مجله کشاورزی بوم‌شناختی ۷ (۱) (۱۳۹۶) ۱۳۸- ۱۲۴

تأثیر عامل‌های بیولوژیک باکتریایی بر کنترل بیماری سوختگی معمولی ناشی از *Xanthomonas axonpodis* pv. *phaseoli* در لوبیا

فاطمه دریکوند، عیدی بازگیر*و مصطفی درویش‌نیا

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.

*نویسنده مسئول: bazgir14@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۱

دریکوند، ف.، ع.بازگیر و م. درویش‌نیا. ۱۳۹۶. تأثیر عامل‌های بیولوژیک باکتریایی بر کنترل بیماری سوختگی معمولی ناشی از (*Xanthomonas axonpodis* pv. *phaseoli*) در لوبیا. مجله کشاورزی بوم شناختی. ۷ (۱): ۱۳۹- ۱۲۴.

سابقه و هدف: بیماری سوختگی معمولی لوبیا با عامل ((*Xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli* (Xap)) هر ساله در مناطق غرب کشور آسیب و زیان شدیدی به این گیاه و محصول آن وارد می‌سازد. این بیماری در مناطق با آب و هوای گرم بسیار شایع است و باعث کاهش ۸۰ درصدی محصول در مناطقی با این آب و هوا می‌شود. از راه‌های مهم و سالم برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از عامل‌های زیستی (بیولوژیک) باکتریایی مانند (*Pseudomonas fluorescens*) و (*Bacillus subtilis*) می‌باشد. هدف از این پژوهش بررسی این دو عامل زیستی علیه بیماری سوختگی معمولی لوبیا است.

مواد و روش‌ها: بدین منظور درآغاز اثر بازدارندگی از رشد این عامل‌های زیستی باکتریای روی باکتری (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) در محیط آزمایشگاه روی محیط کشت Nutrient agar (NA) به مدت ۲۴ ساعت بررسی شد. سپس تاثیر این عامل‌های زیستی در شرایط گلخانه تحت تیمارهای (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) و ترکیب این دو عامل روی گیاه لوبیا آلوده به بیمارگر (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) در قالب طرح کاملا تصادفی و در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. پس از حدود سه هفته، شاخص‌هایی مانند وزن تر ریشه و ساقه، وزن خشک ریشه و ساقه، ارتفاع اندام های هوایی و زمینی گیاه، میزان مقاومت گیاهی و درصد نشانه‌ها (برابر دو نظام کددهی ICTA و روش وبستر و همکاران، برای بررسی توان کنترل‌کنندگی عامل‌های زیستی اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که این عامل‌های زیستی با تشکیل هاله ای بازدارنده در محیط کشت از رشد باکتری (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) جلوگیری کردند. قطر این هاله بازدارنده برای باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* به ترتیب ۳۲/۷۵ و ۲۰/۷۵ میلی متر متغیر بود. این هاله بازدارنده نشان داد؛ عامل‌های زیستی (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) در محیط کشت به‌ترتیب ۲۰ و ۳۰ درصد رشد باکتری (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) را کاهش داداند. شدت نشانه‌های بیماری (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) روی لوبیا در شرایط گلخانه به‌طور متوسط بیش از ۶۳ درصد بود که تیمارهای بیولوژیک باعث کاهش این نشانه‌ها و افزایش مقاومت گیاهی شدند. در این آزمایش، تیمار ترکیبی دو عامل زیستی (*P. fluorescens+B. subtilis*) بیشترین تاثیر را روی کنترل بیماری داشت و نشانه‌های بیماری سوختگی معمولی لوبیا را تا ۵۱ درصد نسبت به شاهد آلوده کاهش داد. که گیاه لوبیا را از لحاظ میزان آلودگی همانند رقم نیمه مقاوم نشان داد. همچنین تیمارهای (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) به ترتیب ۲۱/۷۴ و ۱۵/۲۲ درصد نشانه‌های بیماری را کاهش دادند. این تغییرات به وجود آمده تحت تاثیر این عامل‌های زیستی روی وزن و ارتفاع گیاه آلوده به باکتری (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) تاثیر معنی داری در سطح یک درصد آماری ایجاد کرد. مشخص شده است. مشخص شد این عامل‌های زیستی با تولید آنتی بیوتیک (پادزی) و دیگر متابولیت ثانویه (Raijmakers and Mazzola, 2012)، تاثیر

Archive of SID

www.SID.ir

مستقیم بر رشد گیاه، تولید اکسین و سیتوکنین گیاه، تحریک سامانه مقاومت گیاهی (Nejad *et al.*, 2000; Kilian *et al.*, 2000) می تواند از رشد باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی همانند (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری: عامل‌های زیستی (*P. fleoroscence*) و (*B. subtillis*) تاثیر زیادی در جلوگیری از رشد باکتری (*Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*) دارد و می‌توان از این عامل‌ها و مواد تولیدی آن‌ها برای کنترل بیماری سوختگی معمولی لوبیا بهره جست.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، لوبیا، سودوموناس، باسیلوس، زانتوموناس

مقدمه

حبوبات از منابع مهم غذایی و سرشار از پروتئین هستند که در مقایسه با پروتئین‌های حیوانی در برنامه (رژیم) غذایی مردم، به‌ویژه اقشار کم‌درآمد اهمیت زیادی دارند (Mabagala, 1999). در بین حبوبات، گیاه لوبیا با بیش از یک‌صد گونه و با پیشینه‌ای درحدود هشت هزار سال در بیشتر نقاط جهان کشت می‌شود و در بین حبوبات دارای بیشترین سطح زیر کشت در جهان می‌باشد (Yearbook, 2013). این گیاه با دارا بودن ۲۵-۲۰ درصد پروتئین و ۶۵-۵۰ درصد کربوهیدرات با ارزش‌ترین حبوبات از نظر خوراکی در سرتاسر جهان و همچنین ایران است (Majnoun Hosseini, 2008). بیشترین میزان تولید لوبیا کشور با سهم ۳۰/۲ درصد به استان فارس تعلق دارد و استان‌های خوزستان با سهم ۱۵/۷ درصد و لرستان با سهم ۱۳/۵ درصد تولید لوبیا در کشور به ترتیب رتبه‌های دوم و سوم را به‌خود اختصاص داده‌اند (Ahmadi *et al*., 2015).

گیاه لوبیا می‌تواند مورد حمله بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار گیرد. در میان بیماری‌های باکتریایی لوبیا سه بیماری مانند سوختگی معمولی لوبیا، سوختگی هاله‌ای و لکه قهوه‌ای باکتریایی که به ترتیب توسط (*Xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli*)، (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) و (*P. syringae* pv. *syringae*) ایجاد می‌شوند، از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Schaad *et al.*, 2001). در سال‌های اخیر بیماری سوختگی معمولی لوبیا ناشی از باکتری (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) آسیب و زیان شایان توجهی به کشتزارهای لوبیا در استان‌های مرکزی و لرستان به‌عنوان مناطق عمده تولید این محصول در کشور وارد کرده است (Akhavan *et al.*, 2006; Lak and Dorri, 2009). آسیب و زیان ناشی از بیماری سوختگی باکتریایی معمولی در استان‌های اصفهان و زنجان نیز گزارش‌شده است (Yang *et al.*, 2011). بیماری در مناطق مرطوب و کشتزارهای تحت آبیاری بارانی بسیار شایع است و در شهرستان اراک آسیب و زیان بیماری تا ۸۰ درصد گزارش‌شده است (Lak and Dorri, 2009). یکی از راه‌های مهم انتقال بیماری Xap بذر آلوده است. همچنین، عامل بیماری در پسماندهای گیاهی آلوده و به‌صورت اپی‌فیت (رویه رست) روی گیاهان زراعی غیر میزبان و علف‌های هرز زمستان‌گذرانی می‌کند، لذا استفاده از بذر سالم و تناوب زراعی در کنترل بیماری خیلی مؤثر نیست. روش‌های مبارزه شیمیایی نیز تأثیری در کنترل بیماری و افزایش عملکرد ندارد و بهترین روش کنترل بیماری Xap استفاده از رقم‌های مقاوم است (Kavino *et al.*, 2010). ریزموجود (میکروارگانیسم)های آنتاگونیست (ناهمساز) از طریق اثر متقابل بر پاتوژن (بیمارگر)های گیاهی خاکزاد مختلف، نقش مهمی در کنترل بیماری به‌روش زیستی بازی می‌کنند و به‌عنوان عامل‌های حفاظتی در برابر عامل‌های بیماریزای گیاهی خاک‌زاد عمل می‌کنند. باکتری‌ها نیز در کنترل زیستی عامل‌های بیماری‌زا جایگاه ویژه‌ای دارند. استفاده از گونه‌های باسیلوس و سودوموناس‌های فلورسنت موجود در ریزوسفر (فراریشه)، به‌عنوان عامل‌های بیوکنترل باکتریایی جایگزین مطلوبی برای افزایش رشد گیاه و جلوگیری از بیمارگرهای گیاهی تحت شرایط کشتزار و گلخانه به‌شمار می‌روند (Sindhu *et al.*, 2009). نتایج تحقیقات پیشین نشان داده است که جدایه‌هایی از باکتری (*B. subtilis*) با تولید پروتئین‌های ضد قارچی تأثیر بازدارندگی بر رشد بیمارگرهای گیاهی در محیط کشت داشتند (Lak and Dorri, 2009).

در پژوهش‌های صورت گرفته مشخص شده است که دو باکتری (*Bacillus* sp.) و (*P. fluorescens*) باعث کاهش نشانه‌های ناشی از Xap روی لوبیا و افزایش رشد آن می‌شود (Li *et al.*, 2009). در پژوهش دیگری تأثیر آنتاگونیستی

Archive of SID

www.SID.ir

(*Bacillus* sp.)، (*T. harzianum*) و (*P. fluorescens*) بر باکتری (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) بررسی و مشخص شد که همه این عامل‌ها اثر بازدارندگی خوبی روی این باکتری داشتند (Rashid *et al.*, 2013). باکتری آنتاگونیست (*B. subtilis*) با تولید آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی باعث جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماریزای گیاهی شده است (Backman *et al.*, 1997).

با توجه به اثرگذاری‌های کنترلی باکتری‌های آنتاگونیست (*Bacillus subtilis*) و (*Pseudomonas fluorescens*) روی عامل‌های بیماریزای گیاهی، هدف از این پژوهش بررسی اثر بازدارندگی این دو عامل باکتریایی روی باکتری (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش سویه‌های باکتری (*Xanthomonas a.* pv. *phaseoli* (Xap)) از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی شیراز و همچنین از نمونه‌های گیاهی آلوده به این باکتری جداسازی شدند. از جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی (*B. subtilis* B7) و (*P. fluorescens* CHAO) موجود در کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان که پیش از این، این عامل‌های آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی کشتزارهای استان لرستان جداسازی و شناسایی شده بودند، استفاده شد.

آزمون اثبات بیماریزایی

برای اثبات بیماریزایی باکتری Xap از لوبیا چیتی رقم تجاری و پرمصرف ولی حساس صدری استفاده شد. درآغاز بذرها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند. بذرهای ضدعفونی شده در گلدان‌های پلاستیکی دو کیلوگرمی حاوی خاک کشتزار، کود و شن (به نسبت ۱:۱:۲) کاشته شدند. پس از ۱۰ روز رشد در شرایط گلخانه و ظهور برگ‌های حقیقی، سه برگچه دوم بوته‌ها با جدایه‌های باکتریایی موردنظر مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی گیاهان از کشت ۲۴ ساعته باکتریایی Xap روی محیط کشت استفاده و از این باکتری سوسپانسیونی (دروایه‌ای) با استفاده از آب مقطر تهیه شد. شمار سلول‌های باکتریایی زنده‌ی این سوسپانسیون به روش رقیق کردن متوالی حدود 10^8 واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر) (چگالی نوری ۱/۵ در طول مو ج ۶۰۰ نانومتر – مدل Unico-USA) برآورد شد. سپس برگ‌های انتخاب‌شده برای مایه‌زنی با سوزن استریل (سترون) زخمی و سوسپانسیون باکتری روی آن پاشیده شد. تیمار شاهد در این آزمایش آب مقطر سترون بود. بوته‌های مایه‌زنی شده به‌منظور حفظ رطوبت به مدت ۷۲ ساعت زیر پوشش پلاستیکی قرار داده شدند. این آزمایش تحت تیمارهای شاهد سالم (بدون تلقیح بیمارگر به گیاه)، شاهد آلوده (گیاه آلوده شده به بیمارگر) در چهار تکرار با چهار گیاه در هر گلدان در قالب طرح کامل تصادفی انجام گرفت. برای مقایسه میانگین از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد استفاده شد. در نهایت پس از ظهور نشانه‌ها در طی سه تا چهار هفته، مقاومت گیاه لوبیا در برابر باکتری Xap بر پایه مقیاس‌های توصیه شده زیر اندازه‌گیری شد:

a) نظام نمره‌دهی توسط مرکز بین‌المللی کشاورزی مناطق گرمسیر (ICTA): نمره دهی این نظام برای سنجش مقاومت لوبیا به این‌صورت بود که: کد ۱- برای گیاهی که هیچ نشانه‌ای از بیماری نشان ندهد ۳- برای گیاهی که نزدیک به دو درصد از سطح برگ به‌وسیله لکه‌های کوچک پوشیده شده، غلاف‌ها به‌طورعموم بدون نشانه‌های بیماری هستند ۵- گیاهی که نزدیک به ۱۰ درصد از سطح برگ با لکه‌های متوسط و بزرگ پوشیده شده که به‌طورمعمول همراه با هاله زردرنگ و سوختگی است. لکه‌های روی غلاف بزرگ و به هم ملحق شده و ترشحات باکتری روی آن دیده می‌شود ۷- گیاه لوبیایی که تقریباً ۱۰ درصد از سطح برگ به‌وسیله لکه‌های متوسط و بزرگ پوشیده شده که به‌طورمعمول همراه با هاله زردرنگ و سوختگی است. لکه‌های روی غلاف بزرگ و به هم ملحق شده و ترشحات باکتری روی آن دیده می‌شود ۹- گیاهی که بیش از ۲۵ درصد از سطح برگ با لکه‌های بزرگ پوشیده شده، برگ‌ها سوخته و ممکن است ریزش کنند (Schoonhoven and Pastor-Corrales, 1994). پس از ثبت نشانه‌ها (کد دادن به گیاه) به‌منظور بررسی شدت بیماری ناشی از باکتری Xap روی لوبیا از رابطه زیر استفاده شد (Dhanya *et al.*, 2006).

$$DI=\left[\frac{\sum Sc}{Tl\times Mc}\right]\times 100 \qquad (1)$$

در این رابطه DI شدت بیماری، Sc کد اختصاص داده شده به گیاه، Tl مجموع برگ‌های مشاهده شده و Mc بزرگترین کد در نظام کد دهی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

b) پیشرفت بیماری با نمره‌دهی از ۱ تا ۵ (Webster *et al.*, 1983): برابر این نظام کد دهی گروه بندی مقاومت گیاه مشخص شد بر این پایه؛ کد ۱- برای گیاه بدون نشانه‌ها (ایمن) ۲- گیاهی که در آن لکه‌ها کمتر از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در کمتر ۱۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (مقاوم) ۳- لکه‌ها کمتر از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در ۵۰-۱۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (نیمه مقاوم) ۴- لکه‌ها بیش از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در ۵۰-۱۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (نیمه حساس) ۵- لکه‌ها بیش از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در بیش از ۵۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (حساس) تعریف می‌شود.

بررسی تأثیر عامل‌های آنتاگونیستی باکتریایی در شرایط آزمایشگاه روی باکتری Xap

به‌منظور بررسی تأثیر ضد باکتریایی از روش‌های زیر استفاده شد:

الف) در این روش درآغاز سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر Xap با محیط کشت M9 مخلوط و در تشتک‌های پتری ریخته شدند. پس از جامد شدن محیط کشت، باکتری‌های آنتاگونیست (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) به‌صورت نقطه‌ای کشت و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله ایجاد شده توسط دو باکتری آنتاگونیست اندازه‌گیری شد (Watts *et al.*, 1988).

ب) در این روش سویه‌های باکتری آنتاگونیست به‌صورت لکه‌ای در تشتک‌های حاوی مواد غذایی کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، کلنی‌های باکتری‌های آنتاگونیست رشد کرده، توسط پنبه استریل آغشته به الکل ۹۶ درصد از سطح تشتک پاک شد. سپس روی درپوش هر پتری دو قطره کلروفرم اضافه و به‌صورت وارونه به‌مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند (Sakthivel and Mew, 1991). پس از آن درپوش پتری دیش‌ها در شرایط استریل باز و به‌مدت ۳۰ دقیقه هوادهی شدند. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیماریزا با غلظت 10^8 واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی لیتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (چگالی نوری ۱/۵ در طول مو ج ۶۰۰ نانومتر – مدل Unico-USA) در هر پتری پاشیده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در نهایت قطر هاله ایجاد شده اندازه گرفته شد. در این آزمایش برای تیمار شاهد به‌جای باکتری Xap، آب مقطر استریل استفاده شد. در نهایت درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از رابطه زیر با تغییرهای جزئی محاسبه شد (Pandey *et al.*, 1982).

$$GI = (\frac{dc-dt}{dc}) \times 100 \qquad (۲)$$

در این رابطه GI درصد بازداری از رشد، dc قطر پتری، dt قطر ناحیه رشد کرده باکتری می‌باشد.

برای بررسی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از بیماری‌زایی باکتری سوختگی معمولی لوبیا (Xap) در شرایط گلخانه، سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا و آنتاگونیست با غلظت 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر تهیه شد. ابتدا در مرحله ظهور برگ‌های حقیقی، سه برگچه دوم بوته‌ها باکتری‌های آنتاگونیست تا مرحله جاری شدن آب از سطح برگ‌ها روی گیاه مایه زنی شد و روی بوته‌های مایه‌زنی شده به منظور حفظ رطوبت پلاستیک شفافی کشیده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت همه بوته‌ها توسط باکتری بیماریزا افشانه و دوباره روی آن‌ها به مدت ۷۲ ساعت پلاستیک کشیده شد. در این آزمایش، برای تیمار شاهد آلوده از آب مقطر سترون به‌جای سوسپانسیون عامل‌های آنتاگونیست و برای تیمارهای شاهد سالم از آب مقطر استریل به‌جای سوسپانسیون باکتری بیماریزا روی گیاه پاشش _اسپری) شد این بخش از آزمایش تحت تیمارهای شاهد سالم (بدون تلقیح بیمارگر به گیاه)، شاهد آلوده (گیاه آلوده شده به بیمارگر)، تیمارهای زیستی (سودوموناس+گیاه آلوده، باسیلوس+گیاه آلوده و ترکیب هر دو عامل بیولوژیک+گیاه آلوده) و تیمار شاهد عامل‌های زیستی (سودوموناس+گیاه سالم، باسیلوس+گیاه سالم و ترکیب هر دو عامل زیستی+گیاه سالم) در چهار تکرار با چهار گیاه در هر گلدان در قالب طرح کامل تصادفی انجام گرفت. پس از پایان دوره رشد گیاه و گذر از مرحله حساس به‌منظور ارزیابی تاثیر این عامل‌های آنتاگونیست روی بیماری سوختگی معمولی لوبیا شاخص‌هایی مانند درصد بیماریزایی، وزن‌تر و خشک ارتفاع ریشه و ساقه اندازه‌گیری ودر قالب طرح اجرا شده با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۱).

نتایج و بحث

بیماریزایی باکتری Xap روی گیاه لوبیا

آزمون بیماری‌زایی نشان داد که ظهور نشانه‌های بیماری به‌تدریج پس از ۱۰ روز آغاز شد. از نشانه‌های اولیه آن روی گیاه لکه‌های آب سوخته است که این لکه‌ها به‌تدریج به‌هم

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- طرح آماری تیمارهای باکتری‌یابی آنتاگونیستی علیه باکتری Xap

Table 1. Statistical model map of bacterial antagonists against Xap.

کد Score	تیمار Treatment
-A	شاهد آلوده Infected control
+A	شاهد غیر آلوده Non-infected control
Abs	باسیلوس سابتیلیس + گیاه آلوده به باکتری Xap *B. subtilis* + (+A)
APf	سودوموناس فلورسنت + گیاه سالم آلوده به باکتری Xap *P. fluorescens* + (+A)
ABs+Pf	سودوموناس فلوروسنت+باسیلوس+ گیاه آلوده آلوده به باکتری Xap *B. subtilis*+ *P. fluorescens* + (+A)
Bs	باسیلوس سابتیلیس + گیاه سالم *B. subtilis* + (-A)
Pf	سودوموناس فلورسنت + گیاه سالم *P. fluorescens* +(-A)
Bs+Pf	سودوموناس فلوروسنت+باسیلوس+گیاه سالم *B. subtilis*+ *P. fluorescens*+(-A)

پیوسته و سطح گسترده‌ای از برگ را در بر می‌گیرند و برگ حالت سوختگی به‌خود می‌گیرد. به مرور اطراف این سوختگی‌ها هاله زرد رنگی ظاهر می‌شود. نشانه‌های بیماری روی ساقه به‌صورت لکه‌های تیره و روی غلاف به‌صورت لکه‌های مدور قرمز تا قهوه‌ای تیره مشاهده می‌شود (شکل ۱). نتایج پژوهش‌هایی همسان در همین زمینه نشان داد که نشانه‌ها درآغاز به‌صورت لکه‌های آبسوخته است و به‌مرور با پیشرفت بیماری به‌صورت سوختگی با هاله زرد رنگ در می‌آید (Lak and Dorri, 2009; Akhavan *et al.*, 2006). همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که نشانه‌های ظاهر شده در مرحله گلدهی شدت می‌یابد و بیشترین آسیب و زیان این باکتری از این مرحله آغاز می‌شود و آن‌گاه به مرور با ظهور برگ‌های جدیدتر نشانه‌ها کمتر می‌شود. همان‌طور که در پژوهش‌های دیگری بیان شده است گیاهان در مراحل مختلف رشد و نمو خود واکنش متفاوتی نسبت به بروز بیماری دارند و در مرحله بلوغ و گل‌دهی نسبت به عامل‌های بیماریزای گیاهی حساس‌تر می شوند (Yang *et al.*, 2011). مشخص شده است که بیشترین جمعیت اپی‌فیت باکتری در مرحله گل‌دهی لوبیا ظاهر می شود و در زمان‌های ۱۰ و ۲۰ روز پس از آن جمعیت به‌طور معنی‌داری کاهش نشان می‌دهد (Akhavan *et al.*, 2006). با توجه به این‌که این بیماری در مرحله حساس گل‌دهی بیشتر ظهور پیدا می‌کند، ظهور دیرهنگام نشانه‌ها می‌تواند کنترل و مدیریت این بیماری را دشوار سازد. بنابراین، بهتر است که پیشگیری مقدم بر دیگر روش‌های کنترل و مدیریت این بیماری تلقی شود و دو اصل مهم یعنی دما و رطوبت را برای جلوگیری از این بیماری رعایت و با پیش‌آگاهی از گسترش آن جلوگیری کنیم.

شکل ۱- نشانه‌های بیماری سوختگی معمولی لوبیا: بافت‌های خشک قهوه‌ای رنگ احاطه شده با هاله زرد رنگ باریک.

Fig. 1- Symptoms of bean common bacterial blight: brown dry tissues surrounded by a narrow yellow border.

Archive of SID

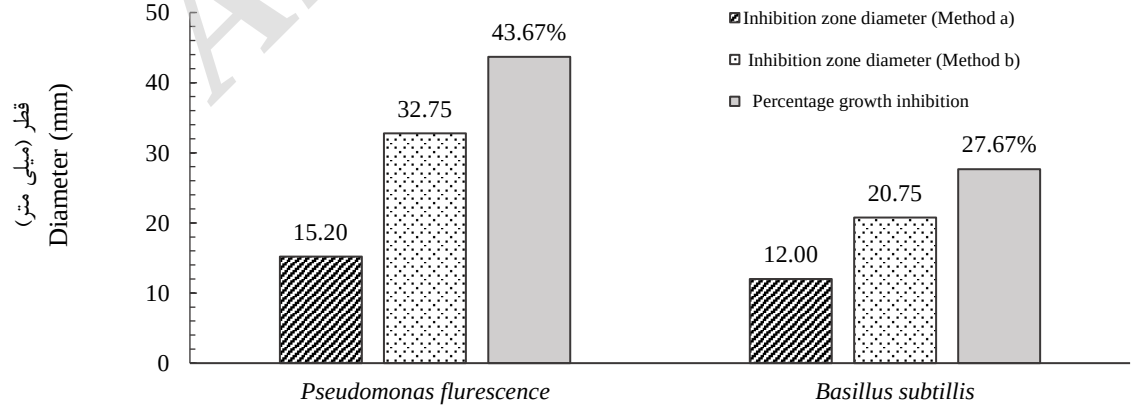
www.SID.ir

در این پژوهش بررسی مقاومت لوبیا چیتی رقم صدری نسبت به بیماری سوختگی معمولی در این گیاه نشان داد که لکه‌ها بیش از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در بیش از ۵۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند. بنابراین، رقم مورد بررسی نسبت به باکتری Xap حساس می‌باشد. همان‌طور که در پژوهش‌های دیگر محققان نیز مشخص شده است بیشتر ژنوتیپ‌های لوبیا نسبت به باکتری عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا (Xap) حساس هستند و شمار کمی به‌عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم شناسایی شده‌اند. این نتیجه نشان می‌دهد که منابع مقاومت به باکتری عامل بیماری محدود می‌باشد. پژوهش‌های زیادی در زمینه یافتن رقم‌های مقاوم لوبیا به بیماری سوختگی باکتریایی معمولی انجام‌شده است اما تاکنون شمار کمی از رقم‌ها و لاین (رگه)های مقاوم به عامل بیماری گزارش‌شده است (Zarela *et al.*, 2007; Kavino *et al.*, 2010).

در این پژوهش گیاه لوبیا تحت تاثیر عامل بیماریزا در گلخانه تحت تاثیر دمای ۲۷ تا ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت بالای ۸۰ درصد قرار گرفت که در این شرایط باکتری بیماریزا (Xap) توانایی بیماریزایی بالایی نشان داد. همچنین برای ایجاد رطوبت از آبیاری بارانی و ایجاد زخم روی گیاه استفاده شد که در شیوع بیماری تاثیر بسیاری داشت در نتایج بررسی‌های دیگر محققان بیان شده است که برای ایجاد بیماری، افزون بر حضور جمعیت مناسبی از باکتری بیماریزای اپی‌فیت، عامل‌های دیگری شامل توانایی نفوذ باکتری به فضای درونی از راه روزنه‌های طبیعی میزبان و شرایط محیطی دخالت دارند؛ که شمار زیاد روزنه‌های هوایی و بزرگ بودن اندازه هر روزنه با حساسیت گیاه به بیماری مرتبط است (Kalyan *et al.*, 2004). همچنین، زخم‌هایی که توسط حشرات و یا بادهای شدید همراه با ذرات گردوغبار و شن به وجود می‌آیند، در رخنه باکتری به درون گیاه و افزایش رخداد بیماری مؤثر هستند (Gilbertson *et al.*, 1992). مناسب‌ترین حالت ممکن برای رخداد و همه‌گیری بیماری‌های باکتریایی، بارش باران همراه با باد یا آبیاری بارانی است. در این حالت باکتری به دلیل وجود لایه آب در سطح برگ‌ها فرصت مناسبی برای افزونش پیدا می‌کند و با افزایش مکان‌های رخنه در نتیجه ایجاد زخم، با سادگی و به‌میزان بیشتری به درون گیاه رخنه کرده بدین ترتیب، جمعیت باکتری‌های اپی‌فیت با رخنه از راه روزنه‌های طبیعی و یا زخم‌های ایجادشده و ایجاد جمعیت درونی در تأمین مایه تلقیح اولیه بیمارگر نقش اصلی دارد (Hirano and Upper, 1983).

بازدارندگی از رشد باکتری Xap تحت تأثیر عامل‌های آنتاگونیست باکتریایی روی محیط کشت

نتایج تأثیر عامل‌های آنتاگونیستی باکتریایی در شرایط آزمایشگاه روی باکتری Xap نشان داد که قطر هاله بازدارنده تشکیل شده توسط این دو باکتری تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نسبت به تیمار شاهد ایجاد کردند ولی نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. باکتری (*P. fluorescens*) در هر دو روش تأثیر بهتری نسبت به (*B. subtilis*) در بازدارندگی از رشد باکتری Xap داشت، به‌گونه‌ای که به‌طور کلی ۴۳/۶۷ درصد از رشد باکتری Xap روی محیط کشت بازدارندگی کرد (شکل‌های ۲ و ۳).

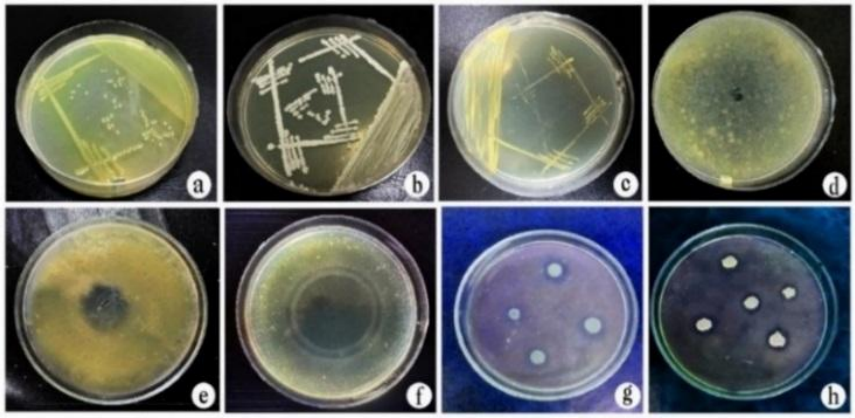


شکل ۲- میانگین قطر هاله بازدارنده باکتری (P. fluorescens) و (B. subtilis) و درصد بازدارندگی از رشد باکتری Xap روی محیط کشت مصنوعی.

Fig. 2- Average diameter inhibition zone of *P. fluorescens* and *B.* subtilis and percentage of inhibition growth of Xap on culture media.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- بازدارندگی از رشد باکتری‌های آنتاگونیست روی باکتری a Xap) کلونی باکتری (*P. fluorescens*) b) کلونی باکتری (*B. subtilis*) c) کلونی باکتری (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) d) پتری شاهد e) هاله بازدارنده (*B. subtilis*) f) هاله بازدارنده (*P. fluorescens*) g) هاله بازدارنده (*P. fluorescens*) در محیط کشت M9 h) هاله بازدارنده (*B. subtilis*) در محیط کشت M9

Fig. 3- Inhibition of the growth of Xap caused by bacterial antagonists. a) Colonies of *P. fluorescens*, b) Colonies of *B. subtilis*, c) Colonies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, d) Control treatment, e) Inhibition zone of *B. subtilis*, f) Inhibition zone of *P. fluorescens* ,g) Inhibition zone of *P. fluorescens* on M9 medium, h) Inhibition zone of *B. subtilis* on M9 medium.

با توجه به یافته‌های این پژوهش مشخص شد که عامل‌های زیستی باکتریای (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) در محیط کشت مصنوعی بازدارندگی بالایی روی بیماری باکتری (*Xanthomonas a.* pv. *phaseoli*) عامل سوختگی معمولی لوبیا داشت. همچنین مشخص شد که باکتری (*P. fluorescens*) تأثیر بیشتری بر کنترل بیماری Xap نسبت به باکتری (*B. subtilis*) داشت. (*P. fluorescens*) در محیط کشت مصنوعی ۴۳/۶۷ درصد از رشد این باکتری جلوگیری کرد. تشکیل هاله بازدارنده ناشی از این دو عامل زیستی در محیط کشت بیانگر این موضوع است که این دو عامل زیستی با تولید مواد و متابولیت‌هایی از رشد باکتری Xap جلوگیری به‌عمل می‌آورند.

در پژوهش دیگری فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های (*P. fluorescens*) روی باکتری Xap بررسی شد و برخی سویه‌ها با ۶۲/۵۰ درصد بازدارندگی از رشد و ۵/۱۷ میلی‌متر هاله بازدارنده، تأثیر کنترلی بسیار بالایی روی این باکتری بیمارگر گیاهی نشان دادند (Kaylan and Mondel, 2004). در پژوهش دیگری مشخص شد که باکتری (*Pseudomonas* sp.) با تولید هاله بازدارنده تأثیر بازدارندگی بالایی روی بیماری سوختگی معمولی لوبیا داشت (Mondal and Verma, 2003). همچنین، نتایج بررسی‌های دیگری نشان داد، گونه‌های (*Pseudomonas* sp.) به‌طور عمده با تشکیل ترکیبات فنلی و فعالیت پراکسیداز باعث بازدارندگی از رشد عامل‌های میکروبی شدند و این باکتری‌های آنتاگونیست تا ۳۹ درصد باعث کنترل بیماری Xap شدند (Da Silva *et al.*, 2008). در پژوهش‌های دیگری نیز مشخص شده است برخی از گونه‌های (*Pseudomonas* sp.) در کنار باکتری (*Rahnella aquatilis*) با افزایش فعالیت پراکسیدازی و همچنین ترکیبات فنولی در محیط کشت از فعالیت بیماری سوختگی معمولی لوبیا تا حد زیادی جلوگیری به عمل می‌آورند (Sallam, 2011). همچنین در پژوهش دیگری بیان شده است که تأثیر بازدارندگی باکتری (*B. subtilis*) را می‌توان به تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی، لیپوپپتیدی و پلی‌کتیدی مانند ایتئرین، سورفاکتین، فنگایسین، باسیلین، دیفیسیدین، ماکرولاکتین نسبت داد (Raijmakers and Mazzola, 2012). بنابراین، به نظر می رسد که عامل‌های آنتاگونیستی (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) در محیط کشت با تولید متابولیت‌های ثانویه و آنتی بیوتیک، ترکیبات فنولی و فعالیت پراکسیدازی و غیره از رشد باکتری Xap در این محیط جلوگیری به‌عمل آورده است.

اثر کنترل‌کنندگی عامل‌های زیستی باکتریایی بر بیماری سوختگی معمولی لوبیا

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر عامل‌های زیستی باکتریایی (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) در کنترل بیماری سوختگی معمولی لوبیا روی شاخص‌هایی مانند طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری داشت ولی روی وزن تر و خشک ریشه تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۲).

تأثیر تیمارهای مختلف زیستی روی ارتفاع ریشه نشان داد که تیمارهای آلوده به بیماری Xap در کاهش طول ریشه نسبت به تیمارهای سالم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشت. گرچه کاربرد جداگانه عامل‌های زیستی باعث افزایش رشد ریشه شده است ولی این تغییرهای رشدی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده نشان ندادند. کاربرد ترکیبی عامل‌های زیستی (*B. subtilis+P. fluorescens*) باعث افزایش رشد طولی ریشه تا ۲۱/۰۶ سانتی‌متر شد، گرچه تفاوت معنی‌داری را با شاهد آلوده ایجاد نکرد ولی افزایش رشد طولی ریشه تحت تأثیر این تیمار به حدی بود که در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد سالم نشان نداد. در کل استفاده برگ کاربرد تیمارهای زیستی باکتریایی (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) تفاوت معنی‌داری روی ارتفاع ریشه ایجاد نکردند.

تأثیر تیمارهای مختلف زیستی روی ارتفاع ساقه نشان داد که تیمارهای (*P. fluorescens*)، (*B. subtilis*) و تیمار ترکیبی (*B. subtilis+P. fluorescens*) در افزایش رشد ساقه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با تیمار شاهد سالم ایجاد نکردند و بهترین تیمار از این نظر تیمار شاهد سالمی بود که به آن (*B. subtilis*) تلقیح شده است که باعث افزایش ارتفاع ساقه لوبیا تا ۳۹/۵۰ سانتی‌متر شد؛ که این افزایش رشد بیانگر این مطلب است که باکتری (*B. subtilis*) افزون بر اینکه در کنترل بیماری Xap نقش مثبتی دارد به‌تنهایی می‌تواند باعث افزایش رشد گیاه نیز بشود به گونه‌ای که این تیمار ((*B. subtilis* (+A)) نسبت به تیمار شاهد سالم و آلوده به ترتیب ۳/۹۰ و ۴۱/۱۴ درصد افزایش رشد در ساقه نشان داده است. تیمار ترکیبی (*B. subtilis+P. fluorescens*) نسبت به تیمار شاهد آلوده به ترتیب ۲۴/۴۴ درصد باعث افزایش رشد ساقه شده است و باعث بهبود رشد ساقه شده است و تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد را با تیمار شاهد سالم نشان نداد. وزن تر گیاه لوبیا آلوده به باکتری Xap تحت تأثیر کاربرد عامل‌های زیستی باکتریایی، گرچه این عوامل باعث افزایش وزن تر ریشه شده‌اند ولی این میزان افزایش در این شاخص تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ایجاد نکرد. ولی در سطح احتمال ۵ درصد تیمار شاهد آلوده و شاهد سالم تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین دو تیمار (*B. subtilis*) و (*B. subtilis+P. fluorescens*) به ترتیب با ۱/۵۵ و ۱/۷۹ گرم وزن تر ریشه تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد سالم نشان ندادند. اندام‌های هوایی گیاه لوبیای آلوده به باکتری Xap تحت تأثیر عامل‌های زیستی باکتریایی نشان داد که تیمار (*B. subtilis+P. fluorescens*) با ۵/۸۴ گرم وزن تر اندام‌های هوایی تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد با تیمار شاهد آلوده با ۳/۴۵ گرم وزن تر اندام‌های هوایی نشان داد. این تیمار باعث افزایش ۴۰/۹۲ درصد وزن تر اندام‌های هوایی گیاه لوبیای آلوده به باکتری Xap شد. تأثیر عامل‌های زیستی باکتریایی بر وزن خشک گیاه آلوده به بیماری سوختگی معمولی لوبیا نشان داد که گرچه این

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف.

Table 2- Analysis of variance results in different treatments.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	ارتفاع Height		وزن تر Fresh weigh		وزن خشک Dry weigh	
		ریشه Root	ساقه Stem	ریشه Root	ساقه Stem	ریشه Root	ساقه Stem
تیمار Treatment	6	22.70**	105.05**	0.62ns	13.25**	0.007ns	0.43**
خطا Error	18	4.12	13.95	0.22	0.92	0.003	0.025
ضریب تغییرات CV	-	10.28	11.70	26.30	17.63	21.60	20.30

**سطح معنی‌داری P< ۰/۰۱، *سطح معنی‌داری ۰/۰۵ > P > ۰/۰۱، معنی‌دار نشدن P >۰/۰۵

**Significant at P<0.01, *Significant at 0.01< P< 0.05 and ns: not significant at P > 0.05.

Archive of SID

www.SID.ir

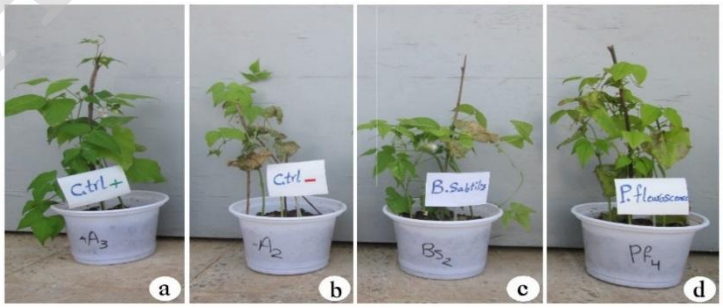
عامل‌های زیستی در کل باعث افزایش این شاخص گیاهی شدند ولی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. ولی بر وزن خشک اندام‌های هوایی این گیاه تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ایجاد کردند. در بین این تیمارها، تیمار (*B. subtilis*+*P. fluorescens*) با ۰/۷۷ گرم وزن خشک اندام‌های هوایی باعث افزایش ۴۸/۰۵ درصدی وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه لوبیا در مقایسه با تیمار شاهد آلوده شد و از این نظر بهترین تیمار به‌شمار می‌آید (جدول ۳ و شکل ۴).

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان بیان داشت که عامل‌های زیستی باعث افزایش در شاخص‌های گیاهی از جمله ارتفاع، وزن تر و خشک گیاه لوبیا می‌شوند. بیشترین تأثیر (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) در اندام‌های هوایی گیاه کرد پیدا کرد. این عامل‌ها باعث تقویت گیاه در برابر شرایط نامساعد از جمله عامل‌های بیماریزایی مانند بیماری سوختگی معمولی لوبیا می‌شود. در شرایطی که این پاتوژن بیماریزا به گیاه لوبیا حمله کند به‌طور معنی‌داری باعث

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف.

Table 3. Mean comparison of variance results in different treatments of biological agents against bean common bacterial blight.

تیمار Treatment	ارتفاع (سانتی‌متر) Height (cm)		وزن تر (گرم) Fresh weight (gr)		وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)		درصد نشانه‌ها Symptoms (%)
	ریشه Root	ساقه Stem	ریشه Root	ساقه Stem	ریشه Root	ساقه Stem	
شاهد آلوده Infected control (-A)	16.92b	23.25c	1.31a	3.07b	0.14a	0.40d	63.89c
شاهد سالم Non-infected control (+A)	23.87a	37.96ab	2.30a	7.38a	0.22 a	1.03ab	0.00[a]
سودوموناس فلورسنت + گیاه سالم آلوده به باکتری Xap *P. fluorescens* + (+A)	20.19ab	31.81abc	2.31a	6.71a	0.25 a	0.97ab	0.00a
باسیلوس سابتیلیس + گیاه آلوده به باکتری Xap *B. subtilis* + (+A)	2025ab	39.50a	1.62a	7.41a	0.22 a	1.29a	0.00a
سودوموناس فلورسنت + گیاه سالم *P. fluorescens* + (-A)	17.60b	29.19c	1.47a	3.77b	0.16 a	0.59cd	50.00b
باسیلوس سابتیلیس + گیاه سالم *B. subtilis* + (-A)	18.25b	28.13c	1.55a	3.51b	0.16 a	0.49cd	54.16bc
سودوموناس فلوروسنت+باسیلوس+گیاه سالم *B. subtilis*+ *P. fluorescens* + (-A)	21.06ab	30.77abc	1.80a	5.84a	0.18 a	0.77bc	31.25b



شکل ۴- مقایسه گیاه سالم با گیاه آلوده به باکتری عامل سوختگی معمولی لوبیا تیمار شده با عامل‌های زیستی باکتریایی در شرایط گلخانه. a) شاهد سالم b) شاهد آلوده c) گیاه آلوده با باکتری Xap تحت تیمار (*B. subtilis*) d) گیاه آلوده به Xap تحت تیمار (*P. fluorescens*).

Fig. 4- Comparison of non-infected plants with infected plants (common bacterial bean blight) treated by bacterial biological agents under greenhouse conditions. a) Non-infected plants, b) Infected plants, c) Plants infected by Xap treated with *B. subtilis*, d) plants infected by Xap treated with *P. fluorescens*.

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش شاخص‌های گیاهی می‌شود و در شرایط مناسب از نظر رطوبت و دما کل گیاه را از بین می‌برد. کاربرد عامل‌های آنتاگونیست (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) روی گیاهان آلوده به Xap باعث مقاومت گیاه لوبیا در برابر Xap شد و از گیاه لوبیا در برابر این عامل بیماریزا را تا حدود زیادی محافظت کرد. در صورتی که (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) همزمان با یکدیگر به کار برده شود به‌طور مؤثرتری باعث تقویت شاخص‌های گیاهی و کنترل بیماری Xap شود.

در پژوهش همسانی استفاده از باکتری‌هایی چون (*Pseudomonas* sp.) و (*Bacillus* sp.) را به‌عنوان عامل‌های کنترل‌کننده Xap پیشنهاد داده‌اند و پژوهشگران این آزمایش بیان داشته‌اند که این دو عامل آنتاگونیستی در کنار باکتری‌های ریزوبیوم باعث فعالیت حفاظتی در برابر بیماری سوختگی لوبیا می‌شود، که در نهایت باعث به وجود آمدن حفاظت سیستمیک (فراگیر) گیاه لوبیا در برابر این بیماری می‌شود (Zanatta *et al.*, 2007). پژوهشگران دیگر با جداسازی باکتری اندوفیت (درون‌رست) (*Pseudomonas* spp.) از ریشه و ساقه‌های گوجه‌فرنگی و کلزا نقش آن‌ها را در افزایش رشد این گیاهان بررسی کردند. آنان در نتایج بررسی‌های خود نشان دادند این باکتری‌ها افزون بر بهبود جوانه‌زنی بذر، افزایش طول گیاهچه و القای رشد، با تولید متابولیت‌های فرار و HCN می‌تواند نقش مؤثری در جلوگیری از رشد عامل‌های میکروبی زیانبار این گیاهان داشته باشند (Nejad *et al.*, 2000). همچنین مشخص شده است باکتری (*B. subtilis* FZB24) با تحریک در افزایش تولید اتیلن و اکسین نظام ریشه‌ای گیاه را توسعه می‌دهد (Kilian *et al.*, 2000).

محققان دیگری، برای کنترل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی ۶۰ جدایه (*B. subtilis*) از نقاط مختلف چین گردآوری کردند که در بین این جدایه‌ها، شش جدایه تأثیر کنترلی بالاتر از ۵۰ درصد از خودشان نشان دادند (Chen *et al.*, 2012). در طی پژوهش‌های دیگری تأثیر آنتاگونیستی (*B. subtilis*) و (*P. fluorescens*) روی باکتری عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی گزارش شده است، باکتری (*B. subtilis*) تأثیر کنترل‌کنندگی بهتری نسبت به باکتری (*P. fluorescens*) دارد و از نظر شاخص‌های طول ساقه، وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه و وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه گزینه بهتری برای کنترل پژمردگی باکتریایی می‌باشد (Mirzaei Najafgholi *et al.*, 2015). در فرایند آزمایش دیگری تأثیر آنتاگونیستی (*Bacillus* sp)، (*T. harzianum*) و (*P. fluorescens*) روی باکتری (*Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*) بررسی و مشخص شد همه این عامل‌ها کنترل‌کنندگی خوبی روی این باکتری داشته‌اند، ولی در بین این عامل‌ها، باکتری (*Bacillus* sp) بیشترین بازدارندگی از رشد این باکتری بیمارگر را به میزان ۱۶/۷۷ درصد داشت (Rashid *et al.*, 2013).

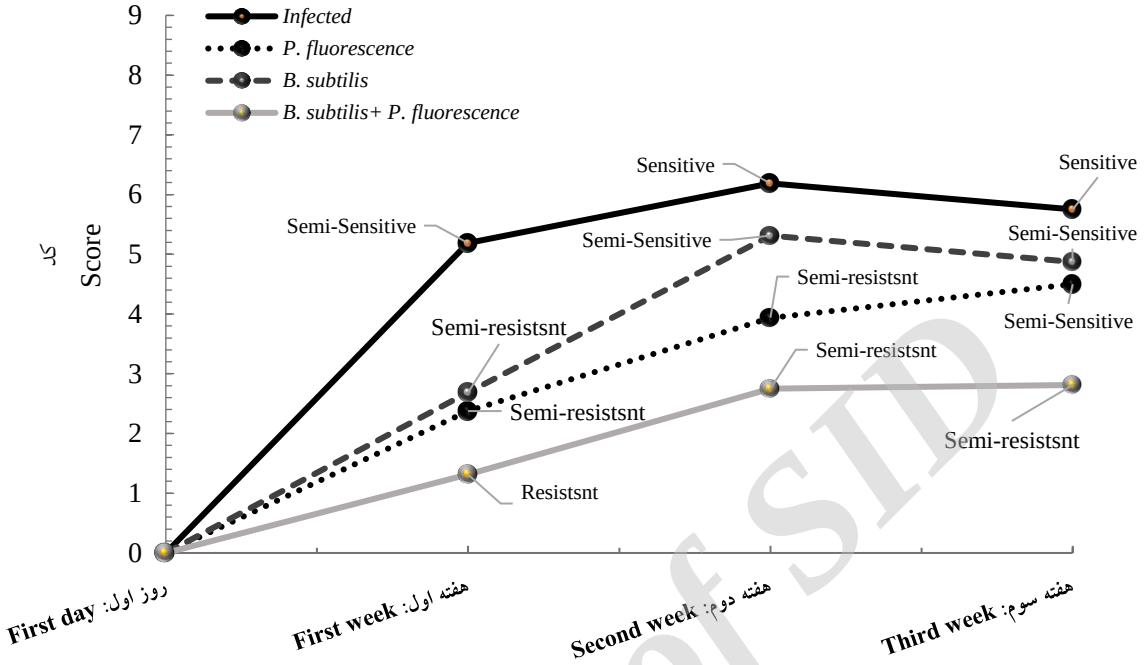
بررسی مقاومت گیاه لوبیا در برابر بیماری Xap نشان داد که رقم لوبیا صدری رقمی حساس به این بیماری می‌باشد، به گونه‌ای که از هفته دوم تلقیح بیمارگر به این گیاه نشانه-هایی در گیاه لوبیا ظاهر شد و به مرور زمان و تا مرحله گلدهی این نشانه‌ها رو به افزایش بود و در مرحله گل‌دهی بیشترین درصد نشانه‌ها را نشان داد. بنابر سامانه CIAT درصد نشانه‌ها در گیاه آلوده لوبیا رقم صدری در این پژوهش ۶۳/۸۹ درصد گزارش شد. گیاه آلوده لوبیا هنگامی‌که تحت تأثیر عامل‌های زیستی باکتریایی قرار گرفت کاهش نشانه‌های خاصی را نشان داد، به طوری که دو تیمار ترکیبی (*B. subtilis+P. fluorescens*) و تیمار (*P. fluorescens*) به ترتیب ۵۱/۰۹ و ۲۱/۷۴ درصد نشانه-ها را کاهش دادند و از این نظر در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده از نظر درصد علائم و تأثیر بر مقاومت گیاهی از خود نشان دادند. بهترین تیمار در این پژوهش تیمار ترکیبی (*B. subtilis+P. fluorescens*) می‌باشد که به‌طور کلی ۳۱/۲۵ درصد نشانه-ها را از خود نشان داد و از نظر مقاومت گیاهی، گیاه لوبیای حساس به بیماری Xap را از حالت حساس به حالت نیمه مقاوم تبدیل کرد (شکل‌های ۵ و ۶).

در این پژوهش به طورکلی کاربرد عامل‌های زیستی (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) در کاهش بیماری سوختگی معمولی لوبیا تأثیر بسزایی داشتند. باکتری (*P. fluorescens*) با ۲۱/۷۴ درصد کاهش نشانه‌ها نسبت به (*B. subtilis*) تأثیر بهتری در کنترل این بیماری داشت. اگرچه کاربرد جداگانه این عامل‌های زیستی باعث کاهش شدت نشانه‌ها و افزایش مقاومت گیاهی شده است ولی کاربرد ترکیبی این دو عامل زیستی نتیجه بهتری داشت و نشانه‌های بیماری سوختگی معمولی لوبیا را در شرایط گلخانه بیش از ۵۰ درصد کاهش داد. در نتایج بررسی‌های دیگر پژوهشگران مشخص شد که دو باکتری (*Bacillus* sp)

Archive of SID

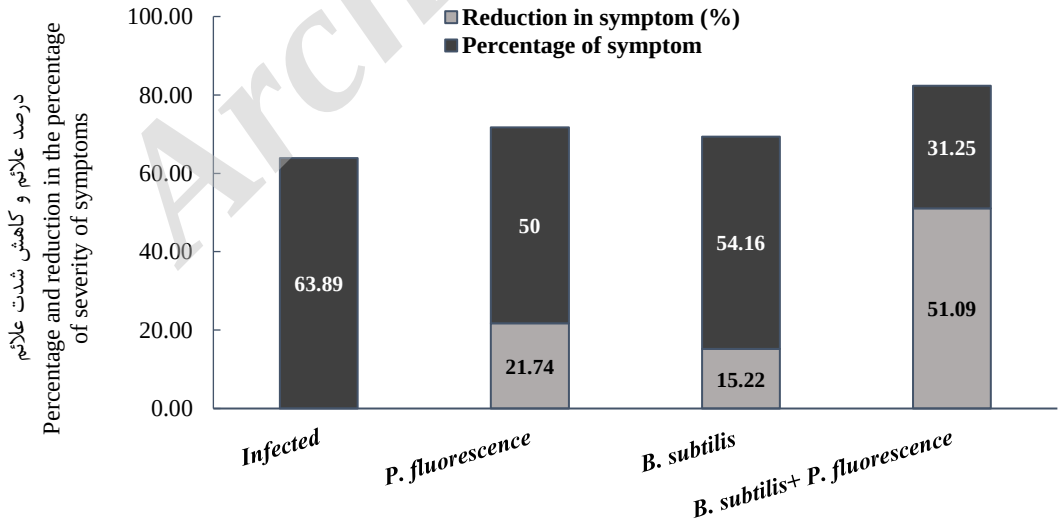
www.SID.ir

و (*P. fluorescens*) باعث کاهش نشانه‌های ناشی از Xap روی لوبیا شدند و به‌طور معنی‌داری باعث افزایش رشد در گیاهان تیمار شده شدند (Mabagala, 1999). همچنین مشخص شده است که گونه‌های سودوموناس و باسیلوس توانسته‌اند باکتری Xap را در مرحله برگ‌های لپه‌ای و نخستین برگ‌های حقیقی تا ۸۰ درصد کنترل کنند و نشانه‌های به وجود آمده توسط این بیمارگر گیاهی را تا حدود زیادی کنترل کردند (Zarela *et al.*, 2007).



شکل ۵- مقاومت گیاه لوبیا با استفاده از نظام نمره دهی CIAT و سامانه مقیاس مقاومت Webster و همکاران، در مقابل با بیماری سوختگی معمولی لوبیا تحت تأثیر عامل‌های زیستی باکتریایی (حساس: Sensitive، نیمه حساس: Semisensitive، مقاوم: Resistant و نیمه مقاوم: Semi-resistant).

Fig. 5- Bean plant resistance by CIAT and Webster *et al.* scoring system against common bacterial bean blight under the influence of bacterial biocontrol agents.



شکل ۶- مقایسه میانگین درصد شدت نشانه‌ها و کاهش شدت نشانه‌ها در تیمار با عامل‌های زیستی باکتریایی در مقایسه با تیمار آلوده.

Fig. 6- Mean comparison of the percentage of symptom severity and the reduction of symptom severity after treatment with bacterial biocontrol agents in comparison with untreated diseased plants.

Archive of SID

www.SID.ir

(سودوموناس‌ها گونه‌هایی از باکتری‌های محرک رشد گیاه هستند و مشخص شده است این باکتری‌ها با تولید سیدروفور، اندول استیک اسید، ACC - دآمیناز و به ویژه انحلال فسفات‌های نامحلول باعث تقویت رشد گیاه و بازدارندگی از رشد عامل‌های بیماریزا می‌شوند (Yang *et al.*, 2011). همچنین مشخص شده است سویه‌های سودوموناس و باکتری‌های محرک رشد در گیاهان، و مقاومت در برابر تنش‌ها و افزایش سرعت رشد گیاهان می‌شوند (Spaepen *et al.*, 2007). باکتری‌های سودوموناس بر میزان سبزینه (کلروفیل) نیز تأثیر معنی‌داری دارد. این افزایش سبزینه را به افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز نسبت داده‌اند (Kavino *et al.*, 2010). در بررسی‌های دیگری سه سویه از باسیلوس (*B. megaterium*) ، (*B. subtilis*) و (*B. megaterium*) روی (*Xanthomonas campestris* pv *campestris*) ارزیابی و مشخص شد این باکتری‌ها همگی تأثیر کنترل‌کنندگی روی این باکتری بیمارگر گیاهی داشتند و گونه (*B. subtilis*) بیشترین تأثیر کنترل‌کنندگی را دارا بود (Monteiro *et al.*, 2005). همچنین مشخص شده است که تأثیر آنتاگونیستی (*P. fluorescens*) روی (*Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*) باعث کاهش ۵۰ درصدی نشانه‌های ناشی از این باکتری شد (El-Hendawy *et al.*, 2003). در پژوهش دیگری استفاده از باکتری‌های (*P. fluorescens*) و (*Pantoea agglomerans*) شدت نشانه‌های سوختگی زانتوموناسی را در برگ پیاز تا سطح معنی‌داری کاهش داد (David and Howard, 2005).

همچنین، گزارش شده است که باکتری (*P. fluorescens*) به‌طور میانگین ۶۳/۸ درصد نشانه‌های به وجود آمده توسط زانتوموناس روی فلفل را کاهش داد. گونه‌های مختلف باسیلوس به‌طور میانگین بین ۴۹ تا ۶۳ درصد نشانه‌های به وجود آمده زانتوموناسی در سطح برگ فلفل را کاهش داد (Ji *et al.*, 2006). همچنین، لکه‌های باکتریایی ایجاد شده روی خیار توسط باکتری زانتوموناس به‌طور معنی‌داری به‌وسیله عامل‌های آنتاگونیست سودوموناس از جمله (*P. fluorescens*) و باسیلوس کاهش پیدا کرد (Wei *et al.*, 1996).

نتیجه‌گیری

بیماری سوختگی معمولی لوبیا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های لوبیا می‌باشد که می‌تواند تولید این محصول را در شرایط مناسب دمایی و رطوبت با مشکل جدی رو به رو سازد. باکتری‌های زیستی (*P. fluorescens*) و (*B. subtilis*) از یک طرف باعث رشد و تقویت گیاه لوبیا و از سوی دیگر باعث کاهش آسیب و زیان باکتری Xap روی این گیاه می‌شود. این عامل‌های زیستی می‌توانند با تولید ترکیبات فنولی و ترکیبات ضد باکتریایی باعث کاهش چشمگیر نشانه‌ها و در نهایت آسیب و زیان باکتری Xap روی گیاه لوبیا می‌شود. کاربرد این دو عامل زیستی با هم و به‌طور همزمان آسیب و زیان بیماری سوختگی معمولی لوبیا را تا زیر آستانه زیان اقتصادی پایین می‌آورد. بنابراین استفاده از این باکتری‌ها و مواد تولیدی آن‌ها می‌تواند جایگزین خوبی در استفاده از سموم و کودهای شیمیایی باشد.

منابع

Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H.R., Hosainpour, R., Hatami, F., Fazli, B., Kazemian, A. and Rafiei, M., 2015. Agricultural Statistics (2013-14). Department Publication of Agriculture, Planning and Economic, Tehran, Iran.

Akhavan, P., Jafari, M. and Fathian, M., 2006. Critical success factors of knowledge management systems: A multi-case analysis. European Business Review. 18, 97-113. (In Persian with English abstract).

Backman, P.A., Wilson, M. and Murphy, J.F., 1997. Bacteria for biological control of plant diseases. In: Rechcigl, N.A. and Rechcigl, J.E. (Eds.), Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control. CRC Press, Boca Rota, Pp. 95-109.

Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R. and Guo, J.H., 2012. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology. 15, 848-864.

Da Silva, E.G., Moura, A.B., Deuner, C.C. and Farias, D.R., 2008. Estudo de mecanismos de biocontrole do crestamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. Revista Ceres. 55, 377-383.

Archive of SID

www.SID.ir

David, H. and Howard, F., 2005. Management of *Xanthomonas* Leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. Plant Disease. 89, 631-639.

Dhanya, M.K. and Mary C.A., 2006. Management of bacterial blight of *Anthurium andreanum* Linden. using ecofriendly materials. Journal of Tropical Agriculture. 44, 74-75.

El-Hendawy, H.H., Osman, M.E. and Sorour, N.M., 2003. Characterization of two antagonistic strains of *Rahnella aquatilis* isolated from soil in Egypt. Folia Microbiology. 48, 799–804.

Gilbertson, R.L. and Maxwell D.P., 1992. Common bacterial blight of bean. In: Chaube, H.S., Kumar, G., Mukhopadhyay, A. N. and Singh, U.S. (Eds.), Plant Diseases of International Importance. Prentice Hall, New Jersey, pp. 18-39.

Hirano, S.S. and Upper C.D., 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. Annual Reviwe Phytopathology. 21, 243-269.

Ji, P., Campbell, H.L., Kloepper, J.W., Jones, J.B., Suslow, T.V. and Wilson, M., 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under Weld conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. Biological Control. 36, 358–367.

Kalyan, K. and Mondal, K.K., 2004. Integrated management strategies for fuscous blight and floury leaf spot of rajmash. Indian Phytopathology. 57, 135-139.

Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D. and Samiyappan, R., 2010. Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp.) under field conditions. Applied Soil Ecology. 45, 71-77.

Kilian, M., Steiner, U., Krebs B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. and Hain, R., 2000. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent *enhancing plant vitality*. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. 1, 72-93.

Lak, M.R. and Dorri, H.R., 2009. Screening bean genotypes (*Phaseolus vulgaris)* for resistance to common bacterial blight disease in Markazi Province, Iran. Plant Protection Journal. 1, 311-320. (In Persian with English abstract).

Li, M., Yang, Q. and Song, J., 2009. Three tubulin genes of *Trichoderma harzianum*: Alpha, Beta, and Gamma. Braz. Archive Biological Technology. 53, 811-816.

Mabagala, R.B., 1999. Epiphtic bacteria varius Bea genotype and their potential for biocontrol pf *xanthomonas axanopodis* pv. *phaseoli*. Tanzania Journal Agricultural. 2, 19-26.

Majnoun Hosseini, N., 2008. Grain legume production. Jihad-Daneshgahi Publication, Tehran, Iran.

Mirzaei Najafgholi, H., Narimani, S., Aeini, M., Taghavi, S.M., Tarighi. S. and Javaheri. S., 2015. Investigation the performance and biological control of the various tomato cultivars against the bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*). Biocontrol in Plant Protection. 57, 47-57. (In Persian with English abstract).

Mondal, K.K. and Verma, J.P., 2003. Biological control of cotton diseases. In: Ganamanickam, S.S. (Eds.), Biological Control of Crop Diseases. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 253-289.

Monteiro, L., Lima, R., Mariano, R. and Souto-Maior, A.M., 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 48, 23-29.

Nejad, P. and Johnson, P.A., 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control. 18, 208–215.

Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D. and Dixit, S N., 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. Zeitschrift fur Pflanzenkraneaten and Pflanzenschutz. 89, 344-349.

Raijmakers, J.M. and Mazzola, M., 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficialnd plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology. 50, 403-424.

Rashid, M., Chowdhury, M.S.M. and Sultana, N., 2013. In-vitro screening of some chemicals and biocontrol agents against *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*, the causal agent of soft rot of potato *Solanum tuberosum*. The Agriculturists. 11, 1-9

Sakthivel, N. and Mew, T.W., 1991. Efficacy of bacteriocinogenic strains of *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae on the incidence of bacterial blight disease of (*oryza sativa* L.). Canadian Journal Microbiology. 37, 764-768.

Sallam, N.M., 2011. Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodi*s pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*.

Archive of SID

www.SID.ir

Archives of Phytopathology and Plant Protection. 44, 1966-1975.

Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third ed. Hall, R., (Eds.), Compendium of Bean Diseases. APS Press, Minnesota, USA, pp. 1-373.

Schoonhoven, A.V. and Pastor-Corrales, M.A., 1994. Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm. CIAT Publication, USA.

Sindhu, S.S., Rakshiya, Y.S. and Sahu, G., 2009. Rhizosphere bacteria and their role in biological control of plant diseases. Pest Technology. 3, 10-21.

Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Reviwe. 31, 425-448.

Watts, R., Dahiya, J., Chaudhary, K. and Tauro, P., 1988. Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of *Trichoderma reseii*. Plant and Soil. 107, 81-84.

Webster, D.M., Temple, R.S. and Galvez, G.E., 1983. Expression of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *phaseolus vulgaris* under tropical conditions. Plant Disease. 67, 394-396.

Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under Weld conditions. Phytopathology. 86, 221-22.

Yang, M.M., Mavrodi, D.V., Mavrodi, O.V., Bonsall, R.F., Parejko, J.A., Paulitz, T.C., Thomashow, L.S., Yang, H.T., Weller, D.M. and Guo, J.H., 2011. Biological control of Take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields. Phytopathology. 101, 14. 81-91.

Yearbook, F.S., 2013. World food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Zanatta, Z., Moura, A.B., Maia, L.C., y dos Santos, A.S., 2007. Biossay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Brazilian Journal of Microbiology. 38. 511- 515.

Zarela, G.C.N., Zanatta, Z., Andrea, B., Moura-Luciano, C., Maia, A. and Dos-Santos, S., 2007. Bioassay for election of biocontroller bacteria against bean common blight *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Brazilian Journal of Microbiology. 38, 511-515.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of bacterial biocontrol agents on common bean blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Fatemeh Drikvand, Eyidi Bazgir*and Mostafa Darvishnia
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
*Corresponding author: bazgir14@gmail.com.
Submitted: 2016.07.23
Accepted: 2016.12.11
Drikvand, F., Bazgir, E. and Darvishnia, M., 2017. Effect of bacterial biocontrol agents on common bean blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Journal of Agroecology. 7 (1), 124-139.

Introduction: Common bacterial bean blight with the casual agent of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap)* causes severe damage to the crop in the west of the country. The disease is prevalent in areas with warm weather, causing up to 80% yield reduction (Lak and Dorri, 2009). One of the ways to control the plant disease is to use bacterial biological agents such as *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtillis*. The aim of this study is to investigate the biological agents that control common bacterial bean blight disease.

Materials and methods: First, the growth inhibitory effect of bacterial biocontrol agents against Xap was investigated in vitro on the Nutrient Agar (NA) medium for 24 hours. Then the effect of biological agents (*P. fluorescens*, *B. subtilis*, and the combination of them) against *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* were evaluated in a completely randomized design in addition to four replications under greenhouse conditions. After about three weeks, indices such as fresh root and shoot weight, dry root and shoot weight, root and stem height, plant resistance, and the percentage of plant disease (according to the coding system ICTA and the method of Webster et al., 1983) were measured and used to analyse the control power of the biological agents.

Results and Discussion: The results showed the biological agents prevented the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by creating a zone inhibitor in the NA medium. The diameter of zone inhibition for *P. fluorescens* and *B. subtilis* were respectively 32.75 and 20.75 mm. Zone inhibition indicated that the biological agents *P. fluorescens* and *B. subtilis* reduced by 20% and 30% *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli's* growth in the culture medium. The severity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* symptoms on bean plants under greenhouse conditions were more than 63%, but the biological treatments reduced the symptoms and increased the plant's strength. In this study, the combination of these two biological factors' treatment (*P. fluorescens* + *B. subtillis*) had the greatest biocontrol effects on the disease and reduced bean common bacterial blight symptoms up to 51% compared to the control. They converted the plant from susceptible to moderately resistant. Singular treatments of *P. fluorescens* and *B. subtilis* reduced symptoms up to 21.74% and 15.22% respectively. These changes in the weight and height of the plants infected by the biological agents *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* had a significant effect on the one-percent significance level. It has been found that these biological agents can prevent the growth of plant pathogenic bacteria such as *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by the production of antibiotics, secondary metabolite (Raijmakers and Mazzola, 2012), direct impact on plant growth, production of auxin and cytokinin, and stimulation of plant resistance (Nejad *et al.,* 2000; Kilian *et al.,* 2000).

Conclusion: These biological agents, such as *P. fluorescens* and *B. subtilis*, had a significant impact in preventing the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Thus, we could use these biological agents and their materials production to control common bean blight disease.

Keywords: Bean, Biological Control, *Bacillus* spp., *Pseudomona* spp., *Xanthomonas* spp.

References:

Raijmakers, J.M. and Mazzola, M., 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficialnd plant pathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology. 50, 403-424.

Nejad, P. and Johnson, P.A., 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control. 18, 208–215.

Archive of SID

www.SID.ir