کارایی باکتری‌های سودوموناس درکنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه کلزا

شیراحمد سارانی[۱*]، عباس شریفی تهرانی[۲]، مسعود احمدزاده[۲] و محمد جوان نیکخواه[۲]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۴)

چکیده

هدف از انجام تحقیق دستیابی به روش‌های سالم و غیر شیمیایی مبارزه با بیماری‌های گیاهی به‌خصوص امکان کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه کلزا با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست و جداسازی مؤثرترین جدایه‌های باکتری و مطالعه تولید متابولیت‌های ضد قارچی آنها می‌باشد. ۲۵۷ جدایه باکتری از ریزوسفر و ریشه کلزا سالم و آلوده به قارچ *Rhizoctonia solani* در استان‌های گلستان، مازندران، گیلان و تهران جدا شد. با استفاده از روش کشت متقابل، توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ بررسی شد و نتایج نشان داد ۶۰ جدایه، دارای خاصیت آنتاگونیستی می‌باشند. با استفاده از آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی، جدایه‌های P1، P2 و P3 تحت عنوان *Pseudomonas fluorescens* شناسایی شدند. این جدایه‌ها با تولید آنتی بیوتیک و مواد فرار، مانع از رشد میسلیوم قارچ شدند. هم‌چنین این جدایه‌ها برخی متابولیت‌های ضد میکروبی دیگر از جمله سیانید هیدروژن، پروتئاز و سیدروفور را تولید می‌نمایند. جدایهP3 بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی نشان داد. تأثیرجدایه‌ها بر کاهش بیماری در شرایط گلخانه در مقایسه با شاهد دارای تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد داشت. جدایه P3 بیشترین تأثیر را در کاهش بیماری در شرایط گلخانه نشان داد. روش آغشته سازی خاک با سوسپانسیون باکتری نسبت به روش آغشته سازی بذر نتیجه بهتری داد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، کنترل بیولوژیکی، سودوموناس‌های فلورسنت، *Rhizoctonia solani*، متابولیت‌های ضد قارچی

مقدمه

گیاه کلزا (*Brassica napus*) با حدود ۳۵ تا ۵۰ درصد روغن در دانه و حدود ۳۵ تا ۴۵ درصد پروتئین در کنجاله از نظر کشاورزی مورد توجه خاص است. این گیاه مورد حمله آفات و بیماری‌های زیادی قرار می‌گیرد. یکی از بیماری‌های مهم کلزا مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* می‌باشد. در شمال کانادا و غرب استرالیا مرگ گیاهچه کلزا یکی از علل اصلی کاهش محصول می‌باشد(۶ و۱۲). در ایران نیز این قارچ از مزارع کلزای استان‌های زنجان و گیلان گزارش شده است(۱). تأثیر اندک روش شیمیایی در

۱. مربی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. به ترتیب استاد و استادیاران گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sarani59@uoz.ac.ir

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

کنترل بیمارگرهای خاکزی و هزینه‌های اقتصادی آن از یک‌طرف و نگرانی‌های زیست محیطی از طرف دیگر، دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به عنوان یک چالش جدی فرا روی محققان قرار داده است. در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به‌خصوص از جدایه‌های متعلق به *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* در کنترل بیماری‌های قارچی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند، گزینه مناسبی برای استفاده در کنترل بیولوژیکی هستند زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشد(۲۷). تولید مواد آنتی‌بیوتیک به عنوان یک عامل مهم در کاهش بسیاری از بیماری‌های ریشه می‌باشد. کلوپر و همکاران (۱۳) نخستین بار بر اهمیت سیدروفورها به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم آنتاگونیستی باکتری‌ها علیه بیمارگرهای گیاهی پی بردند. سیدروفورها مواد کلاته کننده آهن سه ظرفیتی با وزن مولکولی کم هستند. یکی دیگر از متابولیت‌های ضد میکروبی که سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌کنند، سیانید هیدروژن می‌باشد که روی سیستم جذب مواد غذایی بیمارگر تأثیر منفی می‌گذارد. علاوه بر آنتی بیوتیک‌ها، ترکیبات فرار آنتاگونیستی‌ها نیز در بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* نقش مؤثری دارند. هاجدورن و همکاران (۷) سودوموناس‌های جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان مختلف را به عنوان مؤثرترین آنتاگونیست‌ها علیه *R. solani* و *Pythium ultimum* در شرایط آزمایشگاهی معرفی نمودند. هدف از انجام تحقیق دستیابی به روش‌های سالم و غیر شیمیایی مبارزه با بیماری‌های گیاهی به‌خصوص امکان کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه کلزا با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست و جداسازی مؤثرترین جدایه‌های باکتری و مطالعه تولید متابولیت‌های ضد قارچی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی قارچ عامل بیماری

گیاهچه‌های آلوده کلزا که دارای علائم شانکر در ناحیه طوقه و مرگ گیاهچه بودند، قسمت‌های آلوده پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو به مدت ۳۰ دقیقه زیر جریان ملایم آب معمولی شیر، با محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی گردیدند و پس از دوبار شستشو با آب مقطر سترون و رطوبت زدایی روی کاغذ خشک کن سترون به قطعات کوچک‌تر بریده شدند. سپس به محیط آب آگار دو درصد درون تشتک پتری منتقل و تشتک‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۲۵°C نگه‌داری شدند. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها از آنتی بیوتیک سولفات استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. بعد از دو روز تشتک‌ها به کمک استریومیکروسکوپ دو چشمی بررسی و قارچ‌هایی که خصوصیات عمومی ریزوکتونیا را نشان دادند به تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA منتقل شدند. کشت‌های خالص قارچ با جداسازی نوک هیف‌ها از حاشیه کلنی‌ها به‌دست آمد. این کشت‌ها درون لوله آزمایش حاوی محیط PDA در دمای ۴°C درون یخچال نگه‌داری و هر دو ماه یک‌بار تجدید کشت شدند.

برای شناسایی قارچ از روش و کلید شناسایی زمانی(۲)، اگوشی(۱۶)، پارمتر و ویتنی (۱۷) و سوییتگام(۲۴) استفاده شد. صفات مورد اندازه‌گیری عبارت بودند از ۱) تعیین قطر هیف ۲)اندازه‌گیری رشد شعاعی کلنی قارچ ۳) بررسی خصوصیات مرفولوژیکی ۴) رنگ آمیزی هسته‌ها ۵) تعیین گروه آناستوموزی با استفاده از جدایه‌های آزمون تهیه شده از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال با روش (۱۸) استفاده گردید.

اثبات بیماری‌زایی روی گیاه میزبان در شرایط گلخانه

برای تهیه مایه تلقیح قارچ از روش مارهوفر و همکاران(۱۵) استفاده شد. دو گرم بذر ارزن به هر یک کیلوگرم خاک اضافه گردید و در هر گلدان چهار عدد بذر کلزا رقم هایولا (تهیه شده ازمؤسسه اصلاح وتهیه بذر و نهال) کاشته شد. برای هر تیمار

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

چهار تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی به‌کار رفت. درصد پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه اندازه‌گیری شد.

جداسازی و نگه‌داری باکتری‌های آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر و ریشه کلزا

جداسازی تمام باکتری‌های موجود در خاک با استفاده از محیط افتراقیKing B و از روش کیل و همکاران(۱۰) انجام گرفت. برای نگه‌داری جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از روش ولر و کوک (۲۶) استفاده شد. هم‌چنین از روش‌های نگه‌داری در آب مقطر سترون حاوی محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیوم و تجدید کشت متناوب نیز استفاده گردید.

بررسی اثر باکتری‌ها در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری

برای بررسی قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش(۱۱) استفاده شد. باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی محیط کشت NA+PDA و NA به فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک کشت داده شد و سه روز بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ موردنظر در وسط تشتک پتری قرار گرفت. برای هر تیمار سه تکرار به‌کار رفت. پتری‌ها به‌مدت دو تا هفت روز در دمای^{o}C ۲۴ نگه‌داری شدند. وجود هاله بازدارندگی به عنوان واکنش مثبت بازداری از رشد قارچ تلقی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله کلنی باکتری تا میسلیوم قارچ اندازه‌گیری و میانگین آنها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شد.

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

شناسایی خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی باکتری‌ها بر اساس آزمون‌های گرم، هوازی یا بی هوازی، اکسیداز، تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کینگ ب، تولید لوان، تولید سلول‌های میسلیومی، استفاده از قندهای ال- آرابینوز، تری هالوز، دی-گالاکتوز، سوربیتول، ام- اینوزیتول، آدونیتول، بتا آلانین، ساکارز، احیای نیترات، هیدرولاز ژلاتین، آرژنین دی هیدرولاز، رشد در ^{o}C ۴ و ^{o}C ۴۱، لهانیدن سیب زمینی، واکنش فوق حساسیت و هیدرولیز نشاسته با استفاده از روش‌های شاد و همکاران (۲۰) و فهی و پرسلی (۶) صورت گرفت.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های باکتریایی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

تولید آنتی بیوتیک

این آزمون براساس روش کرائوس و لوپر(۱۵)انجام گرفت. با پیپت اپندورف، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری و آب مقطر سترون (شاهد) به محیط PDA اضافه و پخش شد و به‌مدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از این مدت بااستفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، پرگنه باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شد. سپس پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (به‌صورت وارونه) قرارداده شد. پس از ۳۰ دقیقه تقریباً تمام باکتری‌ها از بین رفتند. سپس یک حلقه به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ با رعایت شرایط سترون در وسط محیط کشت هر تشتک پتری کشت قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و اندازه گیری قطر رشد حلقه پس از ۷-۳ روز انجام گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل هر تیمار در سه تکرار انجام شد . گروهبندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک درصد انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول محاسبه گردید.

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

این آزمایش مطابق روش کرائوس و لوپر (۱۵) انجام گرفت. درمرحله اول آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری توسط میله شیشه‌ای برسطح محیط PDA و NGA پخش شد و تشتک‌های پتری به‌مدت سه روز در دمای

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری شد. درمرحله دوم، حلقه‌هایی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ در مرکز تشتک پتری حاوی PDA کشت گردید. سپس در کنار شعله با رعایت شرایط سترون تشتک‌های پتری حاوی قارچ به‌طور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی باکتری‌های انتاگونیست قرار داده شد و لبه پتری‌ها روی هم قرار گرفته توسط نوار پارا فیلم کاملا مسدود گردیدند. تمام تشتک‌های پتری دردمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷-۳ روز نگه‌داری شدند. در تشتک پتری شاهد فقط حلقه‌ای از محیط PDA حاوی قارچ در مقابل پتری‌های حاوی PDA و NGA بدون باکتری قرارداده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل هر تیمار در سه تکرار انجام گرفت و داده‌های بدست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک درصد انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ پس از ۷-۳ روز محاسبه گردید .

تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور از روش شیوان و نیلندز (۲۲) استفاده شد. در این روش از محیط CAS (Chrome Azurol S) استفاده گردید. در صورتی که باکتری تولید سیدروفور کند، باعث تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی می‌شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS می‌باشد. اندازه هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری با میزان سیدروفور رابطه مستقیمی دارد.

تولید پروتئاز

با توجه به نقش پروتئاز به عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی، بررسی تولید آنزیم پروتئاز بر اساس روش مارهوفر و همکاران(۱۶) با استفاده از محیط کشت Skim Milk Agar (SMA) صورت گرفت. تشتک‌های حاوی محیط کشت در ^{o}C ۲۷ به‌مدت ۲۴ ساعت نگه‌داری شدند. تشکیل یک هاله بی رنگ در اطراف کلنی باکتری نشانه فعالیت پروتئاز بود.

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم و همکاران (۴) استفاده گردید. ابتدا برای هر جدایه سه پتری حاوی محیط NA تهیه شد. داخل هر پتری ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و۵٪ اسید پیکریک)در قسمت درب پتری قرار داده شد. درب پتری با نوار پارا فیلم چسبانده شد تا از خروج هرگونه متابولیت فرار و گازی از جمله HCN جلوگیری شود. آنگاه این پتری‌ها به صورت وارونه در دمای ^{o}C ۲۷ در انکوباتور به مدت یک هفته نگه‌داری شدند. در صورت تولید HCN توسط باکتری رشد یافته روی سطح محیط کشت، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و آجری دیده می‌شود که نشانه تفاوت در تولید HCN توسط باکتری می‌باشد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

اثر باکتری‌ها در کاهش بیماری به دو روش آغشته سازی خاک و بذر در گلخانه

برای انجام این آزمایش از روش کیل و همکاران (۱۰) بشرح زیر عمل شد: پس از تهیه مایه قارچ بیماریزا روی بذر ارزن و اضافه کردن آن به خاک (دو گرم بذر ارزن به ازای یک کیلوگرم خاک) در روش آغشته سازی خاک (سترون وغیر سترون) مقدار ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون هر جدایه حاوی 10^{9} سلول باکتری در هر گرم خاک در متیل سلولز یک درصد (شمارش باکتری از سری رقت) استفاده شد. در روش آغشته سازی بذر، بذور سترون شده کلزا به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون هر جدایه حاوی 10^{9}سلول در میلی‌لیتر غوطه ور شدند. تهیه مایه تلقیح باکتری مطابق روش بور و همکاران (۵) انجام شد. از قارچکش بنومیل مطابق روش کایزر و همکاران (۹) در آزمایش‌های گلخانه‌ای جهت مقایسه با اثر باکتری‌های آنتاگونیست استفاده شد. در هر گلدان ۴ عدد بذر کاشته شد. از گلدان‌هایی به قطر ۱۳ سانتی‌متر استفاده شد و آبیاری گلدان‌ها

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

به‌طور منظم روز در میان انجام گرفت. پارامترهای مورد ارزیابی تعداد بذور جوانه زده و گیاهان سالم، پس از چهار هفته(نگه‌داری در شرایط گلخانه) بود. برای هر تیمار سه تکرار در یک طرح بلوک کامل تصادفی به‌کار رفت. این آزمایش دو مرتبه بار تکرار شد.

نتایج

مشخصات قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه کلزا (*Rhizoctonia solani* Kuehn)

از سه جدایه قارچی مورد بررسی، جدایه *R. solani* ساری در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت متعلق به گروه آناستوموزی AG۲-۱ بوده که علاوه بر پوسیدگی ریشه، روی هیپوکوتیل گیاهچه بلافاصله بالای سطح خاک شانکرهای فرورفته بیضی شکل ایجاد نمود که با ویژگی‌های ارائه شده برای این گروه آناستوموزی مطابقت دارد(۱۶و۱۷). رنگ کلنی قارچ در ابتدا سفید بود و بعداً به رنگ سفید مایل به کرم، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره تغییر یافت. اسکلروت‌ها به طور منفرد و در بعضی از موارد به صورت پراکنده و گاهی از موارد به صورت مجتمع در سطح زیرین در تشتک و یا در سطح محیط کشت تشکیل شدند. اندازه اسکلروت‌ها ۰/۴ تا ۲/۵ میلی‌متر است. انشعابات هیف‌ها هم زاویه حاده و هم با زاویه قائمه بوده و در قاعده انشعابات دارای فرورفتگی مشخص هستند. کمی بالاتر از محل فرورفتگی در انشعابات دیواره عرضی تشکیل می‌شود که فاصله دیواره عرضی از محل فرورفتگی در جدایه‌های مختلف با هم متفاوت است و به‌طورکلی ۳ تا ۲۵ میکرومتر است. طول سلول‌های هیف به اندازه ۲۵ تا۲۹۰ میکرومتر است. سلول‌های مونیلیوئید به‌صورت زنجیره‌های ساده و یا منشعب تشکیل می‌شوند و رنگ آنها قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای است و اندازه آنها ۲۸-۱۲×۱۶-۹ میکرومتر است. تعداد هسته در سلول‌های هیف ۳ تا ۱۲ عدد می‌باشد. قطر هیف‌ها ۵/۸ تا ۹/۴ میکرومتر بوده و دمای بهینه برای این جدایه ۲۴ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد و میزان رشد شعاعی روزانه قارچ ۱۷ میلی‌متر است .

آزمون بیماری‌زایی

طی این بررسی در گلدان‌های شاهد، تمام بذرهای کاشته شده سبز گردید و علایم بیماری دیده نشد، در حالیکه در گلدان‌های تیمار شده با جدایه‌های قارچ، بذرها جوانه زد ولی گیاهچه‌ها قبل از ظهور و بعد از ظهور پژمردند. علائم به‌صورت شانکرهای تیره رنگ ظاهر گردید که در ابتدا بخشی از طوقه را فرا گرفت و سپس مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه رخ داد. بین همه تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود داشت. از سه جدایه مورد بررسی جدایه RS ساری با ۹۱ درصد تلفات بیشترین بیماریزایی را داشت. بنابراین این جدایه برای آزمایش‌ها انتخاب شد. در بررسی‌های میکروسکوپی قارچ جدا شده از این بوته‌ها با مشخصات قارچ مایه زنی شده یکسان بود.

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

در این بررسی، توانایی آنتاگونیستی ۲۵۷ جدایه باکتریایی به منظور انتخاب بهترین جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه بر اساس روش کشت متقابل در تشتک پتری روی *R. solani* مورد مطالعه قرار گرفت، که۹۲ جدایه دارای هاله بازدارندگی بودند. ۳۲ جدایه هاله بازدارندگی کمتر از پنج میلی‌متر و۶۰ جدایه هاله بازدارندگی بیش از پنج میلی‌متر ایجاد کردند. باکتری‌های دیگر هیچ تأثیری بر قارچ *R. solani* نداشتند. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌های باکتریایی روی قارچ بر اساس فاصله‌ای که بین حاشیه پرگنه جدایه و قارچ ایجاد شده بود اندازه گیری شد و بر این اساس ۲۰ جدایه از باکتری‌های گرم منفی با بیشترین هاله بازدارندگی انتخاب شدند.

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه

در این بررسی، توانایی آنتاگونیستی ۲۰ جدایه باکتریایی به منظور انتخاب جدایه‌هایی با اثر بیشتر کاهش بیماری در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمون نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

جدول۱. بررسی تعدادی از مکانیسم‌های آنتاگونیستی در بازدارندگی از رشد *R. solani*

جدایه	تولید[۶] آنتی بیوتیک	ترکیبات فرار[۶] روی محیط PDA	ترکیبات[۶] فرار روی محیط NGA	سیدروفور [۱]	پروتئاز [۲]	سیانید هیدروژن [۳]	بازدارندگی علیه قارچ [۴][۵]
P1	۴۵/۶^{a}	۳۷^{b}	۲۸/۹^{b}	+	++	++	۱۶^{b}
P2	۱۷/۷^{c}	۱۶^{c}	۲۴/۱^{c}	+	++	++	۱۷^{ab}
P3	۲۹/۱^{b}	۶۰/۵^{a}	۵۳^{a}	+++	++	+++	۱۸^{a}

۱. ایجاد هاله نارنجی اطراف باکتری روی محیط CAS نشانه تولید سیدروفور می‌باشد.
۲. فعالیت پروتئاز بر اساس بیرنگ نمودن محیط SMA تعیین شد.
۳. تولید سیانید بر اساس میزان تغییررنگ کاغذصافی آغشته به معرف تعیین شد.
۴. عداد هر ستون که با حروف یکسان در سطح ۱و۵ درصد بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار ندارند.
۵. فاصله بین میسلیوم قارچ و کلنی باکتری روی پتری بر حسب میلی‌متر
۶. در صد تأثیر جدایه‌ها درجلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در سطح یک درصد نسبت به شاهد
۷. هر عدد میانگین سه تکرار است.

بر اساس مقایسه میانگین‌ها بیشتر جدایه‌ها نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بودند. جدایه‌های P1، P2 و P3 باکتری‌های سودوموناس فلورسنت و سم بنومیل برای آزمایش‌های نهایی در گلخانه انتخاب شدند. جدایه P1 از مزارع کلزای رشت، جدایه P2 از مزارع کلزای ساری و جدایه P3 از مزارع کلزای نظرآباد جداسازی شدند.

خصوصیات جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر اساس آزمون‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

جدایه‌های P1، P2 و P3 باکتریایی سوا شده از ریزوسفر گرم منفی، هوازی، اکسیداز مثبت بودند و توانایی تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کینگ ب و تولید لوان را دارا بودند، ولی تولید سلول‌های میسلیوم نمی‌کنند. از نظر استفاده ازقندهای ال- آرابینوز، تری هالوز، دی-گالاکتوز، سوربیتول، ام- اینوزیتول، آدونیتول، بتا آلانین، ساکارز، تست احیای نیترات، هیدرولاز ژلاتین، آرژنین دی هیدرولاز رشد در ^{o}C ۴ هر سه جدایه مثبت بودند. هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به لهانیدن سیب زمینی، واکنش فوق حساسیت، رشد در ^{o}C ۴۱ و هیدرولیز نشاسته نبودند. خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی جدایه‌های P1، P2 و P3 با خصوصیات ذکر شده برای گونه *P. fluorescens* مطابقت داشت.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های باکتریایی جدایه‌های *P. fluorescens*

تولید آنتی بیوتیک هر سه جدایه P1، P2 و P3 قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند. بر اساس مقایسه میانگین، هر سه جدایه نسبت به شاهد در سطح یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار بودند. بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه P1 با ۴۵/۶درصد بازدارندگی و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه P2 با ۱۷/۷ درصد بازدارندگی بود(جدول ۱).

تولید ترکیبات فرار ضدقارچی

الف) نتایج حاصل از هر سه جدایه در محیط PDA در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. جدایه P3 بیشترین بازدارندگی(۶۰/۵درصد) را ایجاد کرده بود، بقیه جدایه‌ها نیز باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ شدند(جدول ۱).

ب) نتایج حاصل از هر سه جدایه در محیط NGA در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. در بین جدایه‌ها، جدایه P3 دارای بیشترین (۵۳درصد) وجدایه P2 دارای کمترین (۲۴/۱درصد) درصد تأثیر در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بودند(جدول ۱).

تولید سیدروفور

در این بررسی هر سه جدایه تولید سیدروفور کردند. بیشترین

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

جدول ۲. تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش مرگ گیاهچه‌های کلزا در روش آغشته سازی خاک سترون

تیمارها	میانگین گیاهان سالم خاک بذر	درصد تلفات خاک بذر	درصد تأثیر [(۱)] خاک بذر	گروه بندی تیمارها [(۱)] خاک بذر
شاهد آلوده	۰/۰۴	۹۶	–	e
شاهد غیرآلوده	۱	–	۱۰۰	a
بنومیل	۰/۸۶	۱۴	۸۲	c
جدایه P1	۰/۷۸	۲۲	۷۴	d
جدایه P2	۰/۸۳	۱۷	۷۹	c
جدایه P3	۰/۹۲	۸	۸۸	b

– اعداد ستون که با حروف یکسان نشان داده شده اند در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.

– هر عدد میانگین سه تکرار است.

جدول ۳- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش مرگ گیاهچه‌های کلزا در روش آغشته سازی بذر

تیمار	میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم	درصد تلفات	درصد تأثیر	گروه بندی تیمار [(۱)]
شاهد آلوده	۰/۰۴	۹۶	–	e
شاهد غیرآلوده	۱	–	۱۰۰	a
بنومیل	۰/۸۴	۱۶	۸۰	c
جدایه P1	۰/۷۱	۲۹	۶۷	d
جدایه P2	۰/۸۰	۲۰	۷۶	c
جدایه P3	۰/۹۲	۸	۸۸	b

– اعداد ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار ندارند.

– هر عدد میانگین سه تکرار است.

تولید سیدروفور مربوط به جدایه P3 بود(جدول ۱).

تولید سیانید هیدروژن

بیشترین تولید سیانید هیدروژن مربوط به جدایه P3 و کمترین تولید سیانید هیدروژن مربوط به جدایه P2 بود (جدول ۱).

تولید پروتئاز

جدایه‌ها P1، P2 و P3 تولید پروتئاز کردند. هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری‌ها از نظر اندازه تقریباً با یکدیگر یکسان بودند (جدول ۱).

بررسی گلخانه‌ای تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست برکاهش بیماری مرگ گیاهچه کلزا در روش آغشته سازی خاک و بذر

در روش آغشته سازی خاک کلیه تیمارها از نظر مقایسه میانگین گیاهچه‌های سالم نسبت به شاهد آلوده دارای تفاوت معنی‌دار بودند و باعث کاهش درصد تلفات گیاهچه‌ها شدند. در بین جدایه‌ها، جدایه‌های P3 با ۸۸ درصد و P1 با ۷۴ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در کاهش بیماری داشتند (جدول ۲). در روش آغشته سازی بذر با جدایه‌های آنتاگونیست تیمارها نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بودند و باعث کاهش بیماری شدند. جدایه P3 با ۸۸ درصد و جدایه P1 با ۶۷ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در بازدارندگی بیماری داشتند (جدول ۳).

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

جدول ۴. تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش مرگ گیاهچه‌های کلزا در شرایط خاک غیر سترون

تیمار	میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم	درصد تلفات	درصد تأثیر	گروه بندی تیمار[1]
شاهد آلوده	۰/۰۴	۹۶	–	d
شاهد غیرآلوده	۱	–	۱۰۰	a
بنومیل	۰/۸۰	۱۶	۸۰	b
جدایه P1	۰/۶۸	۲۸	۶۸	c
جدایه P2	۰/۶۵	۳۱	۶۵	c
جدایه P3	۰/۸۰	۱۶	۸۰	b

– اعداد ستون که با حروف یکسان نشان داده شده اند در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار ندارند.
– هر عدد میانگین سه تکرار است.

بررسی در شرایط خاک غیر سترون

جدایه‌ها نسبت به شاهدآلوده اختلاف معنی‌داری داشتند و باعث کاهش بیماری شدند. جدایه P3 با ۸۰ درصد و جدایه P2 با ۶۵ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در کاهش بیماری داشتند (جدول ۴).

بحث

اغلب باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از ریزوسفر کلزا از نظر خواص آنتاگونیستی در آزمایشگاه و گلخانه اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند. گونه *R. solani* در اغلب مناطق جهان به عنوان یکی از عوامل محدودکننده محصولات زراعی مختلف از جمله کلزا محسوب شده و باعث ایجاد خسارت زیادی به محصول می‌شود. خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی جدایه‌های P1، P2 و P3 با خصوصیات ذکر شده برای باکتری گونه *P. fluorescens* توسط شاد و همکاران (۲۰) و فهی و پرسلی (۶) مطابقت داشت. در آزمایش تأثیر آنتی بیوتیک تولید شده از جدایه‌های سودوموناس فلورسنت در محیط کشت PDA مشخص گردید که آنتی بیوتیک تولید شده توسط این باکتری‌ها، باعث بازداری از رشد در مقایسه با شاهد می‌شود. باکتری‌های مولد آنتی بیوتیک‌ها در رقابت برای جذب غذا و اشغال فضا بر دیگر میکروارگانیسم‌ها از بهترین انتخاب در جایگاه اکولوژیکی برخوردار می‌باشند و از همین رو، آنتی بیوز به‌عنوان مکانیسمی مهم و یکی از عوامل تعیین کننده درکنترل بیولوژیک وتسریع رشد گیاه مطرح می‌گردد. در بررسی‌های توماشو و ولر (۲۶) بر مکانیسم‌های اصلی کنترل بیماری پاخوره گندم توسط استرین 2-79 باکتری *P. fluorescens* مشخص شد که آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید نقش اصلی را دارد. در بررسی انجام شده حاضر مشخص گردید، جدایه‌های سودوموناس فلورسنت تولید سیانید هیدروژن کردند. استاتز (۲۴) در تحقیقی مشخص کرد که سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان توتون، با تولید سیانید هیدروژن باعث کنترل بیماری ناشی از *Thielaviopsis basicola* می‌شوند. در بررسی تولید سیدروفور کلیه جدایه‌های سودوموناس فلورسنت تولید سیدروفور کردند. کلوپر و همکاران(۱۴) نخستین بار بر اهمیت سیدروفورها به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم آنتاگونیستی باکتری‌ها علیه بیمارگرهای گیاهی پی بردند. شر و بیکر(۲۱) کنترل بیولوژیک پژمردگی فوزاریومی ترب *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* به وسیله سودوموناس‌های فلورسانت را به تولید سیدروفور توسط باکتری‌ها و رقابت برای یون آهن نسبت دادند. در بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت مشخص گردید، که تمامی جدایه‌ها قادر به بازداری از رشد ریسه‌ای قارچ روی هر دو نوع محیط کشت

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

PDAو NGA هستند. هم‌چنین در بررسی انجام شده مشخص گردید که جدایه‌های آنتاگونیست روی محیط‌های غذایی مختلف تأثیر متفاوتی از نظر میزان تأثیر ترکیبات فرار در بازداری از رشد ریسه‌ای قارچ نشان می‌دهند. کیل و همکاران(۱۲)ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت را به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیماری‌های قارچی می‌دانند. در مورد تولید پروتئاز کلیه جدایه‌ها تولید پروتئاز روی محیط SAM کردند. تولید آنزیم پروتئاز از مکانیسم‌های مؤثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی توسط باکتری‌ها به‌شمار می‌رود (۱۱).

نتایج گلخانه‌ای نشان داد که اغلب جدایه‌ها توانستند در روش آغشته سازی خاک و بذر تأثیر نسبتا یکسانی با قارچکش بنومیل از لحاظ کاهش بیماری داشته باشند.

سپاسگزاری

هزینه این تحقیق با استفاده از اعتبارات طرح نوع ششم معاونت محترم پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تامین شده، که بدین‌وسیله نهایت سپاس به عمل می‌آید. هم‌چنین از آقایان دکتر رحیمیان، دکتر روحانی، دکتر نیک نژاد و دکتر افشاری آزاد به خاطر رهنمودهای ارزنده شان صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. افشاری آزاد، ه. ۱۳۸۱. شناسایی عوامل بیماریزای قارچی کلزا در مناطق مختلف کشور و تعیین اهمیت آنها. مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی.

۲. زمانی، م. ر. ۱۳۶۸. تعیین گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* Kuehn . پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.

3. Alstrom, S.1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant Soil 102: 3-9.
4. Burr, J., M .N. Schroth and T. Suslow. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with spesific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. Phytopathol. 68:1377-1383.
5. Fahy, P.C. and G.J. persley. 1983. Plant Bacterial Disease a Diagnostics Guide. Academic Press., NewYork.
6. Gugle, R.K., S.M. Yitbarek, P.R. Verma, R.A.A. Morall and R.S. Sandasiviah. 1987. Etiology of the *Rhizoctonia* root rot complex of canola in the Peace River region of Alberta.Can Jr of Plant Pathol, 9:119-128.
7. Hagedorn, C., W. D. Gould, and T. R. Bardinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their reprression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55(11): 2793 –2797.
8. Kaiser, W. J., R. M. Hannan and D. M. Weller. 1989. Biological control of seed rot and pre-emergence damping -off of chickpeawith fluorescen t pseudomonads. Soil Biol. Biochem. 21 :269-273.
9. Keel, C., C. Voisard C.H. Berling, G. Kahr and G. Defago. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for suppression of tobbaco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnobiotic conditions Phytopatholgy. 79: 584-589.
10. Keel, C., D. M. Weller, A. Natsch G. Defago, R. J. Cook and L.S. Thomashow. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations. Appl. Environ. Microbiol. 62:552-563.
11. Keel, C. and G. Defago. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. PP. 27-47. *In*: Gange, A. C., V. K., Brown (Eds.), Multitrophic Interactions in Terrestrial System. Oxford, Blackwell Science.
12. Khangura, R. and M. J. Barbetti and M. W. Sweetngham. 1999. Role of *Rhizoctonia* species in damping off of canola. Proceeding of the 10th International Rapeseed. Congress. Canberra, Australia.
13. Klopper, J. W., J. Leong, M. Teintze and M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plantgrowth-promoting rhizobacteria. Nature 286:885-886.
14. Kraus, J. and J. E. Loper. 1990. Biocontrol damping -off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: mechanistic studies. PP. 172-175. *In:* Keel, C., B. Koller and G. Defago (Eds,). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second interational workshop on plant growh promoting rhizobacteria.Interlacen, Switzerland.
15. Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas and G. Defago. 1994. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production .PlantPathol. 44:40-50.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]

16. Ogoshii, A.K. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and interaspecific groups *of Rhizoctonia solani* Kuehn. Ann. Rev. Phytopathol. 23:23-45.
17. Parmeter, J. R. Jr. and H. S. Whitney. 1970. Taxonomy and Nomenclature of the imperfect state. PP. 7-19. *In*: Parmeter, J. R. Jr. (Ed.), Biology and Pathology of *Rhizoctonia solani.* University of California Press, Berkeley.
18. Robert, F.A. and K. Sivasithamparam. 1986. Identity and pathogencity of *Rhizoctonia* spp.associated with bare patcth disease of cereals at a field sitein Western Australia. Neth, J. Plant pathol. 92:185-195.
19. Scher, F.M. and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in Fusarium -suppressive soil. Phytopathol. 70: 412-417.
20. Schaad, N.W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press.
21. Schroth, M.N. and J. G. Hancock. 1982. Disease -suppressive soil and root colonizing bacteria. Science 216-: 1376-1381.
22. Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of sidrophores. Anal. Biopchem. 160:47-56.
23. Stutz, E., G. Defago and H. Kern. 1986. Naturally occuning fluorescent pseudomonad involved in suppression of black root rot tobacco. Phytopathol. 76: 181-185.
24. Sweetngham, M.W. 1996. Integrated contol of *Rhizoctonia* species. PP. 549-558. *In: Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease control. Sneh, B., S. jabaji- Hare, S. Neate and G.Dijst.
25. Tomashow, S. L. and D.M. Weller. 1190. Application of fluorescent pseudomonads to control root diseases of wheat and some mechanisms of disease suppression.*In*: Hornby, D., R.J. Cook, Y. Henis, W.H. Ko, A.D. Rovira, B. Schippers and P.R. Scott. EDS. biological control of soil-borne plant patholons CAB. International Wallingford, Uk.
26. Weller, D. M. and R. J. Cook. 1983. Suppression of take -all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathol. 73 :463-469.
27. Weller, D. M. 1988. Biological control of soillborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26: 379 –407.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1386.11.42.22.1]