Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ شماره چهارم ـ مهر - آبان ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

مطالعه اثر آنتاگونیستی برخی از جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* بر روی قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه لوبیا

محمد رضا اصلاحی
عضوهیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۱/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۲۲

چکیده

در این تحقیق با استفاده از محیط اختصاصی Kings, B از خاک‌های زراعی مناطق مختلف خوزستان شامل شهرهای دزفول، شوشتر، ملاثانی، حمیدیه و سوسنگرد تعداد یکصد و بیست جدایه از پسودوموناس‌های فلورسنس جدا گردید که سه جدایه از آنها در بررسی آزمایشگاهی خواص آنتاگونیستی و کنترل بیولوژیکی خوبی علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا نشان دادند. این سه جدایه با استفاده از روش‌های متداول در باکتریولوژی شناسایی شده و با اندکی اختلاف به گونه *Pseudomonas fluorescens* تعلق داشتند. هر سه جدایه تأثیر معنی‌داری روی کاهش درصد مرگ‌ومیر گیاهچه‌ها در مقایسه با شاهد از خود نشان دادند اما اثر جدایه ۲٤ نسبت به جدایه ۳۰ و ٤۲ چشمگیرتر بود. هر سه جدایه روی محیط PDA (حاوی ۵ درصد گلوکز) تولید نوعی متابولیت نمودند که توانستند در غیاب باکتری‌ها از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت کند. اگرچه ماهیت این متابولیت روشن نشد اما به نظر می‌رسد که نوعی آنتی بیوتیک باشد. هیچکدام از استرین ها روی محیط کشت PDA (حاوی ۵ درصد گلوکز) که حاوی غلظت‌های مختلف کلرید آهن بود، سیدروفور تولید نکردند.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas fluorescens* مرگ گیاهچه، کنترل بیولوژیک، آنتی بیوتیک، سیدروفور، آنتاگونیست

مقدمه

مبارزه بیولوژیک با عوامل بیماریزای گیاهان بویژه پاتوژن‌های خاکزاد از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. تاکنون باکتری‌های متعددی از جنس‌های مختلف به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک معرفی گشته‌اند که بعضی از آنها نیز به‌عنوان عوامل تحریک‌کننده رشد گیاه بکار گرفته شده‌اند. در بین چنین عواملی پسودوموناسهای فلورسنس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (ولر، ۱۹۸۸).

استفاده از برخی گونه‌های پسودوموناس فلورسنس به طریق آغشته کردن بذور به این باکتری‌ها و اضافه نمودن باکتری‌ها به خاک برای کنترل بیماری‌های پاخوره گندم (ولر و کوک، ۱۹۸۳)، پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخودفرنگی(پارکر و همکاران، ۱۹۹۱)، مرگ گیاهچه پنبه (زاکی و همکاران، ۱۹۹۵)، بوته میری خیار (کراوس و لوپر، ۱۹۹۰)، پوسیدگی سیاه ریشه توتون (ولر، ۱۹۸۸)، مرگ گیاهچه و پوسیدگی بذر گندم (میلوس وراث راک، ۱۹۹۷) و عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی (احمد زاده و همکاران، ۱۳۷٦)، نتایج مطلوب و موفقیت‌آمیزی داشته است. در این ارتباط تحقیقات به‌عمل آمده نشان داد که جدایه *Pseudomonas fluorescens* H237 می‌تواند جمعیت قارچ

www.SID.ir

Archive of SID

Fusarium oxysporum f.sp *dianthi* را کاهش دهد (راج میکر و همکاران، ۱۹۹۵).

همچنین، با سواسازی جدایه *P. fluorescens* WCS 374 از خاک مزارع تربچه نشان داده شد که این جدایه توانایی کاهش بیماری پوسیدگی ریشه و پژمردگی گیاه تربچه ناشی از *F. oxysporum* f.sp dianthi را دارد (لیمن و همکاران، ۱۹۹۵). در همین راستا لیمن و همکاران (۱۹۹۵) نشان دادند که جدایه *P. fluorescens* RRLJ 181 از رشد *F. solani* ،*F. semitectum* ،*F. moniliforme* و *F. oxysporum* و جلوگیری می‌کند. *oxysporum f.sp lycopersici* احمدزاده و همکاران (۱۳۷۶) با کاربرد یک جدایه از باکتری‌های پسودوموناس فلورسنس توانستند بیماری مرگ گیاهچه نخود ایرانی ناشی از قارچ *Pythium ultimum* را کاهش دهند.

همچنین ذاکی و همکاران (۱۹۹۵) یک جدایه از *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* را از خاک‌های مزارع پنبه در آریزونا جدا کردند و نقش آن را به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه پنبه به اثبات رساندند. به‌همین ترتیب فرخی نژاد و همکاران (۱۳۷۷) توانستند بیماری پژمردگی فوزاریومی نخودفرنگی را با استفاده از یک جدایه از گونه *P. putida* بنام N1R به‌طور مطلوبی کنترل نمایند.

تحقیقاتی که در جهت تعیین مکانیسم عمل پسودوموناس‌های فلورسنس در کنترل بیماری‌های خاکزاد مانند مرگ گیاهچه انجام گرفته، نشان می‌دهد که رقابت برای جذب مواد غذایی و محصور نمودن جایگاه میکروبی، تولید آنتی‌بیوتیک و مواد ضدقارچی، تولید سیدروفور و القاء مقاومت در گیاه، نقش عمده‌ای در کنترل بیماری‌های خاکزاد ایفا می‌کند (ولر، ۱۹۸۸).

بیشتر تلاش‌هایی که تاکنون در جهت اطلاع از مکانیسم کنترل بیماری‌های ریشه، توسط باکتری‌های فوق صورت گرفته است، روی سیدروفورها و آنتی بیوتیک‌ها متمرکز بوده است (مونتنز و همکاران، ۱۹۹۶). کلوپر و همکاران (۱۹۸۰) گزارش نمودند که جدایه B10 از *P. fluorescens* و یا سیدروفور تولید شده توسط آن از پیشروی بیماری پژمردگی جو ممانعت به‌عمل می‌آورد. برای اولین بار هاول و استیپانوویک (۱۹۷۹) موفق شدند نقش آنتی بیوتیک پیولوتئورین را در بازدارندگی از رشد قارچ‌های *Pythium ultimum* و *R.solani* به اثبات برسانند.

با توجه به اینکه یکی از راه‌های کنترل این بیماری استفاده از سموم شیمیایی می‌باشد اما استفاده از این سموم آلودگی خاک و محیط‌زیست، صرف هزینه زیاد جهت تولید سم و همین‌طور پیدایش مقاومت در جمعیت عوامل بیماریزا در مقابل سموم مصرفی را به همراه دارد. با توجه به مشکلات یاد شده جایگزینی مبارزه شیمیایی با روش‌های کم‌خطرتر و مناسب‌تر مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این راه‌کارها استفاده از عوامل بیولوژیک در کنترل بیماری می‌باشد. از طرفی وجود بیماری مرگ گیاهچه لوبیا در بعضی از مزارع استان محرز بوده و گاهی این بیماری حالت شدید به خود می‌گیرد و باعث از بین رفتن کل محصول می‌شود. حال اگر بتوان از عوامل طبیعی علیه بیماری استفاده کرد و در آینده با استفاده از تکنولوژی نوین، خود این عوامل و یا متابولیت‌های آنان را که باعث کاهش بیماری می‌شوند به‌صورت تجارتی درآورد، می‌توان خطرات استفاده از سموم را کاهش داد و از طرفی دیگر از این نظر که این عوامل طیف وسیعی از بیماری‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند می‌توان امید داشت که کاربرد آنان تک بعدی نبوده و استفاده از آنها بتواند چندین بیماری را به‌طور همزمان کنترل کند.

در این تحقیق خاک مزارع مختلف شهرهای استان خوزستان از نظر وجود باکتری‌های پسودوموناس فلورسنس آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت پس از جداسازی باکتری‌ها، اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها روی قارچ *R.solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا آزمایش شد. همچنین مکانیسم عمل جدایه‌های بکار رفته مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های *P. fluorescent* از خاک: برای جداسازی باکتری‌ها از محیط اختصاصی Kings, B استفاده شد. اختصاصی بودن این محیط به دلیل وجود آمپی سیلین، کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید در محیط مزبور می‌باشد. اجزای این محیط در یک لیتر عبارتند از: پروتئاز پپتون ۲۰ گرم، ($MgSO_4$ ،$7H_2O$ ۱/۵ گرم)، KH_2PO_4، $3H_2O$، آگار ۱۵گرم، گلیسرول ۱۵گرم، آمپی‌سیلین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، کلرامفنیکل ۱۳ میکروگرم در لیتر، سیکلوهگزامید ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و آب مقطر ۱ لیتر (لیمن و همکاران، ۱۹۹۵).

نمونه‌های خاک از مناطق مختلف خوزستان شامل شهرهای دزفول، شوشتر، شوش، ملاثانی، حمیدیه و سوسنگرد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر نمونه ۲۰ گرم خاک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و با استفاده از روش ترقیق مکرر سوسپانسیون خاک تا 10^{5} برابر رقیق گردید. از هر رقت یک دهم میلی‌لیتر به تشتک‌های حاوی محیط کشت فوق منتقل و پخش گردید. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، ظروف کشت جهت ظهور کلنی‌های باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌های جدا شده برای مطالعات بعدی به لوله‌های آزمایش حاوی آگار غذایی (NA) منتقل گردیدند. بررسی‌های مقدماتی در آزمایشگاه که با باکتری‌های به‌دست آمده انجام شد، نشان داد که تنها سه جدایه از باکتری‌های فوق دارای اثرات آنتاگونیستی روی عوامل مرگ گیاهچه بودند، بنابراین بقیه آزمایش‌ها با این سه جدایه انجام شد.

شناسایی باکتری‌ها: با توجه به خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای و با استفاده از روش شاد (۱۹۸۹)، باکتری‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها بر بیمارگر عامل مرگ گیاهچه در شرایط آزمایشگاه: اثر باکتری‌ها روی رشد پاتوژن عامل مرگ گیاهچه لوبیا در شرایط آزمایشگاه با استفاده از روش کشت متقابل انجام شد. برای این منظور، دیسک‌هایی به قطر ۹ میلی‌متر از محیط کشت‌های ۴۸ ساعته قارچ *R.solani* جدا و در یک طرف تشتک‌های پتری حاوی PDA قرار داده شد. ظروف کشت پس از آماده شدن در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت سوسپانسیون غلیظی از کشت تازه باکتری با استفاده از محلول بافر ۰/۱ مولار $MgSO_4$ ،$7H_2O$ تهیه گردید. غلظت باکتری در سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. برای آزمایش، غلظت مناسبی از باکتری (10^{9} - 10^{7} سلول در میلی‌لیتر) با رقیق نمودن سوسپانسیون غلیظ در محلول بافر فوق، تهیه گردید. یک دهم میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به طریق نقطه‌گذاری در طرف مخالف دیسک‌های قارچ در تشتک‌های پتری حاوی PDA قرار داده شد. ظروف کشت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از گذشت ۳ تا ٤ روز خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (راجمیکر و همکاران، ۱۹۹۵).

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر بیمارگر در شرایط گلخانه: به‌منظور آماده‌سازی مایه بیمارگرها و آلوده ساختن خاک، بذور جو در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۳ ساعت خیسانده شد. سپس بذور فوق درون فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری قرار گرفته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌مترمربع به‌مدت یک ساعت اتوکلاو گردیدند. پس از آن هر فلاسک به‌طور جداگانه با قارچ عامل مرگ گیاهچه مایه‌زنی شد. آنگاه فلاسک‌ها برای مدت ۳ هفته در دمای اتاق نگهداری شدند. مایه آماده شده برای مدت ۲٤ ساعت در هوای آزاد در آزمایشگاه خشک شده و در پاکت‌های کاغذی در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. برای آلوده کردن خاک، مایه بیمارگرها به نسبت ۱درصد وزنی به خاک سترون اضافه و خوب مخلوط شد. جدایه‌های باکتری‌ها روی محیط‌کشت King 'sB مایع کشت داده شدند. فلاسک‌های حاوی

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت به مدت ۲٤ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سلول‌های باکتری توسط دستگاه سانتریفیوژ با شتاب گردش ۱۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه از محیط کشت مایع جدا گردید. سلول‌های باکتری، رسوب کرده و محیط کشت در بالا قرار گرفت، محیط کشت را تخلیه نموده و سپس غلظت مناسبی از باکتری (10^{9}- 10^{7} * ۱ یاخته در میلی‌لیتر) با رقیق نمودن سلول‌های باکتری توسط محلول بافر ۰/۱ مولار $MgSO_4, 7H_2O$ تهیه گردید. بذور لوبیا پس از ضدعفونی در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد بلافاصله ۳-۵ مرتبه در ظروف حاوی آب سترون شسته شدند. پس از آن بذور مزبور در پارچه ململ نمدار نگهداری شده تا تحریک به جوانه‌زنی شوند. بذرهای جوانه‌زده به‌مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. برای هر نوع گیاه دو تیمار شاهد شامل: ۱- بذرهای خیسانده شده بدون قارچ و باکتری (شاهد سالم) ۲- بذرهای خیسانده شده به‌همراه قارچ عامل بیماری (شاهد آلوده) و سه تیمار باکتریایی (بذرهای تیمار شده با جدایه‌های باکتری به‌همراه قارچ عامل بیماری) و برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد. سپس ۵ بذر لوبیا در هر گلدان کاشته شد. قطر گلدان‌ها ۲۰ سانتی‌متر بود. آزمایش‌ها بر اساس طرح کامل تصادفی در گلخانه و در شرایط طبیعی با حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ٤۰ در صد انجام گرفت. درصد کنترل بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\frac{(\text{تعداد گیاهان بیمار در تیمار})\times 100}{\text{تعداد گیاهان بیمار در شاهد ۲}}$$

جدا و خالص‌سازی عامل بیماری: نمونه‌برداری از نواحی مختلف خوزستان صورت گرفت. گیاهان آلوده پس از جمع‌آوری در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند. قسمتی از حاشیه زخم‌ها پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۵ درصد برروی آب آگار یا PDA حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم کلرامفنیکل در لیتر قرار گرفت. نوک ریسه‌های شبیه به ریزوکتونیا ۱۲ تا ۲٤ ساعت بعد به یک محیط‌غذایی مناسب (PDA) منتقل و پس از رشد با روش نوک ریسه خالص گردید.

بررسی تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور به‌عنوان مکانیسم عمل باکتری‌ها: برای اثبات تولید آنتی‌بیوتیک روی محیط کشت PDA از کشت ٤ روزه باکتری به روش کرائوس و لوپر (۱۹۹۰) استفاده شد. برای آزمایش، پرگنه‌های باکتری از سطح تشتک پتری جمع‌آوری و برای اطمینان از عدم رشد بقایای پرگنه باکتری‌ها، از پنبه آغشته به فرمالین ٤۰ درصد استفاده گردید. برای این کار پنبه آغشته به فرمالین درون تشتک پتری قرار گرفته و به‌مدت نیم‌ساعت به حالت وارونه در محیط آزمایشگاه تحت شرایط سترون نگهداشته شد. سپس پنبه را خارج کرده و بعد از گذشت چند دقیقه دیسک‌هایی از قارچ روی محیط کشت قرار گرفت. عدم رشد قارچ روی این محیط و مقایسه آن با شاهد که باکتری در آن کشت نشده بود، نشانه وجود آنتی‌بیوتیک درون محیط غذایی تلقی شد. در تشتک‌های پتری شاهد نیز از پنبه آغشته به فرمالین بهمان صورت فوق استفاده گردید. به‌منظور بررسی تولید سیدروفور از روش ولر و کوک (۱۹۸۳) با اندکی تغییر استفاده شد. به این ترتیب که از محیط PDA حاوی ۵ درصد گلوکز بجای محیط King 'sB استفاده گردید. به این محیط مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن ($FeCl_3$) اضافه شد. دیسک‌هایی از قارچ در یک طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA و $FeCl_3$ قرار داده شد. باکتری‌های مورد نظر به‌صورت خطی روی محیط کشت طوری مایه‌زنی گردیدند که در امتداد قطر ظروف کشت، نواری به پهنای ۱/۵- ۱ سانتی‌متر تشکیل شد. ظروف کشت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۲ تا ۳ روز عدم رشد قارچ روی محیط مذکور و مقایسه آن با شاهد که فاقد کلرید آهن شود نشانه عدم فعالیت سیدروفور تلقی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

جداسازی و بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاه: از میان ۱۲۰ جدایه باکتریایی جمع‌آوری شده از خاک مناطق مختلف خوزستان که در محیط کشت King, sB تولید رنگ فلورسنت کردند، فقط سه جدایه اثر آنتاگونیستی برعلیه عامل بیماریزای مولد مرگ گیاهچه در روی محیط کشت نشان دادند.

شناسایی جدایه‌های باکتری: خصوصیات بیوشیمیایی، مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های آنتاگونیست در جدول ۱ ارائه شده است. براساس نتایج حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک، جدایه‌های فوق با اندکی اختلاف به‌گونه *P. fluorescens* تعلق دارند (شاد، ۱۹۸۹ و فهی و پرسلی، ۱۹۸۳).

بررسی مکانیسم عمل باکتری‌ها: جدایه‌های آنتاگونیست (جدایه ۲٤، ۳۰، ٤۲) در محیط کشت PDA تولید نوعی متابولیت نمودند که توانست در غیاب باکتری از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت نماید. اگرچه ماهیت این متابولیت روشن نشد ولی به نظر می‌رسد که این متابولیت نوعی آنتی‌بیوتیک باشد. خاصیت بازدارندگی جدایه‌ها در برابر بیمارگرها روی محیط کشت PDA با اضافه نمودن کلرید آهن کاهش پیدا نکرد، بنابراین به‌نظر می‌رسد که سیدروفور تولید شده در بازدارندگی از بیماری نقشی نداشته باشد.

اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها بر کاهش درصد مرگ و میر گیاهچه‌ها در گلخانه: با توجه به نتایج حاصله از آزمایش تأثیر مایه‌زنی بذور لوبیا توسط باکتری‌های آنتاگونیست برروی وقوع مرگ گیاهچه تحت شرایط گلخانه، جدایه‌های ۲٤، ۳۰، ٤۲ به‌ترتیب به‌میزان ۸٦، ۷۸/٦، ۸۵/۸ درصد نسبت به شاهد قارچ، مرگ‌ومیر گیاهچه‌های لوبیا را کاهش دادند (شکل ۱). تجزیه واریانس آزمایش به‌وسیله نرم‌افزار Costat c انجام گرفت (جدول ۲) و مقایسه میانگین‌ها که با استفاده از روش دانکن صورت گرفت، نشان داد که میانگین‌ها در سطح ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌داری دارند (جدول ۳).

این مطالعه اهمیت جدایه‌های منتخب *P. fluorescent* را در کنترل بیماری مرگ گیاهچه لوبیا نشان داد. در این پژوهش، سه جدایه مختلف باکتریایی از گونه *P. fluorescens* مورد استفاده قرار گرفت که هر سه آنها از شدت ظهور بیماری مرگ گیاهچه لوبیا در شرایط گلخانه‌ای کاستند (نمودار ۱). هر سه جدایه در شرایط آزمایشگاه در برابر عامل ایجادکننده مرگ گیاهچه واکنش آنتی بیوزی خوبی نشان دادند. یکی از روش‌های تشخیص اثر آنتاگونیستی میکروارگانیسم‌های جمع‌آوری شده از طبیعت روی عوامل بیماریزا کاربرد آنها در محیط کشت در آزمایشگاه می‌باشد ولی ظهور چنین تأثیری در آزمایشگاه، نشان‌دهنده موفق بودن جدایه‌ها در کنترل بیماری در شرایط گلخانه و مزرعه نبوده (میاوس و راث راک، ۱۹۹۷) که دلیل این امر شرایط غذایی و بعضی دیگر از فاکتورهایی است که روی رشد و بقاء عوامل بیوکنترل

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها.

آزمون	جدایه ۲٤	جدایه ۳۰	جدایه ٤۲
واکنش گرم	-	-	-
تولید رنگدانه فلورسنت	+	+	+
تاژک	۳ - ۱ قطبی	۳ - ۱ قطبی	۳ - ۱ قطبی
کاتالاز	+	+	+
تجزیه هوازی اکسیژن	+	+	+
تجزیه بی هوازی اکسیژن	-	-	-
اکسیداز	+	+	+
فوق حساسیت	-	-	-
لهانیدن سیب زمینی			
هیدرولیز نشاسته	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
لوان	+	+	+
ارجی نین	+	+	+
احیاء نیترات	+	+	+
رشد در ٤۱ درجه سانتیگراد	-	-	
رشد در ٤ درجه سانتیگراد	+	+	+
استفاده از قندهای مانیتول	+	+	+
سوربیتول	+	-	+
نرهالوز	+	+	-
ساکارز	+	+	+
آرابینوز	-	-	-
زایلوز	-	-	
گلوکز	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+
لاکتوز	-		-
سیترات	-	-	-
مانوز	+	+	+
آدنیتول		-	-
رافینوز	+	+	+
سالی سین	+	+	+
دکستروز	+	+	+

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس آزمایش اثر جدایه‌های باکتری روی وقوع بیماری مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از ***Rhizoctonia solani***.

منابع تغییر	SS	Df	MS	F
تیمار	۲۹/۸	٤	۷/٤٥	۲۳/٥۲٦۳۱٥۷۸۹**
خطاء	٤/۷٥	۱٥	۰/۳۱٦٦٦٦٦٦۷	
کل	۳٤/٥٥	۱۹		

در سطح ۱ درصد معنی‌دار است CV=۸/۹

www.SID.ir

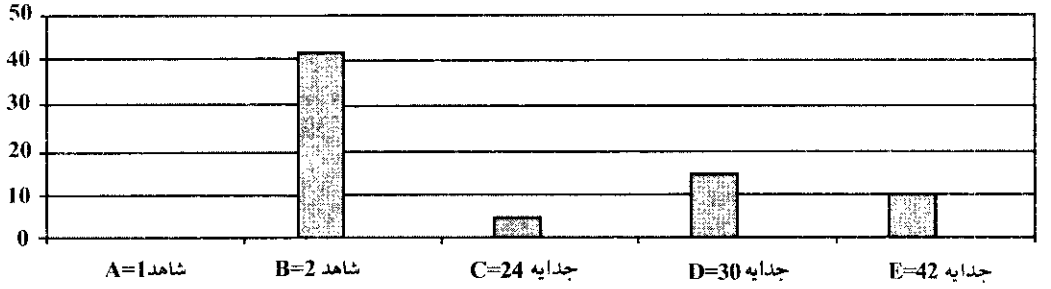
کتابخانه منطقه‌ای علامه بحرالعلوم شیراز

Archive of SID

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن.

تیمار	میانگین تعداد گیاهچه های سالم	مقایسه میانگین در سطح احتمالی ۵٪
۱ (بذر)	۵	A*
۳ (بذر، عامل بیماری، استرین ۲٤)	٤/۵	B
۵ (بذر، عامل بیماری، استرین ٤۲)	٤/۱	C
٤ بذر، عامل بیماری، استرین ۳۰	٤	C
۲ (بذر، عامل بیماری)	۱/۵	D

*- میانگین‌های دارای حداقل اختلاف غیرمشترک در سطح ۵ درصد احتمالی خطا به روش دانکن با هم اختلاف معنی‌دار دارند.



شکل ۱- تأثیر مایه‌زنی بذور لوبیا توسط باکتری‌های آنتاگونیست برروی بیماری مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *R. solani* (نمودار درصد گیاهان بیمار را در هر تیمار نشان می‌دهد).

در طبیعت اثر دارند و بطور قابل توجهی با شرایط محیط کشت متفاوت می‌باشند (کلوپر و همکاران، ۱۹۸۰). بنابراین برای تعیین خاصیت آنتاگونیستی یک میکروارگانیسم نه تنها آزمایش‌ها باید تحت شرایط آزمایشگاه انجام شود بلکه آزمایش‌های مربوطه در سطح مزرعه و با در نظر گرفتن شرایط محیطی نیز بایستی انجام پذیرد تا بتوان مؤثرترین عامل بیوکنترل را شناسایی کرد. در شرایط گلخانه، اثر آنتاگونیستی استرین‌های مذکور برروی *R. solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا انجام شد و این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط دفاگو و همکاران (دیفاگو و هاس، ۱۹۹۵؛ کلوپر، ۱۹۹۱؛ کارترایت و بنسون، ۱۹۹۵) مطابقت دارد.

ولر (۱۹۸۸) مکانیسم عمل پسودوموناس‌های فلورسنس در کنترل بیماری‌های خاکزاد را رقابت برای جذب مواد غذایی و جا، تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور و تحریک سیستم دفاعی گیاه یا مقاومت القائی معرفی نموده است، اما بیشتر تلاش‌هایی که تاکنون جهت اطلاع از مکانیسم کنترل بیماری‌های خاکزاد توسط باکتری‌ها صورت گرفته برروی سیدروفورها و آنتی بیوتیک‌ها متمرکز بوده است (مونتینز و همکاران، ۱۹۹۶). با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد که مکانیسم اثر جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش تولید نوعی آنتی‌بیوتیک باشد و این به‌علت عدم رشد قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه در محیط کشت حاوی گلوکز می‌باشد. در این زمینه هاول و استیپانوویک (۱۹۷۹) قبلاً اثبات کرده بودند که آنتی‌بیوتیک پیرول نیترین و پایولوتئورین می‌توانند به اندازه خود باکتری علیه *R. solani* و *P. ultimum* روی محیط کشت ایجاد بازدارندگی نمایند. نتایج آزمایش بررسی مکانیسم اثر جدایه‌ها با نتایج به‌دست آمده توسط استیپانوویک مشابه بود با این تفاوت که ماهیت و نوع آنتی‌بیوتیک در این بررسی مشخص نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱.احمدزاده، م.، شریفی تهرانی، غ. و رحیمیان، ح. ۱۳۷٦. جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ *Pythium ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸ شماره ۳: صفحه ۸۵-۸۱.

۲.فرخی‌نژاد، ر.، بیکر، ر. و رانو، ر. ۱۳۷۷. کنترل بیولوژیکی پژمردگی فوزاریومی نخود فرنگی به‌وسیله استرین N1R از *Pseudomnas putida* در دو PH مختلف خاک. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. صفحه ۱۵۰.

3.Cartwright, D.K., and Benson, D.M. 1995. Comparision of Pseudomonas species and applicatication techniques for biocontrol of Rhizoctonia stem rot of poinsettia. Plant Disease 79: 309-313.

4.Defago, G., and Haas, D. 1995. Pseudomonas as antagonistis of soilborne plant pathogens: mode of action and genetic analysis. Soli Biochemistry 6: 249-291.

5.Fahy, P.C., and Persley, G.J. 1983. Plant bacterial diseases, A diagnostic guide. Academic press. 393pp.

6.Howell, C.R., and Stipanovic, R.D. 1979. Control of Rhizoctonia solani on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 28: 84-96.

7.Kloepper, J.W. 1991. Development of in vivo assays for prescreening antagonists of Rhizoctonia Solani on cotton. Phytopathology 81: 1006-1013.

8.Kloepper, J.W., Leong, J. Teintze, M. and Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promotimg rhizobacteria. Nature 286: 885-886.

9.Kraus, J., and Loper, J.E. 1990. Biocontrol damping-off of cucumber by Pseudomonas fluorescens Pf-5: mechanisitic studies. 172-175. In plant growth promoting rhizobacteria. Keel, C., Koller, B., and Defago, G. (eds). The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria Interlacen, Switzerland.

10.Leeman, M., Vanpelt, J.A. Hendreckx, M.J. Scheffer, P.A. Baker, P.A.H.M., and Schipper, B. 1995. Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with Pseudomonas fluorescens WCS 374. Phytopathology 85: 1301-1305.

11.Milus, E.A., and Rothrock, C.S. 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling pythium root rot of winter wheat Plant Disease 81: 180-184.

12.Monteiens, E., Bonterra, A. Opher, Y. and Beer, S.V. 1996. Antagonism of selected bacterial strains to Stephylium vesicarium and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. Phyopathology 86:856-863.

13.Parker, J.L., Joy, A.E. and King, E.B. 1991. Biological of Pythium demping-off and Aphanomyces root of peas by application of Pseudomonas cepacia or P. fluorescens to seed. Plant Disease 75:987-992.

14.Raaijmakers, J.M. Leeman, M. Schipers, B. and Baker, P.A. 1995. Dose-response relationships in biological control of fusarium with of radish by Pseudomonas spp. Phytopatholiogy 85:1075-1081.

15.Schaad, N.W. 1989. Laboratory guide for identication of plant pathogenic bacteria, Amer. Phytopathol. Soc, St. plant, Minnesota U.S.A. 72p.

16.Wel, G. Kloepper, J.W., and Tuzun, S. 1995. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology 86:221-224.\

17.Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol 26:379-407.

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

19.Zaki, K. Misaghi, I.J., and Heydaryan, A. 1995. Control of cotton seedling damping-off in the field by Burkholderia (Pseudomonas) cepacia. Plant Disease. 82:291-293.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(4), Oct - Nov 2005
www.magiran.com/jasnr

Stady on antagonistic effect of several *Pseudomons fluorescens* isolates on casual agent of bean seedling damping-off

M.R. Eslahi
Academic member of Dept., Agricultural Research of Khuzestan

Abstract

In this study one hundred twenty *pseudomons fluorescens* isolates were collected by use of King's B medium from field soils of different reigones Khuzestan province including: Dezful, Shoshtar, Shosh, Mollasani and Sosangerd. Only three isolates had suitable antagonistic and biological effects on *Rhizoctonia solani*, the casual agent of been seedling damping off in laboratory experiments. These strain were identified by current methods in bacteriology and belonged to *Pseudomons fluorescens*. Each strain showed significant effect on dead plant percent reduction in compare with check, but effect of strain 24 was more than the others. These bacterial strains produced a kind of metabolite on PDA (containing 5% glucose) that could inhibit the growth of casual agent of seed rots and seeding damping off in the absence of bacteria. This metabolite seems to be an antibiotic. Any one of strain did not produce siderophor on PDA (containing 5% glucose) amended with different concentration of $FeCl_3$.

Keywords:*Pseudomonas fluorescens*; Damping-off; Biological control; Antibiotic; Siderophor; Antagonist

www.SID.ir