Archive of SID

ارزیابی توانایی باکتریهای اپیفیت در کاهش بلایت سنبله و پایداری جمعیت آنتاگونیست روی گندم در شرایط گلخانه‌ای*

Evaluation of epiphytic bacteria for biocontrol of head blight and monitoring stability of antagonist population on wheat in greenhouse

احمد درخشان، ناصر صفایی و عزیزاله علیزاده**

گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت ۱۳۸۵/۵/۶ پذیرش ۱۳۸۸/۲/۲

چکیده

به منظور کنترل بیولوژیکی بلایت سنبله گندم ناشی از *Fusarium graminearum* با استفاده از باکتریهای اپیفیت، ۳۵۰ سوش باکتری از بخشهای هوایی گندم جداسازی، خالص و پس از ارزیابی اثر آنتاگونیستی آنها در شرایط آزمایشگاهی، پنج سوش به همراه یک موتان مقاوم به آنتی‌بیوتیکهای اسید نالیدیکسیک (Nalidixic acid) و کلرامفنیکل از سوش G5-2 انتخاب و در شرایط گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این بررسی از رقم فلات به عنوان حساس ترین رقم استفاده شد. بدین منظور ابتدا سوسپانسیون باکتریهای آنتاگونیست روی سنبله ها در مرحله گل دهی پاشیده شد، و بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیونی از ماکروکنیدیهای قارچ روی سنبله ها پاشیده شد. پس از مایه زنی، سنبله‌ها روزانه مورد بازدید و میزان بیماری یادداشت شد. مقایسه میانگین آزمون دانکن نشان داد که در سطح یک درصد تفاوت معنی داری بین تیمارهای بیمارگر همراه با آنتاگونیست و تیمار بیمارگر تنها از نظر میزان بیماری وجود دارد. در این پژوهش تفاوت معنی داری بین میزان کنترل توسط آنتاگونیست‌های مختلف مشاهده نشد، و آنتاگونیست‌ها توانستند ۵۰ تا ۸۰ درصد بیماری را نسبت به شاهد مثبت، کاهش دهند.

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

از این پنج آنتاگونیست چهار سوش مربوط به *Bacillus* spp. و یک سوش مربوط به *Pseudomonas fluoresecens* بود. بررسی جمعیت موتان از سوش *Bacillus* sp. G5-2 آنتاگونیست نشاندار نشان داد که تا پایان برداشت ۲۲ تا ۵۶ درصد جمعیت باکتری موجود روی سنبله ها مربوط به آنتاگونیست می‌باشد که بیانگر توانایی بالای کلنیزاسیون و حفظ جمعیت آنتاگونیست بروی گیاه می‌باشد. این اولین گزارش از ردیابی جمعیت آنتاگونیست بر روی میزبان است که میتواند به عنوان یک ابزار برای اندازه گیری میزان پایداری جمعیت آنتاگونیست‌ها به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: بلایت سنبله گندم، بیوکنترل، باکتریهای اپیفیت، آنتاگونیست، موتان

مقدمه

بلایت سنبله یا اسکب گندم ناشی از *Giberella zeae* [*F. graminearum* Schwabe. (Schweinitz) Petch] یکی از مخربترین بیماریهای گندم در نواحی مرطوب و نیمه مرطوب در سراسر جهان می‌باشد، که سبب خسارت سنگینی به لحاظ کمی و کیفی بخاطر تولید انواع توکسین های قارچی که برای انسان و دام بسیار خطرناک است، می‌شود (Parry *et al.* 1995, Goswami & Kistler 2004). گرچه چندین گونه از فوزاریوم بعنوان عامل بلایت سنبله معرفی شده است، ولی *Fusarium graminearum* گونه غالب این بیماری در بیشتر کشورها، بویژه ایران محسوب می‌شود (**صفایی** و همکاران، ۱۳۸۴). این بیماری با رسیدن به سطح اپیدمی، موجب کاهش شدید بازده و در نتیجه کاهش شدید قیمت می‌شود که زیان مستقیم و غیر مستقیم ناشی از این قارچ را، میلیاردها دلار تخمین می‌زنند (Gilbert & Tekauz 1999, Goswami & Kistler 2004). روشهای کنترل این بیماری مانند روشهای زراعی، شیمیایی و ارقام مقاوم دارای تاثیرات نسبی می‌باشند. به نظر می‌رسد کنترل بیولوژیکی به لحاظ سازگاری با محیط زیست و با توجه به کوتاه بودن دوره حساسیت گندم به این بیماری (مرحله گلدهی)، استراتژی مناسب و افق روشنی را در مدیریت تلفیقی این بیماری فراهم کند (Feranondo *et al.* 2002). تاکنون کنترل بیولوژیک امیدوار کننده‌ای از محققین مختلف گزارش و ثبت شده است. در مطالعات مزرعه‌ای **خان** و همکاران (Khan et *al.* 2004)، که در آن بیشتر آنتاگونیست‌ها از مخمرها بودند نشان داده شده که این آنتاگونیست ها بین ۵ تا

www.SID.ir

Archive of SID

۶۰ درصد سبب کاهش شدت بیماری نسبت به شاهد شدند. کاربرد استرین .*Bacillus* sp جدا سازی شده از برگ پرچم گندم، شدت بیماری FHB را تحت شرایط گلخانه ای ۶۷ تا ۹۵ درصد کاهش داده و غلظت DON در بذور را هم بین ۸۷ الی ۹۷ درصد کاهش داده است (Khan *et al.*, 1999). در تحقیق گلخانه‌ای دیگر از هفت سوش بکار برده شده دو سوش .*Bacillus* spp، و یک سوش .*Cryptococcus* sp شدت بیماری FHB را از ۴۸ تا ۹۵ درصد کاهش و میزان غلظت DON نیز در این بذور بین ۸۳ تا ۹۸ درصد کاهش یافت. اما سوشهای مذکور تحت شرایط مزرعه‌ای، نتایج متغیری از خود نشان دادند (Schisler *et al*. 2002). در پژوهش دیگری سه سوش باکتری به طور معنی‌داری در کاهش میزان شدت بیماری *F. graminearum* مؤثر بودند. سوش *Bacillus subtilis* ضمن کاهش شدت بیماری، دارای سطح جمعیت بالائی روی سنبله‌ها بعد از مایه‌زنی در شرایط کنترل شده، بوده است (Feranondo *et al.* 2002). سوش C3 *Lysobacter enzymogenes* که یک باکتری گرم منفی می‌باشد، هنگامی که روی سنبله‌های گندم بکار می‌رود از میزان آلودگی اولیه (مقاومت تیپ یک) و هم از سرعت انتشار بیماری (تیپ دوم مقاومت) می‌کاهد. کاربرد سوش C3 بعد از تیمار حرارتی در دمای ۷۰°C برای مدت ۲۰ دقیقه یک روز بعد از مایه‌زنی سنبله‌ها با سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ *F. graminearum*، تفاوت معنی داری از نظر کاهش بیماری نسبت به حالتی که از باکتریها بطور زنده استفاده شد، نشان نداده است. این حالت معرف ایجاد مقاومت القایی در میزبان توسط C3 می‌باشد (Gillbert &Fernando 2004) . در ایران بلایت سنبله در سال ۱۳۶۲ از مازندران گزارش شده است (Bamdadian & Torabi 1983). ولی درآن سال اهمیت زیادی نداشت، از سال ۱۳۶۵ به بعد با معرفی و گسترش ارقام پر محصول فلات و گلستان که به بیماری حساس بوده‌اند و نیز در شرایط مساعد آب و هوای شمال، این بیماری بصورت فراگیر در آمده است. میزان آلودگی در بعضی از مزارع استان‌های شمالی تا ۸۰٪ نیز برآورد شده است (Foroutan *et al.* 1993). در زمینه کنترل بیولوژیکی و تاثیر آنتاگونیستها روی این بیماری بجز موارد بسیار محدود (Foroutan *et al.* 2005) کار چندانی نشده است.

هدف از این تحقیق بررسی برهمکنش بین بیمارگر عامل بلایت سنبله و باکتریهای اپیفیت گندم در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی توان آنها در بیوکنترل این بیماری در شرایط گلخانه

www.SID.ir

Archive of SID

بوده است.

روش بررسی

نمونه برداری و جداسازی قارچ و باکتریهای آنتاگونیست

برای این منظور از اواخر اردیبهشت، تا اوایل تیر سالهای ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ اقدام به نمونه برداری تصادفی از مزارع آلوده به بیماری فوزاریومی سنبله استان گلستان بویژه عراقی محله (ایستگاه تحقیقاتی)، جوج گرگان، تقی‌آباد از توابع شرق گرگان، مسیر بین تقی‌آباد و فاضل‌آباد، علی‌آباد، فاضل‌آباد، آبشار کبودبال و مناطق مهم کشت گندم مازندران (دشت ناز ساری، ارتفاعات بالای ساری) شد. نمونه‌های سنبله و دیگر بخش های هوائی بوته‌های آلوده و سالم، به آزمایشگاه منتقل شد، جدایه های قارچ به دو روش نوک هیف و تک اسپور، روی محیط آب آگار (WA) دو درصد خالص در لوله های حاوی PDA و SNA شیب‌دار کشت و در دمای ٤°C نگهداری شده است. سوشهای باکتری نیز روی محیط NA و NAS کشت و پس از جدا و خالص سازی درون آب مقطر سترون نگهداری شدند.

بررسی خواص آنتاگونیستی باکتریهای در شرایط آزمایشگاهی

۱- آزمون کشت متقابل

به منظور بررسی میزان بازدارندگی باکتری‌های جدا شده، اقدام به ارزیابی آنها در برابر جدایه *Fusarium graminearum*(F1) با روش کشت متقابل مقدماتی و نهایی گردید. در روش اول چهار سوش از باکتریهای مختلف در فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA به صورت خطی در ۴ نقطه تشتک پتری کشت داده شد. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت یک قرص از جدایه قارچ با قطر نیم سانتی متری در وسط پتری گذاشته شد. باکتری‌هایی که در مرحله مقدماتی خاصیت بازدارندگی از رشد و یا لیزکنندگی روی قارچ داشتند، وارد آزمون کشت متقابل نهایی شدند (روش اجرا آزمایش مانند آزمون مقدماتی بوده با این تفاوت که در هر تشتک پتری فقط از یک سوش استفاده شد). درصد کاهش رشد میسلیوم یا مساحت ناحیه بازدارندگی بر اساس فرمول (۱) محاسبه شده است. این آزمایش در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و با سه تکرار انجام شد. از آب مقطر سترون به جای باکتری، به عنوان شاهد استفاده شد (Weller & Cook 1983).

www.SID.ir

Archive of SID

$$\text{درصد کاهش رشد میسلیوم} = \frac{\text{قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد} - \text{قطر پرگنه قارچ در تیمار مورد نظر}}{\text{قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

۲- بررسی تولید مواد فرار ضد قارچی توسط باکتریهای آنتاگونیست

این آزمون به روش *منتیلگر* و همکاران (Montealegre *et al*. 2003) با اندکی تغییر انجام شد. در این روش سوسپانسیونی با رقت $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی‌لیتر از کشت ٤٨ ساعته سوش‌های باکتری در آب مقطر سترون تهیه گردید، به کمک میله شیشه‌ای سترون حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق روی محیط NA و یا NAS (NA حاوی ۲ درصد گلوکز) به روش کشت چمنی کشت شد. تشتک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. سپس قرص کوچکی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کلنی فعال قارچ (F1) *F. graminearum* در تشتک پتری PDA کشت شد. آنگاه دو تشتک پتری حاوی باکتری و قارچ در زیر هود و در شرایط استریل بطوریکه تشتک پتری حاوی قارچ در بالا قرار گیرد مقابل هم قرار گرفته و به وسیله نوار پارافیلم کاملا مسدود شدند. تشتک های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. برای تیمار شاهد فاقد باکتری از سوسپانسیون آب مقطر سترون استفاده شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و کلیه آزمایش ها دو بار تکرار شد. معیار اندازه‌گیری درصد کاهش رشد شبیه آزمایش قبلی می‌باشد.

۳- بررسی تولید ترکیبات خارج سلولی یا مواد آنتی‌بیوتیکی (آزمون آنتی‌بیوز)

این آزمون به روش *کراس و لوپر* (Kraus & Lopper 1990) انجام شد. در این روش ابتدا از محیط کشت تازه باکتری سوسپانسیونی به غلظت $۱۰^{۹}$ (cfu/ ml) از باکتری تهیه، و به کمک میله شیشه‌ای سترون روی محیط PDA به روش چمنی کشت شد. بعد از ۷۲ ساعت ابتداء باکتریها به کمک میله شیشه‌ای کج در زیر هود کاملاً جمع شده و با پنبه سترون کاملاً تمیز و به مدت ۲۰ دقیقه زیر نور ماورای بنفش (UV) قرار گرفت. سپس سطح پتری به کمک پنبه آغشته به کلروفرم تمییز شد و برای مدت نیم ساعت در زیر هود قرار گرفت. آنگاه به مدت ۱/۵ ساعت در پتری را بصورت نیمه باز قرار داده تا کاملاً کلروفرم تبخیر شود. بعد یک قرص قارچ با قطر ۵ میلی‌متری بر روی محیط PDA قرار داده شد. تیمار شاهد، فاقد باکتری و کلروفرم بوده است. این آزمون با سه تکرار وکلیه آزمایشات در دو مرحله تکرار شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون گلخانه‌ای:

۱- تهیه موتان

به منظور ردیابی آنتاگونیست و بررسی دینامیک جمعیت و میزان بقاء آن، اقدام به تهیه موتانت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شد. در این روش از دو آنتی‌بیوتیک اسید نالیدیگسیک و کلرامفنیکل استفاده شد. ابتدا تک کلنی حاصل از محیط کشت تازه باکتری‌هایی که در مرحله آزمایشگاهی خواص آنتاگونیستی خوبی نشان داده بودند مرحله به مرحله وارد غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۲۰، ۳۵، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۵۰ پی‌پی‌ام آنتی‌بیوتیک اسید نالیدیکسیک شدند، سپس سوشهایی که در غلظت ppm۱۰۰ از این آنتی‌بیوتیک قادر به رشد بودند، انتخاب و پس از تثبیت آن در این غلظت، وارد غلظت‌های مختلف (همانند بالا) کلرامفنیکل شدند. به همین ترتیب این سوش‌ها تا غلظت ppm۱۰۰ از آنتی‌بیوتیک دوم هم رشد کردند. برای تثبیت موتانت مورد نظر، ابتداء تک کلنی حاصل از محیط کشت تازه (با غلظت ppm۱۰۰ از دو آنتی‌بیوتیک فوق) را روی محیط آبگوشت غذایی (NB) رشد داده و سپس به مدت دو هفته، هر روز یک میلی‌لیتر از محیط NB حاوی باکتری را به محیط NB جدید انتقال و بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. در طی این مدت هر بار باکتری رشد یافته روی محیط NB را روی محیط حاوی دو آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام رشد داده تا از قدرت رشد آن اطمینان حاصل شود. بعد از دو هفته مجددا روی محیط آنتی بیوتیک دار کشت و باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک، انتخاب شد. این عمل دوبار تکرار شد. سپس یک محلول غلیظ از آن تهیه و به نسبت ۲ به ۱ در گلیسرول ۷۰ درصد رقیق و در داخل میکروتیوپ در دمای ۷۰°C- قرار داده شد. این موتانت به همراه سایر آنتاگونیستها برای آزمون بیوکنترل در گلخانه مورد آزمایش قرار گرفت (Chan *et al*. 2003, Alizadeh *et al*. In press).

۲- آلوده‌سازی سنبله‌ها

در این آزمون برای مایه زنی قارچ از روش مسترهازی (Mesterhazy 1987) و برای مایه زنی باکتری نیز از روش فرناندو و همکاران (Fernando *et al*. 2002) استفاده شد. با شروع ۵۰ تا ۷۰ درصد گلدهی یا مرحله گرده‌افشانی سوسپانسیونی از باکتری به غلظت 10^9 (سلول درواحد میلی لیتر) تهیه و بصورت مه پاشی مستقیم روی سنبله‌ها (بطوریکه سنبله‌ها کاملاً خیس شود) مایه‌زنی انجام شد. سپس به کمک یک پوشش پلاستیکی سیاه کل گلدان پوشیده

www.SID.ir

Archive of SID

شد و به مدت ٢٤ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت، تا استقرار باکتری انجام گیرد. آنگاه سوسپانسیونی از ماکروکنیدیهای قارچ با غلظت ۲×۱۰^{۶} ماکروکنیدی در هر میلی‌لیتر در محیط عصاره ماش (MB) تهیه، و روی سنبله‌ها به روش قبلی پاشیده شد. در تیمارهای شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. گلدان‌ها به مدت ٤٨ ساعت در شرایط زیر پوشش پلاستیکی قرار گرفت. بعد از ٤٨ ساعت پوشش پلاستیکی روی هر گلدان برداشته شد و کل گلدان‌ها در زیر یک پوشش پلاستیکی سراسری قرار گرفتند. پس از مایه زنی قارچ، به مدت ۱۵ تا ۲۰ روز کل سنبله‌ها هر روز مورد بازدید قرار گرفته و تغییرات حاصل طی ۳ تا ۴ مرحله به فاصله زمانی ۳ روز یادداشت شد. لازم به ذکر است این آزمون به صورت مقایسه‌ای بین دو رقم فلات و تجن به عنوان دو رقم حساس نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تجزیه و تحلیل آزمون‌های مرحله آزمایشگاهی پنج آنتاگونیست به همراه یک موتان از سوش *Bacillus* sp.G(5-2) که بهترین نتیجه را در مرحله آزمایشگاهی نشان دادند وارد گلخانه شدند. تیمارهای آزمایش در جدول ۱ ارایه شده است. در مجموع این آزمایش با ١٤ تیمار در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار و در دو مرحله مورد ارزیابی قرار گرفت. کل آزمایش در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۵±۵ $\dot{C}$ با رطوبت نسبی ۹۰-۸۰ درصد انجام شد. هر ۱۰روز پس از کشت گندم، از کود کامل(NPK + TE 20:20:20) بصورت ۱/۵ گرم در لیتر برای آبیاری و کودپاشی علاوه بر آبیاری معمولی آن استفاده شد. بعلاوه برای مبارزه با آفات نیز از سم دیازینون به صورت یک در هزار استفاده شد. این آزمایش دو بار تکرار شد.

۲- شمارش جمعیت و ارزیابی موتانت

برای ارزیابی جمعیت جدود ۳ گرم از بخش‌های هوائی گندم (سنبله و برگ) در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل خرد و مدت ۱ تا ۳ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس رقت‌های مختلف از $۱۰^{-۲}$ تا $۱۰^{-۷}$ تهیه روی محیط NA بدون آنتی‌بیوتیک و محیط آبگوشت غذایی (NA) همراه با دو آنتی‌بیوتیک مورد استفاده برای تهیه موتان [NA+100ppm (Nalidixic acid & Choloramphanicl)] کشت و شمارش جمعیت آنها انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات تیمارهای مورد استفاده در آزمایش های گلخانه‌ای

Tabel 1. Characteristics of treatments used for greenhouse test

تعداد number	کد تیمار code(s)	تیمارها Treatment(s)
1	Ck	شاهد control
2	P	بیمارگر pathogen
3	A1+ P	P+G(5-1)
4	A1	G(5-1)
5	A2+P	P +G(5-2) wild type
6	A2	G(5-2) (W)
7	A3+P	P + G(5-2) mutant
8	A3	G(5-2) (M)
9	A4+P	P + G(5-11)
10	A4	G(5-11)
11	A5+P	P + G(7-1)
12	A5	G(7-1)
13	A6+P	P + A(2-10)
14	A6	A(2-10)

Ck: Check, P: Pathogen, A_1 …A_6: Antagonists.

۳- بررسی روند بیماری در طول آزمایش

برای بررسی روند تغییرات بیماری، پس از مایه‌زنی قارچ و باکتری سنبله‌ها هر روز مورد باز دید قرار گرفتند. سپس با فاصله ۳ روز تعداد سنبلچه‌های آلوده نسبت به کل سنبلچه‌های هر سنبله در هر تکرار مشخص شد. بدین ترتیب ۴، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶ روز پس از مایه زنی یاداشت برداری از میزان بیماری انجام شد. نتایج حاصل برای هر آزمون (فلات آزمایش ۱ و۲) بصورت جداگانه با نرم افزار MSTATC تجزیه شد.

نتیجه

از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ده جدایه قارچ بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و کلید *نلسون* و همکاران (Nelson *et al.* 1983)، خالص شد. هر ده جدایه به گونه *Fusarium graminearum* تعلق داشتند. لازم به ذکر است کلیه آزمونها تنها با جدایه *Fusarium graminearum* F1 انجام گرفت. همچنین از بین نمونه های سنبله و برگ گیاهان سالم و آلوده جمع‌آوری شده ۳۵۰ سوش باکتری جداسازی وخالص شد، که پس از آزمون

www.SID.ir

Archive of SID

اولیه کشت متقابل، ۲۶ سوش با قدرت بالای بازدارندگی از رشد قارچ عامل، انتخاب و مکانیسم بازدارندگی آنها شامل آزمون تعیین درصد بازدارندگی از رشد، تولید مواد فرار و آنتی بیوز مورد ارزیابی قرار گرفت.

اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی:

۱- کشت متقابل

جدول تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر تیمارها در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها بازدارندگی از رشد با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد، ۲۶ سوش آنتاگونیست مورد مطالعه را در ١٤ گروه مجزا قرار داد. در این میان سوش پنج یا G(5-1) با ۵۲ درصد بیشترین تأثیر ممانعت از رشد قارچ (اثر بازدارندگی) را به همراه داشته است. سوش ۶یا G(5-2) ، سوش ۱۱ یا G (3-1) و سوش ۲۵ یا A(2-10) به ترتیب با ۵۱،۵۰ و ۴۹ درصد در رده‌های بعدی بیشترین تأثیر بازدارندگی قرار گرفتند (جدول۲).

۲- بررسی اثر تولید ترکیبات فرار توسط سوش‌های آنتاگونیست

جدول تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر تیمارها در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. مقایسه میانگین داده ها نشان داد، که بیشتر آنتاگونیست‌های فوق دارای قدرت تولید مواد فرار بوده و دست کم ٤٠ درصد از سوش‌های باعث کاهش رشد میسلیومی قابل توجه شده‌اند. سوش ۲۵ یا A(2-10) از سودوموناس با بیش از ۵۰ درصد و ۴ سوش باسیلوس به نامهای ۱۶ یا G(5-11)، ۶ یا G(5-1) ،۷ یا G(5-2) و ۳ یا G(7-1) بین ۴۰ تا ۵۰ درصد نسبت به شاهد سبب کاهش رشد قارچ شدند (جدول ۲).

۳- آزمون بررسی تولید ترکیبات خارج سلولی (تولید آنتی‌بیوز)

نتایج این آزمون موثر بودن اکثر سوش‌ها در ممانعت از رشد قارچ را نشان می‌دهد، به گونه‌ای که بیش از ۳۰٪ جدایه‌ها ۱۰۰٪ مانع رشد بیمارگر شدند. بیست درصد سوشها نیز با کاهش تقریبی ٦٠٪ رشد میسلیومی، کمترین تأثیر را روی قارچ داشتند. بنابراین تقریباً تمام سوشها روی کاهش رشد میسلیومی قارچ تأثیر داشتند (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

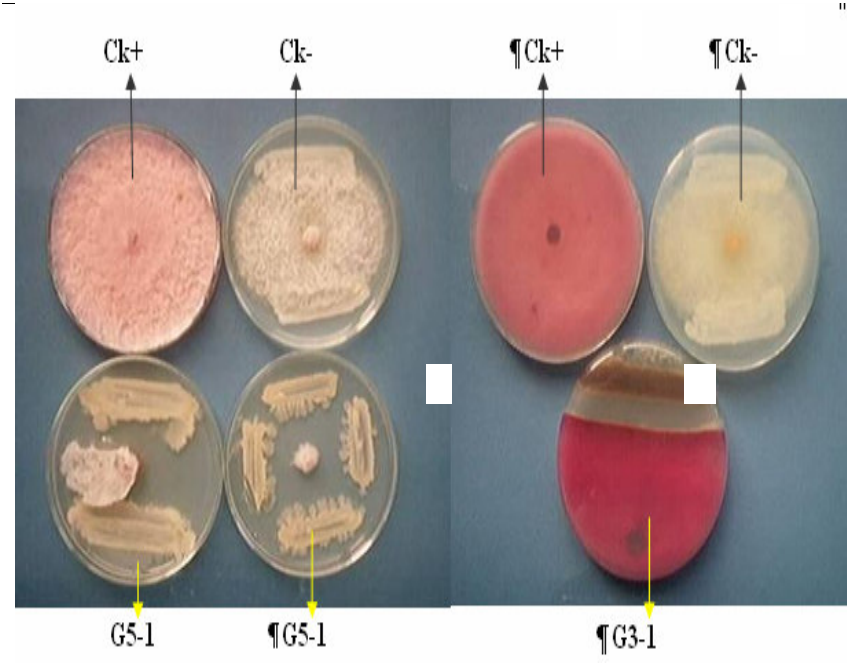
جدول ۲- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی رشد قارچ در ۲۶ آنتاگونیست منتخب و گروه‌بندی آنها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد در سه آزمون کشت متقابل، تولید مواد فرار، آنتی‌بیوز

Table 2. Comparsion of fungal growth in 26 selected antagonist strains and their ranking according to Duncan multiple range test (α = 1%) in dual culture, antibiosis and production of volatailes tests

استرین strain	مواد فرار ۱ Volatile1	مواد فرار ۲ Volatile2	آنتی بیوز۱ Antibiosis1	آنتی بیوز 2 Antibiosis2	کشت متقابل Dual culture
25	50.83a	37.5abc	87.5bcd	87.5abcd	49.79abcd
16	50a	43.75a	95.83abc	100a	49.38bcd
6	49.1a	43.75a	97.91ab	100a	52.29a
7	43.75ab	39.58ab	95.83abc	100a	51.67ab
3	37.5abc	39.58ab	100a	100a	49.38bcd
18	31.25cde	25cde	100a	85.41bcd	47.5def
17	27.08cde	29.17bcd	68.75ef	95.83ab	47.5def
20	25cde	27.8cde	87.5bcd	89.58abc	42.5klm
26	25cde	22.92def	54.16gh	89.5cd	40mn
21	22.91def	29.17bcd	100a	100a	42.5klm
13	22.08def	25cdef	100a	100a	41.88lm
14	22cde	20.83def	83.33d	87.5abcd	38.75no
9	20.83def	16.67defgh	91.67abcd	83.33bcd	46.05fg
10	17.91efg	8.33hk	83.33d	92.91ab	40mn
5	16.67efg	16.67defgh	100a	100a	46.46efg
11	14.58efg	15.42defgh	85.41bc	58.33gf	50.42abc
15	14.58efg	22.92def	58.41cd	87.5abcd	49.58bcd
24	12.5hgf	18.75defgh	91.67abcd	91.67abc	47.5def
4	11.67hgf	22.8def	91.67abcd	87.5abcd	48.96cde
12	8.33ghk	14.58fghk	91.67abcd	56.25g	42.92hkl
22	5hkl	16.67defgh	62.5gf	76.25de	42.92hkl
23	4.16kl	10.42ghk	91.67abcd	75de	44.58ghk
1	2.5l	18.75defgh	47.91h	68.75ef	42.71kl
2	2.08l	7.5k	100a	100a	33.13p
8	2.08l	7.08k	78.5bcd	87.5abcd	45.42fgh
19	1.67l	14.58fghk	72.91e	72.91e	37.29o

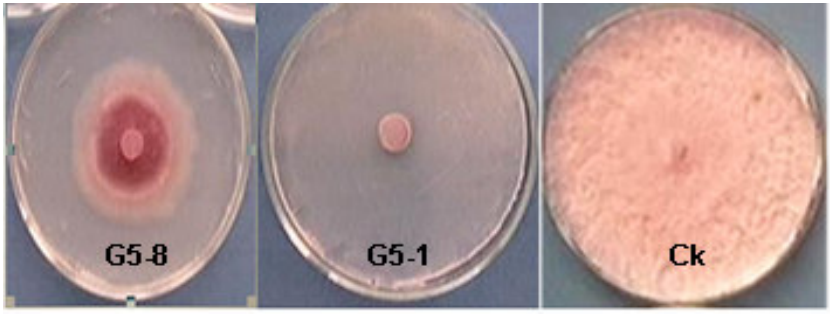
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- مقایسه سوش های G5-1 و G3-1 نسبت به شاهد مثبت (Ck^{+}) و شاهد منفی (سوش بدون تاثیر Ck^{-}) در آزمون کشت متقابل در برابر (F1) *F. graminearum*.

Fig. 1. Comparsion of antagonist G5-1and G3-1 strians with positive and negative control in dual culture tests against *F.graminearum*(F1).

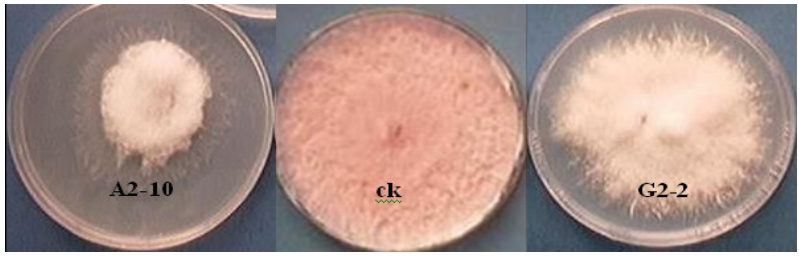


شکل ۲- مقایسه سوشهای G5-1 و G5-8 نسبت به شاهد (Ck) در آزمون تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی.

Fig. 2. Comparsion of antagonist G5-1and G5-8 strians with control (check) in antibiotic production tests.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۳- مقایسه سوش آنتاگونیست A(2-10) نسبت به شاهد(Ck) و سوش بدون تاثیر G(2-2) در آزمون تولید مواد فرار در برابر (F1) *F. graminearum*.

Fig. 3. Comparsion of antagonist A(2-10) strian with control and ineffectiveG(2-2) strain in production of volatiles test.

تهیه موتان

از میان پنج سوش برتر مورد بررسی تنها یک سوش *Bacillus* sp. G(5-2) که دارای توان رشد در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام از دو آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک و کلرامفنیکل بود انتخاب، و برای ارزیابی اثر آنتاگونیستی آن در شرایط گلخانه و بررسی دینامیک جمعیت باکتری در طول آزمایش، به همراه سایر سوشها مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون گلخانه‌ای

۱-انتخاب آنتاگونیست برای آزمون گلخانه

در مجموع بررسی کشت متقابل و مکانیسمهای اصلی مؤثر در شرایط فیلوسفر پنج آنتاگونیست که از نظر بازدارندگی رشد، تولید ترکیبات خارج سلولی (آنتی‌بیوز) و مواد فرار از توان بیشتری برخوردار بودند، برای آزمایش های گلخانه‌ای انتخاب شدند (جدول ۳).

۲- بررسی گلخانه‌ای

نتایج حاصل از بررسی پنج آنتاگونیست منتخب به همراه یک موتان مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و اسید نالیدیکسیک تهیه و برای بررسی اثرات آنتاگونیستی باکتری روی جدایه (F1) *F. graminearum* مورد آزمایش قرار گفت.

نتایج حاصل از دو سری آزمایش روی فلات نشان داد که اولا بین سوشهای اپی‌فیت در کنترل بیماری اختلاف معنی‌دار وجود داشته، و بعلاوه سوش G(5-1) و A(2-10) به ترتیب هر

www.SID.ir

Archive of SID

یک با میانگین ۸۰ و ۷۵ درصد بیشترین تأثیر در کاهش بیماری و سوش G(7-1) با ٤٥ درصد (نتیجه حاصل از سری اول زیرا برای سری دوم این جدایه حذف شد) کمترین تأثیر در کاهش بیماری داشتند.

جدول ۳- میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ در پنج سوش منتخب آنتاگونیست در آزمونهای مختلف آزمایشگاهی

Table 3. Mean of the fungal growth inhibition in five selected antagonist strains in differential *in vitro* tests

آنتی‌بیوز (٪) Antibiosis		تولید مواد فرار(٪) Volatile		کشت متقابل Dual culture	نام آنتاگونیست
Anti 2	Anti 1	Vol 2	Vol 1		Antagonist code
87	87.5	37	51	49.7	25 or A(2-10)
97	100	44	49	52.2	6 or G (5-1)
96	100	40	44	51.6	7 or G(5-2)
96	100	44	50	49.3	16 or G(5-11)
100	100	39	37.5	49.3	3 or G(7-1)

نتایج آزمون دانکن نشان داد که تیمارهای مورد مطالعه در پنج گروه مجزا قرار گرفتند. تیمارهای ۱، ٤، ٦، ۸، ۱۰ و ۱۲ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار آماری نداشته و در یک گروه قرار گرفتند. این گروه شامل تیمارهای آنتاگونستی بدون بیمارگر و کنترل بوده اند. این حالت مبین عدم تاثیر منفی روی گندم و دلیل بر سازگاری آنتاگونیست با شرایط میزبان می باشد. بررسی اثر آنتاگونیستها از نظر درصد کنترل بیماری تیمارهای ۳ و ۱۱ بیانگر کارایی این سوشها [*Pseudomonas fluorescens* A(2-10) ،*Bacillus* sp. G(5-1)] می باشد. در حالیکه سایر آنتاگونیستیها به میزان کمتری قادر به کنترل بیماری بودند.

۳- شمارش جمعیت و ارزیابی موتانت

نتایج این آزمون نشان داده حدد ۲۲ تا ۵۶ درصد جمعیت باکتری موجود بر روی سنبله ها مربوط به آنتاگونیست مربوطه می‌باشد، که بیانگر توانایی بالای کلنیزاسیون و حفظ جمعیت آنتاگونیست روی گیاه می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- مقایسه میانگین درصد کنترل بیماری با آزمون دانکن و گروه بندی تیمارها در دو آزمایش گلخانه‌ای در رقم فلات

Table 4. Comparsion of disease control means using Duncan multiple range test (α = 1%) and ranked treatment of two greenhouse test on falat cultivar

درصد کنترل	Treatment تیمار	Code کد	Numberشماره
100a	Control	CK	1
15.85e	Pathogen	P	2
76.15bc	P + *Bacillus* sp. G(5-1)	A1+P	3
98.94a	*Bacillus* sp. G(5-1).	A1	4
73.03bc	P + *Bacillus* sp. G(5-2) Wild type	A2+P	5
100a	*Bacillus* sp.G(5-2) (W)	A2	6
69.02cd	*Bacillus* sp.G(5-2) (Mutant)	A3+P	7
95.48a	*Bacillus* sp.G(5-2) (M)	A3	8
62.31d	P + *Bacillus* sp. G(5-11)	A4+P	9
100a	*Bacillus* sp. G(5-11)	A4	10
81b	P + *Pseudomonas fluorescens* A(2-10)	A6+P	11
100a	*P. fluorescens* (biovar I) A(2-10)	A6	12

۴- بررسی روند بیماری درشرایط گلخانه

برای بررسی روند تغییرات بیماری، پس از مایه زنی قارچ و باکتری، سنبله‌ها روزانه مورد باز دید قرار گرفتند. سپس با اختلاف ۳ روز تعداد سنبلچه‌های آلوده نسبت به کل سنبله در هر تکرار مشخص و نرخ رشد بیماری مشخص شد. بدین ترتیب ٤، ۷، ۱۰، ۱۳ و ١٦ روز پس از مایه زنی یاداشت برداری از میزان بیماری انجام گرفت. نتایج حاصل اختلاف قابل توجهی از روند بیماری در تیمار بیمارگر تنها نسبت به شاهد و تیمار آنتاگونیستهای مختلف توام با بیمارگر را نشان می دهد که در شکل ٤، ٥ و ٦ نشان داده شده است.

بحث

با توجه به خسارتی که در سالهای اخیر، توسط بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم به مناطق مختلف کشور، بویژه استانهای شمالی (استانهای گلستان و مازندران) وارد شده و معرفی این قارچ بعنوان یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای گندم (Golzar 1993, Mamarabadi 1996, Safaie *et al.* 2005) و عدم وجود یک روش کنترل موثر، سبب شده تا تحقیق حاضر به منظور شناسایی پتانسیل احتمالی بیوکنترل قارچ توسط منابع آنتاگونیستی بومی مورد ارزیابی قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- بررسی دینامیک جمعیت باکتری موتان روی گندم رقم فلات

Table 5- Evaluation of population dynamic mutant bacterial antagonist on wheat Falat cultivar

Treatment تیمار	G5-1 or A_1		G5-2 (M) or A_3		G5-2 (M) +P		A_5-10 or A6		CK	
dilution رقت	NA	NA+ (N. A+CLM)	NA	NA+ (N. A+CLM)	NA	NA+ (N. A+CLM)	NA	NA+ (N. A+CLM)	NA	NA+ (N. A+CLM)
10^{-1}	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q
10^{-2}	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q
10^{-3}	200	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q	ن غ ق ش N.Q
10^{-4}	45-55 (50)	30-50 (40)	40-50 (45)	20-30 (25)	50-70 (60)	13-17(15)	130-150 (140)	25-27(26)	80-120(100)	15-17 (20)
10^{-5}	40	10	8	0	17	1	20	0	15	1
10^{-6}	1	0	2	0	7	-	1	0	9	0

* رقت قابل استناد برای بررسی تغییرات جمعیت (بخاطر رشد تمام تیمارها). **اعداد داخل پرانتز میانگین دو تکرار می‌باشد.

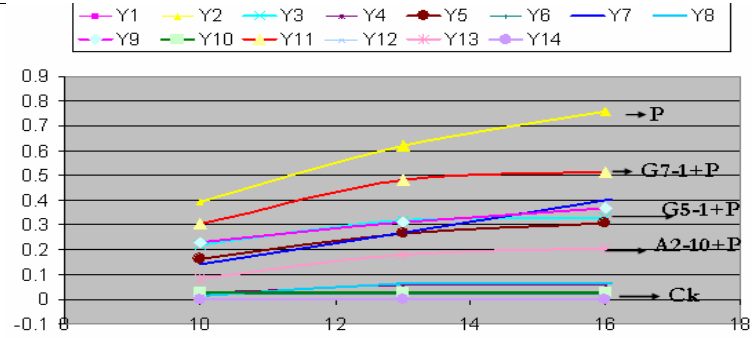
اعداد داخل جدول باید در 10^{7} ضرب شود تا معادل جمعیت در ۵۰ میلی‌لیتر از سه گرم بافت سنبله شود. P: بیمارگر، M: موتان، NA: محیط کشت غذایی بهمراه آگار

NA + (CLM+NA): محیط کشت غذایی بهمراه آگار + آنتی‌بیوتیک‌های (Choloramphenicol, nalidixic acid) هر کدام به در ۱۰۰ پی‌پی‌ام استفاده شده است.

Ck: کنترل، G5-1، G5-2 و A2-10 مربوط به تیمارهای آنتاگونیستی می باشند. غ ق ش: جمعیت بالای باکتری یا اشاره به غیر قابل شمارش بودن جمعیت دارد.

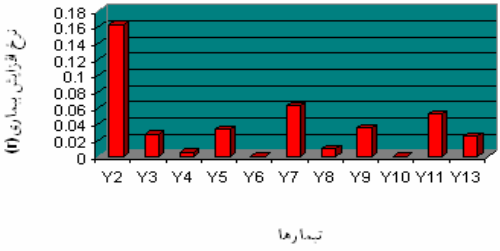
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- بررسی روند پیشرفت بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم در آزمون اول گلخانه‌ای بروی رقم فلات، Y1-14 مربوط به تیمارهای بکار رفته براساس جدول ۱ می باشد. در این شکل به طور مشخصی میزان پیشرفت بیماری در بیمارگر (P) نسبت به سایر تیمارها به ویژه دو آنتاگونیست G5-1 و A2-10 توام با بیمارگر متفاوت است و نمودارهای پایین مربوط به تیمارهای آنتاگونیست تنها و کنترل میباشد که اصلا آلودگی نداشتند.

Fig. 4. Fusarium head blight progress in the first greenhouse experiment on wheat Falat cultivar: Y1-Y14 are treatments as described in Table 1, disease progress in pathogen (P) in comparison to the other treatments especially G5-1 +P and A2-10 +P.

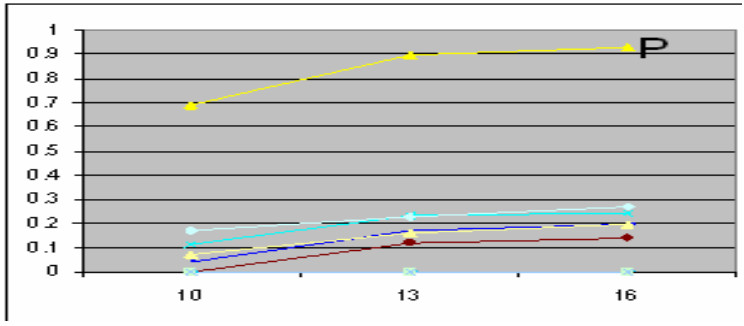


شکل ۵- بررسی نرخ پیشرفت بیماری را در آزمون اول گلخانه ای بروی رقم فلات، درشکل۵، Y1-14مربوط به تیمارهای بکار رفته براساس جدول ۱ می باشد. به ترتیب از چپ به راست Y2= P و Y4, 6, 8, 10, مربوط به تیمار آنتاگونیست تنها (G5-1, G5-2(W), G5-2(M), G5-11, G7-1) و Y3, 5, 7, 11, 13 مربوط به تیمارهای [G5-1+P, G5-2+P(W), G5-2+P(M), G5-11+P, G7-1+P, A2-10 +P] و تیمارهای Y1, 12, 13به ترتیب مربوط به Ck, G7-1, A2-10 بوده است که نرخ بیماری در آنها صفر بوده است.

Fig. 5. Disease progress rate in the first greenhouse experiment on wheat Falat cultivar: Y1-Y14 are treatments as described in Table 1.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- بررسی روند پیشرفت بیماری را در آزمون دوم گلخانه ای بروی رقم فلات در این شکل به طور مشخصی میزان پیشرفت بیماری در بیمارگر (P) نسبت به سایر تیمارهای آنتاگونیستی قابل مشاهده است. تیمارهای بکار رفته در آزمون براساس جدول ۱ است. ولی در این آزمون تیمار های مربوط به A5 یا G7-1 تنها وA5+1+ P یا G7-1+ P (بر اساس جدول ۱) حذف شده است. نمودارهای پایین مربوط به تاثیر آنتاگونیستها در کنترل بیماری و یا کاهش نرخ رشد بیماری می باشد.

Fig. 6. Fusarium head blight progress in the sceond greenhouse experiment on wheat Falat cultivar: the treatments are as described in Table 1.

بخشهای هوایی گیاه حامل مخلوطی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا و غیر بیماریزا می‌باشد. عقیده بر این است که تعامل میان این میکروارگانیسم‌ها از قبیل تولید مواد آنتی‌بیوتیکی و رقابت برای مواد غذایی یا داشتن کنج بوم شناختی مشترک، منتهی به کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای سطح برگ می‌شود (Andrews 1992, Ji & Wilson 2000). در منظر بیواکولوژیست ها فهم همکنش بین قارچ و میکروبهای بخشهای هوایی گندم می‌تواند شرط لازم و مناسبی برای یافتن تأثیر آنتاگونیست‌ها روی بیمارگر باشد (Khan *et al.* 2001, Fernando *et al.* 2002). در بررسی حاضر با نمونه‌برداری از بخشهای هوایی گندم بخصوص سبنله‌های گیاهان سالم و آلوده، پتانسیل آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت سازگار با شرایط اکولوژیکی مشترک با قارچ مورد مطالعه قرار گرفت. از اهداف اصلی این تحقیق یافتن منابع آنتاگونیستی روی سنبله‌ها بود، زیرا سبنله‌ها مهمترین کنج بوم شناختی قارچ را تشکیل می‌دهند و عقیده بر این است که با رقابت برای منابع کربنی مورد استفاده قارچ،

www.SID.ir

Archive of SID

بیمارگر را تحت فشار قرار می‌دهند (Fernando *et al.*, 2002). در این تحقیق ۳۵۰ استرین باکتری روی محیط کشت‌های NA، NAS و KB جداسازی شدند که بر اساس قدرت بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ، یا با داشتن هاله بازدارنده روی محیط PDA (آزمون چهار نقطه‌ای کشت متقابل)، انتخاب آنتاگونیست انجام گرفت. در این آزمون استرین‌هایی که قادر به جلوگیری از رشد قارچ نبودند حذف، و استرین‌های موثر انتخاب، و پس از گروه‌بندی آماری، ۲٦ استرین با میزان بازدارندگی بین ۲۵ تا۵۰ درصد انتخاب شدند.

بنا به گزارش *کاواگلری* و همکاران (Cavaglieri *et al.* 2004) آنتی بیوز رابطه معنی‌داری با شرایط گلخانه داشته و بهترین آزمون انتخاب، به خصوص برای مطالعه شرایط سطح می‌باشد. بر همین اساس در بررسی آزمایشگاهی علاوه بر قطر هاله بازدارنده یا درصد ممانعت از رشد میسلیوم قارچ در کشت متقابل، تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی و مواد فرار نیز مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون کشت متقابل ۲٦ سوش مورد مطالعه از نظر تولید هاله بازدارنده مورد ارزیابی واقع شدند. نتایج حاصله نشان داد که تمامی سوش‌ها دارای این پتانسیل آنتاگونیستی بوده و باعث کاهش رشد میسلیومی قارچ می‌شوند. از بین این سوش‌ها چند سوش از نظر گروه‌بندی آماری در گروه برتر قرار گرفتند که عمده آنها متعلق به جنس باسیلوس با گونه‌های *Bacillus* sp.، *B. cereus* و *B. subtilis* و یک گونه از *Psendomonas fluorescens* بوده است که به طور متوسط این سوش‌ها ۳۵ تا ۵۰ درصد سبب ممانعت از رشد قارچ بیمارگر شدند. این نتایج با یافته‌های درون شیشه‌ای سایر پژوهشگران مطابقت داشته است (Chan *et al.* 2003, Hamdam *et al.* 1991). در گزارشی از بررسی چن و همکاران در سال ۲۰۰۳، خواص ضد قارچی باکتریهای خاکزاد و فعالیت آنتاگونیستی آنها علیه گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق بیشترین درصد باکتریهای جدا شده متعلق به گونه *B. subtilis* بوده که همچنین دارای توان ممانعت از رشد چند گونه از فوزاریوم (۸ گونه) و سه آسکومیست و یک بازیدیومیست نیز بوده است (Chan *et al.* 2003).

نتایج آزمون‌های بررسی تولید مواد فرار و تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی نشان داده که این ۲٦ سوش همگی از این پتانسیل برخوردارند، ولی شدت آنها متفاوت بوده و در سطح احتمال

www.SID.ir

Archive of SID

یک درصد معنی‌دار می‌باشد. از مجموعه سه مکانیسم اصلی بیوکنترل مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی، پنج سوش از گونه‌های مختلف *P. fluorescens* biov.I A(2-10)، *B. cereus* (G5-11)، *B. subtilis* [(G7-1), (G5-1)]، *Bacillus* Sp.(G5-2) که دارای بیشترین تأثیر بودند، انتخاب شدند که این یافته‌ها کم و بیش با یافته‌های آزمایشگاهی افرادی چون فراناندو و همکاران و سایرین مطابقت داشته است (Fernando *et al*. 2002, Chan *et al.* 2003, Khan *et al.* 2004, El-Meleigi & Hassan 2004).

در مطالعات انجام شده توسط *فراناندو* و همکاران (Fernando *et al*. 2002) حدود ٦١ سوش باکتری و پنج جدایه قارچ از بخشهای مختلف گندم جداسازی شد. که حدود ۳۷٪ آنها از برگ و ۹ درصد از غلاف برگ‌ها و پنج درصد از سنبله‌ها و مجموعاً ۵۱ درصد باکتری‌های آنتاگونیست از بخشهای هوایی جدا شدند. که تنها یک جدایه قارچ L-07-01 از سطح توانایی ممانعت از رشد میسلیومی *F. graminearum* را داشته است. دو استرین *B. cereus* L.07-01, *B. subtilis* H-08-02 جدا شده از برگ به همراه استرین *B. mycoides* S-07-01 از اطراف ریشه به ترتیب ٦٠، ۵۲ و ۵۵ درصد از توان ممانعت از رشد برخوردار بودند. این یافته در مجموع با نتایج حاصل از استرین‌های مختلف باسیلوس (*Bacillus* spp.) در شرایط آزمایشگاهی قابل مطابقت می‌باشد.

در بررسی اخیر در زمینه تولید مواد فرار توسط باکتری‌های آنتاگونیست، سوش‌های *Bacillus sp.* (G5-2)، *B. subtilis* (G5-1 & G7-1)، *B. cereus* (G5-11) به همراه سوش *P. fluorescens* biov.I A(2-10) بیشترین درصد تولید مواد فرار را به خود اختصاص داده و بین ۳۰ تا۵۰ درصد سبب کاهش رشد میسلیومی قارچ شدند. در این بررسی حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد از سوش‌های آنتاگونیست، قدرت تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی با توان بازدارندگی صد درصد از رشد قارچ بودند.

در بررسی حاضر سوش *P. fluoescens* biov.I A(2-10) با تولید ترکیبات خارج سلولی به میزان ۸۷٪ از رشد جدایه *F. graminearum* (F1) جلوگیری نمود. متابولیت‌های ثانویه از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌ها نقش عمده‌ای در جلوگیری از رشد عوامل بیماریزای قارچی توسط سودوموناسها به ویژه در شرایط آزمایشگاهی دارد (Weller 1988). آنتی بیوتیک فنازین-۱-

www.SID.ir

Archive of SID

کربوکسیلیک اسید نقش اساسی در بازدارندگی از رشد *G. graminis var tritici* دارد که بوسیله استرین 2-79 *P. fluorescens* تولید می‌شود. تولید آنزیم اندوکتیناز نیز نقش مهمی در بازدارندگی از رشد *R. solani* توسط *P. fluorescens* biov.I دارد. همچنین آنتی بیوتیک ویسکوسیانامید به همراه این آنزیم باعث جلوگیری از رشد *P. ultimum* و *R. solani* توسط *P. fluorescens* biov.I می‌گردد(Mohammadi *et al.* 2005).

در بررسی تأثیر استرین‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بلایت سنبله گندم در شرایط گلخانه، زمانی که حدود ۷۰-۵۰ درصد سنبله ها در مرحله گلدهی بودند عمل مایه زنی انجام شد. بررسی تأثیر تیمار آنتاگونیستی (مایه زنی باکتریهای قبل از قارچ) نشان داد اولا بین سوش‌های آنتاگونیست در سطح آماری یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشته است، و در این بین سوش *P. fluorescens* biov.I A(2-10) (۸٤٪) و *B. subtilis* (۷٦٪) از توانایی خوبی در کنترل بیماری نسبت به پاتوژن برخوردار بودند. در مقایسه با تیمار بیمارگر تنها، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آنتاگونیست‌های مناسب می‌تواند در کنترل بیولوژیکی بیماری مفید و مؤثر واقع شود، و نوید تازه‌ای را در مبارزه تلفیقی و یا مدیریت کنترل بیماری به همراه داشته باشد. در این بررسی که از پنج سوش آنتاگونیستی (*B. cereus* G5-11، *Bacillus* Sp. G5-2، *B. subtilis* [G5-1, G7-1] و *P. fluoresecens* biov.I A2-10) استفاده شد. تمام سوش‌ها نسبت به شاهد مثبت (بیمارگر تنها) دارای اختلاف آماری معنی‌داری در کنترل بیماری بوده‌اند. استفاده از موتان‌های مقاوم به آنتی بیوتیک برای ارزیابی دینامیک جمعیت نشان داد که حدود ۲۲ تا ٥٦ درصد از جمعیت باکتری بعد از مایه زنی در شرایط کنترل شده قابل بازیافت می‌باشند. این در حالی است که به گفته *فرناندو* و همکاران (Frenando *et al*. 2002) سوش *B. subtilis* ضمن کاهش میزان و شدت بیماری، از سطح جمعیت بالایی بر روی سنبله‌های بعد از مایه‌زنی در شرایط کنترل برخوردار بوده است. نتایج این آزمون با بررسی چندین مورد بیوکنترل این قارچ در شرایط کنترل شده (گلخانه) هماهنگی داشته است (Fernando *et al.* 2002, Schisler *et al*. 2002) . این آزمون برای اولین بار روی قارچ فوق انجام شد که ضمن تعیین روند تغییرات جمعیت باکتری، درصد بقای جمعیت آن نیز قابل پیش بینی بود.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی همکنش و تأثیر سه سوش باسیلوس جدا شده از سنبله گندم، روی کاهش بیماری FHB در شرایط گلخانه نشان داد که تیمار بذر به همراه کاربرد باکتریها روی سنبله‌ها قبل از تلقیح قارچ بهترین نتیجه را در کاهش میزان بیماری در مورد هر سه سوش داشته است. سوش H-08-02 *B. subtilis* حدود ٪۱/ ٤٩ بیماری را کاهش داده و تیمار H-08-02 نیز به طور معنی‌داری سبب کاهش شدت بیماری شده است. این نتایج نشان می‌دهد که انتخاب آنتاگونیست‌ها از سنبله‌های گندم یا بخشهای هوایی بسیار سودمند می‌باشد. زیرا بیمارگر و باکتری در استفاده از یک کنج اکولوژیکی مشترک رقیبند، و باکتری می‌تواند از سنبله‌ها به عنوان کنج مشترک استفاده کند. بعلاوه دیگر نتایج و داده‌های حاصل از تیمارهای مختلف کاربرد باکتریها پیشنهاد می‌کند که کاربرد باکتری قبل از قارچ یا تثبیت باکتری قبل از استقرار اسپورهای قارچ منجر کنترل مؤثر قارچ FHB روی سنبله‌ها خواهد شد (Fernando *et al.* 2002). این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

کاربرد سوش AS–43-4 از *Bacillus* spp. جدا سازی شده از برگ پرچم گندم، شدت بیماری FHB را تحت شرایط گلخانه‌ای ٦٧ تا ٩٥ درصد کاهش داده و غلظت DON در بذور را هم بین ٨٧ الی ٩٧ درصد کاهش داده است (Khan *et al.*, 1999). در تحقیق گلخانه‌ای دیگر از هفت سوش بکار برده شده سه سوش *Bacillus* sp. 43-3، *Bacillus* sp.43-4 و *Cryptococcus* sp. OH 182-9 شدت بیماری FHB را از٤٨ تا ٩٥ درصد کاهش و میزان غلظت DON نیز در این بذور بین ٨٣ تا ٩٨ درصد کاهش یافته است (Schisler *et al*., 2002). اما سوشهای مذکور تحت شرایط مزرعه ای، نتایج متغیری از خود نشان دادند. در حالیکه سوش‌های *Bacillus* spp. هیچ تاثیری روی شدت بیماری FHB و میزان غلظت DON در بذور نشان ندادند. ولی سوش OH 182-9 حدود ٥٠ درصد میزان DON را کاهش داد (Schisler *et al*. 2002). از مجموع نتایج حاصل چنین استنباط می‌شود که باکتری‌های آنتاگونیست نقش مهمی در کنترل بیماری و ایجاد مقاومت از تیپ یک و هم مقاومت از تیپ (کاهش میزان DON) دارند. به نظر می‌رسد یافته‌های آزمایشگاهی توام با گلخانه‌ای تحقیق حاضر نیز تاییدی بر گزارشات قبلی باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (73-70) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: احمد درخشان، ناصر صفایی و عزیزاله علیزاده، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

www.SID.ir