۵ تا ۱۰ میلی‌متر	۲
برگهای رنگ پریده، قهوه‌ای شدن شدید آوندها	۳ نکروز تقریبی ریشه و کاهش طول آن	۴ سیاهی ریشه از ۱۰ تا ۱۵ میلی‌متر	۳
پژمردگی شدید	۴ پوسیدگی کامل ریشه و مرگ گیاه	۵ سیاهی کامل ریشه و مرگ گیاه	۴

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست و بررسی تولید ترکیبات آنتاگونیستی توسط آنها

آزمون‌های فوق حساسیت در شمعدانی به روش Mckhann & Hirsch (1995) و Klement *et al.* (1964)، رشد هوازی و غیرهوازی، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، استفاده از لاکتوز، نشاسته، مانیتول و آرژینین به روش Schaad *et al.* (2001)، حساسیت به آنتی بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، استرپتومایسین و داکسی سایکلین به روش Josey *et al.* (1979)، رشد در محیط حاوی نمک طعام ۰/۵٪، ۳٪ و ۷٪ مطابق روش Priefer *et al.* (2001) و رشد در pH ۴ و ۸/۵ بر اساس روش Amargar *et al.* (1997) برای شناسایی باکتری‌ها انجام شد. آزمون‌هایی برای اثبات خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها انجام شد که می‌توان به آزمون‌های تولید پروتئاز به روش Maurhofer *et al.* (1992)، سلولاز، سیانید هیدروژن، سیدروفور با غلظت‌های ۲۵، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول و ترکیبات فرار ضد قارچی به روش Fiddaman & Rossall (1993) اشاره کرد.

آزمون کشت متقابل باکتری‌های آنتاگونیست با عوامل قارچی مهم پوسیدگی ریشه باقلا

جهت بررسی توان آنتاگونیستی استرین‌های باکتریایی و غربال آنها برای بررسی‌های بعدی، بر اساس روش Hagedron *et al.* (1989) از کشت جوان ۴۴ استرین باکتریایی به صورت کشت سه نقطه‌ای از کلونی ۲۴ ساعته هر باکتری در فاصله ۰/۵ سانتی‌متری لبه پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت PDA تلقیح شد و به طور همزمان یک حلقه ۵ میلی‌متری از کشت ۵ روزه بیمارگر نیز در وسط پتری‌دیش تلقیح شد، در پتری‌دیش‌های شاهد نیز به جای باکتری، آب مقطر سترون تلقیح شد. این آزمایش در قالب طرح کامل

تصادفی شامل نه تیمار و سه تکرار انجام شد. کشت‌ها به مدت ده روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان بازدارندگی استرین‌ها از رشد پرگنه بیمارگر، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در هر تیمار} - \text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در پتری‌دیش شاهد}}{\text{میزان رشد پرگنه بیمارگر در پتری‌دیش شاهد}} \times ۱۰۰$$

بررسی‌های بیوکنترلی باکتری‌های آنتاگونیست روی بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زا در گلخانه

جهت آلوده‌سازی خاک گلدان‌ها به قارچ‌ها، مایه تلقیح آنها تهیه گردید. مایه تلقیح استرین‌های باکتریایی در ارلن‌های دو لیتری و برای هر گلدان ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد و OD (Optical Density) این حجم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر به اندازه ۰/۲ تنظیم شده و به گلدان‌ها اضافه شد.

برای آغشته کردن بذور به باکتری، بذور سالم باقلا بعد از ضدعفونی سطحی به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیونی که به روش بالا تهیه شد غوطه‌ور نگه داشته شدند و سپس کاشته شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل شش تیمار و سه تکرار انجام شد.

نتایج

در این تحقیق در مجموع ۱۲۱ جدایه قارچ از ریشه و طوقه گیاهان آلوده جدا گردید. در بین جدایه‌های بدست آمده ۱۱۱ جدایه *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* بود که با استفاده از کلید Nelson (1983) شناسایی شدند. هر دو گونه مونوفیالید بوده دارای ماکرو و میکروکنیدی و کلامیدوسپورهای منفرد یا دوتایی بودند با این تفاوت که فیالید در *F. solani* طویل‌تر اما ماکرو و میکروکنیدی‌های آن کوتاهتر بودند و کلونی *F. solani* کرم اما کلونی *F. oxysporum* صورتی مایل به بنفش بود. سه جدایه *R. solani* که با کلید Sneh *et al.* (1991) شناسایی شدند دارای پرگنه کرم مایل به خرمایی، هیف‌ها با دیواره عرضی و انشعابات آنها با زاویه قائم در محل انشعاب دیده شدند، دو جدایه *Macrophomina phaseolina* که با استفاده از روش Wyllie *et al.* (1989) شناسایی شدند پرگنه خاکستری مایل به سیاه داشتند، پیکنید کروی و تیره رنگ این قارچ حاوی کنیدی‌های تک سلولی بود، دو جدایه *Pythium* که بر اساس کلید Dick (1990) شناسایی شدند کلونی سفید و شبیه به گل رز و اسپورانژیوم کروی تولید نمودند، آنتریدیوم و اگونیوم در این بیمارگر تولید نشد. یک جدایه از هر یک از قارچ‌های ساپروفیت *Cladosporium* و *Curvularia* و یک جدایه آنتاگونیست از جنس *Colonostachys* نیز در میان جدایه‌ها یافت شد.

آزمون بیماری‌زایی

در تمامی گلدان‌های تیمار شده با جدایه‌های *Fusarium solani* (FS)، *Fusarium oxysporum* (FO)، *Rhizoctonia solani* (RS)، *Macrophomina phaseolina* (MP) و *Pythium*(P) درجاتی از آلودگی دیده شد، در هیچ‌یک از گلدان‌های شاهد علائم بیماری دیده نشد تمامی تیمارها از لحاظ درصد وقوع بیماری نسبت به شاهد در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. در نهایت تیمارهای FS3، MP1 و RS1 با درصد وقوع بیماری بیشتر و وزن خشک کمتر روی گیاهان باقلا مورد بررسی، برای مطالعات بعدی انتخاب شدند (جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۲- تأثیر جدایه‌های قارچی مورد نظر در انجام آزمون بیماری زایی، بر روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا

تیمارها	درصد وقوع بیماری	تیمارها	درصد وقوع بیماری	تیمارها	درصد وقوع بیماری	تیمارها	درصد وقوع بیماری	تیمارها	درصد وقوع بیماری
شاهد	۰ b	شاهد	۰ b	شاهد	۰ b	شاهد	۰ b	شاهد	۰ b
FO2	۶۶/۶۶ a	FS5	۶۶/۶۶ a	MP2	۱۰۰ a	RS2	۶۶/۶۶ a	P3	۱۰۰ a
FO7	۶۶/۶۶ a	FS1	۶۶/۶۶ a	MP1	۱۰۰ a	RS3	۱۰۰ a	P2	۱۰۰ a
FO3	۶۶/۶۶ a	FS2	۶۶/۶۶ a			RS1	۱۰۰ a	P1	۱۰۰ a
FO4	۱۰۰ a	FS4	۱۰۰ a						
FO5	۱۰۰ a	FS3	۱۰۰ a						

اعداد جدول میانگین سه تکرار می‌باشند.

میانگین‌هایی که دارای حروف غیر مشابه هستند از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد برخوردارند.

جدول ۳- تأثیر جدایه‌های قارچی مورد نظر در انجام آزمون بیماری زایی، بر روی وزن خشک گیاه باقلا

تیمارها	وزن خشک (گرم)	تیمارها	وزن خشک (گرم)	تیمارها	وزن خشک (گرم)	تیمارها	وزن خشک (گرم)	تیمارها	وزن خشک (گرم)
شاهد	۱/۵ a	شاهد	۱/۳ a	شاهد	۱/۵ a	شاهد	۱/۷ a	شاهد	۲/۲ a
FO3	۱/۰۳ab	FS2	۰/۹۳ a	MP2	۰/۳۶ b	RS2	۰/۸۶ab	P2	۰/۷۳ b
FO7	۱ab	FS1	۰/۹ ab	MP1	۰/۳ b	RS3	۰/۳۶ b	P3	۰/۴۱c
FO2	۰/۹ ab	FS5	۰/۸۳ab			RS1	۰/۲۶ b	P1	۰/۳۵ c
FO4	۰/۴۶ b	FS4	۰/۴ b						
FO5	۰/۳ b	FS3	۰/۳ b						

اعداد جدول میانگین سه تکرار می‌باشند.

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف غیر مشابه هستند از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد برخوردارند.

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست و بررسی تولید ترکیبات آنتاگونیستی توسط آنها

بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، مشخصات استرین‌های R14 و R10 با جنس*Rhizobium* و استرین‌های P34، P38، P18، P24، P9، P37، P42 و P8 با جنس *Pseudomonas* مطابقت داشت (جدول ۴).

استرین‌های P42، P38 و P34 پس از ۴۸ ساعت با توجه به تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه باکتری، پروتئاز مثبت بودند. در آزمون تولید سلولاز و سیانید هیدروژن هیچ‌یک از استرین‌ها قادر به تولید این مواد نبودند. متابولیت‌های فرار استرین‌های P42، P38، P34، P8 و R14 نسبت به شاهد بر روی رشد میسلیومی قارچ *F. solani*، متابولیت‌های فرار استرین P34 نسبت به شاهد بر روی رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* و متابولیت‌های فرار استرین‌های P42، P34، R14 و R10 نسبت به شاهد بر روی رشد میسلیومی قارچ *R. solani* تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد بیمارگر شدند. در این میان به طور میانگین استرین‌های P42 و P34 به ترتیب با ۱۸/۵۲ و ۱۳/۳۳ درصد دارای بیشترین بازدارندگی بودند. استرین‌های P38 و P34 در غلظت‌های ۲۵، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن ۳ روی محیط کشت کینگ-ب توانستند از رشد قارچ‌های بررسی شده جلوگیری کنند ولی در سایر استرین‌ها این حالت مشاهده نشد. در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول همه قارچ‌های مورد نظر توانستند بر روی محیط کینگ-ب رشد کنند.

آزمون کشت متقابل و انتخاب استرین‌های آنتاگونیست

بر اساس آزمون کشت متقابل و مشاهده هاله بازدارندگی، همه تیمارهای باکتریایی در برابر قارچ FS اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد با شاهد نشان دادند اما در مورد قارچ MP تیمار P9 با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت و در مورد قارچ RS تیمارهای P18، P9، P24 و P37 با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند، این نتایج نشان می‌دهد که استرین‌های باکتریایی مورد آزمایش توان کمتری در کاهش اثر قارچ *R. solani* داشتند ولی قارچ *M. phaseolina* را راحت‌تر کنترل کرده‌اند. با بررسی‌هایی که انجام شد، استرین‌های P42 و P38 با بازدارندگی شدید، استرین‌های P34 وP8 با بازدارندگی متوسط و با توجه به اینکه استرین‌های R14 و R10 در آزمایشگاه بازدارندگی نشان ندادند برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند (جدول ۵).

بررسی‌های گلخانه‌ای

استرین‌های P34 و P38 در حالت آلوده‌سازی خاک در تیمارهای *F. solani*، شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۰ (گیاه بیمار نشد) و ۱/۳۳، در تیمارهای *M. phaseolina*، استرین‌های P34 و P8 شدت بیماری را تا سطح صفر (گیاه بیمار نشد) و استرین‌های P34 و P8 در تیمارهای *R. solani* شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۱/۳۳ و ۲/۳۳ کاهش دادند ولی استرین‌های دیگر در کاهش شدت بیماری تأثیر کمتری داشتند. در بررسی روش آغشته‌سازی بذور در تیمارهای *F. solani*، استرین‌های P42 و P38 شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۰/۳۳ و ۰/۶۶، در تیمارهای *M. phaseolina*، استرین‌های P42 و P38 شدت بیماری را تا سطح صفر (گیاه بیمار نشد) و استرین‌های P42 و P8 در تیمارهای *R. solani* شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۱/۳۳ و ۳/۳۳ کاهش دادند ولی استرین‌های دیگر در کاهش شدت بیماری تأثیر کمتری داشتند.

جدول ۴- ویژگی‌های فیزیولویکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری‌های *Rhizobium*و *Pseudomonas* جدا شده از فراریشه باقلا

ویژگی‌های بررسی شده	*Pseudomonas*				*Rhizobium*	
	P34	P38	P42	P8	R14	R10
فوق حساسیت	–	–	–	–	–	–
واکنش گرم	–	–	–	–	–	–
رشد هوازی	+	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی	–	–	–	–	+	+
اکسیداز	+	+	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+	+	+
تولید رنگیزه فلورسنت	+	+	+	+	–	–
تولید لوان	+	–	–	–	+	+
رشد در:						
دمای ۴۰ درجه	–	–	–	–	+	+
دمای ۵۰ درجه	–	–	–	–	–	–
تولید اسید از:						
لاکتوز	+	±	–	–	±	+
نشاسته	–	–	–	–	+	±
مانیتول	±	±	±	±	+	+
استفاده از:						
آرژنین	+	+	+	+	±	+
گلیسیرین	±	±	±	±	+	+
رشد در محیط حاوی نمک طعام						
نیم درصد	+	+	+	+	+	+
سه درصد	+	+	+	+	+	+
هفت درصد	–	–	–	–	–	–
رشد در pH = ۴	–	–	–	–	–	–
رشد در pH = ۸/۵	–	–	–	–	–	–
حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها						
نالیدیکسیک اسید (40mg/Lit)	–	–	–	–	–	–
استرپتومایسین (3mg/Lit)	–	–	+	±	+	+
داکسی‌سایکلین (5mg/Lit)	±	–	+	–	+	+

–، حداقل ۹۵ درصد از استرین‌ها رشد نکردند.
+، حداقل ۹۵ درصد از استرین‌ها رشد کردند.
±، حداکثر ۵۰ درصد از استرین‌ها رشد کردند.

جدول ۵- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی و درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد بررسی در آزمون کشت متقابل

استرین های باکتریایی	میانگین قطر پرگنه قارچ FS	میانگین قطر پرگنه قارچ MP	میانگین قطر پرگنه قارچ RS	استرین های باکتریایی	درصد بازدارندگی از رشد قارچ FS	درصد بازدارندگی از رشد قارچ MP	درصد بازدارندگی از رشد قارچ RS
شاهد	۹۰a	۹۰a	۹۰a	شاهد	۰b	۰b	۰b
P18	۸۱/۵b	۶۸/۶ef	۹۰a	P18	۹/۴۴a	۲۳/۷a	۰b
P9	۷۷c	۹۰a	۹۰a	P9	۱۴/۴۴a	۰b	۰b
P24	۷۷c	۷۵d	۹۰a	P24	۱۴/۴۴a	۱۶/۶۶a	۰b
P37	۷۵d	۷۴/۳d	۹۰a	P37	۱۷/۷۷a	۱۷/۷۷a	۰b
P34	۶۷/۶f	۶۷/۳f	۶۸/۵ef	P34	۲۴/۸۱a	۲۵/۱۸a	۲۳/۸۶a
P8	۶۷/۶f	۶۹/۳e	۶۹/۳e	P8	۲۴/۸۱a	۲۲/۷۶a	۲۳/۳۳a
P38	۶۲/۳h	۶۸/۶ef	۶۸/۳ef	P38	۳۰/۷۴a	۲۳/۷a	۲۴/۰۷a
P42	۴۳/۳i	۳۸/۷j	۶۴/۳g	P42	۵۱/۸۵a	۵۷/۰۴a	۲۸/۵۱a

اعداد جدول میانگین سه تکرار می‌باشند.
میانگین‌هایی که دارای حروف غیر مشابه هستند از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد برخوردارند.

در بررسی تأثیر استرین‌های باکتریایی در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری به خاک روی شدت بیماری در تیمارهای *F. solani*، میزان کاهش شدت بیماری ۱/۷۶ بود که در مقایسه با روش آغشته‌سازی بذور که ۱/۹۴ بود، اثر بهتری نشان داد. در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی شدت بیماری در تیمارهای *M. phaseolina*، میزان کاهش شدت بیماری ۲/۵۲ بود که در مقایسه با روش آغشته‌سازی بذور که ۱/۳۹ بود، اثر کمتری نشان داد و تأثیر استرین‌های باکتریایی در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی شدت بیماری در تیمارهای *R. solani*، میزان کاهش شدت بیماری ۳/۱۱ بود که در مقایسه با روش آغشته‌سازی بذور که ۳/۴۴ بود، اثر بهتری نشان داد (جدول ۶).

جدول ۶- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی شدت بیماری گیاه باقلا در تیمار با *F. solani*، *M. phaseolina* و *R. solani*

تیمارها	اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک	آغشته‌سازی بذور
FS	۱/۷۶ ab	۱/۹۴ ab
MP	۲/۵۲ab	۱/۳۹b
RS	۳/۱۱a	۳/۴۴ a

اعداد جدول میانگین شش تکرار است.

میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد برخوردارند.

در بررسی تأثیر استرین‌ها در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری به خاک آلوده به قارچ بیمارگر بر روی درصد وقوع بیماری، استرین‌های P8، P38 و P34 به ترتیب با ۶۶/۶۶، ۳۳/۳۳ و ۳۳/۳۳ درصد وقوع بیماری، توانستند نسبت به شاهد آلوده در برابر *F. solani*، درصد وقوع بیماری را به ترتیب تا ۳۳/۳۴، ۶۶/۶۷ و ۶۶/۶۷ درصد پایین بیاورند. استرین‌های P34،R10 و P8 به ترتیب با ۶۶/۶۶، صفر و صفر درصد وقوع بیماری، توانستند نسبت به شاهد آلوده در برابر *M. phaseolina*، درصد وقوع بیماری را به ترتیب تا ۳۳/۳۴، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد پایین بیاورند و استرین P38 با ۶۶/۶۶ درصد وقوع بیماری، توانست نسبت به شاهد آلوده در برابر *R. solani*، درصد وقوع بیماری را تا ۳۳/۳۴ درصد پایین بیاورد. ولی استرین‌های دیگر در بالا بردن درصد گیاهان سالم ناتوان بوده و درصد گیاهان سالم در این تیمارها، همچون شاهد مثبت آلوده به بیمارگر صفر بود. در بررسی روش آغشته‌سازی بذور به باکتری، بر روی درصد وقوع بیماری، استرین‌های P38 و P42 به ترتیب با ۶۶/۶۶، ۳۳/۳۳ درصد وقوع بیماری، توانستند نسبت به شاهد آلوده در برابر *F. solani*، درصد وقوع بیماری را به ترتیب تا ۳۳/۳۴ و ۶۶/۶۷ درصد پایین بیاورند. استرین‌های P34 و P8 به ترتیب با ۶۶/۶۶، ۳۳/۳۳ درصد وقوع بیماری، توانستند نسبت به شاهد آلوده در برابر *M. phaseolina*، درصد وقوع بیماری را به ترتیب تا ۳۳/۳۴ و ۶۶/۶۷ درصد پایین بیاورند. در مورد تیمارهای *R. solani* هیچ یک از استرین‌ها قادر به کاهش درصد وقوع بیماری نبودند.

در بررسی تأثیر استرین‌های باکتریایی در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری به خاک روی درصد وقوع بیماری در تیمارهای *F. solani*، میزان کاهش درصد وقوع بیماری ۲۷/۷۸ درصد بود که در مقایسه با روش آغشته‌سازی بذور که ۱۶/۶۷ درصد بود، اثر کمتری نشان داد. در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری به خاک روی درصد وقوع بیماری در تیمارهای *M. phaseolina*، میزان کاهش درصد وقوع بیماری ۳۸/۸۹ درصد بود که در مقایسه با روش آغشته‌سازی بذور که ۵۰/۰۱ درصد بود، اثر کمتری نشان داد. در حالت اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری به خاک روی درصد وقوع بیماری در تیمارهای *R. solani* میزان کاهش درصد وقوع بیماری ۵/۵۶ درصد بود که در مقایسه با روش آغشته‌سازی بذور که صفر درصد بود، اثر بهتری نشان داد (جدول ۷).

جدول ۷- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا در تیمار با *F. solani*، *M. phaseolina* و *R. solani*

تیمارها	اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک	آغشته‌سازی بذور
FS	۷۲/۲۲ab	۸۳/۳۳ ab
MP	۶۱/۱۱ ab	۴۹/۹۹ b
RS	۹۴/۴۴ a	۱۰۰ a

اعداد جدول میانگین شش تکرار است.

میانگین‌هایی که دارای حروف غیر مشابه هستند از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد برخوردارند.

در این تحقیق، در مطالعه تأثیر استرین‌های آنتاگونیست روی فاکتورهای رشدی، نتایج نشان داده است که در شرایط آلوده‌سازی خاک با سوسپانسیون باکتری در تیمار با قارچ *F. solani* استرین‌های P42، P38، P34، P8، در تیمار با قارچ *M. phaseolina* استرین‌های P34 و P8 و در تیمار با قارچ *R. solani* استرین‌های P34، P8 و R14 قادر به افزایش وزن خشک باقلا بودند. در شرایط آغشته‌سازی بذور برای قارچ *F. solani* استرین‌های P42، P38، P8 و R14، برای قارچ *M. phaseolina* استرین‌های P42، P38، P34، P8 و R14 و نهایتاً برای قارچ *R.solani* استرین‌های R14 و R10 قادر به افزایش وزن تر وخشک باقلا بودند .در مورد قارچ‌های فوزاریوم و رایزوکتونیا آلوده‌سازی خاک با سوسپانسیون باکتری موجب افزایش وزن خشک گیاه شده و این در حالی است که در رابطه با ماکروفومینا کاملاً بر عکس بود یعنی وزن خشک گیاه در حالت آغشته‌سازی بذور به باکتری بیشتر بود (جدول ۸).

جدول ۸- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی وزن خشک گیاه باقلا در مرحله گلدهی در تیمار با *F. solani*، *M. phaseolina* و *R. solani*

تیمارها	اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک	آغشته‌سازی بذور
FS	۱a	۰/۴۱ab
MP	۰/۳۶b	۰/۴۳ab
RS	۰/۳۷ab	۰/۳۴b

اعداد جدول میانگین شش تکرار است.
میانگین‌هایی که دارای حروف غیر مشابه هستند از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد برخوردارند.

در ادامه فاکتورهای رشدی دیگری مانند طول ساقه و ریشه، درصد جوانه زنی بذور و تعداد گره‌های ریشه نیز اندازه‌گیری شد که نتایج حاصل از آنها نیز مؤید مطالب فوق می‌باشد.

بحث

Weller (1988) اظهار داشت با توجه به این که تولید مواد بازدارنده در استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاهی به فاکتورهایی از قبیل نوع قند و اسید آمینه موجود در محیط غذایی و نیز به عمق آگار، مقدار مایه تلقیح، حرارت و غیره بستگی دارد، از این جهت ممکن است یک استرین که در شرایط طبیعی یک یا چند نوع از مواد بازدارنده را به فراوانی تولید می‌کند، در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید آن نباشد. حتی ممکن است که ماده بازدارنده تولید شود اما با توجه به شرایط کشت، نشت ماده بازدارنده تولید شده در آگار محسوس نباشد. با توجه به مطالب فوق استرین R10 در آزمون‌های آزمایشگاهی به عنوان یک استرین غیر بازدارنده انتخاب شد اما در بررسی‌های گلخانه‌ای، موجب کاهش درصد وقوع بیماری در حضور *M. phaseolina*، افزایش وزن خشک و افزایش درصد جوانه زنی بذور در حضور *R. solani* شد. استرین R14 نیز در آزمون‌های آزمایشگاهی به عنوان یک استرین غیربازدارنده انتخاب شد اما در بررسی‌های گلخانه‌ای، موجب افزایش وزن خشک گیاه در حضور *R. solani*، افزایش طول ساقه و ریشه و تعداد گره‌ها در حضور *F. solani* و *R. solani* و افزایش درصد جوانه‌زنی بذور شد.

برای انتخاب استرین‌های آنتاگونیست باید به سراغ استرین‌هایی رفت که قادر به حضور و فعالیت در محیط ریزوسفر گیاه باشند. این مسئله از آن جهت حائز اهمیت است که خاک مانند یک بافر بیولوژیکی علیه باکتری‌های غیر بومی عمل می‌کند و لذا هر نوع دست کاری در محیط اطراف ریشه ممکن است موقتی باشد. از این رو چه بسا یک استرین آنتاگونیست از نظر مکانیسم‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی در کنترل قارچ بیمارگر مورد بررسی قرار می‌گیرد، بسیار قدرتمند ظاهر شود، اما قادر به استقرار در ریزوسفر گیاه نباشد (Weller, 1988). در این تحقیق نیز استرین P42 در آزمون‌های آزمایشگاهی به عنوان یک بازدارنده قوی انتخاب شد، اما در بررسی‌های گلخانه‌ای چنانچه در بالا ذکر شد قادر به استقرا کامل در ریزوسفر نبوده و نتایج آزمایشگاهی را به طور صددرصد تأئید نکرده و در همه موارد قوی‌ترین استرین نبود.

بررسی‌های به عمل آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که در حالت آلوده‌سازی خاک در تیمارهای

فوزاریوم، استرین P34، در تیمارهای ماکروفومینا، استرین‌های P34 و P8 و در تیمارهای رایزوکتونیا استرین P34 کاهش بیشتری در شدت بیماری نشان دادند. در مورد اثر استرین‌های باکتریایی بر شدت بیماری، استرین P34 به طور متوسط با کاهش شدت بیماری تا سطح ۰/۴۴ بهترین استرین بود.

در بررسی روش آغشته‌سازی بذور در تیمارهای فوزاریوم، استرین P42، در تیمارهای ماکروفومینا، استرین‌های P42 و P38 و در تیمارهای رایزوکتونیا، استرین P42 کاهش بیشتری در شدت بیماری نشان دادند. استرین P42 به طور متوسط با کاهش شدت بیماری تا سطح ۰/۵۵ بهترین استرین بود.

در بررسی اثر استرین‌ها روی درصد وقوع بیماری در حالت آلوده‌سازی خاک استرین P34 با ۱۶/۶۷ درصد وقوع بیماری، بهترین استرین و در بررسی اثر استرین‌ها روی درصد وقوع بیماری در حالت آغشته‌سازی بذور استرین P42 با ۳۳/۳۳ درصد وقوع بیماری، بهترین استرین بودند.

در این تحقیق با توجه به این که استرین‌های باکتریایی به دو صورت سوسپانسیون خاک و آغشته‌سازی بذور در برابر قارچ‌های بیمارگر به کار برده شدند به طور کلی اثر استرین‌ها در حالت اضافه کردن سوسپانسیون باکتری به خاک بهتر بود اگرچه در مورد قارچ ماکروفومینا حالت عکس داشت که این خود می‌تواند زمینه‌ای برای انجام تحقیقات آتی باشد. Dhingra *et al.* (2006) در برزیل با تیمار خاک با *P. fluorescens* برای کاهش *F. oxysporum* ثابت کردند که این باکتری‌ها باعث کاهش بیمارگر مورد نظر می‌شوند. در تحقیقی مشابه توسط Jamali *et al.* (2006) روی نخود ایرانی، مبارزه با بیمارگر *F. oxysporum* که از عوامل پوسیدگی ریشه این گیاه است صورت گرفت و از باکتری *B. subtilis* استفاده شد. این باکتری را به صورت تیمار خاک و بذر به کار بردند و مشاهده نمودند که بیماری کاهش یافت، بررسی‌های انجام شده نشان داد که تیمار خاک با باکتری تأثیر بیشتری در کنترل قارچ داشت. Khaleghuzzaman & Hossein (2008)، بذور لوبیا چشم بلبلی را برای کاهش *F. oxysporum* با باکتری رایزوبیوم تیمار کردند. نتایج به این صورت بود که گیاهانی که از بذور تیمار شده حاصل شدند، درصد جوانه‌زنی بیشتر، ایستادگی بیشتر و پوسیدگی ریشه کمتری نسبت به تیمارهای کنترل نشان دادند. در این تحقیق نیز استرین‌های رایزوبیوم در بررسی‌های گلخانه‌ای نتایج فوق را تأئید می‌کند اما در بررسی‌های آزمایشگاهی استرین‌های رایزوبیوم اثر بازدارندگی نشان ندادند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که مهمترین عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه باقلا در استان لرستان که از مناطق عمده تولید باقلا در کشور است، گونه‌های *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani* و *Pythium* sp. می‌باشند که گزارش *Macrophomina phaseolina* و *Pythium sp.* به عنوان عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه باقلا برای اولین بار از ایران می‌باشد و سایر عوامل هم برای اولین بار از استان لرستان گزارش می‌شوند. هم‌چنین با توجه به اثر بیوکنترلی مطلوب استرین‌های P34 و P42 روی بیمارگرهای *F. solani* و *M. phaseolina* و تا حدی روی، *R. solani* مطالعات بیشتری در خصوص کنترل بیولوژیکی پوسیدگی رایزوکتونیایی اجتناب ناپذیر است.

REFERENCES

1. Abawi, G. S. (1989) Root rots. In: H. F., Schwartz, & M. A. Pastor Corrales, (Ed.), *Bean production in the tropics*. (pp. 105-157). Centro International Department Agricultural Tropical Colombia.
2. Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A. & Farzaneh, M. (2006). Biological control of bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani* with fluorescent pseudomonads in greenhouse condition. In: Proceedings of *the 17th Iranian Plant Protection Congress*, 2-6 Sep., University of Tehran, Tehran, Iran, P. 131. (In Farsi).
3. Ahmadzade, M. (2003). Study on the effect of fluorescent Pseudomonads against *Pythium ultimum* the causal agent of bean seed rot. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 34, 793. (In Farsi).

4. Akbari, A., Zafari, D., Rohani, H. & Mahmoudi, A. (2006). Study of antagonistic activity of *Bacillus* isolates from bean rhizosphere aganist root rot caused by *Fusarium solani*. In: Proceedings of *the 17th Iranian Plant Protection Congress*, 2-6 Sep., University of Tehran, Tehran, Iran, P. 130. (In Farsi).
5. Amarger, N., Macheret, V. & Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Bacteriologia*, 479, 996-1066.
6. Azimi, S., Farokhinejad, R. & Mousavi, A. (2004). Study *Fusarium* associated with Faba bean root and crown in Khuzestan province. In: Proceedings of *the 16th Iranian Plant Protection Congress*, 29 Aug.-2 Sep., University of Tabriz, Tabriz, Iran, P. 204. (In Farsi).
7. Bond, D. A., Lawes, G. C., Hawtin, M. C. & Stephens, J. S. (1985). Faba bean (*Vicia faba* L.). (pp. 199-265).
8. Dhingra, O. D., Coelho-Netto, R. A., Rodrigues, F. A., Silva, Jr, G. J. & Maia, C. B. (2006). Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress *Fusarium*-yellow of beans. *Biological Control*, 39, 75–86.
9. Dick, M. W. (1990). *Keys to Pythium.* Reading University. Whiteknights.
10. Fiddaman, P. J. & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Applied Bacteriologia*, 74, 119- 126.
11. Gomez, K. A. & Gomez, A. A. (1984). *Statistical Procedures of Agricultural Research*. John Willey & Sons, New York.
12. Hagedron, C. Gould, W. D. & Bardinelli, T. R. (1989). *Rhizobacteria* of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environment Microbiologia*, 55, 2743-2797.
13. Jamali, F., Sharifi Tehrani, A., Okhowat, M. & Zakeri, Z. (2006). Study on the effect of some antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum*, the causal agent of chickpea wilt in greenhouse and field conditions. In: Proceedings of *the 17th Iranian Plant Protection Congress*, 2-6 Sep., University of Tehran, Tehran, Iran. P. 139. (In Farsi).
14. Josey, D. P., Beynon, J. L., Johnston, A. W. & Beringer, J. E (1979). Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Applied Bacteriologia*, 46, 343-350.
15. Khalequzzaman, K. M. & Hossain, I. (2008). Effect of seed treatment with *Rhizobium* strains and biofertilizers on foot/root rot and yield of bushbeen in *Fusarium oxysporum* infested soil. *Bangladesh Journal Agricultural Science*, 46, 55- 64.
16. Klement, Z., Farkas, C. L. & Lovrekorich, L. (1964). Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathologia*, 54, 474-477.
17. Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Hass, D. & Defago, G. (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopatologia*, 82, 190-195.
18. Mckhann, H. & Hirsch, A. (1995). Does *Rhizobium* avoid the host response? *Microbiologia and Immunologia*. (pp. 139-162).
19. Mckenzie, D. L. & Morrall, R. A. A. (1975). Faba bean disease in Saskatchewan in 1975. *Canadian Plant Disease Survey*, 55, 1-7.
20. Muyolo, N. G., Lipps, P. E. & Schmitthenner, A. F. (1993). Reaction of dry bean, lima bean, and soybean cultivars to *Rhizoctonia* root and hypocotyl rot and web blight. *Plant Disease*, 77, 234-238.
21. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species, an illustrated manual for identification.* The Pennsylvania State University Press, University Park.
22. Pratt, R. G., Mclaughlin, M. R., Pederson, G. A. & Rowe, D. E. (1998). Pathogenicity of Macrophomina phaseolina to mature plant tissues of alfalfa and white clover. *Plant Disease*, 82, 1033-1038.
23. Priefer, U. B., Boesten, B., Bouhmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., Miklis, M., Moawad, H., Mouhsine, B., Prell, J., Schluter, A. & Senatore, B. (2001). Characterization of phaseolus symbiotic isolated from Mediterranean soil and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *Journal of Biotechnology*, 91, 223-236.
24. Schaad, N. W., Jones, J. B. & chum, W. (2001) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. (3rd ed.). APS. Press.
25. Sneh, B., Burpee, L. & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia Species*. Minnesota: APS Press.
26. Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review Phytopathologia*, 26, 379-407.
27. Wyllie, T. D. (1989). *Charcoal rot. in compendium of soybean diseases*. (3rd ed.). American Phytopathological Society, St. Paul, MN.