آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۷، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۸

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت رایزوسفر سیب‌زمینی و ارزیابی توان آنتاگونیستی آن‌ها در کنترل *Pectobacterium carotovorum* در شرایط مزرعه

Identification of fluorescent pseudomonads isolated from potato Rhizospher and assessment of their antagonistic activity towards *Pectobacterium carotovorum* under field condition

غلام خداکرمیان* و دوستمراد ظفری
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
(تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۶، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۸)

چکیده

از خاک اطراف ریشه و غده‌های سیب‌زمینی مناطق همدان، دماوند و قصرشیرین نمونه‌برداری شد. از این نمونه‌ها روی محیط کشت pseudomonas agar F، ۹۶ استرین باکتری جنس سودوموناس فلورسنت کننده جدا شد. بر اساس فعالیت آنتاگونیستی استرین‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده روی محیط کشت فوق علیه *Pectobacterium carotovorum* عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی، تعداد ۴۰ استرین نماینده گروه‌های عمده آنتاگونیستی انتخاب و ویژگی‌های فنوتیپی آن‌ها تعیین شد. نتایج بررسی‌های فنوتیپی نشان داد که استرین‌های نماینده به سه گونه *Pseudomonas aeruginosa*، *P. putida* و بیووارهای دو، سه و پنج *P. fluorescens* وابسته هستند. ارزیابی توانایی بیوکنترل تعداد ۲۰ نماینده از استرین‌ها علیه *Pectobacterium carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه نشان داد که عمده این استرین‌ها قادر به بازدارندگی از رشد باکتری یاد شده بوده و در سطح

* **Corresponding author:** Khodakaramian@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار هستند. بر اساس بررسی‌های آزمایشگاهی شش استرین نماینده انتخاب شد. از این استرین‌ها در آب مقطر سوسپانسیون تهیه و جذب نوری آن‌ها به ۰/۱ رسانده شد. سپس سوسپانسیون باکتری‌ها به ترتیب هزار (غلظت I) و ده هزار بار (غلظت II) رقیق شد. غده‌های سیب‌زمینی توسط سوسپانسیون‌های تهیه شده آغشته و در خاک آلوده به باکتری *P. carotovorum* در شرایط مزرعه کاشته شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد که استرین‌های مورد بررسی از نظر توانایی کنترل باکتری *P. carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی سیب‌زمینی دارای تفاوت معنی‌دار بوده و توانستند میزان بیماری را بین ۲/۵ تا ۳۸/۷۵ درصد کاهش دهند. بین دو غلظت به کار رفته استرین‌های باکتری‌های آنتاگونیست از نظر میزان بازداری از بیماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas fluorescens*، *P. putida*، *P. aeruginosa*، پوسیدگی نرم سیب زمینی، کنترل بیولوژیک، *Pectobacterium carotovorum*.

Abstract

Potato rhizospher soil and tubers were collected from Hamadan, Damavand and Qasere-Shrin areas. A total of 96 Fluorescent Pseudomonads strains from collected soil and tuber samples were isolated on pseudomonas agar F medium. Based on the antagonistic activity of the fleuoresent pseudomonads strains against *Pectobacterium carotovoru* invitro, 40 representatives were selected and their phenotypic features were characterized. Phenotypic feature characterizations resulted three species including *Pseudomonas aeruginosa*, *P. Putida* and *P. fluorescens* (bv. II, III & IV). Antagonistic activity assessment of 20 representatives' strains of the above species towards *Pectobacterium carotovorum* the causal agent of potato rot disease invitro indicated that they could inhibit growth of pathogen and siginificant differences among the appllied strains were observed. Based on the results of invitro experiments six strains were selected. Bacterial suspention from these strains with OD (optical density) 0.1 in 600_{nm} were made in distilled water. The bacterial suspention were diluted 1000 (concentration I) and 10000 (concentration II) times respectively. Potato tubers were sprayed with bacterial suspension and they were put in soil infested with *P. carotovorum.* Randomized block design in three replicate were used for this experiment.

Archive of SID

www.SID.ir

Tested strains showed biocontrol activity towards *P. carotovorum* and significant differences were observed among their efficacy were observed. They reduced the potato rot disease caused by *P. carotovorum* between 2.5 to 38.75 %. No significant differences were observed between the two applied concentrations of the antagonistic bacterial suspensions.

Key words: potato rot, biological control, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida*.

مقدمه

گیاه سیب‌زمینی پس از چغندرقند دارای بیشترین مقدار انرژی و عملکرد ماده خشک در واحد سطح است. از نظر میزان انرژی و ارزش غذایی نیز چهارمین محصول بوده و دارای تولید بسیار بالایی است (Lisinka & Leszczyski, 1989). در ایران استان‌های اردبیل، اصفهان، همدان، فارس، آذربایجان‌شرقی و خراسان از مهم‌ترین مناطق کشت این محصول می‌باشند (Anonymous, 1999). از جمله عوامل بیماری‌زایی که باعث ایجاد خسارت در سیب‌زمینی می‌شوند باکتری‌ها هستند. این باکتری‌ها وابسته به جنس‌ها و گونه‌های گوناگونی بوده که بیماری‌های مختلفی از جمله پژمردگی باکتریایی، پوسیدگی نرم، ساق سیاه باکتریایی و جرب معمولی را به وجود می‌آورند. بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی که توسط *Pectobacterium carotovorum* ایجاد می‌شود می‌تواند در مزرعه و انبار به این محصول خسارت وارد کند (Perombelon & Kelman 1980; Xu & Gross, 1986). این گونه دارای دامنه میزبانی نسبتاً وسیعی بوده و چون خاکزاد است، جمعیت آن در خاک‌های آلوده زیاد بوده و حتی در روی غده‌های بدون علایم بیماری، جمعیت قابل توجهی از پاتوژن وجود دارد. این باکتری سطح ریشه‌های سیب‌زمینی را کلنیزه کرده و تحت شرایط مساعد محیطی برای ایجاد بیماری شامل آبیاری فراوان و دمای نسبتاً بالا خسارت فراوانی را وارد می‌کند (Berg *et al*., 2005; Xu & Gross, 1986).

خسارت سالیانه باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم در سال ۱۹۸۰ در سطح جهان 10^8 دلار و میزان خسارت ناخالص آن در سال ۱۹۷٦ در ایالات متحده آمریکا ١٤ میلیون دلار بوده است (Kennedy & Alcorn, 1980; Permbelon & Kelman, 1980). بارزترین ویژگی باکتری‌های مولد

Archive of SID

www.SID.ir

پوسیدگی نرم ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی است. این گروه از باکتری‌ها نیز مانند سایر باکتری‌های پاتوژن گیاهی از راه روزنه‌های طبیعی و زخم‌های ایجاد شده توسط عوامل مختلف وارد میزبان می‌شوند. نکته قابل توجه آن است که حتی اگر جمعیت آن‌ها بالا باشد برای ایجاد بیماری وجود شرایط محیطی ویژه از جمله رطوبت بالا و دمای مناسب الزامی است. غده‌های بذری آلوده، خاک و آب آبیاری منبع اینوکولوم باکتری‌ها مولد پوسیدگی نرم هستند (Abdolghafar & Abdolsayed, 1997; Grandar & Tanner, 1976; Xu & Gross, 1986). بررسی‌هایی در زمینه پراکندگی این باکتری در روی سیب‌زمینی در استان‌های همدان، مازندران، آذربایجان، خراسان و اصفهان توسط احمدوند و فریدونی و در استان فارس توسط ظهورپرالک انجام گرفته است (Ahmadvand, 2000; Feraydoni, 1993; Zohour-e-Peralak, 1988). محققین یاد شده گونه‌های *P. carotovorum* و *P. atrosepticum* را از روی این گیاه گزارش کردند. بررسی‌های انجام شده در استان همدان نشان داده است که به دلیل کشت وسیع و پیاپی سیب‌زمینی و همچنین عدم کشت غده‌های بذری سالم و گواهی شده، بیماری‌های ساق سیاه و پوسیدگی نرم شیوع یافته و در بسیاری از موارد خسارت‌های فراوانی به این محصول وارد نموده است.

در سال زراعی ۷۷-۷۶ در ایستگاه تحقیقاتی تجرک، به دلیل آلودگی سیب‌زمینی به این بیماری‌ها بیش از ٤۰۰ تن سیب‌زمینی معدوم شده است. با توجه به اینکه ایستگاه تحقیقاتی تجرک یکی از مراکز عمده تولید سیب‌زمینی بذری در کشور است، آلودگی ناشی از این باکتری‌ها می‌تواند به سایر نقاط کشور انتقال یافته و در نتیجه خسارت‌های زیادی وارد کند (Ahmadvand, 2000). چون خاک یک منبع مهم آلودگی باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی است لذا کاشت غده‌های بذری عاری از پاتوژن در خاک‌های آلوده برای کنترل بیماری موفقیت آمیز نبوده است (Abdolghafar & Abdolsayed, 1997; Grandar & Tanner, 1976; Xu & Gross, 1986). کنترل شیمیایی بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی نیز به دلیل هزینه بالا و مشکلات زیست محیطی استفاده محدودی دارد. یکی از چشم‌اندازهای روشن کنترل بیماری، یافتن استرین یا استرین‌هایی از سودوموناس‌های فلورسنت یا سایر باکتری‌ها و قارچ‌ها است که بتوانند با کلنیزه کردن سطح ریشه‌ها و غده‌ها و از راه ترشح مواد بازدارنده باکتری‌های مولد

Archive of SID

www.SID.ir

پوسیدگی نرم و یا القاء مقاومت به گیاهان آن‌ها را تا حد زیادی از حمله پاتوژن مصون بدارند (Abdolghafar & Abdolsayed, 1997; Xu & Gross, 1986). برخی از این باکتری‌های آنتاگونیست مانند *Bacillus thuringiensis* علیه *P. carotovorum* در کار سیگنال‌های ارسالی از طرف پاتوژن برای میزبان اختلال ایجاد کرده و این سیگنال‌ها را خنثی می‌کنند (Dong *et al*., 2004). استرین‌های *P. fluorescens* با تولید مواد کلاته‌کننده آهن یا سیدروفور، آهن محیط را از دسترس سایر اعضاء میکروفلور خاک خارج می‌کنند. تولید آنتی‌بیوتیک توسط استرین‌های *P. fluorescens* نیز یک فاکتور مهم در جلوگیری از رشد پاتوژن‌های گیاهی است. این باکتری‌ها محیط اطراف ریشه را کلنیزه کرده و با تولید متابولیت‌هایی مانند سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند فنازین-۱-کربوکسیلات، pyoluteorin، DAPG (٤ و ۲- دی‌استیل‌فلورو گلوسینول) ترکیب میکروفلور ریزوسفر را تغییر می‌دهند (Cronion *et al*., 1997; Xu & Gross, 1986). در یک بررسی از ۲۶۴۸ استرین باکتری جدا شده از سیب‌زمینی جمعیت غالب آنتاگونیست علیه بیماری‌های خاکزاد را گونه *P. putida* تشکیل داده است (Berg *et al*., 2005). با توجه به اهمیت سیب‌زمینی در ایران و شیوع بیماری پوسیدگی نرم در مزارع سیب‌زمینی و ناموفق بودن شیوه‌های معمول کنترل به لحاظ هزینه و مشکلات زیست محیطی، بررسی کنترل بیولوژیک این بیماری اهمیت بیشتری می‌یابد. هدف این بررسی نشان دادن پتانسیل استفاده از باکتری‌ها سودوموناس فلورسنت برای کنترل بیماری است.

روش بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و به دست آورن تک‌کلنی از باکتری‌های آنتاگونیست: از نمونه‌های خاک و غده‌های سیب‌زمینی مناطق همدان، دماوند و قصر شیرین به طور تصادفی ٦۰ نمونه خاک و ٦۰ نمونه غده جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شدند. برای جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت از محیط کشت pseudomonas agar F (Merk Co.) استفاده شد. به این محیط کشت به ازای هر لیتر ۵ گرم گلوکز و ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول اضافه و اتوکلاو شد. از هر نمونه خاک ۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد.

Archive of SID

www.SID.ir

پوست غده‌های سیب‌زمینی نیز به وسیله چاقوی ضدعفونی شده با الکل جدا و به ازای هر گرم ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت پنج ساعت روی شیکر گذاشته شدند. از هر نمونه یک لوپ روی محیط فوق مخطط و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گذاشته شد. پس از گذشت سه روز از هر تشتک تک‌کلنی یا تک‌کلنی‌هایی که ویژگی‌های تیپ *Pseudomonas* را داشتند، به طور تصادفی انتخاب و دوباره روی محیط کشت مزبور تا رسیدن به خلوص کامل کشت شدند. در نهایت ۹۶ استرین باکتری خالص و نگهداری شدند.

شناسایی سودوموناس فلورسنت جدا شده از رایزوسفر سیب‌زمینی بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی: بر اساس ارزیابی‌های اولیه از توانایی کنترل بیولوژیک استرین‌های جدا شده سودوموناس‌های فلورسنت روی محیط کشت pseudomonas agar F (Merk Co.) و بر مبنای هاله بازدارندگی از رشد، تعداد ۴۰ استرین نماینده انتخاب شد. ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های نماینده به شرح زیر بررسی شد:

آزمون حساسیت به KOH 3٪ به روش Suslow *et al.* (1982)، آزمون هوازی یا بی‌هوازی بودن (O/F) به روش Hugh & Leifson (1953)، آزمون اکسیداز به روش Kovacs (1956)، آزمون فوق حساسیت در توتون به روش Klement *et al.* (1964)، تولید لوان روی محیط کشت دارای سوکروز ۵٪ و احیای نیترات به روش Lelliot *et al.* (1984)، هیدرولیز آرژنین به روش Thornley (1960)، آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، تحمل نمک طعام پنج درصد، تولید آنزیم‌های پکتیناز، لهانیدن سیب‌زمینی، رشد در دمای ٤ و ٤١ درجه سانتی‌گراد و تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت pseudomonas agar F به روش Schaad *et al.* (2001)، هیدرولیز نشاسته به روش Graham & Hodgkiss (1967) انجام شد. آزمون‌های لستیناز و ذوب ژلاتین به روش Mac Faddin (1980) انجام شد.

برای بررسی تولید قند از کربوهیدرات‌های گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، سوکروز، زایلوز، ترهالوز، آرابینوز، آدونیتول، سوربیتول، مزو- اینوزیتول، آلفا- متیل‌گلوکوزید، اتانول و گلیسرول و استفاده استرین‌ها از اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه شامل، نیکوتینات، سیترات، لاکتات، مالات، تریپتوفان و آرژنین از محیط پایه Ayer *et al.* (1919) استفاده شد. تمامی قندها،

Archive of SID

www.SID.ir

اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی پس از تندال شدن به غلظت نهایی ۰/۲ درصد به محیط Ayer *et al.* (1919) که حاوی ۱/۲٪ آگارز بود اضافه شده و نتیجه آزمون‌ها در موارد ضروری تا یک ماه پس از کشت بررسی شد.

ارزیابی و انتخاب استرین‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده در شرایط آزمایشگاه علیه *P. carotovorum*: جهت تعیین میزان بازدارندگی سودوموناس فلورسنت جدا شده از غده و ریزوسفر سیب زمینی در شرایط آزمایشگاه استرین های باکتری آنتاگونیست به صورت لکه‌ای در پتری‌های حاوی محیط pseudomonas agar F (Merk Co.) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار کشت شد. استرین‌های باکتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس کلنی باکتری‌های آنتاگونیست کشت شده توسط پنبه استریل آغشته به الکل ۹۶٪ از سطح محیط کشت پاک شد. در این قسمت در هر پتری دو قطره کلروفرم اضافه شد و پتری‌ها به صورت وارونه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. سپس در پتری‌ها در شرایط استریل باز و به مدت ۳۰ دقیقه هوادهی شدند. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا در هر پتری توسط میله شیشه‌ای پخش شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. قطرهای هاله بازدارندگی باکتری آنتاگونیست به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و از آن‌ها میانگین گرفته شد. داده‌های به دست آمده در قالب طرح آماری به کار رفته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای انتخاب استرین‌های باکتری جهت به کار بردن در شرایط مزرعه میانگین‌های به دست آمده توسط آزمون دانکن مقایسه شدند و نماینده گروه‌های عمده انتخاب شدند.

ارزیابی استرین‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از غده و ریزوسفر سیب‌زمینی علیه *P. carotovorum* در شرایط مزرعه: بررسی تأثیر استرین‌های سودوموناس فلورسنت در بازدارندگی از بیماری‌زایی *P. carotovorum* در شرایط مزرعه به صورت زیر انجام شد. سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا و آنتاگونیست با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. برای باکتری بیماری‌زا صد هزار بار (معادل حدودCFU ۱۰۰۰۰ در میلی‌لیتر) و برای آنتاگونیست به ترتیب هزار (غلظت I معادل حدود CFU ۱۰۰۰۰۰۰۰)و ده‌هزار بار(غلظت II

Archive of SID

www.SID.ir

معادل حدود CFU ۱۰۰۰۰۰۰)رقیق شد. غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا تهیه شده از مؤسسه نهال و بذر شهرستان کرج با اندازه‌های نسبتاً یکنواخت برش داده شدند. غده‌ها به مدت دو ساعت در سوسپانسیون‌های تهیه شده از باکتری آنتاگونیست قرار داده و پس از آن به مدت ٤٨ ساعت در شرایط دمای اتاق نگهداری شدند. سپس این غده‌ها توسط سوسپانسیون تهیه شده باکتری بیماری‌زا اسپری و کشت شدند. در این آزمون تعداد شش استرین از باکتری‌های آنتاگونیست در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل ده غده سیب‌زمنی به کار رفت. آزمایش در خاکی که مدت ده سال در آن سیب‌زمینی یا گیاهان غده‌ای دیگر کشت نشده بود اجرا شد. درصد بوته‌های سالم محاسبه و پس از تبدیل زاویه‌ای در قالب طرح آماری به کار رفته آنالیز شد.

نتیجه و بحث

تمام استرین‌های انتخابی و بررسی شده قادر به تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت pseudomonas agar F بودند ولی هیچیک قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون نبودند. ویژگی‌های فنوتیپی رشد در چهار و ٤١ درجه سانتی‌گراد و اکسیداز و آرژنین دی‌هیدرولاز در همه آن‌ها مثبت بود و اکثراً توانستند نیترات را احیاء کنند. تولید لوان روی محیط دارای ٥٪ سوکروز و فعالیت پکتولیتیکی روی حلقه‌های سیب‌زمینی در استرین‌های مورد بررسی منفی بود. غالب استرین‌های بررسی شده ژلاتین را هیدرولیز نمودند. نتایج آزمون‌های فنوتیپی در جدول شماره یک آمده است.

بر اساس خصوصیات فنوتیپی ارایه شده توسط Bossis *et al*. (2001) و Shaad *et al*. (2001) استرین‌های مورد بررسی به گونه‌های *P. aeruginosa*، *P. putida*، *P. fluorescens* bv. II، *P. fluorescens* bv. III و *P. fluorescens* bv. V منتسب شدند. نتیجه ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه باکتری *P. carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در شرایط مزرعه به صورت مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی تیمارها در جدول شماره دو و تجزیه واریانس آن‌ها در جدول شماره سه خلاصه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های سودوموناس جدا شده از سیب‌زمینی

Table 1- Phenotypic features of the *Pseudomonas* strains isolated from potato rhizospher and tuber

Test	*P. aeruginosa*	*P. putida*	*P. fluorescens* bv. II	*P. fluorescens* bv. III	*P. fluorescens* bv. V
O/F	O	O	O	O	O
KOH 3%	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-
Flourescent	+	+	+	+	+
Diffusible non -flourescent pigment	+	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	-
Licitinase	-	-	-	+	+
Potato rot	-	-	-	-	-
HR	+	-	-	-	-
Levan	-	-	+	-	-
Growth at 41° C	+	-	-	-	-
Growth at 4° C	-	+	+	+	+
Gelatin liquifection	+	-	+	+	+
Growth on:					
L-arabinose	-	+	+	V	+
D-xylose	-	+	+	+	+
L-tartaric acid	+	-	-	+	+
D-alanine	+	+	+	+	+
sorbitol	-	+	+	+	+
Trehalose	-	-	+	V	-
D-galactose	-	-	+	V	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Meso-inositol	-	-	+	V	+
Adonitol	-	-	-	V	-
Ethanol	+	-	+	+	+
Geraniol	+	-	-	-	-
Butyrate	+	+	+	V	V
Valerate	+	+	V	V	V
Nicotinate	-	+	-	-	V
Phenyl acetate	-	+	-	-	-
Butylamine	-	+	-	V	V
Glucose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Glyceole	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
Malate	+	+	+	+	+
Tryptophane	-	+	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+

- :واکش منفی ۸۰٪ یا بیشتر استرین‌ها (Negative reaction)، + : واکنش مثبت ۸۰٪ یا بیشتر استرین‌ها (Positive reaction)، V : متغیر (۲۱ تا ۷۹٪ استرین‌ها مثبت).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- گروه‌بندی استرین‌های سودوموناس فلورسنت بر اساس میانگین هاله بازدارنده از رشد *Pectobacterium carotovoru* در شرایط آزمایشگاه با استفاده از آزمون دانکن

Table 2- Grouping of fluorescent pseudomonads based on their invitro inhibition zone towards *Pectobacterium carotovorum*

استرین باکتری Bacterial strain	میانگین قطر هاله بازدارنده (cm) پس از تبدیل داده‌ها به $\sqrt{X+½}$ Inhibition zone (cm)	گروه آماری در سطح ۱٪ Statistical Grouping (1%)	گروه آماری در سطح ۵٪ Statistical Grouping (5%)
PFD2	2.39	A	A
PFH9	2.31	AB	AB
PFH12	2.31	AB	AB
PFH20	2.30	AB	AB
PFQ19	2.16	BC	BC
PAQ1	2.13	BC	BCD
PAQ13	2.10	BC	DE
PPH16	1.87	D	F
PFD7	1.86	DE	FG
PFD14	1.74	DEF	FGH
PPQ8	1.62	DEF	HI
PFH3	1.61	DEF	HI
PFQ4	1.49	EF	I
PPD17	1.06	GH	J
PPD6	0.91	GH	JK
PFH10	0.89	H	K
PFQ15	0.77	H	K
PPH11	0.71	H	K
PFD5	0.71	H	K
PFH18	0.71	H	K

*PFD= *Pseudomonas fluorescens* from Damavand، PFH= *P. fluorescens* from Hamedan، PFQ= *P. fluorescens* from Qasere-e-Shirin، PAQ= *P. aeruginosa* from Qasere-e-Shirin، PPH= *P. putida* from Hamedan، PPQ= *P. putida* from Qasere-e-Shirn، PPD= *P. putida* from Damavand و PPH= *P . putida* from Hamedan

– قطر هاله بازدارنده میانگین‌های سه تکرار می‌باشند.

– میانگین‌های دارای حروف گروه آماری متفاوت در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قطر هاله بازدارندهٔ باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه *Pectobacterium carotovorum*

Table 3- Statistical analyses of fluorescent pseudomonades inhibition zone against *Pectobacterium carotovorum*

منابع تغییرات Source	درجه آزادی DF	جمع مربعات SS	میانگین مربعات M	F
کل Total	59	22.61	–	
تیمار Treatment	19	22.25	1.71	190^{**}
خطا Error	40	0.36	0.009	

**: معنی‌دار در سطح ۱٪ (Significant difference at 1% level).

نتایج تجزیه آماری ارزیابی توان آنتاگونیستی استرین‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه باکتری *P. carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در شرایط مزرعه به صورت مقایسه میانگین‌هاو گروه‌بندی تیمارها در جدول شماره چهار و تجزیه واریانس آن‌ها در جدول شماره پنج خلاصه شده است.

با تطبیق ویژگی‌های فنوتیپی ۴۰ استرین بررسی شده با جداول ارایه شده توسط Bossis *et al.* (2001) و Shaad *et al.* (2001) استرین‌های مورد بررسی به گونه‌های *P. aeruginosa*، *P. putida* و *P. fluorescens* (بیووارهای یک و پنج) تعلق داشتند.این استرین‌ها توانایی ایجاد رنگ فلورسنت روی محیط King'B، واکنش اکسیداز، آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در چهار (غیر از *P. aeruginosa*) و ٤١ درجه سانتی‌گراد در آن‌ها مثبت و واکنش گرم، تولید لوان (غیر از *P. fluorescens* bv. II) لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید رنگ غیر فلورسنت (غیر از *P. aeruginosa*) و واکنش ایجاد فوق حساسیت در توتون در آن‌ها منفی بود. در سایر ویژگی‌های مورد بررسی استرین‌های هر گروه با جداول ارایه شده Bossis *et al.* (2001) و Shaad *et al.* (2001) دارای انطباق قابل قبول جهت تفکیک در حد گونه و بیووار بوده و شناسایی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- مقایسه میانگین توان آنتاگونیستی استرین‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه *Pectobacterium carotovorum* در شرایط مزرعه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

Table 4- Analysis of antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Pectobacterium carotovorum* under field condition

استرین باکتری وغلظت آن Bacterial strain and its concentration	میانگین درصد بوته‌های سالم باقیمانده سیب زمینی پس از تبدیل زاویه‌ای Healthy plant %	گروه آماری در سطح ۵٪ Statistical grouping (5%)	گروه آماری در سطح ۱٪ Statistical grouping (1%)
کنترل مثبت	90.00	A	A
PAQ1 I	56.95	B	B
PAQ1 II	55.65	B	BC
PFH12 II	52.55	C	BC
PFH12 I	51.05	CD	BC
PFD2 I	49.90	D	C
PFD2 II	49.40	D	C
PPH16 II	40.60	E	D
PPH16 I	39.15	EF	DE
PFQ15 I	37.65	F	DE
PFQ15 II	34.70	G	DE
PPD17 II	34.55	G	DE
PPD17 I	34.50	G	DE
کنترل منفی	33.05	G	E

P. fluorescens =PFH جدا شده از دماوند، *Pseudomonas fluorescen*s from Damavand =PFD* جدا شده ازهمدان، PFQ =*P. fluorescens* from Qasr-e-Shirin جدا شده از قصر شیرین، *P. putida* from Hamedan =PPH جدا شده از قصر شیرین، *P. aeruginosa* from Qasr-e-Shirin =PAQ جدا شده از همدان، PPQ = *P . putida* from Qasr-e-Shirin جدا شده از قصر شیرین، *P . putida* from Damavand = PPD جدا شده از دماوند و PPH = *P . putid* جدا شده از همدان.

× داده‌های جدول هر کدام میانگین چهار تکرار می‌باشد. ××میانگین‌های با حروف گروه آماری متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- تجزیه واریانس داده‌های توان آنتاگونیستی استرین‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در شرایط مزرعه

Table 5- Statistical analyses of fluorescent pseudomonades antagonistic activity against potato soft rot disease under field condition

منابع تغییرات Source	درجه آزادی DF	جمع مربعات SS	میانگین مربعات M	F	F (Table) 5%	F (Table) 1%
کل Total	55	13355.34	–	–	–	
بلوک Block	3	5.68	1.89	–	0.045	2.845
تیمار Treatment	13	11694.98	899.61	21.20	1.98**	2.625**
خطا Error	39	1654.68	42.43	–	–	

**: وجود تفاوت معنی‌دار (Siginificant difference)

بررسی توان آنتاگونیستی استرین‌ها علیه *P. carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه نشان داد که عمده آن‌ها توانایی تولید هاله بازدارنده از رشد بوده و از این نظر در گروه‌های آماری متفاوت قرار گرفتند. با توجه به نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی تعداد شش استرین انتخاب و در دو غلظت متفاوت به صورت پوشش دهی سطح غده‌های سیب‌زمینی به کار رفت. تمام این استرین‌ها توانایی کاهش مرگ ومیر بوته‌های سیب‌زمینی در اثر حمله *P. carotovorum* را داشتند ولی هیچکدام قادر به کنترل کامل بیماری نبودند. این استرین‌ها توانستند درصد بوته‌های آلوده را بین ۲/۵ تا ۳۸/۷۵ درصدکاهش دهند.

میزان و ترتیب بازدارندگی استرین‌های بررسی شده درشرایط آزمایشگاه با گروه‌بندی استرین‌ها در شرایط مزرعه تا حدودی متفاوت است. برخی استرین‌ها در شرایط آزمایشگاه دارای بالاترین توان بازدارندگی بودند ولی در شرایط مزرعه در رده‌های بعدی قرار گرفتند. استرین‌هایی نیز در شرایط آزمایشگاه توانایی بازداری از رشد را نداشتند اما در شرایط مزرعه از خود توان بازدارندگی نشان دادند. مشاهده این پدیده گویای پیچیده بودن و تنوع

Archive of SID

www.SID.ir

مکانیسم‌های بازدارندگی بوده که برخی از این مکانیسم‌ها مانند رقابت بر سر مکان، غذا و توان کلنیزه کردن ریشه در آزمایشگاه به دلیل شرایط حادث شده فرصت بروز پیدا نمی‌کنند. در گزارش‌های منتشر شده محققین دیگر نیز این پدیده به ثبت رسیده است (Abdolghafar & Abdolsayed, 1997; Cronion *et al.*, 1997; Xu & Gross, 1986).

در شرایط آزمایشگاه محیط آزمایشی به صورت کنترل شده بوده و بدون دخالت میزبان، شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک و سایر میکروارگانیسم‌های خاکزی می‌باشد. تفاوت‌هایی که در عملکرد میکروارگانیسم‌های مختلف در شرایط متفاوت دیده می‌شود را می‌توان به دخالت شرایط محیط، میزبان و وجود سایر مکانیسم‌های بیوکنترل نسبت داد، چرا که شرایط طبیعی بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاه بوده و میکروارگانیسم از تمام پتانسیل خود برای بقاء و رقابت با سایر موجودات ریز اطراف ریشه استفاده می‌نمایند. وجود چنین شرایط پیچیده‌ای در محیط و اثر متقابل این شرایط تعیین کننده سهم هریک از مکانیسم‌ها بیوکنترل می‌باشد (Cronion *et al*., 1997; Xu & Gross, 1986).

یکی از مکانیسم‌های که اخیراً گزارش شده است خنثی نمودن سیگنال‌های ترشح شده پاتوژن است که در رابطه متقابل میزبان و پاتوژن نقش دارد (Dong *et al*., 2004). مواد بازدارنده از رشد ممکن است دوام و بقاء کافی نداشته و تحت شرایط محیط تجزیه و یا از محل تأثیر خود به دلیل آبیاری شسته شده و یا رقیق‌تر گردند. در مقابل یکی از مکانیسم‌های بیوکنترل توان رقابت و کلنیزاسیون ریشه است که در شرایط آزمایشگاهی امکان بروز آن وجود ندارد در حالیکه تحت شرایط محیطی یکی از فاکتورهای تعیین کننده قدرت بیوکنترل است. بازدارنده‌های ترشح شده توسط میکروارگانیسم‌ها دوام یکسان نداشته و برخی از توان پایداری بیشتری برخوردارند که خود می‌تواند منشأ تفاوت در عملکرد استرین‌ها تحت شرایط متفاوت باشد. برخی از استرین‌های باکتریایی غیر از تولید مواد بازدارنده و سیدروفور، توان رقابتی بالاتری داشته و به علاوه قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمایند. بنابراین عدم انطباق نتایج آزمایشگاه با شرایط مزرعه می‌تواند به دلایل ذکر شده قابل انتظار باشد چرا که چگونگی عملکرد شرایط محیطی تعیین کننده توانایی بیوکنترل استرین‌ها در حضور میزبان و استرین پاتوژن است. داده‌های جدول پنج گویای آن است که تفاوت معنی‌داری بین دو غلظت به کار

Archive of SID

www.SID.ir

رفته در عموم موارد وجود ندارد. این نتیجه نشان می‌دهد که اولاً برای اعمال حد ویژه‌ای از بیوکنترل همیشه غلظت خاصی از آنتاگونیست مورد نیاز است و دوم اینکه به علت محدودیت‌هایی که توسط شرایط محیطی و رقابت سایر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد جمعیت میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست پس از مدتی به حد تعادل رسیده و نمی‌تواند از آن حد تجاوز کند. آنچه مسلم است توجه به این اصل است که چنانچه میکروارگانیسم آنتاگونیست فرصت کافی برای تکثیر تحت شرایط محیط تا بروز پاتوژن داشته باشد حتی اگر در غلظت کم نیز اضافه شود اثر خود را اعمال می‌نماید و در چنین شرایطی اثر غلظت پوشیده می‌ماند*.

منابع

ABDOLGHAFAR, N. Y. and W. M. ABDOLSAYED, 1997. Biological control of soft rot of potato using fluorescent pseudomonads. Arab Uni. J. Agri. Sci., 22: 419- 431.

AHMADVAND, R. 2000. Phenotypic and electrophoretic characteristics of the pectinolytic erwinase affecting potato and corn in Hamedan and Mazandaran provinces. M.Sc. thesis, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, 123pp.

ANONYMOUS, 1999. Statistical study of Potato, Second edition, Statistic and information office, Iranian Ministry of Agriculture, 85 pp.

AYER, S. H., P. RUPP and W. T. JOHNSON, 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. U. S. Dept. Agric. Bull. 782.

BERG, G., A. KRECHEL, M. DITZ, R. A. SIKORA, A. ULRICH and J. HALLMANN, 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 1, 51(2): 215-29.

BOSSIS, E., P. LEMANCEAU, X. LATAOUR and L. GARDAN, 2001. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie, 20 (2000): 51-63.

CRONION, D., Y. MONNE LOCCOZ, A. FENTON, C. DUNNE, D. N. DOWLING and

* **نشانی نگارندگان:** دکتر غلام خداکرمیان و دکتر دوستمراد ظفری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

C. OGARA, 1997. Ecological intraction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinolwith the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. Atroseptica. FEMS Microbiol. Ecol., 23: 95-106.

DONG, Y. H., X. F. ZHANG, J. L XU and L. H. ZHANG, 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* Silences *Erwinia carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism, Signal Interference. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 70: 2, p. 954-960.

FERAYDONI, A. 1993. Charactristics of the strains of *Erwinia carotovora* causing potato soft rot disease in Iran, M.Sc. Thesis, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University. 150 pp.

GRAHAM, D. C. and W. HODGKISS, 1967. Identification of Gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals.J. Appl. Bacteriol., 30: 175-189.

GRANDAR, P. W. and C. B. TANNER, 1976. Potato leaf and tuber water potential measurements with a pressure chamber. Am. Potato. J. 53: 1.

HUGH, R. and E. LEIFSON, 1953. Taxonomic significance of versus oxidative metabolism of carbohydrates by varius Gram negative bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26.

KENNEDY, B. W. and S. M. ALCORN, 1980. Estemates of U. S. crop losses to prokaryote plant pathogens. Plant Dis., 64: 674-676.

KLEMENT, Z., G. L. FARKAS and H. LOVREKOVICH, 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474-477.

KOVACS, N. 1956. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature, 178: 703.

LELLIOT, R. A. and R. S. DICKEY, 1984. Genus VII *Erwinia*, In: Krieg, eds. N. R., Halt, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co., The Baltimore Vol, 1, P. 469-476.

LISINKA, G. and W. LESZCZYSKI, 1989. Potato Science and Technology. Elsevier Applied Science, England, 391 pp.

MAC FADDIN, J. F. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore.

MISAGHI, I. and R. G. GROGAN, 1969. Nutritional and biochmical composition of plant pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. Phytopathology, 59: 1436-1450.

PEROMBELON, M. C. M. and A. KELMAN, 1980. Ecology of the sof rot erwinias. Ann.

Archive of SID

www.SID.ir

Rev. Phyttopathol. 18: 361- 374.

SCHAAD, N. W., J. B. Jones and W. Chun, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third ed. APS Press, Minnesota, 373 pp.

SUSLOW, T. U., M. N. SCHROTH and M. ISAKA, 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918.

THORNLEY, M. J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol., 23: 37-52.

XU, G. W. and D. C. GROSS, 1986a. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppression of potato seed piece decay. Phytopathology, 76: 414-422.

XU, G. W. and D. C. GROSS, 1986b. Field evaluation of the intraction among fluorescent pseudomonads, *Erwinia carotovora* and potato yeild. Phytopathology, 76: 423-440.

ZOHOUR-E-PERALAK, E. 1988. Comparative study on pectionlytic erwiniase affecting potato in Fars province. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, Shiraz University, pp. 116.

Address of the authors: Dr. GH. KHODAKARAMIAN and Dr. D. ZAFARI, Deptartment of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir