

برهم‌کنش باکتری‌های گره‌زای ریشه و قارچ *Fusarium solani* عامل بیماری پوسیدگی ریشه باقلا

نگار سراج‌زاده^۱، غلام‌خداکرمیان^{۲*} و محمدجواد سلیمانی‌پری^۲
۱، کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، ۲، به ترتیب استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۵/۲۶)

چکیده

پوسیدگی ریشه باقلا ناشی از *Fusarium solani* از جمله بیماری‌های مهم بوده و کنترل آن دشوار و پرهزینه است. در این پژوهش، برهم‌کنش باکتری‌های گره‌زای ریشه با عامل بیماری بررسی شد. باکتری‌های گره‌زای ریشه باقلا با *F. solani* در محیط کشت Potato dextrose agar در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار تقابل داده شدند. از نظر بازدارندگی از رشد قارچ، باکتری‌ها تفاوت معنی‌دار داشتند و استرین *Rhizobium leguminosarum* NSZ3 با میانگین هاله‌بازدارنده ۱/۹۳ میلی‌متر بیشترین و استرین *R. leguminosarum* NSZ22 با ۰/۷۵ میلی‌متر کمترین بازدارندگی را داشتند. برهم‌کنش نماینده‌های باکتری‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در شرایط گلخانه به دو روش آغشته‌سازی بذر و خاک بررسی و شاخص‌های وزن خشک بوته، ریشه و طول ریشه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تیمارها با هم تفاوت معنی‌دار داشتند و استرین NSZ3 وزن خشک بوته‌ها را شصت و یک درصد نسبت به شاهد آلوده افزایش داد. استرین‌های NSZ3 و NSZ46 بیشترین تأثیر را روی وزن خشک ریشه داشتند و NSZ3 وزن خشک ریشه را پنجاه درصد و طول ریشه را پنجاه و سه درصد افزایش داد. کاربرد روش آغشته‌سازی بذر با باکتری‌ها برای جلوگیری از قارچ بیمارگر و کمک به پارامترهای رشد گیاه کارایی بیشتری داشت. انتخاب استرین‌ها با کارایی زیاد نه تنها از آلودگی و پیشرفت بیماری جلوگیری کرد، بلکه سبب افزایش کیفیت و کمیت محصول به میزان چشمگیری شد. راهبرد انتخاب و کاربرد باکتری‌های گره‌زا با ویژگی بازدارندگی بیمارگرهای خاکزاد، به حفظ توازن میکروبی خاک، بهداشت تولید محصول و کاهش هزینه‌های کنترل کمک خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: آغشته‌سازی بذر، بیمارگر خاکزاد، *Rhizobium leguminosarum* هاله‌بازدارنده، وزن خشک بوته

مقدمه

بقولات در بسیاری از کشورهای دنیا می‌شوند. قارچ خاکزاد *Fusarium solani* عامل بیماری پوسیدگی ریشه باقلا است (Abo-shady, 2007). بر اثر بیماری ناشی از این قارچ، همه ریشه‌های اصلی و فرعی تغییر رنگ می‌دهند و قهوه‌ای، خشک و پوک می‌شوند. گیاهان

حبوبات پس از غلات مهم‌ترین منبع غذایی انسان هستند و باقلا از مهم‌ترین بقولات دانه‌ای جهان محسوب می‌شود. بیماری‌های قارچی خاکزاد از مهم‌ترین فاکتورهایی هستند که سبب کاهش تولید محصول

آلوده از رشد بازمانده، کوتوله شده و رشدشان نسبت به گیاه سالم به دلیل عملکرد ضعیف ریشه در جذب آب و مواد غذایی کندتر می‌شود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهند که کاهش محصول بر اثر وقوع بیماری بسته به شرایط گوناگون ایجاد بیماری، حدود شش تا پنجاه و سه درصد است و میزان خسارت، به رقم باقلا و دیگر عوامل از جمله عوامل تنش‌زا بستگی دارد (Burke 1991 and Hall). کنترل شیمیایی این بیماری به دلیل خاکزی بودن عامل ایجادکننده، هزینه زیادی در بر دارد و سبب به هم خوردن تعادل میکروبی خاک می‌شود. کنترل بیولوژیک بیماری با استفاده از باکتری‌های گره‌زایی که ویژگی آنتاگونیستی داشته و علاوه بر کاهش بیماری در افزایش محصول نیز نقش دارد، می‌تواند جایگزین مناسبی باشد. باکتری‌های گره‌زا از جمله باکتری‌هایی هستند که با ریشه حبوبات رابطه همزیستی برقرار می‌کنند و در بیشتر موارد سبب تثبیت نیتروژن می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده است که برخی از باکتری‌های گره‌زا و همزیست، علاوه بر تثبیت نیتروژن در گره‌ها و افزایش توسعه و رشد گیاه میزبان، از ریشه‌ها در برابر حمله بیمارگرهای خاکزاد نیز محافظت می‌کنند (Essalmani and Lahlou 2003, Tilak et al. 2006, Huang and Erickson 2007, Bardin et al. 2004). گزارش‌های مختلفی درباره کنترل بیولوژیک قارچ *Fusarium solani* در محصولات مختلف وجود دارد. براساس تحقیقات آندو و سولیا (Anbo and Sullia 1990) از چهار استرین ریزوبیوم جدا شده از گره‌های ریشه بادام‌زمینی، دو استرین از رشد نوزده قارچ غالب ریزوسفر و دو استرین دیگر نیز از رشد بعضی از قارچ‌های ریزوسفر جلوگیری کردند. در سال ۱۹۹۴، احتشام‌الحق و همکاران (Ehteshamul-Haque 1994) پتانسیل بیوکنترلی باکتری‌های *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* را علیه قارچ‌های پاتوژن خاکزاد ریشه گیاهان بررسی کردند. در شرایط آزمایشگاه *R. meliloti* روی رشد *Rhizoctonia solani* *Macrophomina phaseolina* و *F. solani* اثر بازدارندگی نشان داد، در حالی که، *B. japonicum* فقط روی رشد *M. phaseolina* و *R. solani* بازدارندگی داشته است. در شرایط مزرعه

به دو روش آغشته‌سازی بذر و خاک را بررسی و بیماری‌زایی *M. phaseolina* *R. solani* و *Fusarium* spp. را در گیاهان لگوم و غیر لگوم مانند آفتابگردان و بامیه کنترل کردند. در پژوهشی دیگر اسلمانی و همکاران (Eslamani et al. 2003) اثر آنتاگونیستی *R. leguminosarum* علیه قارچ بیماری‌زای ریشه عدس (*F. oxysporum* MR84) را بررسی و دلیل بازدارندگی ریزوباکترها را القای مقاومت سیستمیک اعلام کردند. همچنین، مازن و همکاران (Mazen et al. 2008) تأثیرات آنتاگونیستی گونه‌های *Rhizobium* spp. و *Arbuscular mycorrhiza* را علیه برخی قارچ‌های بیماری‌زای ریشه گیاه باقلا از جمله *R. solani*، *Fusarium* spp. و *F. solani* بررسی کردند. همه تیمارهای ریزوبیوم، سبب کاهش مرگ گیاهان آلوده در مقایسه با گیاه شاهد شدند. نتایج نشان داد که ترکیب ریزوبیوم و میکوریزا مؤثرتر بوده است و کمترین درصد مرگ و میر گیاه و بالاترین درصد گیاه سالم را در دو سال متوالی به دنبال داشت علاوه بر تأثیرات آنتاگونیستی، ریزوباکتری‌های استفاده شده، اثر مثبتی روی رشد و نمو گیاه، ارتفاع بوته، گره‌زایی، وزن خشک بوته و عملکرد گیاه داشتند. از آنجا که در ایران استفاده از مایه تلقیح ریزوبیوم بیشتر برای کاهش استفاده از کودهای شیمیایی بوده و در مورد اثر آن روی کاهش شدت بیماری‌های ناشی از قارچ‌های خاکزاد اطلاعات کمی وجود دارد، هدف تحقیق، بررسی برهم‌کنش باکتری‌های گره‌زای ریشه گیاه باقلا و قارچ *Fusarium solani*، عامل پوسیدگی ریشه این گیاه برای به‌کارگیری در مدیریت کنترل این بیماری خاکزاد بود.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه‌های گیاهی و اثبات گره‌زایی استرین‌های باکتریایی

نمونه‌های ریشه‌های سالم باقلا به صورت تصادفی با حرکت زیگزاگی در مزرعه انتخاب شدند. از گره‌های ریشه و خاک اطراف آن نمونه‌هایی برداشته و در هاون استریل حاوی چند سی سی آب مقطر استریل خرد

باقلا به مدت چهل و هشت ساعت در سوسپانسیون از باکتری با جذب نوری یک دهم در طول موج ششصد نانومتر اندازه‌گیری و با اسپکتروفتومتر غوطه‌ور شدند. سوسپانسیون باکتری در غلظت به کار رفته معادل 10^9 CFU بود. در هر گلدان سه عدد از بذرها کاشته و به هر گلدان نیم لیتری، همراه با خاک حرارت داده شده آماده بیست میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با تعداد 10^6 اسپور در میلی‌لیتر شمارش شده با لام هموسیستمتر اضافه شد (Dar et al 1997). در روش تلقیح خاک، در هر گلدان سه بذر باقلا کاشته و سپس، پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه شد. در نمونه‌های شاهد به جای سوسپانسیون اسپور، از آب مقطر استریل استفاده شد. پس از گذشت سی روز، پارامترهای رشد گیاه شامل وزن خشک بوته و وزن خشک و طول ریشه اندازه‌گیری و برای آنالیز یادداشت شد. از آنجا که گیاهان بیمار شاخص‌های رشدی ضعیف‌تری نسبت به گیاهان سالم دارند، وزن خشک آن‌ها کمتر است و تفاوت این شاخص به‌عنوان ملاک ارزیابی میزان بیماری و در نتیجه، تأثیر آنتاگونیستی باکتری‌های به کار رفته علیه قارچ بیمارگر آنالیز شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام و داده‌ها به‌صورت فاکتوریل آنالیز شدند. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی استرین‌های باکتریایی در آزمایشگاه نشان داد که تعدادی از استرین‌ها علیه *F. solani* هاله بازدارنده داشتند. این استرین‌ها در بازداری از رشد عامل بیماری پوسیدگی ریشه باقلا در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند. استرین‌های NSZ3، NSZ9 و NSZ25 (نام‌گذاری استرین‌ها برگرفته از حروف اول نام و نام خانوادگی نگارنده اول مقاله و شماره آن‌ها مربوط به ترتیب جداسازی نمونه‌ها است) در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب با میانگین قطر هاله بازدارنده ۱/۹۳، ۱/۸۳ و ۱/۷۵ میلی‌متر دارای بیشترین تأثیر بازدارندگی بودند.

شدند (Vincent 1970). سپس، از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت-کشت Yeast Extract Mannitol Agar (YMA-CR) Congo red با pH=۷ به صورت مخطط کشت شدند. برای انتخاب بهتر استرین‌های ریزوبیوم به محیط کشت YMA مقدار دو و نیم میلی‌لیتر محلول کنگورد یک درصد در لیتر اضافه شد. سپس، پتری‌ها در دمای بیست و هشت درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از گذشت دو روز، تک‌کلونی‌های لعابدار، شیری، شفاف و گردی که رنگ قرمز کنگورد را جذب نکرده بودند جدا و تا خالص‌سازی کامل روی محیط مذکور مخطط شدند (Somasegaren and Hoben 1994). برای اطمینان از درستی جداسازی استرین‌های باکتری انتخاب‌شده، آزمون گره‌زایی باکتری، به روش ماتالا و همکاران انجام شد (Matalah et al. 2002). جدایه‌های قارچ *F. solani* جداشده از ریشه گیاه باقلا که بیماری‌زایی آن نیز به اثبات رسیده بود، از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه بوعلی‌سینا تهیه شد.

برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی استرین‌ها و انتخاب استرین با کارایی و فعالیت آنتاگونیستی مؤثر علیه *F. solani*، از کشت‌های تازه تعداد پنجاه و هشت استرین باکتری گره‌زای باقلا به صورت کشت سه نقطه‌ای از هر باکتری در فاصله نیم سانتی‌متری لبه پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت YMA تلقیح شد و هم‌زمان از کشت هفت روزه بیمارگر در وسط پتری‌دیش گذاشته شد. کشت‌ها به مدت ده روز در دمای بیست و پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میانگین هاله بازدارنده استرین‌ها از رشد قارچ بیمارگر محاسبه شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه دانکن مقایسه شدند.

به منظور ارزیابی اثرات آنتاگونیستی، پنج استرین نماینده گروه‌های مختلف انتخاب شدند و علیه قارچ *F. solani* در شرایط گلخانه به دو روش افزودن سوسپانسیون باکتری به خاک و آغشته‌سازی بذر استفاده شدند. ابتدا بذرها باقلا رقم مصری با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس، با آب مقطر استریل شست و شو شدند. در روش آغشته‌سازی بذر، بذرها

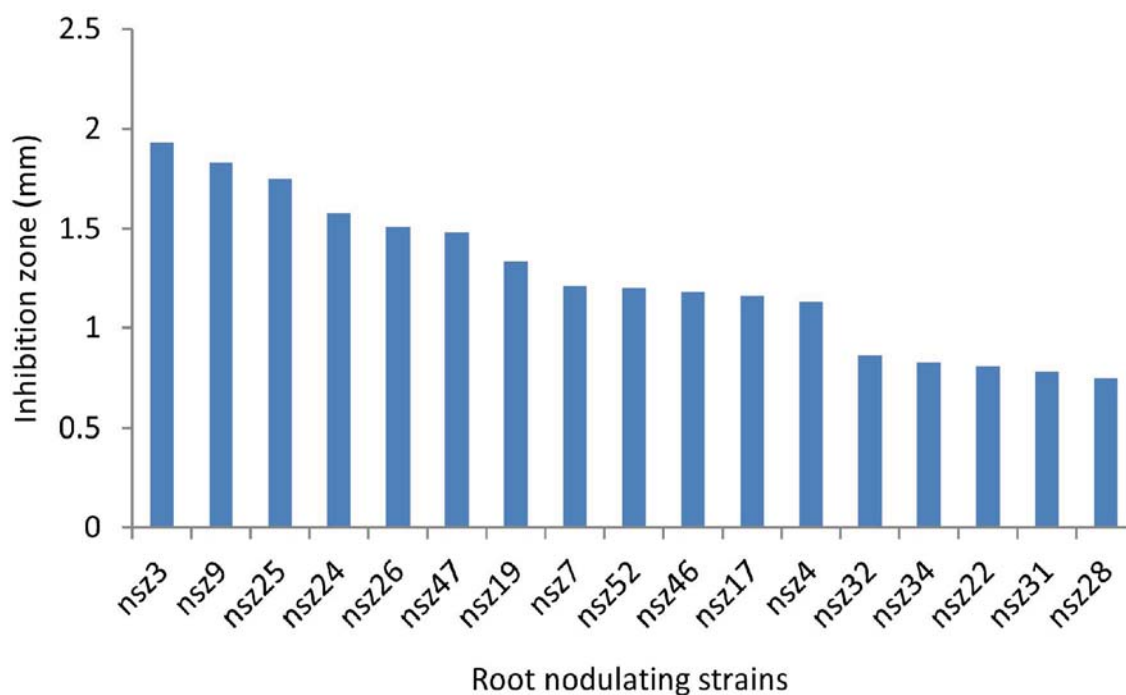
نماینده و میانگین قطر هاله بازدارنده آن‌ها در جدول ۱ و نمودار مربوط به اثر بازدارندگی در شکل ۱ نشان داده شده است.

استرین‌های NSZ22، NSZ31، NSZ28، NSZ31، NSZ32 و NSZ34، بازدارنده ۰/۸۶، ۰/۸۳، ۰/۸۱، ۰/۷۸ و ۰/۷۵ میلی‌متر کمترین اثر بازدارندگی را داشتند. گروه‌بندی تیمارهای

جدول ۱. بازدارندگی استرین‌های *Rhizobium* گره‌زای ریشه باقلا علیه *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه در آزمایشگاه (تنها گروه‌های نماینده نشان داده شده‌اند).

گروه آماری Statistical group	هاله بازدارنده (mm) Inhibition zone (mm)	استرین باکتری Bacterial strain
A	۱/۹۳	NSZ3
AB	۱/۸۳	NSZ9
ABC	۱/۵۸	NSZ24
CDB	۱/۵۱	NSZ26
CDEB	۱/۴۸	NSZ4
CDE	۱/۳۳	NSZ19
DEF	۱/۲۳	NSZ7
GDEF	۱/۱۸	NSZ52
GDEFH	۱/۱۴	NSZ46
GIEFH	۱/۰۰	NSZ4
GIJH	۰/۸۳	NSZ34
IJH	۰/۸۰	NSZ22
IJ	۰/۷۸	NSZ31
J	۰/۷۵	NSZ28
K	۰/۰۰	Control

*اعداد جدول میانگین سه تکرار است. *تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.
** نام‌گذاری استرین‌ها برگرفته از حروف اول نام و نام خانوادگی نگارنده اول مقاله و شماره آن‌ها مربوط به ترتیب جداسازی نمونه‌ها است.



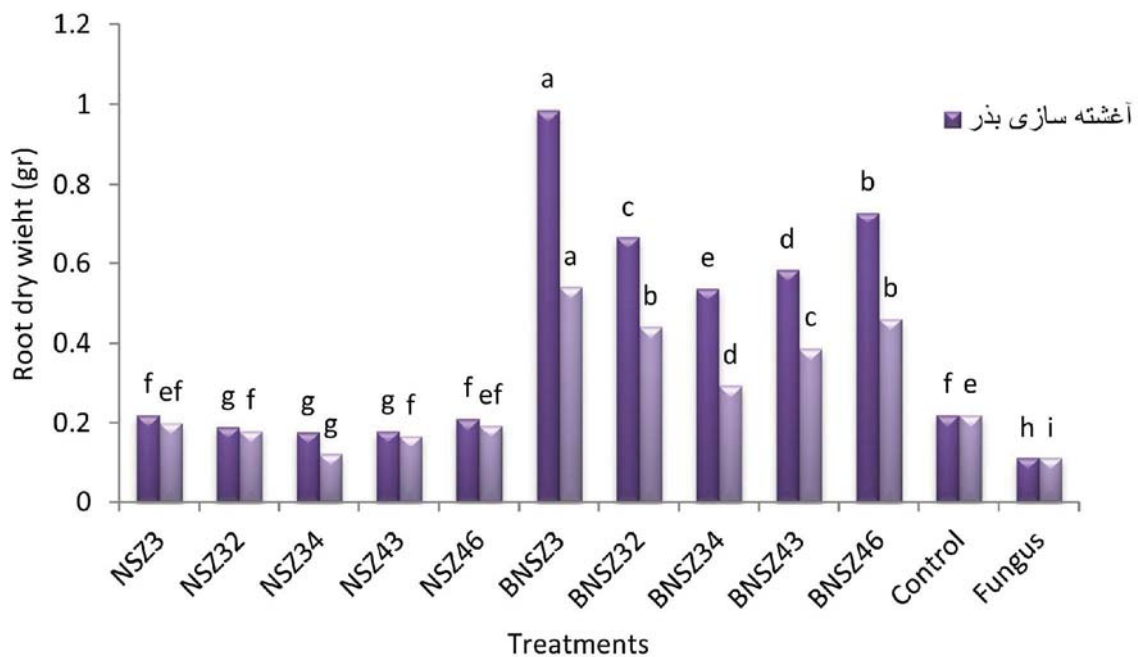
شکل ۱. بازدارندگی استرین‌های *Rhizobium* گره‌زای ریشه باقلا علیه *Fusarium solani* عامل پوسیدگی ریشه در شرایط آزمایشگاه

استرین‌های NSZ46 و NSZ3 بیشترین تأثیر را روی وزن خشک ریشه داشتند و NSZ3 در مقایسه با شاهد آلوده

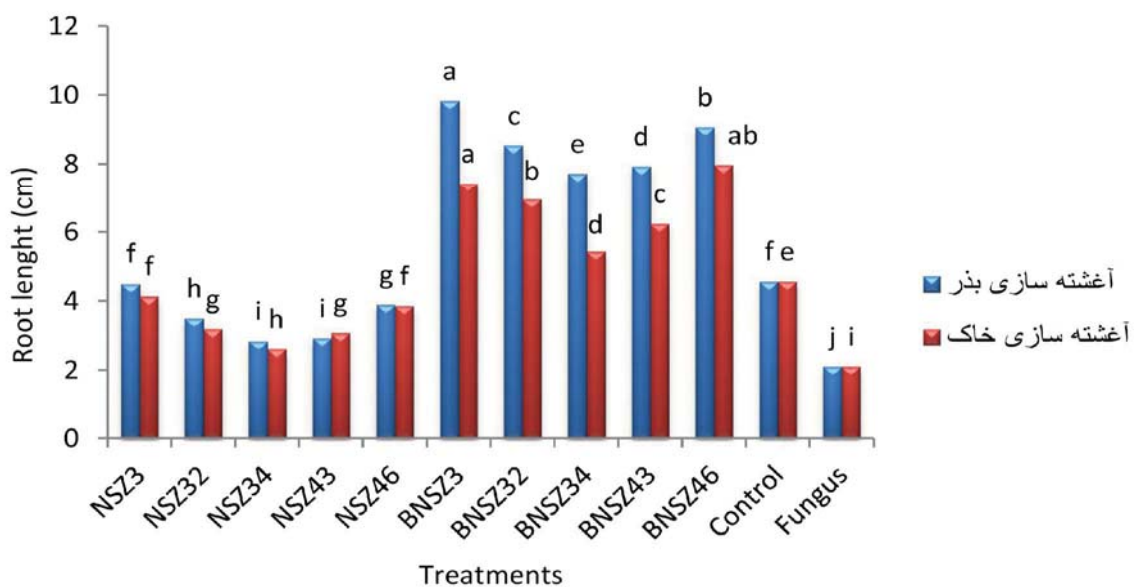
نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل دو فاکتور قارچ و باکتری روی صفت وزن خشک ریشه نشان داد که

شاهد آلوده افزایش معنی‌داری پیدا کرد. استرین NSZ3 طول ریشه را در روش آغشته‌سازی بذر پنجاه و سه درصد و در روش آغشته‌سازی خاک چهل و هشت درصد نسبت به شاهد آلوده افزایش داد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

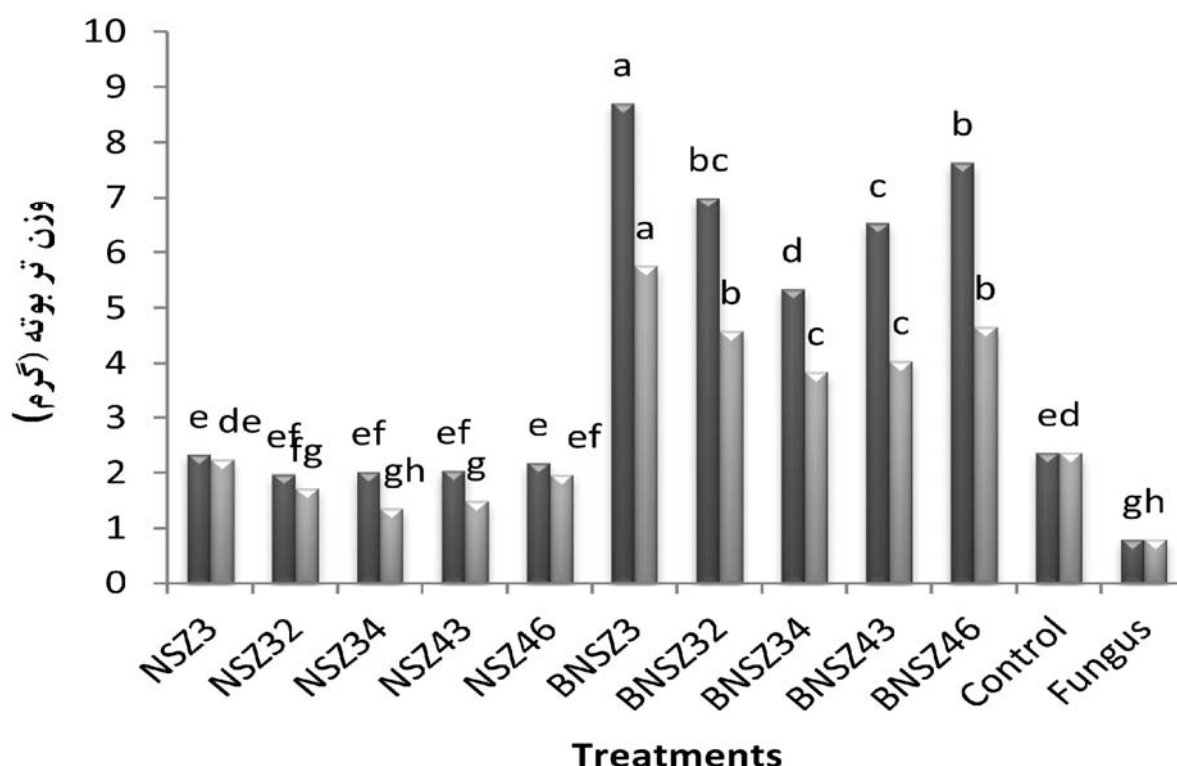
وزن ریشه را پنجاه درصد افزایش داد. استرین‌های NSZ3 و NSZ46 بیشترین تأثیر را روی وزن خشک بوته داشتند و استرین NSZ3 وزن خشک ریشه را نسبت به گیاهان آلوده به قارچ به میزان شصت و یک درصد افزایش داد. بررسی اثر استرین‌های آنتاگونیست روی طول ریشه نشان داد که این شاخص نسبت به



شکل ۲. اثر باکتری‌های گره‌زای ریشه روی وزن خشک ریشه باقلا آلوده به قارچ *Fusarium solani*



شکل ۳. اثر باکتری‌های گره‌زای ریشه روی طول ریشه باقلا آلوده به قارچ *Fusarium solani*



شکل ۴. اثر باکتری‌های گره‌زای ریشه روی وزن خشک بوته باقلا آلوده به قارچ *Fusarium solani*

بذرهای تیمار شده حاصل شده‌اند، درصد جوانه‌زنی و ایستادگی بیشتر و پوسیدگی ریشه کمتری نسبت به تیمارهای کنترل داشتند. احتشام‌الحق و غفار در سال ۱۹۹۳، در پژوهشی دیگر پتانسیل بیوکنترلی *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* را علیه قارچ‌های خاکزی ریشه گیاهان لگوم و گیاهان غیر لگوم ارزیابی کردند. این باکتری‌ها توانستند بیماری‌زایی *Rhizoctonia* spp. را در گیاهان سویا و لوبیا چشم‌بلبلی و آفتابگردان و بامیه کاهش دهند. کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید، جایگاه بسیار مهمی در برنامه‌های مدیریت زراعی یافته است (Whips 2001). باکتری‌هایی که در ناحیه ریشه فعالیت دارند، یکی از عوامل کلیدی، در تغییر اکوسیستم خاک هستند. رابطه متقابل بین ریشه گیاه و ریزوباکترها تأثیر عمده‌ای بر سلامت گیاه، کیفیت خاک و محصول دارد (Whips 2001). باکتری‌های ناحیه ریشه می‌توانند دامنه گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تولید کنند که تأثیر مثبتی روی رشد گیاه دارند. این پدیده سبب افزایش دسترسی به مواد معدنی، افزایش توانایی تثبیت

در آزمون‌های کشت متقابل استرین‌های ریزوبیوم که از گره‌های باقلا جدا شده بودند، از رشد قارچ *Fusarium solani* جلوگیری کردند. در این پژوهش آنالیز نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. باکتری‌های مورد بررسی سبب افزایش ویژگی‌های رشدی شامل وزن خشک بوته و وزن خشک و طول ریشه شدند. همچنین، نتایج نشان داد که در هر دو روش آغشته‌سازی بذر و خاک، استرین NSZ3 بیشترین و استرین NSZ34 کمترین تأثیر را داشتند. به‌طور کلی مشخص شد که تیمار بذر با باکتری‌های گره‌زای ریشه برای جلوگیری از آسیب عامل پوسیدگی ریشه از روش افزودن باکتری به خاک ضمن سادگی و کم هزینه بودن کارایی بالاتری دارد.

نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر پژوهشگران همخوانی دارد. از جمله خالق‌الزمان و حسین در سال ۲۰۰۸ (Khalequzzaman and Hossain 2008). بذرهای لوبیا چشم‌بلبلی را با باکتری‌های همزیست ریشه آغشته کردند و عوامل پوسیدگی ریشه لگومینوز را کاهش دادند. این بررسی نشان داد گیاهانی که از

نخودفرنگی ناشی از *Macrophomina phaseolina* را با استفاده از *Glomus fasciculatum* در شرایط گلخانه بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که تلقیح گیاه با هر یک از آن‌ها به تنهایی یا در ترکیب با هم در کاهش شدت بیماری مؤثر بود. از آنجا که یکی از مکانیسم‌های بازدارندگی در کنترل بیولوژیک القای مقاومت به گیاه میزبان در برابر پاتوژن است؛ بنابراین، در این پژوهش فقط باکتری‌های بازدارنده رشد قارچ در گلخانه استفاده شدند تا ضمن کمک به القای مقاومت به گیاه باقلا و بازدارندگی از رشد قارچ بیماریزا به‌عنوان یک فاکتور کمکی بیشتر به کنترل بیماری کمک کند. با توجه به نتایج پژوهش مزبور برگزیدن استرین‌های گره‌زای بازدارنده رشد قارچ که در فرآیند طبیعی ورود به میزبان سبب القای مقاومت می‌شوند، راهبرد مناسبی برای کمک مؤثر به کنترل بیماری است.

نیتروژن، کاهش خطر سرمازدگی، بهبود سلامت گیاه هنگام بیوکنترل پاتوژن‌های گیاهی، القای مقاومت سیستمیک در گیاه و افزایش رشد و نمو گیاه می‌شود. تاکنون، اثر ریزوباکترهای آنتاگونیست از جمله ریزوبیوم‌ها در کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی خاک‌زی تعداد زیادی از گیاهان زراعی به اثبات رسیده است (Weller 1988). برای مثال بواسینی و همکاران با آغشته‌کردن بذرهای لوبیا با باکتری ریزوبیوم، میزان پوسیدگی ریشه بر اثر فوزاریوم را کاهش دادند (Bardin و همکاران 1986). بردین و همکاران (Bardin et al. 2004) نتیجه گرفتند که سه استرین *R. viceae leguminosarum* bv. که به‌صورت تیمار بذر در مزارع چغندر و نخود آلوده به پیتیوم به‌کار برده شدند، بوته میری پیتیومی را در هر دو گیاه به‌طور مؤثری کنترل کردند. سعید اختر و صدیقی (Sayeed 2007) Akhtar and Siddiqui امکان بیوکنترل پوسیدگی ریشه

REFERENCES

- Abo-Shady AM, Al-ghaffar AB, Rahhal MMH, Abd-El Monem AH (2007) Biological control of *Faba bean* pathogenic fungi by three cyanobacterial filtrates. *Pakistan Journal of Biological Science* 10: 3029-3038.
- Anbo DA, Sullia SB (1990) Antibiotic effect of *Rhizobium* sp. toward some soil fungi. *Acta Botanica Indica* 18: 213-215.
- Bardin SD, Huang HC, Amundsen EJ, Erickson RS (2004) Biological control of *Pythium* damping-off of pea and sugarbeet by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. *Canadian Journal of Botany* 82:291-296.
- Buonassisi AH, Copeman RJ, Pepin HS, Eaton GW (1986) Effect of *Rhizobium* spp. on *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8: 140-146.
- Burke DW, Hall R (1991) *Fusarium* root rot. *Compendium of Bean Diseases*. American Phytopathology Society Press, St Paul MN .pp.9-10.
- Dar GH, Zargar MY, Beigh MA (1997) Biocontrol of *Fusarium* root rot in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. *Microbial Ecology* 34: 74-80.
- Ehteshamul-Haque S (1994) Use of *Rhizobia* in the control of soilborne plant disease caused by root infecting fungi. Doctor of philosophy thesis, the faculty science university of. Karachi 283 pp.
- Essalmani H, Lahlou H (2003) Bioprotection mechanisms of the Lentil plant by *Rhizobium leguminosarum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. *Comptes rendus Biologies Journal* 326: 1163-1173.
- Huang HC, Erickson RS (2007) Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass and seed yield of pea lentil. *Journal of Phytopathology* 155: 31-37.
- Khalequzzaman KM, Hossain I (2008) Effect of seed treatment with *Rhizobium* strains and biofertilizers on foot/root rot and yield of bushbean in *Fusarium oxysporum* infested soil. *Bangladesh Journal of Agricultural Science* 46: 55-64.
- Maatallah J, Berraho EB, Munoz S, Sanjuan J, Lluch C (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *Journal of Applied Microbiology* 93:531-540.
- Mazen MM, El-Btanony N, El-Monium MM, Massoud ON (2008) Cultural filtrate of *Rhizobium* spp. and *Arbuscular Mycorrhiza* are potential biological control agents against root rot fungal disease of *Faba bean*. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3(1): 32-41.
- Tilak K, Ranganayaki N, Manoharhari C (2006) Synergistic effects of plant growth promoting *rhizobacteria* and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by *pigeonpea* (*Cajanus cajan*).

- European Journal of Soil Science 57: 67-71.
- Sayed Akhtar M, Siddiqui ZA** (2007) Effects of *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* sp. on the growth and root rot disease complex of *chickpea*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 40(1):37-43.
- Somasegaren P, Hoben HJ** (1994) Handbook for *Rhizobia* (Methods in Legume-Rhizobium Technology). Springer verlag New Yourk Incorporated 453 Pp.
- Vincent JM** (1970) A Manual for Practical Study of the Root nodules Bacteria. Oxford: Blackwell Scientific publication 440 Pp.
- Whips JM** (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52:487-511.
- Weller DM** (1988) Biological control of soilborne plant pathogen in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26: 379- 407.