Archive of SID

کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی خیار *Verticillium dahliae* به وسیله جدایه باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس

فاطمه احمدی‌فر[۱]، علی روستائی[۲]، داریوش شهریاری[۳] و غلام خداکرمیان[۴]

چکیده

اثرات بیوکنترلی ۲۹۰جدایه باکتری بدست آمده از ناحیه ریزوسفر مزرعه خیار در منطقه ورامین بر اساس میزان بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی خیار (*Verticillium dahliae*)، روی محیط کشت، مورد ارزیابی قرار گرفت. ۳۷ درصد جدایه ها دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند که از بین آنها هشت جدایه با میزان بازدارندگی مختلف، برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند. با توجه به بررسی های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، جدایه *Pseudomonas fluorescens bv.* III،P_1، جدایه های P_2، P_3 و P_4، *Pseudomonas fluorescens bv.* V، جدایه‌های B_1، B_2، B_4 و *Bacillus subtilis* و جدایه B_3، *Bacillus pumilus* تشخیص داده شدند. تمامی هشت جدایه با تولید ترکیبات خارج سلولی توانستند از رشد پرگنه *V. dahliae* جلوگیری کنند. جدایه P_4 با ۹۶/۴ درصد بازدارندگی بیشترین تاثیر را در کاهش رشد قارچ داشت. در آزمون متابولیتهای فرّار جدایه B_4 با ۸۴/۵۴ درصد بازدارندگی، بیشترین تأثیر را در کاهش رشد پرگنه *V. dahliae* داشت. جدایه های P_1، P_2، P_3 و P_4 با تولید سیدروفور از رشد قارچ *V. dahliae* جلوگیری کردند. در آزمایشات گلخانه ای از دو روش پوشش بذر و کاربرد سوسپانسیون باکتری در خاک بصورت محلول پاشی استفاده شد. در آزمون تیمار خاک و بذر، جدایه B_1 بیشترین تاثیر را در کاهش شدت بیماری، افزایش ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور و عدم حضور قارچ عامل بیماری نشان داد، در تیمار بذر نیز جدایه B_2 موجب کاهش شدت بیماری، افزایش ارتفاع، وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور و عدم حضور قارچ عامل بیماری گردید.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، پژمردگی ورتیسیلیومی، خیار، *Bacillus*، *Pseudomonas*

---

۱. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی از دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان
۲ و ۴. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۳. عضو هیات علمی مرکز تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی ورامین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی خیار با عامل *V. dahliae* اولین بار توسط جلالی و احمدی (۱۳۸۱) از گلخانه‌های استان اصفهان و سپس توسط سرپله و شهریاری (۱۳۸۱) از گلخانه‌های منطقه ورامین گزارش گردید. در سالهای اخیر بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی خیار در تعداد زیادی از گلخانه‌های منطقه ورامین گسترش یافته، به طوری که خسارت ناشی از آن در برخی از گلخانه‌ها با ارزیابی مشاهده ای تا ۵۰ درصد نیز تخمین زده شده است (سرپله و شهریاری، ۱۳۸۱). از آنجائیکه میکرواسکلروتهای *V. dahliae* در بافت مرده گیاهی تشکیل می شود و در غیاب میزبان حساس برای چندین سال (۱۳سال) در خاک باقی می‌مانند، کنترل شیمیایی این قارچ تقریباً غیر ممکن است (برگ و همکاران، ۲۰۰۲). در حال حاضر روش موثر و قطعی برای کنترل بیماری وجود ندارد، اگر چه متیل بروماید به عنوان یک روش کنترل برای پژمردگی ورتیسیلیومی در خاک محسوب می شود، استفاده از آن به دلیل اثرات زیست محیطی قابل توجیه نمی‌باشد (برگ و همکاران، ۲۰۰۲). به دلایل ذکر شده استفاده از روش‌های غیر شیمیایی و بیولوژیک برای کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی خیار از اهمیت بسزایی برخوردار است. اولین تلاش برای کنترل بیولوژیکی *V. dahliae* روی سیب‌زمینی صورت گرفت (وادی و ایستون، ۱۹۸۵). آنها بیش از ۱۵۰ جدایه باکتری را از ریشه‌های سیب‌زمینی جدا کردند که در شرایط آزمایشگاهی بر روی *V. dahliae* تاثیر آنتاگونیستی داشتند. برخی جدایه های *Cellulomonas*، *Pseudomonas* و گونه‌های *Streptomyces* بدست آمده در این تحقیق ریشه سیب‌زمینی را احاطه کردند و موجب افزایش رشد گیاه و تولید غده در شرایط گلخانه‌ای شدند (وادی و ایستون، ۱۹۸۵). در تیمار بذر منداب آغشته به باکتریهای *B. subtilis*، *P. fluorescens* و *Stenotrophomonas maltophilia*، بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در شرایط مزرعه به ترتیب به میزان ۱۶/۵، ۱۸ و ۲۲/۹ درصد کاهش پیدا کرد و میزان محصول ۴/۲، ۲/۹ و ۹/۰۱ درصد افزایش یافت (برگ، ۱۹۹۶). با در نظر گرفتن تاثیرات آنتاگونیستی استرینهای مختلف باکتریایی جدا شده از ریزوسفر گیاهان میزبان قارچ *V. dahliae*.

هدف از تحقیق اخیر جداسازی و انتخاب جدایه باکتری های آنتاگونیست جهت مبارزه بیولوژیک با بیماری ورتیسیلیومی خیار در نظر گرفته شد.

مواد و روشها

اثبات بیماریزائی و جداسازی قارچ عامل بیماری

جهت اثبات بیماریزائی، ابتدا بذر خیار (رقم سلطان) ضدعفونی و بعد از آبکشی با آب مقطر استریل و خشک کردن، در گلدان کاشته شدند. گیاهچه ها در مرحله دو برگی از خاک خارج گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در داخل سوسپانسیون قارچ *V. dahliae* (تهیه شده از مرکز تحقیقات ورامین) با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی لیتر قرار گرفتند (سینگلتون و همکاران، ۱۹۹۲). حدود ۳ تا ۴ هفته بعد از مایع زنی علائم مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت. بعد از مشاهده علائم، قسمتهایی از دمبرگ و ساقه بوته‌های بیمار پس از ضدعفونی به قطعات ۱ ـ ۰/۵ سانتیمتری برش داده شد. این قطعات در شرایط استریل، محیط مرطوب و دمای ۲۷- ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت اندام قارچی به خوبی در سطح نمونه‌ها ظاهر شد که توسط سوزن مقداری از آن روی محیط کشت PDA حاوی استرپتومایسین یا زاپک آگار منتقل شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. پس از رشد قارچ، جهت بررسی میکروسکوپی نمونه‌برداری گردید.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

برای جدا سازی باکتری‌های آنتاگونیست از مزارع و گلخانه‌های ورامین و پاکدشت، نمونه‌هایی از خاک اطراف ریشه بوته‌های خیار برداشته شد. نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

خاک‌های جمع‌آوری شده از هر مزرعه به طور جداگانه با یکدیگر مخلوط گردید. یک گرم از خاک هر مزرعه درون لوله آزمایش حاوی نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به روش سری رقت‌ها (Serial dilution) غلظت‌های مختلف سوسپانسیون خاک تهیه گردید و از غلظت مناسب بر روی محیط‌های کشت NA و KB (King B) ریخته و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت پرگنه‌هایی که از نظر شکل ظاهری متفاوت بودند جداسازی و خالص گردیدند (شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

بررسی قدرت بازدارندگی جدایه‌ها بر روی رشد *V. dahliae* در شرایط آزمایشگاهی

تاثیر ۲۹۰ جدایه باکتری بر رشد *V. dahliae* با استفاده از آزمون چهار نقطه‌ای بررسی شد. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها پس از ده روز بر اساس فاصله‌ای که بین حاشیه پرگنه جدایه‌ها و قارچ (Inhibition zone) ایجاد شده بود اندازه‌گیری شد (ولر و کوک، ۱۹۸۳). باکتری‌های با توانایی بازدارندگی با آزمون چهار نقطه ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی شدند. داده های بدست آمده تجزیه و تحلیل شدند (لیتل و هیل، ۱۹۷۸). با استفاده از مقایسه میانگین داده‌ها، هشت جدایه برای آزمون‌های بعدی انتخاب شدند. به منظور شناسائی باکتریهای آنتاگونیست از آزمونهای بیوشیمیائی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی استفاده شد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱). تمام آزمون‌های مربوط به این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. درصد بازدارندگی باکتریها از رشد قارچ، با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد کاهش رشد پرگنه} = \frac{\text{مساحت رشد پرگنه در هر تیمار} - \text{مساحت رشد پرگنه در شاهد}}{\text{مساحت رشد پرگنه در شاهد}} \times ۱۰۰$$

آزمون کشت متقابل(کشت دو نقطه‌ای)

ابتدا یک قطعه از قارچ ورتیسیلیوم در فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. تشتکهای پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس به کمک لوپ استریل نیمی از تشتک پتری با سوسپانسیون هر باکتری تلقیح شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۱۰روز نگهداری گردیدند (ولر و کوک، ۱۹۸۳).

تولید ترکیبات فرّار ضدّ قارچی توسط جدایه ها

سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها به صورت چمنی روی محیط آگار غذایی کشت داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس یک پلاک به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت تازه قارچ *V. dahliae* در وسط تشتک پتری حاوی محیط

www.SID.ir

Archive of SID

PDA قرار داده شد. تشتکهای پتری حاوی قارچ و باکتری آنتاگونیست روبروی هم و توسط نوار پارافیلم پوشانده و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰روز نگهداری شدند (فیدامن و روزال، ۱۹۹۳).

تولید آنتی بیوتیک توسط باکتری‌های آنتاگونیست

سوسپانسیون جدایه‌های باکتری بر روی محیط PDA کشت و به مدت ۳ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از این مدت با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر استریل پرگنه‌های باکتری از سطح محیط کشت شسته شد، سپس پنبه آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (بصورت وارونه) قرار داده شد و پس از ۳۰ دقیقه یک حلقه از قارچ ورتیسیلیوم در وسط تشتک پتری قرار داده شد. در پتری شاهد نیز از پنبه آغشته به فرمالین استفاده گردید (کراس و لوپر، ۱۹۹۰).

تولید سیدروفور

در این آزمون ابتدا محیط کشت KB (King B) حاوی غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن ($Fecl_3$) و محیط کشت KB بدون کلرید آهن تهیه گردید، سپس جدایه‌های *P. fluorescens* روی سه نقطه از تشتک پتری بصورت نقطه‌ای کشت شد. بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های باکتری با پنبه و الکل استریل از روی محیط کشت پاک گردید و سپس دو تا سه قطره کلروفرم درون تشتک پتری (به صورت وارونه) قرار داده شد. بعد از ۳۰ دقیقه جهت از بین رفتن آنتی بیوتیک‌ها تشتکهای پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیونی از قارچ ورتیسیلیوم تهیه و روی محیط ریخته شد و تشتکهای پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردیدند. عدم رشد قارچ در اطراف توده باکتری شاخص تولید سیدروفور ارزیابی شد (دفاگو و هاس، ۱۹۹۰).

تاثیر برخی قارچکش‌ها روی رشد باکتری‌های آنتاگونیست

تاثیر قارچکش‌های بنومیل، کاپتان، کاربندازیم و تیوفانات متیل بر روی رشد جدایه‌های *P. fluorescens* و *Bacillus* با استفاده از دیسکهای کاغذی انجام گرفت. و رشد یا عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های کاغذی مورد بررسی قرار گرفت (شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

آزمایشات گلخانه ای

تاثیر باکتریهای آنتاگونیست بر روی بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی خیار در شرایط گلخانه‌ای با استفاده از دو روش تیمار بذر و تیمار خاک ارزیابی گردید. همچنین در هر دو روش، تاثیر باکتریهای آنتاگونیست بر روی رشد بوته های خیار در عدم وجود قارچ عامل بیماری نیز بررسی شد. در آزمایشات گلخانه‌ای از یک جدایه قارچ و هشت جدایه باکتری استفاده شد. برای تهیه ماده آلوده کننده قارچ *V. dahliae* از محیط کشت ماسه و آرد ذرت به نسبت ۱:۹ استفاده شد. در مرحله بعدی اینوکلوم تهیه شده به نسبت پنج در صد وزنی با خاک سترون مخلوط گردید. سه عدد بذر خیار ضد عفونی شده جهت آزمون خاک در هر گلدان کاشته شد. آزمون‌ها به صورت فاکتوریل با دو فاکتور و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت با چهار تکرار در نظر گرفته شد. فاکتور A شامل دو سطح جدایه قارچ *V. Dahliae* و شاهد بدون قارچ و فاکتور B شامل نه سطح، شاهد بدون باکتری و جدایه‌های P_1، P_2، P_3، P_4، B_1، B_2، B_3 و B_4 بود.

در آزمون تیمار خاک و بذر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری با رقت 10^9 سلول در میلی‌لیتر استفاده گردید (ولر و کوک، ۱۹۸۳). پس از گذشت ۵۰ روز از کاشت، ارتفاع بوته‌ها، وزن خشک اندام هوایی، ریشه و شدت بیماری محاسبه گردید. برای تعیین شدت بیماری تیمارها در اثر قارچ *V. dahliae* از شاخص پولمن و دوی در هر بوته استفاده شد

www.SID.ir

Archive of SID

(پولمن و دوی، ۱۹۸۲). جهت تجزیه و تحلیل آماری داده ها از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی از نرم افزار MSTATC استفاده شد و در صورت نیاز، تبدیل داده انجام شد. برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها و برای تبدیل داده‌ها از فرمولهای $Y=asin\sqrt{x}$ (x درصد کاهش رشد قارچ) و $Y=\sqrt{x}$ (x ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه) استفاده گردید (یزدی صمدی، ۱۳۷۶؛ لیتل و هیل، ۱۹۷۸).

نتایج و بحث

بیماریزا بودن *V. dahliae* روی گیاهچه‌های خیار به اثبات رسید، علائم بیماری (پژمردگی، کلروز و نکروز) چهار هفته پس از تلقیح مشاهده گردید (شکل ۱). قارچ جدا شده از این بوته ها با قارچ تلقیح شده کاملاً یکسان بود.

به کمک نرم افزار SAS، از مجموع ۲۹۰ جدایه مورد مطالعه، چهار جدایه *P. fluorescens* و چهار جدایه *Bacillus* برای شناسایی و بررسی اثرات آنتاگونیستی بر روی قارچ *V. dahliae* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب شدند. با توجه به آزمون‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (جدول ۴)، جدایه P_1 با *Pseudomonas fluorescens bv.u*، جدایه‌های P_2، P_3 و P_4 با *Pseudomonas fluorescens bv. v*، جدایه های B_1، B_2 و B_4 با *Bacillus subtilis* و جدایه B_3 با *Bacillus pumilus* مطابقت داشتند.

شکل ۱: علائم کلروز و نکروز روی برگهای بوته بیمار (سمت چپ)، گیاه سالم (سمت راست) در آزمون اثبات بیماریزائی

www.SID.ir

Archive of SID

اثر بازدارندگی جدایه ها در شرایط آزمایشگاهی

در آزمون کشت متقابل، مقایسه میانگین داده ها (جدول ۱) نشان داد که تمامی جدایه‌های آنتاگونیست باعث کاهش رشد میسلیوم *V. dahliae* گردید که بین آنها جدایه P_4 با ۴۹/۹۳ درصد کاهش رشد، بیشترین و جدایه B_4 با ۱۲/۵ درصد کاهش رشد کمترین تأثیر را داشت (جدول ۱). در آزمون مواد فرّار، مقایسه میانگین داده ها نشان داد که جدایه B_4 با ۸۴/۵۴ درصد، بازدارندگی، بیشترین تأثیر را در کاهش رشد پرگنه *V. dahliae* داشت. جدایه های B_1، B_2، P_1 و P_4 از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با شاهد نداشتند که جدایه‌های P_1 و P_4 با ۲۲/۲۴ درصد کاهش رشد در مقایسه با سایر جدایه ها کمترین تاثیر را داشتند (شکل ۲ و جدول ۱). نتایج تحقیقات فیدامن و روزال بیانگر این نکته است که وجود دی گلوکز در محیط آگار غذایی موجب افزایش فعالیتهای ضد قارچی ترکیبات فرّار *B. subtilis* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* می گردد. وی متابولیتهای فرّار متعددی مثل الکل ها، آلدئیدها، کتونها و استرها را از کشت جدایه *B. subtilis* در محیط NA بدست آورد (فیدامن و روزال، ۱۹۹۳). تمامی جدایه ها قادر به تولید ترکیبات خارج سلولی بودند و باعث کاهش رشد قارچ *V. dahliae* گردیدند. جدایه P_4 با ۹۶/۴ درصد کاهش رشد بیشترین و جدایه B_3 با ۶۰/۸۴ درصد کاهش رشد، کمترین تأثیر را داشتند (جدول ۱). تحقیقات کیل و همکاران نشان داد که باکتری های گروه سودوموناس فلورسنت علاوه بر سیدروفور، سیانید هیدروژن، پروتئاز و ترکیبات آنتی بیوتیک تولید می نمایند (کیل و همکاران، ۱۹۹۶). جدایه های P_1، P_2، P_3 و P_4 بر روی محیط KB حاوی غلظتهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن III و پتری بدون کلرید آهن III از رشد قارچ *V. dahliae* جلوگیری کردند اما در غلظت ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III مانع رشد قارچ نشدند که نشان دهنده تولید سیدروفور توسط این جدایه ها می باشد، این مواد، تحت شرایط کمبود آهن تولید شده و آهن موجود در خاک را از دسترس سایر میکروارگانیسم‌ها خارج نموده و باعث اختلال در واکنشهای حیاتی آنها می شود (ولر، ۱۹۸۸). غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام بنومیل، کاربندازیم، تیوفانات متیل و کاپتان از رشد باکتریهای آنتاگونیست جلوگیری نکرد. نتیجه آزمایش نشان می دهد که می توان ترکیبی از قارچکش و آنتاگونیست را برای کنترل بیماری استفاده نمود. بیکر طی بررسیهایی نشان داد که استفاده از قارچکش همراه با باکتری، عامل بیماریزا را تضعیف نموده و در نتیجه موجب آسیب پذیر شدن آن در برابر باکتری آنتاگونیست می گردد (بیکر، ۱۹۸۷).

تاثیر باکتری های آنتاگونیست در شرایط گلخانه ای

نتایج تحقیقات اخیر نشان می دهد که جدایه B_1 در تمامی شاخص های مورد مطالعه (کاهش شدت بیماری، افزایش ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه) در آزمون تیمار خاک و بذر بیشترین تاثیر را در حضور و عدم حضور قارچ عامل بیماری دارد. جدایه B_2 نیز موجب افزایش ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور و عدم حضور قارچ در تیمار بذر گردید (جدول ۲ و ۳). کیلین و همکاران طی بررسی هایی به این نتیجه رسیدند که جدایه *B. subtilis* F_2 B_{24} در تیمار خاک موجب افزایش ۵٪ وزن خشک ریشه و ۱۲٪ ارتفاع گیاه می گردد. مکانیسم های مختلفی برای *B. subtilis* ذکر نموده اند که شامل رقابت، کلونیزاسیون ریشه، تولید آنتی بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی در گیاه میزبان و تولید ترکیبات هورمونی مشابه سیتوکنین و اکسین می باشد که درنهایت موجب افزایش رشد گیاه می شوند (کیلین و همکاران، ۲۰۰۰).

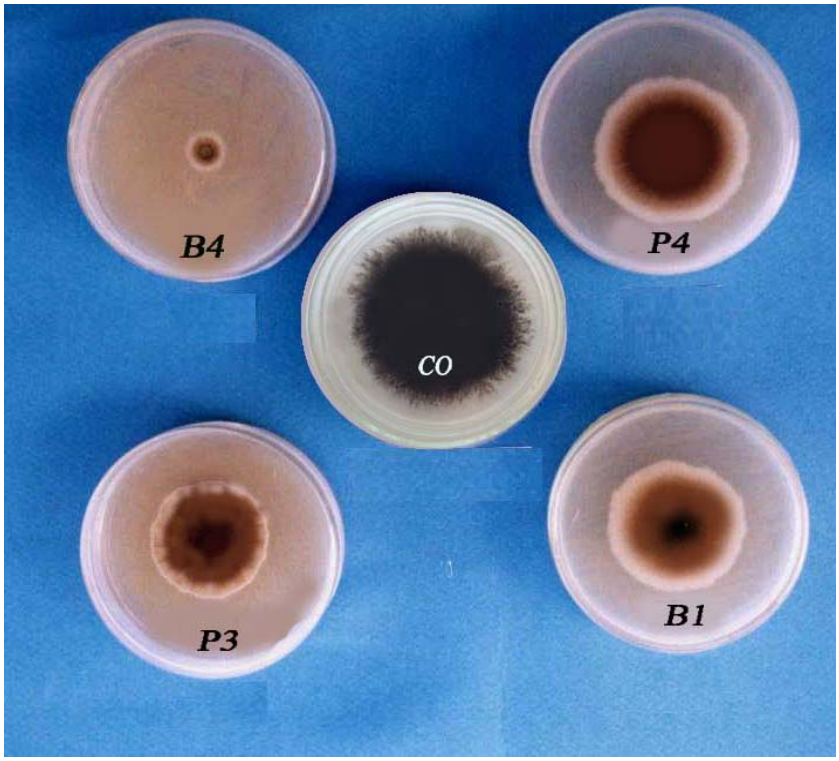
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: میانگین کاهش رشد پرگنه قارچ *V. dahliae* در تیمار با باکتری های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاهی (تولید مواد فرار، تولید آنتی بیوتیک و آزمون کشت متقابل)

باکتری‌های آنتاگونیست	درصد کاهش رشد پرگنه *V. dahliae*		
	آزمون تولید مواد فرار	آزمون تولیدآنتی بیوتیک	آزمون کشت متقابل
شاهد	d	e	e
P.fluorescens bv. ui P_1	۲۲/۲۴ cd	۹۵/۴۹ ab	۴۲/۱۷ a
P.fluorescens bv. V P_2	۷۴/۳۴ ab	۷۲/۶۴ cd	۴۰/۷۶ a
P.fluorescens bv. V P_3	۴۰/۶۰ bc	۷۶/۹۲ cd	۳۷/۸۶ ab
P.fluorescens bv. V P_4	۲۲/۲۴ cd	۹۶/۴۰ a	۴۹/۹۳ a
B.subtilis B_1	۲۷/۱۰ cd	۸۲/۲۱ c	۲۵/۷۳ bc
B.subtilis B_2	۲۳/۰۱ cd	۸۴/۲۹bc	۱۹/۸۵ cd
B.pumilus B_3	۶۹/۸۳ ab	۶۰/۸۴ d	۲۴/۰۲ bc
B.subtilis B_4	۸۴/۵۴ a	۷۲/۳۴ cd	۱۲/۵۰ d

- اعداد جدول میانگین سه تکرار است.
- اعدادی‌که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن در سطح یک درصد ($p<0.01$)با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند.
- اعداد جدول اعداد اصلی هستند اما برای تجزیه و تحلیل با فرمول $Y=\text{asin}\sqrt{x}$ داده ها تبدیل شده اند.



شکل ۲: تأثیر مواد فرّار جدایه های B_4، B_1، *B. subtilis*، P_4 و P_3، *P. fluorescens bv. V*، در کاهش رشد میسلیوم قارچ *V. dahliae*

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه B_3 در آزمون تیمار خاک، وزن خشک ریشه را در عدم حضور قارچ افزایش داد (جدول ۲). وارینا طی تحقیقاتی نشان داد که جدایه *B. pumilus LS213* از طریق مقاومت القائی باعث افزایش وزن خشک، تعداد و اندازه برگها در خربزه می گردد (وارینا، ۱۹۹۸). در آزمون تیمار خاک جدایه P_3 در حضور قارچ باعث افزایش ارتفاع بوته گردید ونیز جدایه P_1 موجب افزایش ارتفاع گیاه نسبت به شاهد سالم و نیز افزایش وزن خشک ریشه نسبت به شاهد آلوده گردید و بالاترین تأثیر را در میان هشت جدایه مورد مطالعه داشت همچنین در تیمار بذر، موجب افزایش وزن خشک ریشه نسبت به شاهد سالم گردید و نیز جدایه P_2 در تیمار بذر باعث افزایش ارتفاع گیاه نسبت به شاهد آلوده و سالم شد (جدول ۲و۳). لبن و همکاران نشان دادند که آغشته سازی قطعات سیب زمینی به باکتری *P. fluorescens* در خاک آلوده و غیر آلوده به *V. dahliae* موجب افزایش وزن ریشه، شاخ و برگ و ارتفاع گیاه می شود. در آزمون تیمار بذر تمام جدایه ها موجب کاهش شدت بیماری شدند اما تنها جدایه های B_1 و B_2 تفاوت معنی دار با شاهد آلوده نشان دادند (جدول ۳). همانطور که مشاهده شد بین نتایج بدست آمده از تست های آزمایشگاهی و گلخانه ای رابطه ای وجود ندارد، در تست های آزمایشگاهی باکتریهای گروه سودوموناس و در گلخانه گروه باسیلوس بیشترین تاثیر را در کنترل قارچ داشتند که این به دلیل وجود سیستم پیچیده بیولوژی و اکولوژی خاک و استقرار آنتاگونیست درمنطقه ریزوسفر و قدرت کلونیزاسیون ریشه و بقای عامل آنتاگونیست، pH خاک و بافت خاک می باشد (لبن و همکاران، ۱۹۸۷). برای تاثیر بهتر آنتاگونیست بایستی مواد آلی خاک را افزایش داد. همچنین کاربرد تلفیقی باکتریهای آنتاگونیست به همراه سموم قارچکش، موثر می باشد (ولر، ۱۹۸۸). اکثر جدایه های باسیلوس تولید اندوسپور کرده و شرایط نامساعد و خشک را تحمل می کنند لذا به راحتی می توان آنها را به صورت پودرهای قابل تعلیق در آب فرموله کرد، مواد همراه و محافظت کننده باید به نسبتی انتخاب شود که باکتری حداکثر رشد را داشته باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه میانگین اثر تیمار خاک با باکتریهای آنتاگونیست بر روی ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی خیار

باکتری‌های آنتاگونیست	شدت بیماری	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
Ch+Co	-	۱۴/۰۱ bc	۱/۹ cde	۰/۹ cdef
P_1Ch+	-	۱۷/۶۶ a	۲/۱۸ abcd	۰/۹۸ abcd
Ch+P_2	-	۱۵/۲۷ ab	۲/۴۹ abc	۰/۹۷ abcd
Ch+P_3	-	۱۵/۴۲ ab	۲/۲۱ abcd	۰/۹۴ abcdef
Ch+P_4	-	۱۴/۸۷ ab	۲/۰۱ abcde	۰/۹۵ abcdef
Ch+B_1	-	۱۷/۸۵ a	۲/۶۲ a	۱/۲ ab
Ch+B_2	-	۱۵/۰۲ ab	۲/۵۷ a	۰/۹۶ abcde
Ch+B_3	-	۱۷/۵۵ a	۲/۱۲ abcd	۱/۲۳ a
Ch+B_4	-	۱۴/۹۳ ab	۲/۵۲ ab	۱/۲ ab
V+Co	۳/۵۸ a	۹/۳۳ f	۰/۹۷ h	۰/۶۲ g
V+P_1	۳/۳۳ ab	۱۲/۶۱ bcdef	۱/۰۸ gh	۰/۸۹ cdef
V+P_2	۳/۲۵ ab	۱۰/۵۷ ef	۱/۷۷ def	۰/۶۸ fg
V+P_3	۳/۳۳ab	۱۲/۷۱ bcde	۰/۹۹ h	۰/۷ defg
V+P_4	۳/۳۳ ab	۱۱/۵۹ cdef	۱ gh	۰/۶۸ efg
V+B_1	۲/۱۶ b	۱۳/۶۷ bcd	۱/۸۳ cdef	۰/۸۸ def
V+B_2	۲/۶۶ ab	۱۱/۵۸ cdef	۱/۵۱ efg	۰/۷۲ defg
V+B_3	۳/۳۳ ab	۱۱ def	۱/۳۲ fgh	۰/۸ defg
V+B_4	۲/۵ ab	۱۰/۴۷ ef	۱/۴۷ efgh	۰/۸۴ defg

- اعداد جدول میانگین چهار تکرار است.
- اعدادی‌که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($p<0/01$) با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند.
- اعداد جدول اعداد اصلی هستند اما برای تجزیه و تحلیل با فرمول $Y=\sqrt{x}$ داده ها تبدیل شده اند.

Co: تیمار بدون باکتری

Ch: تیمار بدون قارچ

V: قارچ عامل بیماری

P_1: Pseudomonas fluorescens bv. ш
P_2, P_3, P_4: Pseudomonas fluorescens bv. V
B_1, B_2, B_4: Bacillus subtilis
B_3: Bacillus pumilus

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر تیمار بذر با باکتریهای آنتاگونیست بر روی ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و شدت بیماری *V. dahliae*

باکتریهای آنتاگونیست	شدت بیماری	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
Ch+Co	-	۱۵/۳ cd	۱/۹۶ bcd	۱/۰۸ bc
Ch+P1	-	۱۶/۰۴ abc	۲/۱۷ abc	۱/۵۴ a
Ch+P2	-	۱۷/۸۲ a	۲/۴۶ ab	۱/۲۲ ab
Ch+P3	-	۱۶/۱۵ abc	۲/۲۳ abc	۱/۱۵ ab
Ch+P4	-	۱۵/۵۹ bcd	۲/۳۸ ab	۱/۲۵ ab
Ch+B1	-	۱۷/۶۶ ab	۲/۶۴ a	۱/۵۷ a
Ch+B2	-	۱۷/۷۳ ab	۲/۶۷ a	۱/۵۵ a
Ch+B3	-	۱۶/۴۴ abc	۲/۵۴ ab	۱/۲۷ ab
Ch+B4	-	۱۵/۹۶ abc	۲/۶۵ a	۱/۲۷ ab
V+Co	۳/۵۷ a	۱۰/۴۶ g	۰/۹۸ f	۰/۶۱ f
V+P1	۳/۱۶ ab	۱۲/۷ efg	۱/۴۴ cdef	۰/۷۶ def
V+P2	۳/۱۴ ab	۱۳/۸۱ de	۱/۱۶ ef	۰/۶۹ ef
V+P3	۳/۱۶ ab	۱۱/۴۱ fg	۱/۰۸ f	۰/۷۱ ef
V+P4	۳/۰۸ ab	۱۱/۴۶ fg	۱/۷۵ bcdef	۰/۸۰ def
V+B1	۲/۲۵ b	۱۵/۰۳ cd	۱/۹ bcd	۰/۹۳ cde
V+B2	۲/۰۸ b	۱۴/۴۴ cde	۱/۹۵ bcd	۰/۹۷ bcd
V+B3	۳/۱۶ ab	۱۲/۹۵ defg	۱/۲۸ def	۰/۸۱ def
V+B4	۲/۵ ab	۱۱/۹۱ fg	۱/۹۱ abcd	۰/۹۵ bcd

- اعداد جدول میانگین چهار تکرار است.

- اعدادی‌که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P<0/01$) با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند.

- اعداد جدول اعداد اصلی هستند اما برای تجزیه و تحلیل با فرمول $Y=\sqrt{x}$ تبدیل داده شده اند.

Co: تیمار بدون باکتری

Ch: تیمار بدون قارچ

V: قارچ عامل بیماری

P_1: Pseudomonas fluorescens bv. ш
P_2, P_3, P_4: Pseudomonas fluorescens bv. V
B_1, B_2, B_4: Bacillus subtilis
B_3: Bacillus pumilus

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴: خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتریهای آنتاگونیست

جدایه های باکتری	B_1	B_2	B_3	B_4	P_1	P_2	P_3	P_4
واکنش گرم	+	+	+	+	−	−	−	−
موقعیت اندوسپور	مرکزی	مرکزی	مرکزی	مرکزی				
تولید رنگدانه فلورسنت	−	−	−	−	+	+	+	+
رشد بی هوازی	+	+	+	+	−	−	−	+
رشد در دمای ۴۱ $\mathring{C}$	*	*	*	*	+	-	+	+
رشد در دمای ۴۵ $\mathring{C}$	−	−	−	−	*	*	*	*
رشد در دمای ۴ $\mathring{C}$	−	−	−	−	−	−	−	−
تحمل به نمک طعام								
۲ درصد	+	+	+	+	+	+	+	+
۳ درصد	+	+	+	+	+	+	+	+
۴ درصد	+	+	+	+	+	+	+	+
۵ درصد	+	+	+	+	+	+	+	+
۶ درصد	+	+	+	+	+	+	+	+
۷ درصد	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در pHهای:								
۴/۵	+	+	+	+	+	+	+	+
۵	+	+	+	+	+	+	+	+
۶	+	+	+	+	+	+	+	+
۷/۵	+	+	+	+	+	+	+	+
۸/۵	+	+	+	+	+	+	+	+
۹	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوان	−	−	−	−	+	−	+	+
لهیدگی سیب زمینی	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	−	−	−	+
هیدرولیز کازئین	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+	+	+	+	+
آرژنین دهیدرولاز	−	−	−	−	−	−	−	−
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	−	−	−	−	−	−	−	−
استفاده از:								
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+
آدونیتول	-	-	-	-	+	+	+	+
ترها لوز	+	+	+	-	+	+	+	+
آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+	+
زایلوز	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	+	−	+	−	+	+	+	+
میواینوزیتول	+	+	+	+	+	−	+	+
سیترات سدیم	+	+	+	+	−	−	−	−
والریک اسید	−	−	+	−	+	+	+	+

+: نشان دهنده مثبت بودن واکنش و یا مصرف کربو هیدرات یا اسید آلی مربوطه

−: منفی بودن واکنش یا عدم مصرف

×: عدم انجام آزمون مورد نظر

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

جلالی، ص. و احمدی، ع. ر. ۱۳۸۱. جداسازی قارچ Verticillium dahliae از بوته‌های خیار در گلخانه‌های استان اصفهان. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی، دانشگاه رازی کرمانشاه، ۳۲۱ صفحه.

سرپله، ا. و شهریاری، د. ۱۳۸۱. جداسازی قارچ Verticillium dahliae از بوته‌های خیار در گلخانه‌های ورامین. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، ۳۲۱ صفحه.

یزدی صمدی، ب.، رضائی، غ. و ولی‌زاده، م. ۱۳۷۶. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران، ۷۴۶ صفحه.

Baker, K. F. 1987. Evoluing concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of phytopathology, 25: 67-85.

Berg, G. 1996. Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to Verticillium dahliae var. longisporum stark. Journal of Plant Disease and protection, 103: 20-30.

Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. and Smalla, K. 2002. Plant dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different Verticillium host plants. Applied and Enviromental Microbiology, 68(7): 3328-3338.

Defago, G. and Hass, D. 1990. Pseudomonas as an antagonist of soilborn plant pathogens: Mode of action and genetic analysis, Soil Biochemistry, 16: 397-403.

Fiddaman, P. J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by Bacillus subtilis. Journal of Applied Bacteriology, 74: 119-126.

Keel, C. D., Weller, M., Natsch, A., Defago, G., Cook, R. J. and Thomashow, L. S. 1996. Conservation of the 2, 4 diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescens pseudomonas strains from diverse geographic locations. Applied and Enviromental Microbiology, 62: 552-563.

Kilian, M. V., Steiner, B., Krebs, H., Junge, G., Schmiedeknecht, L. and Hain, R. 2000. F2B24 Bacillus subtilis mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzen schus Nachrichten Bayer, 1: 72-93.

Kraus, J. and Loper, J. E. 1990. Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by Pseudornonas fluorescens pf- 5: Mechanistic Studies. In: Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (Eds). Plant growth promoting rhizobacter. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria- Interlaken, Switzerland.

Leben, S. D., Wadi, J. A. and Easton, G. D. 1987. Effects of Pseudomonas fluorescens on potato plant growth and control of Verticillium dahliae. Phytopathology, 77: 1592-1595.

Little, T. M. and Hills, F. J. 1978. Agricultural experimentation design and analysis. John Willy & Sons, 350 pp.

Pullman, G. S. and Devay, J. E. 1982. Epidemiology of Verticillium wilt of cotton: Effects of Disease development on plant phenology and lint yield. Phytopathology, 72: 554-556.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic Bacteria. Third Eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul Minnesota, USA, 373 pp.

Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M. 1992. Methods for research on soilborne phytopathologenic fungi. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA, 264 pp.

Varina, C. S. 1998. The effect of LS 203 (Bacillus pumillus) as an amendment for biological plant resistance activation in cantaloupe and watermelon transplant plugs and subsequent field performance. SWFREC station Report, VEG 98.7.

Wadi, J. A. and Easton, G. D. 1985. Control of Verticillium dahliae by coating potato seed pieces with antagonistic bacteria, pp. 134-136. In: Parker, C. A., Rovira, A. D., Moore, K.

www.SID.ir

Archive of SID

J. and Wong, P. T. W. (Eds). Ecology and Management of soil borne plant pathogens. American phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 358 pp.

Weller, D. M. 1988. Biological control of soil-born plant pathogenes in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of phytopathology, 26: 379-407.

Weller, D. M. and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent Pseudomonas. Phytopathology, 73: 463-469.

www.SID.ir

Archive of SID

Biological control of cucumber wilt disease caused by *Verticillium dahliae* by using isolates of Bacillus and Pseudomonas

Ahmadifar[1], F., Rustae[2], A., Shahriari[3], D. and Khodakaramian[4], Gh.

Abstract

Effect of 290 isolates of bacteria from cucumber rhizosphere were studied as potential biocontrol agents for control of cucumber wilt disease caused by *Verticillium dahliae.* 37% of bacterial isolates inhibited growth of V. *dahliae.* Inhibition ability on fungal growth was varied among bacterial isolates, ranged from 12.5-49.93% in dual culture test, from 22.24-84.54% in volatile test and 60.84-96.40% in antibiotic tests. Effective bacterial isolates were identified as *Bacillus subtilis* (B_1, B_2, B_4), B. pumilus (B3), Pseudomonas fluorescens bv. III (P1) and *P. fluorescens* bv V (P_2, P3, P4), according to biochemical, morphological, nutritional and physiological testes. spore germination of V. dahliae *was decreased by* P. fluorescens *bv III* (P1) *and* P. fluorescens *bv V* (P2, P3, P4) *according to siderophore production test. In fungicide testes on bacterial isolates Benomyl, carbendazim, thiofanate metyl and captan no observed any inhibition on growth of bacterial isolates. B. subtilis* (B1) was decreased disease severity, increased plant height, shoot and root dry weight in the infected and non infected to *V. dahliae* in the greenhouse conditions. In seed coating and soil drenching methods similar result had been obtained using *B. subtilis* (B2).

Keywords: Biological control, *Verticillium wilt*, Cucumber, *Bacillus*, *Pseudomonas*

1. M.Sc. Student, Faculty of Aburaihan-Pardiss, Tehran University
2. and 4. Assistant Professor, Depatment of Plant Protection, Faculty of Aburaihan-Pardiss, Tehran University
3. Accademic Staff, Plant Pest and Disease Research Institute,Varamin

www.SID.ir