Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤٢، ١٣٨٥

بررسی شیوه‌ی فعالیت آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنتِ فراریشه گندم و بازدارندگی آن‌ها در برابر فوزاریوم‌های بیماری‌زای ریشه در استان فارس

Antagonistic mechanisms of wheat rhizosphere fluorescent Pseudomonads and their inhibition on root pathogenic *Fusarium* species in Fars province

رضا مستوفی‌زاده‌قلمفرسا*، ضیاءالدین بنی‌هاشمی، سید محسن تقوی

بخش گیاهپزشکی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز

دریافت ١٣٨٤/٧/٦ پذیرش ١٣٨٤/١١/٢٦

چکیده

در طی سال‌های ١٣٧٧ و ١٣٧٨ از مزارع گندم آبی استان فارس نمونه‌برداری به عمل آمده و باکتری‌های سودوموناس فراریشه جداسازی شد. براساس آزمون‌های استاندارد بیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها به‌عنوان *Pseudomonas fluorescens* biotype I، *P. fluorescens* biotype II، *P. fluorescens* biotype III، *P. fluorescens* biotype IV، *P. fluorescens* biotype V، *P. aereofacians*، *P. aeroginosa*، *P. cichorii*، *P. putida*، *P. syringae* و *P. viridiflava* شناسایی

* مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

شده، در آزمون‌های آنتاگونیستی در برابر جدایه شاخص *Geotrichum* sp. مورد استفاده قرار گرفتند. از جدایه‌های باکتریایی که در آزمون آنتاگونیستی مقدماتی فعالیت بالایی نشان داده بودند و گونه‌های *Fusarium* جدا شده از فرایشه گندم در استان فارس شامل: *F. oxysporum*، *F. nygamai*، *F. moniliforme*، *F. graminearum*، *F. culmorum*، *F. avenaceum*، *F. prolifratum*، *F. sambucinum*، *F. semitectum*، *F. solani* و *F. tricinctum* در آزمون‌های آنتاگونیستی تکمیلی استفاده شد. از جدایه‌هایی که در آزمون‌های آنتاگونیستی تکمیلی دارای قدرت آنتاگونیستی بالایی بودند در برابر گونه *F. culmorum* جدا شده از فرایشه گندم در آزمون‌های آنتاگونیستی در محیط فرایشه گندم استفاده گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که ۷۵٪ از جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش دارای فعالیت آنتاگونیستی در برابر جدایه‌ی شاخص *Geotrichum* sp. هستند. کلیه‌ی جدایه‌هایی که دارای فعالیت آنتاگونیستی بوده، از سازوکار تولید سیدروفور استفاده نموده، در حالی که تنها در ۳۳٪ از این جدایه‌ها فعالیت تولید آنتی‌بیوتیک مشاهده شده است. کلیه جدایه‌های مورد آزمایش باعث بازدارندگی رشد در فوزاریوم‌های بیمارگر ریشه در آزمایش‌های درون شیشه‌ای گردیدند. شدت فعالیت آنتاگونیستی هر جدایه باکتری در برابر گونه‌های مختلف فوزاریوم متفاوت بود. به نظر می‌رسد که جدایه‌های E50 از *P. fluorescens* biotype V و K127 از *P. aeroginosa* و S200 از *P. syringae* دارای بیشترین توانایی آنتاگونیستی در برابر فوزاریوم‌های ریشه گندم هستند. عللی که هیچ کدام از جدایه‌های باکتری در شرایط آزمایش نتوانستند *F. culmorum* را در محیط فرایشه کنترل نمایند، مورد بحث قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: گندم، سودوموناس‌های فلورسنت، آنتاگونیست، فرایشه، *Fusarium*

مقدمه

در فرایشه‌ی گندم معمولاً چهار دسته میکروارگانیزم فعالیت می‌کنند: ۱ – بیمارگرهای اصلی که بیماری‌های شناخته شده‌ی ریشه‌ای را تولید می‌کنند، این قارچ‌ها در مراحل اولیه‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

رشد باعث مرگ گیاهچه شده، در مراحل بعدی با آسیب زدن به سیستم ریشه‌ای باعث ضعیف شدن گیاه و در نتیجه افت محصول می‌گردند. ۲- بیمارگرهای فرعی که معمولاً روی بافت‌های جوان (ریشه‌های مویین، یاخته‌های نوک ریشه و یا یاخته‌های کورتکس) اثر می‌گذارند که علائم آن‌ها به راحتی قابل تشخیص نیست. ۳- عوامل پوده‌رست آنتاگونیست که با فعالیت خود جلوی رشد سایر میکروارگانیسم‌ها را می‌گیرند. ٤- عوامل پوده‌رست بی‌اثر که بر سیستم ریشه‌ای گیاه و سایر میکروارگانیسم‌ها اثری ندارند (Weller 1988, Ravanlou & Banihashemi 1999).

مهمترین عوامل بیمارگر اصلی و فرعی ریشه گندم از دسته قارچ‌ها می‌باشند و اگرچه باکتری‌هایِ آنتاگونیست از اهمیت زیادی در مبارزه‌ی بیولوژیک با بیماری‌های ریشه‌ای گندم برخوردارند اما قارچ‌هایی هم وجود دارند که می‌توان از آن‌ها به عنوان عاملی برای مبارزه‌ی بیولوژیک علیه بیمارگرهای ریشه گندم سود برد. بنابراین لزوم شناسایی فلور قارچی و باکتریایی فراریشه گندم برای تعیین بیمارگرها و آنتاگونیست‌های احتمالی آن به منظور استفاده از خصوصیات آن‌ها در کنترل بیماری‌های ریشه‌ی گندم، ضروری است (Weller *et al.* 1988) .

تعداد زیادی از باکتری‌های مربوط به جنس‌های مختلف در فراریشه گندم زندگی می‌کنند (De Freitas & Germida 1992) .جنس *Pseudomonas* یکی از معمول‌ترین جنس‌های همراه با ریشه‌ی گندم است (Weller 1988, De Freitas & Germida 1992). این جنس شامل گروه‌های متفاوتی از نظر خصوصیات زیست‌شناختی و بیوشیمیایی می‌باشد. یکی از مهمترین گروه‌های این جنس ازنظر کشاورزی، دسته‌ی سودوموناس‌های فلورسنت است. گونه‌های موجود در این گروه هم به صورت بیمارگر و هم به صورت پوده‌رست همراه با گندم مشاهده می‌شود. گونه‌های بیمارگر یا ایجاد بیماری‌های لکه برگی می‌نمایند و یا با تولید هسته‌ی یخ باعث حساس شدن گیاه به سرمازدگی می‌گردند (De Freitas & Germida1992).

برخی از گونه‌های پوده‌رست این جنس در محیط فراریشه قدرت رقابت بالایی با سایر میکروارگانیسم‌ها به خصوص بیمارگرهای خاکزاد دارند. این خصوصیات رقابتی در اثر تولید سیدروفور، آنتی‌بیوتیک، HCN و مواد فرار بازدارنده و نیز قدرت استفاده‌ی سریع از منابع کربوهیدراتی، توانایی کلونیزه کردن سریع محیط ریشه و سایر سازوکارهای بازدارندگی به

www.SID.ir

Archive of SID

وجود آمده است. بنابراین می‌توان از آن‌ها برای مبارزه‌ی بیولوژیک علیه بیمارگرهای خاکزاد گندم استفاده نمود (Millus & Rothroch 1997, Wong and Huang 1998). همچنین برخی از سودوموناس‌های فلورسنت به عنوان ریزوباکتری‌های افزایش دهنده‌ی رشد گیاه (PGPR) باعث افزایش رشد و بالا بردن میزان محصول گندم می‌گردند (Weller 1988). بنابراین شناسایی تاکسون‌های سودوموناس درمنطقه‌ی فراریشه گندم برای تعیین آنتاگونیست‌ها و PGPRهای احتمالی به منظور استفاده از قابلیت و توان آن‌ها در کنترل بیمارهای ریشه‌ی گندم و بالا بردن میزان محصول این گیاه ضروری به نظر می‌رسد.

بر طبق گزارش‌های موجود، سودوموناس‌های فلورسنت بیش از ۵۰ نوع مواد آنتی‌بیوتیکی تولید می‌کنند که به‌عنوان مثال می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌هایی چون پیوسیانین، پیرول نیترین، پایولوتئورین و فنازین‌ها اشاره نمود که هر کدام از این آنتی‌بیوتیک‌ها بسته به میزان نفوذپذیری و پایداری آن‌ها در خاک می‌توانند روی بیمارگرهای اصلی و فرعی ریشه مؤثر باشند (Howell & Stipanoric 1979 , Weller *et al.* 1988). همچنین جدایه‌های سودوموناس‌های فلورسنت با تولید سیدروفورها موجب کاهش شدید یون Fe^{3+} محلول در غلظتی برابر با 10^{-17} مول در اطراف ریشه می‌گردند (Leong 1986). سیدروفورهای این جدایه‌ها معمولاً از نوع پیووردین یا سودوباکتین‌ها می‌باشند. سازوکار عمل سیدروفورها به این صورت است که این مواد گرایش شدیدی برای ترکیب شدن با یون Fe^{3+} دارند (ثابت ترکیب آن‌ها در زمان برهمکنش (K_{ass}) در pH=7 تقریباً برابر با 10^{24} می‌باشد) (Meyer & Abdallah 1978). فرریک پیووردین با یک گیرنده‌ی خاص درغشاء خارجی سلول تولید کننده سیدروفور برهمکنش می‌کند و متعاقباً وارد سیتوپلاسم شده، به Fe^{2+} احیا می‌گردد (ر. ک. Hass & Defago 2005). سیدروفورها علاوه بر تأثیرگذاری روی رشد گیاه از ابتلای گیاهان به علائم بافت مردگی نیز جلوگیری به عمل می‌آورند (Leong 1986). از آنجا که بیمارگرهای گیاهی اغلب فاقد سیستم جذب آهن از سیدروفورها می‌باشند، در برابر تولید این مواد با مشکل کمبود آهن روبرو گشته و غیر فعال می‌گردند (Kloepper *et al.* 1980, Weller 1988, Rovira & Ryder 1993). بنابراین شناسایی و تعیین شیوه فعالیت آنتاگونیستی این جدایه‌ها می‌تواند اولین گام برای استفاده از جدایه‌های برتر در کنترل بیماری‌های ریشه‌ی گندم و بالا بردن میزان محصول این

www.SID.ir

Archive of SID

گیـــاه باشـــد. خلاصـــه‌ای از تحقیـــق حاضـــر قـــبلا ارائـــه شـــده اســـت (Mostofizadeh-Ghalamfarsa *et al.* 2002).

روش بررسی

جداسازی و خالص‌سازی

در طی سال‌های ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ نمونه‌هایی از گندم مربوط به نواحی مختلف استان فارس انتخاب و پس از ثبت مشخصات، به آزمایشگاه انتقال داده شد (جدول ۱). خاک ریشه با تکان دادن جدا گردید. از مجموع ریشه‌های هر نمونه ۰/۵ گرم انتخاب شده، به قطعات یک تـا سـه میلی‌متری تقسیم گردید. ریشه‌های خرد شده به ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردیـده، به مدت دو ساعت روی دستگاه لرزا با سـرعت متوسـط (۴۰ دور در دقیقـه) قـرار داده شـد. مخلوط به دست آمده از پارچه ی ململ سترون عبور داده شده، کلیه‌ی ذرات ته‌نشین شـده و رونشین شده ی آن جداگردید. از سوسپانسیون به دست آمده رقـت‌هـای 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5} تهیه گردید. ۰/۲ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های فوق در سه تکـرار درون تشـتک‌هـای پتری هشت سانتیمتری حاوی محیط کشت‌های آگار غذایی (مِرک، آلمان) حاوی ۱۰ گـرم در لیتر سوکروز و محـیط کشـت تغییـر یافتـه‌ی رزبنگـال مـارتین RBM2(K_2HPO_4 ۰/۵ گـرم، KH_2PO_4 ۰/۵ گرم، $MgSO_4.7H2O$ ۰/۵ گرم، پپتون ۰/۵ گرم و رزبنگـال ۰/۰۵ گـرم) بـا یـک میله‌ی شیشه‌ای خمیده به صورت چمنی کشت گردید. قطعاتی از ریشه‌ی خرد شـده‌ی گنـدم نیز مستقیماً روی محیط کشت‌های یاد شـده قـرار داده شـد. بعـد ازدو تـا چهـار روز از بـین پرگنه‌های رشد کرده تعدادی از آن‌ها انتخاب شده، روی محـیط کشـت آگـار غـذایی مخطـط گردید. تک پرگنه‌های به دست آمده روی محیط کشت King-B کشت گردید (Fahy & Peresly 1983). جدایه‌هایی که پس از سه تا پنج روز در زیر نور مـاوراء بـنفش (۲۵٤ نـانومتر) تولیـد رنگدانه‌های فلوروسانت نمودند، بـه‌منظـور تعیـین خصوصـیات فنـوتیپی تحـت آزمـون‌هـای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات نمونه های گندم مربوط به مناطق مختلف استان فارس

Table 1. Characteristics of wheat samples collected from Fars province

منطقه نمونه‌برداری Location	شناسه Code	مرحله‌ی رشدی گندم (ZGS)* Growth stage
باجگاه Badjgah	A	دانه ی شیری (۷) Grain milk (7)
دشت بکان Dasht-e-Bakan	B	دانه ی خمیری (۸) Grain dough (8)
قهگان Gahgan	C	دانه ی شیری (۷) Grain milk (7)
بادکی Badeki	D	دانه ی خمیری (۸) Grain dough (8)
چنارشایجان Chnarshijan	E	خوشه دهی (۵) Heading (5)
شاپور Shapoor	F	پنجه زنی (۲) Tillering (2)
دریس Deris	G	پنجه زنی (۲) Tillering (2)
پل آبگینه Pol-e-Abgineh	H	خوشه دهی (۵) Heading (5)
دریاچه ی پریشان Parishan Lake	I	پنجه زنی (۲) Tillering (2)
جهان آباد Jahanabad	J	پنجه زنی (۲) Tillering (2)
رشن آباد Rashanabad	K	خوشه دهی (۵) Heading (5)
الیاس آباد Elyasabad	L	خوشه دهی (۵) Heading (5)
سمل شمالی N. Samal	M	خوشه دهی (۵) Heading (5)
سمل جنوبی S. Samal	N	خوشه دهی (۵) Heading (5)
حومه ی فسا Fasa	O	خوشه دهی (۵) Heading (5)
حومه ی داراب Darab	P	خوشه‌دهی (۵) Heading (5)
حومه ی فیروز آباد Firoozabad	Q	خوشه دهی (۵) Heading (5)
حومه ی نیریز Niriz	R	خوشه دهی (۵) Heading (5)
حومه ی نورآباد Noorabad	S	خوشه دهی (۵) Heading (5)
حومه ی استهبان Estahban	T	خوشه دهی (۵) Heading (5)

ZGS = Zadoks' growth stage

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص جدایه‌ها

در کلیه‌ی جدایه‌های به دست آمده تعیین واکنش گرم به روش *ساسلو* و همکاران (Suslow *et al.* 1982)، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش *هیو و لایفسون* (Hugh & Lifson 1953)، آزمون تولید لوان، کاتالاز و تولید گاز از گلوکز به روش *لیوت ودیکی* (Leliot & Dicky 1984)، آزمون اکسیداز به روش *کوواکس* (Kovacs 1956)، واکنش فوق حساسیت روی توتون به روش *کلمنت* و همکاران (Kelement *et al.* 1964)، آزمون پکتیناز، اوره آز، هیدرولیز اسکولین، تولید H_2S از پپتون، رشد روی KCN ۱٪ و اثر روی شیر لیتموس به روش *شاد* (Schaad *et al.* 2001)، آزمون هیدرولیز آرژنین به روش *تورنلی* (Thornley 1960)، آزمون هیدرولیز ژلاتین و احیای نیترات به روش *فهی و پرسلی* (Fahy & Peresly 1983)،آزمون هیدرولیز توین ۸۰ ، متیل آلانین دی آمیناز و لیزین، آرژنین و اورنیتین دی کربوکسیلاز به روش *مکفادین* (MacFadin 1980)، آزمون تولید اندول، واکنش متیل رد و تولید استوئین (MR-VP) به روش *گراهام و هیدگکیس*(Graham & Hidgkiss 1967)، آزمون لستیناز به روش *فهی و پرسلی* (Fahy & Peresly 1983) و نیز آزمون تولید اسید از قندها و استفاده از منابع کربوهیدراتی به روش *آیر* و همکاران (ر. ک. Fahy & Peresly 1983) انجام گردید.

آزمون‌های آنتاگونیستی

از جدایه‌های مذکور در آزمون‌های آنتاگونیستی استفاده شد. از هر جدایه لکه‌ای به قطر ۱۵ میلی‌متر روی دو محیط کشت King-B و King-B حاوی ۱۰۰۰ میکرو مول $FeCl_3$ کشت گردید. به فاصله‌ی ۱۰ میلی‌متری از لبه‌ی پرگنه، بلوکی از قارچ *Geotrichum* sp. (دانشگاه شیراز- بخش گیاهپزشکی-جدایهG1) به قطر ۵ میلی‌متر قرار داده شده، با مقایسه‌ی دو محیط کشت و شاهد بدون باکتری تولید سیدروفور و نحوه‌ی رشد پرگنه‌ی قارچی به مدت یک هفته در ۲۵°C بررسی گردید (Kloepper *et al.* 1980).

به منظور بررسی تولید آنتی‌بیوتیک جدایه‌ها روی محیط کشت King-B حاوی ۱۰۰۰ میکرومول $FeCl_3$ در دو تکرار به روش بالا کشت گردیدند. پس از ٤٨ ساعت رشد در ۲۵°C، پرگنه‌ها با پنبه سترون پاک گردیدند. با گذاشتن تشتک‌های پتری به صورت وارونه و ریختن ۵

www.SID.ir

Archive of SID

قطره کلروفرم روی در آن، باکتری‌های باقی مانده ازبین برده شدند. پس از تهویه، یکی از تکرارها برای غیرفعال کردن آنتی‌بیوتیک‌های موجود به مدت دو ساعت در ۷۰°C قرار داده شد. پس از خنک شدن محیط کشت، در هر دو تکرار در فاصله‌ی ۱۰ میلی‌متری از لبه‌ی پرگنه‌ی حذف شده‌ی باکتری بلوکی از قارچ *Geotrichum* sp. به قطر ۵ میلی‌متر قرار داده شد و تولید آنتی‌بیوتیک از طریق مقایسه‌ی نحوه‌ی رشد پرگنه‌ی قارچی در دو محیط کشت، به مدت یک هفته در ۲۵ °C مورد بررسی قرار گرفت (Howell & Stipanoric 1979).

از جدایه‌های باکتری که در آزمون‌های آنتاگونیستی مقدماتی فعالیت بالایی را نشان دادند و گونه‌های فوزاریوم جدا شده از فراریشه گندم در استان فارس شامل: *F. avenaceum*، *F. culmorum*، *F. graminearum* ، *F. moniliforme*، *F. nygamai*، *F. oxysporum*، *F. prolifratum*، *F. sambucinum*، *F. semitectum*، *F. solani* و *F. tricinctum* (Ravanlou & Banihashemi 1999) در آزمون‌های آنتاگونیستی استفاده شد. از هرکدام از جدایه‌ها لکه‌ای به قطر ۱۵ میلی‌متر در روی محیط کشت King-B کشت گردید. به فاصله‌ی ۱۰ میلی‌متری از لبه‌ی پرگنه، بلوکی از قارچ به قطر ۵ میلی‌متر قرار داده شده، با مقایسه‌ی میزان رشد و مقایسه با شاهد بدون باکتری نحوه‌ی رشد پرگنه‌ی قارچی به مدت چهار روز در ۲۵ °C بررسی گردید.

از جدایه‌های باکتر ی که در آزمون‌های آنتاگونیستی مقدماتی و تکمیلی فعالیت بالایی را نشان دادند (جدایه‌های K122، I90، E50، E52r، L137r، M143، D45، S202، P172، S200، H80 و K124) و *Fusarium culmorum* جداشده از فراریشه گندم در آزمون‌های آنتاگونیستی در محیط فراریشه گندم استفاده شد. بدین منظور بذرگندم رقم مرودشت (*Triticum aestivum* L. cv. Marvdasht) به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۹۶٪ و پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ گندزدایی شده ، ۱۰ مرتبه با آب مقطر سترون شستشو گردید. پنج عدد از بذرهای گندم در ظروف پلاستیکی ۲۰۰ میلی‌لیتری حاوی ماسه سترون به عمق دو سانتی‌متر کاشته و به مدت دو هفته در دمای اتاق در زیر نور مهتابی قرار داده شد.

جدایه‌های باکتری روی محیط کشت King-B کشت گردید. پس از ۴۸ ساعت سوسپانسیونی از باکتری با چگالی نوری دو در ۶۰۰ نانومتر تهیه شده، به پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون پنج میلی‌لیتر محلول متیل سلولز ۱٪ اضافه گردید. پس از ورتکس کردن حجم

www.SID.ir

Archive of SID

سوسپانسیون با آب مقطر سترون به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. هر یک از ظروف حاوی گندم‌های دوهفته‌ای با این سوسپانسیون آبیاری گردید و به مدت یک هفته در دمای اتاق و زیر نور مهتابی قرار داده شد. به عنوان شاهد از آب مقطر سترون حاوی محلول ۱٪ متیل سلولز استفاده شد.

برای تهیه مایه، ۲۵۰ میلی‌لیتر ارزن به مدت یک ساعت خیس شده، سه مرتبه در فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۱°C سترون گردید. سه قطعه پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه یک هفته‌ای قارچ *F. culmorum* به ارزن سترون اضافه شده، به مدت دو هفته در ۲۵ °C قرار داده شد. شصت میلی‌لیتر از ارزن مایه‌زنی شده به مدت ۲۰ ثانیه با قهوه خردکن (مولینکس مدل ٦٨٤ ، فرانسه) خرد شد (در این حالت حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد و به‌طور متوسط دارای ۱۰۵۰۰۰ زادمایه در میلی‌لیتر است). براساس آزمون‌های اولیه سنجشِ مایه، ۰/۵٪ از مایه با مخلوط ۱:۳ ماسه سترون و خاک بکر مخلوط گردید. گندم سه هفته‌ای مایه‌زنی شده با باکتری به همراه ماسه اطراف آن در ظروف ۹۰۰ میلی‌لیتری قرار داده شده، خاک مایه‌زنی شده با قارچ به اطراف آن اضافه گردید. آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به ازای هر جدایه باکتری در شرایط گلخانه (با درجه حرارت متوسط ٢٦°C ، از اواسط بهار تا اواسط تابستان) انجام گرفت. میزان مرگ و میر بوته‌ها در طول ۱۲ هفته آماربرداری شده، مقایسه میانگین در سطوح آماری (α) یک و پنج درصد با استفاده از آزمون LSD محاسبه گردید.

نتیجه

کلیه جدایه‌ها روی محیط King-B تولید رنگ فلورسانت نمودند و براساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در یازده گروه قرار گرفتند (جدول ۲) گروههای مشخص شده بر اساس کلیدهای موجود شامل هفت جنس و پنج بیوتیپ بودند (جدول ۳).هفتاد و پنج درصد جدایه‌های مورد آزمایش فعالیت آنتاگونیستی در برابر جدایه شاخص *Geotrichum* نشان دادند و کلیه این جدایه‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند در حالیکه فقط ۳۳٪ از این جدایه‌ها قادر به تولید آنتی‌بیوتیکی بودند (جدول ۴). همچنین کلیه جدایه‌های مورد آزمایش توانستند از رشد تمام یا تعدادی از فوزاریوم‌های بیمارگر ریشه گندم جلوگیری نماید (جدول ۵). هیچ‌کدام از

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های باکتر ی در شرایط آزمایش نتواستند *F. culmorum* را به صورت معنی دارای نسبت به شاهد کنترل کنند.

جدول ۲- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گروه‌های مختلف سودوموناس های فلورسنت جدا شده از مناطق مختلف استان فارس

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of fluorescent Pseudomonads isolates from Fars province

آزمون Test	گروه I Group I	گروه II Group II	گروه III Group III	گروه IV Group IV	گروه V Group V	گروه VI Group VI	گروه VII Group VII	گروه VIII Group VIII	گروه IX Group IX	گروه X Group X	گروه XI Group XI
واکنش گرم Gram Reaction	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
تولید رنگدانه فلورسانت Fluorescent pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوان Levan Production	+	+	–	+	–	–	–	–	–	V	–
کاتالاز Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
رشد هوازی و بی هوازی Oxidative/Fermentative	O	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
فوق حساسیت در توتون Hypersensitive Reaction	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
پکتیناز Pectinase	v	+	v	–	v	–	v	–	–	–	+
آرژنین دی هیدرولاز Arginin dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–
هیدرولیز ژلاتین Gelatin Hydrolysis	+	+	+	+	+	v	+	+	v	+	+
احیای نیترات Nitrate Reduction	–	+	+	+	–	v	+	–	–	–	–
هیدرولیز اسکولین Asculin Hydrolysis	v	–	v	–	v	v	–	–	v	v	v
تولید H_2S از پپتون H_2S from peptone	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
هیدرولیز توین ۸۰ Tween hydrolysis	+	–	v	–	–	v	–	v	–	v	v
واکنش شیر لیتموس Litmus Milk	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k	k
اوره آز Urease	–	–	–	–	–	v	–	–	–	v	–
واکنش متیل رد (MR) Methyle Red	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	v

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- (ادامه) Table 2. (continued)

تولید استوئین (VP) Asetoin production	–	–	–	–	v	–	–	–	–	–	–
تولید اندول Indol production	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
فنیل آلانین دی آمیناز Phenyalanin Diaminase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
لیزین دی کربوکسیلاز Lysin decarboxylase	–	–	–	–	–	–	v	–	–	–	–
آرژنین دی کربوکسیلاز Arginine decarboxylase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اورنیتین دی کربوکسیلاز Ornithin decarboxylase	–	–	–	–	v	–	–	–	v	–	–
تحمل KCN ۱٪ KCN tolerance	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
لسیتیناز Lecitinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v
تولید گاز از گلوکز Gas from glucose	–	–	–	–	v	–	–	–	v	–	–
تولید اسید از : Acid from :											
L(+) آرابینوز L (+) arabinose	+	+	+	v	v	+	+	+	v	v	v
ترهالوز Trehalose	+	+	+	v	–	+	+	+	v	v	v
رافی نوزRaffinose	–	–	–	–	–	v	–	–	–	v	–
L(+) رامنوز L (+) Ramnose	–	–	–	–	V	–	–	–	–	v	–
D(+) زایلوز D (+) Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+
سلوبیوز Cellobiose	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. (continued)

جدول ۲- (ادامه)

Sucrose سوکروز	–	v	v	–	v	v	V	v	v	v	–
D-glucose D گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose لاکتوز	v	v	v	v	v	v	V	v	v	v	v
Malose مالتوز	v	v	+	v	+	v	v	v	v	v	v
استفاده از :											
Utilization of											
Acetate استات	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+
D- Tartarat D تارتارات	–	+									
Citrate سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate مالونات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanin L آلانین	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v
Salicin سالیسین	v	v	–	v	v	+	v	v	v	v	v
Adonitol آدونیتول	+	–	–	v	–	V	v	–	–	–	–
Ethanol اتانول	v	+	+	v	v	V	v	v	v	v	–
Sorbitol سوربیتول	+	+	v	V	v	v	v	v	v	–	v
Myoinositol میواینوزیتول	+	+	v	v	v	v	v	v	v	v	v

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. (continued) جدول ۲- (ادامه)

+ = همه‌ی جدایه‌ها مثبت، **−** = همه‌ی جدایه‌ها منفی، **v** = جدایه‌ها مثبت یا منفی (متغییر)، **o** = هوازی اجباری، **k** = واکنش قلیایی و شفاف کردن محیط.

+ = Positive reaction,- = Negative reaction, v = Variable, o = Oxidative, K = Alkaline reaction.

جدول ۳- گونه یا بیوتیپ‌های مربوط به گروه‌های مختلف از سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده از فراریشه گندم مناطق مختلف استان فارس

Table 3. Fluorescent Pseudomonads species or biotypes of wheat rhizosphere from Fars province

گروه Group	جدایه Isolates	گونه یا بیوتیپ Species or biotype	درصد گونه یا بیوتیپ Percent of species or biotype
I	K122, T210.	*P. fluorescens* biotype I	3.39
II	J115, M140.	*P. fluorescens* biotype II	3.39
III	E54r*, F60, F67r, H86, O161, S205r, T211, T212.	*P. fluorescens* biotype III	13.56
IV	I90, Q189.	*P. fluorescens* biotype IV	3.39
V	E50, E52r, F62, F68r, I102r, L137r, M143, T213.	*P. fluorescens* biotype V	13.56
VI	C34, C35, D43, D45, H82, J112.S202.	*P. aerofaciens*	11.86
VII	F65r, P172, R190, S200.	*P. aeroginosa*	6.78
VIII	L131, L132.	*P. cichorii*	3.39
IX	A14r, A16, H83.	*P. putida*	5.08
X	A1, A6, A10, C36, H80, H81, I98, J110, J111, K124, K128, L135, Q182, R192.	*P. syringae*	23.73
XI	A2, A5, A9, G70, K125, K127, S203.	*P. viridiflava*	11.86

* شناسه r مربوط به جدایه‌هایی است که مستقیماً از سطح ریشه‌ی گندم جدا شده‌اند.

* r = Strains directly isolated from wheat root surface.

جدول۴- فعالیت آنتاگونیستی، تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک در جدایه‌های سودوموناس

www.SID.ir

Archive of SID

فلورسنت فرا ریشه گندم جدا شده از مناطق مختلف استان فارس در برابر جدایـه *Geotrichum* sp.

Table 4. Antagonistic activity, siderophore and antibiotic production of fluorescent Pseudomonads isolates of wheat rhizosphere, from Fars province against *Geotrichum* sp.

تولید آنتی بیوتیک Antibiotic production	تولید سیدروفور Siderophore production	هاله ی بازدارندگی Inhibition zone	جدایه Isolates
+	+	S *	K122
+	+	S	T210
−	+	W	J115
−	−	−	M140
−	+	S	E54
−	+	W	F60
−	+	W	F67
−	+	M	H86
−	−	−	O161
−	+	S	S205
−	+	W	T211
−	+	S	T212
+	+	S	I90
−	+	M	Q189
+	+	M	E50
+	+	S	E52
-	+	M	F62
-	+	M	F68

www.SID.ir

Archive of SID

Table 4. (continued)

جدول ۴– (ادامه)

I102	S	+	–
L137	S	+	+
M143	S	+	+
T213	S	+	–
C34	M	+	–
C35	S	+	–
D45	S	+	–
H82	M	+	–
J112	S	+	–
S202	S	+	–
F65	W	+	–
P172	S	+	−
R190	S	+	+
S200	S	+	+
L131	−	−	−
L132	M	+	+
A14	M	+	+
A16	W	+	−
A1	−	−	−
A6	W	+	−
A10	W	−	−
C36	M	+	+
H80	M	+	−
H81	−	−	−

www.SID.ir

Archive of SID

Table 4. (continued)

جدول ۴- (ادامه)

J98	−	−	−
J110	W	+	+
J111	−	−	−
K124	S	+	+
K128	S	+	−
L135	−	−	−
Q182	−	−	−
R192	S	+	−
A2	−	−	−
A5	−	−	−
A9	−	−	−
G70	M	+	−
K125	W	+	−
K127	−	−	−
S203	S	+	+
D43	−	−	−
G73	M	+	−
H83	M	+	−

*S= ایجاد هاله‌ی بازدارندگی با شعاع بیش از ۱۵ میلی متر از مرکز پرگنه بـاکتری، M= ایجـاد هاله بازدارنده با شعاع ۱۰ تا ۱۲ میلی متر از مرکز پرگنه باکتری، W=ایجاد هاله بازدارندگی بـا شعاع ۸ تا ۱۰ میلی‌متر از مرکز پرگنه باکتری، -=بدون هاله بازدارندگی.

*Inhibition zone measured from the center of bacterial colony: S = >15mm, M = 10-12mm, W = 8-10mm, - = no inhibition zone

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت جداشده از مناطق مختلف استان فارس در برابر گونه‌های فوزاریوم بیمارگر گندم

Table 5. Antagonistic activities of fluorescent Pseudomonads isolates from Fars province against Fusarium species pathogenic on wheat

جدایه باکتری / Bacterial isolate گونه قارچی / Fungus species	D45	E50	E52	I90	H80	K122	K124	L137	M143	P172	S200	S202
F. avenaceum	S	S	S	M	S	M	M	M	W	M	M	M
F. culmorum	-	M	M	S	W	M	S	M	M	S	M	W
F. graminearum	-	M	S	M	M	W	S	S	W	M	W	W
F. moniliforme	W	S	S	W	S	M	M	S	M	S	S	M
F. nygamai	W	S	S	M	W	-	S	-	-	M	M	W
F. oxysporum	W	S	S	M	M	S	S	S	M	W	S	M
F. prolifratum	M	M	S	M	M	W	S	W	W	S	S	S
F. sambucinum	M	S	M	S	M	M	M	M	M	S	S	W
F. semitectum	W	S	S	M	S	W	S	S	M	-	M	S
F. solani	M	M	S	M	M	M	S	M	S	S	S	M
F. tricinctum	M	M	S	S	M	M	S	S	S	M	S	M

S = هاله بازدارندگی قوی، کاهش رشد پرگنه قارچ بیش از ٤٠٪ M = هاله بازدارندگی متوسط، کاهش رشد پرگنه قارچ بین ۱۵ تا ٤٠٪ W = هاله بازدارندگی ضعیف، کاهش رشد پرگنه قارچ کمتر از ۱۵٪، - = بدون هاله بازدارندگی.

S = Strong inhibition zone, >40% growth inhibition, M = Medium inhibition zone, 15-40% growth inhibition, W= weak inhibition zone, < 15% growth inhibition, - = no inhibition zone.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که ۷۵٪ از جدایه‌های مورد آزمایش دارای فعالیت آنتاگونیستی در برابر جدایه‌ی شاخص *Geotrichum* هستند. کلیه‌ی جدایه‌هایی که دارای فعالیت آنتاگونیستی بوده از سازوکار تولید سیدروفور استفاده نموده‌اند در حالی که تنها در ۳۳٪ از این جدایه ها فعالیت تولید آنتی‌بیوتیک مشاهده شد. در این آزمون تنها فعالیت آن دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته که قادرند به صورت محلول در آب درآیند و ممکن است در محیط طبیعی آنتی‌بیوتیک‌های دیگری نیز از این جدایه‌ها تولید شود که در این آزمایش ردگیری نشده است از جمله این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به مواد فرار مانند HCN اشاره کرد (Hass and Defago 2005). یافته‌های *مازولا* و همکاران (Mazzola *et al.* 1992) بیان‌گر این است که در خاک طبیعی سودوموناس‌های فلورسنتی که تولید مواد آنتی‌بیوتیک مانند فنازین‌ها می‌کنند نسبت به جهش یافته‌های فاقد آنتی‌بیوتیک دارای مزیت رقابتی در بقا هستند. همچنین این امکان وجود دارد که فنازین‌ها باعث متحرک شدن یون آهن در خاک شوند (Hernandez *et al.* 2004) که این خود به عمل سیدروفورها کمک کرده و به باکتری‌های ترشح کننده‌ی آن، مزیت اکولوژیکی بیشتری خواهد داد.

با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده، اهمیت بیشتر سیدروفورها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در آزمون‌های آنتاگونیستی درون شیشه‌ای قابل مشاهده است، با این حال نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این اهمیت بسته به جدایه مورد آزمایش تغییر می‌کند. در بررسی انجام شده توسط *ولر* و همکاران (Weller *et al.* 1988) سازوکار محدود شدن بیماری در به کارگیری جدایه‌ی L30b-80 از *P. putida* تولید سیدروفور نقش عمده را در محدود سازی قارچ عامل بیماری ایفا می‌نمود درحالی که هنگام به کارگیری جدایه R1a-80R از *P. fluorescens*، تولید آنتی‌بیوتیک عامل عمده به شمار می‌رفت. این پدیده در سایر بررسی‌ها نیز تأیید شده است (Paplawsky & Ellingboe 1989). *لیمن* وهمکاران (Leeman *et al.* 1996) نشان دادند که سیدروفورها علاوه بر خارج کردن یون آهن از دسترس فوزاریوم‌های ریشه‌ی ترب (*Raphanus sativus*) می‌توانند در این گیاه تولید مقاومت القایی سیستمیک نمایند که این پدیده تنها در زمان آزمون‌های گلخانه‌ای یا مزرعه‌ای خود را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

اگرچه در طبیعت سازوکارهای دیگری از قبیل رقابت در استفاده از منابع کربوهیدراتی، توانایی کلونیزه کردن سریع فراریشه و مقاومت القایی در فعالیت‌های آنتاگونیستی دخالت دارند (Weller 1988, Hass & Defago 2005) اما در هر صورت به‌نظر می‌رسد با استفاده از جدایه‌هایی که فعالیت بالای آنتاگونیستی داشته و از هر دو سازوکار برای این فعالیت استفاده می‌نموده اند (مانند S200, P172, M143, L173, K124, K122, I90, E52, E50, D45, C33 و S202) می‌توان در مدیریت بیماری‌های قارچی ریشه‌ی گندم سود جست.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که کلیه‌ی جدایه‌های سودوموناس مورد آزمایش باعث بازدارندگی رشد در تمامی یا تعدادی از فوزاریوم‌های بیمارگر ریشه‌ی گندم گردیدند و شدت فعالیت آنتاگونیستی هر جدایه باکتری در برابر هر گونه‌ی فوزاریوم متفاوت بود (جدول ۵). برخی از جدایه‌ها در مجموع شدت بازدارندگی زیادتری نسبت به سایرین نشان دادند (جدول ۴و ۵).

در نظر گرفتن دامنه‌ی بازدارندگی به تنهایی نمی‌تواند معیار مناسبی برای کاربرد جدایه‌های سودوموناس در محیط فراریشه برای جلوگیری از فوزاریوم‌های بیمارگر ریشه باشد و علاوه بر این باید توجه کرد که جدایه‌ی مورد نظر بر بیمارگرهای اصلی گندم مانند *F. graminearum* (در حال حاضر *F. pseudograminearum* (Aoki and O'Donnell 1999)) و *F. culmorum* اثر داشته و شدت بازدارندگی آن نیز بالا باشد. براین اساس جدایه‌های E50 و E52 از *P. fluorescens* biotype V ، K127 از *P. syringae* و S200 از *P. aeroginosa* موفق‌ترین جدایه‌ها در برابر فوزاریوم‌های ریشه‌ی گندم بوده‌اند زیرا علاوه بر داشتن دامنه‌ی بازدارندگی بالا و شدت بازدارندگی نسبی بالا، بر بیمارگرهای اصلی ریشه‌ی گندم نیز مؤثر بوده‌اند. اگرچه این فعالیت ممکن است در محیط فراریشه به علت تفاوت در میزان بقا، جایگری باکتری در محیط خاک و همچنین فعالیت ارتقاء دهندگی رشد احتمالی آن‌ها متفاوت باشد. بررسی‌های متعدد روی اثر سودوموناس‌های فلورسنت بر فوزاریوم‌های بیمارگر ریشه سایر گیاهان نشان داده که دامنه‌ی سازوکار بازدارندگی بسیار وسیع است و علاوه بر رقابت بر سر آهن (Bakker *et al.* 1988, Raaijmakers *et al.* 1995) و تولید آنتی‌بیوتیک (Anjaiah *et al.* 1998, Chin-A-Woeng *et al.* 1998) باز دارندگی ممکن است در اثر رقابت بر

www.SID.ir

Archive of SID

سر مـواد غـذایی (Couteaudier & Alabouvette 1990) و القـای مقاومـت سیسـتمیک در برابـر فوزاریوم‌ها (Van Peer *et al.* 1991,Leeman *et al.* 1996, Van Wees *et al.* 1997, Van Loon *et al.* 1998) باشد.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که هیچ‌کدام از جدایه‌های بـاکتری در شـرایط آزمـایش نتوانست *F. culmorum* را در محیط فراریشه به نحوی کنترل نماید که میانگین مرگ و میـر در سطوح آماری (α) یک و پنج درصد اختلاف معنی‌داری با شـاهد داشـته باشـد. بـا توجـه بـه ناپیوسته بودن داده‌های به دست آمده و وسیع بودن دامنه تغییرات علاوه بـر مقایسـه میـانگین مرگ و میر با شاهد به کمک آزمون LSD، مقایسه گروهی تیمارهـا بـه صـورت مقایسـه‌هـای مستقل (orthogonal) نیز به عمل آمد که هیچ‌کدام از مقایسه‌هـا معنـی‌دار نبـود. ایـن موضـوع احتمالاً یا به علت عدم توانایی باکتری‌ها در کلونیزه کردن ریشه و مآلاً جلوگیری از رشد قارچ می‌باشد و یا به دلیل عدم حمایت محیط فراریشه از رشد باکتری‌ها به علت کمبود مواد غذایی و مواد آلی است. سایر بررسی‌ها نشان داده کـه اسـتفاده همزمـان از چنـد جدایـه مختلـف از سودوموناس‌های فلورسنت به علت ترکیب شیوه‌ی عملکرد هرجدایه، باعث کارایی بیشتر و یا حداقل ایجاد مبارزه‌ی بیولوژیک قابل اعتمادتری خواهد شد (de Boer *et al.* 2003).

اگرچه نتایج آزمایش های درون شیشه ای (*in vitro*) نشان داده که تنها ۲۵٪ از جدایه‌های باکتری‌های مورد آزمایش توانسته‌انـد از رشـد پرگنـه‌ی *Fusarium culmorum* تـا میـزان ٤٠٪ جلوگیری کنند، اما به نظر می‌رسد این امکان وجود دارد که با مهیا بودن شرایط از نظر رطوبت و میزان مواد آلی تعدادی از جدایه‌های باکتری در محیط طبیعی باعث کنترل قارچ فوق گردند.

در کل به نظر می‌رسد که استفاده از خاک بستره با میزان مواد آلی کافی، تغذیه مصنوعی با انواع کودها، استفاده هم زمان از چند جدایه و همچنین انتخاب شاخص مناسبی برای مقایسـه میانگین مانند درصد جلوگیری جدایه‌های باکتری از کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ می توانـد در بهبود و قابل اطمینان‌تر کردن نتایج بررسی‌های آتی مؤثر باشد.

سپاسگزاری

از شورای پژوهش‌های علمی کشور به خاطر حمایت مالی از طرح ملـی شـماره ۵۳۹ در

www.SID.ir

Archive of SID

خصوص "مطالعه‌ی میکروفلور زیان آور و مفید طوقه و ریشه گندم در استان فارس" قـدردانی می‌گردد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (13-9) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: دکتر رضا مستوفی‌زاده‌قلمفرسا، دکتر ضیاءالدین بنـی‌هاشـمی و دکتـر سـید محسن تقوی، شیراز، باجگاه، دانشکده کشاورزی دانشـگاه شـیراز، بخـش گیاهپزشکی

www.SID.ir