ویژه‌نامه علمی-پژوهشی

علوم کشاورزی

سال دوازدهم، شماره (۱) ۱۳۸۵

بررسی تاثیر باکتری‌های آنتاگونیستی عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان توت در استان گیلان

هادی رهاننده

مربی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

مصطفی نیک نژاد کاظم پور

استادیار گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

نادر حسن زاده

استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (تهران)

چکیده

در این تحقیق تاثیر آنتاگونیستی باکتری‌های جداسازی شده از باغات توت استان گیلان علیه قارچهای *Fusarium solani* ، *F. oxysporum* و *Lasiodiplodia theobromae* عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه توت در شرق استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. ۵ جدایه منتخب قادر به ایجاد هاله بازدارندگی به میزان ۱ تا ۵ میلی متر روی هر سه قارچ بودند. چهار جدایه باکتریایی *H-1*، *H-16*، *H-24* و *H-25* متعلق به جنس *Bacillus* و جدایه *H-4* متعلق به جنس *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شد. در آزمون مربوط به تاثیر ترکیبات فرار، قدرت بازدارندگی باکتری‌ها از رشد رویشی قارچ های *F.solani*، *F. oxysporum* و *L. theobromae* به ترتیب به میزان ۲۵ الی ۳۵، ۳۶/۱۱ الی ۴۷/۳۵ و ۲۵/۱۸ الی ۷۶/۶۶ در صد بود. جدایه *H4* روی محیط کشت *King's B* محتوی ۵، ۵۰، ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن تولید سیدروفور نموده و از رشد قارچ *Geotrichum candidum* ممانعت بعمل آورد. ترشحات خارج سلولی جدایه های آنتاگونیست انتخابی در غلظت های مختلف سبب بازداری رشد رویشی قارچ های مذکور شد و اغلب با افزایش غلظتها بازداری رشد قارچ ها نیز افزایش یافت. همه جدایه های آنتاگونیست قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند و بخوبی از رشد قارچهای عامل بیماری ممانعت کردند.

واژه‌های کلیدی: سیدروفور، توت، *Fusarium solani*، *F. oxysporum*، *Lasiodiplodia theobromae*، *Geotrichum candidum*.

مقدمه

تا کنون بیماریهای متعددی از روی درخت توت از سراسر دنیا گزارش شده است که یکی از بیماری‌های خاکزی آن پوسیدگی ریشه توت می‌باشد (کریمی، ۱۳۷۴). بیماری پوسیدگی ریشه توت از مسائل عمده باغات توت در همه کشورهایی چون ژاپن، روسیه،

تاریخ دریافت مقاله ۸۳/۱/۲۶ تاریخ دریافت نسخه نهایی ۸۴/۸/۸

Archive of SID

www.SID.ir

چین و تایلند است که به پرورش کرم ابریشم می‌پردازند (Philip *et al*., 2001). عامل پوسیدگی ریشه توت در کشور ژاپن *Helicobasidium mompa* و *Rosellinia necatrix* می‌باشد (Aoki *et al.,* 1959). در کشور روسیه مقاومت پیوندهای مختلف درخت توت نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه مورد بررسی قرار گرفت (Kakuliya *et al.,* 1970). این بیماری در سال ۱۹۷۱ از تایلند نیز گزارش شد (Aoki, 1971). جیمز داک (Duke, 1983) عوامل پوسیدگی ریشه توت را *Armillaria mellea*، *Helicobasidium pureum*، *Rosellinia aguila* معرفی کرد. در کشور هند اولین گزارش بروز پوسیدگی ریشه و طوقه توت با عامل *Botryodiplodia theobromae* توسط Luke و همکاران در سال ۱۹۸۲ اعلام گردید(Teotia *et al.,* 1994). در یک بررسی دیگر عامل بیماری پوسیدگی ریشه توت را *Fusarium solani* تشخیص داده شد (Philip *et al*., 1995). در تامیل نادو هند عامل بیماری قارچ *Botryodiplodia theobromae* معرفی شد (Gangwar *et al.*, 1991). در یک بررسی در قلمستانهای توت در هند که توسط فیلیپ و همکاران (Philip *et al*.,1997) انجام گرفت بیشترین خسارت بالغ بر ۴۴٪ توسط قارچ *Botryodiplodia theobromae* تشخیص داده شد. چنانچه قارچهای *Fusarium solani* و *Phoma sorghina* با خاک مخلوط می‌شدند خسارت به ۵۱/۴٪ تا ۶۱/۴٪ بالغ می شد.*Botryodiplodia theobromae* برگ قلمه را به میزان ۵۰٪-۶۰٪ آلوده می‌کند و سبب die-back می‌شود. در شمال هند عامل پوسیدگی ریشه توت *Fusarium solani* شناسایی شد (Philip *et al*., 1997). اولین شناسایی عوامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت در استان گیلان در سال ۷۶-۷۸ انجام شد که قارچهای عامل بیماری را *Fusarium solani*، *Fusarium oxysporum* و *Botryodiplodia theobromae* تشخیص دادند (مرآت و همکاران۱۳۸۳). برای برخی جدایه های پسودوموناس فعالیت آنتاگونیستی بر اساس تولید آنتی بیوتیک است در حالی که برای دیگر پسودوموناس ها مانند *P.putida* جدایه WCS358 فعالیت آنتاگونیستی بر اساس رقابت برای عنصر آهن می‌باشد (Vidhysaekaran *et al*., 1999). آزاد دیسفانی و همکاران (۱۳۷۹) اثر آنتاگونیستی برخی جدایه‌های *P.fluorescens* و *Bacillus* sp. روی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پنبه *Verticillium dahliae* بررسی کردند و بیان داشتند که این جدایه‌ها با تولید ترکیبات گازی و آنتی بیوتیک قادرند که از رشد ریسه‌ای قارچ عامل بیماری ممانعت نمایند. نیک‌نژاد کاظم‌پور و همکاران (۱۳۸۱) تاثیر چند قارچکش و قارچهای آنتاگونیست را علیه سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که قارچهای آنتاگونیست و قارچکش بنومیل در شرایط گلخانه قادرند بترتیب به میزان ۲۷/۵ و ۳۲/۵ درصد میزان بیماری را کاهش دهند. در این تحقیق میزان تاثیر و نحوه عملکرد تعدادی از جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از منطقه ریزوسفر درختان آلوده توت به عوامل بیماریزای طوقه و ریشه توت جهت کنترل عامل بیماری پرداخته شده است.

روش بررسی

۱-تهیه قارچهای عامل بیماری

بدین منظور جدایه های قارچهای عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت از بخش تحقیقات شرکت ابریشم تهیه گردید و جهت حفظ خصوصیات بیماریزایی آن در مخلوط پوسته و دانه برنج (Mew & Rosales ,1986) کشت و نگهداری گردید.

۲- جداسازی باکتریهای آنتاگونیست

نمونه‌های خاک از منطقه ریزوسفر درختان توت آلوده از مناطق مختلف شرق استان گیلان جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد، نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از ۱۰ گیاه را با یکدیگر مخلوط کرده و از هر نمونه خاک مخلوط شده یک گرم برداشته شد و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون رقت‌های مختلف به طور سریال تهیه گردید. یک‌صد میکرو لیتر از هر رقت تهیه شده را در محیط کشت آگار مغذی (NA) کشت گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. کلنی‌هائی که از نظر شکل و رنگ در محیط آگار مغذی متفاوت بودند انتخاب و در درون لوله، خالص سازی گردیدند.

Archive of SID

www.SID.ir

۳- بررسی ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای در چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA+NA به فواصل مساوی از مرکز، مایه‌کوبی شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس یک حلقه پنج میلیمتری از حاشیه کشت تازه قارچ در مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شدند. در تشتک پتری شاهد، آب مقطر سترون در چهار طرف تشتک پتری مایه‌کوبی شد و در مرکز محیط کشت قارچ قرار داده شد. تشتکهای پتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از اینکه حاشیه پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد به دیواره تشتک پتری برخورد نموده بود، فواصل بازدارندگی بین حاشیه پرگنه جدایه‌های باکتریایی و قارچ اندازه‌گیری گردید.

۴- ویژگیهای آنتی بیوزیز عوامل بیوکنترل باکتریایی

۴-۱) تولید مواد فرار ضد قارچی

بدین منظور مطابق روش فیدامن و روزال (Fiddaman & Rossal, 1993) جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی محیط کشت NA و همزمان جدایه قارچ عامل بیماری روی محیط عصاره سیب زمینی و قند (PDA) کشت شدند. سپس تشتک حاوی قارچ عامل بیماری به صورت وارونه روی تشتک حاوی باکتری قرار داده شد و اطراف تشتک ها با پارافیلم کاملا مسدود شدند. تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در تشتک پتری شاهد، حلقه‌هایی به قطر پنج میلیمتر از محیط کشت عصاره سیب زمینی و قند حاوی قارچهای عامل بیماری در مقابل تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت NA و فاقد جدایه‌های آنتاگونیست قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. قطر رشد ریسه‌ها اندازه‌گیری و سپس با روش مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. درصد بازداری از رشد ریسه‌ای قارچهای عامل بیماری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

درصد بازداری از رشد = (قطر رشد پرگنه تیمار − قطر رشد پرگنه شاهد) / قطر رشد پرگنه شاهد)×۱۰۰

۴-۲) تولید سیدروفور

این بررسی مطابق روش ویلر و کوک (Weller & Cook, 1983) انجام شد. جدایه پسودوموناس فلورسانت روی محیط کشت King's B حاوی غلظتهای ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلریدآهن کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت دردمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون اسپور قارچ *Geotrichum candidum* از یک کشت ۴۸ ساعته روی محیط کشت مایع (PDB) با فرمول ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، در یک لیتر آب مقطر تهیه گردید و بر سطح تشتک پتری حاوی جدایه آنتاگونیست افشانه شد. عدم رشد قارچ در اطراف باکتری، نشان دهنده تولید سیدروفور می‌باشد.

۴-۳) تولید آنتی بیوتیک

این آزمون مطابق روش کراس و لوپر (Kraus & Loper, 1990) انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری و آب مقطر سترون به عنوان شاهد به محیط کشت PDA اضافه و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.پس از این مدت با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، جدایه‌ها از سطح محیط کشت شسته و تشتکهای پتری بطور وارونه به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس یک حلقه به قطر پنج میلیمتر از حاشیه کشت تازه قارچها ، در مرکز هر تشتک پتری کشت داده شد. تشتکهای پتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری و قطر رشد ریسه ها پس از ۷ روز اندازه گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا

Archive of SID

www.SID.ir

تصادفی شامل ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد و داده‌های بدست آمده از آزمایش (قطر رشد ریسه) مورد تجزیه و تحلیل آماری به وسیله مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS قرار گرفتند.

۴-۴) ترشحات خارج سلولی

مطابق با روش سینگ و دورال (Singh & Deverall, 1994) انجام شد. در بخش نخست، محیط کشت مایع (PDB) تهیه گردید. درون فلاسکهای با گنجایش ۲۵۰ میلی‌لیتر، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط مایع فوق را ریخته و در شرایط اتوکلاو، سترون شدند. پس از خنک شدن محیط مایع، به هر یک از فلاسکها یک لوپ کامل از کشت ۲۴ ساعته باکتری اضافه شد. فلاسکها حاوی باکتری روی شیکر دورانی با ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته قرار داده شدند و پس از عبور دادن محیط کشت مایع جدایه ها از کاغذ صافی واتمن شماره یک و سانتریفوژ آنها در ۵۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه، هریک از جدایه‌ها بطور جداگانه توسط صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی صاف گردید و عصاره حاصل از هریک از جدایه‌های مذکور در آزمون بازدارندگی از رشد ریسه‌ای قارچها بکار برده شد. جهت بررسی تأثیر عصاره حاصله، ابتدا محیط کشت PDA به حجم‌های ۱۹، ۱۷ و ۱۵ میلی‌لیتر درون لوله ریخته شد و پس از سترون شدن در شرایط اتوکلاو به ترتیب ۱ میلی‌لیتر (غلظت ۵ درصد حجم به حجم)، ۳ میلی‌لیتر (غلظت ۱۵ درصد حجم به حجم) و ۵ میلی‌لیتر(غلظت ۲۵ درصد حجم به حجم) از عصاره هر یک از آنتاگونیست‌ها به لوله‌های PDA با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد اضافه و به خوبی مخلوط و در شرایط سترون به تشتکهای پتری سترون، منتقل گردیدند. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع فوق بدون باکتری که از صافی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شده بود، استفاده گردید. پس از انعقاد محیط کشت، در مرکز هر تشتک پتری یک حلقه به قطر پنج میلیمتر از حاشیه کشت تازه قارچ، کشت داده شدند. اندازه گیری قطر ریسه هر روز و به مدت ۷ روز پس از کشت قارچ انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل با ۲ عامل و با متن کاملا تصادفی به اجرا درآمد. عامل اول جدایه آنتاگونیست در ۵ سطح و عامل دوم غلظت در ۳ سطح بود. برای هریک از غلظت ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. قطر رشد ریسه در هر غلظت مورد تجزیه و تحلیل آماری به وسیله مدل خطی عمومی در برنامه رایانه ای SAS قرار گرفتند.

۵- آزمونهای افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های منتخب براساس خصوصیات مهم مورفولوژیکی و بیوشیمیائی مورد شناسائی قرار گرفتند. این آزمایشات شامل واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسانت، تولید لوان، آزمون های لهیدگی سیب‌زمینی، آرژنین دی‌هیدرولیز، احیاء نیترات، دهیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته،MR/VP، آزمون فوق حساسیت، استفاده از برخی منابع کربنی و سدیم استات انجام گرفت (Fahy & Persley, 1993 & Schaad, 1988).

نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که از ۱۰۰ جدایه باکتریائی مورد بررسی ۱۶ جدایه روی قارچ *Lasiodiplodia theobromae* ۱۲، جدایه روی قارچ *Fusarium solani* و ۷ جدایه روی قارچ *F. oxysporum* دارای اثر بازدارندگی بودند. از این تعداد تنها ۵ جدایه باکتری دارای توانایی ایجاد هاله بازدارندگی به میزان ۱ تا ۵ میلی متر روی هر سه قارچ عامل بیماری بودند.جدایه H-4 گرم منفی و جدایه‌های H-1 ، H-16 ، H-24 و H-25 گرم مثبت بودند. شرایط رشد جدایه های H-1 ، H-16 ، H-24 و H-25 هوازی و جدایه H-4 غیر هوازی بودند. تنها جدایه H-4 روی محیط کشت King's B دارای رنگدانه فلورسنت بود. چهار جدایه H-1 ، H-16 ، H-24 و H-25 دارای اسپور بودند. براساس آزمونهای انجام شده جدایه‌های H-1 ، H-16 ، H-24 و H-25 در جنس *Bacillus* و جدایه H-4 در گروه پسودوموناس فلورسنت قرار داده شدند. براساس آزمونهای تفکیکی(بیوشیمیایی و فیزیولوژیک)

Archive of SID

www.SID.ir

دو باکتری در سطح گونه *B.megaterium* H-16 ، *B.coagulans* H-24 و دوباسیلوس دیگر در همان سطح نامگذاری شدند (جدول۱). در آزمایشات مربوط به تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه های باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریسه ای قارچ *L. theobromae* روی محیط کشت NA مشخص گردید که کلیه جدایه ها در سطح ٪۵ تفاوت معنی داری با شاهد دارند. جدایه *B.megaterium* H-16 با ٪۲۵/۱۸ و جدایه‌های H-1، *B.coagulans* H-24 و H-25 به ترتیب با ٪۷۰/۰۰، ٪۷۴/۴۴ و ٪۷۶/۶۶ کمترین و بیشترین تاثیر را در بازداری رشد ریسه ای قارچ *L. theobromae* از خود نشان دادند. در ارزیابی آزمون فوق روی قارچ *Fusarium solani* مشخص گردید که جدایه های *B.coagulans* H-24 و H-25 فاقد تاثیر بازداری می باشند اما سه جدایه *B.megaterium* H-16 ، H-1 و H-4 به ترتیب با ۲۵/۰۰، ۳۳/۰۵ و ۵۱/۲۵ درصد بازداری موجب محدودیت رشد ریسه ای قارچ *F. solani* شدند.در آزمون تاثیر ترکیبات فرار روی قارچ *F.oxysporum* مشاهده شد که جدایه های *B.coagulans* H-24 و H-25 هیچگونه بازداری از رشد ریسه ای قارچ *F. oxysporum* از خود نشان ندادند و سه جدایه H-4، H-1 و H-16 *B.megaterium* به ترتیب با ٪۳۶/۱۱، ٪۴۱/۱۱ و ٪۴۷/۳۵ باعث بازداری رشد ریسه ای قارچ *F.oxysporum* شدند (شکل ۱). ترشحات خارج سلولی جدایه های آنتاگونیست در غلظت های مختلف ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد سبب بازداری از رشد رویشی قارچ های عامل بیماری گردید. با افزایش غلظت ترشحات خارج سلولی اغلب افزایش بازداری از رشد ریسه ای قارچ های عامل بیماری مشاهده شد. مقایسه میانگین ها نشان داد که تفاوت میان غلظت های مختلف و همچنین میان جدایه های آنتاگونیست معنی دار بوده و اثرات متقابل آنها نیز معنی دار گردید. در این آزمایش جدایه *B.megaterium* H-16 در غلظت ٪۲۵ بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *L. theobromae* از خود نشان داد (جدول۳) و جدایه *B.coagulans* H-24 در غلظت ٪۲۵ بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *F. solani* داشت (جدول ۴) و جدایه های *B.megaterium* H-16 و H-1 در غلظت ٪۲۵ بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *F. oxysporum* از خود نشان دادند (شکل ۲).نتایج تجزیه واریانس تاثیر آنتی بیوتیک استرین های آنتاگونیست روی رشد ریسه ای قارچ *L. theobromae* نشان داد که تیمارها در سطح ٪۵ با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند ولی با شاهد در سطح ٪۵ دارای تفاوت معنی دار بودند. نتایج حاصل از تاثیر آنتی بیوتیک تولید شده جدایه های باکتری های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ *F. solani* نشان داد که هر ۵ جدایه قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند. این جدایه ها تفاوت معنی داری در سطح ٪۵ با شاهد داشتند. بر اساس مقایسه میانگین ها جدایه های H-1 و H-25 با ٪۹۱/۰۲ بازداری دارای بیشترین تاثیر بودند. جدایه H-4 با ٪۶۷/۹۵ کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد ریسه ای قارچ *F. solani* داشت. نتایج حاصل از تاثیر آنتی بیوتیک تولید شده جدایه های باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریسه ای قارچ *F.oxysporum* نشان داد که هر ۵ جدایه قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند. این جدایه ها در سطح ٪۵ با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. براساس مقایسه میانگین‌ها جدایه‌های H-1، *B.megaterium* H-16 و H-25 به ترتیب با ۹۰/۷۳، ۸۹/۰۹ و ۸۹/۰۹ درصد بیشترین تاثیر را در بازداری از رشد ریسه ای قارچ *F. oxysporum* داشتند. جدایه های H-4 و H-24 *B.coagulans* در سطح پایین تری نسبت به سه جدایه دیگر قرار گرفتند. از بین تمام جدایه ها جدایه H-4 در غلظت ۵ میکرومول کلرید آهن از رشد ریسه ای قارچ *G. candidum* در محیط King's B جلوگیری کرد.

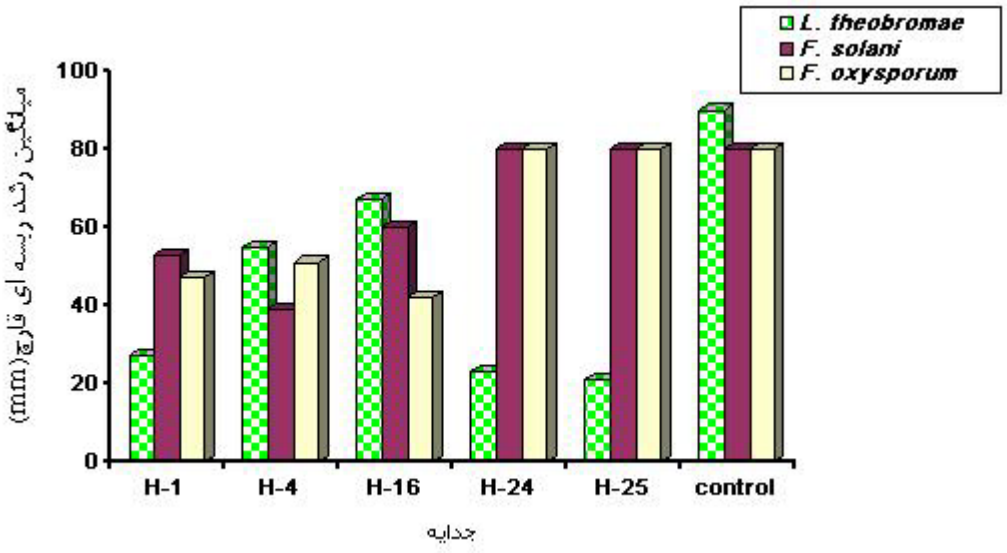
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴ : خصوصیات افتراقی باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از ریزوسفر درختان توت

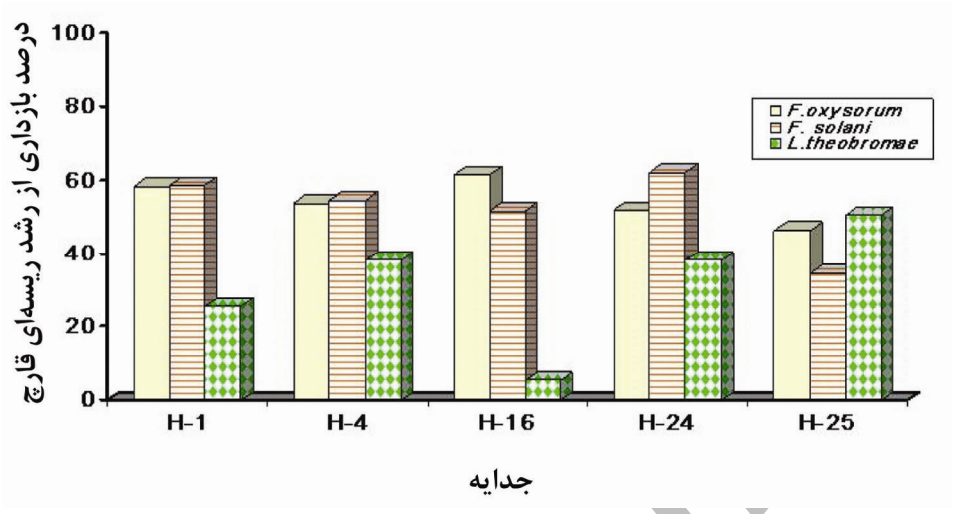
خصوصیات	واکنش جدایه های آنتاگونیست				
جدایه	H-1	H-4	H-16	H-24	H-25
رنگ آمیزی	+	-	+	+	+
رشد هوازی در محیط کشتO/F	+	-	+	+	+
تولید رنگدا نه فلورسانت	-	+	-	-	-
فوق حساسیت	-	-	-	-	-
تولید اسپور	+	-	+	+	+
لهانیدن سیب زمینی	-	+	-	-	-
دهیدرولیز آرژنین	+	+	+	+	+
تولید لوان	-	-	-	-	-
احیاء نیتروژن	+	-	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	-	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	-	+	+	+
استفاده از سیترات	-	+	+	-	-
زایلوز	-	+	-	-	-
آرابینوز	-	+	-	-	+
مانیتول	-	-	-	-	-
آزمون VP	-	-	-	-	-

of SID

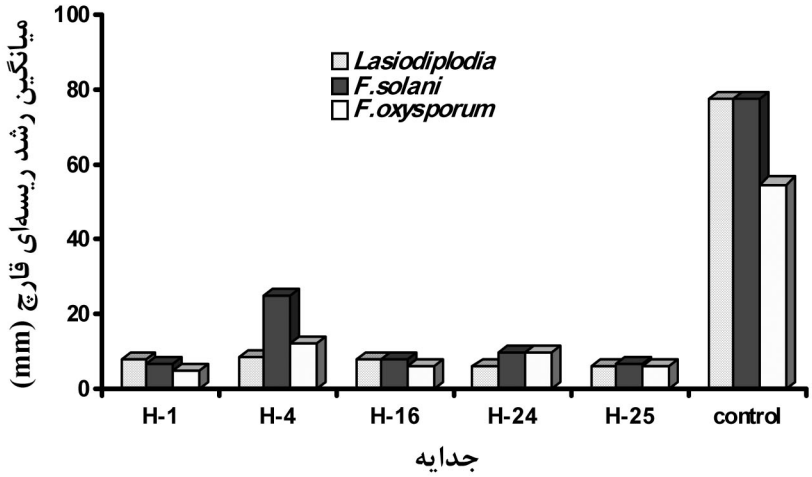


شکل ۱: مقایسه تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریسه ای قارچ های مولد پوسیدگی طوقه و ریشه توت

www.SID.ir



شکل ۲: مقایسه تاثیر ترشحات خارج سلولی باکتری‌های آنتاگونیست در غلظت ٪۲۵ روی قارچ های مولد پوسیدگی طوقه و ریشه توت



شکل ۳: مقایسه تاثیر آنتی بیوتیک جدایه های باکتری‌های آنتاگونیست روی قارچ های مولد پوسیدگی طوقه و ریشه توت (٪۵) .

بحث

عوامل بیوکنترل باکتریایی با تولید متابولیت های خارج سلولی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها (فنازین‌ها، پیرول‌ها، باکتریوسین‌ها) سیدروفورها و مکانیزم‌هایی مانند کلنیزه کردن ریشه، ایجاد مقاومت القایی و تحریک رشد گیاهی در کاهش بیماری‌های گیاهی نقش دارند. اهمیت نسبی هر یک از این مکانیزم‌ها بر اساس شرایط ریزوسفر و همچنین در میان استرین‌ها تا حد زیادی متفاوت است (Weller, 1988). آنتی بیوتیک ها اغلب یک نقش اساسی را در کاهش بیماری توسط برخی باکتری‌ها ایفا می‌کند (Fravel, 1988). نتایج حاصل از بررسی اثرات آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل باکتریایی جداسازی شده از باغات توت استان گیلان نشان داد که آنها از قدرت تولید آنتی بیوزیز بالایی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار هستند. ۵ استرین باکتری آنتاگونیست قادر به

www.SID.ir

ایجاد هاله بازدارندگی بر روی هر سه قارچ عامل بیماری به میزان ۱ تا ۵ میلی متر در محیط کشت NA+PDA بودند. تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست روی رشد ریسه‌ای قارچ‌های عامل بیماری مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که سه جدایه H-4، H-1 و H-16 روی محیط کشت NA تولید ترکیبات فرار ضد قارچی می‌کنند که در کنترل سه قارچ عامل بیماری موثر می‌باشد و دو جدایه دیگر (H-25&H-24) فقط روی قارچ *L. theobromae* تأثیر داشتند. تولید مواد فرار ضد قارچی نیز یکی از مکانیزم های بیوکنترل عوامل باکتریایی محسوب شده که می تواند سرعت رشد میسلیومی و فعالیت آنزیمی را تحت تاثیر قرار دهد. پاسخ میزبان به ترکیبات فرار باکتریایی همزمان به گونه، محیط، سن رشدی میزبان و عوامل بیوکنترل بستگی دارد (Fiddaman & Rosall, 1994). استرین‌ها آنتاگونیست دارای قدرت تولید آنتی بیوتیک در محیط NA بوده که از رشد رویشی قارچ‌های عامل بیماری جلوگیری نمود. در بررسی‌های آزمایشگاهی آنتی بیوتیک تولید شده توسط جدایه‌های باکتری، کنترل بسیار خوبی در جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ‌های عامل بیماری داشت. در آزمون تولید سیدروفور تنها یکی از باکتری‌ها که پسودوموناس فلورسانت بود توانست از رشد ریسه‌ای قارچ *G. candidum* در غلظت ۵ میکرومول کلرید آهن سه ظرفیتی در محیط King's B جلوگیری نماید. طبق گزارشات، بیشتر جدایه پسود و موناسهای فلورسنس قادرند از رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها در محیط با آهن کم جلوگیری نمایند و سیدروفورهای خالص شده نیز اثرات مشابهی دارند (Geels & Schippers, 1983 & Bakkar *et al*., 1991). در بررسی تاثیر ترشحات خارج سلولی باکتری‌های انتخابی برروی رشد ریسه‌ای قارچ‌های عامل بیماری اغلب با افزایش غلظت مایع خارج سلولی، افزایش میزان بازداری از رشد رویشی مشاهده گردید. البته در بعضی از جدایه‌ها با افزایش غلظت از ۵ به ۱۵ درصد هیچگونه تاثیر معنی‌داری روی قارچ نداشتند. با توجه به نتیجه حاصله از بررسی‌های آزمایشگاهی که نشان دهنده قدرت بالای تولید آنتی بیوزیز اکثر جدایه‌های آنتاگونیست می‌باشد، تلاش برای کاربرد مستقیم یا مواد مستخرج از جدایه‌های آنتاگونیست جهت کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت در آزمایشات صحرایی توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری:

نگارندگان لازم میدانند از خانم مهندس مرآت بخاطر اهداء قارچهای عامل بیماری، آقای دکتر سید اکبر خداپرست بخاطر شناسایی مجدد قارچهای عامل بیماری، آقای مهندس مازیار کامران و آقای مهندس شهاب حاج منصور بخاطر همکاری در آزمایشات عمیقا قدردانی نمایند .

منابع و مآخذ:

۱. آزاد دیسفانی،ف.ع.شریفی تهرانی،ق.حجارود و م. محمدی و ح. روحانی. ۱۳۷۹. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus, Pseudomonas* روی قارچ *V.dahlia* عامل پژمردگی پنبه، چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران صفحه ۵۷.

۲. کریمی، جوانشیر. ۱۳۷۴. توت برای ابریشم و ابریشم‌های بدون توت. انتشارات دانشگاه تهران. ص ۲۲۶۵.

۳. نیک‌نژاد کاظم پور،م. پدرام فر،ح. و الهی نیا، س. ع. ۱۳۸۱. بررسی اثر چند قارچکش و قارچ آنتاگونیست علیه عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در اثر *Rhizoctonia solani* kuhn. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ششم. شماره چهارم. صفحه ۱۵۷-۱۵۱.

Archive of SID

www.SID.ir

۴. مرآت،ا.میرحسینی مقدم،س.ع.روحانی،ح.۱۳۸۳.معرفی قارچ های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان توت در استان گـیلان، شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.صفحه ۴۳۷.

5. Aoki, K.(1971).On the root rot of mulberry in Thailand.Bull.Thai Seri.Cent.,1:13-17
6. Aoki, T.& Matsu, O.(1959).Studies on root rot of the mulberry trees caused by *Helicobasidium mompa* & *Rosellinia necatrix*.J.Seric.Japan,28:120-129
7. Bakker, P.A.H.M., Van Peer, R., Schippers, B .(1991). Suppression of soil_borne plantpathogens by flourescent pseudomonads:Mechanisms and prospects. In Biotic intraction and soil borne diseases. Elsevier sciences publisher 1991 USA. pp.217-230.
8. Duke, J. A. (1983). Handbookof Energy Crops. http://www.hort. purdue.edu/ newcrop/ duke_energy /panicum-maximum.htpl
9. Fahy, P. C. and Persley, G.J.(1983).Plant Bacterial Diseases, a diagnostic guide. Academic Press. Academic Press, Sydney, Australia.
10. Fiddaman, P.J. and Rossall, K. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis* J. Appl. Bacteriol. 76:395-405.
11. Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26:75-91.
12. Gangwar, S. K. and Thangavelu, K. (1991). Occurrence of mulberry diseases in Tamil Nadu. Indian-Phytopathology. 44:4,545-549.
13. 13. Geels, F. P., and Schippers, B. (1983). Selection of antagonistic flourescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Phytopathol. Z., 108, 193-206.
14. Gupta,V.P., Tewan,S.K., Govindaioh and Bajpai, A.K. (1999). Ultrastructure of mycoparasitism of *Trichoderma, Gliocladium,* and *Laetisaria* species on *Botriodiplodia theobromae*.Journal-of-phytopathology. 147: 1,19-24.
15. Kakuliya, M.A.& Gogeliya, I.F.(1970).A study of the resistance to root rot of ungrafted material from different mulberry varieties. Trudy Gruzinskogo Sel'sko Khozyaistvennogo institua,76-77:271-282.
16. Kraus, J. and Loper, J.E.(1990).Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mecanistic Studies pp. 177-175. In: Keel, C. Koller, B. and Defago, G. (eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, InerlaKen, Switzerland.
17. Luke P.B.,Sathiyap.(1982) Current Science., 51, 427
18. Mew, T.W. and Rosales ,A.M.(1986).Bacterization of rice plants for the control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*.Phytopathology 76:1260-1264.
19. Philip, T., Govindaiah, Bajpai, A.K., Nagabhushanam, G. and Naidu, N.R.(1997).A preliminary survey on mulberry disease in south India.Indian-Journal-of-Sericulture, 36:2,128-132
20. Philip, T., Gupta, V.P., Govindaiah, Bajpai, A.k. and Datta, R.K.(1995). Disease of mulberry in India-Research priorities and management strategies. Intenational-Journal-of-Tropical-Plant-Disease.12: 1-21.
21. Philip, T., Sharma, D.D. & Govindaiah(2001).Interaction between some biocontrol agents and mulberry rot rot pathogen *Fusarium solani and F. oxysporum*.Sericologia 41: 569-576.
22. Schaad, N. W. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (2 nd ed.). A.P. St. Paul. Minnesota. U.S.A. 164 pp.
23. Shree, M.P. and Nataraja, S.(1993).Post-infectional biochemical and physiological changes in mulberry.Departmant of Sericulture Bangalore University, Bangalore 560 056,India.
24. Sing, V. and Deverall, B.J.(1984).*Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruits.Trans.Br.Mycol.Soc.83:487-490.
25. Teotia, R.S. and Sen, S.K.(1994) .Mulberry disease in india and their control.Sericologia 34: 1-18
26. Vidhyseakaran,P.,and M.Muthamilan.1999.Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. Biocontrol Science and Technology. 8:67-74
27. Weller, D.M. and Cook, R.J.(1983).Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73: 463-469.

Archive of SID

www.SID.ir

JOURNAL OF
AGRICULTURAL
SCIENCES
Islamic Azad University

The Study of Bacterial Antagonistic Effect Decay Agents of Crown and Root of Mulberry Trees in Guilan Province.

H. Rahanandeh
Lecture Departmant of Plant pathology,Arak, Islamic Azad University
M. Niknejad Kazempour
Assistant Professor,Department of Plant pathology,Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University
N. Hasanzadeh
Assistant Professor Departmant of Plant pathology, Science and Reseach, Islamic Azad University (Tehran-Iran)

Keywords: siderophore, mulberry, *Fusarium solani, F. oxysporum, Lassiodiplodia theobromae, Geotrichum candidum*

Abstract

In this study antaginistic effects of some bacteria isolated from mulberry tress were assessed against *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Lasiodiplodia theobromae* under laboratory condition. Five bacterial isolates were able to suppress the fungal growth at the rate of 1-5 mm on PDA. Four of the bacterial strains (H1, H16, H24, H25) were identified as *Bacillus* spp. and the strain H4 was assigned as *Pseudomonas fluorescence*. The volatile metabolites released from antagonistic bacteria could inhibit the growth of fungi *Fusarium solani, Fusarium oxysporum, Lasiodiplodia theobromae* at the rate of 25 to 35, 36.11 to 47.35, 25.18 to76.66 percent, respectively. H4 strain produced sidrophore on King B medium which contained 5, 50, 100 µmol $Fecl_3$ which inhibited the mycelial growth of the *Geotrichum candidum*. The extracellular extracts of selected antagonists reduced the vegetative growth of pathogenic fungi by increasing the extracts concentration. In addition antagonistic bacteria could produce antibiotic substances which led to stop the fungal growth.

Archive of SID

www.SID.ir