جداسازی، تشخیص و مطالعه اثر آنتاگونیستی برخی از جدایه‌های fluorescent pseudomonads بر روی بعضی از عوامل قارچی مرگ گیاهچه در خوزستان

محمد رضا اصلاحی [۱]، رضا فرخی نژاد [۲] و مسعود شمس بخش [۲]

در این تحقیق با استفاده از محیط اختصاصی King-B از خاکهای زراعی مناطق مختلف خوزستان شامل شهرهای دزفول ،شوشتر،شوش ،ملاثانی ،حمیدیه و سوسنگرد تعداد یکصد و بیست جدایه از پسودوموناسهای فلورسنت جداگردید که سه عدد از آنها در بررسی‌های آزمایشگاهی خواص آنتاگونیستی خوبی علیه قارچهای *Pythium ultimum*، *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Sclerotinia sclerotiorum* نشان دادند. این سه جدایه با استفاده از روشهای متداول در باکتریولوژی شناسایی شده و بااندکی اختلاف به گونه *Pseudomonas fluorescens* تعلق داشتند. هر سه استرین تأثیر معنی داری روی کاهش درصد مرگ و میر گیاهچه‌ها در مقایسه با شاهد از خود نشان دادند اما اثر استرین ۲۴ نسبت به استرین های ۳۰ و ۴۲ چشمگیرتربود. هر سه استرین روی محیط کشت PDA (حاوی ۵٪ گلوکز) تولید نوعی متابولیت نمودند که توانست در غیاب باکتری‌ها از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت کند. اگرچه ماهیت این متابولیت روشن نشد اما به نظر می‌رسد که نوعی آنتی‌بیوتیک باشد. هیچکدام از استرین ها روی محیط کشت PDA (حاوی ۵٪ گلوکز) که حاوی غلظتهای مختلف از کلرید آهن بود تولید سیدروفور نکردند. در یک آزمایش مقدماتی که در شرایط مزرعه انجام گرفت هر سه استرین تأثیر معنی داری روی رشد بوته‌ها و میزان محصول غده‌های سیب‌زمینی در مقایسه با گیاهان شاهد از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی : *Pseudomonas fluorescens*، مرگ گیاهچه، کنترل بیولوژیک، آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، آنتاگونیست، PGPR.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- اعضای هیات علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

دریافت : ۷۸/۱۲/۲۲ پذیرش : ۷۹/۱۲/۱۵

مقدمه

مبارزه بیولوژیک با عوامل بیماریزای گیاهان و بویژه پاتوژنهای خاکزاد از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. تاکنون باکتریهای متعددی از جنسهای مختلف بعنوان عوامل کنترل بیولوژیک معرفی گشته‌اند که بعضی از آنها نیز بعنوان عوامل تحریک کننده رشد گیاه بکار گرفته شده‌اند. در بین چنین عواملی پسودوموناسهای فلورسنت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (۲۰). استفاده از برخی گونه‌های فلورسنت پسودوموناس به طریق آغشته کردن بذور به این باکتریها و اضافه نمودن باکتریها به خاک برای کنترل بیماریهای پاخوره گندم (۲۱)، پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود فرنگی (۱۵)، مرگ گیاهچه پنبه (۲۲)، بوته میری خیار (۱۰)، پوسیدگی سیاه ریشه توتون (۲۰)، مرگ گیاهچه و پوسیدگی بذر گندم (۱۳) و عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی (۱)، نتایج مطلوب و موفقیت آمیزی در بر داشته است. در این ارتباط تحقیقات بعمل آمده توسط مرکز تحقیقات و بیوتکنولوژی برلین نشان داد که جدایه *Pseudomonas fluorescens* H237 می تواند جمعیت قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi* را کاهش دهد(۱۶).همچنین لیمن و همکاران (۱۱) با سواسازی جدایه *P. fluorescent* WCS 374 از خاک مزارع تربچه نشان دادند که این جدایه توانایی کاهش بیماری پوسیدگی ریشه و پژمردگی گیاه تربچه ناشی از *F. oxysporum* f.sp *conglutinans* را دارد.در همین راستا لیمن و همکاران (۱۱) نشان دادند که جدایه *P. fluorescens* RRLJ 181 از رشد *Fusarium solani*، *F. semitectum*، *F. moniliforme*، *F. oxysporum* f.sp *ciceris* و *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* جلوگیری می‌کند.احمد زاده و همکاران (۱) با کاربرد یک جدایه از باکتریهای پسودوموناس فلورسنت توانستند بیماری مرگ گیاهچه نخود ایرانی ناشی از قارچ *Pythium ultimum* را کاهش دهند. همچنین ذاکی و همکاران (۲۲) یک جدایه از *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* را از خاکهای مزارع پنبه در آریزونا جدا کردند و نقش آن را بعنوان عامل کنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه پنبه به اثبات رساندند. به همین ترتیب فرخی نژاد و همکاران (۳)توانستند بیماری پژمردگی فوزاریومی

نخود فرنگی را با استفاده از یک استرین از گونه *P. putida* بنام N1R بطور مطلوبی کنترل نمایند.

تحقیقاتی که در جهت تعیین مکانیسم عمل پسودوموناسهای فلورسنت در کنترل بیماریهای خاکزاد مانند مرگ گیاهچه انجام گرفته نشان می‌دهد که رقابت برای جذب مواد غذایی و محصور نمودن جایگاه میکروبی، تولید آنتی‌بیوتیک و مواد ضد قارچی، تولید سیدروفور و القاء مقاومت در گیاه ،نقش عمده‌ای در کنترل بیماریهای خاکزاد ایفا می‌کند (۲۰). بیشتر تلاشهایی که تاکنون در جهت اطلاع از مکانیسم کنترل بیماریهای ریشه، توسط باکتریهای فوق صورت گرفته است اساساً بر روی سیدروفورها و آنتی‌بیوتیکها متمرکز بوده است (۱۴). کلوپر و همکاران در سال ۱۹۸۰ گزارش نمودند که جدایه B۱۰ از باکتری *P. fluorescens* و یا سیدروفور آن از پیشروی بیماری پژمردگی جو ممانعت بعمل می‌آورد (۹). هاول و استیپانوویک (۷) برای اولین بار موفق شدند نقش آنتی بیوتیک پیولوتئورین را در بازدارندگی از رشد قارچهای *Pythium ultimum* و *R. solani* به اثبات برسانند.

یکی دیگر از موارد استفاده این باکتریها، کاربرد آنها بعنوان عوامل سرعت بخشیدن به رشد و بهبود باروری محصولات کشاورزی (Plant Growth Promoting (PGPR Rhizobacteria می‌باشد. استفاده از این پدیده به روش باکتریزاسیون بذر در جهت افزایش باردهی محصولات کشاورزی در سطح تجاری ابتدا توسط دانشمندان شوروی در اواخر دهه ۱۹۵۰ میلادی صورت پذیرفت (۱). در دهه ۱۹۷۰ میلادی این پدیده با کشف یک گروه از باکتریهای پسودوموناس فلورسنت در علم کنترل بیولوژیک اعتبار و مقام خود را بازیافت و در پی انجام یک سری آزمایش مزرعه‌ای در برخی از کشورها، این فرضیه بصورت یک سیستم نسبتاً جدید و بعنوان یک گام نوظهور در راه کنترل بیماریهای ریشه و افزایش رشد و باردهی گیاهان مطرح گردید (۱۲).

در این تحقیق خاک مزارع مختلف شهرهای استان خوزستان از نظر وجود باکتریهای پسودوموناس فلورسنت آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت ، پس از جداسازی باکتریها، اثر جدایه‌ها بر روی قارچهای *Sclerotinia sclerotiorum* عامل مرگ گیاهچه بادمجان، *R.*

solani عامل مرگ گیاهچه لوبیا، *F. oxysporum* عامل مرگ گیاهچه هندوانه و *Pythium ultimum* و نیز خاصیت تحریک کنندگی آنها روی رشد و میزان محصول بوته‌های سیب زمینی آزمایش شد. همچنین مکانیسم عمل استرین های مورد استفاده مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

۱- جداسازی باکتریهای *P. fluorescent* از خاک

برای جداسازی باکتریها از محیط اختصاصی King-B استفاده شد، اختصاصی بودن این محیط به دلیل وجود آمپی سیلین، کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید در محیط مزبور می‌باشد. اجزای این محیط در یک لیتر عبارتنداز:

پپتون ۲۰ گرم ،($MgSO_4.7H_2O$ ۱/۵ گرم)،آگار ۱۵ گرم ،گلیسرول ۱۵ گرم ،آمپی‌سیلین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ،کلرامفنیکل ۱۳میکروگرم در میلی‌لیتر ، سیکلوهگزامید ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و آب مقطر ۱لیتر (۱۱).

نمونه‌های خاک از مناطق مختلف خوزستان شامل شهرهای دزفول ،شوشتر،شوش ،ملاثانی ،حمیدیه و سوسنگرد جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد . از هر نمونه ۲ گرم خاک در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و بااستفاده از روش ترقیق مکرر سوسپانسیون خاک تا 10^{-5} برابر رقیق گردید. از هر رقت یک دهم میلی‌لیتر به تشتکهای حاوی محیط کشت فوق منتقل و پخش گردید. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتیگراد، ظروف کشت جهت ظهور کلنی‌های باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. باکتریهای جدا شده برای مطالعات بعدی به لوله‌های آزمایش حاوی آگار غذایی (NA) منتقل گردیدند. بررسی‌های مقدماتی در آزمایشگاه که با باکتریهای بدست آمده انجام شد نشان داد که تنها سه جدایه از باکتریهای فوق دارای اثرات آنتاگونیستی روی عوامل مرگ گیاهچه بودند، بنابراین بقیه آزمایشات با این سه جدایه انجام شد.

۲- شناسایی باکتریها

با توجه به‌خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی وتغذیه‌ای وبااستفاده از روش شاد (۱۸)، باکتریها مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول شماره ۱).

جدول ۱ خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها.

آزمایش	استرین ۲۴	۳۰	۴۲
واکنش گرم	-	-	-
تولید رنگدانه فلورسنت	+	+	+
تاژک	۳-۱ قطبی	۳-۱ قطبی	۳-۱ قطبی
کاتالاز	+	+	+
تجزیه هوازی اکسیژن	+	+	+
تجزیه بی هوازی اکسیژن	-	-	-
اکسیداز	+	+	+
فوق حساسیت	-	-	-
لهانیدن سیب‌زمینی	-	-	-
هیدرولیز نشاسته	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
لوان	+	+	+
آرجی نین	+	+	+
احیاء نیترات	+	+	+
رشد در ۴۱°C	-	-	-
رشد در ۴°C	+	+	+
استفاده از قندهای‌مانیتول	+	+	+
سوربیتول	+	-	+
ترهالوز	+	+	-
ساکارز	+	+	+
آرابینوز	-	-	-
زایلوز	-	-	-
گلوکز	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+
لاکتوز	-	-	-
سیترات	-	-	-
مانوز	+	+	+
آدنیتول	-	-	-
رافینوز	+	+	+
سالی سین	+	+	+
دکستروز	+	+	+

۳- بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتریها بر پاتوژنهای عامل مرگ گیاهچه در شرایط آزمایشگاه

اثر باکتریها روی رشد پاتوژنهای عامل مرگ گیاهچه در شرایط آزمایشگاه با استفاده از روش کشت متقابل انجام شد. برای این منظور، دیسکهایی به قطر ۹ میلیمتر از محیط کشتهای ۴۸ ساعته قارچهای (*S. sclerotiorum*، *F. oxysporum*، *R. solani*، *P. ultimum*) جدا و در یک طرف تشتکهای پتری حاوی PDA (Potato- Dextrose- Agar) قرار داده شد. ظروف کشت پس از آماده شدن در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت دو روز سوسپانسیون غلیظی از کشت تازه باکتری با استفاده از محلول بافر ۰/۱ مولار $MgSO_4$ ، $7H_2O$ تهیه گردید. غلظت باکتری در سوسپانسیون توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. برای آزمایش، غلظت مناسبی از باکتری (10^{9}-10^{7} سلول در میلی‌لیتر) با رقیق نمودن سوسپانسیون غلیظ در محلول بافر فوق، تهیه گردید. یک دهم میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به طریق نقطه‌گذاری در طرف مخالف دیسکهای قارچ در تشتکهای پتری حاوی PDA قرار داده شد. ظروف کشت در دمای $28^{\circ}c$ نگهداری و پس از گذشت ۳ الی ۴ روز خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

۴- تأثیر باکتریهای آنتاگونیست بر بیمارگرها در شرایط گلخانه

به منظور آماده‌سازی مایه بیمارگرها و آلوده ساختن خاک، بذور جو در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بمدت ۳ ساعت خیسانده شد. سپس بذور فوق درون فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری قرار گرفته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع بمدت یک ساعت اتوکلاو گردیدند. پس از آن هر فلاسک به طور جداگانه با یکی از قارچهای عامل مرگ گیاهچه مایه زنی شد. آنگاه فلاسکها برای مدت ۳ هفته در دمای اتاق نگهداری شدند. مایه آماده شده برای مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد در آزمایشگاه خشک شده و در پاکتهای کاغذی در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای آلوده کردن خاک مایه بیمارگرها به نسبت ۱٪ وزنی به خاک سترون اضافه و خوب مخلوط شد. جدایه‌های باکتری ها روی محیط

کشت King-B مایع کشت داده شدند. فلاسکهای حاوی محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه شیکر گردان با دور ۱۵۰rpm قرار گرفتند. سلولهای باکتری توسط دستگاه سانتریفیوژ با شتاب گردش ۱۵۰۰rpm و به مدت ۱۵ دقیقه از محیط کشت مایع جدا گردید . سلولهای باکتری ، رسوب کرده و محیط کشت در بالا قرار گرفت ،محیط کشت را تخلیه نموده و سپس غلظت مناسبی از باکتری ($۱۰^{۹}$-$۱۰^{۷}$ یاخته در میلی‌لیتر) با رقیق نمودن سلولهای باکتری توسط محلول بافر ۰/۱ مولار $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، تهیه گردید. بذور هندوانه، بادمجان و لوبیا پس از ضدعفونی در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد بلافاصله ۳ تا ۵ مرتبه در ظروف حاوی آب سترون شسته شدند. پس از آن بذور مزبور در پارچه ململ نمدار نگهداری شده تا تحریک به جوانه زنی شوند. بذرهای جوانه زده بمدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. برای هر نوع گیاه دو تیمار شاهد شامل : ۱- بذرهای خیسانده شده بدون قارچ و باکتری ۲- بذرهای خیسانده شده بهمراه قارچ عامل بیماری و سه تیمار باکتریایی (بذرهای تیمار شده با جدایه‌های باکتری بهمراه قارچ عامل بیماری) و برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. سپس ۵ بذر هندوانه، ۵ بذر لوبیا و ۱۰ بذر بادمجان بطور جداگانه در هر گلدان کاشته شد. آزمایشات براساس طرح کاملاً تصادفی در گلخانه ودر شرایط طبیعی انجام گرفت.

۵- بررسی تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور بعنوان مکانیسم عمل باکتریها

برای اثبات تولید آنتی‌بیوتیک روی محیط کشت PDA از روش کرائوس و لوپر (۱۰) استفاده شد. در این روش از کشت ۴ روزه باکتری روی محیط کشت مزبور استفاده بعمل آمد. برای آزمایش، پرگنه‌های باکتری از سطح تشتک پتری جمع‌آوری و برای اطمینان از عدم رشد بقایای پرگنه باکتریها، از پنبه آغشته به فرمالین ۴۰٪ استفاده گردید. برای این کار پنبه آغشته به فرمالین را درون تشتک پتری قرار داده و بمدت نیم ساعت به حالت وارونه در محیط آزمایشگاه تحت شرایط سترون نگهداشته شد. سپس پنبه را خارج کرده و بعد از گذشت چند دقیقه دیسکهایی از قارچ روی محیط کشت قرار گرفت . عدم رشد قارچ روی این محیط و مقایسه آن با شاهد که باکتری در آن کشت نشده بود نشانه وجود آنتی‌بیوتیک درون محیط غذایی تلقی شد. در

تشتکهای پتری شاهد نیز از پنبه آغشته به فرمالین بهمان صورت فوق استفاده گردید.

به منظور بررسی تولید سیدروفور از روش ولر و کوک (۲۱) با اندکی تغییر استفاده شد. به این ترتیب که از محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) حاوی ۵٪ گلوکز بجای محیط King-B استفاده گردید. به این محیط مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن ($FeCl_3$) اضافه شد. دیسکهایی از قارچ در یک طرف تشتکهای پتری حاوی محیط کشت PDA و $FeCl_3$قرار داده شد. باکتریهای مورد نظر بصورت خطی روی محیط کشت طوری مایه زنی گردیدند که در امتداد قطر ظروف کشت، نواری به پهنای ۱/۵-۱ سانتی‌متر تشکیل شد. ظروف کشت در دمای $28^{\circ}c$ نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ الی ۳ روز عدم رشد قارچ روی محیط مذکور و مقایسه آن با شاهد که فاقد کلرید آهن بود نشانه عدم فعالیت سیدروفور تلقی شد.

٦- تأثیر باکتریها روی تحریک رشد و محصول دهی سیب زمینی

برای نشان دادن اثر باکتریها روی رشد و عملکرد گیاه یک آزمایش مقدماتی با استفاده از روش وئی و همکاران (۱۹) در مزرعه انجام شد. بدین منظور، باکتریها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتیگراد در مخلوط عصاره گوشت و پپتون (Nutrient broth) بر روی شیکرگردان با دور ۱۵۰rpm کشت داده شدند. به کمک سانتریفیوژ با شتاب گردش ۱۵۰۰rpm به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه، یاخته‌های باکتری از محیط کشت مایع جدا گردید. سپس غلظت مناسبی از باکتری (10^{9}-10^{7} یاخته در میلی‌لیتر) با رقیق نمودن سوسپانسیون باکتری توسط محلول بافر ۰/۱ مولار $MgSO_4$ ، $7H_2O$ تهیه شد. غده‌های سیب‌زمینی رقم آئولا به مدت ۲ ساعت با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد سترون شده و بعد از آن با آب مقطر سترون شستشو گردیدند. سپس غده‌ها در سوسپانسیون باکتری که از قبل آماده شده بود به مدت یک ساعت قرار گرفتند. غده‌های تیمار شده، بدون اینکه قطعه قطعه شوند در قطعه زمینی در مزرعه گروه باغبانی دانشکده کشاورزی اهواز روی خطوطی بطول ۳۰۰ سانتی متر کشت گردیدند. فاصله خطوط ۴۰ سانتی متر و فاصله بین غده ها در روی خطوط ۴۰ سانتی متر بود . تمام

بوته‌های موجود جهت تعیین اثر باکتریها در رشد و عملکرد گیاه سیب‌زمینی در طول فصل کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند. در انتهای فصل رشد، غده‌های سیب‌زمینی مربوط به هر ردیف جمع آوری شده و میانگین وزنی غده‌ها در هر ردیف با یکدیگر و با شاهد مقایسه شد.

نتایج

۱- جداسازی و بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتریها در شرایط آزمایشگاه

از میان ۱۲۰ جدایه باکتریایی جمع آوری شده از خاک مناطق مختلف خوزستان که در محیط کشت King-B تولید رنگ فلورسنت کردند، فقط سه استرین اثر آنتاگونیستی بر علیه عوامل بیماریزای مولد مرگ گیاهچه در روی محیط کشت نشان دادند.

۲- شناسایی جدایه‌های باکتری

خصوصیات بیوشیمیایی ، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی این ۳ استرین در جدول شماره ۱ ارائه شده است. براساس نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک،این سه استرین با اندکی اختلاف به گونه *P.fluorescens* تعلق دارند(۱۶و۶).

۳- بررسی مکانیسم عمل باکتریها

هر سه استرین در محیط کشت PDA تولید نوعی متابولیت نمودند که توانست در غیاب باکتری از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت کند. اگرچه ماهیت این متابولیت روشن نشد.ولی به نظر می‌رسد که این متابولیت نوعی آنتی‌بیوتیک باشد. خاصیت بازدارندگی استرین ها در برابر بیمارگرها روی محیط کشت PDA با اضافه نمودن کلرید آهن کاهش پیدا نکرد بنابراین به نظر می‌رسد که سیدروفور تولید شده در بازدارندگی از بیماری نقشی نداشته باشد.

۴- اثر آنتاگونیستی باکتریهابر کاهش درصد مرگ و میر گیاهچه‌ها در گلخانه

نتایج بدست آمده از آزمایش تأثیر مایه زنی بذور بادمجان توسط باکتریهای آنتاگونیست روی وقوع مرگ گیاهچه بادمجان تحت شرایط گلخانه نشان داد که هر سه استرین از توسعه بیماری جلوگیری کرده و استرین شماره ۲۴ بهترین اثر آنتاگونیستی را در برابر بیماری نشان داد (جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۱). مقایسه میانگین هاکه با استفاده از روش دانکن صورت گرفت نشان داد که میانگین‌ها در سطح ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌دار دارند(جدول شماره ۳).

جدول ۲ تأثیر باکتریهای آنتاگونیست در کنترل بیماری مرگ گیاهچه بادمجان در گلدان

	تیمار با استرین های باکتری*			تیمار شاهد**	
	۲۴	۳۰	۴۲	CK_1	CK_2
تعداد گیاهچه‌های سالم (میانگین)	۸/۵	۷/۲۵	۷/۵	۱۰	۳
درصدگیاهچه‌های سالم	۸۵	۷۲/۵	۷۵	۱۰۰	۳۰

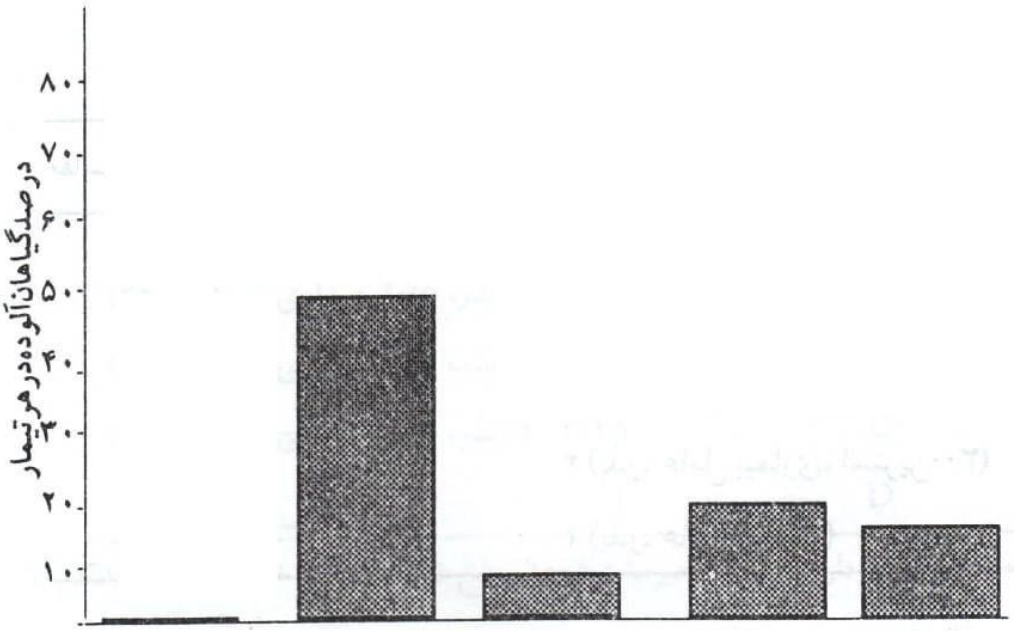
* هر تیمار شامل ۴ تکرار بود و هر تکرار با ۱۰ بذر انجام گرفت.

** خاک سترون شده عاری از بیمارگر CK_1. دارای بیمارگر CK_2

جدول ۳ مقایسه میانگین‌های تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن

تیمار	تعداد گیاهچه‌های سالم میانگین	مقایسه‌میانگین‌درسطح احتمالی ۵٪	
۱ = بذر	۱۰	A	*
۳ = بذر، عامل بیماری، استرین ۲۴	۸/۵	B	
۵ = بذر، عامل بیماری، استرین ۴۲	۷/۵	BC	
۴ = بذر، عامل بیماری، استرین ۳۰	۷/۲۵	C	
۲ = بذر، عامل بیماری	۳	D	

* = میانگینهای دارای حروف غیرمشترک در سطح ۵٪ احتمالی خطا به روش دانکن با هم اختلاف معنی‌دار دارند.



نمودار ۱- تأثیر مایه‌زنی بذور بادمجان توسط باکتری‌های آنتاگونیست بر روی بیماری مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *S. sclerotiorum* (نمودار درصد گیاهان بیمار را در هر تیمار نشان می‌دهد).

با توجه به نتایج حاصله از آزمایش تأثیر مایه زنی بذور لوبیا توسط باکتریهای آنتاگونیست بر روی وقوع مرگ گیاهچه تحت شرایط گلخانه، استرین های شماره ۲۴، ۳۰، ۴۲ به ترتیب به میزان ۸۶ درصد، ۷۸/۶ درصد، ۸۵/۸ درصد نسبت به شاهد قارچ، مرگ و میر گیاهچه‌های لوبیا را کاهش دادند (نمودار ۲). مقایسه میانگین هاکه با استفاده از روش دانکن صورت گرفت نشان داد که میانگین‌ها در سطح ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌دار دارند(جدول شماره ۴).نتایج تأثیر باکتریهای آنتاگونیست در کاهش مرگ و میر گیاهچه‌های هندوانه کشت شده در گلدان در جدول شماره ۵ و نمودار ۳ ارائه شده است. با توجه به جدول شماره ۶ میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در سطح ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌دار دارند.مقایسه میانگین ها با استفاده از روش آماری دانکن صورت گرفت .

جدول ۴ مقایسه میانگینهای تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن

تیمار	تعداد گیاهچه‌های سالم میانگین	٪۵ احتمالی در سطح میانگین‌ها مقایسه
۱ (بذر)	۵	A *
۳ (بذر، عامل بیماری، استرین ۲۴)	۴/۵	B
۵ (بذر، عامل بیماری، استرین ۴۲)	۴/۱	C
۴ (بذر، عامل بیماری، استرین ۳۰)	۴	C
۲ (بذر، عامل بیماری)	۱/۵	D

*=میانگینهای دارای حروف غیر مشترک در سطح ٪۵ احتمالی خطا به روش دانکن باهم اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول ۵ تأثیر باکتریهای آنتاگونیست در کنترل بیماری مرگ گیاهچه نشای هندوانه کشت شده در گلدان

	تیمار با استرین های باکتری *			تیمار شاهد **	
	۲۴	۳۰	۴۲	CK_1	CK_2
تعدادگیاهچه‌های سالم (میانگین)	۴/۵	۳/۲۵	۴	۵	۱
درصدگیاهچه‌های سالم	۹۰	۶۵	۸۰	۱۰۰	۲۰

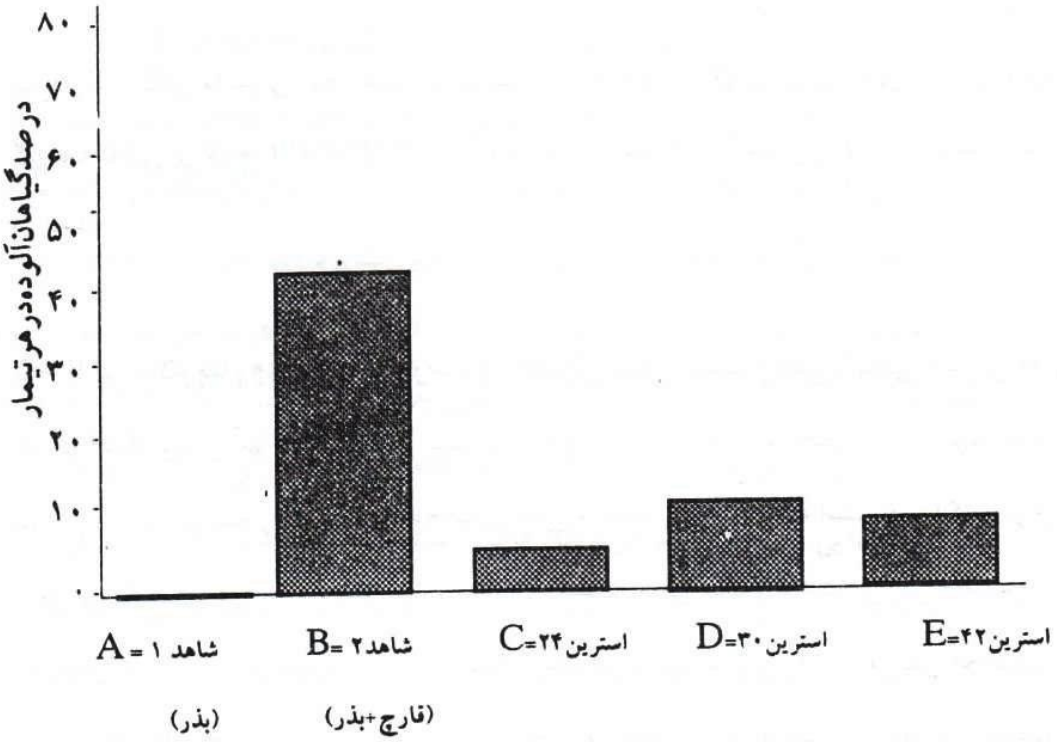
* هر تیمار شامل ۴ تکرار بود و هر تکرار با ۵ بذر انجام گرفت.

** خاک سترون شده عاری از پاتوژن CK_1، دارای پاتوژن CK_2

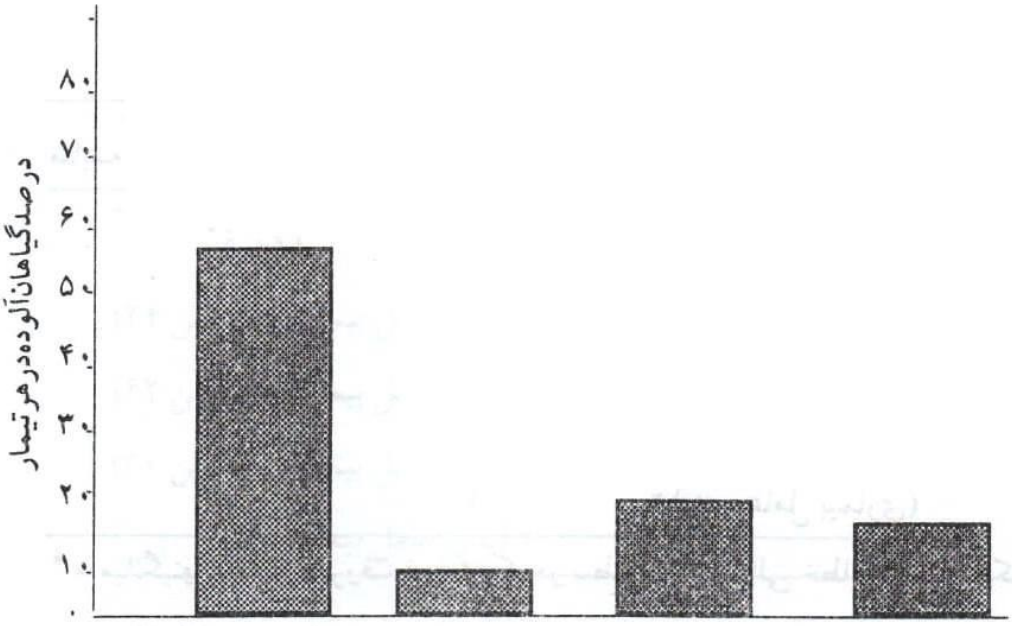
جدول ۶ مقایسه میانگین تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون دانکن

تیمار	میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم	مقایسه میانگین درسطح احتمالی ۵٪
۱ (بذر)	۵	A *
۳ (بذر، عامل بیماری، استرین ۲۴)	۴/۵	B
۵ (بذر، عامل بیماری، استرین ۴۲)	۴	B
۴ (بذر، عامل بیماری، استرین ۳۰)	۳/۲۵	C
۲ (بذر، عامل بیماری)	۱	D

* = میانگینهای دارای حروف غیرمشترک در سطح ۵٪ احتمالی خطا به روش دانکن با هم اختلاف معنی‌دار دارند.



نمودار ۲- تأثیر مایه‌زنی بذور لوبیا توسط باکتری‌های آنتاگونیست بر روی بیماری مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *R. solani* (نمودار درصد گیاهان بیمار را در هر تیمار نشان می‌دهد).



نمودار ۳- تأثیر مایه‌زنی بذور هندوانه توسط باکتری‌های آنتاگونیست بر روی بیماری مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *F. oxysporum* (نمودار درصد گیاهان بیمار را در هر تیمار نشان می‌دهد).

۵- تأثیر باکتریها روی تحریک رشد و محصول دهی سیب زمینی: تمامی استرین هایی که اثر آنتاگونیستی آنها روی عوامل بیماریزای مولد مرگ گیاهچه مشخص شده بود بعنوان عوامل افزایش دهنده رشد و بهبود محصول دهی استفاده شدند. هر سه استرین مذکور در این آزمایش مقدماتی موجب افزایش رشد بوته‌های سیب‌زمینی شده و باعث افزایش محصول در ردیفهای تیمار شده در مقایسه با شاهد تیمار نشده گردیدند. استرین ۲۴ با افزایش محصول به میزان ۳۶/۲۰ درصد نسبت به شاهد بهترین تحریک کننده رشد و افزایش دهنده محصول شناخته شد (جدول ۷).

جدول ۷ افزایش رشد ومحصول دهی بوته‌های سیب زمینی در اثر آغشتن غده‌ها با باکتری

تیمارها	میانگین ارتفاع بوته‌ها (cm)	میانگین محصول (kg/k)	درصدافزایش محصول نسبت به
استرین ۲۴	۷۰/۵۰	۳/۹۵۰	۳۶/۲۰
استرین ۳۰	۶۷/۶۰	۳/۳۵۰	۱۵/۵
استرین ۴۲	۶۹/۸۰	۳/۳۸۰	۱۶/۹
شاهد	۶۰/۴۵	۲/۹۰۰	

بحث

این مطالعه اهمیت استرین های منتخب *P. fluorescent* را در کنترل بیماریهای ناشی از عوامل بیماری مرگ گیاهچه نشان داد.

در این پژوهش، سه استرین مختلف باکتریایی ازگونه *P. fluorescens* مورد استفاده قرارگرفت که هر سه آنهااز شدت ظهور بیماری مرگ گیاهچه بادمجان، لوبیا، هندوانه در شرایط گلخانه‌ای کاستند(نمودار ۱و۲و۳). هر سه استرین در شرایط آزمایشگاه در برابر عوامل ایجاد کننده مرگ گیاهچه واکنش آنتی‌بیوزی خوبی نشان دادند.یکی از روشهای تشخیص اثر آنتاگونیستی میکروارگانیسمهای جمع آوری شده از طبیعت روی عوامل بیماریزا کاربرد آنها در محیط کشت در آزمایشگاه، می‌باشد ولی ظهور چنین تأثیری در آزمایشگاه، نشان دهنده موفق بودن استرین ها در کنترل بیماری در شرایط گلخانه و مزرعه نبوده (۱۳) که دلیل این امر شرایط غذایی و بعضی دیگر از فاکتورهایی است که روی رشد و بقاء عوامل بیوکنترل در طبیعت اثر دارند و بطور قابل توجهی با شرایط محیط کشت متفاوت می‌باشند (۹). بنابراین برای تعیین خاصیت آنتاگونیستی یک میکروارگانیسم نه تنها آزمایشات تحت شرایط آزمایشگاه باید انجام شود بلکه آزمایشات مربوطه در سطح مزرعه و با در نظر گرفتن شرایط محیطی نیز بایستی انجام پذیرد تا بتوان مؤثرترین عامل بیوکنترل را شناسایی کرد.

در شرایط گلخانه، اثر آنتاگونیستی استرین های مذکور بر روی *F. oxysporum* عامل مرگ گیاهچه هندوانه، *R. solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا و *S. sclerotiorum* عامل مرگ

گیاهچه بادمجان، با روش آغشته کردن بذور به سوسپانسیون باکتری با غلظت (10^{9}-10^{7} سلول در میلی‌لیتر) بطور جداگانه و با استفاده از طرح آماری کاملاً تصادفی مورد آزمایش قرار گرفت. در این بررسی استرین های شماره ۲۴، ۳۰، ۴۲ توانستند بیماری مرگ گیاهچه بادمجان ناشی از قارچ *S. sclerotiorum* را به ترتیب به میزان ۸۶ درصد، ۶۸/۶ درصد و ۷۱/۵ درصد نسبت به شاهد قارچ تحت شرایط گلخانه کاهش دهند (نمودار ۱). نتایج بدست آمده از این بررسی با نتایج تحقیقات رودریگز و فندر (۱۷) مطابقت دارد. همچنین استرین های فوق بیماری مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از قارچ *R. solani* را به ترتیب به میزان ۸۶ درصد، ۷۸/۶ درصد و ۸۵/۸ درصد نسبت به شاهد کاهش دادند (نمودار ۲). نتایج بدست آمده از این آزمایش با نتایج بدست آمده توسط دفاگو و همکاران (۵) ،کلوپر (۸) ،کارترایت و بنسون (۴) مطابقت دارد. در همین راستا استرین های مذکور توانستند بیماری مرگ گیاهچه ناشی از قارچ *F. oxysporum* را به ترتیب به میزان ۸۷/۵ درصد، ۶۸/۸ درصد و ۷۵ درصد نسبت به شاهد کاهش دهند (نمودار ۳). نتایج حاصله از انجام این آزمایش با نتایج بدست آمده توسط لیمن وهمکاران(۱۱) مطابقت دارد. با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات فوق استرین شماره ۲۴ نسبت به دو استرین دیگر اثر بیشتر و مطلوبتری داشت.

نظرات مختلفی در مورد مکانیسم اثر باکتریهای پسودوموناس فلورسنت وجود دارد در این زمینه ولر (۲۰) مکانیسم عمل پسودوموناسهای فلورسنت در کنترل بیماریهای خاکزاد را رقابت برای جذب مواد غذایی و جا، تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور و تحریک سیستم دفاعی گیاه یا مقاومت القائی معرفی نموده است. اما بیشتر تلاشهایی که تاکنون جهت اطلاع از مکانیسم کنترل بیماریهای خاکزاد توسط باکتریها صورت گرفته اساساً بر روی سیدروفورها و آنتی‌بیوتیکها متمرکز بوده است (۱۴). با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که مکانیسم اثر استرین های مورد استفاده در این پژوهش تولید نوعی آنتی‌بیوتیک باشدو این بعلت عدم رشد عوامل مرگ گیاهچه در محیط کشت حاوی گلوکز میباشد که تولید آنتی بیوتیک را ممکن می سازد. در این زمینه هاول و استیپانوویک (۷) قبلاً اثبات کرده بودند که آنتی‌بیوتیک پیرول نیترین و پایولوتئورین می توانند به اندازه خود باکتری علیه *R. solani* و *P. ultimum* روی محیط کشت ایجاد بازدارندگی نمایند.

در سالهای اخیر باکتریهای *P. fluorescent* به گونه‌ای موفقیت آمیز بعنوان محرکین رشد و افزایش تولید محصولات کشاورزی بکار گرفته شده‌اند. در این مطالعه سعی شد که این خصوصیت باکتریهای فلورسنت جدا شده از خاکهای خوزستان در مزرعه و در روی گیاه سیب‌زمینی بررسی شود. نتایج بدست آمده مشخص نمود که هر سه استرین میزان تولید غده را افزایش داده ولی استرین شماره ۲۴ نسبت به ۲ استرین دیگراثر بیشتری از خود نشان داد. در جواب اینکه چرا باکتریهای پسودوموناس فلورسنت چنین تأثیری را روی رشد گیاهان دارند. دلایل متعددی ارائه شده است که از جمله می‌توان از بازدارندگی فعالیت پاتوژنهای کم اهمیت خاک (۲۰)، جذب بهتر مواد غذایی بوسیله گیاه و رشد بهتر سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک مانند میکوریزا (۹ و ۲۰)، تولید سیدروفور (۱۲و۲) و نیز تولید مواد تنظیم کنند رشد (۱۹) نام برد.

REFEERNCES **منابع:**

۱- احمد زاده، مسعود.؛ شریفی تهرانی، عباس.؛ رحیمیان، حشمت‌ا...(۱۳۷۶). جدا سازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ ***Pythium ultimum*** عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸، شماره ۳ : صفحه ۸۵-۸۱.

۲- حسن زاده، نادر.(۱۳۷۱). بیوکنترل عوامل بیماریزای خاکزاد گیاهان. مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی. ۱۸۰ صفحه.

۳- فرخی نژاد، رضا.؛ بیکر،رالف.؛ و رانو،راجیندر.(۱۳۷۷).کنترل بیولوژیکی پژمردگی فوزاریومی نخود فرنگی بوسیله استرین N1R از ***Pseudomonas putida*** در دو pH مختلف خاک . خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران .صفحه ۱۵۰.

4- CARTWRIGHT,D.K.;BENSON,D.M.(1995).Comparision of *Pseudomonas* species and application techniques for biocontrol of Rhizoctonia stem rot of poinsettia.Plant Disease 79:309-313.

5- DIFAGO, G.; and HAAS, D. (1995). Pseudomonas as antagonistis of soilborne plant pathogens : mode of action and genetic analysis.Soil Biochemistry 6 : 249-291.

6- FAHY, P.C.; and PERSLEY,G.J.(1983). Plant bacterial diseases, A diagnostic guide. Academic Press. 393pp.

7- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium.Phytopathology 28 : 84-96.

8- KLOEPPER, J.W. (1991). Development of in vivo assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. Phytopathology 81: 1006-1013.

9- KLOEPPER, J.W. ; LEONG, J.; TEINTZE, M.; and SCHROTH, M.N.1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286 : 885-886.

10- KRAUS, J.; & LOPER, J.E. (1990). Biocontrol damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 : mechanistic studies. 172-175. In Plant growth promoting rhizobacteria.Keel, C.; Koller,B.; and Defago, G. (eds). The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria Interlacen, Switzerland.

11- LEEMAN, M.; VANPELT, J.A.; HENDRICKX, M.J.; SCHEFFER, P.A.;BAKER, P.A.H.M.; and SCHIPPERS, B.1995. Biocontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS 374.Phytopathology 85 : 1301-1305.

12-LEONG, J.1986. Siderophore : Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogen. Annu.Rev. Phytopathol 24 : 187-209.

13- MILUS, E.A.; ROTHROCK, C.S. 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling Pythium root rot of winter wheat.Plant Disease 81 : 180-184.

14- MONTEIENS, E.; BONTERRA, A.; OPHIR, Y.; and BEER, S.V.

1996. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of Pear under controlled environment conditions . Phyopathology 86:856-863.

15- PARKE, J.L.; JOY, A.E.; and KING, E.B. 1991. Biological control of Pythium demping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P.fluorescens* to seed. Plant Disease 75 : 987-992.

16- RAAIJMAKERS, J.M.; LEEMAN, M.; SCHIPPERS, B.; and BAKER, P.A. 1995. Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp .Phytopathology 85 : 1075-1081.

17- RODRIGUES, F.; PFENDER, W.F. (1997). Antibiosis and antagonist of *Sclerotinia homeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in vitro and in planta. Phytopathology 87: 616-621.

18- SCHAAD, N.W. 1989. Laboratory guide for identification of Plant pathogenic bacteria, Amer. Phytopathol. Soc, St. Paul,Minnesota U.S.A. 72p.

19- WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; and TUZUN, S. 1995. Induced systemic resistance to cucumber disease and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathology 86 : 221-224.

20- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant

pathogens in the rhizosphere with bacteria.Ann.Rev. Phytopathol 26 : 379-407.

21- WELLER, D.M.; and COOK, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73 : 463-469.

22- ZAKI, K.; MISAGHI, I.J.; and HEYDARI, A. 1995. Control of cotton seedling damping-off in the field by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. **Plant Disease.82: 291-293.**

Isolation and Identification of Antagonist fluorescent pseudomonads from Khuzistan Province and study on Their Repression Against Casual Agent of Seedling Damping - off.

R. Eslahi[1] , R. Farrokhi-Nejad[2] & M. Shamsbakhsh

Key words: *Pseudomonas fluorescens*,Damping-off, Biological control,

Antibiotic, Siderophor, Antagonist,PGPR.

SUMMARY

Soil sample from different fields in Dezful, Shushtar, Shush, Mollasani, and Susangerd were collected. Collectively one handred twenty isolates of fluorescent pseudomonads were obtained from soil samples using King-B medium. Results of the laboratory experiments indicated that only three strains of those isolates had antagonistic effect on casual agent of seedling

1- former graduate student of Plant protection Dept, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz,Iran.

2- Plant protection Dept, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz,Iran.

damping off. These strains were identified based on morphological, physiological and biochemical characters as *Pseudomonas fluorescens* . The effect of these strains were determined on disease severity in a series of experiments that were conducted in green house. Experiments were conducted in completely randomized designs each with 5 treatments and 4 replicates. Results revealed that these strains were able to control seedling damping off effectively. These bacterial strains produced a kind of metabolite on PDA(containing 5% gluocose) that could inhibit the growth of casual agent of seed rots and seedling damping off in the absence of the bacteria. These bacterial strains did not produce siderophore on PDA (containing 5% glucose) amended with different concentration of $FeCl_3$. The primery experiment was conducted with potato plants to determine the efficiency of these bacterial strains as plant growth promoting agents under field conditions. Results showed that these strains caused an increase in yield production .