Archive of SID

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴ (ص ۳۲۹-۳۱۷)

کنترل بیولوژیک عوامل قارچی عمدهٔ پوسیدگی ریشه و طوقهٔ لوبیا در استان زنجان با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست

آفاق فرجی[1*]، رقیه همتی[2] و علیرضا معرفت[3]
۱ و ۲. کارشناس ارشد و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه زنجان
۳. دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه رازی کرمانشاه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۲۷)

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقهٔ لوبیا ناشی از *Rhizoctonia solan*، *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* از بیماری‌های مهم لوبیا در استان زنجان است. کاربرد عوامل بیوکنترل بومی در تلفیق با روش‌های شیمیایی از روش‌های مدیریت مؤثر برای کاهش خسارات این بیماری است. به دلیل تأثیر هم‌زمان چندین قارچ در ایجاد این بیماری و امکان تأثر سینرژیستی عوامل بیماری‌زا، تأثیربخشی روش‌های مدیریتی بر آلودگی‌های هم‌زمان گیاه، حائز اهمیت و قابل بررسی است. در اوایل مردادماه ۱۳۹۰، جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از ریزوسفر گیاهان لوبیای منطقه انجام گرفت. دو جدایه از هر یک از سه گونهٔ قارچی بیماری‌زا تهیه شد. دو جدایهٔ رایزوباکتریایی با توانایی بالا در تولید آنتی‌بیوتیک، مواد فرار، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز علیه هر سه بیمارگر به عنوان بهترین جدایه‌ها برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. نتایج گلخانه‌ای نشان داد که تیمار بذر با باکتری‌های آنتاگونیست اثر معناداری در کاهش شدت بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی لوبیا در تیمارهای جداگانه و هم‌زمان قارچ‌های بیمارگر داشت. رابطهٔ سینرژیستی بین هر سه بیمارگر اثبات شد. در این میان، اثر سینرژیستی بین *F. oxysporum* و *R. solani* آشکارتر بود. اثر سینرژیستی در علائم برگی آشکارتر از علائم ریشه بود.

واژه‌های کلیدی: اثر سینرژیستی، بیوکنترل، ریزوباکتری، عوامل قارچی، لوبیا.

مقدمه

حبوبات پس از غلات مهم‌ترین منبع غذایی بشر و لوبیا از مهم‌ترین حبوبات جهان محسوب می‌شود. استان زنجان با ۱۹۸۷۰ تن تولید لوبیا، مقام چهاردهم کشوری را در تولید لوبیای آبی در سال ۹۱-۱۳۹۰ به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2014). طبق بررسی‌های انجام‌گرفته در مناطق مختلف کشور، این بیماری‌ها همه ساله خسارت زیادی به کشاورزان تحمیل می‌کنند. در استان زنجان با هدف تعیین اهمیت و فراوانی عوامل پوسیدگی قارچی جداشده از ریشه‌های آلودهٔ لوبیا، *Fusarium solani* از ۵۴/۲٪، *Rhizoctonia solani* از ۴۵/۹٪، *Macrophomina phaseolina* از ۲۶/۵٪ و *Fusarium oxysporum* از ۹/۴٪ نمونه‌ها به دست آمد. بنابراین بیماری پوسیدگی قارچی ریشهٔ لوبیا با سه عامل عمده‌تر، شامل: *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* در استان زنجان حائز اهمیت است (Naseri, 2008). هنگامی که قارچ‌های بیمارگر در زمین مستقر شوند، ریشه‌کنی عملی آنها غیرممکن خواهد بود. باید توجه داشت، زمانی که دو یا بیش از

* تلفن: ۰۹۱۰۲۰۳۰۰۱۲
E-mail: afagh.faraji@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

دو نوع بیمارگر در ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه دخیل باشند، بیماری حاصل اغلب شدیدتر از زمانی است که به‌وسیلهٔ یک بیمارگر ایجاد شود (Fawcett, 1931). وجود رابطهٔ سینرژیستی بین *Pythium ultimum* و *F. solani* f.sp. *phaseoli* و نیز نبود برهم‌کنش بین *R. solani* و *F. solani* f.sp. *phaseoli* و همچنین وجود رابطهٔ آنتاگونیستی بین *R. solani* و *P. ultimum* در گیاه لوبیا تحت شرایط مزرعه نشان داده شده است (Pieczarka & Abawi, 1978). تأثیر سینرژیستی شدت و شیوع بیماری‌های ناشی از *F. oxysporum* و *R. solani* در ریشه‌های سویا اثبات شده است (Datnoff & Sinclair, 1988). لذا برای افزایش کارایی روش‌های مدیریتی، لازم است این روش‌ها روی همهٔ عوامل مهم پوسیدگی ریشه آزمون شوند و تأثیر آنها روی آلودگی‌های هم‌زمان نیز ارزیابی شود. در حال حاضر، کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی یکی از کلیدهای عملی در کشاورزی پایدار محسوب می‌شود، زیرا بر اساس مدیریت طبیعی منابع است (Azcón-Aguilar & Barea, 1996). خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌های *Bacillus* spp. و *P. fluorescens* جداشده از مزارع نخودکاری روی پاتوژن‌های خاک‌زاد از جمله *Pythium ultimum*، *R. solani*، *F. avenaceum* و *Ascochyta pisi* ثابت شده است (Wang *et al*., 2003). از آنجا که تاکنون اثرات متقابل سه بیمارگر قارچی فوق روی لوبیا مطالعه نشده بود و تحقیقی در زمینهٔ اثر عوامل بیوکنترل بر آلودگی هم‌زمان بیمارگرهای فوق در لوبیا وجود نداشت، این پژوهش با هدف مطالعهٔ روابط سینرژیستی سه بیمارگر قارچی ریشهٔ لوبیا و بررسی اثر استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل آلودگی لوبیا توسط این بیمارگرها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ قارچ‌های بیمارگر *F. solani*، *F. oxysporum* و *R. solani*

دو جدایهٔ S7A و J15B از *F. oxysporum*، دو جدایهٔ J30A و N8B از *F. solani* و دو جدایهٔ CM و CN از *R. solani* با بیماری‌زایی بالا، جداشده از ریشهٔ لوبیای مزارع لوبیای استان زنجان از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه زنجان برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱. مختصات جغرافیایی مناطق مختلف نمونه‌برداری در استان زنجان

منطقه	قلعهٔ حسینیه	هیدج	صائین قلعه	نصیرآباد	خیرآباد	عمیدآباد	چرگر	نیماور	یوسف‌آباد
مختصات	۳۹s	۳۹s	۳۹s	۳۹s	۳۹s	۳۹s	۳۹s	۳۹s	۳۹s
جغرافیایی	۰۳۳۴۷۲۵	۰۳۳۲۳۴۹	۰۳۲۵۵۱۹	۰۳۳۱۲۵۴	۰۲۷۸۴۴۸	۰۳۳۱۲۵۴	۰۳۲۱۶۱۵	۰۳۰۲۱۱۴	۰۲۹۷۷۵۵
	۴۰۴۶۷۰۵	۴۰۱۵۷۶۴	۴۰۲۰۸۷۲	۴۰۱۷۰۶۴	۴۰۶۲۲۸۶	۴۰۱۷۰۶۴	۴۰۲۴۸۱۷	۴۰۴۳۰۶۹	۴۰۴۶۷۰۵

تهیهٔ جدایه‌های آنتاگونیست

به منظور جداسازی رایزوباکترهای خاک، در تابستان ۱۳۹۰، از خاک اطراف ریشهٔ لوبیای مناطق مختلف استان زنجان نمونه‌برداری تصادفی با حرکت زیگزاگی صورت گرفت و ریشه‌ها همراه خاک اطراف آنها در پلاستیک‌های مجزا قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل گردید. خاک چسبیده به ریشه‌های بوته‌های لوبیا از سطح ریشه جدا و نمونه‌های هر مزرعه با یکدیگر مخلوط شدند. ۲۵ گرم از هر نمونه خاک درون ارلن حاوی ۲۵۰ سی‌سی آب مقطر ریخته شد. سپس هر یک از آنها برای تهیهٔ سوسپانسیون یکنواخت به‌مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد و سوسپانسیون حاصل، برای ته‌نشین شدن مواد معلق آن، به مدت ۱۵ دقیقه به حالت سکون قرار گرفت. از محلول رویی یک لوپ به روش مخطط روی محیط غذایی NAکشت داده شد و پتری حاصل به انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، هر یک از تک‌کلونی‌های متفاوت رشدیافته، به صورت لکه‌ای روی محیط غذایی NA کشت شدند. با گذشت ۷۲ ساعت، ۴۶ جدایهٔ باکتریایی جداسازی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی روی قارچ‌های *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*)

بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک

برای بررسی اثر بازدارندگی و انتخاب بهترین آنتاگونیست، شش جدایهٔ Ne_1، G_{15}، Ne_{18}، N_{19}، Ch_{28} و Y_{46} به‌عنوان نماینده از گروه‌های رایزوباکتر جداسازی شدند (گروه‌بندی بر اساس مورفولوژی کلونی و مناطق نمونه‌برداری) و به همراه چهار جدایهٔ باکتریایی موفق آنتاگونیست دریافت‌شده از کلکسیون آزمایشگاه باکتری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه زنجان G44، J78، L107 و Q178 علیه قارچ‌های *F. oxysporum*، *F. solani* و *R. solani* به روش Hagedorn *et al.* (1989) در آزمون چهارنقطه‌ای آزمون شدند.

آزمون متابولیت‌های فرار ضدقارچی

ابتدا یک لوپ از هر استرین باکتریایی برداشته شد و به روش کشت مخطط روی محیط نیتریت آگار (NA) پخش شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید، سپس یک حلقه از کشت هفت‌روزهٔ قارچ بیمارگر در وسط محیط کشت PDA تلقیح شد. در شرایط سترون، درب تشتک‌های کشت باکتری و قارچ بیمارگر برداشته و دو تشتک بر روی یکدیگر قرار داده شد و با استفاده از نوار پارافیلم، منفذ میانی تشتک‌ها مسدود گردید. سپس تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند، به‌طوری که تشتک حاوی قارچ بالا قرار گیرد و میزان بازداری از رشد میسلیومی بیمارگر برای هر یک از استرین‌ها اندازه‌گیری شد.

آزمون تولید پروتئاز، سیانید هیدروژن و سلولاز

برای آزمون پروتئاز از روش Fahy & Hayward (1983)، بدین ترتیب استفاده شد: ابتدا لایهٔ نازکی از محیط کشت NA در کف پتری ریخته شد و پس از بستن این محیط، مخلوطی از محیط کشت YNA و Skim milk 10% که طی سه روز متوالی به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب درحال‌جوش استریل شده بود، روی آن ریخته شد و پس از بستن محیط کشت باکتری‌ها به‌صورت لکه‌ای بر روی آن کشت و پتری دیش به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. تشکیل هالهٔ شفاف در اطراف کلونی باکتری نشانهٔ فعالیت پروتئازی باکتری است. برای انجام آزمون تولید سیانیدهیدروژن از روش Alstron (1987) بدین ترتیب استفاده شد: محیط سیانیدهیدروژن تهیه و داخل هر پتری ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید، سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل: دو درصد کربنات سدیم و پنج درصد اسیدپیکریک) در قسمت درب پتری قرار داده شد و درب پتری با نوار پارافیلم مسدود گردید، تا از خروج هرگونه متابولیت فرار و گازی، از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری شود. پتری‌ها به صورت وارونه در انکوباتور با دمای ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته نگهداری شدند. تولید HCNتوسط باکتری با تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به کرم، نارنجی و قهوه‌ای مشخص و ثبت گردید. برای انجام آزمون سلولاز از روش Ahmadzadeh *et al.* (2003)، بدین صورت استفاده شد: درون هر لولهٔ آزمایش نه میلی‌لیتر از محیط سلولاز ریخته شد و در هر کدام، یک کاغذ صافی به ابعاد ۱×۹ سانتی‌متر گذاشته شد، به نحوی که نیمی از کاغذ بیرون از سطح مایع قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به محیط تلقیح و در نمونهٔ شاهد یک میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم ریخته شد و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید. تولید رنگ قهوه‌ای تا ۲۱ روز پس از تلقیح نشان‌دهندهٔ تولید سلولاز تلقی شد.

آزمون‌های افتراقی برای تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست مؤثر

ده جدایهٔ باکتریایی منتخب در تعدادی از آزمون‌های متداول بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نظیر: تست گرم، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز توئین۸۰، هیدرولیز ژلاتین، تولید رنگدانهٔ فلورسنتی روی محیط KB، آزمون فوق حساسیت روی شمعدانی، لهانیدن

www.SID.ir

Archive of SID

سیب‌زمینی، رشد هوازی و بی‌هوازی، شفافیت روی محیط Yeast Dextrose $CaCl_2$ agar، لوان و استفاده از سیترات بررسی شدند (Fahy & Hayward, 1983; Schaad *et al*., 2001).

آزمون‌های گلخانه‌ای

از بین ۱۰ جدایهٔ منتخب، با توجه به توانایی تولید آنتی‌بیوتیک، مواد فرار، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز، دو جدایهٔ L_{107} و Q_{178} به عنوان بهترین جدایه‌ها علیه هر سه بیمارگر قارچ‌های *F. Oxysporum*، *F. solani* و *R. solani* برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. خاک مورد استفاده در آزمایش‌ها شامل: خاک معمولی، کود حیوانی و پرلیت با نسبت ۲:۱:۱ بود. خاک‌ها پیش از استفاده اتوکلاو گردیدند. تیمارها شامل: شاهد سالم، شاهد آلوده *R. solani*، شاهد آلوده *F. solani*، شاهد آلوده *F. oxysporum*، شاهد سالم حاوی باکتری Q_{178}، شاهد سالم حاوی باکتری L_{107}، شاهد آلوده *R. solani+F. solani*، شاهد آلوده *R. solani+F. oxysporum*، شاهد آلوده *F. solani+F. oxysporum*، شاهد آلوده *R. solani+F. solani+F. oxysporum* ، تیمارهای تلفیقی قارچ بودند. باکتری‌ها شامل*R. solani* : و جدایهٔ باکتریایی L_{107}، *F. solani* و باکتری L_{107}، تیمار *F. oxysporum* و باکتری L_{107}، تیمار *R. solani+F. solani* و باکتری L_{107}، تیمار *R. solani+F. oxysporum* و باکتری L_{107}، تیمار *F. solani+F. oxysporum* و باکتری L_{107}، تیمار *R. solani+F. solani+F. oxysporum* و باکتری L_{107}، تیمار *R. solani* و باکتری Q_{178}، تیمار *F. solani*و باکتری Q_{178}، تیمار *F. oxysporum* و باکتری Q_{178}، تیمار *R. solani+F.solani* و باکتری Q_{178}، تیمار *R. solani+F. oxysporum* و باکتری Q_{178}، تیمار *F. solani+F. oxysporum* و باکتری Q_{178}، تیمار *R. solani+F. solani+F. oxysporum* و باکتری Q_{178}، تیمار *R. solani+F. solani+F. oxysporum* و باکتری‌های L_{107} و Q_{178}.

آزمایش‌ها در گلخانه، با دمای ۲۵-۳۰ درجهٔ روز و دمای ۱۶ درجه در شب و با روشنایی ۱۲ ساعت و تاریکی ۱۲ ساعت اجرا شد. گلدان‌ها هر دو روز یک بار آبیاری گردید و در هر گلدان که با حجم ۱۵۰۰ سی‌سی و قطر دهانهٔ ۱۸ سانتی‌متر بود،۲ بذر لوبیا قرمز رقم ناز کاشته شد. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۵ تیمار و در ۴ تکرار انجام گرفت.

تهیهٔ مایهٔ بیمارگر سه قارچ *F. solani*، *F. oxysporum* و *R. solani*

برای تهیه و تلقیح مایهٔ تلقیح دو بیمارگر *F. solani*، *F. oxysporum* از روش Bilgi *et al*. (2008)، با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا مخلوطی از ۴۵ گرم ماسه، ۵ گرم آرد ذرت و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر (در ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری) سه روز متوالی به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو شد و ۶ دیسک یک سانتی‌متری از کشت ۷ روزهٔ مخلوط دو جدایهٔ مهاجم قارچ بیمای‌زا روی محیط کشت PDA درون ظرف حاوی محیط کشت انداخته شد. برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح *R. solani*، ۱۰۰ گرم دانه گندم در ۱۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سه روز متوالی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد اتوکلاو شد و سپس، ۵ دیسک یک سانتی‌متری از کشت ۵ روزهٔ مخلوط ۲ جدایهٔ مهاجم این قارچ روی محیط کشت PDA درون آن انداخته شد (Balali *et al*., 1995). مایهٔ تلقیح‌های آماده‌شده به مدت ۱۰ روز در دمای اتاق قرار گرفتند و هر روز ظرف‌ها خوب تکان داده شد، تا اجازهٔ رشد به قارچ در سراسر محتویات داده شود.

تلقیح مایهٔ بیمارگر سه قارچ *F. solani*، *F. oxysporum* و *R. solani*

برای تلقیح مایهٔ بیمارگر دو قارچ *F. solani* و *F. oxysporum* با خاک مایهٔ تلقیح هر قارچ با نسبت ۱۰:۱ از مخلوط خاک، کود حیوانی و پرلیت استریل با نسبت (۱:۱:۲) مخلوط و پس از پر کردن دو سوم حجم پایینی گلدان‌ها با مخلوط خاک، کود حیوانی و پرلیت به یک سوم حجم فوقانی گلدان اضافه شد (Bilgi *et al*., 2008). برای تلقیح مایهٔ بیمارگر قارچ *R. solani* از روش Balali & Kowsari (2004)، با کمی تغییر استفاده شد؛ به این صورت که ۱۰ گرم

www.SID.ir

Archive of SID

مایهٔ تلقیح *R. solani* به‌صورت یک لایهٔ یکنواخت روی لایهٔ خاک ریخته شد.

آماده‌سازی باکتری‌ها برای تلقیح در گلخانه و آغشته‌سازی بذر به باکتری‌های آنتاگونیست

ضدعفونی سطحی بذور لوبیا با هیپوکلریت سدیم ۱٪ انجام گرفت (Abeysinghe, 2007). آماده‌سازی باکتری‌ها برای تلقیح در گلخانه با استفاده از روش Weller & Cook (1983)، بدین ترتیب انجام گرفت: از کشت ۲۴ ساعتهٔ هر یک از دو باکتری آنتاگونیست Q_{178} و L_{107} روی محیط کشت NA سوسپانسیون کدری در آب مقطر استریل تهیه شد و با تنظیم دستگاه اسپکتوفتومتر مدل S2000 شرکت WPA روی طول موج ۶۰۰ نانومتر OD سوسپانسیون بر روی ۰/۶ تنظیم شد که در این حالت، جمعیت باکتری به $۱-۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی رسید. سوسپانسیون $۱-۵\times۱۰^{۸}$ واحد باکتری همراه با ۰/۱ مولار $MgSO_4$ در شرایط کاملاً استریل برای مایه‌زنی بذور استفاده شد (Scher *et al*., 1983).

صفات تحت ارزیابی

فاکتورهای تحت ارزیابی در آزمون‌های گلخانه‌ای پس از ۳۰ روز رشد لوبیا، شامل: ارتفاع بوته در زمان برداشت از سطح خاک تا نوک بوته (سانتی‌متر)، اندازهٔ طول ریشه (سانتی‌متر)، وزن تر و خشک اندام هوایی (گرم)، وزن تر و خشک ریشه (گرم)، درصد خسارت عامل بیماری‌زا به ریشه و درصد علائم برگی بودند. برای اندازه‌گیری علائم اندام‌های هوایی از روش Hartman *et al*. (1997)، استفاده شد: نبود علائم در اندام‌های هوایی =۰، روشن شدن برگ‌ها با حالت ابلقی و موزائیک (۱-۲۰٪ آلودگی برگی) =۱، علائم متوسط با کلروز و نکروز بین‌برگی (۲۱-۵۰٪ آلودگی برگی) =۲، علائم سنگین با کلروز و نکروز بین‌برگی (۵۱-۸۰٪ آلودگی برگی) =۳، علائم شدید یا کلروز و نکروز بین‌برگی (۸۱-۱۰۰٪ آلودگی برگی) =۴، برای اندازه‌گیری علائم ریشه از روش Kim *et al*. (1997)، استفاده شد: گیاهان سالم بدون هیچ‌یک از علائم آلودگی =۰، کمتر از ۲۰٪ ریشهٔ آلوده‌شده و حداقل یک شانکر قهوه‌ای درشت داشته باشد =۱، حدود ۵۰٪ ریشه دارای شانکر تیپیک باشد =۲، بیش از ۶۰-۷۰٪ ریشه دارای شانکر باشد =۳، مرگ گیاهچه پس از در آمدن از خاک، طول گیاهچه کمتر از ۵ سانتی‌متر باشد =۴، مرگ گیاهچه قبل از در آمدن از خاک یا پوسیدگی بذر =۵.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال‌سازی درصدهای شدت بیماری‌زایی ریشه و اندام‌های هوایی با استفاده از فرمول $Y=$ ArcSin $\sqrt{Y}$ (Y= درصد شدت بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری) انجام گرفت (Little & Hills, 1978). تجزیه و تحلیل آماری داده‌های هشت فاکتور اندازه‌گیری‌شده در این پژوهش، با استفاده از نرم‌افزار SAS ver 9.1.3 انجام گرفت؛ این تجزیه و تحلیل‌ها شامل ANOVA و مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن درسطح پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

در مجموع، ۴۶ جدایهٔ باکتری از مزارع موجود در نه روستا جمع‌آوری گشت که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، از جمله: رنگ، شکل حاشیه، محدب یا مقعر بودن، براق یا کدر بودن و شکل کلی کلنی در مکان‌های نمونه‌برداری روی محیط کشت، گروه‌بندی اولیه شدند و یک جدایه از هر گروه به‌همراه چهار جدایهٔ منتخب دیگر از کلکسیون باکتری‌شناسی دانشگاه زنجان برای انجام آزمون‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند (جدول۲).

توانایی جدایه‌ها در بازدارندگی از رشد قارچ‌ها

تولید هالهٔ شفاف پس از گذشت ۴۸ ساعت در اطراف پرگنهٔ جدایه‌های باکتریایی L_{107}، J_{78}، Q_{178}، G_{44}، Ch_{28}، Ne_{18} و Y_{46} از بین ۱۰ جدایهٔ منتخب نشان‌دهندهٔ تولید پروتئاز توسط این جدایه‌ها بود. همچنین در آزمون تولید سیانید هیدروژن، از بین جدایه‌های آنتاگونیستی تحت بررسی، جدایهٔ Ne_1 با تولید سیانید هیدروژن موجب تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف سیانید هیدروژن از زرد به نارنجی و جدایهٔ L_{107} موجب تغییر رنگ آن از زرد به رنگ آجری گردید، در حالی که هیچ جدایه‌ای قادر به تولید سلولاز نبود (جدول۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. ویژگی‌های فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی باکتری‌های جداشده از فراریشهٔ لوبیا

	واکنش جدایه‌های آنتاگونیست									
	G_{44}	J_{78}	L_{107}	Q_{178}	Ne_1	G_{15}	Ne_{18}	N_{19}	Ch_{28}	Y_{46}
رنگ کلنی	قهوه‌ای	سفید	نارنجی	لیمویی	کرم	کرم	کرم	سفید	سفید	سفید
واکنش گرم	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−
اکسیداز	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−
کاتالاز	+	+	+	++	++	+	+	+	+	++
خصوصیات در محیط YDC	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+
تولید رنگدانه‌های فلورسنت	−	−	+	−	−	−	+	−	−	+
رشد هوازی و بی‌هوازی O/F	F	F	O	F	O	F	O	F	F	F
هیدرولیز توئین ۸۰	+	++	+++	++	++		++	+++	−	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	−	+	−	+	−	+	+	W
پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی	+	+	−	+	+	W	−	−	+	−
تولید لوان	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+
فوق حساسیت روی برگ شمعدانی	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−
سیترات	+	+	+	−	+	+	+	−	−	W
ژلاتین	+	+	−	+	+	+	−	−	+	−
باکتری شناسایی‌شده	*Bacillus* sp.	*Bacillus* sp.	*Pseudomonas fluorescens*	*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas* sp.	*Pseudomonas* sp.	*Bacillus* sp.	*Bacillus* sp.	*Pseudomonas* sp.

جدول ۳. میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ‌های *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* در آزمون کشت متقابل و تولید متابولیت‌های فرار ضدقارچی توسط جدایه‌های باکتریایی بومی استان زنجان

جدایهٔ باکتری	محل نمونه‌برداری	*F. oxysporum*		*F. solani*		*R. solani*	
		آزمون کشت متقابل	آزمون تولید متابولیت فرار	آزمون کشت متقابل	آزمون تولید متابولیت فرار	آزمون کشت متقابل	آزمون تولید متابولیت فرار
G_{44}	خرمدره	+++	+++	++	+++	+++	++
J_{78}	خرمدره	++	−	+++	_	++++	+++
Q_{178}	نصیرآباد	+++	+	+++	+	+++	+++
Ne_{19}	نیماور	_	_	_	_	_	_
Ch_{28}	چرگر	++	+	+++	+	+++	_
G_{15}	قلعه حسینیه	_	+	_	+	_	+
L_{107}	خرمدره	++++	+	++++	+	++++	++
Ne_1	نیماور	+	−	+	−	++	+++
Ne_{18}	نیماور	+	+	+	+	++	_
Y_{46}	یوسف‌آباد	+	−	+	−	+	+

− فاقد بازدارندگی، + بازدارندگی ضعیف (رشد کلونی قارچ)، ++ بازدارندگی متوسط (رشد کلونی قارچ)،+++ بازدارندگی خوب (رشد کلونی قارچ)، ++++ بازدارندگی قوی (رشد کلونی قارچ)*

نتایج نشان‌دهندهٔ مطابقت ویژگی‌های باکتری‌های مختلف، عمدتاً با جنس‌های باکتری‌های سودوموناس و باسیلوس بود (جدول ۲) (Fahy & Hayward, 1983; Schaad *et al.*, 2001). در ادامهٔ آزمایش‌ها، دو جدایهٔ L_{107} و Q_{178} از بین این جدایه‌ها بر اساس بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر در آزمون‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

بازدارندگی از رشد قارچ به عنوان بهترین جدایه‌های آنتاگونیستی انتخاب و در بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به‌کار گرفته شدند. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که جدایهٔ باکتری L_{107} از طریق مکانیزم‌های مختلف باعث لیز و دفرمه شدن هیف‌های عامل بیمارگر می‌گردد. در بررسی تقابل جدایهٔ باکتری Q_{178} با قارچ‌های مذکور، با وجود جلوگیری از رشد بیمارگر، دفرمه شدن بیمارگر مشاهده نشد، اما رشد آنها به میزان شایان توجهی کاهش یافت. در بررسی میکروسکوپی تأثیر قارچ‌های مذکور بر یکدیگر، مشخص شد که هیف‌های قارچ‌های مذکور بدون این که تأثیری بر رشد یکدیگر داشته باشند، از کنار هم عبور می‌کنند و به رشد خود ادامه می‌دهند و رشد قارچ *R. solani* از دو قارچ دیگر بیشتر بوده و در تمام موارد، این قارچ از روی جدایه‌های *F. solani* و *F. oxysporum* گذشت و به انتهای پتری رسید.

نتایج آزمون گلخانه‌ای

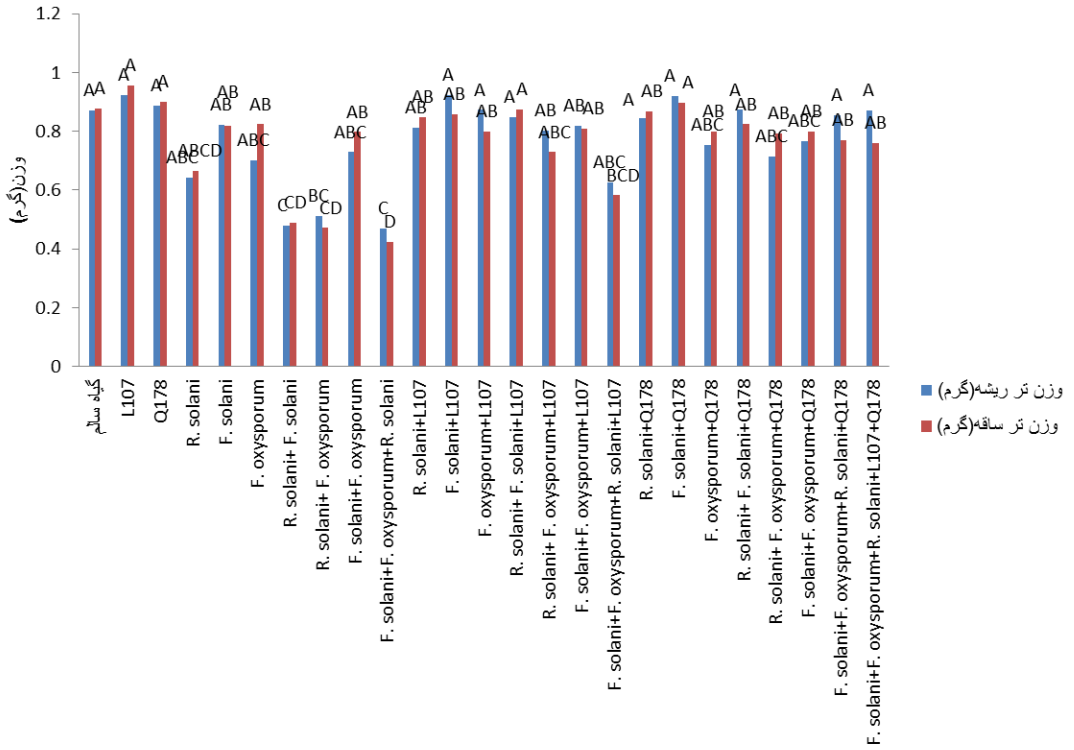
نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای نشان داد که تیمارهای *F. solani+F. oxysporum+R. solani* و *R. solani+ F. solani* بیشترین کاهش را در وزن تر ریشه و تیمار *F. oxysporum+R. solani* از بین تیمارهای اثرات متقابل دوبه‌دو و سه‌تایی قارچ‌های فاقد تیمار باکتری بیشترین وزن تر ریشه را دارا بود. تیمار *F. solani+F. oxysporum+R. solani* بیشترین کاهش را در وزن تر ساقه نشان داد و از بین تیمارهای اثرات متقابل دوبه‌دو و سه‌تایی قارچ‌های فاقد تیمار باکتری بیشترین وزن تر ساقه مربوط به تیمار *F. solani+F. oxysporum* بود (نمودار ۱). تیمار *F. solani+F. oxysporum+R. solani* و *R. solani+ F. solani* و *R. solani+ F. oxysporum* کمترین وزن خشک ساقه را داشتند و از بین تیمارهای اثرات متقابل دوبه‌دو و سه‌تایی قارچ‌های فاقد تیمار باکتری بیشترین وزن خشک ساقه مربوط به تیمار *F. solani+F. oxysporum* بود (نمودار ۲). از نظر درصد خسارت ریشهٔ تیمارهای *F. solani+*L_{107} و *F. oxysporum+*L_{107} و *F. oxysporum+*Q_{178} کمترین میزان و تیمارهای *F. oxysporum+R. solani* و *F. solani+F. oxysporum+R. solani* بیشترین میزان خسارت ریشه را داشتند و از بین تیمارهای اثرات متقابل دوبه‌دو و سه‌تایی قارچ‌های فاقد تیمار باکتری کمترین خسارت ریشه مربوط به تیمار *F. solani+F. oxysporum* بود. تیمارهای *F. solani+F. oxysporum+R. solani* و پس از آن، تیمار *F. oxysporum+R. solani* بیشترین خسارت برگی و تیمارهای *R. solani+*L_{107} و *F. oxysporum+* L_{107} کمترین خسارت برگی را داشتند و از بین تیمارهای اثرات متقابل دوبه‌دو و سه‌تایی قارچ‌های فاقد تیمار باکتری کمترین خسارت برگی مربوط به تیمار *F. solani+F. oxysporum* بود (نمودار ۳). زمانی که هر دو باکتری با هم با سه قارچ به‌طور هم‌زمان به‌کار رفتند، به میزان مطلوبی قادر به کاهش خسارت روی وزن تر ریشه، ساقه و وزن خشک ساقه بودند (نمودارهای ۱ و ۲).

عوامل بیوکنترل باکتریایی با تولید متابولیت‌های خارج سلولی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفورها، مواد فرار و مکانیزم‌هایی مانند کلونیزه کردن ریشه، ایجاد مقاومت القایی و تحریک رشد گیاهی در کاهش بیمارگرهای گیاهی نقش دارند. اهمیت نسبی هر یک از مکانیزم‌ها بر اساس شرایط ریزوسفر و همچنین در میان استرین‌ها تا حد زیادی متفاوت است و در این میان، آنتی‌بیوتیک‌ها یک نقش اساسی را در کاهش بیماری توسط باکتری‌ها ایفا می‌کنند (Weller, 1988). از نظر تولید آنتی‌بیوتیک در پتری هم‌اندازهٔ قطر هالهٔ بازدارندگی تا روز پنجم و هفتم بررسی شد و نهایتاً در روز پنجم و هفتم، دیگر رشد میسلیوم قارچ مشاهده نشد و این به معنای تولید میزان آنتی‌بیوتیک بیشتر با گذشت زمان است. بنا بر تحقیقات Xu & Gross (1986)، قطر هالهٔ بازدارندگی ایجادشده در شرایط آزمایشگاه شاخص قابل اعتمادی نیست، زیرا این هاله بیش از آنکه تابع میزان مواد ممانعت‌کنندهٔ تولیدی باشد، تابع تحرک آنها است. این تحرک می‌تواند با قطبیت و اندازهٔ مولکولی ترکیبات تولیدی مرتبط باشد و همچنین برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط خاک ممکن است به سرعت تجزیه و غیرفعال شوند، چون محیط کشت فضای بسته‌ای است و ممکن است با گذشت زمان، غلظت مواد مترشحهٔ باکتری در آن بالا

www.SID.ir

Archive of SID

رود و ضمن نفوذ در محیط کشت، از رشد عوامل بیماری‌زا جلوگیری کند، ولی در طبیعت احتمال تجزیهٔ این مواد به‌وسیلهٔ دیگر مایکروارگانیسم‌ها، یا شسته شدن به‌وسیلهٔ آب آبیاری وجود دارد. یک ایزوله در صورتی اثر آنتاگونیستی خوبی در طبیعت خواهد داشت که بتواند با شرایط طبیعی محیط سازگار شود. آزمایش‌های Omati *et al.* (2004)، تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های *P. fluorescens* را در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. capsici* نشان داد. ترشحات تولیدشدهٔ جدایه‌های ۱۰۸۳ و D از گونهٔ *P. fluorescens* به‌ترتیب ۳۰ و ۴۳ درصد از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کرد. تأثیر متابولیت‌های فرار ایزوله‌های سودوموناس در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* نشان داد که همهٔ جدایه‌ها به میزان زیادی مانع از رشد قارچ فوق گردیدند و تولید سیانید هیدروژن و دی‌اکسیدکربن از عوامل اصلی جلوگیری از فعالیت بیمارگر تشخیص داده شد. در این آزمون نیز جدایه‌های *Bacillus* sp. *Pseudomonas* ،*Pseudomonas* sp. (Q_{178}) ،(G_{44}) ،*Pseudomonas* sp. (Ne_1) ،*fluorescens* (L_{107}) ،*Bacillus* sp. (Ch_{28}) ،*Bacillus* sp. (J_{78}) *Pseudomonas* sp. (Ne_{18}) و *Pseudomonas* sp. (Y_{46}) در تولید مواد فرار پاسخ مثبت دادند. با استفاده از روش Castric & Castric (1983)، مشخص شد که یکی از ترکیبات فرار *P. fluorescens* گاز سیانید هیدروژن است، هر چند که ترکیبات فرار دیگری مانند آلدهیدها نیز ممکن است تولید شود. در آزمون تولید سیانید هیدروژن از باکتری‌های مورد استفاده در شرایط آزمایشگاه جدایهٔ *Pseudomonas* sp. (Ne_1) و *Pseudomonas fluorescens* (L_{107}) تولید سیانید هیدروژن کردند و کاغذ صافی آغشته به معرف را به رنگ زرد و آجری درآوردند و همان‌طور که انتظار می‌رفت، هیچ یک از ایزوله‌های *Bacillus* تولید سیانید هیدروژن نکردند و نتیجهٔ حاصل از این آزمایش با کارهای ایشان مطابقت داشت.



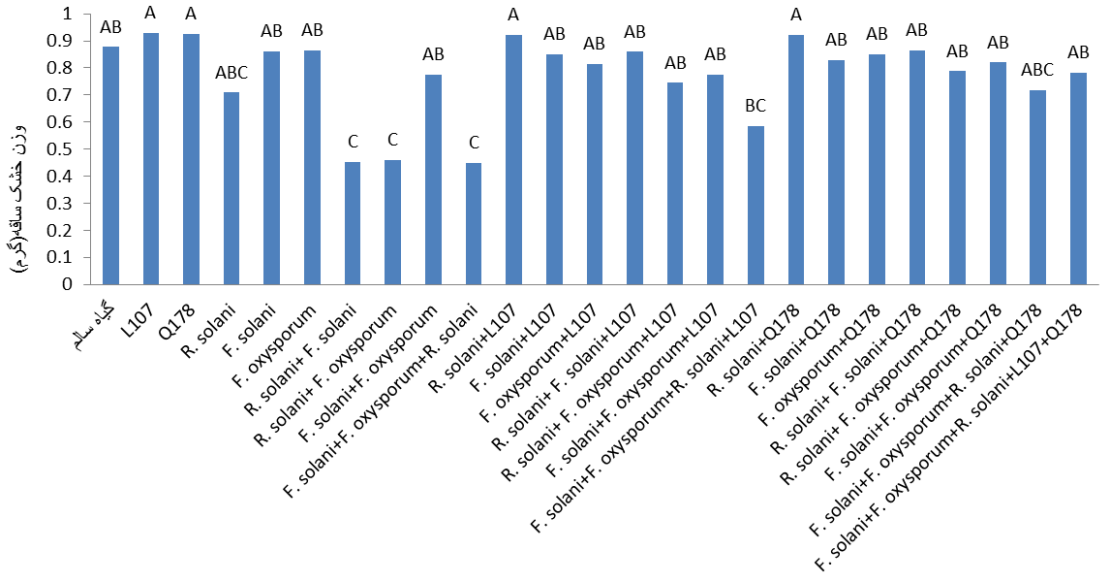
تیمارها شامل: باکتری های L107, Q178 و قارچ های *F. solani, F. oxysporum, R. solani*

نمودار ۱. مقایسهٔ میانگین تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست روی وزن تر ریشه (گرم) و وزن تر ساقه (گرم) در تیمار لوبیا با قارچ‌های *Fusarium solani+Fusarium oxysporum+Rhizoctonia solani*.

میانگین‌هایی که با حروف مشابه در هر ستون نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنادار ندارند.

www.SID.ir

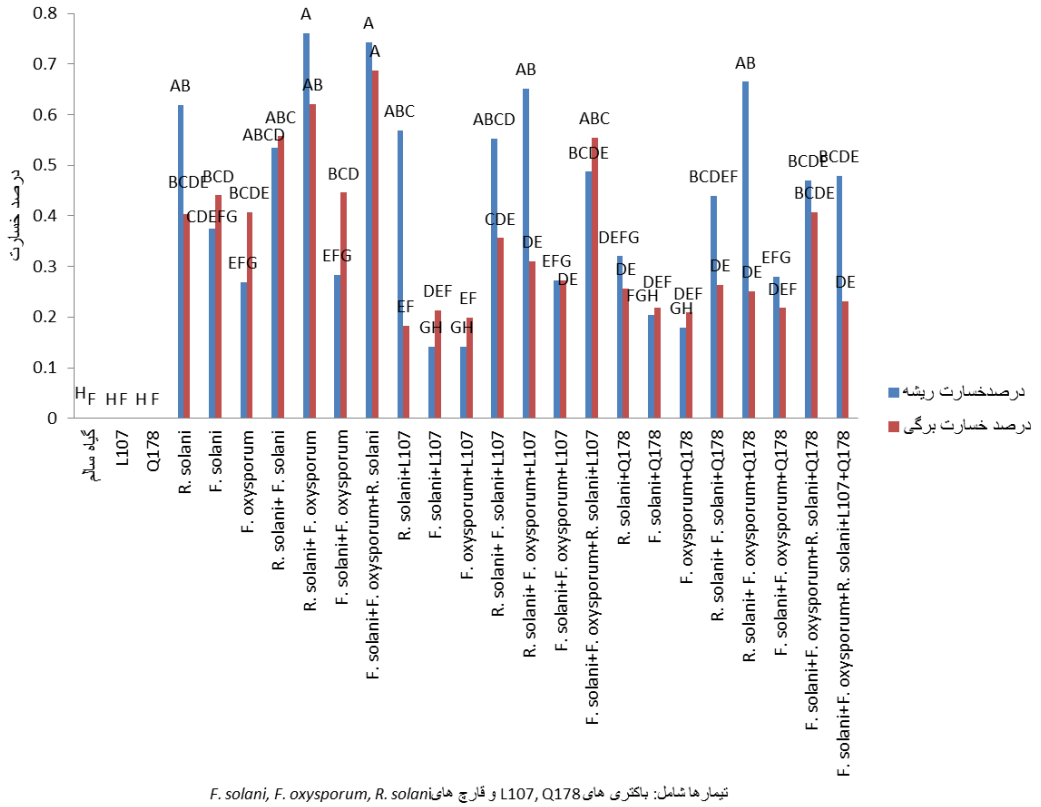
Archive of SID



تیمارها شامل: باکتری های L107, Q178 و قارچ های *F. solani, F. oxysporum, R. solani*

نمودار ۲. مقایسهٔ میانگین تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست روی وزن خشک ساقه (گرم) در تیمار لوبیا با قارچ‌های *Fusarium solani+Fusarium oxysporum+Rhizoctonia solani*.

میانگین‌هایی که با حروف مشابه در هر ستون نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنادار ندارند.



تیمارها شامل: باکتری های L107, Q178 و قارچ های *F. solani, F. oxysporum, R. solani*

نمودار ۳. مقایسهٔ میانگین تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست روی درصد خسارت ریشه و درصد خسارت برگی در تیمار لوبیا با قارچ‌های *Fusarium solani+Fusarium oxysporum+Rhizoctonia solani*.

میانگین‌هایی که با حروف مشابه در هر ستون نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن با یکدیگر اختلاف معنادار ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیت‌های ثانویه از جمله آنزیم‌ها نقش عمده‌ای در جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا دارند. Sunish Kumar *et al.* (2005)، نقش آنزیم‌های تخریب‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی مثل سلولاز، پروتئاز و کیتیناز در فعالیت‌های آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی را ثابت کرده‌اند. جدایهٔ *P. fluorescens*pft-8 که Jayaraman *et al.* (2007)، آن را از ناحیهٔ ریشهٔ گوجه فرنگی جدا کرد، قادر به تولید سطوح بالای کیتیناز، بتا- یک و سه گلوکوناز، سلولاز، متابولیت‌های ضدقارچی و سیدروفور است. در بررسی Ahmadzadeh *et al.* (2003)، از ۴۱ جدایهٔ سودوموناس که بررسی شده بودند، تنها یک جدایه قادر به تولید آنزیم پروتئاز نبود. جدایه‌های *P. aeroginosa* PUPa3 و *P. corrugate* P94 نیز عکس‌العمل مثبتی در تولید پروتئاز نشان دادند، ولی قادر به تولید سلولاز نبودند (Sunish Kumar *et al.*, 2005). در آزمون‌های آزمایشگاهی نیز تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه‌های *Bacillus* sp. (G44)، *Bacillus* sp. (Ch28)، *Pseudomonas* sp. (Ne18)، *Pseudomonas* sp. (Y46)، *Pseudomonas fluorescens* (L107) و *Pseudomonas* sp. (J78) و *Pseudomonas* sp. (Q178) به اثبات رسید. Weller (1988)، اظهار داشت با توجه به اینکه تولید مواد بازدارنده در استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاهی به فاکتورهایی از قبیل نوع قند و اسیدآمینهٔ موجود در محیط غذایی و نیز به عمق آگار، مقدار مایهٔ 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 مادهٔ بازدارنده تولید شود، اما با توجه به شرایط کشت، نشت مادهٔ بازدارنده تولیدشده در آگار محسوس نباشد. در این تحقیق، باکتری‌های منتخب از نظر مکانیزم‌های مختلف بیوکنترلی در محیط‌های مختلف غذایی بررسی شدند. بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ در آزمون‌های آزمایشگاهی مربوط به باکتری L_{107} بود، در حالی که در آزمون‌های گلخانه‌ای باکتری Q_{178} در افزایش وزن تر ریشه و ساقه موفق‌تر بود. اما دربارهٔ قارچ *F. solani* هر دو باکتری به یک میزان بر وزن تر ریشه و فقط باکتری L_{107} به‌طور معناداری بر وزن تر ساقه مؤثر بود. دربارهٔ قارچ *F. oxysporum* باکتری L_{107} به‌طور معناداری موجب افزایش وزن تر ریشه شد. در زمینهٔ علائم خسارت برگی، باکتری L_{107} به‌طور معناداری موفق‌تر از باکتری Q_{178} در کاهش علائم خسارت ناشی از قارچ *R. solani* و همچنین تیمار لوبیا با قارچ *F. oxysporum* عمل کرد، در حالی که هر دو باکتری به یک اندازه در کاهش علائم خسارت ناشی از قارچ *F. solani* عمل کردند. تیمار هم‌زمان دو قارچ *R. solani+F. oxysporum* و همچنین تیمار *F. solani+F. oxysporum* با باکتری Q_{178} افزایش معناداری در وزن تر ریشه نداشت، در حالی که تیمار باکتری Q_{178} با *R. solani* و همین‌طور تیمار باکتری Q_{178} با *F. solani* موجب افزایش معناداری در وزن تر ریشه در مقایسه با تیمار فاقد باکتری شد، اما تیمار باکتری Q_{178} با *F. oxysporum* موجب افزایش معناداری در وزن تر ریشه نشد. تیمار قارچ‌های *R. solani+F. solani* با هر یک از باکتری‌های L_{107} و Q_{178} به‌طور معناداری باعث افزایش وزن تر ریشه در مقابل تیمار فاقد هر باکتری شد. تیمار *R. solani+F. solani* و همچنین تیمار *F. solani+F. oxysporum* با باکتری Q_{178} در کاهش علائم خسارت برگی قوی‌تر از باکتری L_{107} عمل کرد. تیمار هر یک از باکتری‌ها با قارچ‌های *R. solani+F. oxysporum* به یک میزان در رفع علائم خسارت برگی عمل کردند. در آلودگی هم‌زمان سه قارچ مذکور، باکتری Q_{178} به‌طور معناداری قوی‌تر از باکتری L_{107} در افزایش وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه و کاهش علائم خسارت برگی عمل کرد. تیمار هم‌زمان سه قارچ بیماری‌زا با دو باکتری به‌طور هم‌زمان، به‌طور معناداری موجب افزایش وزن خشک ساقه و کاهش علائم خسارت برگی نسبت به تیمار جداگانهٔ هر یک از باکتری‌ها شد. دربارهٔ تأثیر تیمار باکتری‌ها بر علائم خسارت ریشهٔ ناشی از قارچ‌ها، باکتری Q_{178} به‌طور معناداری بهتر از باکتری L_{107} موجب کاهش آلودگی

www.SID.ir

Archive of SID

ناشی از *R. solani* شد و دربارهٔ قارچ *F. solani* بالعکس است. در حالی که در آلودگی هم‌زمان این دو قارچ، باکتری Q_{178} به‌طور معناداری مؤثرتر عمل کرده است و دربارهٔ قارچ *F. Oxysporum* هر دو باکتری به یک میزان موجب تخفیف علائم خسارت ریشه شدند. هر دو باکتری به یک میزان قادر به کاهش علائم خسارت ریشهٔ ناشی از تیمار *R. solani+F. oxysporum* بودند. هیچ‌یک از باکتری‌ها قادر به تخفیف این علائم در تیمار هم‌زمان دو قارچ *F. solani+F. oxysporum* نبودند. در آلودگی هم‌زمان سه قارچ بیمارگر با دو باکتری آنتاگونیست، تیمار دو باکتری همراه یکدیگر و تیمار جداگانهٔ هر یک از باکتری‌ها، به یک میزان قادر به کاهش علائم خسارت ریشه بودند.

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 غیربومی عمل می‌کند و لذا هر نوع دست‌کاری 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 بررسی می‌شود، بسیار قدرتمند ظاهر شود، اما قادر به استقرار در ریزوسفر گیاه نباشد. بدین ترتیب اهمیت انتخاب جدایه‌های بومی در این تحقیق آشکار می‌شود. گر چه کاربرد جداگانه و هم‌زمان جدایه‌های باکتریایی L_{107} و Q_{178} برای بررسی تأثیر آنتاگونیستی‌شان بر علائم خسارت ریشه و برگی در اغلب موارد، نشان‌دهندهٔ کاهش معنادار علائم بیماری در تیمارهای جداگانهٔ هر سه بیمارگر بود، اما از سویی دیگر، کاربرد این باکتری‌ها علیه تیمارهای آلودهٔ مخلوط بیمارگرها (در آلودگی هم‌زمان با دو یا سه بیمارگر) ضمن اینکه موجب کاهش معنادار علائم برگی شد، تأثیر معناداری بر کاهش میزان خسارت ریشه داشت. در کاهش علائم اندام‌های هوایی، در آلودگی‌های هم‌زمان، جدایهٔ L_{107} بهتر از جدایهٔ Q_{178} عمل کرده است. از سویی دیگر، کاربرد مخلوط دو جدایهٔ باکتریایی علیه بیماری حاصل از مخلوط سه بیمارگر موجب کاهش معنادار علائم اندام‌های هوایی در مقایسه با کاربرد جداگانهٔ باکتری‌ها شده است که این امر لزوم استفاده از مخلوط عوامل بیوکنترل را برای حصول نتایج بهتر آشکار می‌کند.

به‌طور کلی، میزان خسارت ریشه در تیمارهای فوزاریومی (آلودگی با یک یا دو گونه فوزاریوم) به‌طور معناداری کمتر از تیمارهای رایزوکتونیا + فوزاریوم (یک یا دوگونه) و رایزوکتونیا بود. این نتیجه می‌تواند نشان‌دهندهٔ تأثیر سینرژیستی بین عوامل قارچی و افزایش علائم خسارت ریشه در آلودگی‌های مخلوط دربرگیرندهٔ قارچ رایزوکتونیا باشد. شایان ذکر است که اثر سینرژیستی بر خسارت ریشه در آلودگی رایزوکتونیا + *F. oxysporum* بارزتر از این اثر در آلودگی رایزوکتونیا + *F. solani* بود. Datnoff & Sinclair (1988)، هم اثر سینرژیستی در شدت بیماری حاصل از *R. solani* و *F. oxysporum* را در سویا اثبات کردند. در حالی‌که Pieczarka & Abawi (1978)، برهم‌کنشی بین دو بیمارگر *R. solani* و *F. solani* در لوبیا تحت شرایط مزرعه مشاهده نکردند. وجود تیمار *F. solani+R. solani* در گروهی مجزا و پایین‌تر از تیمار *R. solani* و بالاتر از *F. solani* نشان‌دهندهٔ آن است که حضور این دو قارچ در کنار یکدیگر برای قارچ *F. solani* دارای تأثیر سینرژیستی است و برای قارچ *R. solani* نه‌تنها اثر سینرژیستی ندارد، بلکه حتی موجب کاهش آلودگی ناشی از آن هم می‌شود که می‌تواند به دلیل رقابت برای تسخیر بافت میزبان باشد. خسارت ریشه در تیمار *F. solani+F. oxysporum* در مقایسه با تیمار *F. oxysporum* بیشتر ولی بدون اختلاف معنادار بوده و در مقایسه با تیمار *F. solani* کمتر و با اختلاف معنادار است. چنین نتیجه‌ای نه‌تنها حاکی از نبود اثر سینرژیستی بین دو گونه فوزاریوم بر علائم ریشه است، بلکه حتی نشان از تخفیف علائم ریشه‌ای ناشی از گونهٔ *F. solani* در آلودگی مخلوط با گونهٔ فوزاریومی دیگر دارد. از سویی دیگر، کاهش معنادار خسارت ریشه در تیمار *F. solani+R. solani* در مقایسه با تیمار *R. solani* و افزایش معنادار آن در مقایسه با تیمار *F. solani* بدین معنا است که آلودگی هم‌زمان این دو قارچ می‌تواند تأثیر کاهشی بر پیشرفت قارچ *R. solani* و تأثیر افزایشی بر علائم قارچ *F. solani* داشته باشد. به‌طور خلاصه، باید گفت اثر سینرژیستی زمانی برقرار است که

www.SID.ir

Archive of SID

میزان بیماری در آلودگی هم‌زمان بیشتر از میزان بیماری در آلودگی جداگانه عوامل بیماری‌زا باشد و چنین حالتی تنها در دو تیمار *F. solani+F. oxysporum+R. solani* و *F.oxysporum+R. solani* قابل مشاهده بود. در این دو حالت نیز شدت اثر سینرژیستی بر علائم فوزاریومی بالاتر از علائم رایزوکتونیایی بود. به‌طوری که علی‌رغم بالاتر بودن خسارت ریشه در این دو تیمار، بین آنها و تیمار رایزوکتونیا اختلاف معناداری وجود نداشت. از سوی دیگر، نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای به‌خوبی اثرات سینرژیستی بین عوامل سه‌گانهٔ بیمارگر را در بررسی علائم اندام‌های هوایی اثبات کرد. تیمار *F. solani+F. oxysporum+R. solani* با قرارگیری در یک گروه جداگانه، بیشترین خسارت اندام هوایی (برگی) را به خود اختصاص داده و پس از آن، تیمارهای آلودگی‌های دوگانه (با دو عامل بیماری‌زا) همگی در یک گروه آماری مجزا قرار گرفتند که با آلودگی‌های جداگانه عوامل بیماری‌زا (به‌جز *F. solani*) تفاوت معنادار داشتند. بدین ترتیب، وجود رابطهٔ سینرژیستی بین عوامل بیماری‌زا در علائم اندام‌های هوایی بارزتر از خسارت ریشه بود.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه اهمیت جدایه‌های باکتریایی *Bacillus* sp. و *P. fluorescens* را در کنترل عوامل قارچی پوسیدگی ریشهٔ لوبیا در آزمایشگاه نشان داد. در این پژوهش، دو جدایهٔ مختلف باکتریایی *P. fluorescens* و *Pseudomonas* sp. تحت مطالعه قرار گرفتند که هر دوی آنها موجب کاهش شدت ظهور بیماری پژمردگی، پوسیدگی و مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از *R. solani*، *F. solani* و *F. oxysporum* در شرایط گلخانه شدند. به‌طور کلی در جلوگیری از ایجاد علائم خسارت برگی بیمارگر، هر دو باکتری به یک میزان مؤثر بودند. در جلوگیری از ایجاد علائم خسارت ریشه، باکتری Q_{178} به‌طور معناداری موفق‌تر از باکتری L_{107} عمل کرد. نکتهٔ شایان توجه در نتایج این تحقیق آن بود که کنترل آلودگی فوزاریومی لوبیا توسط دو باکتری موفق‌تر از کنترل تیمارهای دارای رایزوکتونیا بود. این نتیجه نشان می‌دهد که عوامل باکتریایی به‌کاررفته در این پژوهش در مدیریت پوسیدگی فوزاریومی قابل استفاده‌اند، اما برای حصول موفقیت در مدیریت بیماری در آلودگی هم‌زمان فوزاریومی و رایزوکتونیایی لازم است عوامل بیوکنترل دیگری اعم از باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌صورت تلفیق با جدایه‌های باکتریایی این پژوهش به‌کار گرفته شوند، تا نتایج رضایت‌بخشی حاصل شود. باید توجه داشت که اگرچه کنترل بیولوژیک توسط ریزوباکتری‌های افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه (PGPR) دستاوردی قابل قبول است، اما مقدار ثبت عوامل کنترل زیستی برای استفادهٔ تجاری بسیار کم است. تکنولوژی هنگامی پویا می‌شود که یافته‌های آزمایشگاهی به مزرعه منتقل شوند (Nakkeeran *et al*., 2005). پس به منظور دستیابی به کشاورزی پایدار، باید سعی در شناسایی میکروارگانیسم‌های مفید اعم از قارچ‌ها و باکتری‌ها داشت و در زمینهٔ فیزیولوژی و فراورده‌های آنها با تلاش لازم و سرمایه‌گذاری هر چه بیشتر، تحقیقاتی را به انجام رساند.

REFERENCES

1. Abeysinghe, S. (2007). Biological control of *Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU0. *Ruhuna Journal of Sciences*, 2, 82-88.
2. Ahmadzadeh, M., Sharifi-Tehrani, A., Hejaroud, G.A., Zad, J., Okhovat, M. & Mohammadi, M. (2003). Effects of Fluorescent Pseudomonads on *Pythıum ultımum* casual agent of seed rot of common bean. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 34(4), 793-807. (in Farsi)
3. Alstron, S. (1987). Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil*, 102, 3-9.
4. Anonymous. (2014). Statistical year book of Agriculture. Ministry of Jihade Agriculture. Available at: http://amar.maj.ir/Portal/File/ShowFile.aspx?ID=dc3a745e-6a35-4912-a6cd-edabe7d66b764. (in Farsi)
5. Azcón-Aguilar, C. & Barea, JM. (1996). *Arbuscular mycorrhizas* and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, 6, 457-464.
6. Balali, GR. & Kowsari, M. (2004). Pecticzymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahn, Iran. *Mycopathologia*, 158, 377-384.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Balali, GR., Neatef, SM. & Scott, DL. (1995). Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia. Plant Pathology*, 44, 1050-1057.
8. Bilgi, VN., Bradley, CA., Khot, SD., Grafton, KF. & Rasmussen, JB. (2008). Response of dry bean genotypes to Fusarium root rot, caused by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, under field and controlled conditions. *Plant Disease*, 92, 1197-1200.
9. Castric, KF. & Castric, P. (1983). Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 45, 701-702.
10. Datnoff, LE. & Sinclair, JB. (1988). The interaction of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* in causing root rot of soybeans. *Phytopathology*, 78, 771-777.
11. Fahy, PC. & Hayward, AC. (1983). *Media and Methods for isolation and diagnostic test. In Plant bacterial diseases a diagnostic guide* (Eds.). Academic Press Sydney Publishing.
12. Fawcett, HS. (1931). The importance of investigations on the effects of known mixtures of organisms. *Phytopathology*, 21, 545-548.
13. Hagedorn, C., Gould, WD. & Bradinelli, RT. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2793-2797.
14. Hartman, GL., Huang, YH., Nelson, RL. & Noel, GR. (1997). Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. *Plant Disease*, 81, 515-518.
15. Jayaraman, J., Parthasarathi, T. & Radhakrishnan, NV. (2007). Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off. *Biocontrol*, 52, 683-702.
16. Kim, DS., Cook, RJ. & Weller, DM. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87, 551-558.
17. Little, TM. & Hills, FJ. (1978). Agricultural experimentation: design and analysi (pp. 368). *John Wiley and Sons Publishing*, New York.
18. Nakkeeran, S., Renukadevi, P. & Marimuthu, T. (2005). Antagonistic potentiality of *Trichoderma viride* and assessment of its efficacy for the management of cotton root rot. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38, 209-225.
19. Naseri, B. (2008). Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. *Australasian Plant Pathology*, 37, 546-551.
20. Omati, F., Sharifi-Tehrani, A., Mohammadi, M., Hedjaroud, G.A. & Zad, J. (2004). Antagonistic effects of Bacillus and Peseudomonas isolates on *Phytophthora capsici* the causal agent of pepper damping-off. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 4, 45-52. (in Farsi)
21. Pieczarka, DJ. & Abawi, GS. (1978). Effect of interaction between *Fusarium, Pythium* and *Rhizoctonia* on severity of bean root rot. *Phytopathology*, 68, 403-408.
22. Schaad, NW., Jones, JB. & Chun, W. (2001). *Laboratory guid for identification of plant pathogenic bacteria*. (3rd ed.). St. Paul, MN, APS Press Publishing.
23. Scher, FM., Zeigle, JS. & Kloepper, JW. (1983). A method for assaying the root colonizing capacity of bacteria on maize. *Canadian Journal of Microbiology*, 69, 686-690.
24. Sunish Kumar, R., Ayyadurai, N., Pandiaraja, P., Reddy, AV., Venkateswarlu, Y., Prakash, O. & Sakthive, N. (2005). Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeroginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *Journal of Microbiology*, 98, 145-154.
25. Wang, H., Hwang, SF., Chang, KF., Turnbull, GD. & Howard, RJ. (2003). Suppression of important pea diseases by bacterial antagonists. *Biocontrol*, 48, 447-460.
26. Weller, DM. & Cook, RJ. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent Pseudomonads. *Phytopathology*, 73, 463-469.
27. Weller, DM. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 379-407.
28. Xu, GW. & Gross, DC. (1986). Field evaluation of the interactions among *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* and potato. *Phytopathology*, 76, 423-430.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Journal of Plant Protection, Vol. 46, No. 2, Autumn & Winter 2015-2016

Biological control of major fungal causal agent of root and crown rot of bean in Zanjan province with antagonistic bacteria

Afagh Faraji[1*], Roghaye Hemmati[2] and Alireza Marefat[3]

1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran

(Received: Dec. 27, 2014 - Accepted: Oct. 19, 2015)

ABSTRACT

Root and crown rot of bean caused with *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*, is one of the important diseases of bean in Zanjan province. Using native biocontrol agents integrated with chemical agents is one of the effective management strategies. This is also important to choose control methods effective against all major fungal pathogens and mixed contamination of bean, with them. This research was conducted to study synergistic effect of three major fungal pathogens and biocontrol effects of some native rhizobacteria on disease. During the mid-summer of 2011, 46 bacterial isolates were obtained from bean rhizosphere in Zanjan bean fields. Two isolates of each three fungal species (pathogenic on bean) were also received from mycology collection of Zanjan University. Two isolates of Rhizobacteria were chosen as the best biocontrol agents against all three fungi in terms of production of antibiotic, volatile metabolites, HCN and protease and selected for in-vitro antagonistic experiments. Greenhouse results showed that, seed treatment of bean with bacteria, decreased the disease and increased some vegetative factors of the plant. There was synergistic effect among the fungal species.

Keywords: synergistic effect, biocontrol, rhizobacteria, fungal agent, bean.

* Corresponding author E-mail: afagh.faraji@gmail.com Tel: +98 910 2030012

www.SID.ir