بررسی توانایی تعدادی از جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* در کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی گندم (*Fusarium culmorum*)

ستاره حاجی ماشاءاله بزاز[۱]، محمد رضوی[۲]، ابوالقاسم قاسمی[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا

۲- مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

مسئول مکاتبات: ستاره حاجی ماشاءاله‌بزاز، Starstaroos@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۰۹ ۱۶-۱ (۲) ۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۶

چکیده

بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه یکی از مهمترین بیماری‌های گندم در دنیا و ایران می‌باشد که توسط چندین گونه فوزاریوم از جمله *Fusarium culmorum* و *F. pseudograminearum* ایجاد می‌شود. در این تحقیق ۶۰ نمونه باکتری از سودوموناداهای فلورسنت از محیط فراریشه (rhizosphere) از مناطق گندم کاری استان‌های تهران، قزوین، گلستان، اردبیل، زنجان، مرکزی و اصفهان جمع‌آوری، جداسازی و اثر آن‌ها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه در کنترل بیولوژیکی قارچ *F. culmorum* (عامل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی گندم) مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و داشتن ژن تولید کننده‌ی آنتی‌بیوتیک ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوسینول PhlD، ویژگی‌های جدایه‌های انتخاب شده با بیووارهای I, III, V گونه‌ی *Pseudomonas fluorescens* و *P. protegens* بیشترین شباهت را داشتند. نتایج بررسی اثرات بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس روی قارچ *F. culmorum* (عامل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی گندم) نشان داد که یازده جدایه به‌همراه جدایه‌ی CHA0 (جدایه بین‌المللی CHA0 که اولین‌بار از روی توتون در سال ۱۹۹۲ توسط کیل و همکاران از سوئیس گزارش شده بود) بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ نشان دادند. قدرت رقابت و کلونیزاسیون استرین‌های مختلف روی چهار رقم گندم شامل ارقام نیک نژاد، مرودشت، زاگرس و سرداری در سه سیکل متوالی رشد گندم بررسی شد. طول هر دوره معادل ۴۲ روز تعیین گردید. براساس نتایج، رقم نیک نژاد بیشترین میزان جمعیت باکتری را نسبت به سایر ارقام در ریزوسفر خود تکثیر نموده و رقم زاگرس کمترین جمعیت باکتری را در ریشه‌ی خود داشت. نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که ارقام مرودشت و زاگرس بیشترین شدت آلودگی در طوقه و ریشه و ارقام سرداری و نیک نژاد کمترین میزان آلودگی را نشان دادند و نسبت به بیماری متحمل‌تر بودند. براساس نتایج کلی این بررسی جدایه‌های ۱۹ و ۲۷ باکتری که هر دو به گونه‌ی *P. protegens* شباهت زیاد داشتند از توان آنتاگونیستی بسیار خوبی برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: گندم، پوسیدگی ریشه و طوقه، باکتری آنتاگونیست، سودوموناس فلورسنت، ژن *PhlD*

مقدمه

در سال‌های اخیر به بحث کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به‌خصوص باکتری‌های متعلق به سودوموناداهای فلورسنت از قبیل گونه‌های *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* و تعدادی از گونه‌های متعلق به جنس باسیلوس مثل *B. cereus* و *Bacillus subtilis* در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه‌ی گیاهان زراعی توجه فراوان شده است. سودوموناداها بیشترین جمعیت میکروفلور خاک را تشکیل می‌دهند و سازگاری زیادی با شرایط فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک دارند. نقش اصلی سودوموناداهای فلورسنت که از مهمترین انواع ریزوباکتری‌های تحریک کننده‌ی رشد گیاهان (PGPR) به‌حساب می‌آیند، در بهبود رشد گیاه، به‌طور غیر مستقیم و از طریق توان آن‌ها در حذف عوامل بیماری‌زا از حوزه‌ی فعالیت سیستم ریشه‌ای عنوان شده است. سودوموناس‌های

Archive of SID

www.SID.ir

فلورسنت از عوامل مهم کنترل بیولوژیک بوده و در کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی از جمله پاخوره‌ی گندم در سراسر دنیا نقش کلیدی ایفاء کرده‌اند (Cook, 2000). این باکتری‌ها دارای خصوصیاتی هستند که تأثیر آن‌ها را در کنترل بیماری‌ها اثبات می‌کند. همچنین، آن‌ها به‌خوبی با محیط ریزوسفر سازگار می‌شوند، کلونیزه کننده‌ی ریزوسفر بوده و قادر به مصرف بسیاری از مواد آلی می‌باشند. این باکتری‌ها را می‌توان از طریق عملیات زراعی مثل تیمار بذر به‌کار برد. سودوموناداها تعداد زیادی آنتی‌بیوتیک و سیدروفور تولید می‌کنند که می‌توانند رشد بیمارگر را متوقف کنند (Genowati, 2001; Hass & Defago, 2005). بیماری پاخوره‌ی گندم که توسط یک گونه قارچ به‌نام *Gaeumannomyces graminis* به‌وجود می‌آید یکی از مهمترین بیماری‌های ریشه‌ی گندم در سراسر جهان می‌باشد این بیماری میزان قابل توجهی عملکرد گندم و جو را کاهش می‌دهد. ولی با به‌کاربردن گونه‌ای از باکتری سودوموناس فلورسنت می‌توان شدت این بیماری را کاهش داد که این باکتری با تولید موادآنتی بیوتیک همانند فنازین یا ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول می‌تواند فعالیت این قارچ را کاهش دهد و با تلقیح باکتری سودوموناس فلورسنت به خاک ناقل این بیماری می‌توان آن را به‌یک خاک دافع تبدیل نمود (Raaijmakers & Weller, 2001). همچنین باکتری سودوموناس فلورسنت با تولید مواد آنتی‌بیوتیک که از متابولیت‌های ثانویه می‌باشد در کنترل بیماری‌هایی مانند پوسیدگی سیاه در تنباکو، پژمردگی فوزاریومی در گوجه‌فرنگی و پژمردگی فوزایوزمی در لوبیا مؤثر می‌باشد (Raaijmakers & Weller, 2001). نتایج تحقیق الیوت و همکاران نیز نشان داد سودوموناداها عملکرد گندم را افزایش می دهند (Elliott & lynch, 1984). مایه‌زنی بذرهای گندم زمستانه با سودوموناداهای فلورسنت موجب افزایش ۲۷ درصدی در تولید محصول شد (Miller *et al.*,1990). عوامل آنتاگونیست تولید متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی می‌کنند (Picard *et al*., 2000). در این بین سودوموناس‌های فلورسنت به‌خاطر تنوع این متابولیت‌ها و ظرفیت آن‌ها برای تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های میکروبی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. این متابولیت‌های ثانویه شامل 2,4–diacetylphloroglucinol (DAPG) Phenazines، Pyoluteorin و Pyrrolnitrin می‌باشند (Picard *et al*., 2000). آنتی‌بیوتیک 2,4–DAPG با استراتژی‌هایی چون بازدارندگی مستقیم از رشد عامل بیماری (Thomashow & Weller, 1990)، القاء مقاومت گیاه میزبان و افزایش رشد گیاه از طریق تغییر در جذب عناصر غذایی (Raudales *et al*., 2009) سبب بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زا و بهبود رشد گیاه می‌شود.

دلایل فوق دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به‌عنوان یک موضوع جدی فرا روی محققان قرار داده است. علاوه بر این، نگرانی‌های زیست محیطی و آلودگی چرخه‌ی غذایی به باقیمانده‌ی سموم سبب ممانعت از کاربرد آفت‌کش‌های مؤثر مانند متیل بروماید و کاهش مصرف سموم دیگر شده است (Cook, 2000). این تحقیق در راستای بکارگیری عوامل آنتاگونیست و کم خطر به محیط‌زیست جهت کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه‌ی گندم انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی جدایه‌های سودوموناس و جدایه‌ی قارچ بیمارگر

طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۷ از محیط فرا ریشه‌ی (rhizosphere) مناطق مختلف استان‌های تهران، قزوین، گلستان، اردبیل، زنجان، مرکزی و اصفهان نمونه‌برداری و سودوموناس‌های زیادی با استفاده از محیط کشت کینگز ب (Kings B) حاوی سه آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و سیکلوهگزامید جداسازی شد (Gardener McSpadden *et al*., 2000). شناسایی نمونه‌های باکتری براساس خصوصیات بیوشیمیایی و براساس داشتن ژن تولیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک ۲ و ۴- دی‌استیل‌فلوروگلوسینول *PhlD* با استفاده از PCR انجام شد. این باکتری‌ها برای کنترل بیولوژیکی قارچ بیمارگر *F. culmorum* جدا شده از مزارع گندم منطقه‌ی جوادآباد ورامین مورد بررسی قرار گرفتند.

تکثیر ژن *PhlD* به‌وسیله PCR

Archive of SID

www.SID.ir

به‌منظور ردیابی ژن *PhlD* در سودوموناد‌های فلورسنت به‌دست آمده و تعیین جدایه‌های واجد ژن تولید کننده‌ی آنتی‌بیوتیک ۲و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (*PhlD*) از روش PCR استفاده گردید. برای انجام PCR، آغازگر Phl2a با توالی (´3– GAGGACGTCGAAGACCACCA -´5) و آغازگر معکوس Phl2b با توالی (´3- ACCGCAGCATCGTGTATGAG- ´5) توسط شرکت متابیون آلمان (Metabion International AG, Deutschland) ساخته شدند. آغازگرها براساس توالی *PhlD* باکتری *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 (شماره‌ی دسترسی در بانک ژن U41818) طراحی شده است. آغازگرهای Phl2a و Phl2b که برای تکثیر ژن *PhlD* طراحی شده‌اند دارای ۲۰ جفت باز بوده و قادرند قطعه‌ای از DNA به‌طول bp ۷۴۵ را تکثیر کنند (Rademaker & Debruijin, 1997). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD مدل MY CYCLER با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر X۱۰، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر ۱۰ پیکومول، ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۸ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار و یک میکرولیتر از DNA الگو (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ۱۳/۳۰ میکرولیتر آب مقطر سترون انجام شد. چرخه‌ی دمایی اولیه در دمای ۹۴°C به‌مدت ۲ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ °C، چسبیدن آغازگر به DNA ژنومی به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵°C و تکثیر DNA مورد نظر به‌مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و چرخه‌ی نهایی تکثیردر دمای ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه کامل شد. پس از خاتمه واکنش، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی محلول اتیدیوم بروماید (با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر) با ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به‌مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. جهت تخمین اندازه‌ی قطعات تکثیر شده DNA در PCR، از نشانگر ژنومی 1Kb شرکت Bioron استفاده شد (Rademakers & Debruijin, 1997; McSpadden Gardener *et al*., 2000; Wang *et al*., 2001).

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

۶۰ جدایه باکتری به‌همراه استرین استاندارد CHA0 (موجود در کلکسیون پروکاریوت های موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور) تحت آزمون های فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای قرار گرفتند. بررسی توانایی جدایه‌ها در استفاده از منابع مختلف کربن و انرژی شامل کربوهیدرات‌ها، نمک‌های آلی، اسیدهای آمینه و ترکیبات نیتروژنی با استفاده از محیط پایه‌ی آیر و براساس روش شاد و همکاران (Schaad *et al*., 2001) انجام گرفت.

بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری علیه قارچ *F. culmorum* در شرایط آزمایشگاهی

توان آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری علیه قارچ *F. culmorum* به دو صورت کشت متقابل و چهار لکه‌ای (چهار نقطه‌ای)انجام شد. به این صورت که ابتدا مخلوط محیط کشت نوترینت آگار (NA) و PDA به‌نسبت دو به یک تهیه شد. در روش کشت متقابل چهار جدایه‌ی مختلف باکتری در فاصله‌ی یک سانتی‌متری از لبه‌ی تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA+NA به‌صورت خطی کشت گردید. به‌طور هم‌زمان یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه‌ی پرگنه جوان جدایه‌ی قارچ *F. culmorum* در وسط محیط کشت گذاشته شد. تشتک‌های پتری در دمای ۵ °C نگهداری شدند. پس از آن‌که سطح تشتک پتری شاهد توسط قارچ *F. culmorum* کاملاً پوشیده شد، اقدام به اندازه‌گیری ناحیه‌ی بازدارندگی بین قارچ و باکتری گردید (Weller & Cook, 1983). باکتری‌هایی که بازدارندگی نشان دادند، برای مرحله‌ی بعد انتخاب و با آزمون چهار نقطه‌ای در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی شدند. در آزمون چهار نقطه‌ای به این ترتیب عمل شد که باکتری‌های رشد کرده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی با استفاده از آب مقطر سترون رقیق شد تا غلظت آن OD_{600}= 0.125 گردد که در این حالت سوسپانسیون دارای 10^8cfu/ml می‌باشد. سپس استرین‌های باکتری به صورت چهار لکه‌ی ۲۰ میکرولیتری به فواصل مساوی یک دایره‌ی فرضی از مرکز

Archive of SID

www.SID.ir

(سه سانتی‌متر) در یک تشتک پتری مایه‌زنی و در انکوباتور ۲۵°C قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت یک قرص از قارچ جوان در وسط تشتک پتری قرار داده شد و پس از آنکه سطح تشتک پتری شاهد توسط قارچ *F. culmorum* کاملاً پوشیده شد، میزان بازدارندگی از رشد اندازه‌گیری گردید. لازم به ذکر است که در تمام آزمون‌های مورد بررسی اثر آنتاگونیستی، از جدایه‌ی *P. fluorescens* CHA0 به‌عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم‌ها با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\text{بازداری از رشد (٪)} = \frac{\text{قطر رشد میسلیوم شاهد} - \text{قطر رشد میسلیوم هر تیمار}}{\text{قطر رشد میسلیوم شاهد}} \times ۱۰۰$$

داده‌های به‌دست آمده (درصد بازدارندگی) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون LSD انجام شد (Little & Hills, 1987).

بررسی روند تغییرات جمعیت باکتری‌ها در سیکل‌های مختلف کشت گندم در شرایط گلخانه به‌منظور تعیین قدرت کلونیزاسیون آن‌ها

ارقام گندم مورد استفاده شامل ارقام نیک‌نژاد، مرودشت، زاگرس و سرداری، که از ارقام عمده‌ی گندم در چهار اقلیم مختلف آب و هوایی کشور می‌باشند، بودند. ابتدا سوسپانسیون غلیظی از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها با رقت $۱۰^{۹}$ cfu/ml محلول کربوکسی متیل سلولز سترون یک درصد تهیه شد. بذرها به ظروف فوق منتقل و به‌مدت یک ساعت نگهداری شدند. به‌نحوی که هر بذر با ۸۰۰ سلول باکتری تیمار شد. سپس بذرها از سوسپانسیون باکتری‌ها خارج و در تشتک‌های پتری سترون، در زیر هود خشک شدند. سپس گلدان‌های پلاستیکی به قطر (حدود ۱۸ سانتی‌متر) با خاک پاستوریزه شده پر شدند. ۵ بذر آغشته به هر باکتری در هر یک از گلدان‌ها کاشته شد و روی آن‌ها با یک لایه‌ی حدود یک سانتی‌متری از خاک پوشانده شد. این آزمایش با سه تکرار برای هر رقم در گلخانه با شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه‌ی سلسیوس، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و سه نوبت آبیاری در هفته اجرا گردید.

کاشت (سیکل دهی) متوالی گندم

تغییرات جمعیت سودوموناد‌های فلورسنت روی هر رقم در طول سه دوره‌ی رشدی ۴۰ روزه تعیین گردید. به‌این‌ترتیب که در پایان دوره‌ی ۴۰ روزه، ابتدا اندام‌های هوایی گیاهان در سطح خاک حذف گردید. سپس ریشه‌ها را با دست تکان داده تا خاک‌های سست اطراف آن‌ها ریخته و جدا گردد. محتویات هر گلدان به‌دقت و با آرامی تخلیه و کل سیستم ریشه هر گلدان جدا گردید و نمونه‌ها در داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. سپس محتویات خاک تخلیه شده‌ی هر گلدان دوباره به گلدان‌ها منتقل و مجدداً ۵ عدد بذر گندم در هر گلدان و در قالب همان طرح آزمایشی مربوطه، کاشته شد. این عمل در پایان دوره‌ی رشدی دوم و سوم نیز تکرار شد.

تعیین جمعیت باکتری سودوموناس در ریزوسفر گندم در سیکل‌های متوالی

برای تعیین جمعیت باکتری‌ها، در ابتدا از نمونه‌های ریشه‌ی گندم از تیمارهای مختلف از هر یک از گلدان‌ها، پنج گرم از ریشه و خاک اطراف ریشه (ریزوسفر) با ترازو وزن و در لوله‌ی آزمایش ریخته شد و به‌میزان ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر لوله اضافه گردید و سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۶۰ ثانیه با شیکر لوله هم زده شد. سپس محیط کشت Kings B (KBC) مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (ampicillin 40 µg ml^{-1})، کلرامفنیکل (chloramphenicol 13 µg ml^{-1})، سیکلوهگزامید (cycloeximide 100 µg ml^{-1}) تهیه گردید و در هریک از خانه‌های کیت ۹۶ خانه‌ای الیزا اضافه شد. نمونه‌های عصاره‌ی ریشه و فراریشه تا شش سری رقت در آن به‌مدت ۲۴ ساعت تکثیر گردید. سپس در پایین‌ترین رقت، وجود ژن تولیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (PhlD) با استفاده از پرایمر اختصاصی Phl2a/Phl2b ردیابی گردید و تکثیر این ژن در هر رقت نشانه‌ی وجود باکتری هدف در آن رقت بود. با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از میزان رقیق‌سازی شده برای هر جدایه‌ی باکتری، جمعیت باکتری آن جدایه در هر گرم خاک فراریشه‌ی گندم در پایان هر سیکل کشت گندم (۶هفته) محاسبه گردید (Rademaker & Debruijin, 1997).

بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه‌ی گندم با استفاده از جدایه‌های برتر سودوموناد‌های فلورسنت در شرایط گلخانه

با توجه به نتایج آزمایش توان کلونیزه کردن ریشه‌ی گندم در سیکل‌های متوالی، تعداد ۵ جدایه‌ی برتر باکتری سودوموناس فلورسانت حامل ژن *PhlD* که شامل جدایه‌های ۹، ۱۷، ۱۹، ۲۷ و ۳۰ بودند، انتخاب شده و به روش تیمار بذری برای کنترل قارچ بیمارگر *F. culmorum* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی چهار رقم گندم نیک نژاد، سرداری، مرودشت و زاگرس با تیمارهای، بدون قارچ بیمارگر و باکتری (۴ تیمار)، باکتری تنها (۲۰ تیمار)، قارچ بیمارگر به‌تنهایی (۴ تیمار)، تیمار بذر با باکتری آنتاگونیست و قارچ (۲۰ تیمار) (در مجموع ۴۸ تیمار) در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و به‌طور جداگانه برای هر رقم انجام گردید. ابتدا گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۷ اینچ (حدود ۱۸ سانتی‌متر) ابتدا با خاک پاستوریزه شده تا نیمه پر گردید و بذور گندم به تعداد ۵ بذر در هر گلدان قرار داده شد. برای تیمارهای حاوی باکتری آنتاگونیست از سوسپانسیون 10^9 cfu/ml محلول کربوکسی متیل سلولز سترون یک درصد استفاده شد. بذرها به‌ظروف فوق منتقل شده و به‌مدت یک ساعت نگهداری شدند. سپس بذرها از سوسپانسیون باکتری خارج و در تشتک‌های پتری سترون، در زیر هود تا خشک شدن نگهداری شدند. ۵ بذر آغشته به باکتری سپس در هر یک از گلدان‌ها کاشته شد (Weller & Cook, 1983). پس از قرار دادن بذور در گلدان‌ها مقدار ۰/۲۴ گرم از مایه‌ی تلقیح قارچ تهیه شده به هر گلدان اضافه گردید (Weller & Cook, 1983). سپس بقیه‌ی گلدان‌ها با خاک پوشانده شدند و در گلخانه با دمای ۱۸-۲۲ درجه‌ی سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری و هر ۲ روز یک‌بار آبیاری شدند. پس از گذشت ۶ هفته، گیاهچه‌ها را از خاک خارج نموده و میزان آلودگی ریشه در هر تیمار با نمره دهی ۵-۱ پیشنهادی (Wallwork *et al*., 2004) که در آن صفر (۰٪ آلودگی)، ۱ (۱۰-۱٪ آلودگی)، ۲ (۲۵-۱۱٪ آلودگی)، ۳ (۵۰-۲۶٪ آلودگی)، ۴ (۷۵-۵۱٪آلودگی) و ۵ (۱۰۰٪-۷۶ آلودگی) ارزیابی شدند. همچنین وزن تر و خشک ریشه‌های مربوط به هر تیمار نیز اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده از نرم افزار آماری SAS ver.9.1 استفاده شد. ابتدا تجزیه‌ی واریانس (ANOVA) بر روی داده‌ها انجام و سپس برای مقایسه‌ی میانگین داده‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD α=%5) استفاده شد.

نتایج

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

براساس آزمون‌های فنوتیپی انجام شده استرین‌های مورد بررسی گرم منفی، اکسیداز مثبت، HR منفی، ژلاتین مثبت، لوان منفی، هیدرولیز ژلاتین مثبت، لستیناز مثبت، لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی منفی، احیای نیترات منفی و آرژنین دی هیدرولاز مثبت و در استفاده از منابع کربنی سیترات، آدونیتول، آرابینوز، سوربیتول، اتانول و ترهالوز مثبت و در استفاده از دی گالاکتوز و دی گالاکتورونات متغیر بودند. با توجه به این نتایج، استرین‌ها شباهت به دو گونه‌ی *Pseudomonas fluorescens* و *P. protegens* داشته و به دو گروه تقسیم شدند. نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی در جدول۱ درج شده است.

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری علیه قارچ *F. culmorum* در شرایط آزمایشگاهی

با استفاده از نتایج کشت خطی در مورد ۶۰ جدایه باکتری، ۱۲ جدایه‌ی برتر انتخاب گردید (شکل۱). نتایج تجزیه‌ی واریانس آزمایش بررسی قدرت آنتاگونیستی ۱۲ جدایه باکتری به‌صورت چهار نقطه‌ای در جلوگیری از رشد

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ *F. culmorum* پس از گذشت پنج روز (f=2.39, df=11, p=%1) بدین صورت بود. مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD (α=%5) نشان داد که جدایه‌ها از نظر قدرت آنتاگونیستی در ۵ گروه آماری قرار می‌گیرند. به‌طوری که جدایه‌های ۶، ۹، ۳۰، ۱ و ۱۷ با بیشترین درصد بازداری از رشد در یک گروه مجزا (A) قرار گرفته و جدایه‌های ۱۷، ۱۵، ۵، ۲۷، ۱۹، ۲۶ و ۲۲ به‌همراه جدایه‌ی CHA0 با کمترین قدرت بازدارندگی در گروه دیگر (E) و بقیه‌ی جدایه‌ها در حد وسط قرار گرفتند (جدول۲).

جدول۱- نتایج آزمون‌های فنوتیپی جدایه‌های سودوموناس جدا شده از فریشه‌ی گندم (Schaad *et al.*, 2001) و (Ramette *et al.*, 2011).

Table1- Result of Phenotypic tests on Pseudomonas strains isolated from wheat rhizosphere.

Test	Strain number 1, 6, 9, 15, 17 I	Strain number 19, 26, 27, 30,CHA0 II
Gram	-	-
Oxidase	+	+
HR	-	-
Gelatin	+	+
Levan	-	−
Hydrolys Gelatin	+	+
Lecithinase	+	+
Saft rot	-	-
Citrate	+	+
Nitrat Reduction	-	-
Argenin dehydrolas	+	+
Adonitol	+	+
Arabinose	+	+
Sorbitol	+	+
Etanol	+	+
Terhalose	+	+
D-galactose	+	−
D-Galacturonate	+	-
L-tartaric acid	+	+
D-tartaric acid	+	+

- ۹۰ تا ۱۰۰٪ جدایه ها واکنش منفی نشان داده اند. +: ۹۰ تا ۱۰۰٪ جدایه‌ها واکنش مثبت نشان داده‌اند.

I *Pseudomonas fluorescens* : II *Pseudomonas protegens*

جدول۲- مقایسه‌ی میانگین قطر هاله‌ی بازدارندگی جدایه‌های *P. fluorescens* در کنترل قارچ *F. culmorum* در شرایط آزمایشگاهی.

Table3- In *vitro* inhibition zone of *P. fluorescens* strains against *F. culmorum.*

Inhibition zone (mm)	Statistical grouping	Bacterial isolate
0.64	a	6
0.56	ab	9
0.53	abc	30
0.52	abcd	1
0.49	abcde	17
0.43	bcde	15
0.43	bcde	5
0.42	bcde	27
0.39	cde	19
0.38	cde	26
0.35	de	22
0.34	e	CHA0

- میانگین‌ها با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون LSD هستند.

تعیین جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست در ریزوسفر گندم در سیکل‌های متوالی

روند تغییرات جمعیت ۱۰ جدایه باکتری سودوموناس مورد بررسی در ریزوسفر چهار رقم گندم نیک‌نژاد، مرودشت، زاگرس و سرداری در طی سه سیکل مختلف کشت گندم در شرایط گلخانه به شرح زیر بود:

در رقم مرودشت جمعیت جدایه‌های۱۹، ۱۷و ۲۶ در هرگرم ریزوسفر ریشه‌ی در طی سیکل‌های متوالی رو به رشد بوده و جمعیت آن‌ها با استفاده ازروش غنی‌سازی در محیط کشت KBC^{+++} و ردیابی ژن*phlD* با استفاده از روش PCR ، (واحد کلنی ساز) $1/3\times10^{5}$ cfu در هرگرم خاک ریزوسفراندازه‌گیری شد. جمعیت جدایه‌های ۱ و ۱۵ در طی سیکل‌های متوالی رو به کاهش بوده و جمعیت آن‌ها 1×10^{3}cfu در هرگرم خاک ریزوسفر تخمین زده شد (شکل۲).

در رقم زاگرس جمعیت جدایه‌های ۹ و ۳۰ در طی سیکل‌های متوالی رو به رشد بوده و با استفاده از روش غنی‌سازی در محیط کشت KBC^{+++} و ردیابی ژن*phlD* با استفاده از روش PCR میزان جمعیت آن‌ها، $1/3\times10^{5}$ cfu

Archive of SID

www.SID.ir

در هرگرم خاک ریزوسفر ریشه اندازه‌گیری شد. جمعیت جدایه‌ی ۱ و ۲۶ در در طی سیکل‌های متوالی رو به کاهش بوده و جمعیت آن‌ها، cfu ۱×۱۰^{۳} در هرگرم خاک ریزوسفر ریشه تخمین زده شد (شکل۳).

در رقم نیک‌نژاد جمعیت جدایه‌های۱، ۹، ۱۷، ۱۹، ۲۶ در طی سیکل‌های متوالی رو به رشد بوده و با استفاده از روش غنی‌سازی در محیط کشت KBC^{+++} و ردیابی ژن *phlD* با استفاده از روش PCR میزان جمعیت آن‌ها cfu $۱/۳\times۱۰^{۵}$ در هر گرم خاک ریزوسفر اندازه‌گیری شد. جمعیت جدایه‌های ۶ و ۱۵ در طی سیکل‌های متوالی رو به کاهش بوده و میزان جمعیت آن‌ها cfu ۱×۱۰^{۳} در هرگرم خاک ریزوسفر ریشه اندازه‌گیری شد.

در رقم سرداری جمعیت جدایه‌های ۱۵، ۱۹ و ۲۷ در طی سیکل‌های متوالی رو به رشد بوده و با استفاده از روش غنی‌سازی در محیط کشت KBC^{+++} و ردیابی ژن *phlD* با استفاده از روش PCR میزان جمعیت آن‌ها به‌ترتیب دارای cfu ۵×۱۰^{۳} و cfu $۱/۳\times۱۰^{۵}$ در هرگرم خاک ریزوسفر ریشه اندازه‌گیری شد.

در رقم نیک‌نژاد جدایه‌های ۱، ۹، ۷، ۱۹، ۲۶ بیشترین سازگاری را داشته‌اند و در رقم مرودشت جدایه‌های ۱۹، ۲۶ دارای بیشترین سازگاری بوده و در رقم سرداری جدایه ۱۹ و در رقم زاگرس جدایه‌های ۹ و ۳۰ بیشترین سازگاری را نشان دادند.

در مجموع جدایه‌های ۱۹ و ۱۷ در بین چهار رقم نیک‌نژاد، مرودشت، زاگرس و سرداری بیشترین سازگاری را داشتند. در ارقام مورد بررسی، بیشترین فعالیت باکتری‌ها در ریزوسفر ریشه‌ی رقم نیک‌نژاد و کمترین فعالیت باکتری‌ها در ریزوسفر ریشه رقم زاگرس مشاهده گردید.

از مجموع جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌های ۹، ۱۷، ۱۹، ۲۷ و ۳۰ که از قدرت کلونیزاسیون خوبی برخوردار بودند به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و برای بررسی قدرت آنتاگونیستی آن‌ها علیه قارچ *F. culmorum* در شرایط گلخانه مورد آزمایش قرار گرفتند.

بررسی امکان کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه‌ی گندم با استفاده از جدایه‌های برتر سودوموناده‌ای فلورسنت در شرایط گلخانه

بررسی اثر تیمار ریزوباکترها در خاک آلوده به قارچ *F. culmorum* نشان داد که رقم‌های مرودشت و زاگرس بیشترین شدت آلودگی و رقم‌های سرداری و نیک‌نژاد کمترین شدت آلودگی به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه را نشان دادند.

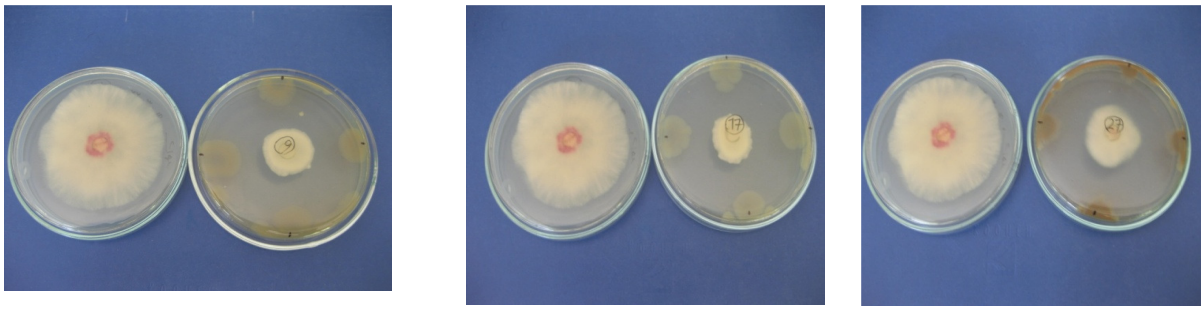
نتایج رقم مرودشت

نتایج تجزیه‌ی واریانس در رقم مرودشت که با ۵ جدایه‌ی سودوموناس فلورسنت در ۱۲ تیمار شامل ۵ تیمار قارچ عامل بیماری‌زا به‌همراه جدایه‌های باکتری، یک تیمار قارچ به‌تنهایی، ۵ تیمار جدایه‌های باکتری به‌تنهایی و یک تیمار بدون قارچ عامل بیماری‌زا و باکتری آنتاگونیست مقایسه شده بودند، نشان داد که بین تیمارها تفاوت معنی‌داری برای شدت بیماری (f=0.364, df=11, p=%1)، وزن‌تر ریشه (f=0.006, df=11, p=%1) و وزن خشک ریشه (f=0.001, df=11, p=%5) وجود داشت.

مقایسه‌ی میانگین شاخص شدت بیماری در تیمارهای مختلف نشان داد که تیمار قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره ۹ باکتری با بیشترین شاخص شدت بیماری (۱/۹۳) به‌همراه تیمارهای: قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۳۰ باکتری، قارچ به‌تنهایی و قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۱۷ باکتری در یک گروه آماری (a) قرار گرفتند. تیمارهای باکتری شماره‌ی ۳۰ به‌تنهایی، شاهد سالم و باکتری شماره‌ی ۱۹ به‌تنهایی با کمترین شاخص شدت بیماری (۰) به‌همراه تیمارهای باکتری شماره‌ی ۲۷ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۹ به‌تنهایی، قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۲۷ باکتری و قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۱۹ باکتری در یک گروه (d) قرارگرفتند. بقیه‌ی تیمارها با شدت بیماری متوسط در حد واسط قرارگرفتند که تیمارهای ۷، ۲، ۴، ۵ و ۶ در یک گروه (c) و تیمارهای ۲، ۴، ۵ و ۶ در یک گروه (d) قرارگرفتند (جدول۳).

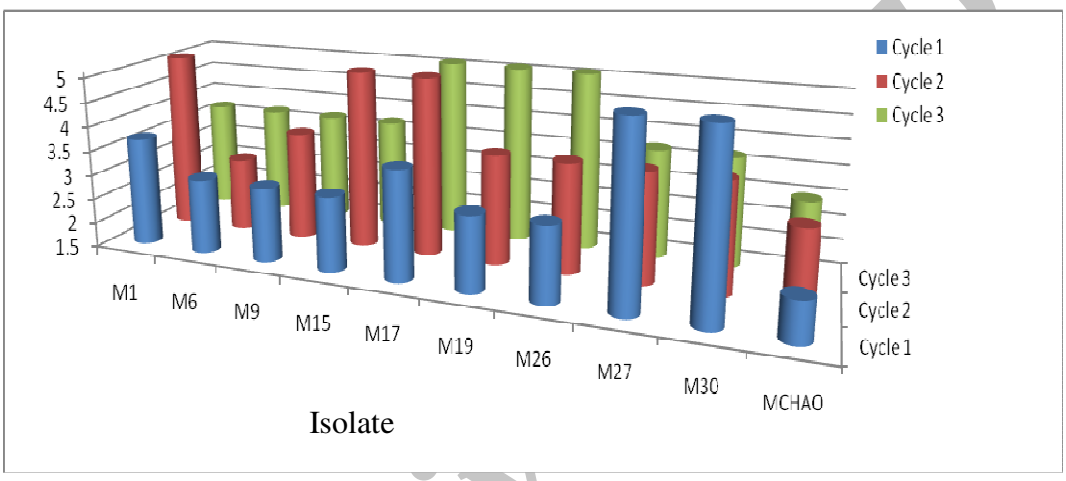
Archive of SID

www.SID.ir



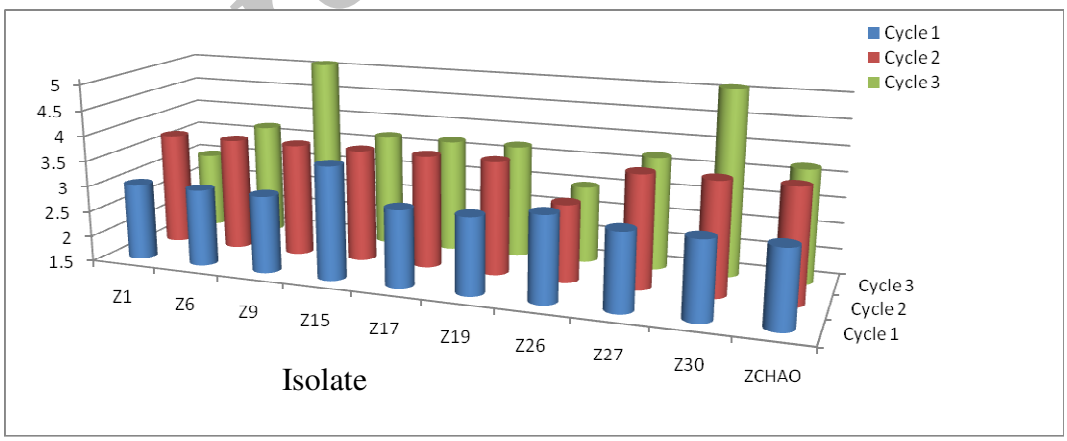
شکل۱- کشت چهار نقطه‌ای یکی از تکرارهای جدایه‌های *P. fluorescens* با قارچ *F. culmorum* در محیط کشت NA+PDA پس از گذشت ۵ روز. از بالا سمت چپ، تشتک‌های پتری به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های ۹، ۱۷ و ۲۷ می‌باشند.

Fig. 1- Tetrapoint culture in one of the repetition of the *P. fluorescens* with *F. culmorum* in NA+PDA medium after 5 days. From left, Petri plates are related to isolates 9, 17 and 27 respectively.



شکل۲- روند تغییرات جمعیت جدایه‌های باکتری سودوموناس در ریزوسفر رقم مرودشت در طی سه سیکل متوالی بر حسب لگاریتم تعداد باکتری در هر گرم خاک.

Fig. 2- Population trends of Pseudomonas isolates in the rhizosphere of Marvdasht wheat cultivar during three cycles as logarithm of number of bacteria pergram of soil.



شکل۳- روند تغییرات جمعیت جدایه‌های باکتری سودوموناس در ریزوسفر رقم زاگرس در طی سه سیکل متوالی بر حسب لگاریتم تعداد باکتری در هر گرم خاک.

Fig. 3- Population trends of Pseudomonas isolates in the rhizosphere of Zagroos wheat cultivar during three cycles as logarithm of number of bacteria per gram of soil.

www.SID.ir

جدول۳– مقایسه‌ی میانگین صفات شاخص شدت بیماری، وزن‌تر ریشه، و وزن خشک ریشه در آزمایش بررسی امکان کنترل بیولوژیک قارچ *F. culmorum* با استفاده از ۵ جدایه مختلف باکتری سودوموناس فلورسانت در رقم مرودشت.

Table 5- Values of disease severity index, root fresh weight and root dry weight in biological control of *F. culmorum* using 5 isolates of *P. fluorescens* in marvdasht cultivar.

Rootdry weight (g)	Root fresh Weight (g)	Disease severity Index	Treatment	Treat ment No.
0.02abc	0.06abf	0d	Control(non-inoculated)	1
0.01c	0.04c	1.30abc	Control(inoculated)	2
0.02bc	0.05cb	1.93a	Strain 9+fungus	3
0.02bc	0.07abc	1.13abc	Strain17+fungus	4
0.02ab	0.10a	0.68bcd	Strain19+fungus	5
0.03a	0.11ab	0.56bcd	Strain27+fungus	6
0.02bc	0.08abc	1.81ab	Strain30+fungus	7
0.01c	0.07ab	0.33cd	Strain 9	8
0.01bc	0.08ab	0.07d	Strain 17	9
0.01bc	0.07ab	0d	Strain 19	10
0.02bc	0.07ab	0.06d	Strain 27	11
0.01c	0.06abc	0d	Strain 30	12

-میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

مقایسه‌ی میانگین وزن‌تر ریشه در تیمارهای مختلف رقم مرودشت نشان داد که تیمار قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۲۷ باکتری با بیشترین وزن (۰/۱۱ گرم) به‌همراه تیمارهای قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۱۹ باکتری، قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۳۰ باکتری، و باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی در یک گروه آماری (a) قرار گرفتند و تیمار قارچ به‌تنهایی با کمترین وزن‌تر ریشه (۰/۰۴ گرم) به‌همراه تیمارهای قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۹ باکتری، شاهد سالم، باکتری شماره‌ی ۳۰ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۱۹ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۹ به‌تنهایی و قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۱۷ باکتری در یک گروه (e) قرار گرفتند. بقیه‌ی تیمارها در حد واسط قرار داشتند، به‌طوری‌که تیمارهای ۵، ۷، ۹، و ۱۱ در یک گروه (b) و تیمارهای ۷، ۹، ۱۱، ۴، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱ در یک گروه (c) و تیمارهای ۹، ۱۱، ۴، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱ و ۳ در گروه دیگر (d) قرار گرفتند (جدول۳).

مقایسه‌ی میانگین وزن خشک ریشه در تیمارهای مختلف رقم مرودشت نشان داد که تیمار قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۲۷ باکتری با بیشترین وزن خشک ریشه (۰/۰۳ گرم) به‌همراه تیمارهای قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۱۹ باکتری و شاهد سالم در یک گروه (a) آماری قرار گرفتند و تیمار قارچ به‌تنهایی (شاهد آلوده) با کمترین وزن خشک ریشه (۰/۰۱ گرم) به‌همراه تیمارهای باکتری شماره‌ی ۳۰ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۹ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۱۹ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۲۷ به‌تنهایی، قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۹ باکتری، قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۱۷ باکتری، قارچ به‌همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۳۰ باکتری و شاهد سالم در یک گروه (c) قرار گرفتند. بقیه‌ی تیمارهای ۵، ۱، ۷، ۴، ۳، ۱۱، ۹ و ۱۰ در گروه حد واسط (b) قرار گرفتند (جدول ۳).

به‌طور خلاصه نتایج مقایسه‌ی میانگین شدت بیماری در رقم مرودشت نشان داد که باکتری شماره‌ی ۲۷ و ۱۹ به خوبی توانستند قارچ *F. culmorum* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی گندم را کنترل نمایند و با شاهد در یک گروه قرار گرفتند. اما سایر جدایه‌های باکتری از توان آنتاگونیستی قوی برخوردار نبودند، به‌طوری‌که جدایه‌های شماره‌ی ۹،۱۷ و ۳۰ با شاهد آلوده در یک گروه قرار گرفتند. مقایسه‌ی وزن تر ریشه‌ی تیمارها نیز نشان داد که

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌های ۲۷ و ۱۹ و ۳۰ توانستند قارچ *F. culmorum* را به خوبی کنترل نمایند و حتی وزن‌تر ریشه این تیمارها از تیمار شاهد سالم نیز بیشتر بود احتمال دارد علاوه بر قدرت آنتاگونیستی علیه قارچ، این جدایه‌ها خاصیت تحریک رشد گیاه (PGPR) را نیز دارا باشند. تیمار باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی نیز از شاهد برتر بود و احتمالاً به دلیل فوق‌الذکر می‌باشد. مقایسه‌ی وزن خشک ریشه‌ی تیمارها نیز بیان‌گر مؤثر بودن جدایه‌های ۲۷ و ۱۹ در کنترل قارچ *F. culmorum* می‌باشد و با شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین براساس نتایج این بررسی در رقم مرودشت می‌توان ادعا نمود که جدایه‌های ۱۹ و ۲۷ باکتری از توان آنتاگونیستی بسیار خوبی برخوردار بودند و می‌توان این جدایه را برای بررسی در مزرعه معرفی نمود.

نتایج رقم زاگرس

نتایج تجزیه‌ی واریانس در رقم زاگرس نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در شدت بیماری (f=0.331, df=11, p=%1)، وزن تر ریشه (f=0.029, df=11, p=%1) و وزن خشک ریشه (f=0.002, df=11, p=%5) وجود داشت.

مقایسه‌ی میانگین شدت بیماری تیمارهای مختلف در رقم زاگرس براساس آزمون LSD (α=%5) نشان داد که تیمار شاهد آلوده به قارچ بیشترین شدت بیماری (۲/۳۵) را داشت اما تیمارهای باکتری شماره‌ی ۳۰ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۲۷ به‌تنهایی، باکتری شماره‌ی ۱۹ به‌تنهایی، شاهد سالم، باکتری شماره‌ی ۹ به‌تنهایی، به‌همراه باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی، قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۳۰، قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۲۷ و قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۱۹ در یک گروه آماری (d) قرار گرفتند و به عنوان تیمارهای برتر محسوب شدند. بقیه‌ی تیمارها از شدت بیماری متوسط برخوردار بودند و در گروه‌های حد واسط قرار گرفتند (جدول۴).

مقایسه‌ی میانگین وزن تر ریشه‌ی تیمارهای مختلف در رقم زاگرس براساس آزمون LSD (α=%5) نشان داد که تیمارهای باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی، و باکتری شماره‌ی ۳۰ به‌تنهایی با بیشترین وزن تر ریشه به‌همراه تیمارهای قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۳۰، قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۲۷، و باکتری شماره‌ی ۹ به‌تنهایی در یک گروه آماری (a) قرار گرفتند و تیمار شاهد آلوده به قارچ با کمترین وزن تر ریشه به‌همراه تیمارهای قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۹، شاهد سالم و باکتری شماره‌ی ۱۹ به‌تنهایی در یک گروه (g) قرار گرفتند و بقیه تیمارها در گروه‌های حدواسط قرار گرفتند. (جدول۴).

مقایسه‌ی میانگین وزن خشک ریشه‌ی تیمارهای مختلف در رقم زاگرس بر اساس آزمون LSD (α=%5) نشان داد که تیمار باکتری شماره‌ی ۱۷ به‌تنهایی، با بیشترین وزن خشک ریشه به‌همراه تیمارهای باکتری شماره‌ی ۹ به‌تنهایی، قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۳۰ و باکتری شماره‌ی ۳۰ به‌تنهایی به عنوان تیمارهای برتر در یک گروه (a) قرار گرفتند و تیمارهای شاهد آلوده به قارچ، قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۹ و باکتری شماره‌ی ۲۷ به‌تنهایی با کمترین وزن خشک ریشه (۰/۰۲ گرم) به‌همراه تیمارهای باکتری شماره‌ی ۱۹ به‌تنهایی، شاهد سالم، و قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۱۹، و قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۱۷ و قارچ به‌همراه باکتری شماره‌ی ۲۷ با کمترین وزن خشک ریشه در یک گروه و بقیه‌ی تیمارها با وزن خشک متوسط در گروه (c) قرار گرفتند (جدول۴) . نتیجه‌ی کلی این بررسی در روی رقم زاگرس نشان داد که جدایه‌ی شماره‌ی ۳۰ باکتری از توان آنتاگونیستی خوبی برای کنترل قارچ *F. culmorum* داشت و با کمترین شدت بیماری، بیشترین وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه به عنوان تیمار برتر می‌باشد و همچنین جدایه‌های ۱۹ و ۲۷ باکتری نیز در کنترل قارچ بیمارگر *F. culmorum* از بقیه‌ی جدایه‌ها برتر بودند که این نتایج با نتایج حاصل از رقم مرودشت کاملاً مطابقت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴– مقایسه‌ی میانگین صفات شدت بیماری، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در آزمایش بررسی امکان کنترل بیولوژیک قارچ *F. culmorum* با استفاده از ۵ جدایه‌ی مختلف باکتری سودوموناس فلورسنت در رقم زاگرس.

Table 7- Values of disease severity, root fresh weight and Root dry weight in biological control of *F. culmorum* using 5 isolates of *P. fluorescens* in Zagroos cultivar experiment.

Rootdry weight (g)	Root fresh Weight (g)	Disease severity Index %	Treatments	Treatment No
0.03bc	0.12egf	0d	Control (non-inoculated)	1
0.02c	0.09g	2.35a	Control (inoculated)	2
0.02c	0.11gf	1.15b	Strain9+fungus	3
0.03bc	0.19bcde	0.74bc	Strain17+fungus	4
0.02bc	0.19bcde	0.64bcd	Strain19+fungus	5
0.03bc	0.26abc	0.31cd	Strain27+fungus	6
0.04ab	0.29ab	0.17cd	Strain30+fungus	7
0.04ab	0.22abcd	0d	Strain 9	8
0.04a	0.31a	0.15d	Strain 17	9
0.02bc	0.15degf	0d	Strain 19	10
0.02c	0.17cdef	0d	Strain 27	11
0.03abc	0.31a	0d	Strain 30	12

- میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار نیستند.

بحث

پوسیدگی‌های طوقه و ریشه‌ی گندم توسط قارچ‌های مختلفی ایجاد می شود که مهمترین آن‌ها گونه‌های *Fusarium culmorum F.* و *F. pseudograminearum* عامل پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه)، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (عامل پاخوره)، *Bipolaris sorokiniana*، (پوسیدگی معمولی ریشه) و گونه‌های *Rhizoctonia solani* و *Pythium* spp. می‌باشند. پوسیدگی طوقه و ریشه که در اثر گونه‌های فوزاریوم ایجاد می‌شود جزء گسترده‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های خاکزاد گندم و جو محسوب می‌شود (Backhouse *et al*., 2004).

میزان خسارت این بیماری‌ها در ایران توسط منصوری و همکاران بین ۱۲-۳٪ گزارش شده است (Mansury *et al*., 2002). مدیریت این بیماری‌ها به‌دلیل خاکزاد بودن عامل بیماری بسیار مشکل می‌باشد چون روش‌های شیمیایی نه تنها پرهزینه و غیراقتصادی بوده، بلکه کارایی چندانی هم نشان نداده‌اند. روش‌های شیمیایی عمدتاً بر فومیگاسیون خاک با استفاده از ترکیباتی چون متیل بروماید بوده که از نظر زیست محیطی بسیار زیان‌آور هستند. لذا کنترل شیمیایی بیماری‌هایی که توسط قارچ‌های خاکزی (از جمله بیماری پوسیدگی معمولی ریشه) ایجاد می‌شود، مشکل و گاهی بی‌تأثیر است. بدین‌جهت بایستی از روش‌های دیگر کنترل استفاده شود (Cook & Baker, 1983). کاربرد عوامل آنتاگونیستی علاوه بر این‌که اثر نامطلوب روی گیاه و محیط ندارند، حتی در مواردی باعث افزایش عملکرد محصول نیز می‌شوند (Weller, 1983). باکتری‌های سودوموناد‌های فلورسنت مسئول کاهش برخی از بیماری‌های ریشه ناشی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد و همچنین ایجاد خاک‌های ممانعت کننده‌ی بیماری می‌باشند (Weller, 1983). از این رو تلاش‌ها در جهت کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک شکل گرفته است.

براساس نتایج بررسی حاضر، جدایه‌های ۱، ۵، ۶، ۹، ۱۵، ۱۷، ۱۹، ۲۲، ۲۶، ۲۷، ۳۰ و CHA0 بهترین و بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ *F. culmorum* در تشتک پتری (هاله بازدارندگی) در شرایط آزمایشگاهی داشتند. مقایسه‌ی نتایج هاله بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زا نشان داد، جدایه‌هایی که توان تولید آنتی بیوتیک نداشتند قدرت چندانی در جلوگیری از رشدقارچ بیمارگر درون تشتک

Archive of SID

www.SID.ir

پتری نداشتند. این نتایج با تحقیقات هانگ یو و همکاران (Hongyou *et al*., 2005) و Thomashow & Weller, 1990). مطابقت دارد. در اغلب موارد کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی از باکتری‌های سودوموناد‌های فلورسنت استفاده شده ولی این عوامل از نظر کارایی در زمان‌ها و مکان‌های مختلف بسیار متغییر و متفاوت بوده‌اند و فعلاً در شرایط مزرعه امکان کاربرد طولانی ندارند (Raaijmakers & Weller, 2001). تأثیر عوامل متعدد محیطی روی بیان ژن‌های مؤثر در خصوصیات آنتاگونیستی و نیز کلونیزاسیون ضعیف ریشه از دلایل مهم این عدم توفیق می‌باشد. بنابراین مطالعه‌ی دقیق شرایطی که روی تولید متابولیت‌های میکروبی مؤثر است و نیز خصوصیاتی که در پدیده‌ی رقابت در ناحیه‌ی ریزوسفر دخالت دارد باید مورد توجه قرار گیرد. دستیابی به اطلاعات ژنتیکی می‌تواند ما را در شناسایی و جداسازی عوامل بیوکنترل یاری نماید. در یک پژوهش پیشین کیل و همکاران (Keel *et al*., 1992) گزارش کردند که متابولیت‌هایی که توسط باکتری‌ها و قارچ‌های ناحیه‌ی ریزوسفر تولید می‌شوند، روی بیوسنتز دی‌استیل فلوروگلوسینول تأثیر می‌گذارد. برای مثال تولید این آنتی‌بیوتیک در استرین CHA0 تا حد زیادی توسط متابولیت‌های خارج سلولی نظیر پایولوتئورین، سالیسیلات و همچنین فوزاریک اسید ممانعت می شود.

در روند تغییرات جمعیتی سودوموناد‌های فلورسنت در ریزوسفر ارقام گندم مورد مطالعه در طی سه سیکل رشدی، مشاهده شد که ارقام نیک‌نژاد و زاگرس به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین فعالیت باکتری در ریزوسفر ریشه در بین ارقام مورد مطالعه می‌باشند. در مجموع جدایه‌های ۱۹ و ۱۷ در بین چهار رقم نیک‌نژاد، مرودشت، زاگرس و سرداری بیشترین سازگاری را داشتند و همچنین جدایه‌های ۹، ۲۷ و ۳۰ از قدرت کلونیزاسیون خوبی برخوردار بودند که در این تحقیق به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و برای بررسی قدرت آنتاگونیستی علیه قارچ *F. culmorum* درشرایط گلخانه مورد آزمایش قرارگرفتند. نوسان و تفاوت در جمعیت سودوموناد‌های فلورسنت در بین چهار رقم گندم مورد مطالعه در طی سه سیکل، احتمالاً ناشی از ترشحات ریشه می‌باشد که در برخی از ارقام این ترشحات از همان دوره‌های اولیه رشد در گیاه تولید می‌شود، بنابراین حضور باکتری‌های مولدDAPG در ریزوسفر گندم به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر مرحله و یا دوره‌ی رشدی گیاه می‌باشد. در این مورد محققین اظهار داشته‌اند که با توجه به‌این‌که ترشحات ریشه به‌عنوان منبع غذایی میکروارگانیسم‌های ریزوسفر بوده و ترکیب این ترشحات تحت تأثیر مراحل رشدی گیاه می باشد، لذا باعث تغییراتی در الگوها و فعالیت‌های جمعیتی ریزوباکترها می‌گردد (Picard *et al*., 2000).

بررسی امکان کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه‌ی گندم با استفاده از جدایه‌های برتر سودوموناد‌های فلورسنت در شرایط گلخانه نشان داد که ارقام نیک‌نژاد و سرداری نسبت به‌بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه با عامل *F. culmorum* متحمل و ارقام مرودشت و زاگرس حساس بودند. با توجه به این نکته که در روند تغییرات جمعیتی، سودوموناد‌های فلورسنت جدایه‌های ۱۷ و ۱۹ بیشترین سازگاری را در بین چهار رقم مورد بررسی داشتند، نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای در این تحقیق نیز نشان داد که در روش آغشته‌سازی بذور جدایه‌های ۱۹ و ۲۷ در دو رقم مرودشت و زاگرس بهترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه داشتند.

در شمال غربی ایالت متحده و در نواحی پرباران و مزارع آبی، استفاده از بذور گندم تیمار شده با سودوموناد‌های مولدDAPG، جهت کنترل پاخوره‌ی گندم یک استراتژی مهم محسوب می‌شود (Raaijmakers *et al*., 1998). بررسی‌های انجام گرفته نشان داده‌اند که سودوموناد‌های فلورسنت از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند رقابت تغذیه‌ای و مکانی، کلونیزاسیون ریشه، تولید آنتی بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی در گیاه میزبان، تولید سیدروفور و تولید ترکیباتی مشابه اکسین و سیتوکینین سبب افزایش جذب آب و مواد غذایی و تحمل به تنش‌های محیطی و در نهایت افزایش و تحریک رشد گیاه می‌شوند (Weller, 1983). طبق بررسی‌های لاز و دا (Luz & Da, 1994) تیمار بذر با سودوموناد‌های فلورسنت، باعث کاهش

Archive of SID

www.SID.ir

شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه‌ی گندم و افزایش عملکرد گردیدند. آغشته‌سازی قطعات بذری سیب‌زمینی به باکتری‌های *Pseudomonas fluoerescens* و *Pseudomonas putida* نیز باعث افزایش محصول گردید (Weller, 1983).

به‌طورکلی و براساس نتایج این بررسی می‌توان ادعا نمود که جدایه‌های ۱۹ و ۲۷ باکتری از توان آنتاگونیستی بسیار خوبی برخوردار بودند و می‌توان این جدایه‌ها را برای بررسی در مزرعه معرفی و در صورت مؤثر بودن نسبت به‌تولید تجاری آن‌ها اقدام نمود هرچند که استفاده از روش کنترل بیولوژیکی مزیت‌های فراوانی دارد، ولی با توجه به متغییر بودن نحوه‌ی کارآیی این عوامل در مناطق و فصول مختلف، استفاده از این روش‌ها در مدیریت بیماری‌های قارچی خاکزاد گندم به‌کندی پیش می‌رود (Duffy *et al*., 1996). علل پایین بودن کارآیی یک آنتاگونیست در طبیعت می‌تواند ناشی از نقص در کلونیزاسیون و پایداری در محیط و مداخله‌ی بیمارگرهای غیر هدف، نقص در تولید متابولیت‌های ثانویه، تنوع ژنتیکی جمعیت بیمارگر و غیره باشد (Mazzola *et al*., 1995). برای استفاده بهتر از عوامل آنتاگونیست، شناخت بیولوژیکی کافی این عوامل، گیاه میزبان، عوامل بیماری‌زا و بستر خاک و همچنین اثرات متقابل آن‌ها ضروری است. تأثیر عوامل آنتاگونیست در مزرعه و سپس سعی در فرمولاسیون، ثبت و تولید تجارتی این عوامل از جنبه‌های اقتصادی و نیز قدرت تأثیر بیشتر، از اهمیت خاصی برخوردار است و می‌بایست به‌طور کامل بررسی گردد. در نهایت استفاده از تلفیق روش‌ها جهت کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد گندم پیشنهاد می گردد. به‌طورکلی، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که خاک‌های زراعی زیر کشت گندم در استان‌های مورد بررسی دارای باکتری‌هایی هستند که احتمالاً می‌توانند در بازداری و کاهش طبیعی بیماری‌های قارچی خاکزاد گندم مؤثر باشند. در انتها به‌نظر می‌رسد که پژوهش حاضر می‌تواند سرفصلی مناسب جهت مطالعه‌ی جمعیت باکتری‌های سودوموناده‌ای فلورسنت در منطقه فراریشه ارقام مختلف گندم، بررسی تغییرات جمعیتی آن‌ها در طول فصل رشد، انجام آزمون‌های گلخانه‌ای جهت انتخاب و گزینش جدایه‌های مؤثر از نظر توان کنترل بیماری‌ها، کلونیزاسیون و بقای آن‌ها در خاک، نحوه‌ی کاربرد مؤثر آن‌ها در سطح مزرعه، بررسی روابط افزایشی این باکتری‌ها با سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک به‌ویژه باکتری‌های تثبیت کننده‌ی ازت و تلقیح توأم آن‌ها روی انواع غلات و لگوم ها، مطالعه و شناسایی آن دسته از خصوصیات سودوموناده‌ای فلورسنت که به تجمع آن در سطح ریشه و محدود نمودن عوامل بیماری‌زا کمک می‌کند باشد. دانش استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) افق‌های نوینی را در جهت افزایش رشد و عملکرد گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زا نوید می‌دهد. در این میان انتخاب سویه‌های برتر و کارا تعیین کننده است. نتایج کلی این تحقیق نشان دهنده‌ی توانایی بالای سودوموناس‌های فلورسنت بومی ایران به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاهی می‌باشد. امید است این سویه‌های مفید بیشتر مورد بررسی قرار گیرند و قابلیت آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل پژوهشگران قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از مسئولین محترم مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور-تهران، به‌خاطر تأمین امکانات لازم برای انجام این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

Backhouse, D., Abubakar, A. A., Burgess, T. L. W., Dennis, J. L., Hollaway, G. B., Wallwork, H. & Henry, F. J. 2004. Survey of Fusarium species associated with crown rot of wheat and barly in eastern Australia. Australasian Plant Pathology. 33:255-261.

Cook, R. J. 2000. Advances in plant health management in the twentieth century. Annual Review of Phytopathology. 38: 95-116.

Archive of SID

www.SID.ir

Cook, R. J. & Baker, K. F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. APS Press, St. Paul, MN, USA., pp. 539.

Duffy, B. K., Simon, A. & Weller, D. M. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. Phytopathology. 86: 188-192.

Elliott, L. F. & Lynch, J. M. 1984. Pseudomonads as a factor in the growth of winter wheat (*Triticum aectivum* L.). Soil Biology and Biochemistry. 16: 69-71.

Genowati, I. 2001. Take-all in wheat: PCR identification of the pathogen and the interactions among potential biological control agents. M. Sc. dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, pp. 60.

Hass, D. & Defago, G. 2005. Biological control of soil-born pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. 10:1-13.

Hongyou, Z., Hailei, W., Xili, L., Ye, W., Liqun, Z., & Wenhua, T. 2005. Improving biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* through chromosomal integration of 2, 4-diacetylphloroglucinil biosynthesis genes. Chinese Science Bulletin. 50: 775-781.

Keel, C., Schaider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Hass, D. & Defago, G. 1992. Supperssion of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloglucinol. Molecular Plant-Microbe Interactions. 5: 4-13.

Little, T. M. & Hills, F. J. 1987. Agricultural Experimentation Design and analysis. John willey and Sons Inc, New York, USA, pp. 349.

Luz, W. C. DA. & Daluz, W. C. 1994. Effect of microbiolization on grain yield and root rot and seed–borne pathogens of wheat. Fitopatologia Brasileira. 19: 144-148.

Mansury, B. Ravanlu, A. Noorolahi, kh. Azadbakht, N. Jafary, H. 2002. Root Rot of weat with azarbayejane gharbi, eilam, lorestan, zanjan and markazy. Proceedings of the Plant Protection Congress of Iran. 41pp.

Mazzola, M., Fujimoto, D. K., Thomashow, L. S., & Cook, R. J. 1995. Variation in sensitivity of *Gaeumannomayces graminis* to antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* and effect on biological control of take-all of wheat. Applied and Environmental Microbiology. 61: 2554-2559.

McSpadden Gardener, B. B., Schroeder, K. L., Kalloger, S. E., Raaigmakers, J. M., Thomashow, L. S. & Weller, D. M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *PhlD*- containing pseudomonads strains isolated from the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology. 66: 1939-1946.

Miller, H. J., Liljeroth, E., Henken, G. & Veen, J. A. 1990. Fluctuations in the fluorescent pseudomonad and actinomycetes populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. Canadian Journal of Microbiology. 36: 254-258.

Picard, C. F. D., Cello, I., Ventura, M., Fani, R. & Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol production bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Applied and Environmental Microbiology. 66: 948-955.

Rademaker, J. L. W., & Debruijn, F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. p. 151-171.

Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. F. & Weller, D. M. 1998. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2, 4- diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. Phytopathology. 89: 470-475.

Archive of SID

www.SID.ir

Raaijmakers, J. M. & Weller, D. M. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2, 4- diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens*: Characterization of superior root colonizing P. fluorescens strain Q8rl-96. Applied and Environmental Microbiology. 67: 2545-2554.

Ramette, A., Frapolli, M., Fischer Le Saux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. M., Defago, G., Sutra, L. & Loccoz, Y. M. 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant–protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. Microbiology. 34: 180-188.

Raudales, R. E., Stone, E., & McSpadden Gardener, B. B. 2009, Seed tratment with 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing Pseudomonads improves crop health in low-pH soils by altering patterns of nutrient uptake. Phytopathology. 99(5): 506-511.

Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. St. Paul, Minnesota, USA. 273 pp.

Thomashow, S. L., & Weller, D. M. 1990. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. Plant and Soil. 129: 93-99.

Wang, C., Ramette, A., Pungasamarnwong, P., Natsch, A., Moenne-Loccoz, Y. & Defago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of dicotyledonous crop-associated Biocontrol pseudomonads of worldwide origin. FEMS Microbiology Ecology. 37: 105-116.

Wallwork, H., Butt, M., Cheong, J. P. E. & Williams, K. J. 2004. Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants. Plant Pathology. 33: 1-7.

Weller, D. M. & Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathology. 73: 463-469.

Weller, D. M. 1983. Colonization of wheat roots by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. Phytopathology. 73: 1548-1553.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for biological control of wheat crown and root rot disease (*Fusarium culmorum*)

Setareh Hajimashaalah Bazaz[1], Mohammad Razavi[2] and Abolghasem Ghasemi[2]

1- Department of Plant Pathology, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2- Plant Diseases Research Department Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Setareh Hajimashaalah Bazaz, starstaroos@yahoo.com

Received: Feb. 15, 2014 **1 (2) 1-16** **Accepted: Nov. 30, 2013**

Abstract

Crown and root rot diseases of wheat caused mainly by *Fusarium culmorum* and *F. pseudograminearum* are important diseases of wheat world wide including Iran. In this study, 60 strains of pseudomonad fluorescent bacteria were obtained and isolated from wheat rhizosphere in Tehran, Ghazvin, Golestan, Ardebil, Zanjan, Markazi and Esfahan provinces and their efficacy in biological control of *F. culmorum* was investigated. According to biochemical, physiological and morphological characteristics of the bacteria, the strains were very similar to biovars I, III and V of *Pseudomonas fluorescence* and *P. protegens*. Antagonistic activities of pseudomonad fluorescent strains against *F. culmorum* were then evaluated Results showed that 11 isolates along with CHA0 were the most effective strains. In order to determine competition and colonization abilities of the selected stains in the soil and wheat rhizosphere, the strains were tested on four wheat cultivars for three continuous growth cycles, each which was 42 days long. The results indicated that Niknejad cv. had the highest bacterial population density after three cycles, followed by Zagross cv. The over all results of this study showed that the bacterial strains 19 and 27 (both belonging to *P. progegens*) had a very good antagonistic ability and have the potential for biological control of *F. culmorum*.

Key words: Wheat, crown rot root, antagonism, *Pseudomonas fluorescens,* 2, 4-*diacetylphloglucinol antibiotic gene* (*phlD*)

Archive of SID

www.SID.ir