

بررسی تاثیر سودوموناسهای فلورسنت روی قارچ *Pythium ultimum* Trow عامل پوسیدگی بذر لوبیا

مسعود احمدزاده^۱، عباس شریفی تهرانی^۲، قربانعلی حجارود^۳، جواد زاده^۴، محمود اخوت^۵ و مجتبی محمدی^۶
۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، دانشجوی دوره دکتری، استادان و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۱/۲۷

خلاصه

در سالهای اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی خاکزاد مورد توجه جدی محققین قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به باکتریهای آنتاگونیست بخصوص از باکتریهای گروه سودوموناسهای فلورسنت در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی اشاره کرد. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشند. در این تحقیق تاثیر ۴۱ جدایه باکتری در کنترل گونه *var. Pythium ultimum sporangiferum* روی ریشه گیاه لوبیا مورد بررسی قرار گرفت. اغلب کلنی‌های رشد یافته روی محیط اختصاصی اس یک تولید رنگدانه فلورسنت کردند. با توجه به نتایج تستهای بیوشیمیایی، جدایه‌های Pf18 و Pf23 (جدا شده از مزارع لوبیای شهرستان خمین) و جدایه Pf26 از مزارع لوبیای دانشکده کشاورزی کرج به عنوان گونه *Pseudomonas putida* تشخیص داده شدند. جدایه‌های Pf13 و Pf22 بعلت عدم قطعیت در تشخیص به عنوان *Pseudomonas sp.* شناسایی شدند. جدایه‌های Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 و نیز استرین CHAO رشد قارچ داشتند. بهترین تاثیر را در جلوگیری از رشد *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی داشتند. جدایه‌های Bs4, Pf6 و Pf20 هیچ گونه تأثیری در کاهش رشد این گونه نداشتند. به غیر از ۱۰ جدایه شامل جدایه‌های Pf6, Pf29, Pf25, Pf24, Pf20, Pf19, Pf14, Pf10, Pf9, Pf31 و Pf31 که قادر به محافظت از بذر نبودند بقیه باکتریها با ممانعت از رشد قارچ بیمارگر، امکان جوانه‌زنی بذر لوبیا در محیط کشت را باعث شدند. از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده فقط ۱۶ جدایه شامل Pf2, Pf4, Pf8, Pf9, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16, Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31, Pf32 و نیز استرین CHAO تولید سیانید هیدروژن کردند. ۱۴ جدایه شامل Pf1, Pf5, Pf6, Pf7, Pf12, Pf15, Pf20, Pf21, Pf23, Pf25, Pf27, Pf28, Pf32 و نیز استرین CHAO تولید پروتئاز کردند. جدایه‌های Pf1, Pf13, Pf16, Pf26, Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHAO با توجه به اندازه قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتریها بیشترین تولید سیدروفور را داشتند. جدایه‌های *B. subtilis* و نیز جدایه‌های Pf11, Pf17, Pf20 و Pf23 اصلا تولید سیدروفور نکردند. هیچیک از جدایه‌های مورد آزمایش نتوانستند درون لوله آزمایش حاوی محیط سلولاز باعث تغییر رنگ کاغذ صافی بشوند. جدایه‌های Pf16 و Pf26 بهترین اثر را در افزایش وزن تر بوته‌های لوبیا در خاک آلوده به *P. ultimum* در شرایط گلخانه داشتند و به همراه شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند. بهترین تاثیر مربوط به جدایه Pf16 بود. بیشترین قدرت کلونیزاسیون ریشه مربوط به جدایه‌های Pf4, Pf7, Pf13 و Pf28 بود.

واژه‌های کلیدی: لوبیا، کنترل بیولوژیکی، سودوموناسهای فلورسنت

مقدمه

از بین بیماری‌های مربوط به ریشه لوبیا، بیماری پوسیدگی بذر، ریشه و بوته‌میری در اثر گونه *Pythium ultimum* Trow از شایع‌ترین آنها می‌باشند (۲). گسترده بودن دامنه میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی، بالا بودن قدرت بیماری‌زایی، انگل اختیاری بودن و توانایی زیاد در باقی ماندن بحالت ساپروفیتی در غیاب گیاه میزبان این گونه را از نظر بیماری‌زایی با اهمیت نموده و کارآیی برخی روش‌های زراعی مانند آیش و تناوب را در کنترل بیماری کاهش داده است. برخی روش‌های زراعی از قبیل رعایت فاصله کافی بین بوته‌های لوبیا به منظور تهویه بهتر خاک و کاهش سایه‌انداز و جلوگیری از انتقال عامل بیمارگر بین ریشه‌ها از اقداماتی است که می‌تواند در کنترل بیماری موثر واقع شود. ضد عفونی بذر با قارچ‌کشهای ضد ائومیسیت^۱ نیز تا اندازه‌ای در کاهش بیماری موثر است. تعدادی ارقام مقاوم به بیماری شناسایی شده‌اند که متاسفانه در شرایط مزرعه دوام چندانی نداشته و پس از چند سال استفاده، مقاومت آنها شکسته شده است.

تأثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل بیماریهای گیاهی خصوصا بیمارگرهای خاکزی و هزینه‌های اقتصادی آن از یک طرف و نگرانی‌های زیست محیطی از طرف دیگر، دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به عنوان یک چالش جدی فراروی محققان قرار داده است. در سالهای اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسمهای آنتاگونیست بخصوص از گروه باکتریهای متعلق به سودوموناسهای فلورسنت (از قبیل *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida*) و تعدادی از گونه‌های باسیلوس (*Bacillus*) در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی اشاره کرد. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشند (۲۳). سودوموناسهای فلورسنت بخش قابل توجهی از جمعیت بومی در خاک‌هایی که بطور طبیعی بازدارنده بوده و نیز خاک‌هایی که

بطور مستمر زیر کشت یک محصول^۲ قرار گرفته‌اند و یا با استفاده از تشعشع خورشیدی پاستوریزه شده‌اند می‌باشند (۲۰). بررسی منابع منتشر شده نشان می‌دهد که اول گزارش در مورد نقش سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل بیماری‌های گیاهی مربوط به (۹) می‌باشد. این دو محقق خواص آنتاگونیستی *P. fluorescens* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* وی پنبه و در سال بعد علیه *Pythium ultimum* را روی همین گیاه به اثبات رساندند. همچنین موفق شدند نقش آنتی بیوتیک پایولوتورین^۳ را در این بازدارندگی نشان بدهند (۱۰). تا کنون تأثیر ریزوباکتریهای آنتاگونیست بخصوص از گروه سودوموناسهای فلورسنت و برخی گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه اغلب گیاهان زراعی به اثبات رسیده است (۳، ۲۱، ۲۳). باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر از گروه سودوموناس‌های فلورسنت بطور مستقیم با تولید یک سری هورمونهای گیاهی و تحریک رشد گیاه، و نیز بصورت غیر مستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آنها می‌شوند (۲۳). تولید آنتی بیوتیک (۷)، سیدروفور (۱۴، ۲۱)، سیانید هیدروژن (۱۳) و انزیم پروتئاز (۱۳) از مهمترین مکانیسم‌های موثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتریها بشمار می‌رود. اغلب میکروارگانیسم‌های هوازی و بی‌هوازی در شرایط کمبود آهن تولید موادی با وزن ملکولی کم (۵۰۰ تا ۱۰۰۰ دالتون) نموده که تمایل زیادی به تشکیل کمپلکس با آهن سه ظرفیتی (یون فریک) دارند. نقش اصلی این مواد تامین آهن برای سلول است (۱۴). سیدروفورها ضمن افزایش رشد گیاه، در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز موثرند. یکی دیگر از متابولیت‌های میکروبی که بوسیله سودوموناسهای فلورسنت تولید می‌شوند سیانید هیدروژن می‌باشد که روی سیستم جذب مواد غذایی تأثیر می‌گذارد. جذب مواد غذایی توسط گیاه یک فرآیند انرژی‌خواه است. بر اساس مطالعات صورت گرفته حدود ۶۰ درصد انرژی ناشی از تنفس ریشه گیاه ذرت به این فرآیند اختصاص دارد. تولید انرژی بصورت بسته‌های ATP در سیستم

2. Monoculture

3. Pyolutorin

1. Oomycetes

محیط کشت انتخابی (حاوی ۲ گرم ساکارز، ۰/۷ گرم دی فسفات پتاسیم، ۳۰ میلی گرم سولفات استرپتومایسین، ۰/۵ گرم کربنات کلسیم، ۰/۲ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم نیترات پتاسیم، ۱۲۰ میلی گرم پیمارسین و ۷۰ میلی گرم قارچ کش (PCNB) منتقل و بصورت وارونه در دمای ۲۵ سانتی گراد نگهداری شد. با توجه به متوسط تعداد کلنی در تشتک‌ها و میزان خاک مورد استفاده، جمعیت قارچ در هر گرم خاک محاسبه گردید.

شناسایی گونه *Pythium*

تشخیص گونه بر اساس منوگراف دیک (۱۹۹۰) صورت گرفت. سرعت رشد شعاعی روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در شرایط تاریکی، رنگ و منظره کلنی، اندازه گیری قطر ائوگون^۱، ائوسپور^۲، ائوپلاست^۳ و ضخامت دیواره ائوسپور، منشا آنتریدی و نحوه اتصال آن به ائوگون تعیین گردید. این پارامترها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ میکروسکوپ اندازه گیری گردید. هر عدد از میانگین دو قطر بدست آمد. شاخص‌های ائوپلاست آپلروتیک و دیواره با استفاده از فرمول‌های دیک محاسبه شد (۵). برای تولید اندام‌های جنسی این قارچ (آنتریدی و ائوگون) از محیط کشت هویج - سیب‌زمینی - آگار (PCA) استفاده شد.

تهیه مایه تلقیح *Pythium* و اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه

برای تهیه مایه تلقیح *Pythium* از روش مارهوفر و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا قارچ *Pythium* روی محیط کشت مالت آگار بمدت ۷ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس یک قطعه ۶ میلی متری از محیط کشت حاوی قارچ در یک ارلن ۳۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۵ گرم بذر ارزن اتوکلاو شده و ۱۲ میلی لیتر آب مقطر سترون قرار داده شد. این ارلن بمدت دو هفته در مدت دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. چهار گرم مایه تلقیح به ازاء یک کیلوگرم خاک برای جنس *Pythium* اضافه و در هر گلدان ده عدد بذر کاشته شد. علائم *Pythium* بصورت پوسیدگی بذر و تغییر رنگ و کاهش جوانه‌زنی ظاهر شد. برای هر تیمار سه تکرار در یک طرح کاملا تصادفی بکار رفت. از بذر لوبیا رقم

تنفسی سیتوکروم اکسیداز بوسیله سیانید هیدروژن ممانعت می‌شود و باعث می‌گردد تا الکترونهای آزاد شده بوسیله اکسیداسیون NADH در میتوکندری از سایر مسیرهای تنفسی دیگر که مقاوم به سیانید هیدروژن است به اکسیژن برسد. لذا اتلاف انرژی در این حالت افزایش یافته و در نهایت باعث اختلال در رشد طبیعی گیاه می‌گردد (۲۱).

بر اساس نتایج کارهای (۱۱) تعدادی از استرین‌های *P. fluorescens* روی گونه *P. ultimum* عامل بوته‌میری نخود، اثرات مشابهی با قارچ‌کشهای متالاکسیل و کاپتان داشت. قدرت جوانه‌زنی و افزایش عملکرد برای تیمار متالاکسیل در تمام آزمایش‌ها معادل یا بیشتر از سایر تیمارها بود. براساس نتایج کارهای (۲۲) تیمار بذور نخود باکتری *P. fluorescens* استرین Q29z-80 تاثیر مشابهی با کاربرد قارچ‌کشهای متالاکسیل و کاپتان در شرایط مزرعه داشت. محققین در حال حاضر به دنبال پیدا نمودن خصوصیات از باکتری‌های آنتاگونیست که در افزایش قدرت رقابت در محیط ریزو سفر و کارایی آنها موثر است می‌باشند. این موضوع به آنها امکان می‌دهد تا با استفاده از مهندسی ژنتیک خصوصیات مورد نظر را در یک باکتری معین وارد نمایند. بررسی تاثیر عوامل محیطی روی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و نیز یافتن روش‌های سریع و آسان شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست از دیگر موضوعات مهمی است که در سال‌های اخیر مورد توجه جدی مراکز علمی جهان و ایران قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی جنس *Pythium*

بذور پوسیده، پس از آماده‌سازی را به محیط آب آگار ۲ درصد حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک ریفمپیسین^۱ منتقل نموده و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد، انتهای هیف کلنی به محیط کشت سیب‌زمینی - هویج - آگار (PCA) منتقل و در دمای یخچال نگهداری شد. برای جداسازی مستقیم و برآورد جمعیت قارچ یک گرم خاک کاملا خشک و نرم با ۱۰ میلی لیتر آب سترون بهم زده شد و رقت‌های مختلفی از آن تهیه و ۰/۲ میلی لیتر از هر کدام روی

2 . Oogonium
3 . Oospore
4 . Oosplast

1 . rifampicin

اصلاح شده بهمن (از گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی) برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر و نگهداری آنها

برای جداسازی سودوموناسهای فلورسنت از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. به این ترتیب که بذور پس از ضد عفونی سطحی در گلدان حاوی ۴۰۰ گرم خاک کاشته شد. پس از چهار هفته نگهداری در تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت نور و رطوبت ۷۰٪، خاک به آرامی از روی ریشه شسته شد. سپس ریشه‌ها درون یک ظرف حاوی آب سترون روی شیکر قرار گرفت و بمدت ۳۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد تیمار شد. ریشه به قطعات یک سانتی‌متری بریده و روی محیط اس‌یک (S1) یا محیط کینگ ب (KMB) قرار گرفت. تشتک‌ها بمدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا کلنی‌های باکتری ظاهر شود. باکتری‌هایی که زیر نور ماوراء بنفش از خود خاصیت فلورسانس نشان دادند به محیط NA منتقل شدند. باکتری استاندارد *Pseudomonas fluorescens* استرین CHAO نیز از دانشگاه پلی تکنیک زوریخ کشور سوئیس دریافت گردید.

شناسایی سودوموناسهای فلورسنت

۳۴ جدایه بر اساس روش‌های شاد و همکاران (۲۰۰۱) از نظر واکنش‌های گرم، کاتالاز، اکسیداز، رشد بی‌هوازی، هیدرولیز نشاسته، تولید آرژنین دهیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان (کلنی لعابدار و برجسته) از سوکروز روی محیط آگار مغذی حاوی سوکروز پنج درصد، احیای نترات، مصرف د-آرابینوز و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ ب مورد بررسی قرار گرفتند. برای تفکیک گونه *P. fluorescens* از گونه *P. putida* از واکنش رشد روی قند ترهالوز استفاده شد. این جدایه‌ها در لوله‌های سربوش‌دار حاوی ۵ میلی‌لیتر محلول یک دهم مولار سولفات منیزیم در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند.

آماده‌سازی بذور، آغشتگی به ریزوباکتریها و قارچ‌کشها و تعیین جمعیت باکتریها روی بذور تیمار شده

آماده‌سازی بذور لوبیا مطابق روش ولر و کوک (۱۹۸۶) انجام شد با این روش جمعیت باکتری به $10^5 \times 1-5$ واحد تشکیل دهنده کلنی رسید. به ازاء هر ۵۰ گرم بذر، محتویات چهار

تشتک پتری حاوی باکتری رشد یافته در ۲۵ میلی‌لیتر محلول یک درصد سلولز ریخته شد (برای جدایه‌های *B. subtilis* از محتویات پنج تشتک استفاده شد). برای تعیین میزان جمعیت باکتری، ۱۰ عدد بذر تیمار شده در یک هاون حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با اسیدیته ۷/۲ خرد شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} تا 10^{-8} روی محیط کشت کینگ ب (محیط آگار مغذی برای جدایه‌های *B. subtilis*) پخش گردید و پس از رشد باکتریها با شمارشگر کلنی میزان واحد تشکیل دهنده کلنی محاسبه شد.

برای آغشته نمودن بذور به قارچ‌کشهای مورد آزمایش مطابق روش کیل و همکاران (۱۹۸۹) قارچ‌کش‌های متالاکسیل (ریدومیل ۲۵ درصد) به میزان ۰/۵ گرم ماده مؤثره به ازاء هر کیلو گرم بذر با اضافه نمودن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر برای ۱۰۰ عدد بذر درون ارلن ۵۰۰ لیتری بکار رفت. ارلن‌ها را بمدت ۲ دقیقه به آرامی تکان داده و سپس درون هود سترون بمدت ۳ ساعت خشک گردید. ترکیب تجاری تریکودرمین بر اساس توصیه شرکت سازنده به میزان ۱۰ گرم پودر به ازاء هر کیلوگرم بذر در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آرامی مخلوط شد.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری

برای تعیین قدرت بازدارندگی از رشد *P. ultimum* در آزمایشگاه از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد به این ترتیب که باکتریها بصورت نقطه‌ای یا خطی روی محیط کشت مالت آگار به فاصله ۰/۵ سانتی متر از لبه تشتک کشت داده شد و یک ساعت بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ مورد نظر در وسط تشتک پتری قرار گرفت. در این روش باکتری که قبلاً بمدت ۸ ساعت در محیط مایع مغذی^۱ شامل پیتون و عصاره مخمر کشت داده تا در فاز لگاریتمی رشد قرار گیرد. برای هر باکتری سه تکرار بکار رفت. تشتک‌ها بمدت ۴ تا ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی بدون در نظر گرفتن شعاع آن به عنوان واکنش مثبت بازدارندگی از رشد قارچ تلقی شد. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله

1. Nutrient broth

یک لوپ باکتریها به صورت نقطه‌ای روی این محیط کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در صورتیکه باکتری تولید سیدروفور کند باعث تغییر رنگ محیط به نارنجی می‌شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS می‌باشد. قطر هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری با میزان سیدروفور رابطه مستقیمی دارد. میانگین بدست آمده برای هر باکتری بعنوان یک تکرار با استفاده از آزمون t-student با یکدیگر مقایسه شد. هر یک از مقادیر بدست آمده، میانگین سه آزمایش مستقل است.

تولید پروتئاز

تولید این آنزیم بر اساس روش مارهوفر و همکاران (۱۹۹۴) بررسی شد. ابتدا محیط کشت (SMA)^۲ شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی و ۱۳/۵ گرم آگار باکتریولوژیک تهیه و درون اتوکلاو سترون شد. تشتک‌های حاوی محیط کشت SMA در ۲۷ درجه بمدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. تشکیل یک هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی باکتری نشانه فعالیت پروتئاز است.

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش کاستریک و کاستریک (۱۹۸۳) استفاده شد: ابتدا سوسپانسیون هر یک از باکتریها از کشت ۲۴ ساعته بطور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر جدایه روی محیط کشت NA پخش شد. قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر در محلول معرف HCN غوطه‌ور گردید. این محلول شامل: ۵ میلی‌لیتر اتیل استواسات مس (Copper (II) ethylaceto acetate، ۵ میلی‌گرم متیل بیس-ان-ان-دی‌متیل آنیلین (Methylene) bis(-n-n-dimethylaniline) و ۲ میلی‌لیتر کلروفورم می‌باشد. آنگاه قطعات کاغذ صافی آغشته به معرف مذکور درون درب تشتک پتری حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار گرفت و بصورت وارونه در ۲۸ درجه نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ آبی پس از ۱۸-۳ ساعت نشانه تولید سیانید می‌باشد.

تولید سلولاز

محیط سلولاز شامل ۱ گرم دی فسفات پتاسیم، ۰/۵ گرم

کلنی باکتری تا میسلیم قارچ اندازه‌گیری و میانگین آنها بر اساس آزمون t-student در سطح ۰/۵ مقایسه شد.

بررسی امکان محافظت از بذر در مقابل قارچ‌های بیماری‌زا درون پتری

از بذور تیمار شده با متیل سلولز یک درصد بعنوان شاهد استفاده شد. برای هر تیمار سه تکرار بکار رفت. بذور آغشته شده به باکتری در اطراف تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و بلافاصله قطعه آگار حاوی قارچ عامل بیماری در وسط آن قرار گرفت. پس از یک هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه، میزان قدرت حفاظت از بذر علیه عامل بیماری و امکان جوانه‌زنی آنها در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های میکروبی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی

تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور از روش شین و نیلندز (۱۹۸۲) استفاده شد. در این روش از محیط (CAS)^۱ استفاده گردید. که از ترکیب سه محلول بدست می‌آید:

محلول اول: ۳۰/۲۴ گرم پیرازین بیس اتان سولفونیک اسید (Pipes) با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط شد، اسیدیته آن با سود یک نرمال به ۶/۸ رسید و سپس ۵ گرم کازآمینواسید اضافه گردید و به همراه ۱۲ گرم آگار در ۱۲۱ درجه بمدت ۱۵ دقیقه سترون شد.

محلول دوم: ۶۰/۵ میلی‌گرم از CAS در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محلول سه ظرفیتی آهن (10 mM FeCl₃.6H₂O, 10mM HCl) به آن اضافه شد. در ظرف دیگری ۷۲/۹ میلی‌گرم از ماده هگزادسیل تری متیل آمونیوم بروماید (HDTMA) با ۴۰ میلی‌لیتر آب کاملاً مخلوط و سپس با اضافه کردن آن به ظرف اول محلول دوم بدست آمد که جداگانه اتوکلاو گردید.

محلول سوم: ماده MgCl₂.6H₂O را به میزان ۸۱۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ریخته و بعد از هم زدن اتوکلاو شد. محلول دوم و سوم با یکدیگر مخلوط و در حالت بهم خوردن به محلول اول اضافه گردید. محیطی که بدست می‌آید آبی‌رنگ است که درون پتریهای سترون ریخته شد. با استفاده از

گرفت که مؤید جمعیت باکتری روی ریشه می‌باشد.

نتایج

مشخصات گونه *Pythium ultimum* Trow

در اغلب موارد، نمونه‌های جدا شده از مزارع لوبیا در کرج، گونه *Pythium ultimum* Trow تشخیص داده شد. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داد که وارپته این گونه *sporangerum* می‌باشد. در هیچ یک از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع خمین این قارچ مشاهده نشد. با استفاده از روش جداسازی مستقیم از خاک و تهیه سری رقت، جمعیت قارچ در خاک ۱۲۵ واحد تشکیل دهنده کلنی^۱ در هر گرم خاک تعیین گردید. میسلیم‌های این گونه روی محیط کشت PDA به رنگ سفید و با منظره پنبه‌ای بود.

مشخصات میکروسکوپی: هیف‌ها استوانه‌ای شکل به قطر متوسط ۴/۲ میکرومتر (از ۱/۵ تا ۶/۵ میکرومتر) بوده و در کشت‌های قدیمی نیز دیواره عرضی دیده شد. آنتریدی از محل زیر دیواره عرضی آگون منشعب می‌شود (فرم monoclinous). ائوگون در انتهای هیف واقع شده، صاف و کروی به قطر متوسط ۲۱/۸۲ میکرومتر (از ۱۹/۶ میکرومتر تا ۲۲/۹ میکرومتر) که روی محیط PDA استاندارد تولید شد. در هر ائوگون یک ائوسپور تشکیل گردید. دیواره ائوسپور صاف به قطر متوسط ۱۷/۱۵ میکرومتر (از ۱۶/۸۴ تا ۱۸/۱۶) و دارای دیواره دو لایه بوده که سیتوپلاسم را در بر می‌گیرد. ائوسپورهای این قارچ معمولاً بلافاصله یا پس از یک دوره استراحت (اغلب هفت ماه) جوانه زدند. این گونه روی محیط PDA اسپورانژهای کروی با دیواره صاف تولید نمود. با استفاده از فرمول‌های دیک (۱۹۹۰) شاخص‌های ذیل برای ۲۰ آگون بدست آمد: شاخص آپروتیک = ۴۸/۷۵، شاخص دیواره = ۳۹/۴۵ و شاخص ائوپلاست = ۲۵/۵۲. **جداسازی و شناسایی و تشخیص گونه‌های سودوموناسهای فلورسنت**

اغلب کلنی‌های رشد یافته روی محیط اختصاصی "اس یک" تولید رنگدانه فلورسنت کردند. حداقل قدرت جداسازی این محیط کشت ۸۰ درصد و در برخی مناطق از جمله مزارع خمین تا ۹۰ درصد بود. نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای تشخیص گونه‌های *Pseudomonas* در جدول ۲ ذکر شده

نیترات سدیم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. درون هر لوله آزمایش ۹ میلی‌لیتر ریخته و در هر کدام یک کاغذ صافی به ابعاد ۹×۱ سانتی‌متر گذاشته شد. بنحوی که نیمی از کاغذ بیرون از سطح مایع قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری را وارد لوله کرده و در دمای ۲۵ درجه نگهداری شد. تا ۳ هفته پس از انجام آزمایش، هر روز کاغذهای صافی از نظر هرگونه تغییر رنگ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی خواص بازدارندگی سودوموناسهای فلورسنت در شرایط گلخانه علیه عامل بیماری

برای انجام این آزمایش از روش کیل و همکاران (۱۹۹۶) بشرح زیر عمل شد: پس از تهیه مایه تلقیح قارچ بیماری‌زا درون ارزن‌های حاوی ۲۵۰ گرم بذر ارزن و ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر، و اضافه کردن آن به خاک (چهار گرم مایه تلقیح در یک کیلوگرم خاک برای جنس *Pythium*) دو ساعت بعد ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری ($10^7 \times 1$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر) به ازا هر کیلوگرم بذر اضافه شد. سپس در هر گلدان ده عدد بذر کاشته شد. چهارده روز بعد (نگهداری در شرایط ۲۲ درجه، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) گلدان‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. پارامترهای مورد ارزیابی، تعداد بذور جوانه زده و سالم، و وزن تر بوته دو هفته پس از کاشت بود. برای هر تیمار سه تکرار در یک طرح کاملاً تصادفی بکار رفت. این آزمایش دو مرتبه در شرایط یکسان تکرار شد.

بررسی کلونیزاسیون ریشه توسط باکتریهای آنتاگونیست

برای انجام این بررسی از روش کیل و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد. دو هفته پس از کاشت بذور آغشته به باکتریهای آنتاگونیست در آزمایش گلخانه‌ای در خاک آلوده به گونه *P. ultimum* برای هر تیمار سه گیاهچه انتخاب و ریشه‌های آنها توزین گردید. ریشه‌ها به قطعات کوچکتر بریده شد و درون ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۸۵٪ نمک طعام ریخته و بمدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. رقت‌های مناسب تهیه و با استفاده از پی پت پاستور مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر نمونه روی محیط کشت کینگ ب حاوی آنتی‌بیوتیک سولفات کاناماسین پخش گردید. پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت شمارش باکتری صورت

Pf31 و Pf7, Pf9, Pf10, Pf14, Pf18, Pf19, Pf21, Pf24
کمترین تأثیر را روی رشد قارچ داشتند (گروه c).

**بررسی امکان محافظت از بذر در مقابل قارچ‌های بیماریزا
درون پتری**

گونه *P. ultimum* بشدت از جوانه‌زنی بذور در محیط کشت همانند محیط زنده ممانعت می‌کند. همانگونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود به غیر از ۱۰ جدایه شامل جدایه‌های Pf6, Pf9, Pf10, Pf14, Pf19, Pf20, Pf24, Pf25, Pf29 و Pf31 که قادر به محافظت از بذر نبودند بقیه باکتریها با ممانعت از رشد قارچ عامل بیماری، امکان جوانه‌زنی بذر لوبیا در محیط کشت را باعث شدند. ترکیب تجارتي تریکودرمین نیز نتوانست باعث حفاظت از بذر بشود.

**بررسی تولید برخی از متابولیت‌های ضد میکروبی بوسیله
ریزوباکتریها**

تولید سیانید هیدروژن

از بین ریزوباکتریهای آنتاگونیست مورد استفاده فقط جدایه‌های Pf2, Pf4, Pf8, Pf9, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16, Pf31, Pf32 و Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31 استرین CHAO تولید سیانید هیدروژن کردند (جدول ۱). در سایر جدایه‌ها تولید این متابولیت به اثبات نرسید.

تولید پروتئاز

جدایه‌های Pf1, Pf5, Pf6, Pf7, Pf12, Pf15, Pf20, Pf28, Pf27, Pf25, Pf23, Pf21 و Pf32 و نیز استرین CHAO تولید پروتئاز کردند. هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتریها از نظر اندازه تقریباً با یکدیگر یکسان بودند (جدول ۱). در سایر جدایه‌ها تولید این آنزیم به اثبات نرسید.

تولید سیدروفور

از نظر تولید سیدروفور روی محیط کشت CAS، جدایه‌های Pf1, Pf13, Pf16, Pf26, Pf27 و Pf32 و نیز استرین CHAO با توجه به اندازه قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتریها بیشترین تولید سیدروفور را داشتند. جدایه‌های Pf3, Pf4, Pf5, Pf6, Pf7, Pf8, Pf12, Pf14, Pf15, Pf18, Pf19, Pf21, Pf22, Pf24, Pf25, Pf28, Pf29, Pf31, Pf33 و Pf34 نیز بخوبی تولید سیدروفور نمودند. جدایه‌های B. subtilis و نیز جدایه‌های Pf11, Pf17, Pf20 و Pf23 اصلاً تولید سیدروفور نکردند. جدایه‌های Pf2, Pf9, Pf10 و Pf30 نیز مقدار کمی تولید کردند (جدول ۱).

است. واکنش اکسیداز در گونه‌های مختلف این جنس متفاوت ولی برای تمام جدایه‌های متعلق به گونه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* مثبت است. همگی گرم منفی و کاتالاز مثبت می‌باشند. سودوموناسها عموماً قادر به احیای نیتراست نیستند ولی جدایه‌های *P. fluorescens* می‌توانند از نیتراست به عنوان گیرنده نهایی الکترون در مسیر تنفسی استفاده نموده و آنرا احیا کنند. جدایه‌های *P. putida* قادر به احیای نیتراست نیستند. همچنین گونه *P. putida* برخلاف گونه *P. fluorescens* قادر به استفاده از قند ترهالوز نمی‌باشد. از این دو واکنش اخیر می‌توان برای تفکیک دو گونه استفاده نمود. البته برخی از بیوورهای گونه *P. fluorescens* نیز قادر به احیای نیتراست نیستند. همانگونه که در جدول ۲ دیده می‌شود هیچ یک از گونه‌ها در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد رشد نکرد ولی همگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. همچنین هیچ یک از باکتریها قادر به تحمل KCN یک درصد و تولید سولفید هیدروژن از پیتون نبودند. با توجه به نتایج تست‌های بیوشیمیایی، جدایه‌های Pf18 و Pf23 (جدا شده از مزارع لوبیای شهرستان خمین) و جدایه Pf26 از مزارع لوبیای دانشکده کشاورزی کرج به عنوان گونه *P. putida* تشخیص داده شدند. جدایه‌های Pf13 و Pf22 بعلت عدم قطعیت در تشخیص به عنوان *Pseudomonas sp.* در نظر گرفته شدند. اگرچه این دو جدایه تولید رنگدانه فلورسنت نیز نمودند.

تعیین جمعیت باکتریها روی بذور تیمار شده لوبیا

شمارش کلنی‌های رشد یافته روی محیط‌های کشت کینگ ب (برای سودوموناسهای فلورسنت) و آگار مغذی (برای باسیلها) نشان داد که متوسط جمعیت باکتری روی بذر معادل 1×10^7 واحد تشکیل دهنده کلنی بود.

اثر ریزوباکتریها در جلوگیری از رشد گونه *Pythium ultimum* در شرایط آزمایشگاهی

همانگونه که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود در مورد جلوگیری از رشد گونه *P. ultimum* روی محیط کشت سیبزمینی دکستروز آگار (PDA)، جدایه‌های Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 و نیز استرین CHAO بهترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ داشتند (گروه a). جدایه‌های Pf3, Pf4, Pf5, Pf30, Pf32, Pf6 و نیز Bs2, Bs3, Bs5 در رتبه بعدی قرار گرفتند (گروه ab). جدایه‌های Bs4, Pf6 و Pf20 هیچ گونه تأثیری در کاهش رشد قارچ نداشتند. جدایه‌های Pf3,

جدول ۱- بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی و کنترل عامل بیماری در آزمایشگاه و گلخانه

تیمار	ناحیه بازاری (۱)	تولید سیانید هیدروژن (۳)	تولید سیدروفور (۴)	تولید پروتئاز (۵)	وزن تر بوته بر حسب گرم (۶)	درصد جوانه‌زنی (۷)	حفاظت از بذور (درون پتری)
CHAO	(۲) a۳/۲	+	+++	+	ab۲۰/۷	ab۸۶	+
Pf 1	b۱/۲	-	+++	+	bc۷۳	bc۷۳	+
Pf 2	ab۲/۴	+	+	-	c۷۱	cd۱۲/۷	+
Pf 3	c۰/۴	-	++	-	c۶۸	cd۱۲/۷	-
Bs 1	b۱/۳	-	-	-	c۶۸	cd۱۲/۸	-
Bs 2	ab۱/۹	-	-	-	c۶۷	cd۱۲/۵	+
Bs 3	ab۲/۱	-	-	-	c۶۸	bc۱۵/۶	+
Bs 4	.	-	-	-	bc۷۳	bc۱۵/۴	-
Bs 5	ab۱/۸	-	-	-	bc۷۲	bc۱۵/۴	+
Bs 6	b۱/۲	-	-	-	c۷۱	c۱۴/۷	+
Pf 4	ab۲/۱	+	++	-	ab۸۶	ab۲۰/۸	+
Pf 5	ab۲/۳	-	++	+	bc۷۳	bc۱۵/۶	+
Pf 6	.	-	++	+	ab۸۵	ab۲۰/۸	-
Pf 7	c۰/۹	-	++	+	b۸۱	b۱۸/۶	+
Pf 8	a۲/۹	+	++	-	bc۷۳	bc۱۵/۸	+
Pf 9	c۰/۵	+	+	-	c۶۷	cd۱۲/۷	-
Pf 10	c۰/۹	-	+	-	bc۷۳	bc۱۵/۲	-
Pf 11	b۱/۲	-	-	-	d۴۹	d۹/۸	+
Pf 12	b۱/۲	-	++	+	c۶۸	cd۱۲/۶	+
Pf 13	b۱/۴	+	+++	-	c۶۷	cd۱۲/۸	+
Pf 14	c۰/۶	+	++	-	bc۷۲	bc۱۵/۲	-
Pf 15	a۲/۸	+	++	+	b۸۱	b۱۸/۵	+
Pf 16	a۳/۲	+	+++	-	a۹۲	a۲۵/۲	+
Pf 17	b۱/۱	-	-	-	bc۷۳	bc۱۵/۶	+
Pf 18	c۰/۸	+	++	-	c۶۴	cd۱۱/۸	+
Pf 19	c۰/۵	-	++	-	bc۷۴	bc۱۵/۴	-
Pf 20	.	-	-	+	bc۷۶	bc۱۶/۲	-
Pf 21	c۰/۸	-	++	+	b۸۲	b۱۸/۴	+
Pf 22	b۱/۳	+	++	-	bc۷۲	bc۱۵/۴	+
Pf 23	b۱/۴	-	-	+	cd۶۱	cd۱۲/۶	+
Pf 24	c۰/۵	-	++	-	d۴۸	d۹/۸	-
Pf 25	b۱/۲	-	++	+	b۸۱	b۱۸/۴	-
Pf 26	a۳/۲	+	+++	-	ab۸۶	a۲۵/۶	+
Pf 27	a۳/۲	+	+++	+	ab۸۹	ab۲۲/۵	+
Pf 28	b۱/۲	+	++	-	bc۷۸	bc۱۶/۸	+
Pf 29	b۱/۱	-	++	+	b۸۴	ab۲۰/۵	-
Pf 30	ab۲/۳	-	+	-	c۷۱	c۱۴/۷	+
Pf 31	c۰/۵	+	++	-	bc۷۴	bc۱۵/۶	-
Pf 32	ab۲/۴	+	+++	-	ab۸۶	ab۲۰/۵	+
Pf 33	ab۲/۳	-	++	+	bc۷۲	c۱۴/۸	+
Pf 34	b۱/۱	-	++	-	bc۷۳	bc۱۵/۵	+
قارچ کش	-	-	-	-	b۸۶	b۱۸/۲	+
تریکودرمین	-	-	-	-	b۸۰	b۱۷/۸	-
شاهد آلوده	-	-	-	-	d۴۵	d۸/۷	-
شاهد سالم	-	-	-	-	a۹۷	a۲۸/۲	+

۱- فاصله بین میسلیموم و کلنی باکتری بر حسب سانتی‌متر. ۲- اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند. ۳- تولید سیانید براساس آبی‌رنگ شدن کاغذ آغشته به معرف تعیین شده است. ۴- هاله نارنجی اطراف کلنی باکتری نشانه تولید سیدروفور است. ۵- فعالیت پروتئاز براساس بی‌رنگ نمودن محیط SMA تعیین گردید. ۶- وزن تر بوته‌ها دو هفته پس از کاشت تعیین شد. در هر گلخانه ۱۰ عدد بذور و برای هر تیمار سه تکرار استفاده شد. ۷- تعداد بذور جوانه زده و سر پا پس از یک هفته شمارش شد.

جدول ۲- واکنش‌های بیوشیمیایی سودوموناسهای فلورسنت

کد	واکنش گرم	احیای نیترات کاتالاز	ذوب ژلاتین	اکسیداز	تولید لوان	آرژنین دهیدرولاز	رشد در ۴ درجه	رشد در ۴۱ درجه	رشد روی ترهالوز	رنگدانه تولید H2S	تحمل KCN %	اوره آز
CHA0	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 1	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 2	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 3	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 4	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 5	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 6	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	م
Pf 7	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 8	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 9	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 10	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 11	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 12	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 13	-	ن	+	+	+	ن	+	-	+	+	-	ن
Pf 14	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	م
Pf 15	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 16	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 17	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 18	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Pf 19	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 20	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 21	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 22	-	ن	+	+	+	ن	+	-	+	ن	-	ن
Pf 23	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Pf 24	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 25	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 26	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	م
Pf 27	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Pf 28	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 29	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 30	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 31	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 32	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 33	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Pf 34	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-

:- (منفی)

:+ (مثبت)

م: (متغیر)

ن: (نامشخص)

تولید سلولاز

هیچ یک از جدایه‌های مورد آزمایش نتوانستند درون لوله آزمایش حاوی محیط سلولاز باعث تغییر رنگ کاغذ صافی بشوند. لذا تولید آنزیم سلولاز با این روش به اثبات نرسید.

بررسی اثر جدایه‌های ریزوباکتری در کاهش بیماری ناشی از گونه *Pythium ultimum* در گلخانه

بررسی اثر ریزوباکتریها در خاک آلوده به گونه *P. ultimum*

جدول ۳- واکنش متقابل بین تعدادی از متابولیت‌های مربوط به جدایه‌های ریزوباکتری و فعالیت ضد قارچی آنها در شرایط گلخانه

متغیر	ضریب همبستگی (۲)
<i>P. ultimum</i>	۰/۴۴
ایجاد هاله بازدارندگی	۰/۳۱
تولید سیدروفور	۰/۲۸
تولید سیانید هیدروژن	۰/۱۸
تولید پروتئاز	

همبستگی در سطح ۱٪ تعیین شده است.

بحث

بررسی‌ها نشان داد که سودوموناسهای فلورسنت بطور فعال در اغلب خاکهای زراعی وجود داشته و احتمالاً مسئول کاهش طبیعی برخی از بیماری‌های ریشه ناشی از عوامل خاک زی می‌باشد. اغلب سودوموناسهای فلورسنت جدا شده از ریزوسفر لوبیا از نظر خواص آنتاگونیستی در آزمایشگاه و گلخانه اثرات قابل توجهی از خود نشان دادند. بر اساس مطالعات و بررسی‌های بعمل آمده تاکنون در خصوص کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی بذر، ریشه و بوته‌میری ناشی از بیمارگرهای *P. ultimum* روی لوبیا با استفاده از سودوموناسهای فلورسنت هیچ گونه فعالیت پژوهشی صورت نگرفته است و این تحقیق برای اولین بار روی لوبیا صورت می‌گیرد. گونه *P. ultimum* در اغلب مناطق کشور به عنوان یکی از عوامل محدود کننده محصولات زراعی مختلف از جمله حبوبات محسوب شده و باعث ایجاد خسارت تا ۳۰٪ محصول می‌شود (۲). معمولاً جداسازی این قارچ به تمهیدات خاصی برای حذف سایر میکروارگانیسم‌های ساپروفیت نیاز دارد و به آسانی قابل جداسازی نمی‌باشد. این قارچ دارای دو وارسته می‌باشد که یکی تولید زئوسپور می‌کند (وارسته *sporangigerum*) و دیگری تولید ائوسپورانژ و زئوسپور نمی‌کند (وارسته *ultimum*). گونه جدا شده از مزارع دانشکده کشاورزی لوبیا، با توجه به تولید زئوسپور و سایر شاخص‌های محاسبه شده به عنوان وارسته *sporangiferum* شناسایی شد. شاخص ائوپلاست در وارسته *sporangiferum* همواره از ۲۵ درصد بیشتر است در حالی که در وارسته *ultimum* از ۲۰ درصد بیشتر نیست. در هیچ‌یک از تحقیقات قبلی روی لوبیا در ایران اشاره‌ای به نوع وارسته‌ای این قارچ نشده است.

این قارچ از بذر پوسیده شده و نیز گیاهانی که بتازگی سر از خاک درآورده‌اند قابل جداسازی است. استفاده از آنتی‌بیوتیک ریفمپیسین به میزان ۵۰ میکروگرم در لیتر محیط کشت امکان جداسازی این قارچ را فراهم می‌سازد. لازم به ذکر است که قبلاً وارسته *P. ultimum var. ultimum* توسط احمدزاده و همکاران (۱۳۷۶) روی نخود ایرانی از مزارع دانشکده کشاورزی گزارش شده و به نظر می‌رسد که هر دو وارسته در این مزارع فعالیت دارد (۱).

نشان داد که جدایه‌های Pf16 و Pf26 بهترین تأثیر را در افزایش وزن تر بوته‌های لوبیا در شرایط گلخانه داشتند و به همراه شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند (گروه a). پس از آن جدایه‌های Pf4, Pf6, Pf27, Pf29 و Pf32 و نیز استرین CHAO در رتبه بعدی جای گرفتند (گروه ab). قارچ‌کش متلاکسیل تأثیر متوسطی روی کاهش بیماری داشت و به همراه جدایه‌های Pf25 و Bs4, Pf7, Pf15, Pf21 و ترکیب تجاری تریکودرمین در یک گروه بودند (گروه b). جدایه‌های Pf11 و Pf24 هیچگونه تأثیری نداشته و به همراه شاهد آلوده در یک گروه قرار گرفتند (گروه d). کمترین تأثیر نیز مربوط به جدایه‌های Pf2, Pf3, Bs1, Bs2, Pf9, Pf12, Pf13, Pf18 و Pf23 بود (گروه cd). نتایج در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

نتایج حاصل از تأثیر این باکتریها روی جوانه‌زنی بذور نیز بررسی شد. بهترین تأثیر مربوط به جدایه Pf16 بود که به همراه شاهد سالم در یک گروه قرار گرفتند (گروه a) و پس از آن جدایه‌های Pf4, Pf6, Pf26, Pf27, Pf29, Pf32 و نیز استرین CHAO در رتبه بعدی واقع شدند (گروه ab). قارچ‌کش متلاکسیل تأثیر متوسطی روی محافظت از بذور و امکان جوانه‌زنی آنها داشت و به همراه جدایه‌های Pf7, Pf15, Pf21 و Pf25, Pf29 و ترکیب تجاری تریکودرمین در یک گروه قرار گرفتند (گروه d) و کمترین تأثیر نیز مربوط به جدایه Pf23 بود (گروه cd).

بررسی قدرت کلونیزاسیون ریشه‌های لوبیا توسط ریزوباکتریهای آنتاگونیست

نتایج حاصل از شمارش کلنی باکتریهای رشد یافته روی محیط کشت مربوط به ریشه‌های لوبیای درون خاک آلوده به قارچ *P. ultimum* پس از دو هفته نشان داد که بیشترین قدرت کلونیزاسیون ریشه مربوط به جدایه‌های Pf4, Pf7, Pf13 و Pf28 بود (گروه a). در این گروه جمعیت باکتری به ترتیب به ۸/۱، ۸/۲، ۸/۱ و ۸/۲ رسید. پس از آن جدایه‌های Pf5, Pf17, Pf25 و استرین CHAO در رتبه دوم قرار گرفتند (گروه ab). در این گروه جمعیت باکتری به ۷/۶ رسید. کمترین قدرت کلونیزاسیون مربوط به جدایه‌های Bs2, Bs4, Bs5, Bs6 و Pf16, Pf22 و Pf31 بود (گروه c). در این گروه جمعیت باکتری به ۶/۸ رسید.

گلخانه تعیین شد. تجزیه واریانس اعداد بدست آمده با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS نشان داد که هیچگونه همبستگی بین هر یک از متغیرهای مذکور با فعالیت ضد قارچی باکتریها در شرایط گلخانه دیده نمی‌شود. بیشترین ضریب همبستگی مربوط به ایجاد هاله بازدارندگی در پتری (۰/۴۴) و کمترین آن مربوط به تولید پروتئاز است (۰/۱۸).

سایر ضرایب همبستگی بین متغیرهای مختلف در کنترل بیولوژیکی بشرح زیر تعیین گردید:

۱- ضریب همبستگی بین قدرت جلوگیری از رشد گونه *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی با قدرت جلوگیری از رشد قارچ در شرایط گلخانه ۰/۴۷

۲- ضریب همبستگی بین قدرت جلوگیری از رشد گونه *P. ultimum* در شرایط گلخانه با قدرت کلونیزاسیون ریشه توسط ریزوباکتریها ۰/۱۴

ضریب همبستگی بین نتایج بازدارندگی از رشد قارچ های بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی با نتایج بدست آمده از نتایج کارهای گلخانه ای معنی دار نشد. این نتیجه گیری نیز با یافته های برخی از محققین از جمله، شریفی تهرانی و همکاران (۱۹۹۸) و کارهای هاجدرون و همکاران (۱۹۸۹) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج ضریب همبستگی تولید سیدروفور با قدرت کنترل بیماری در شرایط گلخانه ای به نظر می‌رسد که همبستگی معنی داری بین این دو وجود ندارد. بر اساس نتایج یک کار تحقیقاتی، سیدروفور تولید شده توسط استرین *P. fluorescens* CHAO در کنترل بیماری های پوسیدگی سیاه ریشه توتون و پاخوره گندم اثر چندانی ندارد (۱۳). همچنین نتایج یک تحقیق نشان داد که تولید سیدروفور توسط استرین *P. putida* WCS417 نقش چندانی در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک ندارد. موتانهایی که تولید سیدروفور نمی‌کردند نیز تأثیر خوبی در کنترل این بیماری داشت ولی کلونیزاسیون ریشه بخوبی صورت نگرفت (۶).

در آزمایش های انجام شده هیچگونه همبستگی بین متغیرهای مورد بررسی با فعالیت ضد قارچی باکتریهای آنتاگونیست در شرایط گلخانه وجود نداشت. جدایه های Pf15, Pf27, Pf27, Pf32 و استرین CHAO تولید هر سه ماده سیدروفور، پروتئاز و سیانید هیدروژن کردند در حالیکه

محیط اسیدیک یک محیط انتخابی و افتراقی برای سودوموناسهای فلورسنت محسوب می‌شود (۸). قدرت انتخابی این محیط بدلیل وجود دو ماده سدیم لائوریل ساکوزین (SLS)^۱ و آنتی بیوتیک تریمتوپریم^۲ است که اولی از رشد میکروارگانیسم های گرم مثبت و دومی از رشد سودوموناسهای غیرفلورسنت جلوگیری می‌کند. همچنین این دو ماده دارای اثر تشدید کننده روی یکدیگر داشته و حذف یکی باعث کاهش تأثیر دیگری می‌شود. نتایج بدست آمده از جداسازی باکتریها از مزارع کرج و خمین نشان داد که کارایی این محیط برای جداسازی سودوموناسهای فلورسنت حداقل ۸۰ درصد بود. این موضوع با نتایج گولد و همکاران (۱۹۸۵) مطابقت دارد. بنظر می‌رسد کارایی بیشتر این محیط در مزارع خمین (که اغلب سالها بصورت متناوب با گندم کاشته می‌شود) نسبت به سایر مناطق، جمعیت بیشتر سودوموناسهای فلورسنت در خاک باشد. بنا بر نظر ولر (۱۹۸۸) تناوب گیاهان تیره بقولات با گندم نقش مؤثری در افزایش جمعیت سودوموناسهای فلورسنت دارد. این تناوب معمولاً در مزرعه دانشکده کشاورزی کرج رعایت می‌شود. تمام باکتریهای متعلق به جنس *Pseudomonas* گرم منفی، میله ای شکل و دارای یک تا چند تاژک قطبی می‌باشند. به غیر از گونه *P. corrugata*، هیچ سودوموناسی در ۴۱ درجه سانتی گراد رشد نمی‌کند و از د-آرابینوز به عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط می‌توانند استفاده نمایند. هیچگونه فرم مقاومی برای این جنس شناخته نشده است. گونه *P. fluorescens* دارای پنج بیووار مختلف می‌باشد که از نظر مصرف برخی قندها قابل تفکیک و شناسایی هستند.

در جدول ۳ ضرایب همبستگی بین تعدادی از متغیرهای مؤثر در پدیده کنترل بیولوژیکی با کنترل بیماری ناشی از بیمارگرهای *P. ultimum* و *R. solani* در شرایط گلخانه ذکر شده است.

ضریب همبستگی پیرسون^۳ برای مقایسه متغیرهای مربوط به تولید سیدروفور، پروتئاز، سیانید هیدروژن و ایجاد هاله بازدارندگی در تشک پتری با فعالیت ضدقارچی آنها در شرایط

1. Sodium Lauroyl Sarcosine
2. Trimethoprim
3. pearson

استفاده، از بین ۴۱ جدایه تنها ۱۶ جدایه توانست تولید سیانید هیدروژن نموده و کاغذ صافی آغشته به معرف را به رنگ آبی درآورد. همانطور که انتظار می‌رفت هیچ یک از جدایه‌های *B. subtilis* تولید سیانید نکرد. بر اساس یک کار تحقیقاتی، حداقل ۴۰ درصد سودوموناسهای که از ریزوسفر سیب‌زمینی جداسازی شده بودند در شرایط آزمایشگاهی تولید سیانید هیدروژن کردند (۲۱). ۱۵ جدایه نیز تولید آنزیم پروتئاز کردند. در مورد جدایه‌های *B. subtilis* تولید پروتئاز روی محیط کشت SMA به اثبات نرسید. به غیر از جدایه‌های *B. subtilis* و چهار جدایه از سودوموناسهای فلورسنت بقیه آنها بخوبی تولید سیدروفور کردند.

استرین CHAO در شرایط گلخانه‌ای درون خاک استریل تأثیر قابل توجهی روی بیماری‌های ناشی از گونه *P. ultimum* داشت و بر روی گونه *P. ultimum* تأثیر بهتری نسبت به قارچ‌کش متالاکسیل داشت. بر اساس نتایج کارهای تارپرو-کاساس و همکاران (۱۹۹۰) تیمار بذور نخود با باکتری *P. fluorescens* استرین Q29z-80 تأثیر مشابهی با کاربرد قارچ‌کشهای متالاکسیل و کاپتان در شرایط مزرعه داشت (۲۱). جدایه‌های Pf16 و Pf26 تنها باکتری‌هایی بودند که در کاهش رشد عامل بیماری در شرایط گلخانه اثرات خوبی داشتند. جدایه Pf16 در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بالایی داشته و همچنین از نظر تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن در سطح بالایی بود. این جدایه تولید پروتئاز نکرد ولی نسبت به سایر جدایه‌ها توانایی کمتری برای کلونیزاسیون ریشه لوبیا داشت. جدایه Pf26 تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن نکرد ولی تولید سیدروفور کرد. این جدایه نیز از نظر کلونیزاسیون ریشه لوبیا مشابه جدایه Pf16 بود.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبارات طرح ملی بررسی اثر آنتاگونیستهای باکتریایی روی قارچ‌های مهم خاکزی عوامل بوته‌میری گیاهان در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شده است. از دکتر دفاگو از کشور سوئیس بخاطر ارسال استرین CHAO *P. fluorescens* و رهنمودهای ارزنده صمیمانه قدردانی می‌شود.

گروه‌بندی آنها از نظر تأثیر روی وزن تر بوته لوبیا به ترتیب در رتبه‌های دوم، سوم، سوم، چهارم و دوم بود. جدایه Pf16، که در آزمایش‌های گلخانه‌ای بهترین اثر را داشت از نظر تولید سیانید و سیدروفور و هاله بازدارندگی نیز بالاترین رتبه را داشت ولی تولید پروتئاز نکرد. در مورد جدایه‌هایی که هیچ یک از مواد آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید و پروتئاز را تولید نکردند ولی اثر خوبی روی جوانه‌زنی داشتند بنظر می‌رسد از طریق کلونیزه نمودن سطوح بذر در حال جوانه‌زنی و ریشه باعث حفاظت فیزیکی می‌شوند. لازم است تحقیقات تکمیلی در خصوص بهترین شرایط اکولوژیکی برای فعالیت آنتاگونیستی، رشد و بقای باکتری و نحوه کاربرد مایه تلقیح در سطح مزرعه ادامه براساس نتایج محاسبه جمعیت اولیه باکتریها روی بذور و تعیین جمعیت باکتریها روی ریشه پس از دو هفته در خاک آلوده به گونه *P. ultimum* می‌توان گفت که اغلب جدایه‌های ریزوباکتری توانستند جمعیت اولیه خود را نه تنها حفظ نمایند بلکه از ۷/۳ (محاسبه لگاریتمی میزان واحد تشکیل دهنده کلنی) به ۷/۶ (در جدایه‌های Pf5, Pf17, Pf5) و استرین CHAO، ۸/۱ (در جدایه‌های Pf4 و Pf13) و ۸/۲ (در جدایه‌های Pf7 و Pf28) برسانند که نشانه توانایی این باکتریها برای رقابت و کلونیزه نمودن ریشه لوبیا در خاک می‌باشد. در برخی جدایه‌ها جمعیت باکتری از ۷/۳ به ۶/۸ کاهش یافت. اغلب جدایه‌های *B. subtilis* قادر به کلونیزه کردن ریشه نبودند. ضریب همبستگی این متغیر (قدرت کلونیزاسیون) با توانایی جلوگیری از بیماری ناشی از گونه *P. ultimum* در شرایط گلخانه ۰/۱۴ محاسبه گردید که نشانه عدم همبستگی بین آنها می‌باشد. معمولاً توانایی یک باکتری برای کلونیزاسیون ریشه شرط لازم (نه کافی) برای فعالیت کنترل بیولوژیکی علیه قارچ‌های بیمارگر بشمار می‌رود (۱۳).

در مجموع از بین ۴۱ جدایه مورد استفاده در آزمایش اثر ریزوباکتریها در جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی، تنها ۶ جدایه توانست بخوبی از رشد گونه *P. ultimum* ممانعت کند. ۳ جدایه نیز اصلاً تأثیری نداشتند و ۱۰ جدایه نیز تأثیر ناچیزی در کاهش رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی نشان داد.

در مورد تولید سیانید و پروتئاز توسط ریزوباکتریهای مورد

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. احمدزاده، م. شریفی تهرانی، ع. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۶. جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸ شماره ۳.
۲. اخوت، م. کایزر، و. و غ. مصاحبی. ۱۳۴۶. بررسی بیماری‌های بقولات در ایران. مجله بیماری‌های گیاهی شماره ۳ سال چهارم.
3. Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:67-85.
4. Castric, K.F. & P. A. Castric. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:701-702.
5. Dick, M.W. 1990. Key to *Pythium*. Department of botany School of plant sciences, University of Reading. 64pp.
6. Duiiff, B.J., J. W. Meijer, P. A. H. M. Bakker, & B. Schippers. 1990. Suppression of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* in soil; mode of action. pp. 152-161. *In* keel C., koller B. and Defago G. (eds). Plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth - promoting rhizobacteria. Interlacen, Switzerland.
7. Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopatol.* 26:75-91.
8. Gould, W.D., C. Hagedron, T. R. Bardinellii, & R. Zablutowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent *Pseudomonads* from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:28-32.
9. Howell, C.R., & R. D. Stipanovic. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedling with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 28-84:96.
10. Howell, C.R. & R. D. Stipanovic. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* - induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic. pyoluteorin. *Phytopathology* 70:712-715.
11. Kaiser, W.J., R. M. Hannan. & D. M. Weller. 1989. Biological control of seed rot and pre emergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. *Soil Biol. Biochem.* 21:269-273.
12. Keel, C., D. M. Weller, A. Natsch, G. Defago, R. J. Cook, & L. S. Thomashow. 1996. Conservation of the 2,4- diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent pseudomonas strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:552-563.
13. Keel, C. & G. Defago. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. *In*: Gange AC, Brown VK, eds. *Multitrophic interactions in terrestrial system.* Oxford: Blackwell Science. 27-47.
14. Leong, J. 1986. Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24:187-209.
15. Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Haas, & G. Defago. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology.* 82:190-195.
16. Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas, & G. Defago. 1994. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced production. *Plant pathology,* 44:40-50.
17. Sharifi -Tehrani, A., Y. Zaia, Moenn-Oaccoz, & G. Defago. 1998. Biococontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by fluorescent pseudomonads. *Journal of Med. Fac. Univ. Gent,* 64/3b:425-429.
18. Schaad, N.W., J. B. Jones, & W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 373 pp.
19. Scher, F.M. & R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in Fusarium-suppressive soil. *Phytopathology.* 70:412-417.
20. Schippers, B., A. W. Bakker, & A. H. M. Bakker. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:339-59.
21. Tarpero-Casas, A., W. J. Kaiser, & D. M. Ingram. 1990. Control of *Pythium* seed rot pre emergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. *Plant Dis.* 74:563-569.

22. Waterhouse, G.M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycological papers. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 109:1-15.
23. Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26:379-407.

Effects of Fluorescent Pseudomonads on *Pythium ultimum* Casual Agent of Seed Rot of Common Bean

M. AHMADZADEH¹, A. SHARIFI-TEHRANI², GH. HEJAROUD³, J. ZAD⁴,
M. OKHOVVAT⁵, AND M. MOHAMMADI⁶

1, 2, 3, 4, 5, 6, Ph.D. Student , Professors and assistant professor,
Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

Accepted April. 16, 2003

SUMMARY

Biological control of soil-borne fungal diseases of plants has received a serious attention among plant pathologists in recent years. In this regard, antagonistic rhizobacteria, more specifically fluorescent pseudomonads and certain species of *Bacillus*, are known to control fungal as well as bacterial root diseases of agronomic crops. Rhizospheric microorganisms are thought to be a suitable candidate for biological control since rhizosphere is considered the first line of defense for roots against soil-borne pathogens. In this study, a total of 41 bacterial strains were tested as potential biological control agents against damping off and root rot fungal diseases caused by *Pythium ultimum*. The least isolation capability of S1 medium for fluorescent pseudomonads was 80% and in some regions including the fields in Khoumain, Markazi province, it was up to 90%. Two isolates were identified as *Pseudomonas* sp., three isolates as *P. putida* and the rest were *P. fluorescens*. Isolates Pf8, Pf15, Pf16, Pf26, Pf27 and CHA0 showed the most inhibitory effects against the in vitro growth of *P. ultimum*. Isolates Bs4, Pf6 and Pf20 had no inhibitory effect on *P. ultimum*. A total of 16 isolates including Pf2, Pf4, Pf8, Pf9, Pf13, Pf14, Pf15, Pf16, Pf18, Pf22, Pf26, Pf27, Pf28, Pf31, Pf32 and CHA0 produced hydrogen cyanide. Fourteen isolates including Pf1, Pf5, Pf6, Pf7, Pf12, Pf15, Pf20, Pf21, Pf23, Pf25, Pf27, Pf28, Pf32 and CHA0 produced protease. Bacterial isolates that generated siderophore included Pf1, Pf13, Pf16, Pf26, Pf27, Pf32 and CHA0. Neither *Bacillus subtilis* isolates nor those belonging to *P. fluorescens*, Pf11, Pf17, Pf20 and Pf23, produced any siderophore. None of the bacterial isolates were able to produce cellulase since there was no change of color on filter paper in a tube containing cellulase. Isolates Pf16 and Pf26 significantly increased the fresh weight of bean plants inoculated with *P. ultimum* under the greenhouse conditions. These strains were placed in the same group as the non-inoculated control was. Isolate Pf16 increased seed germination the most. Isolates Pf4, Pf7, Pf13 and Pf28 were the strongest colonizers of bean roots.

Key words: Bean, Biological control, Fluorescent pseudomonads.