Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤١، ١٣٨٤

تاثیر آنتاگونیستهای باکتریایی در کنترل بلایت سنبله گندم*

Effect of antagonistic bacteria on fusarium head blight of wheat

عبدالرضا فروتن، حشمت‌اله رحیمیان و عزیزاله علیزاده**

مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

دریافت ١٣٨٢/١٢/٦ پذیرش ١٣٨٤/٤/١٥

چکیده

بلایت سنبله گندم ناشی از گونه‌های مختلف *Fusarium* از بیماری‌های مهم این محصول در استان‌های شمالی ایران می‌باشد. در این تحقیق کارایی باکتری‌های آنتاگونیست و برخی قارچکش‌ها در کنترل این بیماری، مورد ارزیابی قرار گرفته است. از ٨٠ نمونه سنبله آلوده جهت جداسازی بیمارگر و ٢٩٠ نمونه کامل گندم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف مازندران برای بازیافت باکتریهای اپی‌فیت استفاده گردید. از ١٣٢ سوش باکتری جدا شده، ٣٢ سوش دارای

* بخشی از نتایج طرح تحقیقات ملی تحت عنوان: امکان کنترل بیولوژیکی بیماری بلایت خوشه گندم با استفاده از میکروارگانیسمهای آنتاگونیست (شماره ثبت ١٠٤١).

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

قابلیت بازدارندگی از رشد کلنی قارچ *F. graminearum* در آزمایشات درون شیشه‌ای بود. این سوش‌ها متعلق به گونه‌های مختلف *Bacillus* و *Pseudomonas* بوده و برحسب مناطق جمع‌آوری شده (قراخیل، فیروزکنده، بایع‌کلا، دشت‌ناز، ساری، جویبار و نکا)به ترتیب با حروف N, J،S،D،B،F،G کدگذاری شدند. از بین آنها سوش‌های B1، N5 ، S2، B4 باکتری باتوجه به قطر هاله بازدارندگی به عنوان سوش‌های برتر و جدایه Fg-4 قارچ بیمارگر، از نظر قدرت بیماری‌زایی بالا به عنوان جدایه مناسب انتخاب و در کلیه آزمون‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. آنتاگونیست‌های مورد استفاده در آزمایشات گلخانه‌ای موجب کاهش آلودگی و افزایش وزن هزار دانه شدند. در آزمایشات مزرعه‌ای، تیمارهای محلول پاشی شده با قارچکش رورال تی- اس (یک کیلوگرم در هکتار) و مخلوط چهار سوش آنتاگونیست از نظر کنترل بیماری و افزایش محصول برتر از سایر تیمارها بودند. به استناد نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، دو سوش B1 و S2 متعلق به *P. fluorescens* biovar-1، سوش N به *P. aerogiiosa* و سوش B4 متعلق به *B. subtilis* می‌باشد. آنتاگونیست‌های مورد استفاده با اعمال مکانیسمهایی نظیر آنتی‌بیوز و تولید سیدروفور در کنترل بیولوژیکی قارچ بیمارگر ومآلاً بیماری FHB عمل نمودند.

واژه‌های کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله گندم (FHB)، کنترل بیولوژیکی، آنتاگونیست ،سیدروفور و آنتی‌بیوز

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله (Fusarium head blight,FHB) یکی از بیماریهای مهم گندم در مناطق مرطوب و نیمه مرطوب جهان می‌باشد (McMullen *et al.* 1997, Windels 2000, Parry *et al.* 1995, Gilbert & Tekauz 1999). این بیماری توسط چندین گونه جنس *Fusarium* بوجود آمده که در بین آنها *F. graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae*) به عنوان گونه غالب در دنیا گزارش شده است (Ireta & Gilcherist 1994, Parry *et al.* 1995). خود این گونه امروزه به عنوان یک گونه تک‌نیایی، مرکب از حداقل نه گونه فیلوژنتیکی مجزا تشکلیل شده که برخی از آنها در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

و یا نواحی جغرافیایی ویژه ظاهر می‌شوند (O` Donnell *et al*. 2004, Goswami & Kistler, 2004).

بیماری بلایت سنبله در اپیدمی‌های شدید خسارات جبران‌ناپذیری را به محصول وارد می‌سازد و به استناد گزارش مؤسسه تحقیقات CYMMIT این بیماری علاوه بر خسارت کمی، کیفیت دانه را کاهش داده و مهمتر از همه به خاطر تولید توکسین‌های متعدد به عنوان مهمترین عامل محدود کننده برداشت گندم در بسیاری از مناطق جهان شناخته شده است (Stack 1999, 2003).

روشهای زراعی و شیمیائی مبارزه با این بیماری کارائی چندانی نداشته‌اند (Parry et al. 1995, Milus & Parsons 1994). استفاده از قارچکش‌ها علی‌رغم تاثیر و صرفنظر از هزینه‌های اقتصادی ومشکلات زیست‌محیطی، به دلیل بارندگی‌های طولانی در زمان شیوع بیماری بازدهی مناسبی ندارد. از طرفی قارچکش‌ها ممکن است در کاهش میزان آلودگی مؤثر بوده ولی در کاهش غلظت زهرابه‌ها بی‌تأثیر و یا کم اثر باشند (Brule – Babel & Fernando 2002, Khan *et al*. 2004) محدودیت‌هایی نیز در دستیابی به ارقام مقاوم وجود دارد که مهمتر از همه حجم بالای کار و زمان نسبتاً طولانی لازم برای تهیه ارقام مقاوم می‌باشد. کنترل بیولوژیکی می‌تواند به عنوان یکی از روشهای مبارزه درمدیریت تلفیقی آفات (IPM) برای مبارزه با این بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

بعضی از قارچها مثل گونه‌هایی از جنس تریکودرما و بعضی از باکتریهای جنس باسیلوس و سودوموناس علیه بعضی از عوامل بیماریزای گیاهی بکار رفته و مانع رشد و فعالیت آنها گردیده‌اند. *بورقی* و همکاران (Borghi *et al.* 1990) در ارزیابی ۲۸۵ جدایه استرپتومایسس (*Streptomyces*) جدا شده از خاک مزارع غلات و بقولات، خاصیت آنتاگونیستی ۲۵ درصد آنها علیه قارچ *Fg* را گزارش نمودند. *ونگ* و همکاران (Wang *et al.* 1992) با محلول‌پاشی سوش A014 باکتری *Bacillus subtilis* روی گندم درمرحله سنبله، کاهش بیماری بلایت خوشه ناشی از Fg را در حد ۵۰/۶ درصد در چین گزارش نموده‌اند. اثر مثبت *Bacillus subtilis* علیه بلایت خوشه گندم توسط *هوانگ* و همکاران (Huang *et al.* 1993) نیز گزارش شده است. *بنی‌زری* و همکاران (Benizri *et al.* 1995) در بررسی عکس‌العمل یک گونه سودومانوس و *F g* در محیط هیدروپونیک و

www.SID.ir

Archive of SID

در شرایط سترون، فعالیت این باکتری بر علیه قارچ مزبور را مشاهده نمودند. آنها تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک را مکانیسم تأثیر باکتری بیان نموده‌اند. *ولر* (Weller1988) نیز تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک، رقابت برای غذا و القاء مقاومت را مکانیسم تأثیر میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست قارچی و باکتریایی اعلام نموده است. *شیسلر* و همکاران (Schisler *et al.* 2002) کنترل بیولوژیکی مؤثری را روی گندم دوروم آلوده به FHB در شرایط گلخانه و مزرعه‌ای گزارش کردند. در گندم هگزاپلوئید نیز از چندین آنتاگونیست مؤثر در شرایط گلخانه برای کنترل این بیماری استفاده شده است(Khan *et al.* 2004) . *فیمینگ و شیمینگ* (Fuming & Shiming 1995) در ارزیابی تعدادی باکتری و مخمر به سه نژاد مؤثر آنتاگونیست که به ترتیب ۹۱/۸، ۷۵/۳ و ۹۸/۹ نسبت به شاهد، FHB را در گلخانه کنترل کردند برخورد نمودند. همین جدایه‌ها در مزرعه نیز به ترتیب ۶۷/۶، ۶۴/۹ و ۵۶/۷ درصد بیماری را کنترل کردند. در تحقیقات *صفائی* (۱۳۸۱) ۲۷۸ میکروارگانیسم (باکتری و مخمر) از ریزوسفر، فیلوسفر و اسپرموسفر گندم جداسازی و علیه Fg در آزمایشات درون شیشه‌ای غربال شدند از این میان سه گونه *Bacillus subtilis* (دو استرین)، *Bacillus* sp. (یک استرین) و مخمر *Sporobolomyces roseus* بهترین نتیجه را دادند.

بیماری بلایت سنبله گندم در چند استان کشور، به خصوص در استانهای شمالی شیوع دارد. مساعد بودن شرایط آب و هوایی این مناطق برای اپیدمی بیماری، کمبود ارقام مقاوم در شرایط فعلی ونیز مشکل سمپاشی مزرعه در زمان شیوع بیماری به خاطر بارندگی‌های مداوم، به نظر می‌رسد کنترل بیولوژیکی با استفاده از آنتاگونیست‌ها روش بسیار مناسبی برای به حد اقل رسانیدن خسارت محصول ناشی از این بیماری باشد. در مورد کنتر ل بیولوژیکی بلایت سنبله گندم توسط آنتاگونیست تاکنون تحقیقات جامعی در کشور انجام نگرفته و این اولین گزارش مستند در این زمینه می‌باشد.

روش بررسی

جداسازی و نگهداری قارچ عامل بیماری

www.SID.ir

Archive of SID

به‌منظور جدا سازی قارچ عامل بیماری از نیمه دوم اردیبهشت ۱۳۷۷، مزارع گندم استان و ایستگاه‌های تحقیقاتی قراخیل، فیروزکنده، دشت‌ناز و بایع‌کلا بررسی و از گیاهانی که علائم مشخص بیماری را نشان می‌دادند نمونه‌برداری گردید. جمعاً ۸۰ نمونه جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه انتقال یافت. در آزمایشگاه قسمت‌های مختلف سنبله شامل پوشینک‌های دانه و قطعاتی از محور سنبله بطور جداگانه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد بمدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه، برحسب ضخامت بافت، ضدعفونی و پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل روی محیط‌کشت PDA کشت داده شده و در دمای 25^{o} C نگهداری شدند. خالص‌سازی قارچ بطریقه نوک ریسه و تک اسپورروی محیط‌کشت آب‌آگار انجام گرفت. جهت تشخیص قارچ، هر جدایه روی محیط‌کشت CLA (carnation leaf agar)، PDA و PSA (potato sucrose agar) کشت و مشخصات پرگنه و مرفولوژیک آنها تعیین و با استفاده از روش *بوث* (Booth 1971)و *نلسون* و همکاران (Nelson *et al.* 1983) مورد شناسایی قرار گرفت و فراوانی گونه‌ها در نمونه‌های جمع‌آوری شده تعیین گردید.

آزمون بیماریزایی

بذور گندم رقم فلات (حساس به بیماری) در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ و ارتفاع ۱۵ سانتیمتر با خاک سترون در گلخانه کشت و در هر گلدان چند بوته مناسب نگهداری شد. درمرحله گلدهی ۵ سنبله اصلی در هر گلدان انتخاب و به کمک سرنگ یک قطره از سوسپانسیون اسپورتهیه شده به روش *واگنر* (Wagner 1992)، در گلچه میانی هر سنبله تزریق شد. سنبله‌های مایه‌زنی شده بمدت ٤٨ ساعت با کیسه نایلونی پوشانده شدند. در تیمار شاهدآب مقطر سترون تزریق شد. ارزیابی آزمون ۱۵ روز بعد از مایه زنی براساس روش *ایرتا و گیل‌کریست* (Ireta & Gilchrist 1994) به شرح زیر انجام گرفت:

مقاوم = حداکثر ۲ سنبلچه آلوده در هر خوشه

نیمه مقاوم = ۳-۲/۱ سنبلچه آلوده در هر خوشه

نیمه حساس = ۵-۳/۱ سنبلچه آلوده در هر خوشه

www.SID.ir

Archive of SID

حساس = ۷-۵/۱ سنبلچه آلوده در هر خوشه

و خیلی حساس = بیش از ۷ سنبلچه آلوده در هر خوشه

جداسازی میکرو اورگانیسمها

در ایستگاههای تحقیقاتی قراخیل، فیروزکنده، دشت‌ناز و بایع‌کلا و نیز مزارع گندم بهشهر، نکا، ساری، قائمشهر، بابل و جویبار از بوته‌های گندم در مراحل پنجه‌زنی، گلدهی، شیری و خمیری نمونه‌برداری (۲۹۰ نمونه برگ و سنبله) شده و نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال یافت.

در آزمایشگاه نمونه‌های برگ وساقه گندم به تفکیک خرد و در ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و روی شیکر با سرعت۱۲۰ حرکت در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. یک لوپ از سوسپانسیون حاصل در سطح تشتک پتری حاوی محیط‌های کشت KB (King Medium B) و PDA کشت گردید. پرگنه‌های مورد نظر پس از خالص‌سازی روی محیط‌کشت PDA در لوله‌های آزمایش منتقل وپس از ۲-۱ روز رشد در ٦-٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی جدایه ها و انتخاب آنتاگونیستهای مناسب

از کشت نقطه‌ای و متقابل برای ارزیابی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها استفاده گردید. در کشت نقطه‌ای، باکتریها با فواصل معین در ٤ نقطه هر پتری روی محیط‌کشت PDA کشت و پس از ٢٤ ساعت نگهداری در دمای 25^{o} C یک قطعه ۵ میلی‌متری از محیط کشت PDA حاوی قارچ *F g* تازه رشد یافته بصورت وارونه در وسط هر پتری قرار داده شد.

پس از نگهداری کشت‌ها در انکوباتور، با تکمیل رشد بیمارگر در پتری‌های شاهد (پس از ۵ روز)، قدرت بازدارندگی هر یک از آنتاگونیست‌ها با تعیین قطر هاله بازدارندگی رشد بیمارگر تعیین گردید.

آزمون کشت متقابل به منظور تعیین دقیق فاصله بازدارندگی هر یک از جدایه‌های مورد نظر باکتری و نیز به منظور ممانعت از اثر تداخلی سایر جدایه‌هایی که در آزمون قبلی مانع از رشد قارچ *F g شده* بودند انجام گرفت. در این آزمون جدایه باکتری در وسط تشتک پتری ۹ سانتی‌متری

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شد. میزان بازدارندگی در مقایسه با شاهد (بدون وجود باکتری) درمدت زمانی که دو پرگنه قارچ در وسط تشتک پتری به هم رسیدند (۵ روز بعد) اندازه‌گیری شد این آزمون در سه تکرار انجام شد و جدایه‌هایی که بیشترین بازدارندگی را از خود نشان می‌دادند انتخاب شدند (Montealegre *et al.* 2003).

بررسی سموم قارچ کش

به‌منظور انتخاب قارچکش مناسب در مقایسه با آنتاگونیست‌ها در آزمون‌های گلدانی و مزرعه‌ای، ۳ قارچ‌کش پروپیکونازول (EC ۲۵۰) ، بنومیل(wp٪۵۰) و ایپرودیون+کاربندازیم (wp۲۵) با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از ماده تجارتی براساس روش *هورسفال* (Horsfal 1956) به محیط کشت P D A اضافه شدند. پس از انعقاد محیط‌کشت، قطعه‌ای از آگار حاوی بیمارگر در وسط هر پتری قرار داده شد. در پتری شاهد بدون اضافه کردن قارچ‌کش، فقط قطعه‌ای از آگار حاوی بیمارگر در وسط تشتک پتری قرار داده شد. هر تیمار در ۳ تشتک پتری در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی کشت شد. کشت‌های انجام شده در دمای ۲۲ تا 25^{o} C نگهداری شدند.پس از تکمیل رشد بیمارگر در پتری‌های شاهد آزمایش متوقف و میزان رشد آن در تیمارهای دارای قارچ‌کش اندازه‌گیری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

بررسی مکانیسم تاثیر جدایه‌های آنتاگونیست

آزمون تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌های آنتاگونیست

براساس روش *کراس و لوپر* (Kraus & Lopper 1990)، مقدار ٤۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه به محیط‌کشت P DA در تشتک پتری اضافه و با تکان دادن آن، سوسپانسیون باکتری در جهات مختلف در سطح تشتک پخش گردید. باکتریها پس از ۳ روز نگهداری در دمای 25^{o} C، با استفاده از اسکالپل از سطح تشتک پتری تراشیده شدند. سپس سطح آن با میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون از باکتری‌های باقیمانده پاک شده و تشتک‌های پتری به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پنبه آغشته به کلروفرم قرار گرفتند. بعد درب تشتک‌های پتری حدود ۱۰ دقیقه تحت شرایط سترون باز نگه داشته شده تا بخار کلروفرم از سطح محیط خارج شود. آنگاه یک قطعه ۵ میلی‌متری

www.SID.ir

Archive of SID

از حاشیه کشت قارچ تازه رشد یافته *F g* دروسط تشتک پتری بطور وارونه قرار داده شد. تشتک شاهد (بدون باکتری) مشابه فوق تهیه گردید.پس از ۵ روز با تکمیل رشد شاهد، تیمارها مورد مقایسه قرار گرفتند.

آزمون تولید مواد فرار بازدارنده توسط جدایه‌های آنتاگونیست

از روش *کراس و لوپر* (Kraus & Lopper, 1990) برای ارزیابی تولید مواد فرار استفاده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کدری که از کشت ۷۲ ساعته هر یک از باکتریها تهیه شده بود، روی محیط‌کشت NAG (آگار غذایی حاوی ۲٪ گلوکز) پخش شد. تشتک‌های پتری به مدت ۲٤ ساعت در دمای 25^{o} C نگهداری شدند و همزمان یک قطعه از محیط‌کشت حاوی بیمارگر به قطر۵ میلی‌متر بطور وارونه در وسط یک تشتک‌پتری حاوی محیط‌کشت PDA قرار داده شد. پس از بر داشتن در، دو تشتک، در شرایط سترون روی هم قرار داده شد، بطوریکه تشتک پتری حاوی قارچ در بالا و لبه آنها روی هم قرار گرفت و توسط نوار پارافیلم کاملا مسدود گردید. تشتک‌های پتری تیمار شده در دمای فوق تا رشد شاهد کامل نگهداری و سپس همانند روش تولید آنتی‌بیوتیک ارزیابی شدند. در این آزمون نیز برای هر جدایه ۳ تکرار در نظر گرفته شده بود.

بررسی تولید سیدروفور[1] (Siderophore)

ارزیابی تولید سیدروفر با روش *ولر و کوک* (Weller & Cook, 1983) انجام شد. هریک از باکتریها به تفکیک در ۳ نقطه با فاصله یکسان از یکدیگر روی محیط‌کشت KB حاوی مقادیر،۲۵ ،۱۰۰ و۲۰۰ میکرومول کلرید آهن۳ ظرفیتی ($FeCl_3$) کشت و برای ٤۸ ساعت در دمای 25^{o} C نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون اسپورهای قارچ *Geotrichum candidum* با غلظت 10^{4} اسپور در هر میلی‌لیتر در سطح محیط‌های کشت تیمار شده محلول‌پاشی گردید. عدم رشد قارچ در اطراف باکتری نشان‌دهنده تولید سیدروفور توسط باکتری‌ها تلقی شد.

شناسائی میکرو ارگانیسمهای برتر

شناسایی آنتاگونیست‌های برتر براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و مقایسه با کلید

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی باکتری‌ها (Holt *et al.* 1994, Lelliott & Stead 1987, Krieg & Holt 1984) انجام گرفت.

آزمون‌های گرم با محلول ۳٪ پتاس، رشد هوازی و غیرهوازی، فوق حساسیت در توتون، اکسیداژ، لهانیدن (پوسیدگی نرم) سیب‌زمینی، کاتالاز، احیای نیترات، تولید لوان، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، رشد در دماهای مختلف و استفاده از قندها در محیط پایه آیر و حد اکثر و حد اقل دمای رشد براساس روش *شاد* و همکاران (Shaad *et al*. 2001) انجام شد.

آزمون گلدانی

بذور گندم رقم فلات (حساس به بیماری) پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت۲ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطرسترون در گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد ۱۵×۲۰ سانتیمتر کاشته شدند. پس از سبز شدن در هر گلدان چند گیاهچه مناسب نگهداری و بقیه حذف گردیدند. پس از رشد، بوته‌های گندم در دو مرحله تورم خوشه و گلدهی با سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست به غلظت 10^8سلول زنده در میلی‌لیتر و قارچکش انتخابی با غلظت ۱۰۰۰پی پی ام محلول‌پاشی و گلدان‌های تیمار شده در گلخانه نگهداری شدند.

تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از:

۱- قارچ کش رورال تی اس

۲- B-1 (جدایه ۱ بایعکلا)

۳-B-4 (جدایه ٤ بایعکلا)

٤-N-5 (جدایه ٥ نکا)

٥-S-2 (جدایه۲ ساری)

٦-مخلوط جدایه های باکتریائی

۷- شاهد با آلودگی مصنوعی

۸- شاهدبدون آلودگی مصنوعی

هر تیماردر۳ تکرار در قالب طرح بلوکهای کاملاً تصادفی انجام گرفت.

آلودگی مصنوعی با استفاده از محلول‌پاشی ماکرو کنیدی *F g* ۲ روز بعد ازمحلولپاشی با

www.SID.ir

Archive of SID

آنتاگونیست‌ها در مرحله گلدهی، شروع و سپس هر یک روز در میان تا ٦ نوبت صورت پذیرفت.

ارزیابی آزمایش ۲۱ روز بعد از اولین مایه‌زنی، هنگام توسعه بیماری روی سنبله‌های شاهد با تعیین درجه آلودگی براساس روش *بکله* و همکاران (Bekele *et al*. 1994) به شرح زیر انجام گرفت:

۱=۱ سنبلچه آلوده یا کمتر در هر سنبله

۲=۲ سنبلچه آلوده در هر سنبله

۳=۳ سنبلچه آلوده در هر سنبله

٤،٥و٦= به ترتیب ٤،٥،٦ سنبلچه آلوده در هر سنبله و معمولاً ، در بالا و پایین سنبله پراکنده هستند.

۷= سنبلچه آلوده در هر سنبله و سنبلچه‌ها به هم متصل هستند.

۸= بیشتر سنبلچه‌های هر سنبله آلوده و بعضی از آنها به رنگ صورتی می‌باشند.

۹=تقریباً شبیه ۸ بوده ۱/۲ تا۳/٤ سنبلچه‌ها آلوده و به رنگ صورتی تا سفید هستند.

۱۰= شبیه ۹ بوده ، آلودگی شدید، سنبله‌ها نازک و خشک شده بودند.

پس از برداشت محصول وزن هزار دانه تعیین و داده‌ها براساس روش دانکن مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (Basiri 1993).

آزمون مزرعه‌ای

در این آزمایش پس از آماده‌سازی زمین در ایستگاه تحقیقات زراعی بایع‌کلا در سال زراعی ۷۹-۱۳۷۸ نسبت به کشت بذور گندم رقم فلات اقدام گردید. پس از رشد گیاه، بوته‌های گندم در ۲ مرحله تورم سنبله و گلدهی (مانند آزمون گلدانی) با سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست 10^8 cfu/ml و قارچ‌کش انتخابی (۱ کیلو در هکتار) محلول‌پاشی شدند. آلودگی مصنوعی و ارزیابی آزمایش نیز مثل آزمون گلدانی صورت پذیرفت. استفاده از قارچ‌کش دو روز قبل از آلودگی مصنوعی انجام گرفت و برای تاثیر بهتر قارچ‌کش آبیاری به مدت یک روز قطع گردید.

این آزمون در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. اندازه هر کرت آزمایشی ١٦ مترمربع بود. پس از رسیدن محصول دو خط کناری از هر کرت حذف گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

محصول بقیه کرتها برداشت وعملکرد آنها براساس روش دانکن (Basiri 1993) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.جهت بررسی اثر سال، آزمون مزرعه‌ای در سال زراعی ۸۰-۱۳۷۹ نیز تکرار گردید.

نتیجه و بحث

در این بررسی از ۸۰ نمونه سنبله گندم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران، ۹۰ جدایه فوزاریوم بدست آمده که از آن میان ۸۲ جدایه (۹۱/۱٪) متعلق به *F. g* بود. فراوانی گونه *F. g* در نمونه‌های جمع آوری شده از مزارع گندم استان نشان دهنده دامنه انتشار و اهمیت آن از جنبه خسارت اقتصادی بر محصول گندم می‌باشد. از کشت گونه *Fg* بر روی محیط‌کشت CLA فرم جنسی قارچ (*Gibberella zea*) بدست آمد. همچنین پریتسیوم قارچ مزبور بر روی خوشه و ساقه گندم، برنج و ذرت نیز مشاهده گردید، که از نظر مشخصات مر فولوژیکی وتولید پریتسیوم در محیط‌کشت به گروه II تقسیم‌بندی *فرانسیس و برگس* (Francis & Burgess 1977) نزدیک می‌باشد. تا قبل از سال ۱۹۹۹ قارچ هموتال عامل بلایت سنبله گندم و جو به عنوان *F. graminearum* G2 شناخته می‌شد، که جهت تشخیص و تمایز آن از قارچ هتروتالیک عامل پوسیدگی ریشه، پایه و طوقه گندمیان از نام *F. graminearum* G1 استفاده می‌شد (Francis & Burgess 1997 Goswami & Kistler 2004). در حالی که از سال ۱۹۹۹ این قارچ‌ها براساس خصوصیات بیولوژیکی و فیلوژنتیکی هر کدام دارای مشخصات مرحله جنسی مربوط به خود می‌باشند. بدین معنی که گروه I امروزه به عنوان *F. pseudograminearum* با مرحله جنسی *G. coronicola* شناخته می‌شود (Aoki & Donnella 1999 a,b) و *F. graminearum* G2 بعنوان یک گونه تک‌نیایی مرکب براساس خصوصیات مورفولوژیک و مجموعه مشخصات مولکولی حداقل به ۹ گونه مجزای فیلوژنتیکی تقسیم شده است (Goswami & Kistler 2004). این گونه‌ها اکنون بطور رسمی با مفهوم *F. graminearum* sensu stricto مرتبط با عامل بلایت فوزاریومی مطرح می‌شوند. بعنوان مثال (*F. asiaticum. F. graminearum* Lineag 6 از عمومی‌ترین بیمارگر بلایت

www.SID.ir

Archive of SID

فوزاریـــومی در نـــواحی مشخصـــی از چـــین و دیگـــر منـــاطق آســـیا مـــی‌باشـــد (O` Donnell *et al.* 2004, Goswami & Kistler 2004).

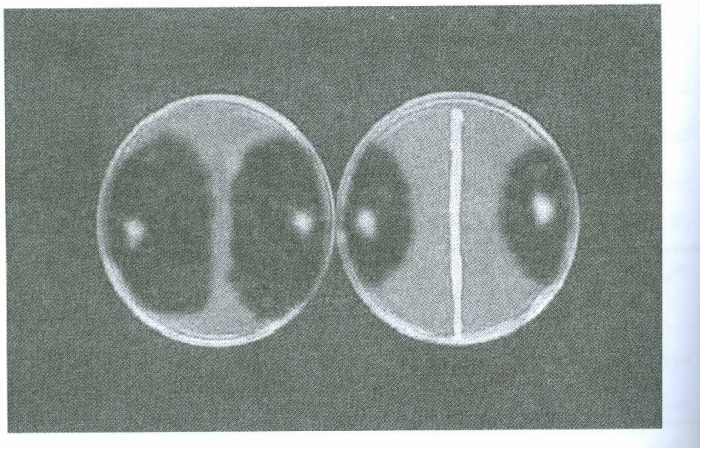
از مجموع ۲۹۰ نمونه جمع‌آوری شده گندم در استان، ۱۳۲ سویه باکتریایی شـامل:۳۰ سـویه از منطقه قراخیل قائمشهر (تحت کدG)،۲۰ سویه از فیروزکنده ساری (F)،۱۰ سویه بایع‌کـلا (B) ، ۱۲ سویه از دشت‌ناز (D) ،۳۰ سویه از حومه ساری (S)،۲۰ سویه از جویبار قائمشهر (J) و ۱۰ سـویه از نکا (N) بدست آمد. با ارزیابی سویه‌ها از نظر توانائی بازدارندگی از رشـد بیمـارگر، ۳۲ جدایـه بـا ایجاد هاله بازداری از رشد میسـلیوم قـارچ *Fg* بـه عنـوان سـویه‌هـای دارای قـدرت آنتاگونیسـتی شناسائی شدند. انتخاب آنتاگونیست‌ها از طریق بررسی اثرات بازدارندگی آنها در مقـابل بیمـارگر در آزمایشگاه صورت گرفت (شکل ۱). کارهای *ولر و کوک* (Weller & Cook 1983) و *ونگ و بیکر* (Wong & Baker 1984) نیز نشان داد که آزمـون‌هـای درون شیشـه‌ای مـی‌تواننـد در انتخـاب اولیـه آنتاگونیست‌ها در کنترل بیولوژیکی قابل استفاده باشند.

جدایه‌های آنتاگونیست B4،S2 ، N5، B1 از نظر قطر هاله بازداری از رشد قارچ عامل بیمـاری و جدایه *Fg-4* از نظر قدرت بیماریزایی به عنوان جدایه‌های برتر تعیین شده که در تمام آزمـون‌هـای گلدانی و مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). تمام جدایه‌های منتخـب قـادر بـه تولیـد آنتی‌بیوتیک و مواد فرار بودند.

جهت تولید آنتی‌بیوتیـک از محـیط‌کشـت PDA اسـتفاده شـد (Kraus & Lopper 1990). *گـراس* (Gross 1985) محیط‌کشت PDA را مناسب تولید آنتی‌بیوتیک گزارش نموده است. زیرا محیط‌کشـت PDA دارای حداقل ۲ مول در لیتـر آهـن بـوده کـه ایـن مقـدار بـرای تولیـد آنتـی‌بیوتیـک توسـط سودوموناس‌ها طی انجام متابولیسم‌های ثانوی ضـرورت دارد. از طـرف دیگـر مقـدار فسـفاتازهای اسیدی و قلیایی از تشکیل آنتی‌بیوتیک جلوگیری می‌کند. *ولـر و کـوک* (Weller & Cook 1983) نیـز محیط‌کشت PDA را برای ارزیابی تولید آنتی‌بیوتیک مناسب دانستند. تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف توسط اکثر سویه‌های *P. fluorescens* مورد استفاده در کنترل بیولوژیکی به عنوان مکانیسم اصلی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- هاله بازداری از رشد *Fusarium graminearum* توسط جدایه B1 (*Pseudomonas fluorescens*) (راست) نسبت به شاهد (چپ).

Fig. 1. Inhibition of mycelial growth of *Fusarium graminearum by Pseudomonas fluorescens* B1 (right) compared to the control (left).

بازداری از رشد قارچ بیماریزا ذکر شده است (Hamdan *et al.* 1991, Fravel 1988, Brisbane & Rovira 1988).

تمامی جدایه‌های مورد استفاده قادر به تولید سیدروفور بودند، به‌طوری که با افزایش غلظت یون آهن (Fe^{+3}) از میزان هاله باز دارندگی و از جوانه‌زنی اسپورهای قارچ *Geotrichum candidum* کاسته شد.

از جمله مکانیسم‌های مورد اشاره برای باکتری‌های آنتاگونیست عوامل بیماریزا، تولید ترکیب فرار سیانید هیدروژن می‌باشد. *دفاکو* و همکاران (Defago *et al.* 1990) مکانیسم اصلی بازداری عوامل بیماریهای مختلف توسط سویه *P. fluorescens* CHAO را تولید این ترکیبات می‌دانند. ترکیب مذکور برای قارچها سمی به شمار می‌آید. این ترکیب با تاثیر بر متابولیسم گیاه موجب انگیزش تشکیل ریشه‌های موئین فراوان می‌گردد. محققین همچنین احتمال دادند که این ترکیب در افزایش مقاومت گیاه میزبان مؤثر می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تاثیر کاربرد جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست و قارچکش‌ها در کـاهش آلـودگی بلایـت سنبله و افزایش محصول گندم

Table 1. Effects of antagonist isolates and fungicides in reducing severity of Fusarium head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* and grain yield

Treatment	Greenhouse گلخانه		Field مزرعه					
تیمار	severity	1000 grain weight	Severity درجه آلودگی			Yield(T\h) عملکرد محصول(تن/هکتار)		
	درجه آلودگی	وزن هزار دانه(گرم)	First year سال اول	Second year سال دوم	Compound analysis تجزیه مرکب	First year سال اول	Second year سال دوم	Second year تجزیه مرکب
Eperidion+Carbendazin ایپردیون+کاربندازیم	4.83 bc	36.03 a	5.67 a	6.5 bc	6.08 c	41.4 a	4.50 a	4.45 a
Pseudomonas fluorescens- B1	4.19 bcd	36.53 a	7.67 c	6.01 bc	6.84 bc	3.06 c	4.32 a	3.69 b
Bacillus subtilis-B4	4.76 bcd	36.63 a	8 a	6.37 bc	7.18 bc	3.13 c	4.12 ab	3.62 b
Pseudomonas aeruginosa-N5	5.73 b	36.7 a	8 a	6.81 bc	7.53 b	3.06 c	4.04 ab	2.55 b
Pseudomonas fluorescens- B2	4.78 bc	36.97 a	8a	7.07 b	7.47 b	3.12 c	4.16 ab	2.64 b
Mixed isolates مخلوط جدایه ها	3.36 cd	37.5 a	4.33 c	5.04 c	4.69 d	4.49 a	4.53 a	4.51 a
Infected check شاهد با آلودگی مصنوعی	9.67a	23.9 b	8.33 a	9.76 a	9.05 a	3.04 c	3.1 c	۳2.07 c
Noninfected check شاهد بدون آلودگی مصنوعی	2.33 d	38.9a	6.33 ab	7.5 b	6.92 bc	3.87 a	3.72 b	3.79 b

www.SID.ir

Archive of SID

تولید HCN توسط سویه CHAO در حضور عنصر آهن انجام می‌گیرد. می‌توان نتیجه گرفت که هنگام کمبود آهن باکتری *P. fluorescens* تولید سید روفور و در شرایطی که عنصر آهن به مقدار کافی در دسترس باشد با تولید H CN موجب بازداری از رشد و فعالیت عوامل بیماریزا می‌شوند. آزمون تولید این مواد نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد بررسی با تولید مواد فرار از رشد میسلیومی قارچ *Fg* جلوگیری کردند. از نظر قطر هاله بازداری از رشد *Fg-4* توسط قارچکش‌ها، باکتری‌های برتر و مواد فرار آنها، تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور، تیمارها در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲).

براساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی جدایه‌های گرم منفی همگی متعلق به جنس سودوموناس بودند. جدایه‌های B1 و S2 به عنوان بیوار1 *Pseudomonas fluorescens biovar-1* و جدایه N5 *P. aeruginosa* شناسائی شدند. جدایه B4 از نظر ویژگیهای فنوتیپی شباهت زیادی به *Bacillus subtilis* داشت.

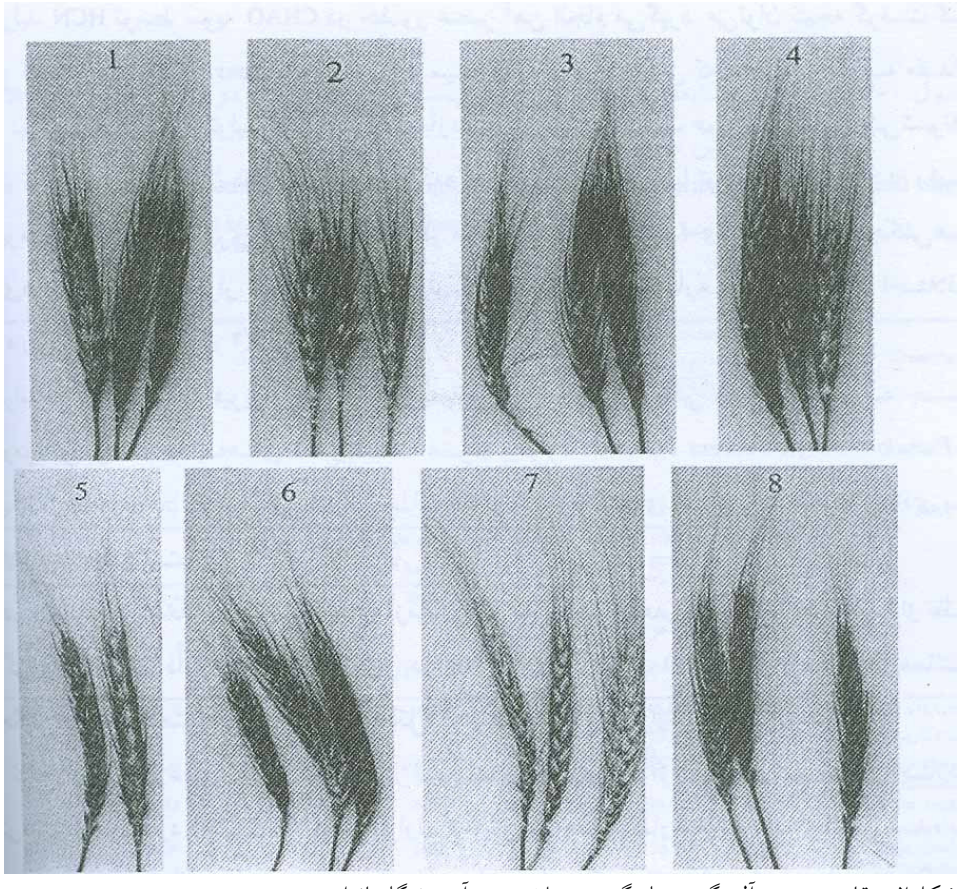
در آزمایشات گلخانه‌ای بین تیمارهای آزمایشی در مقایسه با شاهد با آلودگی مصنوعی، از نظر آلودگی و وزن هزار دانه اختلاف معنی‌داری در حد ۱٪ وجود داشت (جدول ۲) و جدایه‌ها همانند قارچکش موجب کاهش شدت آلودگی (شکل ۲) و افزایش وزن هزاردانه شدند (جدول ۱).

نتایج آزمون مزرعه‌ای نشان داد که در بین تیمارهای مورد آزمایش در سطح۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). در سال اول آزمایش به جز تیمارهای محلول‌پاشی شده با قارچکش ایپریدیون+کاربندازیم و مخلوطی از جدایه‌های باکتریائی، بقیه تیمارها (هر یک از باکتریها به تنهایی) قادر به کنترل بیماری نبودند و علت احتمالی آن وجود شرایط نا مساعد آب و هوائی برای فعالیت باکتری‌ها بوده است. به‌همین دلیل شدت بلایت خوشه نیز پائین بود (جدول ۱).

در سال دوم آزمایش، با تامین رطوبت مناسب برای کلیه تیمارها و ایجاد با آلودگی مصنوعی تیمارها قادر به کاهش درجه آلودگی بیماری و افزایش عملکرد بودند. تاثیر مخلوط جدایه‌ها (تیمار ٦) بیشتر از هر یک از باکتری‌ها بطور جداگانه و نیز سایر تیمارها بود (جدول ۱). مخلوط جدایه‌ها

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- مقایسه درجه آلودگی سنبله گندم به بلایت در آزمون گلخانه‌ای

۱= اپریـدیون+کاربنـدازیم،۲=B1- *Fseudomonas fluorescens* ، ۳=B4- *Bacillus subtilis* ، ٤= *Pseudomonas aeroginosa*-N5

۵= S2- *Pseudomonas fluorescen* ، ٦= مخلوط جدایه های باکتریائی،۷=شاهد با آلودگی مصنوعی،۸= شاهد بدون آلودگی مصنوعی

Fig 2.Comparison of blight severity of wheat head in the greenhouse.
1=Iperidion+Carbendazim, 2= *Pseudomonas fluorescens* –B1,3= *Bacillus subtilis*-B4, 4= *Pseudomonas aeroginosa*-N5,
5=*Pseudomonas fluorescen*-S2 , 6=mixture of bacterial isolates, 7= inoculated check,8=non inoculated check

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- خلاصه تجزیه واریانس و مقایسه مشخصات اندازه‌گیری شده میانگین مربعات اثر آنتاگونیست‌های باکتریایی در شدت آلودگی و اجزای محصول گندم

Table 2. Summary of analysis of variance and mean comparison of the effects of bacterial antagonists on Fusarium head bligt severity and wheat yield components

Source منبع تغیرات	Inhibition of mycelial growth of *Fg* by bacterial strains ** هاله بازداری از رشد بیمارگر توسط باکتریها	Inhibition of mycelial growth of *Fg* by bacterial strains هاله بازداری ازرشد بیمارگر توسط قارچکشها	Inhibition of mycelial growth of *Fg* by bacterial strains volatiles هاله بازداری از رشد بیمارگر توسط مواد فرار باکتریها	Disease severity at Green house** درجه آلودگی سنبله در گلدان	1000 grain weight ** وزن هزار دانه(گرم)	Disease severity in field** درجه آلودگی سنبله در مزرعه سال اول	Disease severity in field** درجه آلودگی سنبله در مزرعه سال دوم	Disease severity in field** درجه آلودگی سنبله در مزرعه (تجزیه مرکب)	Yield in Field** عملکرد محصول در مزرعه (تن / هکتار) سال اول	Yield in Field** عملکرد محصول در مزرعه (تن / هکتار) سال دوم	Yield in Field** عملکرد محصول در مزرعه (تجزیه مرکب)
Year(سال)								0.245			3.489
Replication تکرار			0.8			2.792	1.032	1.846	0.021	0.063	0.42
Treatment تیمار	15.032	1776.937	2922.5	14.633	366.969	6.232	5.687	9.389	1.302	0.659	1.36
Interaction effect اثر متقابل								2.538			0.497
Error خطا	0.750	1.238	3.8	0.657	3.798	0.554	0.496	0.543	0.02	0.047	0.34
Cv ضریب تغییرات	15.075%	3.28%	6.09%	16.78%	5.51%	10.57%	10.23%	10.57%	4.01%	5.35%	4.83%

معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪ **, *:Significant at 1% and 5% levels

www.SID.ir

Archive of SID

با ٤٨/٣٦٪ کاهش آلودگی (میانگین درجه آلـودگی ٥/٠٤) در مقایسـه بـا تیمـار شـاهد بـا آلـودگی مصنوعی (میانگین درجه آلودگی ٩/٧٦)، و ٤٦/١٪ افزایش محصول (٤/٥٣تن در هکتار) نسـبت بـه عملکرد شاهد با آلودگی مصنوعی (٣/١ تن در هکتار) و نیز بقیـه تیمارهـا برتـری داشـت. کـاهش آلودگی در تیمارهای محلول‌پاشـی شـده بـا بـاکتری‌هـای *P. aerognosa*- N5 ، *P. fluorescen* –S2، *P. fluorescens* -B1، *B. subtilis*- B4 ، شاهد بدون آلودگی مصنوعی و اپریدیون+کاربندازیم به ترتیب ٢٩/٣، ٣٠/٥، ٣٨/٤، ٣٤/٧، ١٣/١ و ٢٣/٨ درصـد و افـزایش محصـول در ایـن تیمارهـا ٣٠، ٣٤/١، ٣٩/٣، ٣٢/٩، ٢٠ و ٤٥/١ درصد بود. بـه نظـر مـی‌رسـد مخلـوط جدایـه‌هـا در دامنـه وسـیعتری از استرس‌های محیطی نسبت به هر یک از باکتری‌ها به تنهائی قادر به رشد و فعالیت بوده‌اند.

پیرسون و ولر (Pierson & Weller 1994) مخلوط سویه‌های *P. putida* Qd8-80 و Q2-87, Qc68-80, Qcl80 گونه *P. chlororaphis* را علیه بیماری پاخوره در شرایط آلودگی مصنوعی در مزرعه مورد ارزیابی قرار داده و افزایش محصولی به میزان ٢٠/٤٪ در مقایسه با شاهد را گزارش نمودند. در حالیکه استفاده از هریک از سویه‌ها به تنهایی موجب افزایش محصول به میزان ٢/٦٪ ، ٥/١ ٪، ٥/٥ ٪، ٩/٥ ٪ گردیده بود. در آزمایش دیگری (Duffy & Deeago 1999) مخلوط سویه‌های *P. fluorescens* و *P. chlororaphis* با تولید آنتی‌بیوتیک‌های فنازین -١- کربوکسیلیک اسید و فلوروگلوسینول موجب کنترل ٣٠-٨٤ درصد کنترل همین بیماری در گندم گردید.

در تجزیه مرکب، اثر سال، تیمار و اثرات متقابل معنی‌دار بود. معنی‌دار بودن اثر سال مربـوط بـه شرایط آب و هوایی و آبیاری متغیر هر سال بوده است.اخـتلاف معنـی‌دار در اثـرات متقابـل نشـان دهنده رفتارهای متفاوت تیمارها در دو سال مختلف می‌باشد. وجود شرایط خشـک و پـائین بـودن رطوبت در سال اول باعث گردید که روش‌های کنترل تاثیری در بیماری و میـزان عملکـرد نداشـته باشد، ولی در سال دوم با انجام آبیاری میست تا مرحله خمیری، نه تنها شرایط برای توسعه بیماری، بلکه برای کارآئی آنتاگونیست‌ها جهت کنترل بیماری نیز مناسب بوده است.

در سال دوم آزمایش با وجود علائم بیماری در سطح سنبله‌ها، چروکیدگی دانـه و کـاهش وزن آنها در کرت‌های تیمارشده بـا قـارچکش و آنتاگونیسـت قابـل ملاحظـه نبـود. *دفـاگو* و همکـاران

www.SID.ir

Archive of SID

(Defago *et al*. 1990). این پدیده را به احتمال افزایش مقاومت و یا تحمل بیشتر گیاه در استفاده از میکروارگانیسم نسبت داده‌اند.

اگرچه کنترل زراعی مناسب، استفاده بهینه از کودها،آبیاری و کنترل علف‌های‌هرز و تناوب زراعی ممکن است در کاهش میزان اینکولوم موجود برای شروع بیماری روی سنبله‌ها دخیل باشد ولی نمی‌تواند تنها راه حل کنترل موثر این بیماری محسوب شود. از طرفی دسترسی به کولتیوارهای مقاوم به این بیماری و یا متحمل نسبت به توکسین‌های ناشی از عوامل این بیماری هنوز در دسترس نمی‌باشد (Fernando *et al*. 2002). بعلاوه استفاده از ارقام متحمل تنها می‌تواند موجب کاهش نسبی بیماری و آلودگی محصول به فیتوتوکسین شوند ولی نمی‌تواند موجب حل این معضل شود. بعنوان مثال با وجود کشت ارقام متحمل در ۲۵ درصد نواحی گندمکاری آلمان، این مشکل همچنان حل نشده باقی مانده است (Arpad & Redomir 1999). از مجموع گزارشات می‌توان نتیجه گرفت که نیاز به روش کارآمد برای کنترل این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. مبارزه بیولوژیکی به عنوان یکی از روش‌های کنترل می‌تواند جایگزین و یا مکمل مناسبی در این زمینه باشد، زیرا برای محیط‌زیست بی‌خطر بوده هزینه بالایی نداشته و در خصوص این بیماری شاید تنها راه کنترل مؤثر محسوب شود. بعلاوه استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید از مهمترین عوامل مؤثر دربرقراری تعادل پایدار سیستم زراعی بوده ودر مدیریت تلفیقی آفات (IPM) گندم نیز از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Khan *et al*. 2004, Fernando *et al*. 2002).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (204-199) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: عبدالرضا فروتن، حشمت اله رحیمیان و عزیز علیزاده، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس ،تهران- ایران

www.SID.ir