Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دهم ـ شماره چهارم ـ زمستان ۱۳۸۲
www.magiran.com/jasnr

تاثیر آنتاگونیستی جدایه های *Bacillus* و *Pseudomonas* روی قارچ *Phytophthora capsici* عامل بوته میری فلفل

فرخنده امتی[1]، عباس شریفی‌تهرانی[2]، مجتبی محمدی[2]، قربانعلی حجارود[2] و جواد زاد[2]

[1] مرکز تحقیقات کشاورزی سمنان (شاهرود)؛ [2] دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۱/۲/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۸۲/۸/۳

چکیده

در این تحقیق قارچ عامل بیماری از طوقه‌های پوسیده فلفل جداسازی و *phytophthora capsici* تشخیص داده شد. در مجموع ۱۵۱ جدایه باکتریایی از ریزوسفر گیاهان مختلف جدا شد که ۳۷ جدایه متعلق به باکتریهای گرم مثبت وسودوموناسهای فلورسانت با استفاده از روش کشت متقابل توانایی آنتاگونیستی علیه قارچ *P.capsici* نشان دادند. از میان جدایه‌های آنتاگونیست ٦ جدایه با بیشترین تأثیر روی قارچ *P.capsici* جهت مطالعات بعدی انتخاب شد. بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی ومرفولوژیکی، جدایه‌های 1083 و D، *Pseudomonas fluorescens* وجدایه‌های BS، 2001، 1061 و 703، *Bacillus subtilis* تشخیص داده شدند. دو جدایه 1083 وD توانستند از طریق تولید آنتی‌بیوتیک ومتابولیتهای فرار، از رشد میسلیوم قارچ *P.capsici* در شرایط آزمایشگاه جلوگیری نمایند. جدایه 1083 روی محیط کینگ ب (KB) حاوی ۲۵ میکرومول کلرید آهن تولید سیدروفور نمود واز رشد قارچ *Geotrichum candidum* ممانعت نمود در حالیکه جدایه D در هیچیک از غلظت‌های کلرید آهن نتوانست تولید سیدروفور کند. در آزمایش اثر متابولیتهای مایع جدایه‌های *B. subtilis* روی قارچ *P.capsici* جدایه‌های BS و 2001 بیشترین و جدایه 1061 کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ فوق داشتند. متابولیتهای فرار کلیه جدایه‌های *B. subtilis* از رشد میسلیوم قارچ *P.capsici* ممانعت به‌عمل آوردند و میزان بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها تحت تأثیر محیط کشت مورد استفاده بود. در آزمایش بررسی تولید سیانید هیدروژن (HCN) توسط جدایه‌های آنتاگونیست، تنها جدایه‌های *P. fluorescens* توانایی تولید سیانید هیدروژن را داشتند. در مجموع باکتریهای آنتاگونیست بخصوص جدایه‌های *B. subtilis* از کارایی مؤثری در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری در محیط کشت برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: فلفل، بوته میری فیتوفترایی فلفل، باکتریهای آنتاگونیست

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاکنون بیماریهای متعددی از سراسر دنیا روی فلفل گزارش شده است که یکی از آنها بوته میری فلفل در اثر قارچ *Phytophthora capsici* (Leonian) می‌باشد (لونیان[1]، ۱۹۲۲). قارچ عامل بیماری پلی فاژ بوده و یکی از پاتوژنهای مهم خاکزی است و معمولاً به ریشه، طوقه و میوه حمله می‌کند و پس از ورود به بافتهای میزبان به اطراف محل نفوذ پیشروی و قسمت‌های مورد حمله ابتدا به رنگ قهوه‌ای روشن و سپس قهوه‌ای تیره در می‌آید. پس از این مرحله بوته آلوده ناگهان و در حالیکه برگها سبز می‌باشند پژمرده و به عبارتی بوته سبز خشک می‌گردد (ارشاد و هیله، ۱۳۵٤). دامنه میزبانی وسیع وتوانایی بسیار زیاد ااسپورهای آن برای مقاومت در شرایط نامساعد، نبودن ارقام مقاوم در برابر عامل بیماری، کاربرد سموم شیمیایی در خاک و پیدایش نژادهای مقاوم باعث ایجاد محدودیت و مشکلات جدی در زمینه کنترل این بیماری شده است.

از اقدامات اساسی که از دیرباز مورد توجه محققین بوده است استفاده از عوامل طبیعی برای کاهش خسارت ناشی از عوامل قارچی خاکزاد از جمله قارچ *Phytophthora capsici* است. چو (۱۹۸۷) خاک ٦ منطقه واقع در کره را جهت جداسازی و شناسایی آنتاگونیستهای *P. capsici* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل، مورد مطالعه قرار داد و از مجموع ۸٤٦ میکروارگانیسم جداشده، از *Bacillus polymyxa* و *Burkolderia cepacia* و *Bacillus* sp. به‌عنوان مؤثرترین آنتاگونیستها نام برد. در تحقیقی دیگر نمک و همکاران (۱۹۹٦) گزارش کردند در بین عوامل بیولوژیک فقط *B. Subtilis* توانایی کنترل بیولوژیکی قارچ *P. capsici* را دارا بوده است. هنیس و اینبار (۱۹٦۸) در بررسی‌های خود نقش ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *B. subtilis* را در بازدارندگی از رشد میسلیوم و تشکیل اسکلروت قارچ *Rhizoctonia solani* به اثبات رساندند. بسون ومیشل (۱۹۸٦) دو آنتی بیوتیک ضد قارچی با نامهای اتیورین دی[2] واتیورین ای[3] را از استرین *B. subtilis* تولیدکننده اتیورین آ[4] جدا نمودند. لوفلر و همکاران (۱۹۸۵) نیز نشان دادند که از دو آنتی‌بیوتیک تولیدی توسط *B. subtilis* (استرین۳-F-۲۹) آنتی بیوتیک باسیلی‌سین[5] از رشد مخمرها جلوگیری نموده در حالیکه فنجی مایسین[6] از فعالیت آنتی‌بیوتیکی علیه قارچهای میسلیومی برخوردار است. فیدامن و روسال (۱۹۹۳) در تحقیقی به اثبات رساندند که استرینی از *B. Subtilis* علاوه بر تولید آنتی بیوتیک، با تولید ترکیبات فرّا ر از رشد قارچهای *R. solani* و *Pythium ultimum* ممانعت به‌عمل می‌آورد. اولین گزارش در مورد نقش سودوموناسهای فلورسانت[7] در کنترل بیولوژیک مربوط به هاول و استیپانویک (۱۹۸۰) می‌باشد.آنها موفق شدند نقش دو آنتی‌بیوتیک پیرول نیترین[8] و پیولوتئورین[9] را بترتیب در بازدارندگی قارچهای *R. Solani* و *P. ultimum* به اثبات رساندند. تولید سیدروفور یکی از مکانیسم‌های مهم کنترل بیولوژیکی می‌باشد. این مواد در شرایط کمبود آهن تولید شده و تشکیل یک کمپلکس با یون آهن سه ظرفیتی می‌دهند (لیونگ[10]، ۱۹۸٦). نقش سیانید هیدروژن به‌عنوان یکی از عوامل اصلی در افزایش فعالیت مکانیزم دفاعی گیاه توسط زدور و اندرسون (۱۹۹۰) مطرح شده است. در ایران نیز تولید ترکیبات فرّار، آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن به‌عنوان مکانیزم‌های بازدارندگی جدایه‌های *B. subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* روی قارچ

1- Leonian

2- Iturin D
3- Iturin E
4- Iturin A
5- Bacilycin
6- Fengymycin
7- Fluorescent Pesudomonads
8- Pyrolnitrin
9- Pyoluteorin
10- Leong

www.SID.ir

جدول ۱ – اثر جدایه‌ها و مقادیر مختلف ترشحات مایع جدایه‌های ***B. Subtilis*** در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ ***P. capsici***

جدایه مقدار عصاره	قطر رشد کلنی(mm)	2001 درصد بازداری	گروه بندی ٪۱	تیمارها ٪۵	قطر رشد کلنی(mm)	703 درصد بازداری	گروه بندی ٪۱	تیمارها ٪۵	قطر رشد کلنی(mm)	BS درصد بازداری	گروه بندی ٪۱	تیمارها ٪۵	قطر رشد کلنی(mm)	1061 درصد بازداری	گروه‌بندی ٪۱	تیمارها ٪۵
شاهد	۵۱/۶۶ ±۰/۳۳	۰	a	a	۵۱/۶۶ ±۰/۳۳	۰	a	a	۵۱/۶۶ ±۰/۳۳	۰	a	a	۵۱/۶۶ ±۰/۳۳	۰	a	a
٪۰/۷۵	۴۹ ± ۰/۵۷	۵/۱۶	abcd	bcd	۴۹/۳۳ ±۰/۳۳	۴/۵۲	abc	abc	۴۹ ± ۰/۵۷	۵/۱۶	abcd	bcd	۵۰/۶۶ ± ۰/۱۶	۱/۹۳	ab	ab
٪۰/۱/۵	۴۷/۳۳ ±۰/۳۳	۸/۳۹	cde	cde	۴۸ ±۰/۵۷	۷/۱۰	bcd	cde	۴۸ ±۰/۱۶	۱۰/۹۷	def	ef	۴۹ ±۰/۵۷	۵/۱۶	abcd	bcd
٪۳	۴۴/۳۳±۰/۳۳	۱۴/۲۰	efg	fg	۴۶ ±۰/۵۷	۱۰/۹۷	def	ef	۴۲/۳۳±۰/۱۶	۱۸/۰۷	gh	gh	۴۶/۶۶±۰/۱۶	۹/۶۷	cde	de
٪۵	۳۷/۳۳ ±۰/۳۳	۲۷/۷۵	i	i	۴۰/۶۶ ±۰/۳۳	۲۱/۲۸	h	h	۳۷/۳۳ ±۰/۳۳	۲۷/۷۵	i	i	۴۳ ±۰/۱۶	۱۶/۷۷	fgh	gi
٪۱۵	۲۲/۶۶ ±۰/۳۳	۵۶/۱۴	k	k	۲۸/۶۶ ±۰/۳۳	۴۴/۵۱	j	j	۲۳/۶۶ ±۰/۱۶	۵۴/۱۹	k	k	۳۰/۳۳ ±۰/۳۳	۴۱/۳۰	j	J

اعداد متن جدول میانگین ۳ تکرار است .

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند دارای اختلاف معنی‌دار نیستند.

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

Verticillium dahliae به اثبات رسیده است (آزاد سیفایی و همکاران، ۱۳۷۹).

در این تحقیق وجود باکتریهای آنتاگونیست در ناحیه ریزوسفر گیاهان مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. پس از جداسازی، انتخاب و شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست، مکانیزم‌های بازدارندگی و طرز تأثیر آنها روی عامل بیماری مورد بررسی واقع شد.

مواد و روشها

۱-**جداسازی، شناسایی و آزمون بیماریزایی قارچ عامل بیماری:** قارچ عامل بیماری از طوقه و ریشه گیاهان بیمار فلفل با استفاده از محیط انتخابی PDA با آگار یک در صد حاوی مواد ضد قارچی وباکتریایی (B NPRA) مطابق روش ماساگو (۱۹۷۷) جداسازی، جهت تشخیص گونه قارچ *Phytophthora* از کلیدهای مصور قارچ‌شناسی استامپ (۱۹۹۰) و ارشاد (۱۳۷۱) استفاده و اثبات بیماری‌زایی مطابق روش ساتور و بوتلر (۱۹٦۷) بر روی رقم کالیفرنیا وندر انجام شد.

۲- جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از خاک: بدین منظور یک گرم از خاک ناحیه ریزوسفر گیاهان فلفل، گوجه فرنگی، بادنجان، گندم و ذرت هر یک بطور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ریخته و غلظت‌های مختلف بصورت سریال در محلول یک در صد پپتون تهیه گردید از هر رقت یکصد میکرولیتر به محیط NA منتقل شد و در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شدند.

۳- بررسی اثر ریزوباکتریها بر روی *P.capsici* در پتری: تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های سودوموناس فلورسانت مطابق روش هجدران و همکاران (۱۹۸۹) وجدایه‌های غیر فلورسانت مطابق روش پارک (۱۹۸۹) انجام و قدرت بازدارندگی جدایه‌ها بر اساس فاصله بین حاشیه کلنی قارچ و باکتری اندازه‌گیری گردید. شش جدایه با بیشترین قدرت بازدارندگی جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند.

۱- ۳- آزمونهای افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌ها: واکنش گرم در پتاس ۳ درصد به روش ساسلو (۱۹۸۲)، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، تولید رنگ فلورسانت روی محیط کینگ ب (کینگ و همکاران[1]، ۱۹٥٤)، رشد روی محیط D1، تولید کلنی‌های زرد یا نارنجی روی محیطهای NGA، YDC و NBY و رنگ آمیزی اسپور به روش شاد (۱۹۸۸) انجام شد.

۲-۳- آزمونهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت شناسایی جدایه‌های مختلف: تولید رنگ فلورسانس روی محیط کینگ B و تولید رنگدانه آبی روی محیط کینگ A انجام شد (فهی و پرسلی[2]، ۱۹۸۳). برای تعیین واکنش فوق حساسیت (HR)، سوسپانسیونی حاوی 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر از هر جدایه به زیر بشره شمعدانی تزریق گردید (فهی و پرسلی، ۱۹۸۳). از کشت خالص باکتریها برای انجام آزمونهای تولید لوان، سیتوکروم اکسیداز، لهانیدن سیب‌زمینی، هیدرولیز ژلاتین و نشاسته، استفاده از منابع کربنی، احیای نیترات، آزمون حداکثر و حداقل دمای رشد از محیط عصاره مخمر و محیط غذایی مایع[3] استفاده شد (شاد[4]، ۱۹۸۸). آزمونهای تولید اندول، کاتالاز، لستیناز، هیدرولیز کازئین، تحمل نمک طعام (۷-۲درصد)، تولید اسید از کربوهیدرتها، استفاده از سیترات، رشد غیر هوازی در محیط مایع گلوکز، آزمون تحرک در مرکب چین و رنگ‌آمیزی اسپور مطابق روشهای شاد (۱۹۸۸) انجام گرفت.

٤- بررسی مکانیزم تأثیر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* روی قارچ *P.capsici* در شرایط آزمایشگاه:

1- King et al.
2- fahy & persley
3- Nutrient Broth
4- Schaad

www.SID.ir

Archive of SID

۴-۱- بررسی تولید آنتی بیوتیک: مطابق روش کرائوس و لوپر (۱۹۹۰) پس از رشد باکتری به‌مدت سه روز روی محیط آگار مغذی حاوی دو درصد گلوکز (وزن بر حجم)، کلنی‌های رشد یافته از سطح پتری جمع‌آوری و پتریها مدت نیم‌ساعت در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. عدم رشد قارچ فیتوفترا روی این محیط ومقایسه آن با شاهد که باکتری در آن کشت نشده بود نشانه وجود آنتی‌بیوتیک در محیط غذایی تلقی شد. در صد بازدارندگی رشد مطابق رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیماریزا} = \frac{\text{قطر رشد میسلیوم در هر تیمار} - \text{قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

۴-۲- بررسی تولید سیدروفور: جدایه‌های مورد مطالعه روی محیط کینگ ب حاوی غلظتهای ۲۵، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن FeCl3 کشت ومدت ۴۸ ساعت در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. عدم رشد قارچ *Geotrichum candidum* در اطراف باکتری نشانه تولید سیدروفور می‌باشد (ولر و کوک[1]، ۱۹۸۳).

۴-۳- بررسی تولید ترکیبات فرآر ضد قارچی: در مرحله اول آزمایش، ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کدر جدایه‌های مختلف در سطح محیط TSA پخش ومدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله دوم، حلقه‌هایی از قارچ در محیط PDA کشت و سپس در کنار شعله، پتریهای حاوی قارچ و باکتری روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود و قطر میسلیوم پس از چهار روز اندازه‌گیری شد (کرائوس و لوپر[2]، ۱۹۹۰).

۵- بررسی مکانیزم تأثیر جدایه های *B.subtilis* روی قارچ *P. capsici*:

۵-۱- بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *B. subtilis* روی قارچ *P.capsici*: ترشحات مایع جدایه‌ها بر اساس روش سینگ و دورال (۱۹۸۴) به کمک فیلترهای میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی توسط پمپ خلاء تهیه و به نسبتهای ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۵ و ۱۵ درصد با محیط کشت PDA در حال سرد شدن مخلوط گردیدند. پس از کشت یک حلقه از قارچ در وسط هر پتری، پتری‌های حاوی قارچ و باکتری روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود و قطر میسلیوم ۹۶ ساعت پس از کشت قارچ اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل دو عاملی با متن کاملاً تصادفی به مرحله اجرا در آمد.

۵-۲-بررسی اثر ترشحات فرآر جدایه های *B. subtilis* روی قارچ *P. capsici*: این تحقیق مطابق روشهای فیدامن و روسال (۱۹۹۴-۱۹۹۳) انجام شد. در مرحله اول آزمایش از محیط کشتهای TSA، PDA و NAG (حاوی ۲ درصد دی گلوکز) جهت کشت باکتری به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در مرحله دوم پس از کشت حلقه‌ای از قارچ *P.capsici* در مرکز تشتک پتری حاوی PDA، تشتکهای پتری حاوی قارچ و باکتری روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود ومدت ۶ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (فیدامن و روسال[3]، ۱۹۹۳). داده‌های بدست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم) در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه وتحلیل و میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن مقایسه گردیدند.

۵-۳- بررسی تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه های *B. subtilis* و *P.f luorescens*: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کدر هر جدایه در سطح آگار غذایی NA پخش گردید. سپس قطعاتی از کاغذ

1- Weller & Cook
2- Krous & Loper
3- Fiddaman & Rossal

www.SID.ir

Archive of SID

صافی آغشته به محلول معرف سیانید هیدروژن شامل ۵ میلی‌گرم از اتیل استواستات مس[1] (II) و ۵ میلی‌گرم ٤-٤ متیلن بیس- (-ان-ان- دی متیل انیلین)[2] در ۲ سانتی‌متر مکعب کلروفرم غوطه‌ور گردیدند. قطعات آغشته به معرف درون درب تشتک پتری قرار گرفته و تشتکهای پتری بطور وارونه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. تغییر رنگ کاغذ صافی به آبی پس از ۱۸-۳ ساعت نشان‌دهنده تولید HCN می‌باشد (کاستریک و کاستریک[3]، ۱۹۸۳).

نتایج و بحث

بر اساس نوشته‌های استامپ و همکاران (۱۹۹۰) و ارشاد (۱۳۷۱) قارچ عامل بوته میری فلفل، *P. capsici* تشخیص داده شد. این‌گونه اولین بار توسط لونیان (۱۹۲۲) در آمریکا از فلفل جدا شد. در ایران اولین بار ارشاد و هیله (۱۳٥٤) قارچ مذکور را به‌عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل معرفی نمودند. در این مطالعه،۱۵۱ جدایه باکتریایی بر اساس کشت متقابل در پتری مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج آزمایش درون پتری و بازدارندگی باکتریهای گرم مثبت وسودوموناسهای فلورسانت از رشد میسلیوم قارچ *P. capsici* نشان داد که در خاکهای زراعی کشور جدایه‌های باکتریهای آنتاگونیست وجود دارند که احتمالاً تا حدودی در کاهش طبیعی بیماری نقش دارند. ٦ جدایه انتخابی بر اساس آزمونهای افتراقی تفاوتهایی را از نظر واکنش گرم، تولید اسپور و تولید رنگدانه فلورسانت نشان داده و براساس تفاوت‌هایی که با یکدیگر و با دیگر جنسهای باکتری داشتند به دو گروه باکتریهای گرم مثبت از جنس *Bacillus* و باکتریهای گرم منفی جنس سودوموناسهای فلورسانت تفکیک گردیدند (شناد، ۱۹۸۸). خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های سودوموناس (1083, D) بویژه از نظر تولید لوان، عدم لهانیدن سیب زمینی، عدم تحریک واکنش فوق حساسیت، اکسیداز و آرجی نین دی هیدرولاز مثبت و استفاده از منابع کربنی سوربیتول وساکارز با خصوصیات گونه *P. uorescens* مطابقت داشت (فهی و پرسلی، ۱۹۸۳). نتایج آزمونهای فیزیولوژیک، بیوشیمایی ومرفولوژیک جدایه‌های ۲۰۰۱، ۱۰٦۱، ۷۰۳ و BS به استثنای تولید لسیتیناز توسط جدایه ۷۰۳ با خصوصیات ذکر شده برای گونه *B. Subtilis* شباهت داشت (شاد، ۱۹۸۸).

جدایه‌های D و ۱۰۸۳ در محیط کشت مورد آزمایش (NAG) تولید نوعی آنتی‌بیوتیک نموده که توانست در غیاب خود باکتری از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت کند (شکل۱). کرائوس و لوپر (۱۹۹۰) در بررسیهای خود در رابطه با مکانیزم‌های بازدارندگی از رشد قارچ *P. ultimum* توسط استرین PF-S از *f l orescens* گزارش نمودند که این استرین روی محیط NAG تولید آنتی بیوتیک نمی‌کند ولی روی محیط 523 حاوی آگار تولید آنتی‌بیوتیکهایی از نوع پیرول نیترین وپایولوتئورین می‌نماید. در این مطالعه تنها جدایه ۱۰۸۳ در غلظت ۲۵ میکرومول کلرید آهن تولید نوعی سیدروفور نمود در حالیکه جدایه D در هیچیک از غلظتهای کلرید آهن سه ظرفیتی اثر باز دارندگی روی قارچ *G.candidum* نداشت. بنظر می‌رسد که این جدایه تولید سیدروفور نمی‌کند، تاکنون نقش سیدروفور استرین *P. putida* A-12 در بازداری از رشد فرم‌های اختصاصی *Fusarium oxysporum* روی خیار، تربچه و کتان ونقش سیدروفور سودوپاکتین استرین *Pseudomonas* sp. B-12 در کنترل بیماری پاخوره غلات در جو به اثبات رسیده است (لئونگ، ۱۹۸٦). آزمایش تأثیر متابولیت فرار جدایه‌های *P. fluorescens* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P. capsici* نشان داد که ترشحات فرار دو جدایه 1083 و .D، توانایی بازداری از رشد قارچ را بترتیب ۳۰ و٤۳ درصد داشتند (شکل ۲). با استفاده از روش کاستریک و کاستریک (۱۹۸۳) مشخص گردید که احتمالاً یکی از

1- Ethylacetoacetate Copper (II)
2- Methylen bis – (N-N-dimethlaniline)
3- Castric & Castric

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات موجود در متابولیتهای فرار جدایه‌های مذکور سیانید هیدروژن می‌باشد. جدایه *P. fluorescens* REW-1-1-1 تولیدکننده سیانید هیدروژن مکانیزم دفاعی گیاه را فعال نموده و موجب تجمع ترکیبات فنلی وفیتولکسینها در برگ لوبیا گردید (زدور و اندرسون[1]، ۱۹۹۰).

در آزمایش بررسی اثر ترشحات خارج سلولی جدایه‌های *B. subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در شرایط پتری، مقادیر مورد آزمایش در سطح یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بوده و بر اساس مقایسه میانگین‌ها، جدایه های B S و 2001 بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P. Capsici* در میزان ۱۵ درصد داشته و بترتیب ٥٦/١٤ و ٥٤/١٩ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ مذکور شدند، در حالیکه کلیه جدایه‌ها در میزان ۰/۷۵ درصد تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشته و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۱). این اختلافات در بین جدایه‌های مختلف یک گونه، از نظر تولید مواد قابل انتشار وممانعت از رشد قارچها توسط محققین گزارش شده است. استرینهای *B. subtilis* طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیکها از جمله میکوسابتیلین[2]، ایومایسین[3]، سابتیلین[4]، باسیلومایسین[5]، باسیلیسین[6]، توکسی مایسین[7] و غیره تولید نموده که نقش عمده‌ای در خاصیت آنتاگونیستی این باکتری علیه قارچها، مخمرها و باکتریها دارند (هنیس و اینبار[8]، ۱۹٦۸؛ لوفلر و همکاران[9]، ۱۹۸۵؛ بسون و میشل[10]، ۱۹۸٦). در این مطالعه مشخص گردید که جدایه‌های *B. subtilis* علاوه بر تولید آنتی‌یوتیک توانایی تولید ترکیبات فرار ضد قارچ *P. capsici* را در سه نوع محیط غذایی TSA، PDA و NAG داشته و رفتارهای متفاوتی را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ نشان دادند (شکل ۳). نتایج تحقیقات فیدامن و روسال (۱۹۹۳و۱۹۹٤) بیانگر این موضوع است که وجود دی گلوکز در محیط آگار مغذی موجب افزایش فعالیتهای ضد قارچی ترکیبات فرار *B. subtilis* علیه رشد قارچ *R. solani* می‌گردد. آنها متابولیتهای فرار متعددی شامل الکل، آلدئید، کتون و استرها را از کشت جدایه N C IMB *B. subtilis* در محیط آگار مغذی حاوی ۲ درصد دی‌گلوکز بدست آوردند. در این مطالعه همچنین مشخص گردید که جدایه‌های *B. subtilis* توانایی تولید سیانید هیدروژن را نداشته و نتیجه حاصل از این آزمایش با کارهای کاستریک و کاستریک (۱۹۸۳) مطابقت داشت.

بطور کلی از بررسی‌های بعمل آمده چنین نتیجه‌گیری می‌شود که باکتریهای آنتاگونیست بخصوص جدایه‌های *B. subtilis* جمع آوری شده از مزارع منطقه کرج کارایی مؤثری در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری در محیط کشت داشتند و از آنجا که کنترل بیولوژیک این بیماری به‌عنوان یک روش مهم در مدیریت بیماریهای گیاهی در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته و اولین قدم در توسعه کنترل بیولوژیک جداسازی و تعیین ارگانیسم‌هایی با پتانسیل بالا برای جلوگیری از توسعه بیماری می‌باشد به‌همین جهت جستجو برای دستیابی به عوامل کنترل بیولوژیک از منطقه ای که در همان جا بایستی مصرف شود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

1- Zodor & Anderson
2- Mycosubtilin
3- Eumycin
4- Subtilin
5- Bacilliomycin
6- Bacilysin
7- Toximycin
8- Henis & Inbar
9- Loeffler et al.
10- Besson & Michel

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱.ارشـاد، ج. ۱۳۷۱. گـونه‌های فیتوفترا در ایران (جداسازی- خالص‌سازی - شناسایی). وزارت کشاورزی سازمان تحقیقـات کشـاورزی، ۲۱۷ صفحه.

۲. ارشاد، ج. و من فرد هیله. ۱۳۵٤. بررسی بوته میری فلفل در ایران. بیماریهای گیاهی،۱۱: ۲۹-۲۱.

۳.آزاد سیفانی، ف.، شریفی تهرانی، ع.، حجارود، ق. ع.، محمدی، م. وح. روحانی. ۱۳۷۹. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* روی قارچ *Verticillium dahliae* عامل پژمردگی و رتیسیلیومی پنبه، چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایـران. صفحه ۵۷.

4.Besson, F., and G. Michel. 1986. Isolation and characterization of new Iturins: Iturin D and Iturin E. The Journal of Antibiotics. XI (4):437- 442.

5.Castric, K. F., and P. A. Castric. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 45 (2): 701 – 702.

6.Cho, E. K. 1987. Strategies for biological control of soil borne diseases in economic crop in Korea. Kor. J. Plant Pathol. 3 (4): 313 –317.

7.Fahy, P. C., and G. J. Persley. 1983. Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. Academic press. New York. 393p.

8.Fiddaman, P. J., and S. Rossal. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus Subtilis*. Journal of Applied Bacteriol. 74: 119 –126.

9.Fiddaman, P. J. , and S. Rossal. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriol. 76: 395-405.

10- Hagedron, C., W. D. Gould, and T. R. Bradinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55 (11): 2793 – 2797.

11.Henis, Y., and M. Inbar. 1968. Effect of *Bacillus subtilis* on growth and sclerotium formation by *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 58: 933-938.

12.Howell, C. R., and R. D. Stipanovic. 1980. Supperession of *Pythium ultimum* induced by damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopatol. 70(8): 712-715.

13.King, E. D., M. K. Ward, and D. E. Raney. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.

14.Kraus, J., and J. E. Loper. 1990. Biocontrol of *Pythium* damping–off of cucumbers by *Pseudomonas fluorescens* pf –5: Mechanistic studies. PP 172 –175 In Keel, C., B. Koller, and G. Defago (eds). Plant grown promoting rhizobacter. The second internationl Workshop on plant growth promoting rhizobacteria – Interlaken, Switzer land.

15.Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 187- 209.

16.Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. Phytopathol 12:401-408.

17. Loeffler, W., J. S. M. Tschen, N. VanittanKom, E. Khorpp, T. F. Hsich, and T. C. W u. 1985. Antifungal effects of Bacilysin and Fengimycin from *Bacillus subtilis* F 29 –3. A comparison with activity of other *Bacillus* antibiotics. J. Phytopathol. 115: 204-213.

18.Masago, H., M. Yoshikawa, M. Fukada, and N. Nakavishi. 1977. Selective inhibition of *Phytium spp.* on medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soil and plants. Phytopathol. 67: 425-427.

19.Nemec, S., L. E. Datnoff , and J. Strandbery.1996. Efficacy of biocontrol agent in planting mixes to colonize plant root sand control root diseases of vegetables and citrus. Crop Protection. 15(8): 735-742.

20.Park, J. H., and H. K. Kim. 1989. Biological control of *Phytophtora* Crown and root rot of greenhouse pepper with *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter agglomerans* by improved method of application, Kor. J. plant pathol. 5(1): 1-12.

21.Satour, M. M., and E. E. Butler. 1967. A root and crown rot of tomato caused by *phytophthora capsici* and P. parasitica. Phytopathol. 57: 510- 515.

22.Schaad, N. W. (ed). 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2 nd. Ed. Am. Phytopathol. Soc St. paul, MN, USA. 164 pp.

23.Singh, V., and B. J. Deveral . 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Sco. 83 (3): 487-490.

www.SID.ir

Archive of SID

24.Stamps, D. J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook, and G. S. Hall. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycol. 162 pp.

25.Suslow, T. R., and M. N. Schroth. 1982. *Rhizobacteria* of sugar beets: effects of seed application and root colonnization on yield. Phytopathol. 72 (2): 199-206.

26.Weller, D. M., and R. J. Cook. 1983. Suppression of take all of wheat by seed treatment whit fluorescent *Pseudomonads*. Phytopathol. 73 (3): 463-469

27.Zodor, R. E., and A. J. Anderson. 1990. Influence of root colonizing bacteria on defense responses of beans. P. 187–190. In Keel, C., B. Koller, and G. Defago. (eds.) The plant growth promoting rhizobacteria, The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlaken Switzerland.

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 10(4), Winter 2004
www.magiran.com/jasnr

Antagonistic effects of *Bacillus* and *Peseudomonas* isolates on *Phytophthora capsici* the causal agent of pepper damping - off

F. Omati[1], A. Sharifi-Tehrani[2], M. Mohammadi[2], G.A. Hedjaroud[2] and J.zad[2]
[1]Agricultural Research Center of Semnan (Shahrood), [2]College of Agriculture, University of Tehran. Karaj, Iran.

Abstract

The causal organism was isolated from rotted crown of pepper and was identified as *Phytophthora capsici.* In this study, 151 bacterial isolates were collected from various plant rhizospheres, 37 isolates belonging to fluorescent *Pseudomonads* and gramp ositive bacteria showed antagonistic effect on *P. capsici* among these antagonists, six were studied for their inhibitory effect against pepper damping –off. Baesd on biochemical, physiological and morphological tests, isolates D and 1083 were as *Bacillus subtilis*. The isolates 1083 and D produced antibiotic as well as volatile metabolites that inhibited mycelial growth of *P. capsici* in vitro. Isolates 1083 on king B medium produced siderophore, while isolate D did not produce siderophor at different FeCl3 concentrations. *B. subtilis* isolates prevented the mycelial growth through antibiotic and volatile metabolite Production. Among antagonistic isolates, only D and 1083 could produce hydrogen cyanid.

Keywords: Pepper; Damping – off; Antagonistic bacteria