بررسی توانایی بیوکنترلی و دینامیک جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست علیه *Sclerotinia sclerotiorum* در کلزا*

Biocontrol ability and population dynamics of bacterial antagonists against *Sclerotinia sclerotiorum* in canola

سید مجتبی منصوری پور، عزیزاله علیزاده، ناصر صفایی**
دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری شناسی گیاهی

دریافت ۱۳۸۷/۸/۲۱ پذیرش ۱۳۸۷/۱۲/۲۱

چکیده

پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا (*Brassica napus* L.) ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* ، یکی از بیماری‌های مهم کلزا می باشد، که در عمده مناطق کشت این محصول شایع است. روش‌های زیادی جهت کنترل این بیماری وجود دارد که ایمن ترین آنها کنترل بیولوژیک می‌باشد. توانایی آنتاگونیستی باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر و اندام‌های هوایی کلزا علیه *S. sclerotiorum* از طریق آزمایش‌های مختلف درون‌شیشه‌ای ارزیابی شد. به این منظور ابتدا ۱۲۰ جدایه باکتری خالص سازی شدند. سیزده جدایه با استفاده از روش کشت متقابل توانایی آنتاگونیستی بالایی را نشان دادند. از این میان ۱۱ جدایه گرم مثبت و متعلق به گونه *Bacillus subtilis* و دو جدایه گرم منفی و متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* بودند. تمامی ۱۳ جدایه از نظر تولید ترکیبات فرار، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید مواد مایع خارج سلولی و تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفتند که جدایه *P. fluorescens* Pf51 جهت تهیه موتان مقاوم به آنتی‌بیوتیک برای آزمایش گلخانه‌ای

* قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب گردید. به منظور تعیین دینامیک جمعیت آنتاگونیست در طول آزمایش‌های گلخانه‌ای موتان مقاوم به دو آنتی بیوتیک(ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید) ایجاد شد. آزمایش‌های گلخانه ای در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه عامل آنتاگونیست، بیمارگر و قارچکش بنومیل با ۱۲ تیمار در چهار تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که بین تیمارها از نظر تاثیر روی وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه و اندازه زخم تفاوت معنی‌داری ($P\leq0.01$) وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه Pf51 نسبت به شاهد مثبت۸۹ درصد در وزن تر اندام‌های هوایی و۹۲ درصد در وزن خشک اندام‌های هوایی افزایش رشد داشته است. همین جدایه نسبت به شاهد مثبت۸۷/۷۳ درصد در وزن تر ریشه و۸۰ درصد در وزن خشک ریشه افزایش رشد داشته است. همچنین جدایه Pf51 سبب ۸۱/۲ درصد جلوگیری از توسعه زخم شد. نتایج به دست آمده از شمارش جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست نشان داد که جمعیت باکتری‌ها در شروع آزمایش دچار افت شده و پس از استقرار، تعداد آنها افزایش می‌یافت به گونه‌ای که در حضور بیمارگر جمعیت آنتاگونیست ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی به دو برابر جمعیت اولیه رسیده و سبب کنترل بیماری گردید، اما حضور قارچکش بنومیل تاثیر منفی بر جمعیت باکتری داشته و سبب کاهش آن شد.

واژه‌های کلیدی: بیوکنترل، پوسیدگی اسکلروتینیایی، *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis*

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) مناسب‌ترین گیاه روغنی مناطق معتدل شمالی می‌باشد و قرن هاست که در این مناطق کشت می‌گردد. سطح زیر کشت کلزا در سال زراعی پایه ۷۳-۱۳۷۲، ۹۴/۵ هکتار در سال زراعی ۸۰-۱۳۷۹ برابر ۲۵۹۳۹ هکتار و در سال زراعی ۸۱-۱۳۸۰بالغ بر ۷۰ هزار هکتار بوده و میزان تولید آن در سال پایه برابر با ۵۱/۲ تن بود و در ضمن سطح زیر کشت کلزا در سال زراعی۸۵-۱۳۸۴ برابر با ۱۷۴۵۰۰ هکتار و درسال زراعی ۸۶-۱۳۸۵ برابر ۲۰۰ هزار هکتار بود. کشت تجاری کلزا از سال ۱۹۴۲ در قسمت شمالی قاره آمریکا یعنی کشور کانادا شروع گردیده و امکان استفاده از روغن کلزا برای مصرف خوراکی در سال ۱۹۴۸ مورد توجه قرار گرفت و منجر به استخراج روغن خوراکی از کلزا در سال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

۱۹۵۶ تا ۱۹۵۷ گردید (Shirani & Dehshiri 2000).

یکی از عوامل محدود کننده کشت این محصول پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد (Boland & Hall 1994, Aghajani & Safaie 2008, Bolton *et al*. 2006). در این بیماری برگهای آلوده معمولاً آبسوخته شده که این لکه ها به سرعت توسعه می‌یابند و برگها از دمبرگ می‌افتند، سپس لکه‌ها از طریق دمبرگ به ساقه توسعه یافته و بعد میسلیومهای سفید رنگ ظاهر شده و اسکلروتها تشکیل می‌شوند. اسکلروتها نقش اصلی را در چرخه زندگی به عنوان زادمایه بازی می‌کنند و بیش از هشت سال در خاک زنده باقی می‌مانند (Adams & Ayers 1979, Bolton *et al*. 2006).

این بیماری تا کنون از اکثر مناطق عمده کلزاکاری دنیا شامل کانادا و ایالات متحده آمریکا از روی کلزا و همچنین از آمریکای شمالی، اروپا و آسیا از روی بسیاری از محصولات گزارش گردیده است(Zhang 2004). این بیماری در ایران از استانهای مازندران و گلستان از روی کلزا و از مناطق آذربایجان غربی، کردستان و فارس از روی میزبانهای مختلف گزارش گردیده است (Aghajani & Safaie 2008, Afshari azad *et al*. 2006).

کنترل این بیماری از طریق تولید ارقام مقاوم به دلیل وجود مقاومت چند ژنی مشکل می‌باشد (Fernando *et al.* 2006) و در ضمن به دلیل مضرات سموم برای انسان و طبیعت یکی از بهترین راه های کنترل بیماری، مبارزه بیولوژیک می باشد. *بولند و هال* (Boland & Hall 1994) گزارش دادند که باکتری *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn قادر به کنترل پوسیدگی سفید لوبیا ناشی از *S. sclerotiorum* می‌باشد. *فرناندو* و همکاران (Fernando *et al.* 2006) باکتری‌های *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard and Sauvageau)Bergey *et al.* PA-23 ، *Bacillus amyloliquefaciens* BS6 بر علیه قارچ *S. sclerotiorum* در آزمایش های درون شیشه‌ای، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای استفاده نمودند که خاصیت بازدارندگی از خود نشان دادند. برطبق نظر آنها این باکتری‌ها با القای مقاومت-اکتسابی‌سیستمیک(ISR) سبب تولید آنزیم‌های کیتیناز (PR-3) و β-1,3 –Glucanase (PR-2) در گیاهان شده که آن‌ها نیز موجب تجزیه کیتین و گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ می‌شوند. مطالعات این گروه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین یک یا دو بار پاشیدن باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

وجود ندارد. در آزمایش‌های مزرعه‌ای با پاشیدن 10^5 اسپور در میلی‌لیتر، ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی باکتری‌های *Pseudomonas chlororaphis* PA-23 و *Bacillus amyloliquefaciens* BS6 مشخص گردید که دو باکتری فوق قادر به جلوگیری از بیماری مذکور در مزرعه می باشند.

این تحقیق به منظور بررسی توانایی باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از خاک مزارع و اندام‌های هوایی کلزا در کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا و پایش جمعیت آنتاگونیست در طول دوره اعمال بیوکنترل از طریق آنتاگونیست نشاندار انجام شد.

روش بررسی

جداسازی قارچ عامل بیماری

به منظور جداسازی قارچ عامل بیماری، مزارع کلزا در استانهای مازندران و گلستان در فاصله زمانی فروردین ماه تا خردادماه سال ۱۳۸۵ مورد بازدید قرار گرفت و نمونه‌های مبتلا به بیماری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی عامل بیماری ابتدا نمونه‌های آلوده را با آب روان شسته و سپس قسمت‌های آلوده به وسیله سدیم هیپوکلریت ۰/۵ درصد ضدعفونی و با آب مقطر سترون سه مرتبه شستشو شد. پس از خشک کردن نمونه ها به وسیله کاغذ صافی سترون، آن ها را روی محیط سیب‌زمینی- دکستروز-آگار(Potato Dextrose Agar,PDA) کشت داده و در دمای $25^{\circ}C$ درجه سانتیگراد جهت رشد نگهداری شدند.

آزمون بیماریزایی

به منظور اثبات بیماریزایی۲۳ جدایه *S. sclerotiorum* در کلزا، گلدان‌ها با مخلوط خاک: پرلیت: پیت ماس به نسبت ۱:۱:۱ پر گردیدند. سپس بذور کلزای رقم اُکاپی (Okapi) درون گلدانها کشت گردید و چهار هفته پس از کاشت، سومین برگ توسعه یافته از ناحیه میانی دمبرگ از گیاه جدا گردید و محل زخم به وسیله یک قرص ۵ میلی متری از حاشیه پرگنه سه روزه قارچ مایه‌زنی گردید و با تیپ آبی رنگ(Blue Tip)(نوک سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتر) بسته شد و به مدت ۲۰ روز در گلخانه با دمای 25 ± 5 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در تیمار شاهد از قرص آگار فاقد قارچ استفاده شد(Zhao *et al*. 2004) .

جداسازی باکتری‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

بدین منظور ۵۰ نمونه خاک از ناحیه ریزوسفر و قسمت‌های هوایی گیاهان سالم کلزا جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. از هر نمونه مقدار ۱۰ گرم خاک با آب مقطر سترون مخلوط شد و حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. از این سوسپانسیون رقت های سریالی(10^{-1}، 10^{-2} ، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}) تهیه شد. از هر رقت مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت آگار مغذی (Nutrient Agar, NA) ریخته شد و با میله شیشه‌ای سرکج به طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخش گردید.

شناسایی باکتری‌ها

جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از آزمون‌های افتراقی نظیر گرم در پتاس سه درصد، تشکیل اندوسپور، رشد هوازی و بی‌هوازی و تولید پیگمان‌های فلورسنت روی King 's B Medium(KB)، خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر اکسیداز، تولید لوان، ذوب ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، احیاء نیترات، آرژنین دهیدرولاز در سطح جنس و با کمک آزمون‌های مصرف منابع کربنی در سطح گونه شناسایی شدند(Schaad *et al*. 2001).

بررسی خواص آنتاگونیستی باکتری‌ها در آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل

ابتدا باکتری را در حاشیه تشتک پتری به فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه آن بر روی یک دایره با سوسپانسیون باکتری(دو لوپ باکتری در یک میلی لیتر آب مقطر سترون) تلقیح کرده و تشتک‌ها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس یک قرص ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه پرگنه فعال قارچ *S. sclerotiorum* در مرکز تشتک قرار داده شد. در تیمار شاهد به جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌ها به مدت چهار تا پنج روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Hagedron *et al*. 1989) .

بررسی تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

آزمایش مربوط به تولید ترکیبات فرار ضدقارچی مطابق روش فرناندو و همکاران (Fernando *et al*. 2005) انجام شد. ابتدا سوسپانسیون غلیظی از کشت‌های جوان باکتری از هر جدایه در آب مقطر سترون تهیه گردید و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر توسط میله شیشه‌ای سرکج روی محیط Tryptic Soy Agar (TSA) پخش گردید. سپس گرده ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت سه روزه قارچ را در مرکز تشتک پتری‌های حاوی PDA قرار داده شد. سپس در کنار شعله با

Archive of SID

www.SID.ir

رعایت شرایط سترون، تشتک پتری‌های حاوی قارچ به طور وارونه روی تشتک پتری‌های حاوی باکتری‌های آنتاگونیست قرار داده شد و دور تشتک پتری‌ها توسط پارافیلم کاملا مسدود گردید. تشتک‌های پتری پس از مایه‌زنی در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز نگهداری شدند. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطرسترون استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا"تصادفی، شامل ۱۴ تیمار(جدایه‌های باکتری و شاهد) در ۳ تکرار اجرا گردید و داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ٪ ۱ انجام گردید. درصد بازداری از رشد میسلیوم با استفاده از رابطه (۱) برای هر تیمار محاسبه گردید.

رابطه۱

$$\text{درصد کاهش رشد قارچ} = \frac{\text{قطر پرگنه قارچ در تیمار مورد نظر} - \text{قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد}}{\text{قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰$$

بررسی متابولیت‌های قابل نفوذ در آگار (تولید آنتی بیوتیک)

این آزمون بر اساس روش *کراس و لوپر* (Kraus & Lopper 1990) انجام شد. سوسپانسیون باکتری از کشت تازه هر یک از جدایه‌های باکتری تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به محیط کشت PDA اضافه و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج پخش گردید. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون باکتری استفاده گردید. تشتک‌های پتری به مدت سه روز در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از مدت فوق باکتری‌ها به کمک پنبه سترون از سطح پتری جمع‌آوری شدند. سپس پنبه آغشته به کلروفرم درون تشک پتری قرار داده شده و تشتک به صورت وارونه روی سطح میز گذاشته شد. تشتک‌های پتری‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند سپس به مدت یک ساعت در زیر هود با باز گذاشتن در تشتک‌ها تهویه انجام شد. آنگاه یک گرده پنج میلی‌متری از حاشیه کشت سه روزه قارچ با رعایت شرایط سترون در مرکز هر تشتک پتری قرار داده شد. تشتک ها در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و اندازه‌گیری رشد میسلیومی قارچ در مقایسه با شاهد پس از ۵ روز انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح

Archive of SID

www.SID.ir

کاملا"تصادفی، شامل ۱۴ تیمار(جدایه‌های باکتری و شاهد) در ۳ تکرار اجرا گردید و داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ٪۱ انجام گردید. درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از رابطه (۱) برای هر تیمار محاسبه گردید.

بررسی مواد مایع خارج سلولی

این آزمون بر اساس روش *سینگ و دورال* (Singh & Deverall 1984) صورت پذیرفت. ابتدا باکتری‌ها درون محیط مایع Nutrient Broth (NB) کشت داده شدند و به مدت ٤٨ ساعت برروی شیکر با rpm ۱۲۵قرار گرفتند. سپس ٤٥ میلی‌لیتر از NB حاوی باکتری درون فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در ٦۰۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. سپس در شرایط سترون و زیر هود با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری مایع رویی (Supernatant) سترون شده و درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتری سترون دیگری ریخته شد و سپس به نسبت ٪۱۵ به محیط PDA در حالت مذاب اضافه گردید و بعد از انجماد محیط یک گرده از حاشیه پرگنه سه روزه قارچ در مرکز هرتشتک پتری قرار گرفت. برای شاهد از محیط NB فاقد باکتری و سترون شده توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استفاده گردید. درصد بازداری رشد میسلیوم پس از ٤ روز اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا"تصادفی، شامل ۱۴ تیمار (جدایه‌های باکتری و شاهد) در ۳ تکرار اجرا گردید و داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ٪۱ انجام گردید.

بررسی تولید سیدروفور

این آزمایش با استفاده از محیط آگار آبی کرم آزورل اس (Chrome Azurol S, CAS)براساس روش اصلاح شده *الکساندر و زوبرر* (Alexander & Zuberer 1991) انجام شد. برای تهیه این محیط چهار محلول ذیل بطورمجزا تهیه و سترون و در نهایت با هم مخلوط شدند.

محلول معرفFe-CAS برای تهیه این محلول ۱۰ میلی لیتر$FeCl_3.6H_2O$ یک میلی مولار در محلول ۱۰ میلی مولار اسید کلریدریک با ۵۰ میلی لیتر محلول حاوی۵/ ٦۰ میلی گرم Chrome CAS (Azurol S) (۲۱میلی گرم در میلی لیتر) مخلوط شد. مخلوط ارغوانی حاصله به آرامی و

Archive of SID

www.SID.ir

همراه با تکان دادن پیوسته به ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۷۲/۸ میلی گرم HDTMA(Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) (۱/۸۲ میلی گرم در یک میلی لیتر) اضافه شد . در نهایت محلول آبی تیره حاصله اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد شد.

محلول بافر : برای تهیه محلول بافر۳۰/۲۴ گرم PIPES(Piperazine-1,4- bis 2-ethanesulfonic acid) در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمکی (محلول نمکی حامل: ۰/۵ گرم NaCl، ۱گرم NH_4Cl و ۰/۳ گرم KH_2PO_4) حل گردید. اسیدیته محلول با استفاده از محلول ۵۰ درصد KOHدر ۶/۸ تنظیم و سپس حجم نهایی آن به ۸۰۰ میلی لیتر رسانده شد. محلول حاصل پس از افزودن ۱۵ گرم آگار اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سرد شد.

محلول غذایی: حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۱۱ میلی گرم$CaCl_2$، ۰/۰۴ گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۱/۲ میلی گرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۱/۱۷ میلی گرم $MnSO_4.H_2O$، ۴۹۳ میلی گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱/۴ میلی گرم H_3BO_3 و ۱ میلی گرم$Na_2MoO_4.2H_2O$ در ۷۰ میلی لیتر آب مقطر بود .این محلول پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس سرد گردید.

محلول کازوآمینواسید: برای تهیه این محلول ۳ گرم کازوآمینواسید در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. برای سترون نمودن این محلول از کاغذ صافی غشائی با قطر روزنه۰/۲۲ میکرومتری استفاده شد. پس از تهیه چهار محلول فوق، محلول غذایی را به محلول بافر و محلول کازوآمینواسید اضافه گردید. سپس همراه با به هم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS به آنها اضافه و محیط حاصله در تشتک های پتری پخش گردید . پس از انجماد محیط، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با روش قطره گذاری در مرکز هر تشتک قرار داده شد و تشتک ها به مدت ۹۶ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی مشخص و با اندازه گیری قطر هاله رنگی اطراف پرگنه هر جدایه، توانایی آن در تولید سیدروفور ارزیابی شد. آزمایش فوق دو مرتبه انجام شد.

تهیه آنتاگونیست نشاندار

به منظور تعیین جمعیت باکتری آنتاگونیست و تغییرات آن در طول آزمایش، آنتاگونیست مورد نظر از طریق مقاومت به آنتی‌بیوتیک نشان‌دار شد.. موتان‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، که به طور خود به خودی به وجود می‌آیند، از طریق مخطط کردن روی محیط NA حاوی مقادیر

Archive of SID

www.SID.ir

متفاوت آنتی‌بیوتیک به شرح زیر به دست می‌آمد. ابتدا مقاومت باکتری به ریفامپیسین (rifampicin) بررسی گردید. برای این کار غلظت‌های افزایشی این آنتی‌بیوتیک (۱ ،۵ ،۱۰ ، ۲۰،۳۵ ،۵۰ ،۱۰۰ و ۱۵۰ پی. پی. ام) استفاده شد. پرگنه های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک انتخاب و سپس برای القاء مقاومت به آنتی‌بیوتیک دوم استفاده شدند. روش کار و غلظت‌های مورد استفاده برای آنتی‌بیوتیک دوم یعنی اسید نالیدیکسیک (nalidixic acid) دقیقا مشابه به ریفامپیسین بود. سپس موتان مورد نظر دوباره روی محیط NA حاوی ۱۵۰ میلی گرم در لیتر از هر دو آنتی‌بیوتیک آزمایش شد. به منظور اطمینان از ثبات موتان موردنظر، در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط NB فاقد آنتی‌بیوتیک کشت گردید. ارلن روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. سپس ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به ارلن دوم که آن نیز محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط NB فاقد آنتی‌بیوتیک بود منتقل و مجدداً ارلن دوم به مدت ۲٤ ساعت روی شیکر نگهداری شد. این عمل تا ۱٤ بار برای اطمینان از ثبات موتان تکرار شد. پس از پایان این مرحله باکتری موتان یافته مجدداً به محیط NA محتوی ۱۵۰ پی. پی. ام از هر دو آنتی‌بیوتیک منتقل و توانایی رشد آن مورد تایید قرار گرفت. موتان مقاوم به آنتی‌بیوتیک و جدایه مادری آن از نظر سرعت رشد، مرفولوژی و خصوصیات آنتاگونیستی مقایسه و سپس یک پرگنه فاقد اختلاف معنی دار برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شد. این کار دو بار تکرار شد و موتان‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به محیط Nutrient Broth (NB) حامل ٪ ٤۰ گلیسرول منتقل و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آزمون بیوکنترل در گلخانه

آزمون بیوکنترل در گلخانه با استفاده از استرین *Pseudomonas* (Trevisan)Migula Pf51 *fluorescens* انجام گردید. در این مرحله ابتدا بذر گیاه کلزا رقم اکاپی (Okapi) درون گلدان‌های حاوی خاک، پرلیت وپیت ماس به نسبت ۱:۱:۱ کاشته شد. پس از رسیدن گیاهان کلزا به مرحله شش برگی، آزمایش اجرا گردید. جهت مایه‌زنی باکتری، ۲٤ ساعت قبل از مایه‌زنی قارچ، سوسپانسیون باکتری روی تیمارهای مورد نظر پاشیده شد و ۲٤ ساعت پس از آن به وسیله گلبرگ‌های کلونه شده کلزا به وسیله میسلیوم قارچ در محل اتصال دمبرگ به ساقه مایه‌زنی گردید و روی گلدان‌ها به وسیله پلاستیک پوشانده شد و به وسیله‌ی اسپری آب رطوبت اشباع تامین گردید. مقدار قارچکش مورد استفاده با انجام یک آزمایش تعیین گردید

Archive of SID

www.SID.ir

(اطلاعات منتشر نشده است). تیمارهای این آزمایش عبارت از:nc :شاهد غیرآلوده مایه زنی شده بوسیله آب (شاهد منفی)، 51m+P: بیمارگر همراه با باکتری جهش‌یافته Pf51 *P. fluorescens*، 51w+P: بیمارگر همراه با استرین مادری باکتری Pf51 *P. fluorescens*، 51m+P+F: بیمارگر همراه با باکتری جهش‌یافته Pf51 *P. fluorescens* همراه با قارچکش بنومیل (۱۵۰ppm)، 51m+F: قارچکش بنومیل (۱۵۰ppm) همراه با باکتری جهش‌یافته Pf51 *P. fluorescens*، 51w+P+F: بیمارگر همراه با استرین مادری باکتری Pf51 *P. fluorescens* همراه با قارچکش بنومیل (۱۵۰ppm)، F: قارچکش بنومیل (۱۵۰ppm)، 51w+F: استرین مادری باکتری Pf51 *P. fluorescens* همراه با قارچکش بنومیل (۱۵۰ppm)، 51m: باکتری جهش‌یافته Pf51 *P. fluorescens*، 51w: استرین مادری باکتری Pf51 *P. fluorescens*، PC: بیمارگر (شاهد مثبت) و F+P: قارچکش بنومیل (۱۵۰ppm) همراه با بیمارگر بودند. این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه عامل پاتوژن، آنتاگونیست و قارچکش با ۱۲ تیمار در ٤ تکرار و برای دو مرتبه انجام شد. نتایج حاصله پس از ۲۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس شاخص‌های وزن تر وخشک اندام هوایی، وزن تر وخشک ریشه و مساحت زخم ایجاد شده به وسیله بیمارگر انجام گردیدند. تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و گروه‌بندی تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح ٪۱ انجام گرفت.

بررسی دینامیک جمعیت باکتری آنتاگونیست

به منظور بررسی روند تغییرات جمعیت باکتری آنتاگونیست مقاوم به آنتی بیوتیک در طول آزمایش از جدایه*P. fluorescens* Pf51 در آزمایش های گلخانه ای استفاده شد. تعیین جمعیت باکتری هر پنج روز یکبار در طول دوره آزمایش صورت گرفت. برای این منظور از گلدان های جداگانه ای که همزمان با تیمار اصلی و تحت همان شرایط مایه‌زنی شده بودند استفاده شد، که برای هر نمونه برداری از گیاهان این گلدان ها استفاده شد بدین ترتیب که گیاهان از ناحیه طوقه جدا گردیده و درون ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطرسترون قرار گرفتند و از آن-ها سری رقت تهیه گردید و ۱۰۰میکرولیتر سوسپانسیون باکتری از رقت$^{-6}$ ۱۰روی محیط کشت NA همراه با آنتی‌بیوتیک کشت گردید. تشتک‌های پتری به مدت۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری، و سپس پرگنه های مربوطه شمارش شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه

جداسازی قارچ عامل بیماری

علائم ناشی از آلودگی *S. sclerotiorum* در سطح مزرعه شامل پژمردگی اندام هوایی و ایجاد زخم از محل جدا شدن دمبرگ از ساقه و توسعه یافتن آن به سر تا سر ساقه می باشد که این فرآیند در نهایت منجر به شکستن ساقه و افتادن گیاه می شود. از مجموع نمونه‌های منتقل شده به آزمایشگاه ۴۸ جدایه *S. sclerotiorum* از اندام‌های هوایی گیاهان آلوده جداسازی و خالص گردید.

آزمون بیماریزایی

اولین علائم پژمردگی و ایجاد زخم بر روی ساقه ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی از محل ایجاد زخم شروع شد و تقریبا" پس از ۱۵ تا۲۰ روز ساقه به طور کامل آلوده شده و از بین رفت. علائم در ابتدا به صورت پژمردگی و سپس رشد سریع میسلیوم‌ها درون ساقه را خالی کرده و در مراحل پیشرفته درون ساقه اسکلروت تشکیل گردید. از میان جدایه های مورد آزمایش جدایه A-18 با قدرت بیماریزایی بالا سبب شدیدترین خسارت بر روی گیاهان کلزا می شد و از اندامهای آلوده قارچ مایه‌زنی شده بازیافت و جهت آزمون‌های بعدی انتخاب گردید.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

از مجموع ۱۲۰ باکتری جدا شده ،۴۲ جدایه (۳۵ درصد) از ریزوسفر و۷۸ جدایه(۶۵ درصد) آن‌ها از فیلوسفر گیاه کلزا بازیافت و خالص سازی شده بود.

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از آزمون‌های افتراقی نظیر گرم در پتاس سه درصد، تشکیل اندوسپور، رشد هوازی و بی‌هوازی و تولید پیگمان‌های فلورسنت روی KB به دو گروه باکتری‌های گرم مثبت از جنس *Bacillus* (۱۱جدایه ,Bs48, Bs32, Bs28, Bs52, Bs77 Bs92, Bs34, Bs 22, Bs68, Bs56, Bs45) و باکتری‌های گرم منفی از جنس *Pseudomonas* (۲جدایهPf41,Pf51) تفکیک گردیدند(Schaad *et al.*,2001). خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های *Pseudomonas* نظیر اکسیداز، تولید لوان، ذوب ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، احیاء نیترات، آرژنین دهیدرولاز آنها را در گونه *P. fluorescens* و جدایه‌های *Bacillus*

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس آزمون‌های تشکیل و موقعیت قرارگیری اندوسپور، مصرف سیترات، تحمل به نمک طعام و آزمون وژ پرسکوئر به عنوان گونه *B. subtilis* تشخیص داده شد(Schaad *et al*. 2001)، برای جدایه‌های Pf41 و Pf51 واکنش‌های گرم، هیدرولیز نشاسته و استفاده از سوکروز به عنوان منبع کربن منفی و واکنش‌های تولید رنگ فلورسنت، اکسیداز، ذوب ژلاتین، احیاء نیترات، آرژنین دی هیدرولاز و استفاده از D–گالاکتوز، سوربیتول، گلوکز و ترهالوز مثبت بود و جدایه Pf51 قادر به تولید لوان از سوکروز بود در حالیکه جدایه Pf41 قادر به تولید لوان از سوکروزنبود و جدایه Pf51 قادر به استفاده از D–زایلوز به عنوان منبع کربن نبود در صورتی که جدایه Pf41 قادر به استفاده از D–زایلوز به عنوان منبع کربن بود.

برای جدایه‌های Bs48, Bs32, Bs28, Bs52, Bs77, Bs92, Bs34, Bs 22, Bs68, Bs56, Bs45 واکنش‌های گرم، اندوسپور(مرکزی)، کاتالاز، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، مصرف سیترات، احیاء نیترات، تولید اسید از D–گلوکز، آرابینوز و تحمل به نمک طعام در سطوح ٪۲، ٪۵، ٪۷ و٪ ۱۰، رشد در PH های ۶/۸ و ۵/۷ و رشد در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتیگراد و آزمون وژ پروسکوئر مثبت و واکنش‌های رشد بی هوازی، رنگ فلورسنت، اکسیداز و رشد در دمای ۵ درجه سانتیگراد منفی بود. تولید اسید از D–زایلوز برای جدایه‌های متفاوت متغیر بود.

انتخاب جدایه های آنتاگونیست

در این بررسی ۱۲۰ جدایه باکتری از ریزوسفر و اندام هوایی گیاهان کلزا جدا گردید و بر اساس آزمون کشت متقابل (Dual Culture) خاصیت بازدارندگی آنها در مقابل قارچ *S. sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه های باکتریایی بر اساس فاصله ای که بین پرگنه قارچ و جدایه باکتری ایجاد شده بود، اندازه گیری شد و جدایه‌های توانا برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. از مجموع باکتری های جدا شده ۱۳ جدایه فعالیت آنتاگونیستی مطلوبی از خود نشان دادند که از این مجموعه، جدایه‌های Bs77, Bs48, Bs32, Bs92, Bs34, Bs 22, Bs68, Bs56, Bs45, Pf51 از اندام هوایی کلزا و جدایه‌های Bs28, Bs52,Pf41 از ریزوسفر کلزا جداسازی شده بودند.

بررسی اثر متابولیت های فرار

در این آزمون با استفاده از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده های حاصل از آن

Archive of SID

www.SID.ir

نشان داده شد که بین تیمار ها در سطح٪ ۱ اختلاف معنی دار وجود دارد(جدول۱) و جدایه *P. fluorescens* Pf51 با٪ ۸۳،۳۳ درصد کاهش رشد بیشترین و جدایه *B. subtilis* Bs52 با ٪۳۴،۱۲ درصد کاهش رشد کمترین تاثیر را در رشد قارچ داشتند.

آزمون تولید آنتی بیوتیک

جدایه های آنتاگونیست از نظر تاثیر تولید آنتی‌بیوتیک در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در سطح ٪۱ تفاوت معنی داری نشان دادند. بر اساس مقایسه میانگین داده ها، جدایه های *B. subtilis* Bs68 و *B. subtilis* Bs56 با ٪ ۱۰۰ کاهش رشد بیشترین و جدایه *B. subtilis* Bs45 با ٪ ۳۵،۹۲کاهش رشد کمترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیومی قارچ داشتند (جدول۱).

بررسی ترشحات مایع خارج سلولی

جدایه های آنتاگونیست از نظر تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ در سطح ٪۱ تفاوت معنی داری نشان دادند. بر اساس مقایسه میانگین داده ها جدایه *B. subtilis* Bs45 با٪ ۱۰۰ کاهش رشد بیشترین و جدایه *B. subtilis* Bs77 با ٪۱۵،۳۱ کمترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیومی قارچ داشتند(جدول۱).

بررسی تولید سیدروفور

از مجموع۱۳ جدایه باکتریایی آنتاگونیست که در مطالعات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت تمامی آن‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند. قدرت تولید سیدروفور در بین جدایه ها بر اساس هاله رنگی تشکیل شده در اطراف پرگنه باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بین جدایه ها از نظر قدرت تولید سیدروفور اختلاف معنی داری در سطح ٪۱ وجود دارد. مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد که جدایه *P. fluorescens* Pf51 با تولید هاله ای به قطر۹ میلی متر بیشترین و جدایه *B. subtilis* Bs22 با تولید هاله ای به قطر۱ میلی متر کمترین توانایی را در تولید سیدروفور در بین جدایه های تولید کننده سیدروفور داشتند (جدول۱).

۴-۸ تهیه موتان باکتریایی

به منظور بررسی روند تغییرات جمعیت آنتاگونیست در گلخانه، اقدام به تهیه موتان از باکتری انتخاب شده برای مطالعات گلخانه ای گردید. از این رو جدایه *P. fluorescens* Pf51

Archive of SID

www.SID.ir

برای این منظور مورد استفاده قرار گرفت که قادر به رشد در غلظت ۱۵۰ پی. پی. ام هر دو آنتی بیوتیک بود.

جدول ۱ـ مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی جدایه های مختلف(*Pseudomonas fluorescens*(Pf و(Bs) *Bacillus subtilis* علیه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن

Table 1. Comparison of means of data as a result of different antagonistic mechanisms of different isolates of *Pseudomonas fluorescens* (Pf) and *Bacillus subtilis* (Bs) against *Sclerotinia sclerotiorum in vitro* using Duncan' multiple range test

جدایه‌های آنتاگونیست	مواد فرار (درصد بازدارندگی)	آنتی‌بیوتیک (درصد بازدارندگی)	مواد مایع خارج سلولی (درصد بازدارندگی)	سیدروفور (میلی‌متر)
Antagonist's isolates	%inhibiton Volatiles	Antibiotics	Culture filtrates	Siderophores
Pf51	83.33 a	88.51 b	87.38 b	9 a
Bs92	78.97 a	47.03 e	63.96 d	6 ef
Pf41	60.31 b	37.03 f	79.72 c	3 e
Bs68	55.95 bc	100 a	90.53 b	4f
Bs32	52.37 bc	70.26 c	83.78 b	4 bcd
Bs45	51.58 bc	35.92 f	100 a	4e
Bs22	51.58 bc	42.21 ef	86.93 b	1 e
Bs77	45.63 bcd	60 d	15.31 g	6 f
Bs56	44.44 bcd	100 a	67.11 c	7abc
Bs34	42.85 cd	76.29 bc	85.58 b	2 a
Bs48	42.453 cd	42.22 ef	61.25 d	3 ab
Bs28	41.66 cd	83.7 bc	22.96 f	1.2 e
Bs52	34.123 d	40.73 ef	53.01 e	8 e
CHECK	0 e	0 h	0 h	0 g

* تیمارهایی که دارای حروف مشترک در یک ستون می‌باشند، در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

* Values with the same letter in each column are not significantly different at 1% level according to Duncan's multiple range test.

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند.

Each value is mean of three replications.

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش‌های گلخانه ای

اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی وزن تر وخشک اندام هوایی و ریشه و شاخص اندازه زخم *S. sclerotiorum* در تیمارهای مختلف به عنوان شاخص‌هایی برای کارایی کنترل بیولوژیکی بیماری به شرح زیر بررسی شد.

شاخص وزن تر و خشک اندام هوایی

نتایج حاصل از بررسی این شاخص نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی تفاوت معنی‌داری در سطح ٪۱ وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه *P. fluorescens* Pf51 نسبت به شاهد مثبت موجب افزایش ۸۹ درصددر وزن تر و۹۲ درصد در وزن خشک اندام‌های هوایی میزبان داشته است (جدول۲). مضافا نتایج نشان داد که اثر سه فاکتور آنتاگونیست، پاتوژن و قارچکش بنومیل بر روی وزن تر وخشک اندام هوایی اختلاف معنی‌داری دارند و اثرات متقابل آنها نیز دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند.

شاخص وزن تر و خشک ریشه

نتایج حاصل از بررسی این شاخص نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست روی وزن تر و خشک ریشه تفاوت معنی‌داری در سطح ٪۱ وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه *P. fluorescens* Pf51 نسبت به شاهد مثبت موجب افزایش۸۷/۷۳ درصددر وزن تر و۸۰ درصد در وزن خشک ریشه در میزبان شده است (جدول۲). نتایج نشان داد که اثر دو فاکتور آنتاگونیست و پاتوژن بر روی وزن تر وخشک ریشه اختلاف معنی‌داری داشته ولی قارچکش بنومیل بر روی وزن تر وخشک ریشه اثر معنی‌داری نداشت. اثرمتقابل آنتاگونیست، پاتوژن و قارچکش بر یکدیگر نیز اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

شاخص اندازه زخم

نتایج حاصل از بررسی این شاخص نشان داد که بین تیمارها از نظر اثرات آنتاگونیست روی اندازه زخم تفاوت معنی‌داری در سطح ٪۱ وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه *P. fluorescens*Pf51 نسبت به شاهد مثبت موجب ۸۱/۲ درصد کاهش در اندازه زخم در میزبان شده است(جدول۲). نتایج نشان داد که اثرسه عامل آنتاگونیست و پاتوژن و قارچکش بر روی اندازه زخم اختلاف معنی‌داری دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین داده‌های حاصل از تاثیر باکتری آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* علیه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از پنج شاخص متفاوت درآزمون گلخانه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq 0.01$)

Table 2. Comparison of means of five different indices as influenced by antagonistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* Pf51 against *Sclerotinia sclerotiorum* in greenhouse experiments using Duncan's multiple range test ($P\leq 0.01$)

تیمار	FWC (gr) وزن تر اندام هوایی به گرم	DWC (gr) وزن خشک اندام هوایی به گرم	FWR (gr) وزن تر ریشه به گرم	DWR (gr) وزن خشک ریشه به گرم	LS (cm^2) اندازه زخم به سانتی متر مربع	FWC + FWR (gr) وزن تر اندام هوایی و ریشه
nc	61.57 a*	30.4 a	45.4 ab	8.17 a	0 c	106.97 a
f	36 c	19.67 c	40.45 ab	7.25 ab	0 c	76.45 cd
pc	4.7 d	2.18 d	4.4 c	1.36 c	25.5 a	9.1 e
f+p	36.82 c	18.15 c	29 b	4.72 b	8.25 b	65.82 d
51w	51.7 ab	26.11 ab	46.57 ab	8.45 a	0 c	98.27 b
51w+f	38.35 c	19.85 c	33.7 ab	7.02 ab	0 c	72.05 cd
51w+p	44.65 bc	28.22 a	36.92 ab	6.97 ab	6.25 bc	81.57 c
51w+p+f	36.27 c	21 bc	38.65 ab	6.02 ab	5.75 bc	74.92 cd
51m	52.35 ab	26.37 ab	41.76 ab	7.8 a	0 c	94.11 bc
51m+f	44.05 bc	22.32 bc	49.9 a	6.05 ab	0 c	93.95 bc
51m+p	40.29 c	26.08 ab	34.87 ab	6.57 ab	7.5 b	75.16 cd
51m+p+f	35.2 c	20.92 bc	45.34 ab	6.5 ab	7 c	80.54 c

FWC: Fresh weight of canopy; DWC: Dry weight of canopy; FWR: Fresh weight of roots; DWR: Dry weight of roots; LS: Lesion size; nc: negative control, 51m+P: mutant antagonist + pathogen, 51w+P: antagonist + pathogen, 51m+P+F mutant antagonist+ pathogen + benomyl, 51m+F: mutant antagonist+ benomyl, 51w+P+F: antagonist+ Pathogen+ benomyl, F:benomyl, 51w+F: antagonist + benomyl, 51m:mutant antagonist, 51w:antagonist, pc: positive control, F+P: benomyl + pathogen; gr: gram, cm^2: square centimeter.

تیمارهایی که دارای حروف مشترک در یک ستون می‌باشند، در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.*

*Values with the same letter in each column are not significantly different at 1% level according to Duncan's multiple range test.

اعداد جدول میانگین چهار تکرار هستند.

Each value is mean of four replications.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی دینامیک جمعیت آنتاگونیست

شمارش موثر و عملی جمعیت آنتاگونیست در تیمارهای مربوط به جدایه های نشاندار شده(51m) و مادری (51w) *P. fluorescens* Pf51 در طول آزمایش های گلخانه ای پنج روز پس از اولین مایه زنی به‌وسیله باکتری و در فواصل زمانی هر پنج روز یکبار صورت گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که جمعیت باکتری‌ها ابتدا دچار افت شده و به $۳،۲ \times ۱۰^{۷}$cfu/ml و ۲×۱۰^{۷} cfu/ml به ترتیب در آنتاگونیست نشاندار و تیپ وحشی رسید ولی پس از استقرار، به تدریج جمعیت افزایش یافته وبه $۸،۵ \times ۱۰^{۷}$ cfu/ml در آنتاگونیست نشاندار و $۱۰^{۷} \times$ cfu/ml ۹،۵ در آنتاگونیست تیپ‌وحشی رسید، این افزایش و پایداری جمعیت در حضور بیمارگر نیز حفظ شده و سبب کنترل بیماری گردید. از طرف دیگر حضور قارچکش تاثیر منفی در جمعیت باکتری داشته و سبب کاهش جمعیت آنها شد(شکل‌های ۲و۱).

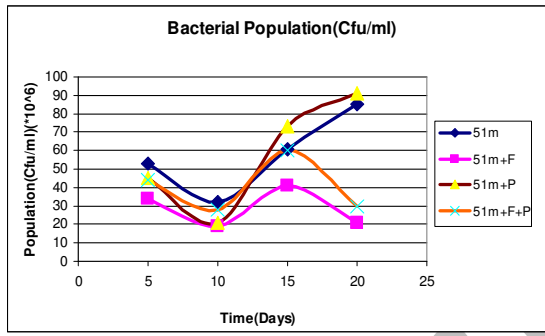
بحث

در این تحقیق از مجموع ۱۲۰ جدایه باکتریایی جدا شده از ریزوسفر و اندام های هوایی کلزا ۱۳ جدایه دارای توانایی آنتاگونیستی بهتری نسبت به سایرین بودند. تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه های آنتاگونیست روی رشد میسلیومی قارچ *S . sclerotiorum* مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که کلیه این جدایه ها ترکیبات فراری را تولید می نمایند که تاثیر مطلوبی در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *S. sclerotiorum* دارد.

در مورد شناسایی نوع ترکیبات فرار جدایه های *Bacillus* spp. تحقیقات زیادی صورت گرفته است و تا کنون تولید ترکیبات فراری مثل الکل ها (ایزوآمیل الکل)، آلدهیدها، کتون ها و استرها توسط جدایه های مختلف *Bacillus* spp. در بازدارندگی مطلوب آنها در جلوگیری از رشد رویشی قارچ ها و سیانوباکتری ها به اثبات رسیده است (Fiddamen & Rossall 1994). از جمله ترکیبات فراری که توسط جدایه های *P. fluorescens* تولید می شود می تواند سیانید هیدروژن(HCN) باشد که در بررسی های انجام شده توسط کاستریک و کاستریک (Castric & Castric 1983) تولید آن توسط جدایه های *P. fluorescens* به اثبات رسید.

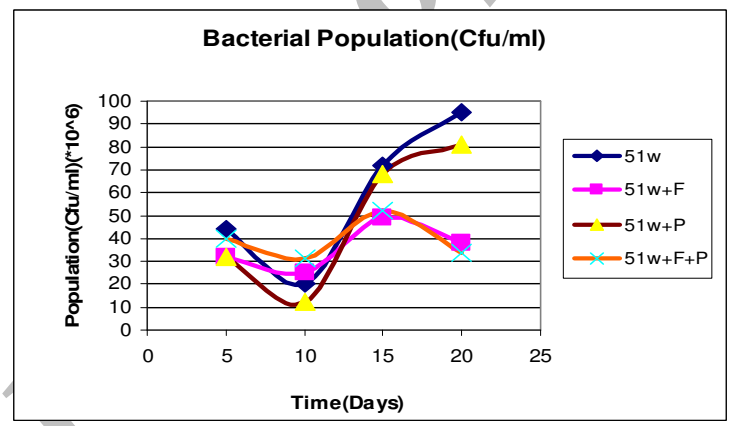
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- منحنی‌های روند تغییرات جمعیت جدایه نشاندار 51m *Pseudomonas fluorescens* در تیمارهای مختلف آزمایش گلخانه ای ، 51m: آنتاگونیست موتان تنها، 51m+F:: آنتاگونیست موتان+ بنومیل، 51m+P: آنتاگونیست موتان+ بیمارگر، 51m+F+P : : آنتاگونیست موتان+ بنومیل+بیمارگر.

Fig. 1. Population dynamics curves of *Pseudomonas fluorescens* mutant in different treatments in greenhouse experiments, 51m: mutant antagonist, 51m+F: mutant antagonist +Benomyl, 51m+P:mutant antagonist+pathogen ,51m+F+P: : mutant antagonist +Benomyl+pathogen.



شکل۲- منحنی‌های روند تغییرات جمعیت جدایه تیپ وحشی51w *Pseudomonas fluorescens* در تیمارهای مختلف آزمایش گلخانه ای، 51w: آنتاگونیست تنها، 51w+F: : آنتاگونیست + بنومیل، 51w+P: آنتاگونیست + بیمارگر،51w+F+P: : آنتاگونیست + بنومیل+بیمارگر.

Fig. 2. Population dynamics curves of *Pseudomonas fluorescens* wild-type in different treatments in greenhouse experiments, 51w: antagonist, 51w+F: antagonist +Benomyl, 51w+P: antagonist+pathogen,51w+F+P: antagonist+Benomyl+ pathogen.

www.SID.ir

در بررسی تاثیر ترشحات مایع برون سلولی جدایه های *Pseudomonas* و *Bacillus* در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *S. sclerotiorum* در آزمایشگاه، مشخص گردیدکه تمامی جدایه ها ترشحاتی را تولید می کنند که در جلوگیری از رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* موثرند. تحقیقات مفصلی در مورد نوع ترکیبات موجود در ترشحات مایع برون سلولی جدایه های *Pseudomonas* و *Bacillus* صورت گرفته است و مشخص گردیده که یکی از ترکیبات مهم آنها آنتی بیوتیک ها است که انواعی از آنها از قبیل mycobacillin, bacillumycin, fungistatin, bacillin, fungimycin توسط شریبر وهمکاران (Schreiber *et al.* 1988) از جدایه های *Bacillus* spp. گزارش شده است. از سوی دیگر آنتی بیوتیک های فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید، ۲- هیدروکسی فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید، ۲-هیدروکسی فنازین، ۴و۲- دی استیل فلوروگلوسینول، پیولوتئورین و پیرولنیترین نیز توسط محققینی چون *ساوچوک* و همکاران (Savchuk *et al.* 2001) از جدایه های *Pseudomonas* گزارش گردیدند.

نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که جدایه *P. fluorescens* بهترین تاثیر را در جلوگیری از رشد قارچ *S. sclerotiorum* و توسعه بیماری در گلخانه داشته که با توجه به نتایج آزمایش‌های درون شیشه‌ای به نظر می‌رسد مکانیسم‌های اصلی بیوکنترل در این جدایه تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل مواد فرار و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. نتایج حاصل همچنین مشخص کرد که کاربرد قارچکش تاثیرمعنی‌داری بر روی وزن تر وخشک ریشه نداشته است.

مطالعه روی دینامیسم جمعیت فیلوسفر و ردیابی سرنوشت باکتری‌های آنتاگونیست از اهمیت خاصی برخوردار است. روند افزایشی جمعیت باکتری آنتاگونیست روی گیاه پس از مایه‌زنی توسط یوئن و همکاران (Yuen *et al.* 1991) مشاهده شد. این محققین جمعیت سه استرین *Pantoea herbicola* را بازیافت نمودند که در کنترل عامل پوسیدگی سفید لوبیا *S. sclerotiorum* نقش عمده‌ای داشتند. جمعیت این نژادها از 10^2cfu/ml به ازای هر گلبرگ در شروع آزمایش به 10^7cfu/ml بعد از ۱۶ ساعت در دمای ۲۵درجه سانتیگراد رسید. در تحقیق حاضر نیز استرین Pf51 *P. fluorescens* به خوبی قادر شد جمعیت خود را به میزان دو برابر جمعیت اولیه یعنی به میزان $9/1 \times 10^7$ cfu/ml در حضور بیمارگر افزایش دهد و در طول آزمایش قادر به زنده ماندن و حفظ جمعیت خود روی میزبان بود. در حضور قارچکش

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیت همین باکتری افت قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد. که بیانگر اثر سوء قارچکش بنومیل روی جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید می‌باشد که این بر خلاف نتیجه والات و گودیلا(Valat 1990 & Gaudilla) بود که نشان داد بیشتر قارچکش‌های استاندارد به جز تیرام تاثیر سویی بر بقاء و رشد استرین‌های.*Pseudomonas* spp ندارد. به عقیده بیکر(Baker,1987) استفاده از قارچکش به همراه باکتری می‌تواند موجب ضعیف شدن عامل بیماری و در نتیجه آسیب‌پذیرتر شدن آن در برابر عوامل آنتاگونیست گردد، که احتمالا در این تحقیق، قارچکش علاوه بر تاثیر در کاهش رشد قارچ بر روی گونه باکتری آنتاگونیست مورد مطالعه در این تحقیق تاثیر منفی گذاشته و سبب کاهش جمعیت آن می‌گردد.

جدایه *P. fluorescens* Pf51 که در آزمایش‌های درون شیشه‌ای(*in vitro*) اثر بازدارندگی خوب و در گلخانه قادر به کنترل موثر بیماری فوق الذکر بود از اندام هوایی گیاه کلزا جدا شده بود به علاوه ۸ جدایه دیگر از مجموع ۱۳ جدایه آنتاگونیست که در شرایط درون شیشه اثرات بازدارندگی خوب از خود نشان می‌دادند از اندام هوایی جدا شده بودند به نظر می‌رسد باکتری‌های موجود در فیلوسفر نسبت به باکتری‌های ریزوسفر در کنترل این بیماری موثرتر می‌باشند. این پدیده می تواند با ماهیت هوازاد بودن این بیماری قابل توجیه باشد. در تحقیق *فرناندو* وهمکاران (Fernando *et al*. 2006) نیز باکتری *Bacillus amyloliquefaciens*BS6 که از برگ کلزا جداسازی شده بود نسبت به آنتاگونیست *Pseudomonas chlororaphis*PA-23 که از ریزوسفر کلزا جداسازی شده بود در کنترل بیماری موثرتر عمل کرد.

در این مطالعه تمامی ۱۳ جدایه آنتاگونیست قادر به تولید سیدروفور در محیط CAS-agar بودند که از این میان جدایه *P. fluorescens* Pf51 بیشترین توانایی را در تولید سیدروفور از خود نشان داد. در این بررسی مشخص گردید که جدایه های سودوموناس از توانایی بالاتری در تولید سیدروفور نسبت به جدایه های باسیلوس برخوردارند. از مطالعات سایر محققین نیز چنین مستفاد می‌شود که مکانیسم عمده بازدارندگی ناشی از سودوموناس‌ها در تولید سیدروفور و القاء مقاومت سیستمیک نهفته است (Boland & Kuykendall 1998).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (59-56) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir

نشانی نگارندگان: سید مجتبی منصوری‌پور، عزیزاله علیزاده، ناصر صفایی، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID

www.SID.ir