Archive of SID

ارزیابی توان آنتاگونیستی بیووارهای باکتری *Pseudomonas fluorescens* جدا شده از ریزوسفر سیب زمینی جهت کنترل *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*

فاطمه شهریاری[۱]، غلام خداکرمیان[۱] و اصغر حیدری[۲]

چکیده

***به منظور ارزیابی تأثیرات آنتاگونیستی بیووارهای باکتری Pseudomonas fluorescens علیه Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* عامل بیماری ساق سیاه سیب زمینی، استرین‌هایی متعلق به بیووارهای III , IV و V باکتری P. fluorescens بررسی شدند. در ارزیابی اثر آنتاگونیستی علیه عامل بیماری ساق سیاه باکتریایی سیب زمینی روی محیط کشت PDA، ۶۰ درصد استرین‌ها هاله بازدارنده ایجاد کردند که قطر هاله بازدارنده در استرین‌های مختلف از ۱/۵ تا ۵/۵ سانتی‌متر متغیر بود. استرین‌هایی از این باکتری با دو تراکم 10^{7} تا 10^{9} و 10^{10} تا 10^{12} واحد تشکیل دهنده پرگنه برای کنترل این پاتوژن در شرایط گلخانه نیز بررسی شدند.**

در آزمایش‌های گلخانه‌ای تعداد گیاهان سالم در گلدان‌های تیمار شده با استرین‌های باکتری آنتاگونیست ۲۹ تا ۵۴ درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود. تفاوت معنی‌داری بین استرین‌ها و تراکم‌های به کار رفته وجود نداشت و هیچ استرینی نتوانست به طور کامل بیماری ساق سیاه سیب زمینی را کنترل کند. هم‌چنین اکثر این استرین‌ها وزن تر کل گیاه در هر گلدان را نیز به میزان دو تا سه برابر افزایش دادند. تمام استرین‌های بررسی شده در گلخانه، روی محیط کشت قادر به تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور بودند که به احتمال قوی توانایی آنها در جلوگیری از رشد این پاتوژن به دلیل اثر این متابولیت‌های ثانویه است.

واژه‌های کلیدی: *کنترل بیولوژیکی، بیماری ساق سیاه، Pseudomonas fluorescens، سیب زمینی، پکتوباکتریوم، ایران*

مقدمه

بیماری ساق سیاه باکتریایی سیب‌زمینی که توسط *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Atroseptcium* (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptcia*) ایجاد می‌شود، سبب فساد قطعات بذری قبل از سبز شدن، پوسیدگی نرم و ساق سیاه و پوسیدگی غده‌های حاصل در مزرعه و انبار می‌شود. جمعیت پاتوژن همواره در خاک‌های آلوده زیاد بوده و حتی در روی غده‌های بدون علایم بیماری جمعیت قابل توجهی از پاتوژن وجود دارد. ریشه سیب‌زمینی و سطح غده‌ها

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. محقق مؤسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

توسط پاتوژن کلنیزه شده و تحت شرایط مساعد محیطی، جمعیت آن از 10^6 کلنی در هر گرم ریشه در اواسط فصل تجاوز می‌کند(۱۶). مرگ زودرس در اواسط فصل که بوته‌های سیب‌زمینی به فراوانی آبیاری شده‌اند و دمای خاک در بالاترین حد می‌باشد، رخ می‌دهد که در این زمان پاتوژن بیشترین جمعیت را داراست(۱۶). غده‌های بذری آلوده، خاک و آب آبیاری منبع اینوکولوم باکتری می‌باشند(۹). چون خاک منبع مهم آلودگی برای پاتوژن است، کنترل بیماری با کاشت غده‌های بذری عاری از پاتوژن موفق‌آمیز نبوده است (۱۵). بنابراین سایر روش‌های کنترل علاوه بر تناوب زراعی و کاشت غده‌های بذری سالم برای حفاظت مؤثر گیاهان از آلودگی به این باکتری ضروری می‌باشد. برای کنترل بیماری ساق سیاه باکتریایی سیب‌زمینی استفاده از غده‌های بذری گواهی شده، کاربرد سموم شیمیایی در مزرعه و استفاده از ارقام مقاوم سیب‌زمینی به این باکتری توصیه شده است، ولی با توجه به احتمال پیدایش استرین‌هایی با بیماری‌زایی شدیدتر، خطر استفاده از سموم شیمیایی برای انسان و محیط زیست و هزینه بالای روش‌های رایج کنترل، تحقیق جهت معرفی روش‌های مناسب‌تر مانند کنترل بیولوژیک، لازم و ضروری می‌باشد(۳).

بیش از ۳۰ سال است که گونه‌های باکتری جنس *Pseudomonas* به عنوان عوامل بالقوه کنترل بیولوژیک شناخته شده‌اند(۱۳). موارد بسیاری از کاربرد موفقیت‌آمیز سودوموناس‌های فلورسنت مانند *P. fluorescens* و *P. putida* وجود دارد که نشان‌دهنده توانایی آنها در بهبود شرایط محیطی ریشه و کنترل بیولوژیک برخی از پاتوژن‌های گیاهی است. گونه‌های مختلف سودوموناس‌های فلورسنت خصوصاً دو گونه فوق جمعیت باکتری عامل بیماری ساق سیاه را روی ریشه و غده‌ها کاهش می‌دهند (۱۱). رقابت این گونه‌ها در ریزوسفر و هم‌چنین تولید متابولیت‌های ثانویه توسط آنها، جمعیت میکروفلور اطراف ریشه را تغییر می‌دهد(۷). در ایالت واشنگتن سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده از سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه از پوسیدگی قبل از سبز شدن و فساد قطعات بذری سیب‌زمینی توسط *P. carotovorum* subsp. *atroseptcium* جلوگیری کردند که استرین‌های آنتاگونیست به کار رفته *P.fluorescens* Bio III و *P. putida* بوده‌اند (۱۵). در آزمایش‌های گلخانه‌ای نیز با به کار بردن باکتری *P. fluorescens* سبز شدن گیاه سیب‌زمینی بیش از ۶۴ درصد افزایش یافته و رشد آن نیز در مقایسه با شاهد که فقط با باکتری پاتوژن تلقیح شده بود هفت برابر افزایش نشان داده است (۱۵). هم‌چنین استرین‌هایی از *P. fluorescens* انتخاب و در مزرعه توانایی آنها در کلنیزه کردن ریشه سیب‌زمینی و افزایش محصول بررسی شده است که برخی از استرین‌ها ریشه‌ها را با جمعیتی بالغ بر 10^5 واحد تشکیل دهنده پرگنه در هرگرم وزن تر کلنیزه کرده و در سر تا سر فصل رشد وجود داشته‌اند (۱۵ و ۱۶). با آغشته کردن غده‌های سیب‌زمینی به *P. fluorescens* یا *P. putida* یا مخلوطی از هر دو قبل از کاشت در خاک آلوده به *P.carotovorum* ، شدت پوسیدگی نرم در غده‌های سیب زمینی کاهش یافته است. کاربرد مخلوطی از این دو باکتری مؤثرتر از کاربرد هر کدام به تنهایی بوده و جمعیت پاتوژن به میزان زیادی کاهش یافته است(۱). در یک بررسی با آغشته کردن قطعات بذری سیب‌زمینی به سودوموناس‌های فلورسنت آنتاگونیست *P. carotovorum* و چند پاتوژن دیگر سیب‌زمینی، محصول و تعداد غده‌ها در گیاهان تیمار شده در آزمایش‌های گلخانه‌ای به ترتیب بیش از ۷۰ و ۹۳ درصد افزایش یافته است (۶). سودوموناس‌های فلورسنت به عنوان رایزوباکترهای تحریک‌کننده رشد گیاه شناخته شده‌اند. این باکتری‌ها با تولید مواد کلاته‌کننده آهن به نام سیدروفور، آهن محیط را از دسترس سایر اعضای میکروفلور خاک خارج نموده و به این طریق از کلنیزه شدن ریشه توسط میکروارگانیسم‌های مضر جلوگیری می‌شود. تولید آنتی‌بیوتیک نیز توسط آنها یک فاکتور مهم در جلوگیری از رشد پاتوژن‌های گیاهی است.

با توجه به اهمیت محصول سیب‌زمینی در ایران ضروری است که برای کنترل بیماری‌های آن در کنار سایر روش‌ها از عوامل بیولوژیک موجود در ریزوسفر گیاه سیب‌زمینی نیز

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

استفاده شود ولی یک روش جداسازی مؤثر لازم است تا بتوانیم باکتری‌های مفید را از میان جمعیت‌های مختلف باکتری موجود در ناحیه ریشه انتخاب کرده سپس توانایی آنها را تحت شرایط کنترل شده آزمایش کنیم.

مواد و روش‌ها

۱. استرین‌های آنتاگونیست به کار رفته

سودوموناس‌های فلورسنت استفاده شده در این پژوهش اکثراً از سطح غده و تعدادی نیز از خاک مزارع سیب زمینی استان‌های همدان، اصفهان، اردبیل و تهران، روی محیط کشت Pseudomonas F جدا شده‌اند. استرین‌های به کار رفته در بررسی‌های گلخانه‌ای (جدول ۱) نیز بر طبق خصوصیات فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی توصیه شده تشخیص داده شده‌اند. تست‌هایی مانند اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین و آرژنین دی هیدرولاز، تولید رنگیزه فلورسنت روی محیط کشت King's B، احیای نیترات، تولید لوان از سوکروز، لهانیدن سیب‌زمینی، رشد در ۴ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد، استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، آدونیتول، اتانول، دی- آلانین، ال- آرابینوز، دی- زایلوز، دی – گالاکتوز و ... به عنوان منابع کربن استفاده شده‌اند(۲، ۵، ۸ و ۱۰).

۲. اثبات بیماری‌زایی باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum*

بیماری‌زایی دو استرین از باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* جداسازی شده از سیب زمینی‌های آلوده به روش زیر اثبات گردید. در طوقه بوته‌های سیب زمینی کاشته شده (۴-۳ برگی) زخمی ایجاد و سپس سوسپانسیون باکتری به محور زخم اضافه شد که پس از ظهور علایم بیماری ساق سیاه، باکتری عامل دوباره جدا و ویژگی‌های آن با باکتری تلقیح شده تطبیق داده شد (شکل ۱).

۳. بررسی ویژگی آنتاگونیستی استرین‌ها

۳. ۱. آزمون برروی محیط کشت آگاردار

دیسک‌های کاغذی به قطر پنج میلی‌متر به سوسپانسیون سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده آغشته گردید و سپس بر روی ظروف حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند. این ظروف کشت به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و سپس با استفاده از بخار کلروفرم باکتری‌های رشد کرده طی مدت زمان ۲۰ دقیقه کشته شدند. پس از هوادهی پتری‌ها به منظور حذف بخار کلروفرم، سوسپانسیون باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* روی این ظروف اسپری گردید. پس از نگه‌داری این ظروف در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، میانگین قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری و در یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی و نتایج آن برای انتخاب استرین‌های با توان آنتاگونیستی بالا مورد ارزیابی قرار گرفت.

٤. بررسی تولید آنتی بیوتیک

بخ منظور بررسی توانایی تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور از استرین‌های S13, D3, AR1, H4, S15, S17, H5, S1, D6 و D9 که نماینده بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorescens* بودند و هم‌چنین در مقابل باکتری عامل ساق سیاه سیب زمینی ویژگی آنتاگونیستی نشان دادند، استفاده گردید.

برای بررسی تولید آنتی بیوتیک از روش ولر و کوک (۱۲) استفاده شد. استرین‌های آنتاگونیست روی محیط Nutrient agar glucose (یک درصدگلوکز) حاوی کلرید آهن III ($FeCl_3$) به غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار به صورت لکه‌ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها به وسیله پنبه استریل پاک گردیدند و با گذاشتن پتری‌ها به صورت وارونه و قراردادن چند قطره کلروفرم روی در آن، باکتری‌های باقی مانده از بین برده شدند، پس از تهویه، سوسپانسیون باکتری پاتوژن به صورت چمنی بر روی محیط پخش گردید و وجود هاله بازدارندگی پس از ۳۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. به علت وجود آهن کافی در این محیط سیدروفور تولید نشده و آثار بازدارندگی موجود، ناشی از تولیدآنتی بیوتیک تلقی گردید (شکل ۲).

۵. بررسی تولید سیدروفور

روی محیط Nutrient agar sucrose (یک درصد سوکروز) و

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

جدول ۱. نماینده‌هایی از بیووارهای باکتری *P. fluorescens* و اثرآنتاگونیستی آنها علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum*

استرین	گونه	بیووار	قطرهالهٔ بازدارنده (cm)*	تولید آنتی بیوتیک	تولید سیدروفور	درصد بوته های سالم**		وزن تر بوته‌ها در هر گلدان(g) **	
						A	B	A	B
S17	*P. fluorescens*	III	۴/۲۵	+	+	۸۷/۵	۹۳/۷۵	۱۱/۵۴	۱۳/۱۵
D3	*P. fluorescens*	III	۲/۷۵	+	+	۸۳/۳	۹۱/۶۵	۱۱/۶۷	۱۴/۷۰
H5	*P. fluorescens*	III	۳/۶۶	+	+	۷۰/۸۳	۸۱/۲۵	۱۵/۹۲	۱۵/۹۲
S1	*P. fluorescens*	IV	۳/۵	+	+	۷۷/۰۵	۸۷/۵	۹	۱۰/۱۰
D6	*P. fluorescens*	III	۵/۵	+	+	۸۵/۴۰	۹۱/۶۵	۱۲/۷۱	۱۳/۴۲
D9	*P. fluorescens*	V	۴/۳	+	+	۶۸/۷۳	۸۵/۴۰	۸/۶۲	۱۰/۹۳

A: تراکم $۱۰^{۹}$–$۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده پرگنه از استرین آنتاگونیست

B: تراکم $۱۰^{۱۲}$–$۱۰^{۱۰}$ واحد تشکیل دهنده پرگنه از استرین آنتاگونیست

** : داده‌ها، میانگین‌های ۴ تکرار هر استرین

* : قطرهالهٔ بازدارندهٔ ایجاد شده توسط استرین‌های آنتاگونیست در برابر باکتری P. c. subsp. atrosepticum روی محیط کشت PDA

– در شاهد قطعات بذری سیب زمینی با تراکم $۱۰^{۹}$–$۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده پرگنه از باکتری پاتوژن مایه‌زنی شدند که درصد بوته‌های سالم ۳۹/۵۸ و وزن تر بوته‌ها در هر گلدان ۵/۱۷ گرم بود.

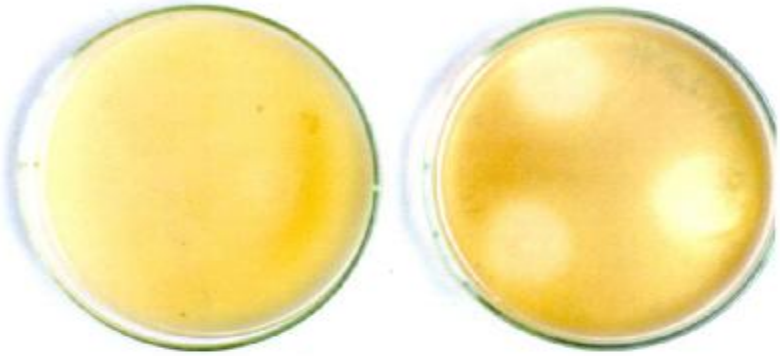
– قطعات بذری سیب زمینی که فقط با آب آغشته شدند درصد بوته‌های سالم آنها ۹۵ و وزن تر بوته‌ها در هر گلدان ۱۹/۳۶ گرم بود.

شکل ۱. علایم بیماری ساق سیاه باکتریایی سیب زمینی ایجاد شده توسط *P. c.* subsp. *atrosepticum*

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID



تیمار شاهد

شکل ۲. هاله‌های بازدارنده ایجاد شده با تولید مواد آنتی‌بیوتیکی توسط استرین‌های *P. fluorescens* علیه *P. c.* subsp. *atrosepticum*

NAS حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III ($FeCl_3$)، باکتری آنتاگونیست به صورت لکه‌ای کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت کلنی باکتری به وسیله پنبه استریل پاک گردید. روی در پتری وارونه چند قطره کلروفرم ریخته شد و بعد از یک ساعت پتری‌ها تهویه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا آنتی بیوتیک‌های احتمالی تولید شده، غیرفعال گردند. عدم وجود هاله در پتری حاوی کلرید آهن III و وجود هاله در پتری فاقد کلرید آهن III پس از کشت چمنی پاتوژن به عنوان وجود سیدروفور ارزیابی گردید.

۶. کاربرد بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorscene* جهت کنترل بیماری باکتریایی ساق سیاه سیب‌زمینی در شرایط گلخانه

شش استرین D3، S17، H5، S1، D6 و D9 نماینده بیووارهای III، IV و V باکتری *P. fluorescens* بر مبنای میزان هاله بازدارنده رشد انتخاب شدند و در شرایط گلخانه جهت کنترل باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). از کشت ۲۴ ساعته هر یک از استرین‌ها سوسپانسیون‌هایی به تراکم 10^7 تا 10^9 و 10^{10} تا 10^{12} واحد تشکیل دهنده پرگنه با استفاده ار اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و سپس قطعات بذری سیب زمینی با سوسپانسیون باکتری‌ها آغشته شدند. قطعات بذری پوشش داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شدند و سپس با سوسپانسیونی به تراکم 10^7 واحد تشکیل دهنده پرگنه از باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* اسپری گردیدند. قطعات بذری (سه قطعه در هر گلدان و در چهار تکرار) در خاک پاستوریزه کشت شدند. در گلدان‌های شاهد نیز قطعات بذری آغشته به سوسپانسیون باکتری پاتوژن قرار داده شد. در چهار گلدان نیز قطعات بذری آغشته شده با آب استریل کشت شد. پنج هفته بعد از کاشت، تعداد گیاهان سالم و وزن تر کل گیاه در هر گلدان تعیین گردید. گیاهان به آرامی از خاک خارج و زیر آب جاری شسته شدند و سپس وزن تر آنها یادداشت شد و تجزیه و تحلیل دادها صورت گرفت.

نتایج و بحث

تعداد ۱۷۰ استرین از سودوموناس‌های فلورسنت، آثار آنتاگونیستی آنها علیه باکتری عامل بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی روی محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت. ۶۰ درصد آنها علیه این پاتوژن هالهٔ بازدارنده ایجاد کردند که هالهٔ تولید شده در تعداد زیادی از استرین‌ها یک ناحیه واضح و روشن و فقط حالت بازدارندگی داشت زیرا، پس از ۴-۳ روز از مایه زنی، باکتری پاتوژن در ناحیه بازدارنده رشد کرد و تعداد کمی از استرین‌ها ناحیه بازدارندهٔ آنها از نوع کشندگی بود. با توجه به جدول ۲ تفاوت بین استرین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد و استرین‌ها در

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

جدول ۲. آنالیز واریانس قطر هاله بازدارنده سودموناس‌های فلورسنت علیه *P. c.* subsp. *atrosepticum*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
استرین	۳۹	۶/۴۶**
خطا	۸۰	۰/۱۱ ns
کل	۱۱۹	

**: معنی‌دار در سطح یک درصد
ns : معنی‌دار نیست.

۱۳ گروه آماری قرار گرفتند. قطر هالهٔ بازدارنده در استرین‌های مختلف از ۱/۵ تا ۵/۵ سانتی‌متر متغیر بود که بیشترین میانگین را استرینD6 به میزان ۵/۵ سانتی‌متر داشت (جدول۳). نتایج به دست آمده با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۱۵).

فسفات غیرآلی از تولید آلکالین و اسید فسفاتاز که برای تشکیل متابولیت‌های ثانویه لازم می‌باشند، جلوگیری می‌کند و غلظت‌های بیش از یک میلی مولار فسفات غیرآلی شدیداً برای متابولیسم‌های ثانویه *Pseudomonas* بازدارنده است (٤ و ١٤). محیط کشت PDA چون میزان فسفات غیرآلی آن پایین است این مزیت را دارد که یک محیط غذایی مناسب جهت تولید متابولیسم ثانویه و آنتی بیوتیک فراهم می‌کند ولی آهن زیاد آن مانع از تولید پیگمانت فلورسنت می‌شود (۱۵).

شش استرین از باکتری *P. fluorescens* که در بررسی‌های گلخانه‌ای به کار رفتند، با توجه به جدول ۴ تفاوت بین استرین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد. با توجه به شکل۳، تمام استرین‌ها با دو تراکم به‌کار رفته در مقایسه با شاهد که فقط با باکتری پاتوژن تلقیح شده تفاوت معنی‌دار دارند. تعداد گیاهان سالم را ۲۹ تا ۵۴ درصد افزایش داده‌اند ولی هیچ استرینی نتوانست بیماری ساق سیاه را به طور کامل کنترل نماید که با نتایج بسیاری از محققین دیگر مشابه بود (٦، ١٥ و ١٦).

استرین‌های به کار رفته با وجود این که روی محیط کشت PDA در مقابل باکتری Pca هاله‌های بازدارنده متفاوتی ایجاد کردند ولی در شرایط گلخانه‌ای تفاوت معنی‌داری بین استرین‌ها و تراکم‌های به کار رفته وجود نداشت. با توجه به این که این استرین‌ها در شرایط آزمایشگاهی به عنوان تولید کنندهٔ آنتی‌بیوتیک و سیدروفور شناخته شدند، تفاوت‌های حاصل می‌تواند ناشی از تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورهای مختلف با ویژگی‌های متفاوت باشد و ممکن است بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط خاک به سرعت تجزیه و غیر فعال شوند. هم‌چنین چون محیط کشت فضای بسته‌ای است ممکن است با گذشت زمان غلظت مواد مترشحه باکتری در آن بالا رود و ضمن نفوذ در محیط کشت از رشد عامل بیماری‌زا جلوگیری کند ولی در طبیعت احتمال تجزیه این مواد توسط سایر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد و یا ممکن است توسط آب آبیاری شسته شوند. هم‌چنین یک استرین در صورتی اثر آنتاگونیستی خوبی در طبیعت خواهد داشت که بتواند سریعاً با شرایط محیط سازگار شود و با باکتری پاتوژن در اشغال ریزوسفر رقابت کند. تعامل باکتری و گیاه و سایر میکروارگانیسم‌های محیط در ایجاد نتایج متفاوت مؤثرند که به دست آمدن نتایج مختلف ارزش آزمایش‌های گلخانه‌ای را به‌عنوان یک روش جهت حذف استرین‌های غیر مؤثر تقویت می‌کند (۱۵).

هم‌چنین با توجه به جدول آنالیز واریانس وزن تر کل گیاه در هر گلدان پس از کاربرد بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorescens* علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* در شرایط گلخانه، تفاوت بین استرین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است (جدول ۵) و با توجه به شکل ۴، اکثر استرین‌های به کار رفته وزن تر کل گیاه در هر گلدان را ۲ تا ۳ برابر افزایش دادند. اما استرین D9 با تراکم 10^{7} تا 10^{9} واحد تشکیل دهنده پرگنه و استرین S1 با هر دو تراکم به کار رفته تفاوت معنی‌دار نسبت به شاهد ندارند و وزن تر بوته‌های سیب زمینی به طور معنی‌دار افزایش نیافته است که ممکن است به خاطر تولید سیدروفورهایی با وابستگی شدید به آهن توسط

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های قطر هاله بازدارندهٔ سود و موناس‌های فلورسنت علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

استرین باکتری	* میانگین قطر هاله بازدارنده (cm)	گروه آماری
D6	۵/۵۰۰۰	A
AR8	۴/۵۸۳۳	B
D2	۴/۳۳۳۳	BC
S17	۴/۲۵۰۰	BCD
H10	۴/۰۸۳۳	BCD
AR2	۴/۰۸۳۳	BCD
AR12	۳/۶۶۶۷	CDE
H5	۳/۶۶۶۷	CDE
S13	۳/۵۰۰	DEF
H43	۳/۵۰۰	DEF
H25	۳/۲۵۰	EFG
H44	۳/۲۵	EFG
S9	۳/۲۵	EFG
H30	۳/۱۳۳۳	EFGH
H19	۳/۱۰۰۰	EFGH
S3	۲/۹۱۶۷	EFGHIJ
H46	۲/۹۱۶۷	EFGHIJ
H9	۲/۸۶۶۷	EFGHIJ
AR3	۲/۸۵۰۰	EFGHIJ
D4	۲/۸۳۳۳	EFGHIJ
S25	۲/۷۵	FGHIJK
S22	۲/۷۵	FGHIJK
H17	۲/۶۳۳۳	GHIJKL
AR13	۲/۵	GHIJKL
S15	۲/۵	HIJKL
S7	۲/۲۵	IJKL
S14	۲/۱۸۳۳	JKL
H11	۲/۱۶۶۷	JKL
D14	۲/۱۳۳۳	JKL
S33	۱/۹۱۶۷	KL
S19	۱/۸۳۳۳	L
S6	۰/۰۰۰	M
H21	۰/۰۰۰	M
D5	۰/۰۰۰	M
D8	۰/۰۰۰	M
S5	۰/۰۰۰	M
S21	۰/۰۰۰	M
H37	۰/۰۰۰	M
شاهد	۰/۰۰۰	M

* : میانگین سه تکرار

- : میانگین‌های با حروف گروه آماری متفاوت در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول ۴. آنالیز واریانس درصد بوته‌های سیب زمینی سالم پس از کاربرد استرین‌های *P. fluorescens* علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* در شرایط گلخانه

منابع تغییر	درجه‌آزادی	میانگین مربعات
استرین باکتری و تراکم	۱۳	۸۳۰/۲۵ *
خطا	۴۲	۳۳۵/۵۱ ns
کل	۵۵	

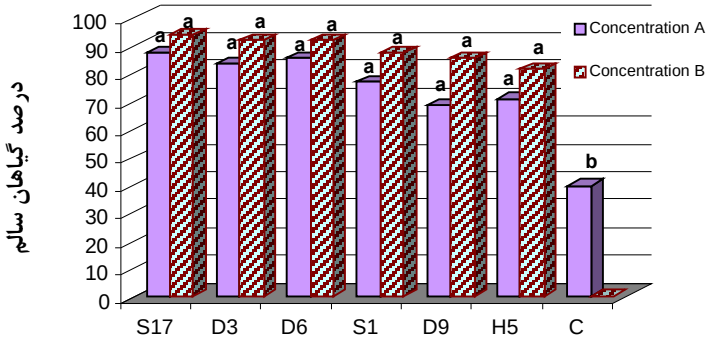
*: معنی‌دار در سطح احتمال۵٪

ns : معنی‌دار نیست.

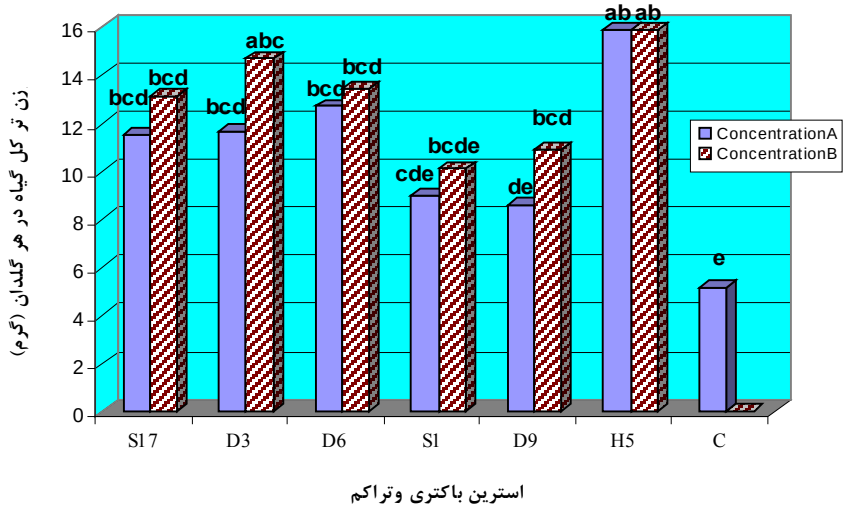
www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID



شکل ۳. درصد بوته‌های سیب زمینی سالم پس از کاربرد استرین‌های *P. fluorescens* در دو تراکم علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* در شرایط گلخانه بعد از پنج هفته



شکل۴. وزن تر بوته‌های سیب زمینی پس از کاربرد استرین‌های *P.fluorescens* در دو تراکم علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* در شرایط گلخانه بعد از پنج هفته

جدول ۵. آنالیز واریانس وزن تر بوته‌های سیب زمینی پس از کاربرد استرین‌های *P. fluorescens* علیه باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* در شرایط گلخانه

منابع تغییر	درجه‌آزادی	میانگین مربعات
استرین باکتری و تراکم	۱۳	۵۱/ ۳۳ *
خطا	۴۲	۱۲/۲۵ ns
کل	۵۵	

* : معنی‌دار در سطح احتمال۵٪

ns : معنی‌دار نیست.

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

این استرین باشد که آهن مورد نیاز گیاه را نیز از محیط جذب و در نتیجه مانع از رشد گیاه شده است. بسیاری از گونه‌های گیاهی قادر به استفاده از سیدروفورهای آهن دار هستند با این همه استثنائاتی وجود دارد مثلاً سیدروفور تولید شده توسط *Pseudomonas* B10 به نام سودوباکتین مانع جذب آهن توسط گیاهان نخود می‌شود ولی اگروباکتین جذب آهن توسط گیاهان تک لپه و دو لپه را آسان می‌کند. سایر محققین نیز افزایش رشد گیاه توسط باکتری *P. fluorescens* را گزارش کرده‌اند (٦،٣، ٧، ١٥ و ١٦).

بین دو تراکم 10^7 تا 10^9 و 10^{10} تا 10^{12} واحد تشکیل‌دهنده پرگنه به کار رفته از باکتری‌های آنتاگونیست تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. بر اساس بررسی‌های انجام شده، حداقل تعداد 10^6 واحد تشکیل دهنده پرگنه در هر میلی‌لیتر از سودوموناس‌های فلورسنت برای هر قطعه بذری لازم است تا کنترل قابل توجهی از *P. c.* subsp. *atrosepticum* به دست آید (١٥). با توجه به آزمایش‌های گلخانه‌ای استرین‌های D3، S17، H5 و D6 که همگی متعلق به بیووار III باکتری *P. fluorescens* بودند، آنتاگونیست‌های بهتری می‌باشند.

به طور کلی، نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که کنترل بیولوژیکی، روش بالقوه‌ای برای کنترل بیماری ساق سیاه باکتریایی سیب‌زمینی است و سودوموناس‌های فلورسنت عوامل مؤثری برای کنترل بیولوژیکی زیرگونه‌های *P. carotovorum* از جمله زیرگونه *P. c.* subsp. *atrosepticum* می‌باشند. این باکتری‌ها محیط اطراف ریشه را کلنیزه کرده و جمعیت بالایی را تولید می‌کنند و با تولید متابولیت‌های ثانویه بسیاری مانند سیدروفور، آنتی‌بیوتیک و سیانیدهیدروژن از رشد فیتوپاتوژن‌ها جلوگیری کرده و موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند(٣ و ٧). امروزه حفظ منابع طبیعی و کاستن از مواد آلاینده هوا، خاک و آب استفاده از روش‌های طبیعی و بیولوژیک را جهت کنترل بیماری‌های گیاهی از اهمیت روزافزونی برخوردار کرده است. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی برای طبیعت بدون زیان می‌باشد. بنابراین لزوم توجه بیشتر به روش‌های کنترل غیر شیمیایی کاملاً آشکار بوده و در این راستا استفاده از عوامل آنتاگونیست علیه عوامل بیماری‌زا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل لزوم شناسایی و جداسازی عوامل آنتاگونیست بومی مناطق آلوده کشور که دارای قدرت بالقوه مهار عامل بیماری باشند بسیار ضروری است.

منابع مورد استفاده

1. Abdelghafar, N. Y. and W. M. Abdelsayed. 1997. Biological control of bacterial soft rot of potato by using *Pseudomonas fluorescent*. J. Agric. Sci. 22: 419-431.
2. Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour and L. Gardan. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie 20: 50-63.
3. Cronin, D., Y. Moenne Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling and O'Gara. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiol. Ecol. 23: 95-106.
4. Duffy, B. K. and G. Defago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains.Appl. Environ. Microbiol. 65: 2429-2438.
5. Fahy, P. C. and G. J. Persley. 1983. Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia.
6. Geels, F. P. and B. Schippers. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic *Pseudomonas fluorescent* spp. Phytopathol. 108: 207-214
7. Kloepper, J. W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant promoting rhizobacteria on populations of *E. carotovora* on potato roots and daughter tubers. Phytopathol. 73: 217-219.
8. Palleroni, N. J. 1984. Gram – negative aerobic rods and cocci: Family I Pseudomonadaceae. 141-168. *In*: N. R. Krieg, and J. G. Holt. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. William and Wilkins, Baltimore.
9. Powelson, M. L. and J. D. Apple. 1984. Soil and seed tubers as sources of inoculum of *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* for stem soft rot of potatoes. Phytopathol. 74: 429-432.

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

10. Schaad, N. W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3th ed., APS Press, London.
11. Taminage, T. and k. Ogasawara. 1979. Bacterial stem rot of potato caused by *Erwinia chrysanthemi*. Annal. Phytopathol. Soc. 45: 471-475.
12. Waller, D. M. and R. J. Cook. 1993. Suppression of take-all of wheat seed treatments with *pseudomonads fluorescent*. Phytopathol. 73: 463-469.
13. Walsh, U. F., J. P. Morrissey and F. O'Gara. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: From functional genomics to commerial exploitation. Curr. Opinion in Biotechnol.12: 289-295.
14. Weinberg , E. D. 1977 . Mineral Element Control of Microbial Secondary Metabolism. pp. 286-316 . *In*: E. D. Weinberg, (Ed.), Microorganisms and Mineral . Marcel Dekker Inc., New York .
15. Xu, G. W. and D. C. Gross. 1986a. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppression of potato seed piece decay. Phytopathol. 76: 414-422.
16. Xu, G. W. and D. C.Gross. 1986b. Field evaluation of the interactions among *Pseudomonads fluorescent*, *Erwinia carotovora* and potato yeilds. Phytopathol. 76: 423-430.

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com