بررسی متابولیت های تولید شده توسط چند باکتری آنتاگونیست و تاثیر آنها بر روی دو جدایه قارچ بیماریزای گیاهی *Rhizoctonia solani*

مریم شهرکی[1*]، اصغر حیدری[2] و نادر حسن زاده[3]

[1] زاهدان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سیستان

[2] تهران، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

[3] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت: 86/4/19 تاریخ پذیرش: 87/4/2

چکیده

از جمله مهمترین باکتریهای آنتاگونیستی گونه های مربوط به سرده (سرده) *Bacillus* و *Pseudomonas* می‌باشند. جهت بررسی مکانیزمهای مؤثر در بازدارندگی رشد دو جدایه از قارچ *Rhizoctonia solani* در اثر تولید متابولیت های ضد قارچی، سیدروفور و سیانید هیدروژن، جدایه های باکتریایی Sch-5 و Sch-3 متعلق به سرده Bacillus که تأثیر خوبی در کنترل جدایه قارچی RsK وجدایه های Ssh-4، Sch-3 و Ssh-3 متعلق به سرده Bacillus و Ckk-1 متعلق به سرده Pseudomonas با بهترین تاثیر در کنترل جدایه قارچی RsA در شرایط گلخانه، مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمون بررسی تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار، اندازه گیری قطر رشد میسلیوم قارچ در برابر باکتریها انجام شد. آزمون مذکور در جدایه قارچی RsK با 3 تیمار در 3 تکرار و در جدایه RsA با 5 تیمار در 3 تکرار انجام شد. اندازه گیری میانگین قطر کلنی جدایه قارچی RsA پس از 5 روز، نشان داد که درصد بازدارندگی جدایه های باکتریایی Sch-3، Ssh-3، Ckk-1 و Ssh-4 و شاهد به ترتیب 58/8، 62/2، 74/4، 83/3 و 0 می باشد. همچنین در صد بازدارندگی جدایه های Sch-5 و Sch-3 بر جدایه قارچی RsA 8/ 68 و60 بود. جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* در شرایط فقدان یا کمبود آهن سه ظرفیتی (0 و 25 میکرومول $FeCl_3$) قادر به تولید مواد سیدروفور بود. نتایج نشان داد که هر چه مقدار آهن سه ظرفیتی کمتر باشد (صفر میکرومول) مقدار تولید مواد سیدروفور بیشتر و در نتیجه مقدار هاله بازدارندگی جوانه زنی اسپورهای قارچ بیشتر می شود. آزمونی دیگر به منظور بررسی تولید متابولیتهای ضد قارچی فرار با 3 تیمار در 3 تکرار برای جدایه قارچی Rsk و 5 تیمار در 3 تکرار برای جدایه قارچی RsA شد، نشان داد که جدایه قارچی RsK در حضور جدایه های باکتریایی Sch-5 و Sch-3 حدود 8 میلی متر و جدایه قارچی RsA در حضور جدایه های باکتریایی Ckk-1، Ssh-4، Sch-3 و Ssh-3 به ترتیب 8 ، 8 ،10 و12 میلی متر رشد داشت که در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی دار بود. همچنین در بررسی توانایی تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه های باکتریایی شد، تنها جدایه Ckk-1 سیانید هیدروژن تولید و سایر جدایه ها فاقد این توانایی بودند. نتایج به دست آمده از آزمونهای فوق نشان داد که تمامی جدایه های باکتریایی قادر به تولید متابولیتهای ضد قارچی فرار و غیر فرار و جدایه سودوموناس فلورسنت قادر به تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور می باشد که از مهمترین مکانیسم های باکتریهای آنتاگونیست بر علیه قارچهای بیماریزای گیاهی است.

واژه های کلیدی: باکتریهای آنتاگونیست، سیانید هیدروژن، سیدروفور و متابولیتهای ضد قارچی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 09155441724، پست الکترونیک: maryam_shahraki@yahoo.com

مقدمه

Andrews در 1992 کنترل بیولوژیکی را نوعی اکولوژی کاربردی دانست به طوری که مطابق آن می بایستی یک جامعه میکروبی را با هدف مناسب ساختن آن برای عوامل کنترل کننده و نا مناسب کردن آن برای عامل بیماریزا مدیریت نمود (7). اساس کنترل بیولوژیک بر پایه پدیده آنتاگونیسم قرار دارد که از طریق مکانیسمهای مختلفی اعمال می شود. و بر اساس تعریف Cook & Baker در 1988 مفهوم پدیده آنتاگونیسم عبارت است از برهم زدن یا ممانعت از رویدادهای زندگی (رشد، تکثیر، آلوده سازی، گسترش و پایداری) یک موجود زنده توسط موجودات زنده دیگر (9).

یک عامل کنترل بیولوژیکی که بتواند به خوبی از گیاه در برابر بیماریهای خاکزی حفاظت نماید باید پارازیت مورد نظر را بواسطه منع توسعه آن، ضربه پذیر ساختن آن در برابر دیگر اعضاء میکروفلور خاک، یا نابودی سریع آن تحت کنترل در آورد. عامل کنترل بیولوژیک ممکن است این کار را از طریق رقابت برای غذا، یا جایگاههای بالقوه قابل نفوذ در میزبان، تولید آنتی بیوتیکها یا آنزیمهای لیز کننده و یا پارازیتیسم انجام دهد و نیز عامل کنترل کننده باید خود، در تراکمی مؤثر و در جایگاهی مناسب مستقر گردد، تا امکان کنترل موثر پارازیت بوجود آید (2 و 5).

گزارشات منعکس شده در ژورنالهای علمی کشاورزی حکایت از اثرات امید بخش این عوامل در شرایط گلخانه ای وحتی مزرعه ای دارد و اینکه عوامل مذکور می توانند در برخی موارد آماده ارائه برای تولید انبوه و استفاده در کشاورزی گردند. میکروارگانیسم های رقیب در ریزوسفر قادر هستند که در ریزوسفر گیاهان، تکثیر و گسترش یابند، بدین جهت در مقایسه با مواد شیمیایی می توانند در طی مدت زمان طولانی گیاهان را در مقابل عوامل خاکزاد محافظت نمایند، در این میان آنتاگونیست های باکتریایی از جایگاه ویژه ای برخوردارند، چرا که از طریق مکانیزمهای مختلف (تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی، سیدروفور، کلونیزه نمودن ریشه و...) قادر به مهار نمودن عوامل بیماریزا می باشند (1).

در این تحقیق تولید سیانید هیدروژن، سیدروفور، متابولیتهای ضد قارچی فرار و غیر فرار توسط باکتریهای آنتاگونیستی قادر به کنترل قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه در شرایط گلخانه ای، مورد بررسی قرار گرفت و برخی مکانیزمهای مؤثر در بازدارندگی قارچ مورد نظر شناسایی شد.

مواد و روشها

جمع آوری و نام گذاری جدایه های باکتریایی: برای جمع آوری جدایه های باکتریایی، نمونه های مختلفی از خاکهای مناطق چغندر کاری و مزارع پنبه مورد استفاده قرار گرفت. این نمونه ها از ناحیه ریزوسفر بوته های سالم واقع در مجاورت بوته های آلوده جمع آوری و نگهداری شده بصورت کلکسیون آزمایشگاه نباتات صنعتی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی تهران مجزا شد. کدگذاری جدایه ها بر اساس نام محل جداسازی انجام گرفت، بر این اساس جدایه های باکتری مزارع چغندر قند چناران - خراسان با پیشوند Sch، جدایه های باکتری مزارع چغندر قند اطراف شاهرود - سمنان با پیشوند Ssh و جدایه های باکتری مزارع پنبه کار کنده - گرگان با پیشوند Ckk، کدگذاری شد.

نگهداری باکتریها: برای نگهداری باکتریها، از هر کدام از جدایه ها سوسپانسیون غلیظی از باکتری در محلول 0/1 مولار سولفات منیزیوم در لوله های درپیچ دار کوچک تهیه و در دمای 4 درجه سانتی گراد یخچال نگهداری شد (25) . همچنین برای کلیه کارهای آزمایشگاهی کشت تازه باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار مورد استفاده قرار گرفت.

غربال نمودن (Screening) **باکتریهای آنتاگونیست علیه قارچ *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه** (*In vitro*): در طول این آزمون همواره خواص یک آنتاگونیست خوب را در نظر گرفته، و در این جهت آزمونهایی چون آزمون کشت متقابل و آزمون چهار نقطه ای انجام پذیرفت.

آزمون چهار نقطه ای: به منظور بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتریها در شرایط آزمایشگاهی این آزمون مطابق با روش Keel و همکاران در 1996 انجام پذیرفت. در این آزمون 4 جدایه مختلف با فواصل معین روی پتری دیشهای حاوی محیط کشت PDA و KMB بصورت نقطه ای کشت و مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 25 درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از آن یک دیسک به قطر 6 میلی متر از کشت تازه قارچ *R. solani* و از حاشیه کلنی قارچ از روی محیط کشت PDA برداشته شد و بطور وارونه در وسط هر یک از پتری دیشهای حاوی PDA (Potato Dextrose Agar) و KMB (Proteose Pepton 2%, K_2HPO_4 0.15%, $MgSo_4$. $7H_2o$ 0.15% glycerol 1.5% - agar 1.5%, D. H_2O 100ml) قرار گرفت. برای هر تیمار سه تکرار بکار رفت. پتری دیشها بمدت 2 تا 7 روز در دمای 24 درجه سانتی گراد نگهداری شد. وجود هاله بازدارندگی بدون در نظر گرفتن شعاع آن به عنوان واکنش مثبت بازداری از رشد قارچ تلقی و درصد بازدارندگی باکتریها با توجه به فرمول زیر محاسبه شد. لازم به ذکر است که محیط کشت PDA جهت ارزیابی تولید متابولیتهای ضد قارچی و محیط KMB جهت تولید سیدروفور مورد استفاده قرار گرفت.

$$\text{درصدبازدارندگی} = \frac{\text{قطرکلنی قارچ در پتری دیش محتوی جدایه باکتری} - \text{قطرکلنی شاهد}}{\text{قطرکلنی شاهد}} \times 100$$

آزمون کشت متقابل (Dual culture) : برای محاسبه دقیق فاصله بازدارندگی هر یک از جدایه های باکتری مورد نظر و به دلیل جلوگیری از اثر تداخلی سایر جدایه ها همانند آزمون قبلی این روش نیز مورد آزمایش قرار گرفت. بدین ترتیب هر جدایه باکتری در وسط یک تشتک پتری 9 سانتی متری با محیط کشت NA را بصورت خطی کشت داده و پس از رشد باکتری دو دیسک 0/8 سانتی متری از حاشیه کشت قارچ *R. solani* با فاصله مساوی از خط باکتری بر روی سطح آگار قرار داده شد. پس از آنکه دو کلنی قارچ درون تشتک پتری شاهد در مدت 72 ساعت به هم رسیدند، میزان بازدارندگی در مقایسه با شاهد اندازه گیری شد (19). این آزمون در 4 تکرار و برای 2 جدایه قارچی متفاوت RsA و RsK بطور مجزا انجام و درصد بازدارندگی هر یک از باکتریها با توجه به فرمول بالا محاسبه شد.

شناسایی باکتریهای آنتاگونیست: جدایه هر باکتری که بهترین تأثیر را در کنترل بیماری رایزوکتونیایی مرگ گیاهچه چغندرقند در آزمونهای گلخانه ای داشت، بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی و مرفولوژیکی موجود در منابع وکلید شناسایی باکتریها تا حد سرده مورد شناسایی قرار گرفت (20).

آزمون گرم: این رنگ آمیزی کلیدی نقش بسیار مهمی در تفکیک اولیه باکتریها به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی دارد. در این رنگ آمیزی سه مرحله شاخص وجود دارد که مراحل انجام آن به شرح زیر است:

قطره سوسپانسیون باکتری روی لام پخش، و پس از خشک شدن تثبیت گردید. رنگ آمیزی اول – با محلول کریستال ویوله (بمدت یک دقیقه) و شستشوی با آب، رنگ آمیزی دوم – با محلول لوگال (Iodine) به مدت یک دقیقه و سپس اضافه نمودن چند قطره اتانول 95 درصد برای رنگ زدایی رنگ اول و شستشو با آب، رنگ آمیزی سوم – با سافرانین (به مدت 45 ثانیه) و شستشوی مجدد با آب انجام، و نمونه ها در زیر میکروسکوپ با بزرگ

نمایی 100X (باکتریهای گرم منفی به رنگ قرمز و باکتریهای گرم مثبت به رنگ آبی) مشاهده شد.

اکسیژن و رشد هوازی و غیر هوازی در باکتریها (o/F) : برای انجام اینآزمون از روش Hagh& LeiFson; 1953 استفاده شد. محیط کشت پایه شامل پپتون: 2 گرم، کلرور سدیم: 5 گرم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات: 0/3 گرم، آگار: 3 گرم و 3 میلی لیتر بر موتیمول بلو (1 درصد) در یک لیتر آب با PH = 7 تهیه که پس از اتوکلاو محلول گلوکز 1 درصد استریل به آن اضافه شد. این محیط در حجم 3 – 5 میلی لیتر در لوله های آزمایش استریل تقسیم گردید. برای هر جدایه باکتری دو لوله انتخاب شد که پس از کشت باکتری به صورت Stab به یکی از لوله ها پارافین مایع استریل جهت غیر هوازی ساختن آن اضافه و بین 48–24 ساعت به صورت در بسته در انکوباتور نگهداری شد (3).

هیدرولیز نشاسته (Starch hydrolysis): برای انجام این آزمون به محیط کشت نوترینت آگار نشاسته 0/2 درصد محلول در آب اضافه و پس از اتوکلاو در پتری دیش استریل ریخته شد. پس از کشت باکتریها و انکوباسیون به مدت 48–24 ساعت مقداری محلول Iodine به سطح پتری اضافه شد. تغییر رنگ محیط به آبی تیره نشانه عدم هیدرولیز نشاسته و عدم تغییر رنگ به منزله هیدرولیز نشاسته می باشد (3).

هیدرولیز ژلاتین (Gelatin hydrolysis): در این آزمون کشت باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی 4/ درصد ژلاتین انجام شد. پس از انکوباسیون به سطح محیط مقداری محلول اسیدی کلرور جیوه اضافه شد (3). در صورتیکه در زمینه شیری رنگ محیط کشت هاله بی رنگ در اطرف کشت باکتری ظاهر شود، این امر نشانگر وجود فعالیتهای آنزیمی gelatinase در باکتریهای مورد بررسی است.

اکسیداز: برای انجام این آزمون ابتدا محلول 1 درصد ماده شیمیایی Tetramethyle – P - phenylenediamine diyhydrochloride را در آب تهیه و کاغذ صافی را با آن در یک پتری دیش مرطوب نموده، سپس با لوپ کلنی های باکتریهای تازه کشت شده را روی کاغذ صافی آغشته تماس داده و قدری کشیده شد(3). در صورتی که بلافاصله پس از تماس کلنی با کاغذ صافی، رنگ محل تماس تبدیل به رنگ قرمز شود، آزمون اکسیداز برای باکتری مربوطه مثبت و در صورت عدم تغییر رنگ، واکنش اکسیداز منفی تلقی گردید.

تولید لوان (Levan Formation): برای انجام این تست به محیط کشت پایه مقدار 5 درصد ساکارز به عنوان منبع کربنی اضافه شد و باکتریها روی پتری دیشهای حاوی محیط کشت مذکور کشت شد (3). در اثر رشد، کلنی های با باکتری لوان مثبت، به حالت گنبدی شکل نیمه شفاف (مرواریدی) ظاهر می گردند.

رشد در 41 و 4 درجه سانتی گراد: جدایه های باکتری، در محیط کشت نوترینت آگار جهت تحمل دماهای فوق بصورت خطی کشت و در انکوباتور با دمای 41 و 40 درجه سانتی گراد نگهداری شد (3).

رشد در PH= 5.7: برای انجام این آزمون، pH محیط کشت نوترینت آگار قبل از اتوکلاو به 5/7 رسید و سپس در پتری دیشهای استریل تقسیم و جدایه های باکتری روی آنها کشت داده شد و 24 ساعت در انکوباتور با دمای 25 درجه سانتی گراد نگهداری شد (3).

بررسی تولید برخی متابولیتهای ضد قارچی مؤثر با خاصیت آنتاگونیستی: جهت بررسی مکانیزمهای مؤثر در بازدارندگی رشد دو جدایه قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند (کرمانشاه و آذربایجان) که به اختصار Rsk و RsA نامیده می شود، دو جدایه باکتری Sch-5 و Sch-3 متعلق به سرده Bacillus با تأثیر خوب در کنترل

جدایه قارچ RsK در شرایط گلخانه و جدایه های Ssh-4 ، Ssh-3 و Sch-3 متعلق به سرده Bacillus و نیز جدایه Ckk-1 متعلق به سرده Pseudomonas مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تأثیر متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار بازدارنده توسط جدایه های باکتری

برای اثبات تولید این متابولیتها با اندکی تفاوت مطابق روش Krous و Lopper در 1992، 400 میکرو لیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه به محیطهای کشت PDA و NAG (آگار غذایی محتوی گلوکز 3 درصد) اضافه شد(16). با تکان دادن پتری دیش در جهات مختلف سوسپانسیون کاملاً در سطح پتری دیش پخش گردید، پس از 3 روز نگهداری در انکوباتور با دمای 25 درجه سانتی گراد با استفاده از اسکالپل باکتریها از سطح پتری دیش تراشیده شد. سپس سطح آنها با میله شیشه ای و آب مقطر استریل از باکتریهای باقیمانده پاک شد، پتری دیشها مدت 30 دقیقه در معرض پنبه آغشته به کلروفرم قرار گرفتند و درب آنها بمدت حدود 10 دقیقه تحت شرایط استریل زیر هود باز گذاشته شد تا بخار کلروفرم کاملاً از سطح محیط خارج شود، آنگاه یک قطعه 6 میلی متری از حاشیه کشت تازه قارچ *Rhizoctonia solani* در وسط پتری دیش بطور وارونه قرار داده شد. سپس پتری دیشها به انکوباتور با دمای 25 درجه سانتی گراد منتقل، و اندازه گیری قطر رشد میسلیوم پس از 5 روز انجام شد.

در پتری دیش شاهد پس از شستن با میله شیشه ای و آب مقطر استریل و نیم ساعت قرار گیری در معرض بخار کلروفرم، یک قطعه قارچ *Rhizoctonia solani* قرار گرفت، این آزمون در 3 تکرار انجام و بازدارندگی رشد میسلیوم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصدبازدارندگی} = \frac{\text{قطر رشد میسلیوم در هر تیمار} - \text{قطر رشد میسلیوم در پتری دیش شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیوم در پتری دیش شاهد}} \times 100$$

بررسی تولید متابولیت های ضد قارچی فرار بازدارنده توسط جدایه‌های باکتریایی: برای انجام این آزمون از روش Krous و Lopper (1992) استفاده شد، ابتدا سوسپانسیون کدری از کشت 72 ساعته یک جدایه تهیه و سپس مقدار 200 میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور روی محیط NAG (آگار غذایی حاوی 2 درصد گلوکز) پخش شد(16). پتری دیشها به مدت 24 ساعت در انکوباتور با دمای 25 درجه سانتی گراد قرار گرفت و همزمان یک قطعه قارچ به قطر 6 میلی متر بطور وارونه در وسط یک پتری دیش حاوی PDA قرار داده شد و پس از برداشتن درب دو محیط کشت، دو پتری دیش در زیر هود استریل مقابل هم قرار داده شد، به طوری که پتری دیش حاوی قارچ در بالا و بطور وارونه روی محیط کشت NAG قرار گرفت. درب پتری دیشها با نوار پارافیلم کاملاً مسدود گردید و درون انکوباتور با دمای 25 درجه سانتی گراد بمدت 5 روز نگهداری شد. هنگامیکه قطر کلنی قارچ در پتری دیش شاهد تمام سطح محیط کشت PDA را پوشش داد (یک هفته بعد) نتایج همانند آزمون تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار ارزیابی گردید، در این آزمون نیز برای هر جدایه باکتری 3 تکرار در نظرگرفته شد.

بررسی تولید سیانید هیدروژن: برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم و همکاران در 1987 استفاده گردید (6). ابتدا برای هر جدایه سه پتری دیش حاوی محیط نوترینت آگار تهیه و داخل هر پتری دیش 100 میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل 2 درصد کربنات سدیم و 5 درصد اسید پیکریک) در قسمت درب پتری دیش قرار داده شد و درب پتری دیش با نوار پارافیلم مسدود گردید تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی از جمله HCN جلوگیری شود. آنگاه این پتری دیشها بصورت واژگون در دمای 27 درجه سانتی گراد در

انکوباتور به مدت یک هفته نگهداری شد. درصورت تولید HCN توسط باکتری رشد یافته روی سطح محیط کشت تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و آجری دیده می شود که نشانه تفاوت در تولید HCN توسط باکتری می باشد. رنگ کرم بیانگر حداقل مقدار تولید HCN و رنگ آجری مبین حداکثر تولید HCN می باشد.

جدول 1- مقایسه درصد بازدارندگی قطر کلنی جدایه قارچی Rs (K) و Rs (A) توسط جدایه های باکتریایی درشرایط آزمایشگاهی(In vitro)

تیمارها	درصد بازدارندگی از رشد جدایه قارچی Rs K	درصد بازدارندگی از رشد جدایه قارچی Rs A
شاهد	0	0
Ssh-2	80	10
Sch-10	80	38
Sch-3	80	81
Sch-8	79	51
Ssh-1	76	31
Sch-5	72	49
Sch-2	69	24
Ssh-5	64	67
Sch-4	64	69
Sch-1	63	36
Ssh-4	63	58
Ckk- 2	53	53
Ssh-3	49	66
Ckk-1	48	79
Sch-6	44	18
Sch-11	42	50
Ckk-3	38	76
Sch-13	33	22
Sch-7	31	18
Sch-14	27	27
Sch-12	27	27
Sch-9	22	38

کلیه اعداد مندرج در جدول میانگین 4 تکرار می باشد.

بررسی تولید سیدروفور: با توجه به نقش مهم سیدروفورها بعنوان یکی از مکانیزمهای بازدارندگی آزمایش زیر مطابق روش Weller و Cook (1983) برای بررسی تولید آنها بوسیله جدایه فلورسنت (Ckk-1) انجام گرفت(25). جدایه مورد آزمایش روی محیطهای KB وNAG (آگار غذایی، گلوکز 5 درصد)، مخلوط با غلظتهای 200، 100 و 25 میکرومول کلرید آهن ($FeCl_3$)، کشت داده و به مدت 48 ساعت در حرارت مناسب نگهداری شد. سپس سوسپانسیون آبی اسپورهای قارچ *Geotrichum candidum* از یک کشت 48 ساعته روی محیط PDA روی پتری دیشهای حاوی باکتری اسپری گردید. عدم رشد قارچ در اطراف باکتری نشانه تولید سیدروفور است. شرح کشت به این شکل می باشد که جدایه باکتری به صورت سه نقطه روی محیط کشت قرار داده شد و بعد از 24 ساعت به وسیله اسپورهای قارچ مذکور اسپری گردید.

جدول 2- نتایج آزمونهای بیوشیمیایی روی جدایه های مورد مطالعه(*Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus spp*)

آزمونهای شناسایی	Ckk-1	Sch-5	Sch-3	Ssh-4	Ssh-3
واکنش گرم	−	+	+	+	+
تشکیل Endospores	−	+	+	+	+
رشد هوازی	هوازی	بی هوازی/ هوازی	بی هوازی/ هوازی	بی هوازی/ هوازی	بی هوازی/ هوازی
خاصیت فلورسنت روی KB	+	−	−	−	−
تشکیل کلنی زرد روی YDC (Yeast extract – dextrose – $caco_3$)	−	−	−	−	−
اکسیداز	+	ND	ND	ND	ND
تولید لوان	+	ND	ND	ND	ND
هیدرولیز نشاسته	−	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+	+
رشد در 4 درجه سانتیگراد	+	−	−	−	−
رشد در 41 درجه سانتیگراد	−	+	+	+	+
رشد در PH=5/7	ND	+	+	+	+

نتایج

نتایج آزمون بازدارندگی رشد کلنی قارچ *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاهی: با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون کشت متقابل، جدایه قارچی RsK در تیمارهای برخی از جدایه های باکتری دارای بیشترین محدودیت رشد بود. بر این اساس 10 جدایه باکتری Ssh-2، Sch-10، Sch-3، Sch-8، Ssh-1، Sch-5، Sch-2، Ssh-5، Sch-4 و Sch-1 دارای بالاترین درصد بازدارندگی بود و در شرایط آزمایشگاهی بیشترین تأثیر را روی جلوگیری از رشد کلنی جدایه قارچی Rs K داشت. سایر جدایه های باکتری که بیشترین تأثیر را درکاهش قطر کلنی جدایه قارچی RsA داشتند، عبارت بودند از جدایه های Sch-3، Ckk-1، Ckk-3، Sch-4، Ssh-5، Ssh-3، Ssh-4، Sch-8، Sch-11 و Sch-5 (جدول 1)که جهت بررسیها و آزمایشهای گلخانه ای مورد استفاده قرار گرفت (شکل 2 و 3).

شناسایی جدایه های باکتری برتر: با استفاده از روشهای باکتری شناسی تعلق جدایه های Sch-5، Sch-3، Ssh-4 و Ssh-3 به سرده Bacillus مشخص شد. همچنین جدایه Ckk-1 به سرده Pseudomonas تعلق داشت (جدول 2).

مکانیسم های بازدارندگی جدایه های Bacillus: تأثیر متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار جدایه های باکتری در جلوگیری از رشد میسلیوم دو جدایه قارچی از رشد هر دو جدایه قارچی RsA و RsK در اثر تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار تمام جدایه های باکتری Bacillus جلوگیری به عمل آمد (جدولهای 3، 4، 5 و 6).

جدول 3- میانگین قطر کلنی قارچ RsA پس از 5 روز روی محیط NAG در آزمون تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار

جدایه ها	شاهد	Sch-3	Ssh-3	Ssh-4
متوسط قطر کلنی RsA	90	37	34	15
درصد بازدارندگی	0	٪58	٪62	٪83

اعداد متن جدول میانگین 3 تکرار است

جدول 4- میانگین قطر کلنی قارچ RsK روی محیط NAG پس از 5 روز در آزمون تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار

جدایه ها	شاهد	Sch-5	Sch-3
متوسط قطر کلنی قارچ RsK برحسب mm	90	28	36
درصد بازدارندگی	0	٪68	٪60

اعداد متن جدول میانگین 3 تکرار است

جدول 5- میانگین قطر کلنی قارچ RsA روی محیط PDA پس از 5 روز در آزمون تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار

جدایه ها	شاهد	Sch-3	Ssh-3	Ssh-4
متوسط قطر کلنی RsA	86	31	31	13
درصد بازدارندگی	0	٪63	٪63	٪84

اعداد متن جدول میانگین 3 تکرار است

جدول 6- میانگین قطر کلنی قارچ RsK روی محیط PDA پس از 5 روز در آزمون تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار

جدایه ها	شاهد	Sch-5	Sch-3
متوسط قطر کلنی قارچ RsK برحسب mm	86	23	23
درصد بازدارندگی	0	٪73	٪62

اعداد متن جدول میانگین 3 تکرار است

همانگونه که مشاهده می گردد، در اثر تولید متابولیت های ضد قارچی غیر فرار توسط جدایه های باکتری مورد استفاده شده، رشد هر دو جدایه قارچی RsK و RsA متوقف شد. در بین جدایه های باکتری فوق جدایه Ssh-4 بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قطر کلنی قارچ RsA داشت. همچنین جدایه باکتری Sch-5 در مقایسه با جدایه باکتری Sch-3 تأثیر بیشتری را در بازدارندگی از رشد کلنی قارچ RsK دارا بود (شکل 4).

تاثیر متابولیت های ضد قارچی فرار در جلوگیری از رشد میسلیوم دو جدایه قارچی: نتایج این آزمون جنبه کیفی داشت، به طوری که در مقابل تمام جدایه‌های باکتری Bacillus هر دو جدایه قارچی مذکور تقریباً محدودیت رشد داشتند. در این میان جدایه قارچی RsK در مقابل جدایه های باکتریایی Sch-5 وSch-3 حدود 8 میلی متر رشد نمود و جدایه قارچی RsA در مقابل جدایه‌های باکتری Ssh-3، Sch-3 و Ssh-4 به ترتیب 8 ، 8 و 12 میلی متر رشد داشت، که در مقایسه با شاهد (متوسط قطر کلنی قارچی 90 میلی متر) اختلاف معنی داری مشاهده می شود و به این ترتیب هر 4 جدایه باکتری مورد آزمون قادرند با تولید متابولیتهای ضد قارچی فرار از رشد جدایه های قارچی مذکور جلوگیری نمایند.

تولید سیانید هیدروژن: نتایج نشان داد که هیچیک از جدایه ها باعث تغییر رنگ کاغذ صافی نشد، در نتیجه

جدایه های باسیلوس قادر به تولید سیانید هیدروژن نمی باشند.

مکانیسم های بازدارندگی جدایه *Pseudomonas fluorescent* تأثیر متابولیت های ضد قارچی غیر فرار باکتری در جلوگیری از رشد میسلیوم جدایه قارچی Rsk

در اثر تولید متابولیت های ضد قارچی غیر فرار توسط جدایه این باکتری از رشد جدایه قارچی RsK جلوگیری به عمل آمد (جدول 7). این جدایه حدود 74 درصد از رشد مسیلیومی قارچ مذکور جلوگیری کرد.

تأثیر متابولیت های ضد قارچی فرار باکتری در جلوگیری از رشد میسلیوم جدایه قارچی Rsk : نتایج این آزمون نشان داد که جدایه قارچ RsK در مقابل جدایه باکتری Ckk-1 10 میلی متر رشد داشت که در مقایسه با شاهد (متوسط قطر کلنی قارچی 90 میلی متر) اختلاف معنی دار است، بنابراین این جدایه قادر است تا با تولید متابولیت های ضد قارچی فرار از رشد جدایه قارچی RsA جلوگیری نماید.

تولید سیدروفور Siderophores: جدایه باکتری Ckk-1 متعلق به *Pseudomonas flluorescens* به عنوان یکی از آنتاگونیست های برتر مورد مطالعه قرار گرفت که در رقتهای 0 و 25 میکرومول کلرید آهن 3 مانع از جوانه زنی آرتروسپورهای قارچ *Geotrichum candidum* شد. عدم وجود هاله بازدارندگی و جوانه زنی قارچ *G candidum* در رقتهای 100 و 200 میکرومول از کلرید آهن 3 حاکی از عدم تولید ترکیبات سیدروفور توسط باکتری در شرایط وفور آهن سه ظرفیتی می باشد. باکتری در فقدان یا کمبود آهن سه ظرفیتی (0 و 25 میکرومول $FeCl_3$) قادر به تولید مواد سیدروفور است (شکل 5)، این مواد با کلاته نمودن آهن و جذب آهن سه ظرفیتی مانع از جوانه زنی اسپورهای قارچ مذکور می شوند. نتایج نشان می دهد هر چه مقدار آهن سه ظرفیتی کمتر باشد (صفر میکرومول) مقدار تولید مواد سیدروفور بیشتر و در نتیجه مقدار هاله بازدارندگی از جوانه زنی اسپورهای قارچ بیشتر می شود (جدول 8). بنابراین جدایه مذکور قادر است در کمبود آهن، سیدروفورهای قوی جاذب آهن را تولید نماید.

تولید سیانید هیدروژن: نتایج نشان می دهد که جدایه Ckk-1 موجب تغییر رنگ کاغذ صافی در مقایسه با شاهد می شود که نشان دهنده تولید سیانید هیدروژن توسط این باکتری می باشد (شکل 6).

بحث

با توجه به شناسایی باکتریها مشخص شد که بهترین عملکردها متعلق به باکتریهای سرده Bacillus می‌باشد. این باکتریها چندین ترکیب ضد میکروبی تولید می کنند. در سال 1986 Loeffler و همکاران دریافتند که باکتری Bacillus قارچ *Rhizoctonia solani* موجود در بسیاری از محصولات را بخوبی کنترل می نماید. این باکتریها ترکیباتی به نام باسیلیسین (Bacilysin) و فنجیامایسین (Fengymycin A , B) شامل یک بخش چربی C18–C15 و یک بخش پپتید (Peptide) حاوی هشت باقی مانده اسید آمینه، تولید می‌کنند. اختلاف بین فنجیامایسین A و B در اینست که نوع B دارای D-alanine و نوع A دارای D-valine می باشد. باسیلیسین از رشد مخمرها و باکتریها جلوگیری می کند و فنجیامایسین مانع از رشد قارچهای ریسه‌ای می گردد. بنابراین استنباط می شود دلیل عملکرد گروه Bacillus در آزمایشات گلخانه ای مسئله فوق باشد (5).

در مورد باکتریهای Pseudomonas نیز در بررسیهایی که در سال 1990 توسط Weller و Thomashow انجام گرفت(24)، بر اهمیت تولید آنتی بیوتیکی بنام Phenazin-1-Carboxylic acid توسط این باکتریها تأکید شد، عامل ضد قارچی دیگر این گروه از باکتریها Anthranilic acid

است که مورد شناسایی این دانشمندان قرار گرفت، علاوه بر این تولید سیدروفور نیز بعنوان عامل دیگری شناخته شد (14 و 15). در بررسیهای بعمل آمده بعضی از باکتریهای Pseudomonas به شدت ریشه ها را کلونیزه نموده و باعث افزایش رشد گیاه می شوند، این افزایش رشد ممکن است از طریق تولید عوامل رشدی حاصل شود. اما یک دلیل مهم برای این واکنش، شکست رقیبان پاتوژنی در ریزوسفر و متعاقباً حفاظت ریشه‌ها علیه بیماری توسط بعضی باکتریها است، اینگونه ارگانیسم ها باید بتوانند از محیط ریزوسفر بخوبی و بطور مؤثر بهره برداری نمایند و یا بقول برخی از محققین، باید شایستگی ویژه ریزوسفر را داشته باشند (2، 5 و 23).

جدول 7- میانگین قطر کلنی قارچ RsA پس از 5 روز روی محیط NAG در آزمون تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار

جدایه	Ckk-1	شاهد
متوسط قطر کلنی قارچ RsA بر حسب mm	23	90
درصد بازدارندگی	٪74	0

اعداد متن جدول میانگین 3 تکرار است

جدول 8 – مقایسه هاله بازدارندگی *Geotrichum. candidum* توسط جدایه باکتری Ckk-1 (سودوموناس فلورسنت) در محیطهای کشت KB با غلظتهای 200 و 100 و 25 و 0 میکرومول کلرید آهن ($FeCl_3$)

رقت Fecl3 میکرومول	0	25	100	200
جدایه Ckk-1	14	7	0	0
شاهد فاقد باکتری	0	0	0	0

نتایج حاصل از آزمونهای تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار روی محیط NAG (آگار غذایی محتوی گلوکز 3 درصد) بر اساس هاله بازدارندگی مطابق روش Weller و Cook در سال 1983 (24) و کاهش رشد قطری میسلیوم مطابق با روش Krous و Lopper در سال 1990 نشان داد که تمام 5 جدایه مورد بررسی قادر به تولید متابولیتهای ضد قارچی غیر فرار روی هر دو نوع محیط کشت PDA و NAG (محتوی گلوکز 3 درصد) هستند. همچنین در بررسی انجام شده مشخص گردید که جدایه های آنتاگونیست روی محیطهای غذایی مختلف تاثیر متفاوتی از نظر میزان تاثیر ترکیبات فرار در بازداری از رشد ریسه ای قارچ نشان می دهند. تولید متابولیتهای ضد قارچی مختلف توسط اکثر سویه های *Pseudomonas fluorescens* و گونه های *Bacillus* مورد استفاده در کنترل بیولوژیک بعنوان مکانیزم اصلی جلوگیری از رشد قارچ و کنترل بیماری ذکر شده است (18 و 19). کراس و لوپر (Kraus and Loper., 1990) در تحقیق خود گزارش کردند که جدایه های "سودوموناس فلورسنت" روی محیط کشت تولید متابولیتهای ضد قارچی می کنند. همچنین در بررسیهای توماشو و ولر در 1990 (23) بر مکانیسم های اصلی کنترل بیماری پاخوره توسط دودمان 79 -2 باکتری P. fluorescens مشخص شد که آنتی بیوتیک فنازین – 1– کربوکسیلیک اسید نقش اصلی را دارد. تحقیقات انجام شده توسط حمدان و همکاران (Hamdan et al., 1991) ، نشان داد که تولید آنتی بیوتیک فنازین – 1– کربوکسیلیک اسید توسط جدایه 79 -2 باکتری *P. fluorescens* در بازدارندگی بیماری پاخوره گندم از نقش بسیار مهم تری نسبت به تولید سیدروفور پایووردین برخوردار است(4).

آزمون تولید سیدروفور و جلوگیری از جوانه زنی اسپورهای قارچ *Geotrichum candidum* در رقتهای مختلف کلرید آهن 3 نشان داد که جدایه سودوموناس فلورسنت مورد مطالعه قادر به تولید سیدروفور بود، بطوریکه با افزایش غلظت یون آهن از میزان هاله بازدارندگی از جوانه زنی اسپورهای قارچ کاسته شد. کلوپر و همکاران در 1980 (14) برای نخستین بار بر اهمیت سیدروفورها بعنوان یکی از مکانیسم های مهم آنتاگونیستی باکتریها علیه بیمارگرهای گیاهی پی بردند. شر و بیکر در 1980 کنترل بیولوژیکی پژمردگی فوزاریومی ترب با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp *conglutinans* بوسیله سودوموناسهای فلورسنت را به تولید سیدروفور توسط باکتریها و رقابت برای یون آهن نسبت دادند(21). سیدروفورها بعلت جذب آهن سه ظرفیتی و انتقال آن به ریشه های گیاه خصوصاً در خاکهایی که دچار کمبود آهن می باشند سبب کنترل بیماری می شوند. در خصوص نقش سیدروفورها در محدود شدن رشد و فعالیت قارچ *R. solani* نیز گزارشاتی وجود دارد. (12) وجود آهن برای رشد هیف ضروریست، هر عاملی که از دسترسی میکروارگانیسم ها به آهن موجود در محیط ممانعت به عمل آورد در واقع اکولوژی میکروارگانیسم را تغییر داده است. سیدروفورها ترکیبات خارج سلولی (Exteracellular) با وزن مولکولی کم هستند که میل ترکیبی بالایی نسبت به آهن فریک (سه ظرفیتی) دارند (13).

رقابت برای آهن بعنوان راهی برای بازداشتن بیماری، حداقل برای تعدادی از بیماریها توجه خاصی را به خود جلب نموده است. آهن خیلی سخت در آب حل می شود و بهمین دلیل غالباً برای گیاهان و میکروارگانیسم ها محدود کننده می باشد. گیاهان و میکروارگانیسم ها به واسطه ترکیباتی که به آهن متصل می شوند و سیدروفور نام دارند، این عنصر را به دست می آورند. این ترکیبات لیگاندهایی با وزن مولکولی کم و تقریباً ویژه کسب آهن بوده، که از طریق آنها با تنش حاصل از کمبود آهن مقابله می گردد. آهن با تمام فراوانی در خاک بطور آزاد و محلول در PH قلیایی یافت نمی شود، بنابراین در شرایط قلیایی وقتی دسترسی به آهن محدود می شود، میکروارگانیسم ها در صورت نداشتن یک سیستم جذب مناسب آهن مثل سیدروفور از آهن محروم می ماند. در واقع پیوند سیدروفورها با آهن سه ظرفیتی آن را به شکل غیر قابل استفاده برای عامل بیماریزا مبدل می نماید و در نتیجه از تعداد و یا میزان فعالیت پاتوژن کاسته می شود. شواهد ناشی از نقش سیدروفورهای تولید شده سودوموناس های فلورسنت در محدود شدن بیماری و افزایش رشد گیاه بر پایه مشاهدات ذیل استوار است:

1) توقف فعالیت آنتاگونیستی سودوموناسهای محرک رشد گیاه در شرایط طبیعی و نیز در محیط آزمایشگاهی با افزودن آهن سه ظرفیتی محلول
2) عدم توانایی موتانت های Sid حاصل از سودوموناس های محرک رشد گیاه در محدود ساختن عوامل بیماریزا، افزایش رشد ریشه و ازدیاد محصول
3) ممانعت سیدروفورهای خالص شده از رشد عوامل بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی و تأثیر مثبت آنها در افزایش رشد گیاه

در بین سودوموناسهای فلورسنت سیدروفورهای تولیدشده توسط سویه های مختلف از نظر ساختمان شیمیایی با یکدیگر متفاوتند (17).

در کل دو تیپ سیدروفور توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند

الف- هیدروکسامیت Hydroxamate

ب- ترکیبات کاتکول Cate chol (14، 15).

در بررسی انجام شده مشخص گردید جدایه های *B. subtilis* تولید سیانید هیدروژن نکرده و نتیجه این تحقیق با تحقیقات کاستریک در 1983 (8) مطابقت دارد، اما

جدایه سودوموناس فلورسنت تولید سیانید هیدروژن نمود. استاتز و همکاران در 1986 (22) مشخص کردند که سودوموناسهای فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان توتون، با تولید سیانید هیدروژن باعث کنترل بیماری ناشی از *Thielaviopsis basicola* می شوند.

Defago و همکاران در 1990 (10) نشان دادند که مکانیزم اصلی بازداری بیماریهای مختلف توسط سویه *Pseudomonas fluorescens* CHAO تولید ماده فرار مذکور توسط این سویه است و متذکر شدند ترکیب مذکور برای قارچها ماده ای سمی به شمار می آید و نیز این ترکیب با تأثیر بر متابولیسم گیاه، موجب انگیزش تشکیل ریشه های مویین فراوان می گردد. همچنین احتمال دادند این ترکیب در افزایش مقاومت گیاه میزبان نیز مؤثر باشد، نکته جالب آنکه تولید HCN توسط سویه *P. fluorescens* CHAO بر اثر حضور عنصر آهن انجام می گیرد. بعبارت دیگر می توان اینگونه نتیجه گرفت که در هنگام کمبود آهن باکتریها ی سودوموناس فلورسنت تولید ترکیب سیدروفور و در شرایطی که عنصر آهن به مقدار کافی در دسترس می باشد تولید HCN می‌کنند و در هر صورت باعث بازداری از رشد و فعالیت عوامل بیماریزای گیاهی می شوند.

در بررسی تأثیر ترکیبات ضد قارچی فرار جدایه های سودوموناس و باسیلوس مشخص گردید که تمامی جدایه ها قادر به بازداری از رشد ریسه ای قارچ روی محیط کشت NAG (آگار غذایی محتوی 2 درصد گلوکز) هستند. فیدامن و روزال در 1993 (11) نشان دادند که علاوه بر ترکیبات غیر فرار، ترکیبات فرار *B. subtilis* نیز در بازداری از رشد *R. solani* و *Pythium ultimum* نقش مؤثری دارند. کیل و همکاران در 1997 nv ترکیبات ضد قارچی فرار جدایه های سودوموناس فلورسنت را بعنوان یکی از مکانیسمهای کنترل بیماریهای قارچی می دانند (12). می توان نتیجه گرفت که در خصوص عدم توانایی جدایه های دیگر در کنترل این بیماری در این آزمایشها شاید عدم توانایی آنها در کلونیزه نمودن ریشه یا تولید اندک مواد ضد قارچی است و در واقع یک مشخصه برای کلنیزه کنندگان ریشه اینست که آنها باید در برابر مکانیسم های دفاعی میزبان مقاومت نمایند. روی سطوح ریشه ها آنزیمهایی وجود دارند که می توانند باعث تولید مواد اکسیژن دار مثل پراکسید هیدروژن و $\overline{O}_2$ شوند؛ بنابراین لازم است کلنیزه کنندگان خود را در برابر این عوامل مصون دارند (10).

منابع

1) احمدزاده، م. و کریمی، ع. 1379، مهار بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی خاک در محیط اطراف ریشه (ریزوسفر) توسط باکتریها (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران، شماره19، 26صفحه.

2) حسن زاده، ن.، 1371، بیوکنترل عوامل بیماریزای خاکزاد گیاهی. مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، سازمان تحقیقات کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران، 179 صفحه.

3) حسن زاده، ن.، 1374، اصول و روشهای باکتری شناسی گیاهی. مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی، چاپ اول، 543 صفحه.

4) سارانی، ش. ر. 1384. کنترل بیولوژیکی قارچ *Rhizoctonia solani Kuehn* ، عامل مرگ گیاهچه کلزا با استفاده از برخی باکتریهای آنتاگونیست. پایان نامه فوق لیسانس دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. 138 صفحه.

5) مژدهی، ح،1373، کنترل بیماریهای گیاهی(ترجمه)، مرکز انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، 514صفحه.

6- Alstrom, S. 1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant Soil 102: 3 –9.

7- Andrews. J. H., 1992, Biologic control in the phylospgere. Ann. Rev. phytopathol. 30, 603 – 635.

8- Castric, K. F. and Castric, P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogonic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 54 (2), 701 – 702.

9- Cook, R.J. and Baker. K.F. 1988. The nature and practice of Biological control of plant pathogens. A P S. press, 539pp.

10- Defago, G., Berling, C – H., Burger, U., Haas, D., Kahr, G., Keel, C., Voisard, C., Wirthner, P. and Wuthrich, B. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: potential applications and mechanisms. In: Hornby D., Cook R. J., Henis Y., Ko W. H., Rovira A. D., Schippers B. and Scott P. R. eds. Biological control of soil – borne plant pathogens CBA. International Wallingford, UK. 479 pp.

11- Fiddamen, P. J. and Rossall, s. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis.* J. Appl. Bacteriol. 74: 119 – 126.

12- Keel, C., and Defago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens : mechanisms and ecological impact. In: Gange, A. c. and Brown, U. K. (eds) Multirotrophic interaction in terrestrial system. Blackwell scientific pub. London, uk. Pp. 27- 46.

13- kirkegaard, J. A., wong, P.T.W. and Desmarchelier., J.M, 1996, Invitro suppression of fungal root pathogens of cereales by brassica tissues. Plant pathology 45, 593-603.

14- kloepper, J.W., leong, J., Teintze, M. and Schroth M.N., 1980 a, pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. Current Microbiology 4,317-320.

15- kloepper, J. w. , leong, J., Teintze, M. and schroth, M.N., 1980 b, enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobbacteria . nature 286, 885-886.

16- Kraus, J. and lopper, J. E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite Production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of Pythium damping- off of cucumber. Phytopathology 82: 264-271.

17- Meyer. J. M, and Hornsperger, J. M., 1978, Role of pyoverdine, the iron – binding fluorescent pigment of *pseudomonas fluorescens*, in iron transport. J. Gen. Microbiol. 107.321- 331.

18- Misaghi, I. J., Grogan, R.G., spearman, L.c., and stowell, L.J. 1981, Antifungal activity of fluorescent pigment produced by flourescent pseudomonads (Abstr.). phytopathoglogy 71, 106.

19- Misaghi, I J., stowell, L. J., Grogan, R. G. and spearman., L. C., 1982, Fungistatic activity water- soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. Phytopothology 72,33-36.

20- Schaad, N. W. 1988. Labaratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed., APSPress, 158pp.

21- Scher, F. M. and Baker, R. 1980. Mechanism of biological control in Fusarium – suppressive soil. Phytopathology 70: 412 – 417.

22-Stutz, E., Defago, G., and Kern, H. 1986. Naturally occuning fluorescent pseudomonad involved in suppression of black root rot tobacco. Phytopathology 76: 181 – 185.

23- Suslow, T.V., Schroch, M. N. and Isaka, M. 1982, Role of root colonizing bacteria in plant growth,In: Mount, M.S. and lacy,G.H.(eds) phytopathogenic prokaryotes, vol. 1 , Academic press , Newyork , USA, pp. 187-223.

24- Thomashow, S. L. and Weller, D. M. 1990. Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take – all disease of wheat. Plant and Soil 129: 93 – 99.

25- Weller. D. M. & Cook, R. J. 1983. Suppression of take – all of wheat by seed treatment with *pseudomonas fluorescent*. Phytopathology 73: 463 – 469.

Investigation of Antibiotic , Siderophore, volatile metabolites production by Bacillus and Pseudomonas Bacteria

Shahraki M.[1], Heydari A.[2] and Hasanzadeh N.[3]

[1]**Agricultural and Natural Sorces Research Center of Sistan, Zahedan, I.R. of IRAN**

[2] **Iranian Research Institute of Plant Protection Tehran, I.R. of IRAN**

[3] **Islamic Azad university, Science & Research Branch, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

Different species of Bacillus and Pseudomonads are among the most important bacterial antagonists that are capable of controlling phytopathogenic fungi and bacteria. In the green house experiments, 5 bacterial isolates belonged to Bacillus (Sch-5،Sch-3، Ssh-4,Ssh-3) and Pseudomonads Ckk-1 which showed higest effectiveness in controling of *Rhizoctonia solani* (isolates RsK and RsA) were selected. In experiment for investigation of Antibiotic production percent inhibiton of mycelial growth of R solani by bacterial isolates was determined.This experiment carried out for RsK isolate in 3 treatments(2 bacterial isolates and control) with 3 replications and for RsA in 5 treatments (include 4 bacterial isolates and control) with 3 replications. Growth of RsA on NAG was determined 5 days later.The results showed that Sch-3،Ssh-3، Ckk-1،Ssh-4 inhibitory effect against RsA were 58/8% .62/2% .74/4% .83/3% respectively. Isolates Sch-3 and Sch-5 inhibitory effect were 68/8% and 60% against RsA respectively. In another experiment, to study volatile metabolites produtions in 3 treatments (2 bacterial isolates and control) with 3 replications for RsK and in 5 treatments (4 bacterial isolates and control) with 3 replications for RsA. The results indicated that fungal isolate RsK growth was about 8mm against bacterial isolates Sch-5, Sch-3 and fugal isolate RsK against Ckk-1, Ssh-4, Sch-3, Ssh-3 was 8, 8, 10,12mm respectively. there were significant differences among control and other treatments.The over all results indicated that all bacterial isolates could produce volatile and non-volatile metabolites and Ckk-1 isolate of Pseudomonas was capable of siderophore and hydrogen cyanide production which are their most important mode of action against plant pathogenic microorganisms.

Keywords: Antagonistic bacteria, hydrogen cyanide, siderophore and antimicrobial metabolites.