کنترل بیولوژیکی پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست

Biological control of Fusarium wilt of potato using antagonistic strains of bacteria

امیر خراسانی آقازاده*، عزیزاله علیزاده و ناصر صفایی

گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت ۱۳۸۵/۵/۱ پذیرش ۱۳۸۷/۵/۲۳

چکیده

بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی از جمله بیماریهای مهم این محصول است که در مزرعه و انبار خسارت فراوان وارد می کند. به منظور کنترل بیولوژیک با این بیماری از مجموع ۱۲۰ سوش باکتری جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی، ۲۷ جدایه با روش کشت متقابل توانایی آنتاگونیستی بالایی در برابر قارچ بیمارگر از خود نشان دادند. توانایی آنتاگونیستی باکتری‌های جدا شده از نظر تولید ترکیبات فرار، آنتی‌بیوتیک و سیدروفور مورد بررسی قرار گرفت. هشت استرین از مجموع ۲۷ جدایه باکتریایی که دارای اثرات آنتاگونیستی بالاتری بودند و در این میان دو سوش موتان نیز وجود داشت، جهت آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب گردید. این استرین‌ها شامل *Pseudomonas fluorescens* biov. III DA1, DA1m, DA3 ، *Bacillus subtilis* DM1, DM1m, DP1، *B. brevis* B1 و *P. fluorescens* CHAO (جدایه مدل) بودند. ارزیابی بیوکنترل با استفاده از غده‌های سیب‌زمینی، با دو روش پوشش بذر و محلول‌پاشی خاک در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۷ تیمار و ۳ تکرار صورت پذیرفت. در این آزمایش استرین *Pseudomonas fluorescens* biov. III DA1 بیشترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری و استرین *B. brevis* B1 بیشترین تاثیر را روی فاکتورهای رشدی نشان داد. تغییرات جمعیت آنتاگونیست‌های موتان مقاوم به ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید و بیمارگر در طول

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش‌های گلخانه‌ای، همبستگی منفی بین این دو پارامتر را نشان داد (r= -٦٤/٣٪).

واژه‌های کلیدی : سیب‌زمینی، کنترل بیولوژیکی، پژمردگی فوزاریومی و باکتری‌های آنتاگونیست

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از محصولات غده‌ای است که نقش مهمی در تغذیه مردم جهان به ویژه کشورهای جهان سوم دارد. این محصول با سطح زیر کشت ۲۲ میلیون هکتار و تولید حدود ۳۰۰ تن به علت داشتن محتوای بالای کربوهیدراتی و کولتیوارهای چند منظوره چهارمین محصول غذایی جهان به شمار می‌رود (Secor & Gudmestad 1999). در ایران سطح زیر کشت این محصول ١٤٣٢٦٦ هکتار، میزان تولید آن ۳۱۳۹۹۱۹ تن و متوسط تولید تقریباً ۲۲ تن در هکتار است (Anonymous 2004). بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در ایران ابتدا در سال ۱۳٤۹ توسط گرلاخ و ارشاد گزارش شد (Behdad 1996). قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* عامل سه بیماری مهم در سیب‌زمینی می‌باشد که عبارتند از: پوسیدگی خشک فوزاریومی (Potato dry rot)، پژمردگی (Potato wilt) و پوسیدگی انتهای ساقه سیب‌زمینی (Potato stem-end rot) (Saremi, 2000).

بیماری پژمردگی در مناطقی که سیب‌زمینی در دمای نسبتاً بالا خصوصاً هنگامی که گیاه در فصل گرم و خشک کشت شود، بسیار پراکنده و با شدت بالایی ظهور پیدا می‌کند. علائم بیماری در اواسط فصل رویشی ظاهر و پژمردگی سریع حادث می‌شود بطوریکه ساقه از قسمت پایین می‌افتد و گیاه پیش از موعد می‌میرد. پژمردگی از برگ‌های پایینی شروع و به قسمت‌های بالایی گیاه گسترش می‌یابد. تغییر رنگ سیستم آوندی ساقه به قسمت‌های پایینی ساقه و کمی بالاتر از سطح خاک محدود می‌شود (Saremi 2000).

علی‌رغم اینکه یکی از روشهای متداول کنترل عوامل بیماریزا و کاهش خسارت ناشی از آنها در گیاهان استفاده از سموم شیمیایی می‌باشد، در مورد این بیماری مصرف هیچگونه سمی به دلیل عدم کارآیی و عوارض زیست محیطی توصیه نمی‌شود. از این‌رو به نظر می‌رسد که استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست بومی منطقه به منظور کنترل بیماری، گامی موثر در جهت کاهش خسارت ناشی از قارچ بیمارگر باشد. امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای خاکزاد با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست قریب به ۸۰ سال است که مورد توجه

Archive of SID

www.SID.ir

محققین قرار گرفته است (Slininger *et al*. 2003). *شیسلر* و همکاران (Schisler *et al*. 1996) تاثیر غلظت‌های مختلف ۱۸ جدایه باکتریایی آنتاگونیست متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Enterobacter* را در کنترل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی با عامل *F. sambucinum* بررسی نمودند. غلظت‌های 10^6، 10^7 و 10^8 cfu/ml دوزهای مناسب و غلظت 10^8cfu/ml مؤثرترین دوز جهت کنترل پوسیدگی خشک معرفی شد.

صدفی و همکاران (Sadfi *et al*., 2001) موفق به جداسازی باکتری‌های حاوی اسپور متعلق به جنس *Bacillus* شدند که حالت آنتاگونیستی روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی خشک غده‌های سیب‌زمینی ناشی از قارچ *F. roseum* var. *sambucinum* را داشت. همگی این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی ۵۰ درصد کاهش رشد قارچ را باعث شدند. همچنین جدایه‌های *B. lentimorbus* X7، *B. cereus* X9 و *B. licheniformis* 132, X16, G7 پوسیدگی خشک را در غده‌های مایه‌زنی شده به میزان ۸۹–٦٦ درصد کاهش دادند. مکانیسم تأثیر این باکتری‌ها مربوط به تولید مواد فرار و آنزیم‌های تجزیه کننده کیتین و گلوکان می‌باشد. *نتز* و همکاران (Notz *et al*. 2002) توکسین بیماریزای گیاهی فوزاریک اسید تولید شده توسط استرین‌های *F. oxysporum* را به عنوان فاکتور کلیدی در ممانعت از تولید آنتی‌بیوتیک 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) توسط *P. fluorescens* CHAO معرفی نمودند. این توکسین با ممانعت از بیان اپرن *phl*ACBDE استرین CHAO در محیط کشت و ریزوسفر میزبان مانع از تولید DAPG می‌شود. همچنین همبستگی مثبتی بین غلظت فوزاریک اسید و میزان بیان ژن سنتزکننده DAPG وجود دارد. DAPG یکی از موثرترین متابولیت‌های ضد میکروبی تولید شده توسط استرین‌های فلورسنت سودوموناس می‌باشد. *اسلینینجر* و همکاران (Slininger *et al*. 2004) برای اولین بار متابولیت‌های زیست فعال indole-3-acetic acid (IAA), Phenylacetic acid (PAA) و Tyrosol (TSL) را از باکتری بیوکنترل *Enterobacter cloacae* S11:T:07 جدا نموده و نقش آن را در جلوگیری از پوسیدگی خشک سیب‌زمینی ناشی از *F. sambucinum* به اثبات رسانیدند. به عقیده آنان این ترکیبات که تولید آنها توسط باکتری به نوع مواد غذایی محیط کشت وابسته است، بطور معنی‌داری پوسیدگی خشک و جوانه‌زنی غده‌های سیب‌زمینی را کاهش می‌دهند.

Archive of SID

www.SID.ir

صفری و روحانی (Safari & Rouhani 1998) در تحقیقی اثر چهار جدایه *B. subtilis* بدست آمده از ریزوسفر سیب زمینی در همدان را روی قارچ های بیماریزای *Verticilium albo-atrum*، *F. oxysporum*، *F. solani* و *C. coccodes* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. بیشترین قدرت بازدارندگی در میان جدایه ها مربوط به جدایه P2 در قارچ *V. albo-atrum* تشخیص داده شد.

هدف از انجام این تحقیق جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر سیب‌زمینی و بررسی توانایی آنها در کنترل این بیماری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌باشد.

روش بررسی

جداسازی میکروارگانیسم‌ها

به منظور جداسازی قارچ عامل بیماری، مزارع سیب‌زمینی شهرستان دامغان مورد بازدید مکرر قرار گرفت و نمونه‌های مبتلا و مشکوک به بیماری به آزمایشگاه منتقل گردیدند. عامل بیماری از بخش آوندی قسمت‌های هوایی گیاه و پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد در محیط کشت PDA و محیط کشت اختصاصی Nash & Snyder جداسازی شد. پس از رشد قارچ اقدام به خالص‌سازی آن با استفاده از دو روش تک اسپور (Single spore) و کشت نوک ریسه (hyphal tip culture) گردید. به منظور جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست چندین نمونه خاک از ناحیه ریزوسفر بوته‌های سالم سیب‌زمینی جمع‌آوری و از آن غلظت‌های مختلف بطور سریالی تهیه گردید. از هر یک از رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} نمونه‌ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون روی محیط کشت نوترینت آگار پخش و پس از ظهور پرگنه‌ها و خالص‌سازی آن، در شیشه‌های پنی‌سیلین حاوی ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل نگهداری شدند.

آزمون بیماریزایی جدایه های قارچی

آزمون بیماریزایی جدایه های فوزاریوم طبق روش *اباوی و لوربیر* (Abawi & Lorbeer 1971) بصورت کاشت بذر سیب زمینی در گلدان های حاوی خاک سترون + مایه تلقیح قارچ انجام شد. همچنین برای انتخاب موثرترین جدایه از نظر بیماریزایی از

Archive of SID

www.SID.ir

شاخص *آرورا* و *پندی* (Arora & Pandy 1988) که بر اساس طول نکروز آوندی بود، استفاده شد.

تعیین فرم مخصوص جدایه بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* 11-S

تعیین فرم مخصوص جدایه **بیمارگر** *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* 11-S با چندین گیاه متعلق به تیره سیب زمینی (*Solanaceae*) و تیره‌های نزدیک به آن چون بقولات (*Fabaceae*) و کدوئیان (*Cucurbitaceae*) انجام شد (جدول ۲). در انتهای دوره ۶۰ روزه آزمایش، کلیه گیاهان تیمار شده با جدایه 11-S و شاهد به دقت بازرسی و از بخش های هوایی آنها نمونه برداری شد. کلیه نمونه ها از بافت آوند چوبی ساقه تهیه و در محیط PDA کشت گردیدند.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی میکروارگانیسم‌های جدا شده

توانایی آنتاگونیستی میکروارگانیسم ها در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از آزمون کشت متقابل به روش *هجدرون* و همکارن (Hagedorn *et al*. 1989)، تولید ترکیبات فرار ضدقارچی مطابق روش *مونتالگر* و همکاران (Montealegre *et al*. 2003) و تولید آنتی بیوتیک براساس روش *کراس* و *لوپر* (Kraus & Loper 1990)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۸ تیمار و ۳ تکرار انجام و داده‌های بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون LSD در سطوح ۱٪ و ۵٪ انجام شد.

بررسی تولید سیدروفور

این آزمایش با استفاده از محیط آگار آبی کرم آزورل اس براساس روش اصلاح شده *الکساندر* و *زوبرر* (Alex&er & Zuberer 1991) انجام شد. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی مشخص و با اندازه‌گیری قطر هاله رنگی اطراف پرگنه هر جدایه توانایی آن در تولید سیدروفور ارزیابی شد.

تهیه موتان باکتریایی

موتان‌های باکتریایی از طریق مخطط کردن روی محیط NA حاوی مقادیر متفاوت آنتی بیوتیک به شرح زیر به دست آمد. ابتدا مقاومت باکتری بر ریفامپیسین آزمایش گردید. برای این کار غلظت های افزایشی این آنتی بیوتیک که عبارت بودند از: ۱mg/lit، ۵mg/lit، ۱۰mg/lit، ۲۰mg/lit، ۳۵mg/lit، ۵۰mg/lit، ۱۰۰mg/lit و ۱۵۰mg/lit استفاده شد. پرگنه های مقاوم به این آنتی بیوتیک انتخاب و سپس مورد استفاده برای القاء مقاومت به آنتی بیوتیک دوم قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

روش کار و غلظت های مورد استفاده برای آنتی بیوتیک دوم یعنی نالیدیکسیک اسید دقیقا مشابه ریفامپیسین بود. موتان های مقاوم به آنتی بیوتیک به محیط NB حامل ٤٠٪ گلیسرول منتقل و در ٧٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جمعیت باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک و جمعیت مادری از نظر سرعت رشد، مورفولوژی و سایر خصوصیات مقایسه و سپس یک پرگنه بدون اختلاف معنی‌دار برای آزمایش های گلخانه ای انتخاب شد. این پروسه دوبار تکرار شد (Alizadeh *et al*. In Press).

بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در شرایط گلخانه

در این آزمایش قدرت جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست در کاهش یا کنترل پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تهیه مایه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* سوسپانسیون اسپور قارچ به درون کیسه‌های پلاستیکی حاوی ماسه دو بار سترون اضافه گردید و کیسه‌ها به مدت ٢٠ روز در دمای ١٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. طی این مدت قارچ تولید کلامیدوسپور نموده که از آن به عنوان مایه آلوده کننده جهت آزمون های گلخانه‌ای استفاده شد. تهیه مایه جدایه‌های آنتاگونیست مطابق روش کیم و همکاران (Kim *et al*. 1997) انجام شد. بدین منظور از کشت تازه باکتری یک لوپ پر به فلاسک‌های حاوی محیط NB اضافه شد. فلاسک‌ها در دمای ٢٨-٢٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت در روی شیکر با دور ١٥٠rpm قرار داده شد. برای انجام مطالعات گلخانه‌ای، گلدان‌هایی به قطر دهانه ١١ سانتی‌متر انتخاب و با مخلوط خاک سترون+ پرلیت+ پیت ماس (به نسبت ١: ١: ٢) پر شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ١± ٢٥ درجه سانتی‌گراد با تناوب نوری ١٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. در تمامی آزمایش های گلخانه ای از سیب‌زمینی رقم اگریا که از حساسیت بالایی نسبت به این بیماری برخوردار بود و از جدایه S -11 قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* که از قسمت های بالایی آوند ساقه جدا شده بود، استفاده گردید. روشهای ذیل جهت بررسی اثر باکتری های آنتاگونیست در کنترل بیماری مورد مقایسه قرار گرفت.

الف) تهیه گیاهچه سیب زمینی با ساقه های بریده شده: در این آزمایش ابتدا از ساقه‌های انتهایی حامل ٣- ٢ دمبرگ بوته‌های سیب زمینی، برشهایی تهیه و هر یک از ساقه های بریده شده داخل گلدان‌های پلاستیکی کوچک حاوی مخلوط پرلیت و پیت ماس به نسبت ١:٢ قرار داده

Archive of SID

www.SID.ir

شد. گیاهچه های یکدست با ارتفاع حدود ۲۰ سانتی متر برای آزمایش های بیوکنترل مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش به صورت مایه زنی گیاهچه های سیب زمینی در سوسپانسیون باکتری حاوی 10^9 سلول در میلی لیتر به مدت نیم ساعت انجام شد و سپس گیاهچه ها به گلدانی که نیمه پایینی آن با اینوکلوم قارچ به میزان ۲۰۰ عدد کلامیدوسپور در هر گرم خاک پر شده بود کشت و مابقی گلدان با خاک استریل تا ارتفاع مناسب پر گردید. در گلدان های شاهد آلوده به قارچ و شاهد غیر آلوده، ریشه های سیب زمینی به جای سوسپانسیون باکتری در آب مقطر سترون غوطه ور گردیدند. این آزمایش در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۱۹ تیمار در ۳ تکرار انجام گرفت. نتایج حاصله پس از ۷۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس وزن تر و خشک اندام های هوایی و زیر زمینی و شاخص تعیین آلودگی بود. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار MSTAT-C انجام و گروهبندی تیمارها با آزمون LSD در سطوح ۱٪ و ۵٪ صورت گرفت.

ب) آزمون بیوکنترل با غده های سیب زمینی: در این آزمایش غده‌های سیب‌زمینی با دو روش ۱- پوشش بذر (seed coating) و ۲- تیمار خاک (soil drenching) توسط باکتری های آنتاگونیست تیمار شدند. در روش اول سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست در محلول یک درصد متیل سلولز تهیه گردید. یک گرم متیل سلولز به آرامی به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب در حال جوشیدن اضافه گردید. پس از سترون نمودن مخلوط فوق، غلظت نهایی باکتری در این سوسپانسیون در 10^9 سلول در میلی‌لیتر تنظیم گردید. غده‌های سیب‌زمینی ابتدا بطور کامل شستشوی گردید. سپس با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۲-۱ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و به مدت یک ساعت داخل فلاسک های حاوی سوسپانسیون باکتری نگهداری شدند. سپس در مجاورت هوا خشک و در هر گلدان یک عدد غده آغشته به باکتری کاشته شد (Weller & Cook 1983). در روش دوم، پس از کاشت غده‌ها داخل گلدان ۷۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست با غلظت 10^9 سلول در میلی‌لیتر به هر یک از گلدان‌ها اضافه گردید و این تیمار هر ۱۵ روز یکبار تکرار شد. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید (Weller & Cook 1983). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳۷ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. نتایج حاصله پس از ۹۰ روز براساس وزن تر و خشک اندام‌های هوایی

Archive of SID

www.SID.ir

و زیرزمینی و درصد آلودگی بوته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C و گروه‌بندی تیمارها با آزمون LSD در سطوح ۱٪ و ۵٪ انجام گرفت.

تعیین جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست جهش یافته و پاتوژن در طول آزمایشات گلخانه‌ای

به منظور بررسی روند تغییرات جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست جهش یافته در طول آزمایش از دو جدایه موتان *P. fluorescens* biov. III DA1m و *B. subtilis* DM1m در آزمایش‌های گلخانه‌ای استفاده شد. تعیین جمعیت این دو باکتری، هر ۱۵ روز یکبار در طول دوره آزمایش از خاک تیمارهای مختلف صورت گرفت. برای این منظور ۱۰ گرم خاک جمع‌آوری شده از سه ناحیه ریزوسفر هر یک از تکرارهای مربوطه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون سوسپانسیون می‌شد و پس از تهیه رقت‌های متوالی از آن، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری از رقت 10^{-4} روی محیط NA حاوی دو آنتی‌بیوتیک (ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید) کشت می‌گردید. تشتک های پتری به مدت ۷۲–۴۸ ساعت در دمای ۲۸–۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری، سپس پرگنه های مربوطه شمارش و محاسبات لازم صورت می‌گرفت. برای تعیین جمعیت بیمارگر نیز هر ۱۵ روز یکبار ۱۰ گرم از خاک ناحیه ریزوسفر تیمارهای مختلف پس از تهیه رقت های متوالی روی محیط Nash & Snyder کشت می گردید. تشتک های پتری به مدت ۷۲–۴۸ ساعت در دمای ۲۸–۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری، سپس پرگنه های مربوطه شمارش و محاسبات لازم صورت می‌گرفت.

نتیجه

جداسازی میکروارگانیسم‌ها

از مجموع نمونه‌های بیمار سیب‌زمینی منتقل شده به آزمایشگاه، ۴۱ جدایه فوزاریوم از قسمت‌های مختلف ریشه، طوقه و ساقه گیاهان آلوده جدا و خالص سازی گردید و با استفاده از کلیدهای معتبری همچون *نلسون* و همکاران (Nelson *et al*. 1983) و *برگس* و همکاران (Burgess *et al*. 1994) گونه آنها *F. oxysporum* تشخیص داده شد. در آزمون بیماریزایی جدایه‌های فوزاریوم، جدایه S-11 که از قدرت بیماریزایی بیشتری نسبت به سایرین برخوردار و از ناحیه آوند ساقه جداسازی شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. ضمنا در این بررسی تعداد

Archive of SID

www.SID.ir

۱۲۰ جدایه باکتری از ریزوسفر بوته‌های سیب‌زمینی جدا گردید و ۲۷ جدایه در شرایط آزمایشگاهی فعالیت آنتاگونیستی در مقابل *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* از خود نشان دادند که در این بین، ۲۱ جدایه متعلق به باکتری‌های گرم مثبت و ٦ جدایه متعلق به باکتری‌های گرم منفی بود (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات باکتری های آنتاگونیست مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Characteristics of antagonistic bacteria used in present study

گونه باکتری Bacterial species	جدایه باکتری Bacterial strains
Bacillus subtilis	TA6,GA1,GA2,DM1,DP1,DP2,DP3,DP4,DP5,DP6,DP7,TB1,DR1,DR2,DR3,DR4,DR5,B2
B. pumilus	DM2
B. brevis	B1
Pseudomonas flourescens biov. II	T2
P. flourescens biov. III	DA1,DA2,DA3,GP1,GP2
Coryneforme sp.	TC4

تعیین فرم مخصوص جدایه بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* 11-S

در آزمایش تعیین فرم مخصوص جدایه بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* 11-S، مشخص شد که این جدایه تنها قادر به ایجاد پژمردگی در سیب زمینی بوده و در هیچ یک از میزبان های دیگر که با این جدایه مایه زنی شده بودند پژمردگی ایجاد نشد. بطوریکه قارچ عامل بیماری به استثنای سیب زمینی از اندام های هوایی سایر میزبان ها جدا نشد. لذا این جدایه به عنوان فرم اختصاصی سیب زمینی تحت عنوان *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* معرفی شد (جدول ۲).

آزمون کشت متقابل

در این آزمون جدایه *P. flourescens* biov. III GP1 با ٦٨/٢ درصد کاهش رشد قارچ بیشترین و جدایه *B. pumilus* DM2 با ٢٥/٤٧ درصد کاهش رشد کمترین تاثیر را بر کاهش رشد میسلیومی قارچ دارا بودند.

آزمون بررسی ترکیبات خارج سلولی در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*

جدایه‌های آنتاگونیست از نظر تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی در جلوگیری از رشد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فرم ویژه جدایه S-11 قارچ *Fusarium oxysporum* بازیافت شده از ساقه سیب زمینی

Table 2. Forma specialis of *Fusarium oxysporum* isolate (11-S) recovered from stem vascular of potato

میزبان مایه زنی شده Inoculated host	جداسازی قارچ *F. oxysporum* از آوند چوبی Recovery from vascular		میزبان Host	جداسازی قارچ *F. oxysporum* از آوند چوبی Recovery from vascular	
	ریشه Root	ساقه Stem		ریشه Root	ساقه Stem
سیب زمینی (Potato)	+	+	لوبیا(Bean)	–	–
گوجه فرنگی(Tomato)	+	–	کتان(Flax)	–	–
فلفل(Pepper)	–	–	پنبه(Cotton)	–	–
بادنجان(Eggplant)	+	–	کنجد(Sesame)	–	–
تنباکو(Tobacco)	–	–	کدو(Zucchini)	–	–
نخود(Chickpea)	–	–	خربزه(Melon)	–	–
عدس(Lentil)	–	–	خیار(Cucumber)	–	–
ماش(Mung Bean)	–	–	هندوانه(Watermelon)	–	–

– : عدم جداسازی قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*

+ : جداسازی قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*

-: isolation of *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*
+: not isolation of *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*

میسلیوم قارچ در سطح ۱٪ تفاوت معنی داری نشان دادند و جدایه *P. flourescens* biov. III DA1 با ۱۰۰ درصد کاهش رشد بیشترین و جدایه *B. subtilis* TA6 با ۸/۸ درصد کاهش رشد کمترین تاثیر را در کاهش رشد میسیلومی قارچ داشتند.

بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*

به منظور نشان دادن اثر ترکیبات فرار ضدقارچی در کاهش رشد میسلیوم قارچ، قطر پرگنه قارچ در سطح رویی تشتک مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۱٪ وجود داشته و جدایه *P. flourescens* biov. III GP1 با ۹۲/۵ درصد کاهش رشد بیشترین و جدایه *Coryneforme* sp. TC4 با ۱۰/۷۳۳ درصد کاهش رشد کمترین تأثیر را در کاهش رشد میسلیومی قارچ داشتند.

بررسی تولید سیدروفور

از مجموع ۲۸ جدایه باکتریایی آنتاگونیست که در مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت، ۱۳ جدایه قادر به تولید سیدروفور بر روی محیط CAS-agar بودند. در این بین جدایه *P. flourescens* biov. III DA1 و جدایه *B. subtilis* TA6 به ترتیب با تولید هاله‌هایی با قطر ۵/۲ و ۳/۲۷ سانتی‌متر بیشترین توانایی را در تولید سیدروفور در بین جدایه‌های سودوموناس و باسیلوس داشتند.

بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در گلخانه

با توجه به نتایج آزمایش‌های درون شیشه‌ای، اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های *P. fluorescens* biov. III DA1، *P. fluorescens* biov. III DA1m، *P. fluorescens* biov. III DA3، *B. subtilis* DM1، *B. subtilis* DP1 و *B. brevis* B1 به همراه جدایه *P. fluorescens* CHAO (دریافتی از بخش پروکاریوت موسسه گیاهپزشکی ایران) در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی اثر باکتری های آنتاگونیست در رشد رویشی سیب زمینی و جلوگیری از فعالیت بیماریزایی قارچ عامل بیماری، آنتاگونیست ها با دو روش تیمار گیاهچه های ناشی از قلمه های تکثیر شده سیب زمینی و تیمار غده های سیب زمینی با باکتری های آنتاگونیست مورد استفاده قرار گرفت. در هر روش شدت بیماری، وزن تر و خشک اندام های هوایی و ریشه اندازه گیری و داده های حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تاثیر باکتری های آنتاگونیست در روش تیمار گیاهچه های ناشی از قلمه های سیب زمینی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین تیمارها از نظر تاثیر روی وزن تر و خشک اندام های هوایی تفاوت معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1 (تیمار۱) نسبت به شاهد مثبت ٤١/١٨ درصد افزایش رشد و در مقابل تیمار بیمارگر ۸۵/۱ درصد کاهش رشد داشته است. همچنین متوسط وزن خشک تیمار شده توسط جدایه های *P. fluorescens* biov. III DA1 (تیمارهای ۱و۲) و *P. fluorescens* biov. III DA2 (تیمار ۳) نسبت به شاهد مثبت به ترتیب با ٤١/١، ١٩/١ و ٢٠/٤ درصد افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

رشد به عنوان بهترین تیمارها معرفی شدند. تیمار بیمارگر نیز در مقایسه با شاهد مثبت سبب ٦٦/٢٦ درصد کاهش رشد شد (جدول ۳). بررسی تاثیر جدایه های آنتاگونیست روی وزن تر و خشک ریشه نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، متوسط وزن تر تیمار شده توسط جدایه های *P. fluorescens* biov. III DA1 (تیمارهای ۱و۲) و *P. fluorescens* biov. III DA2 (تیمار ۳) نسبت به شاهد مثبت به ترتیب با ٤٠/١٥، ١٧/٥١ و ٢٧/٢٦ افزایش رشد بیشترین تاثیر را دارا بودند. همچنین متوسط وزن خشک تیمار شده با جدایه های *P. fluorescens* biov. III DA1 (تیمارهای ۱و۲) و *P. fluorescens* biov. III DA2 (تیمار۳و٤) به ترتیب با ٣٠/٦١، ٩/٩٢، ١٩/٤ و ٦/٩ افزایش رشد نسبت به شاهد مثبت بیشترین کارایی را در افزایش وزن خشک ریشه نشان دادند (جدول ۳).

کاهش شدت بیماریزایی در بین جدایه های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد منفی (تیمار۱۹) قابل توجه بود و جدایه های *P. fluorescens* biov. III CHAO و *P. fluorescens* biov. III DA1 بطور کامل از پوسیدگی ریشه توسط قارچ عامل بیماری ممانعت کردند. همچنین تمامی جدایه ها به استثنای جدایه *B. subtilis* DM1 مانع از پیشرفت عامل بیماریزا در آوند ساقه و ایجاد نکروز در آن شدند (جدول ۳).

تاثیر باکتری های آنتاگونیست در روش تیمار غده های سیب زمینی

تیمارهای مختلف باکتری تقریباً اثر یکسانی روی رشد اندام‌های هوایی داشتند و در این بین متوسط وزن تر و خشک تیمار مربوط به جدایه *B. subtilis* DM1 به ترتیب با ۲۷ و ۱۱/۹ درصد افزایش رشد نسبت به شاهد به عنوان بهترین تیمار شناخته شد (جدول ٤). روی وزن تر و خشک ریشه بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت و متوسط وزن تر و خشک تیمارهای مربوط به جدایه *B. brevis* B1 (تیمار ۲۹) به ترتیب با ١٠٥/٣ و ١١٦/٣ درصد افزایش رشد نسبت به شاهد مثبت (تیمار ۳۳) بیشترین تأثیر را روی وزن ریشه دارا بود (جدول ٤). اثر باکتری‌های آنتاگونیست در کاهش شدت بیماریزایی (پوسیدگی ریشه و نکروز آوندی) در مقایسه با شاهد منفی (تیمار ۳۵) قابل توجه بود و این اثر در روشهای مختلف کاربرد آنتاگونیست (تیمار بذر و تیمار خاک) نیز متفاوت بود. جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1 هم در روش تیمار بذر و هم در روش تیمار خاک به ترتیب با ۱۰۰ و ۸٤ درصد کاهش پوسیدگی ریشه، بیشترین تأثیر را در کاهش فعالیت بیماریزایی قارچ نشان داد. حرکت عامل

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- اثرات باکتری های آنتاگونیست روی وزن تر و خشک اندام های هوایی و ریشه و میزان پوسیدگی ریشه در روش تیمار قلمه های سیب زمینی

Table 3. Antagonistic effects of bacteria on fresh & dry weight of aerial & root portions & percent of root rot of potato in a greenhouse experiment in which stem cut-inoculation method was employed

تیمار Treatment	جدایه باکتری Isolate bacteria	وزن تر اندام هوایی (گرم) Aerial fresh weight (gr)	وزن خشک اندام هوایی (گرم) Aerial dry weight (gr)	وزن تر ریشه (گرم) Root fresh weight (gr)	وزن خشک ریشه (گرم) Root dry weight (gr)	درصد پوسیدگی ریشه Percent root rot
1	DA1	218.17a	17.07a	12.94a	1.01a	-
2	P+DA1	182.4b	14.41ab	10.85abc	0.85abc	0
3	DA1m	186.1b	14.57ab	11.75ab	0.92ab	-
4	P+DA1m	157.6bc	12.41bc	9.84bcd	0.83abc	4.2
5	CK	154.9bc	12.10bcd	9.23bcde	0.77bcd	-
6	CK-B	141.7cde	10.72cdef	8.71cdef	0.76bcd	-
7	DA3	145.0cd	10.85cdf	7.77df	0.66cde	-
8	P+DA3	147.7cd	11.26cd	8.02def	0.70cde	8.33
9	B1	125.9cde	9.53defgh	7.72def	0.66cde	-
10	P+B1	110.3ef	7.82ghi	6.01fghi	0.53efg	20.83
11	CHAO	143.7cd	10.6cdefg	7.70def	0.67cde	-
12	P+CHAO	116.4def	8.18fghi	6.34fgh	0.56efg	0
13	DP1	118.7def	8.44efghi	6.94efg	0.61def	-
14	P+DP1	91.86fg	6.403ij	4.08hi	0.39gh	16.7
15	DM1	128.9cde	9.47defgh	5.95fghi	0.54efg	-
16	P+DM1	76.81g	6.01ij	3.33ij	0.30h	29.2
17	DM1m	142.9cd	11.09cde	6.92efg	0.61def	-
18	P+DM1m	93.33fg	7.06hi	4.40ghi	0.42fgh	12.5
19	P	23.08h	4.08j	0.67j	0.08i	54.2

اعداد جدول میانگین سه تکرار است

تیمارهای هر ستون که با حروف مختلف نشان داده شدند، در آزمون LSD در سطح ۱٪ با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند. P: جدایه s-11 قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi*، CK: شاهد مثبت، DA1 و DA3: *Pseudomonas fluorescens* biov.III، B1: *Bacillus brevis*، DP1 و DM1: *B. subtilis*، DA1m: موتان جدایه DA1 و DM1m: موتان جدایه DM1، CHAO: *P. fluorescens* CHAO

Each data represent the mean three replicate.
Means followed by different letters within a column are significantly different (P= 0.01) according to LSD test.

Archive of SID

www.SID.ir

بیماریزا در آوند و ایجاد نکروز آوندی در ساقه تنها محدود به جدایه *B. subtilis* DP1 بود و بقیه جدایه‌های آنتاگونیست مورد استفاده مانع از فعالیت قارچ در آوند شدند. سم بنومیل نیز بطور معنی‌داری نتوانست شدت بیماریزایی را در مقایسه با شاهد منفی کاهش دهد، اما استفاده آن بصورت سوسپانسیون در خاک موثرتر از کاربرد آن بصورت تیمار بذر بود (جدول ٤).

جدول ٤- اثرات باکتری های آنتاگونیست روی وزن تر و خشک اندام های هوایی و ریشه و درصد پوسیدگی ریشه در روش تیمار غده های سیب زمینی

Table 4. Antagonistic effects of bacteria on fresh & dry weight of aerial & root portions & percent of root rot of potato in a greenhouse experiment in which seed bacterization method was employed

جدایه باکتری Isolate bacteria	وزن تر اندام هوایی (گرم) Aerial fresh weight (gr)	وزن خشک اندام هوایی (گرم) Aerial dry weight (gr)	وزن تر ریشه (گرم) Root fresh weight (gr)	وزن خشک ریشه (گرم) Root dry weight (gr)	درصدپوسیدگی ریشه(تیمارخاک) Percent root rot (soil treatment)	د پوسیدگی ریشه (تیمار بذر) Percent root r (Seed treatme
DA1 s	257.6bcdef	26.4ab	42.37b	3.32bc	-	-
DA1 sd	290abcdef	24.42abcdefg	34.78bcde	2.81bcde	-	-
P+DA1 s	315abcde	25.13abcdefg	30.86bcdefg	2.47bcdefg	0a	–
P+DA1 sd	257.6bcdef	20.02cdefgh	23.38cdefghi	1.88bcdefghi	-	15.5a
DA1m s	279.5bcdef	25.64abc	42.38b	3.36b	-	-
DA1m sd	272.6bcdef	20.39bcdefgh	34.05bcde	2.72bcdef	-	-
P+DA1m s	293.3cdefg	24.77abcdefgh	33.66bcde	2.66bcde	2.2ab	-
P+DA1m sd	263.1bcdef	20.17cdefgh	23.83cdefghi	1.89defghi	-	22.2ab
DM1 s	382.5a	27.32a	33.99bcde	2.69bcdef	-	-
DM1 sd	290.8abcdef	21.56abcdefg	28.91bcdefgh	2.39bcdefg	-	-
P+DM1 s	251.3bcdef	19.77cdefgh	22.42defghi	1.86defghi	67.3b	-
P+DM1 sd	230.6defg	19.37fgh	13.63ghij	1.17ghij	-	51.1abcd
DM1m s	297.5abcdef	23.72abcdefg	35.19bcd	2.78bcdef	-	-
DM1m sd	283.0bcdef	21.17bcdefgh	26.31bcdefgh	2.15bcdefgh	-	-
P+DM1m s	247.1bcdefg	19.53defgh	21.55defghi	1.78efghi	15.5ab	-

Treatment

Archive of SID

www.SID.ir

Table 4. (continued) جدول ۴- (ادامه)

DM1m P+sd	222.4efg	19.33gh	18.21defghij	1.51efghij	-	51.1abcd
DA3 s	292.6abcdef	22.11abcdefg	17.05efghij	1.41fghij	-	-
DA3 sd	290.3abcdef	20.92bcdefgh	34.53bcde	2.72bcdef	-	-
P+DA3 s	288.9abcdef	21.08bcdefgh	28.60bcdefgh	2.25bcdefgh	8.9ab	-
P+DA3 sd	228.8defg	19.49efgh	21.42defghij	1.71efghi	-	31.1abc
CHAO s	297.6abcdef	23.83abcdefg	40.82bc	3.21bcd	-	-
CHAO sd	285.9bcdef	20.80bcdefgh	30.54bcdefg	2.452bcdefg	-	-
P+CHAO s	272.8bcdef	20.72bcdefgh	24.46defghi	1.97cdefgh	11.1ab	-
P+CHAO sd	259.2bcdef	20.02cdefgh	19.69defghij	1.59efghij	-	46.7abc
DP1 s	320.2abcd	25.41abcdef	31.59bcdef	2.48bcdefg	-	-
DP1 sd	303.8abcde	24.35abcdefg	34.55bcde	2.77bcdef	-	-
P+DP1 s	297abcdef	23.56abcdefg	22.69defghi	1.71efghi	40.0c	-
P+DP1 sd	250.3bcdefg	19.70cdefgh	13.79fghij	1.25ghij	-	53.3bcd
B1 s	340.4ab	25.55abcd	77.62a	6.55a	-	-
B1 sd	308.8abcde	24.79abcdefg	32.21bcde	2.55bcdef	-	-
P+B1 s	326.5abc	25.50abcde	31.15bcdefg	2.48bcdefg	6.7ab	-
P+B1 sd	298.8abcde	23.64abcdefg	22.30defghi	1.81efghi	-	22.2abc
CK	299.8abcde	24.41abcdefg	30.42bcdefg	2.41bcdefg	-	-
CK+B	270bcdef	20.68bcdefgh	34.74bcde	2.71bcdef	-	-
P	156.2gh	15.44hi	7.03ij	0.56ij	61.7d	66.7de
P+B s	203.3fg	19.72cdefgh	12.04hij	0.99hij	56.7c	-
P+B sd	107.7h	10.17i	3.65j	0.32j	-	66.7de

اعداد جدول میانگین سه تکرار است.

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند، در آزمون LSD در سطح ۱٪ با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند.

P: جدایه s-11 قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi*، CK: شاهد مثبت، CK+B: شاهد مثبت به همراه نوترینت براث، DA1 و DA3: *Pseudomonas fluorescens* biov.III، B2: *Bacillus brevis*، DP1 و DM1: *B. subtilis*، DA1m: موتان جدایه DA1 و DM1m: موتان جدایه DM1، B +P: تیمار سم بنومیل، s (soil treatment): تیمار خاک، sd (seed treatment): تیمار بذر

Each data represent the mean three replicate.
Means followed by different letters within a column are significantly different (P= 0.01) according to LSD test.

Archive of SID

www.SID.ir

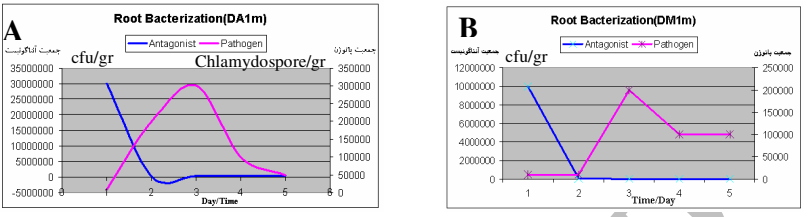
تغییرات جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست جهش یافته و بیمارگر در طول آزمایش‌های گلخانه‌ای

شمارش جمعیت باکتری های آنتاگونیست در گلخانه در فواصل هر ۱۵ روز یکبار صورت گرفت. در روش تیمار قلمه های سیب زمینی با آنتاگونیست ها به صورت غوطه ور کردن ریشه ها در سوسپانسیون باکتری، جمعیت اولیه باکتری در خاک $۱۰^{۷}$ سلول در هر گرم خاک محاسبه گردید. در نمونه برداری بعدی جمعیت باکتری ها به میزان ۱۰۰ برابر کاهش یافت و جمعیت آن به $۱۰^{۵}$ سلول در هر گرم خاک رسید. جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m جمعیت خود را تا پایان آزمایش در همین سطح نگه داشت و میزان جمعیت باکتری در تیمارهایی که قارچ عامل بیماری حضور نداشت، از فراوانی بیشتری نسبت به تیمارهای حاوی بیمارگر برخوردار بود. تغییرات جمعیت آنتاگونیست و بیمارگر نسبت به زمان با استفاده از رگرسیون غیر خطی بررسی شد. در روش تیمار قلمه های سیب زمینی با آنتاگونیست، معادله تغییرات جمعیت جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m بصورت $Y_A = 1.58*10^7 - 962292.0t+26885.5t^2-165.98t^3$ با ضریب تبیین ۶۳/۲۵٪ و بیمارگر بصورت $Y_P = 81052.7+10157.7t-187.665t^2+0.93t^3$ با ضریب تبیین ۶۷/۹۱٪ می باشد (شکل A–۵). جمعیت جدایه *B. subtilis* DM1m در نمونه برداری سوم به میزان ۱۰ برابر در تیمارهای بدون قارچ و به میزان ۱۰۰ برابر در تیمارهای حاوی بیمارگر کاهش یافت. در نهایت این جدایه جمعیت خود را در $۱۰^{٤}$ در غیاب بیمارگر و $۱۰^{۳}$ در حضور بیمارگر تا پایان آزمایش حفظ نمود. روند تغییرات جمعیت این جدایه از معادله $Y_A = 3.17*10^7-1.99*10^7t+38994.7t^2-242.1t^3$ با ضریب تبیین ۹۸/۳۳٪ و در بیمارگر از معادله $Y_P = -16000.1-1714.27t+207.94t^2-2.22t^3$ با ضریب تبیین ۵۶/۶۱٪ تبعیت می کند (شکل B–۵). در تیمار شاهد عامل بیماریزا توانست جمعیت خود را در سطوح بالا ($۱۰^{۵}$) حفظ کند. اما در حضور آنتاگونیست جمعیت بیمارگر به نحو چشمگیری کاهش یافت. جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1 جمعیت قارچ را به میزان ۱۰ برابر ($۱۰^{٤}$) در اواخر آزمایش نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد (شکل A–۵). جمعیت بیمارگر در حضور جدایه *B. subtilis* DM1m کاهش نیافت و در سطوح بالا ($۱۰^{۵}$) حفظ شد (شکل B–۵).

در آزمایش بیوکنترل با غده های سیب زمینی میزان جمعیت جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m در روش تیمار خاک $۱۰^{۷}$ و در روش تیمار غده $۱۰^{۱}$ سلول در هر گرم خاک و جمعیت جدایه *B. subtilis* DM1m در روش تیمار خاک $۱۰^{۷}$ و در روش تیمار غده $۱۰^{۱}$ سلول

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- روند تغییرات جمعیت آنتاگونیست و بیمارگر در طول آزمایش های گلخانه ای در روش تیمار قلمه های سیب زمینی (A: *P. flourescens* biov. III DA1m ،B: *B. subtilis* DM1m).

Fig. 5. Population dynamics of antagonist & pathogen during a greenhouse experiment in which stem cut-inoculation method was employed (A; *P. flourescens* biov. III DA1m , B; *B. subtilis* DM1m).

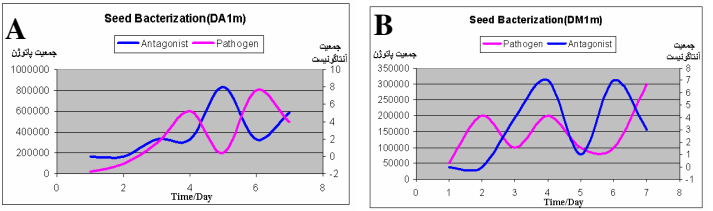
در هر گرم خاک محاسبه گردید. جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m در روش تیمار خاک جمعیت بیمارگر را به میزان ۱۰۰ برابر ($۱۰^۳$) در مقایسه با تیمار شاهد ($۱۰^۵$) کاهش داد (شکل A-۷)، در حالیکه در روش تیمار غده جمعیت بیمارگر در سطوح بالا ($۱۰^۵$) حفظ شد (شکل A-۶). کاهش جمعیت بیمارگر در سطوح پایین تری (به میزان ۱۰ برابر) نیز برای جدایه *B. subtilis* DM1m در روش تیمار خاک (شکل B-۷) نسبت به روش تیمار غده وجود داشت (شکل B-۶). در روش تیمار بذر، روند تغییرات جمعیت جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m از معادله $Y_A = -2.61+0.15t-0.0004t^2-0.000004t^3$ با ضریب تبیین ۴۱/۹۵٪ و در بیمارگر از معادله $Y_P = -203472.0+22978.6t-423.39t^2+2.27t^3$ با ضریب تبیین ۷۳/۳۷٪ (شکل A-۶) و روند تغییرات جمعیت جدایه *B. subtilis* DM1m از معادله $Y_A = -0.93+0.005t+0.002t^2-0.00001t^3$ با ضریب تبیین ۵۰/۱۴٪ و بیمارگر از معادله $Y_P = -86691.4+5770.61t+83.49t^2-0.73t^3$ با ضریب تبیین ۶۲/۱۲٪ تبعیت می کند (شکل B-۶).

در روش تیمار خاک، روند تغییرات جمعیت جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m از معادله $Y_A = 9.60*10^7-6.06*10^6t+119618.0t^2-745.67t^3$ با ضریب تبیین ۹۸/۱۵٪ و در بیمارگر از معادله $Y_P = -587999.0+53619.0t-1047.62t^2+5.93t^3$ با ضریب تبیین ۸۸/۷۸٪ (شکل A-۷) و روند تغییرات جمعیت جدایه *B. subtilis* DM1m از معادله $Y_A = 6.26*10^7-3.23*10^6t+59462.9t^2-308.99t^3$ با ضریب تبیین ۵۴/۲۹٪ و در بیمارگر از معادله

Archive of SID

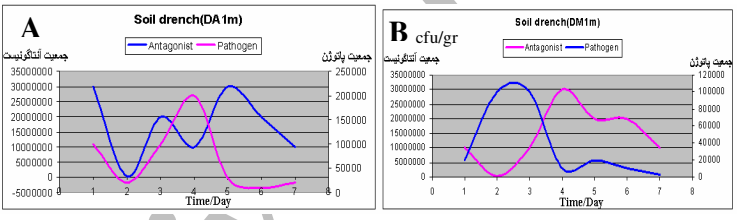
www.SID.ir

$Y_P = 14261.2+4339.13t-60.75t^2+0.19t^3$ با ضریب تبیین ۲۸/۹۱٪ تبعیت می کند (شکل B–۷).



شکل ٦- روند تغییرات جمعیت آنتاگونیست و بیمارگر در طول آزمایش های گلخانه ای در روش تیمار غده های سیب زمینی (آزمون Seed bacterization) (A: *P. flourescens* biov. III DA1m، B: *B. subtilis* DM1m).

Fig. 7. Population dynamics of antagonist & pathogen during a greenhouse experiment in which seed bacterization method was employed (Seed bacterization assay) (A; *P. flourescens* biov. III DA1m , B; *B. subtilis* DM1m).



شکل ۷- روند تغییرات جمعیت آنتاگونیست و بیمارگر در طول آزمایش های گلخانه ای در روش تیمار غده های سیب زمینی (آزمون Soil bacterization) (A: *P. flourescens* biov. III DA1m، B: *B. subtilis* DM1m).

Fig. 7. Population dynamics of antagonist & pathogen during a greenhouse experiment in which seed bacterization method was employed (Soil bacterization assay) (A; *P. flourescens* biov. III DA1m , B; *B. subtilis* DM1m).

بحث

توجه ویژه به اثرات مخرب زیست محیطی مواد شیمیایی در سالهای اخیر که نقش های وسیعی را در کنترل عوامل بیماریزا داشته اند، به استفاده از عوامل بیوکنترل معطوف کرده است. مضافا مشکل عمده سالهای گذشته در زمینه مطالعات بیولوژیکی در خصوص عدم توانایی محققین در دنبال کردن سرنوشت و تغییرات جمعیت آنتاگونیست مورد استفاده و

Archive of SID

www.SID.ir

بیمارگر در سالهای اخیر با ایجاد موتان های آنتی بیوتیکی و مولکولی برطرف گردیده است (Alizadeh *et al*. in press; Derakhshan *et al*. in press; Khorasani, 2006). این معضل در این تحقیق نیز با استفاده از موتان های آنتی بیوتیکی برطرف و تغییرات جمعیت هر دو عامل شرکت داده شده در بیوکنترل بیماری پژمردگی سیب زمینی یادداشت برداری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است (اشکال ۷– ۵). در این تحقیق از بوته‌های سیب‌زمینی با علائم بیماری، گونه ای از جنس فوزاریوم جدا گردید. با توجه به خصوصیات فیزیولوژیک و مورفولوژیک جدایه‌ها و به کمک کلیدهای موجود گونه آنها *F. oxysporum* تشخیص داده شد. در آزمایش بیماریزایی روی گیاهان مختلف، جدایه *F. oxysporum* 11-S تنها در سیب‌زمینی پژمردگی ایجاد کرد. استناد این نتایج و بر اساس نظر برخی محققین (Rich 1983)، قارچ عامل بیماری در منطقه دامغان *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* تشخیص داده شد. در این مطالعه جدایه‌های آنتاگونیستی متعلق به باسیلوس از فراوانی بیشتری نسبت به سودوموناس برخوردار بود. این احتمالاً به دلیل تولید اندوسپور در این باکتری ها است که باسیلوس را نسبت به شرایط نامساعد خصوصاً خشکی و گرمای مناطق مورد مطالعه این تحقیق مقاوم می‌سازد (Whipps, 2001).

بررسی اثر ترکیبات خارج سلولی در رشد میسلیومی قارچ نشان داد که جدایه‌ها از نظر توانایی تولید آنتی‌بیوتیک نسبت به یکدیگر متفاوت بوده و جدایه‌های DA1 و *P. flourescens* biov. III DA2، *B. subtilis* B2 و *P. flourescens* biov. III GP1 به ترتیب بیشترین اثر را دارا بودند. گزارش های متعددی از تولید متابولیت های ضد قارچی توسط باکتری ها تحت شرایط آزمایشگاهی وجود دارد که ممکن است در شرایط *in vivo* نیز چنین فعالیتی داشته باشند (Whipps 2001).

تاثیر متابولیت‌های فرار ضد قارچی در رشد میسلیومی قارچ مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که جدایه‌های آنتاگونیست علاوه بر تولید آنتی‌بیوتیک توانایی تولید ترکیبات فرار ضد قارچی را نیز در محیط NA دارا می‌باشند.

از مجموع ۲۷ جدایه آنتاگونیست تنها ۱۳ جدایه قادر به تولید سیدروفور در محیط CAS-agar بودند و جدایه‌های DA1 و *P. flourescens* biov. III DA2 بیشترین توانایی را در این

Archive of SID

www.SID.ir

خصوص نشان دادند. در این بررسی جدایه های سودوموناس از توانایی بالاتری در تولید سیدروفور نسبت به جدایه های باسیلوس برخوردار بودند. یکی از مکانیسم های عمده بازدارندگی ناشی از سودوموناس ها در مقابل پژمردگی های فوزاریومی در میزبان های مختلف تولید سیدروفور گزارش شده است (Bol& & Kuykendall 1998).

بررسی اثر باکتری های آنتاگونیست در کنترل پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی در گلخانه با تیمار آنتاگونیست‌ها با غده‌های سیب‌زمینی توسط دو روش تیمار بذر و تیمار خاک صورت گرفت. در این آزمایش تیمارهای مختلف باکتری تقریباً اثر یکسانی روی رشد اندام هوایی داشتند و تقریباً تمامی جدایه‌های آنتاگونیست باعث افزایش رشد اندام‌های هوایی به ویژه در تیمارهایی که آنتاگونیست‌ها به صورت محلول‌پاشی در خاک استفاده شده بودند، گردید. در این بین جدایه *B. subtilis* DM1 بیشترین تأثیر را در افزایش وزن اندام‌های هوایی در مقایسه با تیمار بدون بیمارگر داشت. بررسی تاثیر جدایه‌ها در ریشه حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها بود و جدایه *B. brevis* B1 در روش تیمار خاک بهترین تأثیر را در القاء رشد دارا بود. اثر باکتری‌های آنتاگونیست در کاهش شدت بیماریزایی (پوسیدگی ریشه و نکروز آوندی) در مقایسه با تیمار شاهد قابل توجه بود و این اثر در روشهای مختلف کاربرد آنتاگونیست (تیمار بذر و تیمار خاک) نیز متفاوت بود. جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1 هم در روش تیمار بذر و هم در روش تیمار خاک به ترتیب با ۱۰۰ و ۸٤/۸۷ درصد کاهش پوسیدگی ریشه، بیشترین تأثیر را در کاهش فعالیت بیماریزایی قارچ نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد. از طرفی سم بنومیل بطور معنی‌داری نتوانست شدت بیماری را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهد، اما استفاده آن بصورت سوسپانسیون در خاک موثرتر از کاربرد آن بصورت تیمار بذر بود. نتایج حاصل از این آزمایش موید این مطلب است که بطور کلی کاربرد آنتاگونیست‌ها بصورت محلول‌پاشی در خاک موثرتر از کاربرد آن بصورت تیمار بذر می‌باشد.

جمالی و همکاران در تحقیقی اثر جدایه های آنتاگونیستی *B. subtilis* و *P. fluorescens* را در کاهش پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی نمودند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد جدایه های آنتاگونیست در روش آغشته سازی خاک با سوسپانسون جدایه ها بسیار موثرتر از روش آغشته سازی بذر بودند (Jamali *et al*. 2006). بر

Archive of SID

www.SID.ir

اساس کار فرناندو و همکاران کاربرد تکراری آنتاگونیست‌ها بصورت اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری در فواصل زمانی معین به خاک، هم سبب افزایش القاء رشد و هم باعث کنترل بهتر بیماری به دلیل افزایش جمعیت آنتاگونیست در ریزوسفر می‌شود (Fern&o *et al*. 2006).

نتایج حاصل از شمارش جمعیت بیمارگر حاکی از وجود اختلاف چشم‌گیر تراکم جمعیت بین دو روش کاربرد آنتاگونیست می‌باشد. جدایه *P. fluorescens* biov. III DA1m در روش تیمار خاک به شدت جمعیت بیمارگر را به میزان ۱۰۰ برابر (10^3) در مقایسه با تیمار شاهد (10^5) کاهش داد، در حالیکه در روش تیمار غده جمعیت بیمارگر در سطوح بالا (10^5) حفظ شد. کاهش جمعیت بیمارگر در سطوح پایین‌تری (به میزان ۱۰ برابر) نیز برای جدایه *B. subtilis* DM1m در روش تیمار خاک نسبت به روش تیمار غده وجود داشت.

پژمردگی فوزاریومی طیف وسیعی از گیاهان به استثنای گیاهان متعلق به خانواده گرامینه را مورد حمله قرار می‌دهد. روش‌های کنترل فعلی هم ناکارآمد و هم کاربرد آن مشکل است. چند ترکیب شیمیایی موثر در کاربردهای آزمایشگاهی وجود دارد اما در مزرعه به علت عدم امکان استفاده مستقیم آنها در خاک فاقد کارآیی مطلوب می‌باشد. به نظر می رسد مناسبترین راه کنترل پژمردگی فوزاریومی استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. اما به علت عدم شناخت و دستیابی به ژن‌های مسئول مقاومت تاکنون دستیابی به چنین ارقامی میسر نگشته است. لذا استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست یکی از بهترین روش‌های کنترل این قبیل بیماری‌ها به حساب می‌آید (Bol& & Kuykendall 1998).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (1-4) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: امیر خراسانی آقازاده، عزیزاله علیزاده و ناصر صفایی گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID

www.SID.ir