مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۴ (۸۰۳-۷۹۱)

بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت روی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.)de Bary عامل پوسیدگی ریشه آفتابگردان

کیوان بهبودی[۱]، عباس شریفی تهرانی[۲]، قربانعلی حجارود[۳]، جواد زاد[۴]، مجتبی محمدی[۵] و حشمت الله رحیمیان[۶]
۱، ۲، ۳، ٤، ٥، دانشجوی دوره دکتری، استادان و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
٦ ، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۸

خلاصه

خاک مزارع آفتابگردان استان آذربایجان غربی جمع آوری شد، سپس بذر آفتابگردان در گلخانه در این خاکها کاشته شد و از ریزوسفر این گیاهان ٤٥ جدایه سودوموناس فلورسانس با استفاده از محیط S1 جدا گردید. بررسی تاثیر جدایه‌های فوق در جلوگیری از تندش اسکلروت قارچ نشان داد که ٢٦ جدایه مانع تندش اسکلروت قارچ گردیدند که برای آزمایشهای بعدی انتخاب شدند و جدایه‌های B8، B29 و B38 بیشترین تاثیر را در جلوگیری از تندش اسکلروت قارچ دارا بودند. همچنین بررسی تاثیر ریزوباکتریها در خاک غیر استریل و آلوده شده به قارچ نشان داد که قارچکش بنومیل و جدایه‌های B119 ، B120، B111و B112 بیشترین تاثیر را در کنترل بیماری داشتند. بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر سودوموناسهای فلورسنت روی قارچ فوق نشان داد که در ناحیه بازدارندگی، از هیف مقدار زیادی محتویات سیتوپلاسم به خارج تراوش کرده و در اطراف هیف مجتمع شده و تشکیل لخته داد. همچنین در این ناحیه هیفهای غیرطبیعی مشاهده شد که شامل پیچش، نکروز و چند شاخه شدن هیف بودند. ٦٨ درصد از ریزوباکتریهای مورد استفاده و همچنین جدایه CHA0 تولید سیانید هیدروژن کردند. کاربرد جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی (کشت متقابل) نشان دادند که جدایه‌های CHA0، B112، B119 و B38 بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد قارچ دارند. بررسی متابولیتهای فرار جدایه‌ها نشان داد که این متابولیتها به خوبی سبب ممانعت از رشد میسلیوم قارچ فوق می‌گردند و جدایه‌های B120 و B112 به میزان ۱۰۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری کردند. بررسی تاثیر جدایه‌ها در افزایش رشد گیاه آفتابگردان نشان داد که جدایه‌های B112، B119 و B111 بیشترین تاثیر را در افزایش وزن گیاه آفتابگردان دارند. همه جدایه‌های موثر در کنترل بیماری، باکتری *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، کنترل بیولوژیکی، سودوموناس فلورسنت

مقدمه

آفتابگردان با نام علمی *Helianthus annuus* یکی از ۵ گیاه روغنی یکساله جهان محسوب می‌گردد که به علت داشتن ۴۶ درصد روغن با کیفیت بالا، یکی از دانه‌های روغنی پر ارزش می‌باشد. این گیاه کوتاه‌ترین دوره رویشی را نسبت به سایر گیاهان زراعی یکساله دارد که در شرایط مختلف آب و هوایی و در منطقه وسیعی از مملکت به دو روش آبی و دیم کشت می‌گردد(۴). یکی از مهمترین بیماریهای آفتابگردان در ایران بوته‌میری و پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*(Lib.)de Bary می‌باشد (۲، ۳). ایرانی (۱۳۷۷) میزان خسارت قارچ *S. sclerotiorum* را در مرحله نزدیک برداشت در مناطق ماکو، خوی، سلماس، ارومیه و

مکاتبه کننده: کیوان بهبودی
e-mail: Keivanbeh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

میاندوآب به ترتیب ۲۱/۵، ۳۶، ۳۸، ۳۰/۵ و ۱۸ درصد برآورد کرد. این بیماری از اکثر نقاط دنیا گزارش گردیده است (۱۹).

بیش از ۳۰ گونه از قارچها و باکتریها به عنوان عوامل آنتاگونیست یا میکوپارازیت گونه‌های جنس اسکلروتینیا گزارش شده‌اند که در غالب موارد بررسی ها آزمایشگاهی یا تحت شرایط استریل انجام شده و فعالیت آنتاگونیستی اغلب گونه‌ها تحت شرایط طبیعی نامعلوم می‌باشد (۲۹). شناخت نقش مفید باکتریهای خاکزی در افزایش رشد گیاهان، بیش از یک قرن سابقه دارد و سودوموناسها از اهمیت ویژه‌ای در میان این گروه باکتری‌ها برخوردار هستند. شواهد نشان می‌دهد، کاربرد سودوموناسها همراه بذور سبب محافظت آنها و گیاهان در مقابل عوامل بیماریزای خاکزی شده و در نتیجه افزایش محصول را بدنبال دارد (۱۳، ۱۷، ۲۱). همچنین کاربرد جدایه‌های باکتریایی سبب عدم تندش اسکلروت‌های قارچ *S. sclerotiorum* شده است (۳۲). مکلوگلین و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند که کاربرد سودوموناسهای فلورسنت در مزرعه سبب افزایش ظهور گیاهچه آفتابگردان در حضور قارچ *S. sclerotiorum* و در نتیجه ممانعت از بیماری شده است. همچنین جدایه‌های سودوموناس فلورسنت به عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی در جلوگیری از قارچ‌های خاکزاد گوناگون گزارش شده‌اند (۳۰،۷). اوجی جینو و همکاران (۱۹۹۳) جدایه‌هایی از سودوموناسهای فلورسنت، غیرفلورسنت و باسیلوس را بر علیه قارچ *S.sclerotiorum* بکار بردند و نتیجه گرفتند تولید آنتی بیوتیک توسط این جدایه‌ها مهمترین نقش را در کنترل قارچ فوق داشته است.

مبارزه شیمیایی و استفاده از ارقام مقاوم تاثیری در کنترل بیماری اسکلروتینیایی آفتابگردان نداشته است (۲۹). بطور کلی مبارزه شیمیایی با عوامل بیماریزای خاکزاد تاثیر چندانی ندارد و علاوه بر این سبب آلودگی زیست محیطی می‌گردد و همچنین روی میکروفلور طبیعی خاک تاثیر منفی گذاشته و از حاصلخیزی خاک می‌کاهد. بدین جهات مبارزه بیولوژیک با این عوامل بخصوص قارچ عامل بیماری اسکلروتینیایی آفتابگردان از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

به منظور یافتن بهترین جدایه‌های سودوموناس فلورسنت جهت کنترل بیولوژیکی قارچ *S.sclerotiorum* این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوري گياهان بيمار،جداسازي و خالص سازي قارچ بيمارگر

بوته‌های آفتابگردان با علائم بیماری از مزارع آلوده ارومیه منطقه نازلو جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس با احتیاط خاک اطراف ریشه و طوقه جدا و در زیر شیر آب بطور سطحی شستشو شدند. برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ از بوته‌ها و اسکلروتهایی که از قسمت‌های مختلف (سطح رویی ساقه، سطح زیرین پوست ساقه، مغز ساقه، ناحیه طوقه و اطراف ریشه‌های اصلی) بوته‌های آلوده برداشت شده بودند از روش هوانگ (۱۹۹۰) استفاده شد. جهت جداسازی قارچ از اسکلروت بدین ترتیب عمل گردید که، اسکلروت‌ها ابتدا به مدت ۹۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر استریل و جذب آب اضافی توسط کاغذ صافی، در محیط کشت PDA کشت گردیدند. سپس قارچهای رشد کرده درون تشتک پتری دیگری منتقل و درون انکوباتور با درجه حرارت ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از آب آگار ۲ درصد تک ریسه و خالص شدند.

اثبات بيماريزايي

پس از شناسایی عامل بیماری، اثر بیماریزایی آن روی رقم رکورد طی مراحل زیر آزمایش گردید.

تهيه مايه قارچ

برای این منظور از روش سائسفورد و کولی (۱۹۹۲) استفاده گردید. ابتدا گندم رقم قدس شیشه‌ای درون الک زیر آب شسته، سپس داخل بشر ریخته و روی آن آب ریخته شد و به مدت ۲ ساعت به همان حالت نگهداری گردید تا اینکه دانه‌ها بخوبی خیس بخورند. سپس ۶۰ گرم گندم در داخل ارلن ۳۰۰ میلی لیتر ریخته شد و ۶۰ میلی لیتر آب به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد سترون گردید. پس از سرد شدن ارلن‌ها، هر کدام با قارچ بیماریزا مایه‌زنی شدند. بدین منظور از کشت سه روزه قارچ

Archive of SID

www.SID.ir

S. sclerotiorum روی محیط کشت PDA، قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتیمتر برداشته و استفاده گردید. بعد از آن ارلن‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳ هفته نگهداری گردیدند. ضمناً هر ۳ روز یکبار ارلن‌ها تکان داده شدند.

مایه زنی

استفاده از اسکلروت

بدین منظور از روش هوانگ (۱۹۹۰) استفاده گردید. بدین ترتیب ابتدا گلدانها استریل گردید، سپس از خاک استریل به نسبت حجمی خاک رس ۱، خاک برگ ۳ و ماسه ۱ پر گردیدند. سپس ابتدا بذور جوانه‌دار شدند و درون هر گلدان ۴ عدد بذر جوانه زده از رقم رکورد کاشته شد. جوانه‌دار کردن بذور به اینصورت بود که ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و بعد از شستشو با آب مقطر استریل، روی کاغذ صافی خشک و سپس در شرایط استریل ۱۵ الی ۲۰ عدد بذر در داخل یک پتری حاوی محیط آب آگار ۲ درصد استریل قرار داده شدند. مجموعه حاضر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید تا بذور جوانه‌دار شوند. آنگاه در کنار هر بذر جوانه‌دار شده، اسکلروت قارچ *S. sclerotiorum* به اندازه تقریبی ۱-۰/۷ سانتیمتر قرار داده و سرانجام ۲ سانتیمتر از خاک استریل روی آنها ریخته شد. بعد از این مرحله گلدانها در گلخانه با نور روزانه ۱۴ ساعته و دمای ۳±۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۴۰ درصد قرار گرفتند و یک روز در میان آبیاری شدند. این آزمایش شامل ۴ تیمار و ۴ تکرار (هر تکرار حاوی ۴ بذر) بود که در آن تیمار شاهد بدون اسکلروت در نظر گرفته شد. تیمارها به ترتیب شامل ۱ تا ۵ اسکلروت در کنار هر بذر بودند. نتایج پس از ۱۴ روز ارزیابی گردید. در پایان آزمایش، گیاهچه‌ها را از خاک در آورده و پس از شستشو و جداسازی خاک روی ریشه‌ها، قطعه‌هایی حدود ۳ میلیمتر از آن بریده سپس در هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی، سپس در آب مقطر استریل شستشو و روی کاغذ صافی خشک شدند و در نهایت در محیط کشت PDA جهت جداسازی قارچ قرار گرفتند.

استفاده از بذر گندم واجد قارچ

در این روش از کشت ۱۰ روزه قارچ روی محیط کشت گندم طبق روش سانسفورد و کولی (۱۹۹۲) استفاده شد. بدینصورت که در کنار هر بذر جوانه زده یک دانه گندم حاوی قارچ *S. sclerotiorum* قرار داده شد. سپس روی بذور خاک استریل ریخته شد. این آزمایش واجد ۲ تیمار و ۴ تکرار بود. تیمار یک بذور گندم تلقیح شده با قارچ *S. sclerotiorum* و تیمار دوم شاهد بود.

استفاده از میسلیوم قارچ روي محیط کشت PDA

در این روش از حاشیه کشت ۳ روزه قارچ *S. sclerotiorum* روی محیط کشت PDA استفاده گردید. بدین طریق که ابتدا درون گلدان‌های پر شده از خاک استریل، بذور آفتابگردان کاشته شد. وقتی گیاهچه‌ها ۱۴ روزه شدند، در کنار هر گیاهچه در سطح گلدان یک قطعه به قطر ۱ سانتیمتر از محیط کشت PDA واجد میسلیوم قارچ قرار داده شد و یک سانتیمتر خاک استریل نیز روی آن ریخته شد. این آزمایش شامل دو تیمار مایه زنی شده با قارچ بیمارگر و شاهد بود. هر تیمار واجد ۴ تکرار و در هر گلدان ۴ بوته بود.

جداسازي باکتریها از خاک

برای جداسازی باکتریها از روش اکسپرت و دیگات (۱۹۹۵) استفاده گردید. به اینصورت که خاک مزارع آفتابگردان ارومیه، خوی، مرند و سلماس به گلخانه منتقل و در گلدان ریخته شد و بذور آفتابگردان رقم آکورد در آنها کاشته شدند. بعد از ۳ هفته، ریشه‌های آفتابگردان بشدت تکان داده شدند و در نتیجه خاک چسبیده به ریشه‌ها جدا شد. سپس نمونه‌های ریشه به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۱ درصد استریل منتقل شد. سپس سری رقت آنها روی محیط اس یک[1] کشت شد (۲۲). محیط اس یک شامل ۱۸ گرم آگار، ۱۰ گرم ساکاروز، ۱۰ میلی لیتر گلیسرول، ۵ گرم کازامینواسید[2]، ۱ گرم NaHCO3، ۱ گرم MgSO4 x 7 H2O، ۲/۳ گرم K2HPO4، ۱/۲ گرم سدیم لوریل سارکوزین[3](SLS)، ۲۰ میلی‌گرم آنتی بیوتیک تری

1. S1 medium
2. Casaminoacids
3. Sodium lauroyl sarcosine

Archive of SID

www.SID.ir

متوپریم[1] و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر است (۱۰). کلنی‌های واجد نور فلورسنت توسط لامپ ماوراء بنفش ۳۶۵ نانومتر شناسایی و جهت خالص سازی دو بار روی محیط کشت کینگ ب[2] تک کلنی گردیدند.

نگهداري باکتريهاي سودوموناس فلورسنت

برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌های سودوموناس فلورسنت، ابتدا پرگنه باکتری رشد یافته روی محیط کشت کینگ ب با استفاده از سوزن کشت به محیط لوریا برتانی براث[3] منتقل شد. محیط لوریا برتانی براث شامل ۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم تریپتون پپتون[4] ، ۰/۲۵ گرم MgSO4 x 7 H2O، ۸ گرم NaCl و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر است (۲۵). سپس ۱۶ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد روی دستگاه تکان دهنده[5] با ۱۶۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس به نسبت یک به یک با گلیسرول ۸۷ درصد استریل مخلوط و ۲ ساعت در دمای اطاق نگهداری شدند. آنگاه یک میلی‌لیتر درون لوله کوچک ریخته و درون فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

بررسي تاثير جدايه‌هاي سودوموناس فلورسنت در جلوگيري از تندش اسکلروت قارچ *S. sclerotiorum*

برای تولید اسکلروت از روش سانسفورد و کولی (۱۹۹۲) استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ اسکلروت گرد با قطر ۷-۴ میلی‌متر در سوسپانسیون باکتری شامل۱۰۸ سلول در میلی لیتر برای ۶۰ ثانیه غوطه‌ور شدند (برای تیمار شاهد، اسکلروت در آب مقطر استریل غوطه‌ور گردید). سپس اسکلروتها روی ماسه استریل مرطوب در پتری قرار می‌گرفتند و به مدت ۳۰ روز در شرایط ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۸). اسکلروتها سپس شسته و سطح آنها با محلول یک به یک اتانل و هیپوکلریت سدیم، استریل سپس در پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفتند (در هر پتری ۱۰ اسکلروت قرار گرفت) و به مدت ۷ روز در دمای ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۲). ۴۶ جدایه همراه با شاهد در ۵ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت.

1. Trimethoprim
2. King`s B medium
3. Luria bertani broth medium
4. Tryptone peptone
5. Shaker

اسکلروت‌های تندش نیافته و اسکلروت‌های زنده تولید کننده میسلیوم شمارش شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس بررسی شدند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

بررسي تاثير سودوموناسهاي فلورسنت در کاهش بيماري ناشي از قارچ *S. sclerotiorum*

این آزمایش طبق روش اکسپرت و دیگات (۱۹۹۵) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد. ابتدا بذور به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شد. سپس بوسیله آب مقطر استریل شستشو داده شدند و داخل اطاق کشت روی کاغذ صافی خشک گردیدند. سپس بذور داخل پلیت حاوی آب آگار ۲ درصد قرار داده شدند و مجموعه فوق به مدت ۲ روز تحت شرایط حرارتی ۲۷ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد قرار گرفتند تا بذور جوانه زدند. سپس بذور جوانه زده به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون جدایه‌های باکتری حاوی ۱×۱۰۸ سلول در میلی لیتر قرار گرفتند. خاک مورد استفاده غیر استریل بود. جهت کاربرد قارچ *S. sclerotiorum* از اسکلروت به میزان ۳ عدد در کنار بذر استفاده شد. گلدانها به مدت ۱۴ روز در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۱ درجه سانتیگراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پارامترهای مورد ارزیابی شامل تعداد گیاه سالم و مرده و وزن تر ریشه و قسمت‌های هوایی بودند. هر تیمار واجد ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۴ بذر بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس بررسی شدند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

شناسايي باکتريها

پنج جدایه موثر در کنترل بیماری بر اساس روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) از نظر واکنشهای گرم، کاتالاز، اکسیداز، رشد بی‌هوازی، هیدرولیز نشاسته، تولید آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان (کلنی لعابدار برجسته) از سوکروز روی محیط آگار مغذی حاوی سوکروز ۵ درصد، احیای نیترات، مصرف آدونتیول، ال ارابینوز، گالاکتوز، سوربیتول، رشد روی قند

Archive of SID

www.SID.ir

ترهالوز و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ ب مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسي ميكروسكوپي نحوه تاثير سودوموناسهاي فلورسنت روي قارچ *S. sclerotiorum*

بمنظور مشاهده نحوه ارتباط بین سودوموناسهای فلورسنت و هیفهای *S. sclerotiorum* طبق روش زازرینی و توسی (۱۹۸۵) به شرح زیر عمل شد.

الف- پس از تهیه محیط کشت حاوی مخلوط یک به یک، دو محیط PDA و کینگ ب، در یک پتری استریل به میزان ۴۰ میلی لیتر از محیط فوق ریخته و در حالیکه محیط گرم و مایع است یک عدد لام استریل را با استفاده از پنس از یک طرف در محیط فرو برده، بطوریکه یک سطح لام آغشته به محیط کشت شود. آنگاه لام را کج گرفته تا محیط اضافی آن خارج شود و لایه نازکی از محیط در سطح لام باقی بماند. سپس لام را روی یک کاغذ صافی استریل و مرطوب در پتری قرار داده و در یک طرف آن یک حلقه به قطر ۵ میلیمتر از کشت ۲ روزه قارچ *S. sclerotiorum* گذاشتهودر طرف دیگر به فاصله ۲ سانتیمتر جدایه سودوموناس فلورسنت بصورت خطی کشت گردید. سپس پتریها به انکوباتور با دمای ۲۱ درجه سانتیگراد انتقال داده شدند و روزانه بررسی گردیدند. این عمل ۵ روز ادامه یافت.

ب- پس از تهیه محیط کشت بطریق فوق (مخلوط PDA و کینگ ب)، در یک طرف پتری قارچ اسکلروتینیا و در طرف دیگر پتری جدایه سودوموناس فلورسنت کشت گردید، بطوریکه فاصله آنها از یکدیگر ۳ سانتیمتر بود. سپس نحوه تاثیر جدایههای سودوموناس روی قارچ *S. sclerotiorum* در زیرمیکروسکوپ بررسی گردید.

بررسي تجزيه كيفي توليد سيانيد هيدروژن

برای بررسی تجزیه کیفی تولید سیانید هیدروژن از روش کستریک (۱۹۷۷) و کاغذ 3M[1] استفاده شد. ابتدا کاغذ 3M در محلول کلروفرم، حاوی ۵ میلیگرم در میلی لیتر اتیل استو استات مس[2] و ۵ میلی گرم در میلی لیتر ۴ و ۴- متیلن بیس- ان-ان-دی متیل آنیلین[3] خیس شد. سپس کاغذ فوق خشک و در تاریکی نگهداری گردید. برای ردیابی فنوتیپی سیانید هیدروژن باکتریها در ۲ پلیت میکروتیتر[4] (دارای ۹۶ چاهک،که هر چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بود) کشت شدند. پلیت اول واجد محیط کشت کینگ بی دارای گلایسین و کلرید آهن و پلیت دوم محیط کشت کینگ بی و گلایسین بودند. به اینصورت که ابتدا محیط کینگ بی اتوکلاو شد و سپس ۴/۴ گرم اسید آمینه گلایسین و کوفاکتور کلرید آهن که بوسیله فیلتراسیون استریل شده بودند، اضافه گردیدند. سپس کاغذ 3M روی میکروپلیت گذاشته شد و در میکروپلیت نیز محکم روی آن گذاشته شد، بطوریکه منافذ را مسدود کند و سیانید هیدروژن فرار نکند. سپس در میکروپلیت را بسته و آنرا در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد و روی شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گذاشته و ۲۴ ساعت بعد کاغذ 3M را خارج و کاغذ جدیدی گذاشته و مجددا بعد از ۴۸ ساعت یادداشت برداری انجام شد. با توجه به میزان تغییر رنگ کاغذ سفید به آبی، میزان تولید سیانید هیدروژن به قوی (+++)، متوسط (++)، ضعیف (+) و عدم تولید (-) تفکیک شد. این آزمایش دارای دو تیمار (محیط کشت کینگ بی حاوی گلایسین باضافه کوفاکتور کلرید آهن و محیط کشت کینگ بی حاوی گلایسین) و سه تکرار بود.

بررسي قدرت بازداري از رشد قارچ بيمارگردرون تشتك پتري

برای تعیین قدرت بازدارندگی از رشد قارچ *S. sclerotiorum* درون تشتک پتری از روش اکسپرت و دیگات (۱۹۹۵) استفاده شد.به اینصورت که ابتدا مخلوط محیط کشت عصاره مالت آگار[5] و کینگ ب به نسبت یک به یک تهیه گردید. سپس دیسک به قطر ۵ میلیمتر حاوی کشت ۵ روزه قارچ *S. sclerotiorum* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت فوق قرار گرفت. سپس مقدار ۲۰ میکرومتر سوسپانسیون باکتری حاوی۱۰۸ سلول در میلی لیتر در چهار نقطه به فاصله ۳ سانتیمتر از مرکز پتری قرار گرفت و پتریها در ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. قدرت بازدارندگی بوسیله اندازهگیری فاصله بین کلنی باکتری و قارچ اندازهگیری گردید.

1. Castric1977, 3M paper
2. Copper II ethyl aceto acetate
3. 4,4-methylen-bis-N-N-dimethyl-aniline
4. Microtitration plate
5. Malt extract agar

Archive of SID
www.SID.ir

بررسي اثر متابوليت هاي فرار (گازي) جدايه‌هاي باكتريايي در جلوگيري از رشد ميسيليوم قارچ *S. sclerotiorum*

در این آزمایش از پتری‌های ۹ سانتیمتری استفاده شد که قطر آن در ته پتری واجد دیواره بود و پتری را به دو قسمت تقسیم می‌کرد. در نتیجه در یک طرف پتری محیط PDA و در طرف دیگر محیط کینگ ب ریخته و بعد از منعقد شدن محیط کشت به میزان ۵۰ میکرولیتر از هر باکتری روی محیط کینگ ب ریخته و بخوبی بوسیله میله شیشه‌ای سراسر محیط کشت کینگ ب پخش گردید. همچنین در طرف دیگر پتری که واجد محیط کشت PDA بود یک حلقه به قطر ۵ میلی متر از کشت دو روزه قارچ *S. sclerotiorum* کشت گردید. دور پتری‌ها بوسیله پارافیلم بخوبی مسدود شد و پتری‌ها در انکوباتور با درجه حرارت ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. لازم به ذکر است که در پتریهای شاهد فقط از حلقه‌ای به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت PDA حاوی قارچ *S. sclerotiorum* استفاده گردید. برای هر تیمار (باکتری) ۳ تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارای رشد میسیلیوم قارچ *S. sclerotiorum* در اثر متابولیت‌های فرار باکتریها با استفاده از رابطه، قطر رشد میسیلیوم قارچ اسکلروتینیا در پتری شاهد منهای قطر رشد میسیلیوم قارچ اسکلروتینیا در اثر متابولیت‌های فرار باکتری تقسیم بر قطر رشد میسیلیوم قارچ در پتری شاهد ضربدر ۱۰۰ بدست آمد.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد و داده‌های بدست آمده از آزمایش در هر مرحله مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

بررسي تاثير سودوموناسهاي فلورسنت درافزايش رشد آفتابگردان

این آزمایش طبق روش اکسپرت و دیگات (۱۹۹۵) انجام گردید و خاک مورد استفاده غیراستریل و فاقد قارچ بیمارگر بود. این آزمایش طبق شرح گفته شده در قسمت بررسی خواص بازدارندگی سودوموناسهای فلورسنت در شرایط گلخانه علیه بیمارگر ریشه انجام گردید. برای کاربرد قارچ بیمارگر در تیمار شاهد آلوده از روش سانفورد وکولی (۱۹۹۲) استفاده گردید. به اینصورت که در کنار هر بذر جوانه زده، یک دانه گندم حاوی قارچ بیمارگر استفاده شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس بررسی شدند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

نتایج

شناسايي قارچ بيمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)de Bary

نمونه جداشده از مزارع آلوده ارومیه، منطقه نازلو طبق کلید کوهن (۱۹۷۹) قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* تشخیص داده شد.

بررسي بيماريزايي قارچ بيمارگر

در همه روش‌ها بعد از مدت ۳ روز حالت پژمردگی سبز در بوته‌های آلوده به قارچ بیمارگر مشاهده گردید. طوقه در نزدیکی خاک به رنگ سبز متمایل به سفید در آمد و پس از مدتی گیاهچه‌های آلوده افتادند. در نهایت پوشش سفید قارچ در اطراف طوقه نمایان شد.

جداسازي باكتريها

محیط اس یک، محیطی اختصاصی برای جداسازی سودوموناسهای فلورسنت می‌باشد و اغلب کلنی‌های موجود در سطح محیط کشت فوق تولید رنگدانه فلورسنت کردند. درصد جداسازی این محیط در مزارع ارومیه، مرند، خوی و سلماس به ترتیب ۷۵، ۸۰، ۸۰ و ۸۰ درصد بود. فهرست باکتریها در جدول ۱ موجود است.

بررسي تاثير جدايه‌هاي سودوموناس فلورسنت در جلوگيري ازتندش اسكلروت *S. sclerotiorum*

بررسی اثر ریزوباکتریهای سودوموناس در جلوگیری از تندش اسکلروت قارچ *S. sclerotiorum* نشان داد که ۲۶ جدایه از نظر آماری متفاوت از شاهد می‌باشند. این ۲۶ جدایه برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شدند. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد جدایه‌های B8 ، B29 و B38 بیشترین تاثیر را در جلوگیری از تندش اسکلروت *S. sclerotiorum* دارند. کمترین تاثیر مربوط به جدایه‌های B137 ، B7 ، B10 ، B11 ، B5 ، B14 ، B20 و B92

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- فهرست باکتریهای استفاده شده و بررسی تاثیر آنها در جلوگیری از تندش اسکلروت قارچ *S. sclerotiorum*

تیمار	گیاه	مکان نمونه برداری و فرد اهدا کننده	درصد اسکلروتهای تندش نیافته(۱)
B8	آفتابگردان	خوی، اراضی شهر	۷۲a
B29	آفتابگردان	ارومیه، جاده لک	۶۸ab
B38	آفتابگردان	سلماس، اراضی شهر	۶۸ab
B107	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۶۶abc
B110	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۶۴abcd
B53	آفتابگردان	ارومیه، نازلو	۶۲abcde
B24	آفتابگردان	ارومیه، جاده لک	۶۰abcdef
B120	آفتابگردان	ارومیه، جاده دانشگاه	۵۲bcdefg
B4	آفتابگردان	خوی، اراضی شهر	۵۰cdefg
B30	آفتابگردان	ارومیه، جاده لک	۴۸defgh
B42	آفتابگردان	سلماس، اراضی شهر	۴۸defgh
B115	آفتابگردان	ارومیه، جاده دانشگاه	۴۸defgh
B1	آفتابگردان	خوی،قیشلق علیا	۴۶efghi
B101	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۴۶efghi
B41	آفتابگردان	سلماس، اراضی شهر	۴۴fghi
B2	آفتابگردان	خوی،قیشلق علیا	۴۴fghi
B111(R458)	گندم	آقای دکتر احمدزاده، مزرعه دانشکده کشاورزی کرج	۴۲ghij
B104	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۴۲ghij
B112	آفتابگردان	ارومیه، جاده دانشگاه	۳۲hijk
B33	آفتابگردان	سلماس، اراضی شهر	۳۲hijk
B31	آفتابگردان	ارومیه، جاده لک	۳۰ijk
B119	آفتابگردان	ارومیه، جاده دانشگاه	۲۶jkl
CHAO	توتون	پرفسورG.Defago، سوییس	۲۴kl
B9	آفتابگردان	خوی، اراضی شهر	۲۴kl
B16	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۲۲kl
B28	آفتابگردان	ارومیه، جاده لک	۲۰klm
B55	آفتابگردان	ارومیه، نازلو	۱۸klmn
B131	آفتابگردان	ارومیه، لک پر	۱۲klmn
B51	آفتابگردان	ارومیه، نازلو	۴mn
B17	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۴mn
B78	آفتابگردان	ارومیه، نازلو	۴mn
B135	آفتابگردان	ارومیه، لک پر	۴mn
B3	آفتابگردان	خوی،قیشلق علیا	۴mn
B15	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۲n
B35	آفتابگردان	سلماس، اراضی شهر	۲n
B83	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۲n
B60	آفتابگردان	ارومیه، نازلو	۲n
B56	آفتابگردان	ارومیه، نازلو	۲n
B92	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۲n
B20	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۰n
B14	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۰n
B5	آفتابگردان	خوی، اراضی شهر	۰n
B11	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۰n
B10	آفتابگردان	خوی، قیشلق سفلا	۰n
B7	آفتابگردان	خوی، اراضی شهر	۰n
B137	آفتابگردان	ارومیه، اطراف روستای لک	۰n
شاهد	-	-	۰n

۱- گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

می‌باشند که از نظر آماری در گروه شاهد می‌باشند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

اثر سودوموناسهاي فلورسنت در كاهش بيماري ناشي از قارچ *S. sclerotiorum* در گلخانه

بررسی اثر ریزوباکتریها در خاک آلوده به قارچ *S. sclerotiorum* در کاهش بیماری نشان داد که قارچکش بنومیل بیشترین تاثیر را در ظهور گیاهچه دارد و در گروه b پس از شاهد سالم (a) قرار گرفت (جدول ۳). پس از آن جدایه B119 در گروه bc و جدایه‌هایB120، B111 در گروه bcd قرار گرفتند. سپس جدایه B112 در گروه cd قرار گرفت. کمترین تاثیر مربوط به جدایه‌های B53،B31، B4،B33،B29، B9 ، B42 ، B28 ، B41 و B30 بودند که از نظر آماری تفاوتی با شاهد آلوده نداشتند.

نتایج حاصل از تاثیر باکتریهای فوق روی وزن آفتابگردان نیز بررسی گردید. تیمار شاهد سالم ازنظر آماری در گروه a و جدایه B119 بیشترین تاثیر را در افزایش وزن تر بوته داشت (گروه b). پس از آن تیمارهای B120 ، CHAO، B101 ، B112، بنومیل و B8 در گروه bc قرار گرفتند. سپس جدایه B111 در گروه bcd قرار گرفت. کمترین تاثیر مربوط به جدایه‌هایB53، B31، B4 ، B33، B29 ، B9 ، B42 ، B41 ، B28 ، B30 ، B107 و B1 بودند که از نظر آماری تفاوتی با شاهد آلوده نداشتند.

بررسی مقایسه وزن قسمت‌های هوایی[1] بوته آفتابگردان نشان داد که شاهد سالم در گروه a و جدایه B119 در گروه b قرار گرفتند. سپس جدایه B120 در گروه bc قرار گرفت. کمترین تاثیر مربوط به جدایه‌های B53 ، B31 ، B4 ، B33 ، B29 ، B9 ، B42 ، B41، B28 ، B30 و شاهد آلوده بودند.

بررسی مقایسه وزن ریشه بوته آفتابگردان نشان داد که شاهد سالم (گروه a) و تیمار B112 (گروه ab) از نظر آماری تفاوتی با یکدیگر ندارند. سپس تیمار B119 در گروه bc قرار گرفت. کمترین تاثیر مربوط به جدایه‌های B53 ، B31 ، B4 ، B33 ، B29 ، B9 ، B42 ، B41 ، B28 ، B30 و شاهد آلوده بود.

1. Shoot

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ – واکنش بیوشیمیایی سودوموناسهای فلورسنت

کد	واکنش گرم	احیای نیترات	کاتالاز	ذوب ژلاتین	اکسیداز	تولید لوان	آرژنین دهیدرولاز	رشد در ۴ درجه	رشد در ۴۱	HR	رشد روی ترهالوز	رنگدانه فلورسنت	آدونیتول	ال- آرابینوز	د- گالاکتوز	سوربیتول	ام- اینوزیتول
B111	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+
B112	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	+	+	+	+
B119	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+
B120	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+
CHA0	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+

همچنین برگهای کوتیلدونی گیاهچه‌های حاصل از تیمار ۱۰ درصد بنومیل، دفرمه و واجد اثرات سوء قارچکش بودند.

شناسايي باکتريها

نتایج واکنش بیوشیمیایی باکتریهای موثر در کنترل بیماری در جدول ۲ موجود می‌باشد. با توجه به نتایج موجود در جدول ۲، همه این باکتریها *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شدند. همانگونه که در جدول ۲ دیده می‌شود همه گونه‌ها در ۴ درجه سانتیگراد رشد کردند ولی هیچکدام در ۴۱ درجه سانتیگراد رشد نکردند و همه باکتریها تولید رنگدانه فلورسنت کردند.

بررسي ميكروسكوپي نحوه تاثير سودوموناسهاي فلورسنت روي فارچ *S. sclerotiorum*

بررسی میکروسکوپی نشان داد که در ناحیه بازدارندگی هیفهای قارچ بیمارگر در مواجه با ترشحات باکتریایی دچار اختلالاتی می‌شوند. در این ناحیه از هیف مقادیر زیادی از محتویات سیتوپلاسم به خارج تراوش کرده و در اطراف هیف مجتمع و منعقد شده و تشکیل لخته می دهد. همچنین در این ناحیه هیف‌های غیرنرمال مشاهده شد که شامل پیچش[1]، نکروز و همچنین چند شاخه شدن[2] هیف می شد.

بررسي توليد سيانيد هيدروژن

از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده در آزمایش اثر سودوموناسهای فلورسنت در کاهش بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* در گلخانه ۶۸ در صد از جدایه‌ها در محیط کشت حاوی کلریدآهن تولید سیانید هیدروژن کردند(جدول ۳).

جدایه‌هایCHAO، B119 ، B112 و B101 بیشترین میزان سیانید هیدروژن را تولید کردند (+++)، سپس جدایه‌های B42، B28 و B16 میزان کمتری سیانید هیدروژن تولید کردند (++) و بقیه جدایه‌ها کمترین میزان سیانید هیدروژن را تولید کردند (جدول ۳). نتایج فوق پس از ۲۴ ساعت بدست آمد. در محیط کشت فاقد کلرید آهن، جدایه B41 تولید سیانید هیدروژن نکرد و همچنین جدایه‌های B16 ، B28، B42 و B101 سیانید هیدروژن کمتری تولید کردند (جدول ۳). نتایج فوق پس از ۲۴ ساعت بدست آمدند. همچنین نتایج حاصل از جدایه‌های فوق پس از ۴۸ ساعت کاملاً مشابه نتایج بدست آمده پس از ۲۴ ساعت بودند (جدول ۳).

بررسي قدرت بازداري از رشد قارچ بيمارگر درون تشتك پتري

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، جدایه‌های B119، B112، B38 و جدایهCHAO به ترتیب به میزان ۱/۳، ۱/۴، ۱/۳ و ۱/۶ سانتی‌متر سبب جلوگیری از رشد قارچ شدند. جدایه‌هایB33 ، B104 و B107 هیچگونه تاثیری در کاهش رشد قارچ نداشتند.

بررسي اثر متابوليت‌هاي فرار (گازي) جدايه‌هاي باكتريايي در جلوگيري از رشد ميسليوم قارچ *S. sclerotiorum*

نتایج حاصل از آزمایش فوق نشان می‌دهد که متابولیت‌های گازی جدایه‌های B111 ، B112 ، B119 ، B120 و CHA0 به خوبی سبب ممانعت رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum* می‌شود و همگی از این نظر در گروه آماری a و همچنین شاهد در گروه b قرار گرفت (جدول ۴).

1. Coiling
2. Ramification

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ - بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت در کنترل قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در آزمایشگاه و گلخانه و تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌های آنتاگونیست

تیمار	ناحیه بازداری (۱)	تولید سیانید(۲) هیدروژن پس از ۲۴ ساعت		تولید سیانید هیدروژن پس از ۴۸ ساعت		میانگین ظهور گیاهچه(۳)		وزن تر قسمت هوایی بر حسب گرم(۴)		وزن تر ریشه بر حسب گرم		وزن تر بوته بر حسب گرم	
		با کلرید آهن	بدون کلرید آهن	با کلرید آهن	بدون کلرید آهن								
B1	۰/۴	+	+	+	+	۱/۲۵	cdef	۲	cdefgh	۰/۳۱	cd	۲/۳۱	cdefg
B2	۰/۹	+	+	+	+	۱/۷۵	cd	۲/۵	bcdefg	۰/۴۷	cd	۲/۹۷	bcdef
B4	۰/۴	+	+	+	+	۰	g	۰	h	۰	d	۰	g
B8	۰/۵	+	+	+	+	۱/۵	cde	۳/۴	bcd	۰/۴۶	cd	۳/۸۶	bc
B9	۰/۸	+	+	+	+	۰	g	۰	h	۰	d	۰	g
B16	۱	++	+	++	+	۲	bcd	۲/۷۷	bcdef	۰/۴۵	cd	۳/۲۲	bcdef
B24	۱/۲	+	+	+	+	۱/۷۵	cd	۲/۹	bcdef	۰/۴۸	cd	۳/۴	bcde
B28	۰/۷	++	+	++	+	۰/۲۵	fg	۰/۹	efgh	۰/۲	cd	۱/۱	defg
B29	۰/۸	+	+	+	+	۰	g	۰	h	۰	d	۰	g
B30	۱	+	+	+	+	۱	defg	۱/۶	defgh	۰/۲۶	cd	۱/۸۶	cdefg
B31	۰/۷	+	+	+	+	۰	g	۰	h	۰	d	۰	g
B33	۰	−	−	−	−	۰	g	۰	h	۰	d	۰	g
B38	۱/۳	+	+	+	+	۱/۵	cde	۲/۷۶	bcdef	۰/۴۷	cd	۳/۲۳	bcdefg
B41	۰/۸	+	−	+	−	۰/۵	efg	۰/۷	fgh	۰/۱۴	d	۰/۸۴	efg
B42	۱/۱	++	+	++	+	۰/۲۵	fg	۰/۴	gh	۰/۱	d	۰/۵	fg
B53	۰/۵	−	−	−	−	۰	g	۰	h	۰	d	۰	c
B101	۱/۲	+++	+	+++	+	۱/۵	cde	۳/۸	bcd	۰/۶۲۱	cd	۴/۴۲	bc
B104	۰	−	−	−	−	۱/۲۵	cdef	۲/۳	cdefgh	۰/۴۶	cd	۲/۷۶	bcdef
B107	۰	−	−	−	−	۱/۵	cde	۱/۹	cdefgh	۰/۱۹	cd	۲/۰۹	cdefg
B110	۰/۲	−	−	−	−	۱/۲۵	cdef	۲/۷	bcdefg	۰/۴۶	cd	۳/۱۶	bcdef
B111	۰/۶	−	−	−	−	۲	bcd	۳/۲	bcde	۰/۴۴	cd	۳/۶۶	bc
B112	۱/۴	+++	+++	+++	+++	۱/۷۵	cd	۳/۱	bcde	۱/۲۸	ab	۴/۳۸	bc
B115	۰/۴	−	−	−	−	۱/۵	cde	۲/۶	bcdefg	۰/۴۵	cd	۳/۰۵	bcdef
B119	۱/۳	+++	+++	+++	+++	۲/۲۵	bcd	۴/۸	b	۰/۶۲	cd	۵/۴۲	b
B120	۰/۷	+	+	+	+	۲	bcd	۴/۱	bc	۰/۵۴	cd	۴/۶۴	bc
CHA0	۱/۶	+++	+++	+++	+++	۱/۷۵	cd	۳/۹	bcd	۰/۵۷	cd	۴/۴۷	bc
بنومیل	×	×	×	×	×	۳	b	۳/۰۷	bcde	۰/۸	bc	۳/۸۷	bc
شاهدسالم	×	×	×	×	×	۴	a	۱۰/۳	a	۱/۶	a	۱۱/۹	a
شاهد آلوده	×	×	×	×	×	۱	defg	۱/۸	cdefgh	۰/۴۲	cd	۲/۲۲	cdefg

۱- فاصله بین میسلیوم و کلنی باکتری بر حسب سانتی‌متر.۲- تولید سیانید بر اساس آبی شدن کاغذ آغشته به معرف تعیین شده است.۳- ظهور گیاهچه پس از دو هفته شمارش شده است.۴- وزن تر گیاهچه، ریشه و کل گیاه دو هفته پس از کاشت تعیین شد.۵- گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq ۰/۰۵$) انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت در افزایش رشد آفتابگردان و تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد قارچ *S. sclerotiorum*

تیمار	ظهور گیاهچه (۱)	وزن تر قسمت هوایی برحسب گرم(۲)	وزن تر ریشه برحسب گرم	وزن ترکل گیاه برحسب گرم	تاثیر ترکیبات فرار(۳)
B111	۴a	۷/۰۶b	۱ab	۸/۰۷b	۹۱/۴۸a
B120	۴a	۵/۶۴c	۰/۹۶b	۶/۶۰c	۱۰۰a
B119	۴a	۷/۵۶ab	۱/۳۶a	۸/۹۳ab	۹۵/۲۰a
B112	۴a	۸/۵۲a	۱/۳۴a	۹/۸۶a	۱۰۰a
CHAO	۴a	۷/۱۸b	۱/۱۵ab	۸/۳۴b	۸۲/۹۶a
شاهد سالم	۴a	۵/۸۶c	۰/۸۵b	۶/۷۱c	۰b
شاهد آلوده	۰/۲۵c	۰/۳۲e	۰/۰۶d	۰/۳۸e	-
بنومیل	۱/۵b	۲/۳۵d	۰/۴۶c	۲/۸d	-

۱- ظهور گیاهچه پس از دو هفته شمارش شده است.۲- وزن تر قسمتهای هوایی، ریشه و کل گیاه دو هفته پس از کاشت تعیین شد.
۳-اعداد ، در صد ممانعت از رشد میسلیوم قارچ هستند.۴- گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq$ ۰/۰۵) انجام شد.

بررسي تاثير سودوموناسهاي فلورسنت در افزايش رشد آفتابگردان

بررسی اثر ریزوباکتریها در خاک غیر استریل نشان داد که همه جدایه‌ها و شاهد سالم از نظر ظهور گیاهچه در گروه a قرار می‌گیرند و بنومیل در گروه b و شاهد آلوده در گروه c قرار گرفت (جدول ۴).

بررسی وزن قسمت هوایی نشان داد که تیمار B112 و B119 دارای بیشترین تاثیر در افزایش وزن بوده و به ترتیب در گروه a و ab قرار می‌گیرند. سپس تیمار B111 و CHAO در گروه b قرار گرفتند و پس از آن B120 و شاهد سالم در گروه c و تیمار بنومیل در گروه d و شاهد آلوده در گروه e قرار گرفت (جدول ۴).

بررسی اثر ریزوباکتریها در افزایش وزن ریشه نشان داد که B119 و B112 دارای بیشترین افزایش وزن بودند و در گروه آماری a قرار گرفتند. تیمارهای B111 و CHAO در گروه آماری ab و سپس تیمارهای B120 و شاهد سالم در گروه آماری b قرار گرفتند. تیمار بنومیل در گروه آماری c قرار گرفت و شاهد آلوده در گروه d قرار گرفت (جدول ۴).

بررسی اثر ریزوباکتریها در افزایش وزن کل گیاه نشان داد که تیمار B112 بیشترین تاثیر را در افزایش وزن دارا بود و در گروه a قرار گرفت. تیمار B119 نیز همچنین در گروه ab قرار گرفت. CHAO و B111 از نظر آماری در گروه b قرار گرفتند. تمام تیمارهای ذکر شده سبب افزایش وزن بوته شدند. تیمار B120 و شاهد سالم در گروه آماری c قرار گرفتند. قارچکش بنومیل در گروه آماری d قرار گرفت و شاهد آلوده در گروه آماری e قرار گرفت (جدول ۴).

بحث

کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان بدلیل خاکزی بودن عامل بیماری با روش‌های شیمیایی کار آسانی نبوده و لازم است از روشهای دیگر مانند کنترل بیولوژیکی و زراعی استفاده کرد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که سودوموناسهای فلورسنت در اغلب خاکهای زراعی وجود دارند و در این بررسی باکتریهای فوق از ریزوسفر گیاه آفتابگردان جدا گردیدند. جنس سودوموناس از نظر اکولوژیکی، متنوعترین و با اهمیت‌ترین گروه باکتریها روی زمین می‌باشد. سودوموناسها در محیط‌های طبیعی هستند و ارتباط نزدیکی با گیاهان و حیوانات ایجاد می‌کنند. این گستردگی جهانی، سازش فیزیولوژیک و ژنتیکی زیادی را نشان می‌دهد (۲۸). سودوموناسهای فلورسنت مسئول کاهش برخی از بیماریهای ریشه ناشی از عوامل بیماریزای خاکزی و همچنین ایجاد خاکهای ممانعت کننده بیماری می‌باشند(۳۰).

Archive of SID

www.SID.ir

محیط اس یک، محیط انتخابی و افتراقی برای سودوموناسهای فلورسنت محسوب می‌شود (۱۰). قدرت انتخابی این محیط بدلیل وجود دو ماده سدیم لوریل سارکوزین [1] و آنتی بیوتیک تریمتوپریم [2] است که اولی از رشد میکروارگانیسمهای گرم مثبت و دومی از رشد سودوموناسهای غیر فلورسنت جلوگیری می‌کند. همچنین این دو ماده دارای اثر تشدیدکنندگی روی یکدیگر داشته و حذف یکی باعث کاهش اثر دیگری می‌شود. نتایج بدست آمده از جداسازی باکتریها از مزارع ارومیه، مرند، خوی، و سلماس نشان داد که کارآیی این محیط حداقل ۷۵ درصد بود. این موضوع با کارهای احمدزاده و همکاران (۱۳۸۲) و گولد و همکاران (۱۹۸۵) مطابقت دارد.

علیرغم اینکه مطالعات زیادی بر روی تاثیر آنتاگونیستی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت در برابر عوامل بیماریزای خاکزی انجام شده است (۱۵)، تنها یک بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت را در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه‌ها آفتابگردان مطالعه کرده است (۹).

۶۸ درصد از جدایه‌های مورد بررسی در شرایط آزمایشگاهی تولید سیانید هیدروژن کردند. این نسبت تولید سیانید هیدروژن در سودوموناسهای فلورسنت حدود ۲۰ درصد بیشتر از جدایه‌های ریزوسفری این باکتریها در اروپای غربی می‌باشد (۷). سیانید هیدروژن از اکسیداسیون گلایسین و توسط آنزیم سیانید هیدروژن سینتیز [3] تولید می‌شود و این آنزیم توسط ژنهای *hcnABC* تولید می‌گردند (۵) و بدین جهت گلایسین به محیط کشت اضافه گردید. همچنین بررسیها نشان می‌دهد وجود کوفاکتور کلرید آهن در تولید سیانید هیدروژن تاثیر دارد (۵). سیانید هیدروژن مختل کننده تنفس و همچنین کلاته کننده فلزات [4] می‌باشد و بوسیله بسیاری از سودوموناسها تولید می‌شود. سیانید هیدروژن در کنترل بعضی از بیمارگرها مانند *Pythium ultimum* در خیار نقش اصلی را ایفاکرده است(۱۶).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که توانایی جدایه‌ها در ممانعت از رشد قارچ *S. sclerotiorum* در پتری و تولید سیانید هیدروژن در ارتباط مستقیم هستند و نتایج حاصل با کارهای دفاگو و هاس (۱۹۹۰) مطابقت دارد.

بررسی کاربرد جدایه‌ها در خاک غیراستریل در گلخانه نشان داد که نتایج کارهای آزمایشگاهی، توانایی جدایه‌های باکتریایی را در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* نشان نمی‌دهند. بررسی‌ها نشان داد که هیچکدام از جدایه‌های موثر در جلوگیری از تندش اسکلروت قارچ *S. sclerotiorum* ، در شرایط گلخانه و خاک غیراستریل تاثیری در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* ندارند. آزمایشهای انجام شده در گلخانه ظرفیت واقعی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت را در جلوگیری از قارچ فوق نشان داد. جدایه B29 که تاثیر خوبی در جلوگیری از تندش اسکلروت قارچ فوق نشان داد، در گلخانه و خاک غیراستریل اثر سینرژیست در توسعه بیماری داشت. بطور کلی جدایه‌های B4، B9 ، B28 ، B29 ، B31 ، B33 و B53 اثر سینرژیست در توسعه بیماری داشتند، با اینحال از نظر آماری تفاوتی با شاهد آلوده از خود نشان ندادند. این مورد در کارهای اکسپرت و دیگات (۱۹۹۵) نیزمشاهده شده است. آزمایشهای انجام شده بوسیله پریکرل و ونکورا(۱۹۸۰) نشان دادند که ریشه‌های کلونیزه شده با سودوموناسها، بیشتر از ۲ برابر ریشه‌های فاقد میکروارگانیسم‌ها تولید ترشحات ریشه می‌کنند یعنی بعضی از باکتریها سبب افزایش نفوذپذیری سلولهای ریشه شده و در نتیجه ترشحات ریشه افزایش می‌یابد.

تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های موثر در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* نشان داد که همه جدایه‌ها به میزان زیادی مانع رشد میسیلیوم قارچ فوق گردیدند. بنظر می‌رسد تولید سیانید هیدروژن و دی اکسید کربن از عوامل اصلی جلوگیری از رشد قارچ فوق باشند(۷). جدایه B111 و B53 تولید سیانید هیدروژن نکردند با اینحال ترکیبات فرار تولیدی واجد موادی بود که از رشد قارچ فوق جلوگیری کردند.

یکی از اثرات قابل توجه ریزوباکتریها، تاثیر آنها در افزایش رشد گیاه می‌باشد. کاربرد جدایه‌های B112 ، B119 ،B111و CHAO در خاک غیراستریل و فاقد قارچ *S. sclerotiorum*

1. Sodium lauroyl sarcosine
2. Trimethoprim
3. HCN-synthase
4. Metal chelating

Archive of SID

www.SID.ir

سبب افزایش معنی‌دار وزن ریشه، قسمت‌های هوایی و وزن کل بوته‌های آفتابگردان گردیدند. حسن زاده (۱۹۹۰) ضمن بررسی تاثیر ۱۰۰ جدایه ریزوباکتر، نشان داد که افزایش رشد گیاه لوبیا چشم بلبلی در شرایط عاری از هر گونه عامل بیمارگر می‌تواند به علت تولید مواد تنظیم کننده رشد و یا افزایش جذب برخی مواد معدنی باشد. آغشته نمودن قطعات بذری سیب زمینی به باکتریهای *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas putida* باعث افزایش محصول گردید که این افزایش رشد گیاه به علت جذب مواد معدنی و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مضر بوده است (۳۰).

سپاسگزاری

این تحقیق با همکاری گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی تهران و گروه بیماری شناسی دانشگاه پلی تکنیک زوریخ(ETH)، سوییس انجام شده است.

منابع مورد استفاده REFERENCES

۱. احمد زاده ،م.، ع. شریفی تهرانی ، ق. حجارود، ج. زاد، م. اخوت و م. محمدی .۱۳۸۲.بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت روی قارچ عامل پوسیدگی بذر لوبیا.مجله علوم کشاورزی ایران.جلد ۳۴ شماره ۴،صفحات ۸۰۷-۷۹۳ .

۲. آل آقا،ن.۱۳۵۰.پوسیدگی طوقه آفتابگردان،گزارش سالیانه طرح بررسی بیماریهای مهم نباتات، دانشکده کشاورزی،دانشگاه تهران،صفحات ۸۹-۸۳ .

۳. ایرانی، ح. ۱۳۷۷.سبب شناسی عامل پوسیدگی طوقه و ریشه آفتابگردان در استان آذربایجان غربی. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، ۵-۱ شهریور،صفحه ۱۱۰.

۴. عرشی، ی. ۱۳۷۳. علوم و تکنولوژی آفتابگردان، وزارت کشاورزی، معاونت زراعت، اداره کل دانه های روغنی ایران،۴۷۵ صفحه.

5. Blumer, C. & D. Haas. 2000. Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis.Arch.Microbiol. 173,170-177.
6. Castric, P. A. 1977.Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis.J. Bacteriol.130, 826-831.
7. Defago,G. & D. Haas. 1990. Pseudomonas as antagonistic of soilborne plant pathogens:modes of action and genetic analysis .Pp.249-291.In: J.M.Bollag,& G.Satotzky (Vol.6 eds.). Soil biochemistry, New York,Basel.
8. Dos Santos, A. F. & O. D. Dhingra. 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. On the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Bot. 60: 472-475.
9. Expert, J. M. & B. Digat. 1995. Biocontrol of S*clerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas putida* strains. Can. J. Microbiol. 41(8)685-691.
10. Gould,W. D., C. Hagedron, T. R. Bardelinii, & R. Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. Appl. Environ. microbiol. 49: 28-32.
11. Hassanzadeh, N. 1990. Role of rhizobacteria in promoting cowpea seed growth. P. 98. In: C. Keel, B. Koller, & G. Defago (eds). Plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria.Interlacen, Switzerland.
12. Hoes, J. A., & H. C. Huang. 1975. *Sclerotinia sclerotiorum*:viability and separation of sclerotia from soil. Phytopathol. 65: 1431-1432.
13. Howell,C. R. & R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacertium. Phytopathol. 69:480-482.
14. Huang, H. C. 1990. Cyclic occurence of *Sclerotinia* wilt of sunflower in western canada. Plant Dis. 74:766-770.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Kaiser,W. J., R. M. Hannan, & D. M. Weller. 1989. Biological control of seed rot and preemergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. Soil Biol. Biochem. 21:269-273.
16. Keel, C. & G. Défago. 1996. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens:Mechanisms and ecological impact. 36th Symposium of the British Ecological Society. 27-46.
17. Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintz, & M. N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature (London), 286:885-886.
18. Kohn, L. M. 1979. A monograph revision of the genus *Sclerotinia.* Mycologia 9:365-424.
19. Kolte, S. J. 1985. Diseases of annual edible oil seed crops. CRS,Inc., 2000 Corporate Blvd., N. W., Bocarton, Florida 33431.
20. Mcloughlin, T. J., J. P. Quinn, A. Bettermann, & R. Bookland. 1992. *Pseudomonas cepaci* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controling the disease. Appl. Environ. Microbiol. 58:1760-1763.
21. Mew, T. W. & A. M. Rosales. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 76:1260-1264.
22. Oedjijono, M., A. Linet, & C. Dragar. 1993. Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. Soil Biol. Biochemistry 25: 247-250.
23. Patterson, C. L. & R. G. Grogan. 1985. Differences in epidemiology and control of lettuce crop caused by *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 69:766-770.
24. Prikryl, Z. & V. Vancura. 1980. Root exudates of plants. VI. Wheat root exudation as dependent on growth,concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. Plant Soil,57:69-83.
25. Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning :A laboratory manual, 2nd eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
26. Sansford, C. E., & J. R. Coley. 1992. Production and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol. 41:154-156.
27. Schaad, N. W., J. B. Jones, & W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 373 pp.
28. Spiers, A. J., A. Buckling, & P. B. Rainey. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiol. 146, 2345-2350.
29. Steadman, J. R. 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathol. 69:904-907.
30. Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407.
31. Zazzerini, A. & L. Tosi. 1985. Prove di antagonismo di alcuni isolati bacttericinei confronti della *Sclerotinia sclerotiorum*(lib.)de Bary. Informatore Fitopatol. 25(1)27-30.
32. Zazzerini, A., L. Tosi, & J. Rossi. 1987. Antagonistic effects of *Bacillus* spp. On *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. Phytopathol. Medit. 26:185-187.

Archive of SID

www.SID.ir