بررسی قابلیت کنترل کنندگی برخی ازجدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* روی مرگ گیاهچه پنبه در شرایط مزرعه

حجت ا... محمودجانلو- سعید نصرالله نژاد * - اصغر حیدری[1]

تاریخ دریافت:۸۶/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۱۲

چکیده

یکی از مهمترین بیماریهای پنبه در ایران که هر ساله خسارت جبران ناپذیری به کشت این گیاه در مرحله جوانه زنی بذر ودر ابتدای رشد گیاهچه‌ها می‌زند، بیماری مرگ گیاهچه پنبه است.مهمترین عوامل این بیماری قارچهای *Pythium* spp و *Rhizoctonia solani* می‌باشند. در این تحقیق امکان کنترل بیولوژیکی این بیماری در شرایط مزرعه با استفاده از باکتریهای آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت. تعداد پنج جدایه باکتری (۳ جدایه ازگونه *Pseudomonas fluorescens* و ۲ جدایه متعلق به جنس*Bacillus* spp) بر اساس مطالعه کار آیی آنها در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه انتخاب شدند و دو تیمار قارچکشهای رایج کاربوکسین تیرام و کاربندازیم ویک تیمار شاهد در مجموع با هشت تیمار فرعی و دو تیمار اصلی با طرح آماری کرتهای یک بار خرد شده[2] دردو سال زراعی ۱۳۸۱و۱۳۸۲ با روش پوشش بذری[3] در چهار تکرار تحت بررسی قرار گرفتند.تاثیرجدایه‌ها و قارچکشها بر اساس تعدا گیاهچه‌های سالم ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ روز بعد از کشت انجام گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که جدایه (Q42) از گونه *Pseudomonas fluorescens*در دو رقم (ساحل و سای اکرا)و جدایه های GM-5 وGM-4 از جنس*Bacillus* spp بترتیب در ارقام سای اکرا و ساحل به همراه قارچکشهای کاربندازیم وکاربوکسین تیرام بیشترین تاثیر را از نظر حفاظت گیاهچه هادر مقابل بیماری مرگ گیاهچه داشتند. نتایج بدست آمده برای دو رقم مورد استفاده و سالهای مختلف اندکی متفاوت بود که البته این تفاوتها از نظر آماری معنی دار نبودند. نتایج کلی این آزمایش نوید بخش این امر است که ممکن است بتوان قارچکشهای شیمیایی را با باکتریهای آنتاگونیست جهت کنترل بیماری مرگ گیاهچه در مزرعه جایگزین نمود که هم مقرون به صرفه تر بوده و هم برای محیط زیست کم خطر تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : پنبه، سودوموناس، باسیلوس، کنترل بیولوژیک، مرگ گیاهچه، پیتیوم، رایزوکتونیا

مقدمه

بیماری مرگ گیاهچه یکی از مهمترین بیماریهای پنبه بوده و مهمترین عوامل این بیماری قارچهای .*Pythium spp* و *Rhizoctonia solani* میباشند. (۱۴). این بیماری که در ابتدای رشد بوته‌ها حادث می‌شود دارای دوحالت بوده که یکی قبل از سر بر آوردن بوته از خاک[4] می‌باشد که ریشه چه و ساقه چه در هنگام جوانه زدن مورد حمله قارچ قرار میگیرند و دیگری بعد از سر برآوردن بوته از خاک[5] حادث می‌شود،که سبب پوسیدگی طوقه و ریشه گیاهچه گشته و

۱. به ترتیب محقق موسسه تحقیقات پنبه کشور ،گرگان، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ، تهران

* نویسنده مسئول Email: Snasrollanejad@yahoo.com

2. split plot
3. seed coating
4. preemergence damping –off
5. post emergence damping –off

Archive of SID

www.SID.ir

نهایتا" ممکن است به مرگ کامل گیاهچه منجر گردد (۲۷). چندین گونه قارچ *Pythium* از جمله *P.ultimum* , *P.aphanidermattum* , *P.irregulare*, *P.debaryanum*. در این پوسیدگی‌ها دخالت دارند. گونه *Pythium ultimum* یکی از عوامل مهم مرگ گیاهچه پنبه در قبل وبعد از رویش گیاهچه‌ها در منطقه گزارش شده است(۵). عامل مهم دیگر قارچ *R.solani* از گروه آناستوموزی AG-4 می‌باشد که در ایران بعنوان بیمارگر مرگ گیاهچه معرفی شده است (۲).

مطالعات انجام شده طی صد سال گذشته ثابت کرده است که انواع بسیار زیادی از میکرو ارگانیسمها دارای اثرات آنتاگونیستی بر عوامل بیماری زا گیاهی دارند (۱۲). خاک یک اکو سیستم بسیار پیچیده حاوی موجودات زنده مختلف شامل میکرو ارگانیسها، بی مهرگان مختلف و موجودات دیگر است که در آن رقابت برای مواد غذایی بسیار شدید است. میکرو اورگانیسمهای مفید خاک مانند قارچها وباکتریها حجم زیادی از خاک اطراف ریشه گیاه را اشغال کرده‌اند این میکرو اورگانیسمها از مواد آلی و ترشحات ریشه تغذیه میکنند. رقابت آنها با عوامل بیماری زا مانند *Pythium spp* و *Rhizoctonia spp* اهمیت زیادی در کاهش خسارت عوامل بیماری زا ی خاک زا دارد(۱۵).

در سالهای اخیر پژوهشهای چندی در مورد مبارزه بیولوژیک با بیماریهای گیاهی انجام شده است.در این پژوهشها، پژوهشگران با استفاده ازقارچها و باکتریها ی آنتاگونیست موفق به کنترل موثر بیماریهای گیاهی گردیده اند. کلوپر وهمکاران (۱۹۸۰) آنتا گونیستهای زیادی از جمله *P. fluorescens* ,*Burkholderia cepacia* , *P.putidae* , *Bacillus subtilis* را در این رابطه مورد آزمایش قرار دادند و ثابت کردند که گونه های مذکور بطور موثری باعث کنترل بعضی از بیمارگرهای گیاهی شده اند، همچنین نشان دادند، جدایه H237 از *P.fluorescens* می تواندرصد بالائی از جمعیت قارچ *Fusarium oxysporum* fsp *dianti* را در شرایط مزرعه کاهش دهد (۲۰).

احمد زاده و همکاران (۱) با کاربرد یک جدایه از باکتری *Pseudomonas fluorescens* توانستند بیماری مرگ گیاهچه نخود ایرانی ناشی از *Pythium ultimum* را کاهش دهند همچنین زاکی و همکاران (۲۷) یک جدایه ازگونه *Burkholderia cepacia* را از خاک مزارع پنبه درآریزونا جدا کردند و نقش آن را بعنوان عامل کنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* (عامل مرگ گیاهچه پنبه) به اثبات رساندند. هول وهمکاران (۱۶) یک جدایه *Trichoderma virens* را علیه بیماری مرگ گیاهچه پنبه در شرایط مزرعه در کالیفرنیا، آرکانزانس، هندوستان، می‌سی سی پی و اوکلاهمای امریکا به مدت دوسال درمزرعه‌ای که سابقه بیماری مرگ گیاهچه درشرایط طبیعی بوده آزمایش کردند و نتیجه گرفتند که تیمار بذر پوشش داده شده با *T.virens* و قارچکش متالاکسیل به طور معنی داری نسبت به شاهد، با کاهش بیماری مرگ گیاهچه همراه بوده است. فتاحی راد و همکاران (۷) امکان استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست برای کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه پنبه را شرایط آزمایشگاه وگلخانه با جدایه هایی از پسودوموناس فلورسنت و جنس باسیلوس بررسی کردند و نتیجه گرفتند هفت جدایه از گروههای فوق بیشترین تاثیر را در کنترل بیماری داشتند. امروزه ضد عفونی بذر با قارچکشهای محافظت کننده عمده ترین روش مبارزه شیمیایی با بیماری مرگ گیاهچه پنبه می‌باشد قارچکشهای مورد استفاده در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه علی رغم موثر بودن دارای معایبی نیز می‌باشند از آن جمله می‌توان به تاثیرات سوء بر روی میکروارگانیزم های غیر هدف، آلوده سازی محیط زیست وایجاد مقاومت اشاره نمود. علوی و آهون منش(۶)، حسن زاده(۴)، حیدری و همکاران (۱۴). مشکلات فوق لزوم جستجو و آزمایش روش های غیر

Archive of SID

www.SID.ir

شیمیایی را اجتناب ناپذیر نموده است. هدف از اجرای این تحقیق بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با بیماری مرگ گیاهچه پنبه وهمچنین عوامل این بیماری با استفاده از باکتریهای آنتاگونیست در شرایط مزرعه بوده است.

مواد و روش ها

نوع طرح

این مطالعه درطرح آزمایشی با کرتهای یک بار خرد شده[1]در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار که در آن دو رقم پنبه ساحل و سای اکرا ۳۲۴ در کرتهای اصلی و پنج جدایه باکتری‌های آنتاگونیست از گروه سودوموناس فلورسنت(Q42،KK-7، Q97) و باسیلوس (GM-5، GM-4)و دو قارچکش کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و یک تیمار شاهد منفی در مجموع با هشت عامل فرعی در کرتهای فرعی قرار گرفتند در ایستگاه تحقیقات پنبه کارکنده (واقع در ۳۵ کیلومتری غرب گرگان) در سالهای (۸۲-۱۳۸۱) به اجراء در آمد. مزرعه تحت آزمایش بعد از شخم عمیق زمستانه بر اساس آزمون خاک (نمونه بردار ی ها) کود پاشی از نوع سولفات پتاسیم و اوره و فسفات آمونیوم انجام گرفت و بعد از دیسک زنی درچند نوبت بطور متناوب واستفاده از علف کش سونالان وترفلان، کاشت آزمایش در نیمه دوم اردیبهشت انجام شد. هر کرت فرعی با چهار خط کاشت به طول ۶ متر و با تراکم کاشت ۲۰×۸۰سانتی مترکشت گردید. در هر چال کاشت ۳ عدد بذر با قوه نامیه بالای ۹۸ درصد در همه کرتها به طور یکسان کاشته شد. ملاک سنجش تاثیر عوامل آزمایش تعداد گیاهچه باقیمانده[2] بود که به فاصله هر ۱۵ روز در چهارنوبت در دو خط وسط کرتهای فرعی انجام شد.

این ایستگاه یکی از ایستگا ههای اسکرین بیماری‌های پنبه می‌باشد. جدایه‌های باکتری استفاده شده در این طرح از گروههایی بودند که قبلاً خاصیت آنتاگونیستی آنها در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده بودو بهترین تاثیر را در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در آزمونهای گلخانه‌ای داشتند برای اینکار نمونه های مختلفی از خاک مزارع پنبه از ناحیه ریزوسفر بوته های سالم واقع در مجاورت بوته های آلوده جمع آوری گردید ودر محیط کشتهای عمومی نوترینت آگار(NA) و آب آگار(WA) واختصاصی کینگ بی (Kings, B) خالص سازی وجدا شدند و بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موجود در منابع و با کلید شناسایی باکتری‌ها در طرح جداگانه‌ای در سال ۱۳۸۰ در آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی مورد شناسایی قرار گرفتند. کد گذاری جدایه‌ها بر اساس منطقه جمع آوری نمونه‌ها (K برای کارکنده، GM برای گرجی محله) وشماره جدایه‌ها انجام گردید در ضمن جدایه های (Q) از جدایه های اهدایی بودند. جهت غربال نمودن باکتریهای آنتاگونیست از آزمونهایی چون آزمون کشت متقابل وآزمون چهار نقطه‌ای انجام پذیرفت همچنین در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد آزمایش قرار گرفتند واز نظر خاصیت آنتاگونیستی نسبت به جدایه های دیگر برتری نشان دادند. جدایه های فوق در آزمایشگاه نباتات صنعتی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی تهران بصورت کلکسیون نگهداری می‌شوند.(۷)

تیمار بذور پنبه با جدایه‌های باکتری و قارچ کش‌ها

برای این کار از روش حیدری و میساقی (۱۴) به شرح ذیل استفاده گردید. ابتدا سه کیلوگرم بذر پنبه از هر یک از ارقام پنبه ساحل و سای اکرا ۳۲۴ با قوه نامیه بالای ۹۸ درصد تهیه گردید. بذور فوق با اسید سولفوریک غلیظ کرک زدایی(دلینته) شدند. ا بتدا ۲۰۰ تشتک پتری حاوی محیط

1. split plot
2.stand

Archive of SID

www.SID.ir

کشت اختصاصی Kings, B (۴۰ تشتک پتری برای هر جدایه) تهیه گردید.و هر پتری بوسیله ۳۰۰ ـ ۲۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه باکتری کشت گردید. تشتکهای پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ^{o}c ۲۵ نگهداری شدند (۴). پس از ۷۲ ساعت کلنی‌های هر جدایه بوسیله آب مقطر استریل ازمحیط کشت شسته و بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتراز هر جدایه با غلظت 10^{9} cfu/ml تهیه گردید از طرف دیگر جهت پوشش کامل و تیمار جدایه‌ها با بذور پنبه محلول ۲ درصد متیل سلولز درون فلاسک شیشه‌ای در پیچ دار تهیه گردید. برای حل شدن کامل پودر متیل سلولز در آب، ابتدا آب را گرم کرده، به آرامی پودر مذکور به آن افزوده و پس از یکنواخت شدن محلول توسط دستگاه ورتکس به سوسپانسیون جدایه‌های باکتری اضافه گردید. سپس بذور پنبه را به بشر محتوی سوسپانسیون جدایه‌ها و متیل سلولز اضافه نموده تا پوشش بذر کامل انجام گیرد. بعد از ۴ ـ ۳ ساعت بذور را از درون بشر با استفاده ازدستکش سترون خارج نموده و در زیر هود استریل پخش گردید تا خشک گردند. قابل ذکر است که در جهت ارزیابی کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه توسط جدایه های آنتاگونیست در مقایسه با قارچکشهای رایج، قارچکشهای کاربوکسین تیرام و کاربندازیم انتخاب شدند. تیمار بذور با قارچ کش‌ها بر اساس توصیه شرکت سازنده و منابع موجود به میزان ۴۰۰ ـ ۲۰۰ گرم از ماده موثر در ۱۰۰ کیلوگرم بذر(۴ ـ ۲ در هزار) مصرف شد (۳) به طوریکه لایه بسیار نازکی از سم بذور پنبه را پوشش داد. برای تیمار شاهد منفی بذور فقط با محلول متیل سلولز ۲ درصد پوشش داده شدند.

جهت تعیین اثر عوامل فرعی، اصلی، اثر سال و اثرات متقابل آنها در صفات، یادداشت برداری تجزیه آماری مرکب (دوساله) با نرم افزار MSTATC انجام گرفت و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ ٪ مورد مقایسه قرار گرفتند. برای اطمینان از وجود عوامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه و آلودگی طبیعی مزرعه، طوقه و ریشه‌های گیاهچه آلوده و بذور پوسیده از مزرعه جمع آوری گردید. پس از شستشوی ملایم بافت در زیر جریان آب شیر به مدت چند دقیقه، ضد عفونی آن با فروبردن در محلول ۱۰ درصد مایع سفید کننده موجود در بازار (حاوی ۵٪ هیپو کلریت سدیم) و خشک کردن روی کاغذ صافی استریل قطعات از مرز بافت آلوده و سالم انتخاب گردید و بر روی تشتکهای پتری حاوی محیط کشت آب آگار (WA) انتقال داده شد. پتری‌ها در انکوباتور (در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند و پس از ۱۲ تا ۴۸ ساعت نگهداری و مشاهده ریسه‌های نظیر رایزوکتونیا، پی تیوم، فوزاریوم، آسپرژیلوس، پنی سیلیوم که بیشترین آنها از گروه ریزوکتونیا و پی تیوم بودند در استریومیکروسکوپ ازنوک ریسه‌ها نمونه‌ای برداشت شد و به لوله آزمایش حاوی PDA انتقال داده شد. این لوله‌ها در تاریکی و در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد انکوباتور به مدت ۳ ـ ۲ هفته نگهداری شد تا کلنی جدایه‌های قارچی کاملاً رشد نموده و در آنها سختینه تولید شود و سپس درب لوله‌ها بوسیله پارافیلم بسته شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس مرکب در بررسی تاثیر عوامل باکتریایی (فاکتور فرعی) و ارقام پنبه و اثرات متقابل آن در تعداد بوته‌های سبز جدول (۱) نشان می‌دهد که اثر سال درتعداد گیاهچه در ۱۵ روز بعد از کاشت در سطح یک درصد و در روزهای ۳۰، ۴۵، ۶۰ روز بعد از کاشت در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد. تاثیر ارقام پنبه بر صفات فوق در هیچ یک از مراحل یادداشت برداری معنی دار نمی باشد و این در حالی است که جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی)روی تعداد گیاهچه سبز در

Archive of SID

www.SID.ir

۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از کاشت به طور معنی داری در سطح آماری یک درصد موثرند. اثر متقابل سال × ارقام در هیچ یک از مراحل یادداشت برداری در صفت فوق معنی دار نمی باشد و اثر متقابل سال × جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) در ۱۵ روز بعد از کاشت در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد و در بقیه مراحل یادداشت برداری در صفت فوق اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود. اثر متقابل ارقام × جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) در تعداد گیاهچه سبزدر ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کاشت در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد و اختلاف در بقیه مراحل یادداشت برداری در صفات فوق معنی دار نمی باشد. اثرات متقابل سه عامل ارقام × جدایه‌های باکتری (فاکتور فرعی) × سال روی تعداد گیاهچه سبزدر هیچ یک از مراحل یادداشت برداری معنی دار نبوده است (جداول ۱ و ۲). نتایج تحقیقات دو ساله نشان می‌دهد که اثر سال برفعالیت عوامل بیماری مرگ گیاهچه تاثیر دارد و این تاثیر در اوایل کاشت بذور بیشتر مشاهده می‌شود. بذرهای دو رقم پنبه از نظر خسارت عوامل مرگ گیاهچه عکس العمل یکسان داشتند این نتیجه جدایه باکتری مناسب را برای کنترل بیماری مرگ گیاهچه برای پنبه فراهم می‌کند. ارقام پنبه تحت تاثیر سال عکس العملی مشابه در خسارت عوامل بیماری داشتند. جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) تحت تاثیر سال روی تعداد گیاهچه‌های سبز در اوایل کاشت بذر یعنی حداکثر دو هفته بعد از کاشت که با نوسانات تغییرات آب و هوائی توام است متفاوت بوده و پس از سپری شدن ایام فوق و با مساعد شدن شرایط آب و هوائی و مناسب شدن رشد بوته‌ها عکس العمل یکسانی داشتند و به بیان دیگر اینکه جدایه‌های مناسب معرفی شده برای کنترل عوامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه وابسته به شرایط سال نمی باشد. ارقام پنبه تحت تاثیر جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) بعد از سپری شدن حدود ۳۰ روز از کاشت تاثیر جدایه هاروی ارقام معنی دار نبودند و به عبارت دیگر جدایه‌های مناسب برای کنترل عوامل مرگ گیاهچه برای اکثر ارقام قابل تعمیم می‌باشد. اثرات متقابل ارقام × جدایه‌های باکتری ×سال در هیچ یک ازمراحل یادداشت برداری صفات معنی دار نبودند و نتیجه کلی اینکه جدایه‌های مناسب برای پنبه در سالهای مختلف قابل تعمیم می‌باشد.

مقایسه میانگین تعداد گیاهچه سبز درجدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) و ارقام پنبه حاصل از تجزیه مرکب بروش آزمون چند دامنه‌ای دانکن درجدول (۱) نشان می‌دهد که تیمارهای قارچکش کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و جدایه باکتری Q42 به لحاظ برخورداری از بالاترین تعداد گیاهچه سبزدر روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از کاشت در یک کلاس واقع شده و اختلاف بین آنها معنی دار نمی باشد و نسبت به تیمار کنترل (شاهد) در کلاس بالاتری قرار دارند به بیان دیگر اینکه جدایه باکتری Q 42 می‌تواند به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک جهت عوامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه محسوب گردد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل ارقام × جدایه‌های باکتری (عوامل فرعی) جدول (۲) حاصل از تجزیه واریانس مرکب نشان می‌دهد که در رقم ساحل جدایه Q42 و GM-5 به لحاظ برخورداری از بیشترین تعداد گیاهچه درکلیه مراحل از مؤثرترین عوامل بعد از قارچکشها در کنترل بیماری می‌باشند ودر رقم سای اکرا ۳۲۴ جدایه GM-4 و Q42 در صفات فوق با قارچکشها در یک کلاس واقع هستند و درکنترل بیماری موثر هستند بنابراین با دو سال بررسی مزرعه‌ای با آغشته سازی جدایه‌ها با بذور[1] دو رقم پنبه این نتیجه مهم به دست می‌آید که جدایه باکتری Q42 از گروه *Pseudomonas fluorescens* برای ارقام ساحل و سای اکرا ۳۲۴ و جدایه GM-4 از گروه *Bacillus* spp برای رقم سای اکرا ۳۲۴ وجدایه GM-5 از همین گروه برای رقم ساحل در کنترل بیماری موثر می‌باشند.

1. seed coating

Archive of SID

www.SID.ir

جدول(۱) مقایسه میانگین مرکب * تعداد گیاهچه سبز[1] در ۱۵، ۳۰، ۱۵ و ۶۰ روز بعد از کا شت در ارقام و جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی)

تیمارها	تعداد گیاهچه ۱۵ روز ه	تعداد گیاهچه ۳۰ روزه	تعداد گیاهچه ۴۵ روز ه	تعداد گیاهچه ۶۰ روز ه
ارقام				
ساحل	a۱۱۳	a۱۰۹	a۱۰۸	a۱۰۷
سای اکرا ـ ۳۲۴	a۱۱۷	a۱۱۱	a۱۰۹	a۱۰۸
عوامل فرعی				
GM-5جدایه	bcd۱۱۴	bcd۱۰۹	bc۱۰۸	bcd۱۰۷
Q 42جدایه	ab۱۲۰	ab۱۱۶	ab۱۱۴	abc۱۱۳
Q 97جدایه	cd۱۰۸	d۱۰۳	c۱۰۲	d۱۰۰
GM-4جدایه	bcd۱۱۴	bcd۱۰۸	bc۱۰۷	bcd۱۰۵
KK-7جدایه	d۱۰۷	cd۱۰۱	c۱۰۱	d۹۹
قارچکش کاربوکسین تیرام	a۱۲۷	a۱۲۳	a۱۲۳	a۱۲۲
قارچکش کاربندازیم	abc۱۱۹	ab۱۱۶	ab۱۱۵	ab۱۱۴
شاهد	bcd۱۱۰	d۱۰۴	c۱۰۱	cd۱۰۹

*: در هر ستون تفاوت اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نمی باشد

جدول (۲) مقایسه میانگین مرکب * تعداد گیاهچه سبزدر ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از کاشت در اثر متقابل ارقام پنبه بر جدایه‌های باکتری (فاکتور فرعی)

اثر متقابل		تعداد گیاهچه ۱۵روز ه	تعداد گیاهچه ۳۰ روزه	تعداد گیاهچه ۴۵ روزه	تعداد گیاهچه۶۰ روزه
ساحل	GM-5جدایه	abcde۱۱۸	abcde۱۱۳	abcde۱۱۳	abcd۱۱۲
	Q 42جدایه	abc۱۲۲	abc۱۱۹	abcd۱۱۶	abc۱۱۶
	Q 9 7جدایه	cde۱۰۹	cde۱۰۵	bcdef۱۰۵	bcde۱۰۴
	GM-4 جدایه	cde۱۰۸	cde۱۰۱	def۱۰۰	cde۹۹
	KK-7جدایه	bcde۱۱۲	cde۱۰۶	bcdef۱۰۶	bcde۱۰۴
	کاربوکسین تیرام	abc۱۲۴	abc۱۱۹	abc۱۱۹	ab۱۱۹
	کاربندازیم	cde۱۰۹	bcde۱۰۸	abcdef۱۰۸	abcde۱۰۶
	شاهد	de۱۰۳	de۹۷	ef۹۶	cde۹۵
سای اکرا	GM-5جدایه	bcde۱۱۱	cde۱۰۴	cdef۱۰۳	bcde۱۰۳
	Q 42جدایه	abcde۱۱۸	abcde۱۱۴	abcdef۱۱۲	abcde۱۱۰
	Q 9 7جدایه	cde۱۰۸	de۱۰۰	ef۹۸	de۹۵
	GM-4جدایه	abcd۱۲۰	abcd۱۱۵	abcde۱۱۴	abcd۱۱۲
	KK-7جدایه	e۱۰۱	e۹۶	f۹۴	e۹۳
	کاربوکسین تیرام	a۱۳۰	a۱۲۷	a۱۲۵	a۱۲۴
	کاربندازیم	ab۱۲۸	ab۱۲۴	ab۱۲۲	ab۱۲۱
	شاهد	abcde۱۱۶	abcde۱۱۱	bcdef۱۰۵	bcde۱۰۴

*: در هر ستون تفاوت اعداد که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نمی باشد.

1 .stand

Archive of SID

www.SID.ir

رویدادهاست و نتایجی که ازهر دو روش غربال کردن (انتخاب اولیه) به دست می‌آید ممکن است فقط در همان شرایط معتبر باشد و تغییر در هر یک از متغیرها از قبیل محیط کشت، حرارت، زمان و مکان ارزیابی مزرعه‌ای ممکن است نتایج متفاوتی نشان دهد (۹). بنابراین مطالعات زیادی از صفات میکرو ارگانیسم‌ها مورد نیاز می‌باشد و این اطلاعات باید هنگام انتخاب اولیه عوامل بیوکنترل در اختیار باشد تا به کار گرفته شوند اما تهیه این اطلاعات مفصل از تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها در مرحله انتخاب اولیه نیاز به آزمایشات بسیاری داشته و کاری دشوار، گران و غیر ممکن است. بنابراین آزمایشات مزرعه‌ای برای تعیین ثبات اثر عوامل بیوکنترل در شرایط مختلف محیطی مورد نیاز است. عموماً اعتقاد به این است که هیچ ارتباطی بین بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی و بازدارندگی بیماری در شرایط مزرعه‌ای وجود ندارد. محققان زیادی بیان داشته‌اند که آنتاگونیسم (آنتی بیوزپس) در شرایط آزمایشگاهی اشتباه آمیز بوده و هیچ ضمانتی برای ویژگی آنتاگونیستی در شرایط زنده محسوب نمی شود و ممکن است منجر به حصول نتیجه مطلوب نگردد اگر به عنوان تنها ویژگی انتخاب یک جدایه به حساب آید.(۲۱) بهترین روش برای انتخاب استرین‌های کارا این است که ابتدا آنها در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای آزمایش گردند قبل از آنکه برای ارقام توصیه شوند اگر چه حصول بیوکنترل ثابت یک شکل ویژه در کاربرد عوامل بیوکنترل باکتریایی محسوب می‌گردد ولی در این میان درک بیشتر شرایط اکولوژیکی عوامل بیوکنترل می‌تواند کمک زیادی نماید. (۲۵) اثر عوامل بیوکنترل به میزان زیادی تحت تاثیر طبیعت فیزیکی ـ شیمیایی خاک، رطوبت و دمای خاک واقع می‌شود (۲۲).

برگر و همکاران در سال ۱۹۸۶ نشان دادند که فعالیت عوامل بیوکنترل مشخصی توسط گونه‌های گیاهی خاصی محدود می‌گردند. در واقع متابولیت‌های گیاهی ترشح یافته مثل ترکیبات ضد میکروبی می‌توانند به صورت انتخابی از احاطه سازی ریشه توسط گروههای خاصی از میکرو ارگانیسم‌ها جلوگیری نمایند. بنابراین یکی ازدلایل تنوع عوامل بیوکنترل در کاهش بیماری یا افزایش محصول می‌تواند پاسخ نوع رقم به عوامل بیوکنترل باشد. نان داکومار و همکاران در سال ۲۰۰۰ اعلام کردند که کنترل بیولوژیک توسط سودو موناسهای فلورسنت یک استراتژی مؤثر مدیریت بیماریهای خاکزاد می‌باشد. توانایی سود و موناسهای فلورسنت در اشغال سریع ریزوسفر بسیاری از گیاهان این گروه از باکتریها را یک گروه تاکسونومیک جالب برای مطالعات بیوکنترل می‌سازد. سودو موناس فلورسنت در هر ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد یک نسل تولید می‌کند ولی گونه‌های باسیلوس درهر ۳۹ ساعت در همین دما یک نسل به وجود می‌آورد رشد سریع گونه‌های سود و موناس و انتخابی عمل نمودن آنها به خاطر تمایل بالا ی باکتریهای گرم منفی درجذب شدن به سمت ترشحات اسیدهای آمینه در آنها یک ویژگی برتر در رقابت با سایر میکرو فلور ریزوسفر می‌دهد. (ساسلو و سچروس، ۱۹۸۲). از طرفی دیگر عوامل بیوکنترل جنس باسیلوس از جمله گونه *Bacillus subtilis* در دامنه وسیعی ازشرایط محیطی زنده باقی مانده و به صورت موفقیت آمیزی میزبان را احاطه می‌سازند.(۲۴).

همانگونه که در جدول(۲) نشان داده شد ازمیان پنج جدایه باکتری استفاده شده در آزمایش جدایه باکتری Q42 از گروه *Pseudomonas fluorescens*در دو رقم پنبه و دو جدایه (GM-4,GM-5) از گروه*Bacillus* spp بترتیب در

Archive of SID

www.SID.ir

ارقام ساحل و سای اکرا به طور مؤثر و معنی داری در شرایط مزرعه در دو سال اجرای آزمایش باعث افزایش تعداد گیاهچه‌های سبز شدند و عوامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه با کاهش میزان مرگ و میر بوته‌ها کنترل شد. همچنین در مقایسه میان عملکرد جدایه‌های فوق با تیمار شاهد (کنترل) و تیمارهای مربوط به قارچکش‌های کاربوکسین تیرام و کاربندازیم انجام شده جدول (۱) ملاحظه گردید جدایه‌های فوق در سطح آماری همانند قارچکشهای کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و بهتر از جدایه‌های دیگر و شاهد (کنترل) عمل کردند. با توجه به نتایج به دست آمده از محاسبات آماری مشخص شد که سطوح عملکرد بهتر جداول را باکتریهای گروه *Pseudomonas fluorescens* اشغال نموده اند.

البته در بررسیهای که در سال ۱۹۹۰ توسط توما سو و ولر انجام گرفت، اهمیت تولید آنتی بیوتیکی به نام فنازین – کربوکسیلیک اسید توسط این باکتریها مورد تائید قرار گرفته است. عامل دیگر ضد قارچی این گروه از باکتریها به نام آنترانیلیک اسید نیز مورد شناسایی این دانشمندان قرار گرفته است به علاوه اینکه تولید سیدروفور نیز به عنوان عامل دیگر شناسایی شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت عواملی مثل تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور در این آزمایش نقش مهمی داشته است و یا در بررسیهایی به عمل آمده بعضی از باکتریهای *Pseudomonas* به شدت ریشه‌ها را کلنیزه نموده و باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند این افزایش رشد یا اینکه ممکن است ازطریق عوامل رشدی حاصل شود اما یک دلیل مهم برای این واکنش شکست رقیبان پاتوژنی در ریزوسفر و متعاقباً حفاظت ریشه‌ها علیه بیماری توسط بعضی از باکتریها می‌باشد. به هر حال در مورد مکانیزم عمل دو جدایه فوق در کاهش و جلوگیری ازرشد قارچهای عوامل بیماری نظرات مختلفی وجود دارد به عنوان مثال (۲۵)رقابت برای جذب مواد غذایی یا تولیدآنتی بیوتیک و سیدروفور (که از خواص سود و موناسهای فلورسنت) می‌باشد را مؤثر در این زمینه می‌داند و محققین دیگر این مطلب را تائید می‌کنند. دکون وبری (۱۹۹۳)، میلوس و روتروک (۱۸). تولید آنتی بیوتیک‌های مختلف توسط اکثرجدایه‌های سود و وموناسهای فلورسنت و جنس *Bacillus* مورد استفاده در کنترل بیولوژیک به عنوان مکانیزم اصلی جلوگیری از رشد قارچ و کنترل بیماری ذکر شده است.

پس ازآنتی بیوتیک‌ها مهمترین نقش را سیدروفورهای باکتریهای سود و موناس دارند. سیدروفورها به علت جذب آهن سه ظرفیتی و انتقال آن به ریشه‌های گیاهخصوصاً در خاکهاییکهدچار کمبودآهن می‌باشندسبب کنترل بیماری می‌شوند. در خصوص نقش سیدروفورها در محدود شدن رشد و فعالیت قارچ *R. solani*نیز گزارشاتی وجود دارد. عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه برای رشد هیف خود به آهن نیازمند است. هر عاملی که از دسترسی میکرو ارگانیسم‌ها به آهن موجود در محیط ممانعت به عمل آورد در واقع اکولوژی میکرو ارگانیزم را تغییر داده است. سیدروفورها ترکیبات خارج از سلولی[1] با وزن مولکولی کم هستند که میل ترکیبی بالایی نسبت به آهن فریک (سه ظرفیتی) دارند. آهن با تمام فراوانی در خاک به طور آزاد و محلول در pH قلیایی یافت نمی شود. بنابراین در شرایط قلیایی وقتی دسترسی به آهن محدود می‌شود میکرو ارگانیزم در صورت نداشتن یک سیستم جذب مناسب آهن مثل سیدروفور، از آهن محروم می‌ماند در واقع پیوند سازی سیدروفورها با آهن سه ظرفیتی آن را به شکل غیر قابل استفاده برای عامل بیماری زا مبدل می‌نماید

1. Extera cellular

Archive of SID

www.SID.ir

و در نتیجه از مقدار و یا میزان فعالیت پاتوژن کاسته می‌شود (۷).

از جمله مکانیزمهای مورد اشاره برای باکتریهای سود و موناس آنتاگونیست عوامل بیماری زا تولید ترکیب فرار سیانید هیدروژن می‌باشد (۱۳).محققین متذکر می‌شوند که ترکیب مذکور برای قارچها ماده‌ای سمی به شمار می‌آید و نیز این ترکیب با تاثیر بر متابولیسم گیاه موجب انگیزش تشکیل ریشه‌های مویین فراوانی می گردد. همچنین احتمال داده که این ترکیب در افزایش مقاومت گیاه میزبان مؤثر باشد نکته جالب آنکه تولید سیا نید هیدروژن براثر حضور عنصر آهن انجام می گیرد به عبارت دیگر می‌توان این گونه نتیجه گرفت که در هنگام کمبود آهن باکتریهای سود و موناس فلورسنت تولید ترکیب سیدروفور و در شرایطی که عنصر آهن به مقدار کافی دردسترس می‌باشد تولید سیانید هیدروژن می کنند.

بعد ازگروههای *P. fluorescens* به لحاظ آماری باکتریهای *Bacillus* spp جایی گرفتند این باکتریها ترکیباتی را به نام باسیلیسین [1] و فنجیامایسین [2] که از یک بخش چربی c18 ـ c15 و یک بخش پپتید [3] حاوی هشت باقی مانده اسید آمینه تشکیل شده تولید می کنند. قابل ذکر است که فنجیامایسین مانع از رشد قاچهای ریسه‌ای می گردد. بنابراین استنباط می‌شود دلیل عملکرد گروه *Bacillus* spp در آزمایش مزرعه‌ای شاید مساله فوق باشد. می توان نتیجه گرفت که در خصوص عدم توانایی جدایه‌های دیگر در کنترل این بیماری در این آزمایش شاید عدم توانایی آنها در کلنیزه کردن ریشه یا تولید پائین آنتی بیوتیکها و به طور کلی مواد ضد قارچی است. و در واقع یک مشخصه برای کلنیزه کنندگان ریشه این است که آنها باید در برابر مکانیسم‌های دفاعی میزبان مقاومت نمایند روی سطوح ریشه‌ها آنزیم هایی وجود دارند که می‌توانند باعث تولید موادی اکسیژن دار مثل پر اکسید هیدروژن و O2 شوند بنابراین لازم است کلنیزه کنندگان خود را در برابر این عوامل مصون نگه دارند (۸).

این تحقیق یک بررسی جهت شناسایی و کاربرد تعدادی از جدایه‌های باکتری موفق در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در شرایط مزرعه و شرایط طبیعی می‌باشد و همانگونه که عنوان شد یکی از اهداف بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای کاربرد عوامل بیولوژیک و استفاده آن در شرایط مزرعه و طبیعی است و جا دارد در آینده بررسی‌های مزرعه‌ای بیشتری در مناطق مختلف پنبه کاری کشور و بهینه سازی فرمولاسیون آنتاگونیست ها، پیدا کردن مواد همراه مناسب وروشهای مختلف کاربرد مواد فوق از جمله محلول پاشی در بستر کاشت [4] که مواد بیولوژیک بیشتر در تمامی محیط و بذر قرار می گیرند انجام گیرد.

1. bacilysin
2. Fengyamycin A, B
3 .peptide
4. Soil drench

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱. احمد زاده، م. کریمی، ع. ۱۳۷۹. مهار بیولوژیک عوامل بیماری زای گیاهی خاکزی در محیط اطراف ریشه (ریزوسفر) توسط باکتریها (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران، شماره ۱۹، ۲۶ (ص).

۲. ارشاد، ج.۱۳۷۴. قارچهای ایران. انتشارات سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی. ۸۷۴(ص).

۳. بامدادیان، ع. ۱۳۷۵. قارچکش وکاربرد آنها در کشاورزی.انتشارات برهمند. ۲۳۵ (ص)

۴. حسن زاده، ن. ۱۳۷۴. اصول و روشهای باکتریای شناسی گیاهی، مرکزانتشارات علمی دا نشگاه آزاد اسلامی چاپ اول، ۶۴۱ (ص)

۵. حمداله زاده، الف. منصوری، ب. ۱۳۷۳. بررسی تکمیلی بیماریهای قارجی پنبه در ایران. گزارش نهایی بخش آفات وبیماریهای گیاهی.مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان وگنبد.

۶. علوی، ا. ع، آهون منش.۱۳۷۶.کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی خاکزاد (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی،تهران، جلد اول، ۴۰۴(ص)

۷. فتاحی راد، ه. حیدری، ا لف و زمانی زاده، حمید رضا. ۱۳۸۰. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری ریزوکتونیایی مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از باکتریهای آنتا گونیست. پایان نامه کارشناسی ارشد.دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

۸. مژدهی، ح.۱۳۷۳. کنترل بیماریهای گیاهی (ترجمه). مرکزانتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۱۴ (ص).

9. Anderws , J.H.1992. Biological control in the Phylosphere. Ann. Rev. Phytopathology : 30 : 603-635.
10. Berger, F., L., White, D., Frazer, R., and Leifert, C. (1986). Effect of pathogen inoculum , antagonist density and plant species on biological control of *Phytophthora* and *pythium* damping off by Bacillus subtilis cot1 in high humidity fogging glasshouses. phytopathology 86 : 428-433.
11. Blakeman, j. p., and Fokkema , N. J. (1982). Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Ann. Rev. phytopathology 20: 167- 192.
12. Cook, R.J.2000.Advances in plant health management in the 20th century.Annual Review of phytpathology 38:95-116.
13. Defago , G. and Hass. D. 1990 , Pseudomonas as antagonists of soil - born plant pathogens ; Mode of action and Genetic analysis soil Biochemistry , 16 : 397-403.
14. Heydari , A.and Misaghi , I. J. 1998, Biocontrol activity of *Burkholderi*a *cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide treated soils.Plant and Soil 202: 109-116.
15. Honitink,H.A.J.and Boechm,M.J.1999.Biocontrol with in the contex of soil microbial communities : A substrate dependent phenomenon. Annual Rewiew of Phytopathology 370,427-446.
16. Howell, C. R, James E. Devary. Richard H. Garber , and william E. Batson. 1997. Field control of cotton seadling Diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments Journal of cotton Science 1: 15 -20.
17. Leben, C. (1994). In fluence of bacteria isolated from healthy cucumber Leaves on two leaf disease of cucumber. Phytopathology 54: 405-406.
18. Milus ,E.A.,and Rothrock,C.S.1997.Efficacy of bacterial seed treatments for controlling Pytium root rot of winter wheat Plant Disease 81: 180-184.
19. Nandakumar, R., Babus, S., viswanathan, R., Reguchandeer, T. and Samiapan , R. 2000. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil biology and Biochemistry 33 (2001), 603-612.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Raaijmakers,J.M. Leeman,M.Schipers ,B.and Baker,P.A.1995.Dose-response relationships in biological control of radish by Pseudomonas spp. Phytopathology 85:1075-1081.
21. Sakltivel , N.,and Gnanamanicham , S. S.(1987). Evaluation of *Pseudomonas fluoresens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (oriza satival.) Applied and Enviroment Microbiology, 53(9). 2056-2059.
22. Suslow, T. V., Schroth, M. N. and Isaka, M (1982). Application of arapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without stainig. Phytopathol. 72:917-918.
23. Thomashow, L. S., and Weller, D. M. (1990). Role of antibiotics andsiderophores in biocontrol of take - alldisease of wheat. Plant and soil. 129: 93-99.
24. Turner, J. T., and Backman.P.A. (1991). Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. Plant Dis. 75: 347-353.
25. Weller, D. M. 1988. Biological control of soil - born plant pathogens in the Rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. phytopathol. 26 : 379- 407.
26. West, A.M.,Burges,H.D.,Dixon,T.J., and Wybon,C.H.(1985).Survival of Bacillus thuringiensis and B.subtilis spore incula in soil.Effects of pH, Moisture,Nutrient availiability and indigenous.
27. Zaki. K, I, J. Misaghi, and A. Heydari. 1998. Control of cotton seedling Damping - off in the field by *Burkholderia* (*Pseudomonas) cepacia*. Plant Disease P: 291 - 293.

Archive of SID

www.SID.ir

Biocontrol potential of some *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolates on seedling damping –off of cotton in field condition

H. Mahmoodjanlou - S. Nasrollanejad[*] - A. Heydari[1]

Abstract

One of the most important cotton diseases in Iran is post emergence cotton seedling damping –off which causes significant losses annually. The most important agents of these diseases in Iran are *Pythium* spp. and *Rhizoctonia solani*. In this study the possibility of biological control using bacterial antagonists in the field was investigated. Five bacterial isolates (three belonging to *Pseudomonas fluorescens* and two *Bacillus spp.*) were selected for this study based on their performances in the greenhouse experiments. Two cotton varieties (Sahel and Saiokra) were used in this experiment and seed coating procedure was followed for bacterial application. The study was carried out in a cotton fields in Golestan province during 1381 and 1382 (2002 and 2003) growing seasons. Two commonly used fungicides (Carbendazim and Carboxin thiram) were also used for comparison. The efficacy of bacterial isolates and fungicides was evaluated based on the number of healthy seedlings (stand) 15, 30, 45 and 60 days after sowing.Results indicated that three bacterial isolates (one *Pseudomonas fluorescens* and two *Bacillus spp.)* along with fungicides showed the most effectiveness in control of cotton seedlings against damping-off disease in both years. The results obtained for two cotton varieties in different years varied but the differences were not statistically significant. The differences in the obtained results in different years may be due to the variation in environmental conditions. The overall result of this study shows the possibility of using antagonistic bacteria and fungicides in the cotton fields as biological control agents (BCA).

Key words: Cotton**,** Pseudomonas**,** Bacillus, Biocontrol, Damping-off، Pythium ,Rhizoctonia

Archive of SID

* Corresponding author Email: Snasrollanejad@yahoo.com
1. Cotribution From Cotton Research Institute of Iran, Gorgan. University of Agricultural Sciences and Natural Resoures, Gorgan. Plant Protection Reserch Institute, Tehran

www.SID.ir