

بررسی قابلیت کنترل کنندگی برخی از جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* روی مرگ گیاهچه پنبه در شرایط مزرعه

حجت ا... محمودجانلو - سعید نصرالله نژاد* - اصغر حیدری^۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۱

تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۱۲

چکیده

یکی از مهمترین بیماریهای پنبه در ایران که هر ساله خسارت جبران ناپذیری به کشت این گیاه در مرحله جوانه زنی بذر و در ابتدای رشد گیاهچه‌ها می‌زند، بیماری مرگ گیاهچه پنبه است. مهمترین عوامل این بیماری قارچهای *Pythium spp* و *Rhizoctonia solani* می‌باشند. در این تحقیق امکان کنترل بیولوژیکی این بیماری در شرایط مزرعه با استفاده از باکتریهای آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت. تعداد پنج جدایه باکتری (۳ جدایه از گونه *Pseudomonas fluorescens* و ۲ جدایه متعلق به جنس *Bacillus spp*) بر اساس مطالعه کار آبی آنها در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه انتخاب شدند و دو تیمار قارچکشیهای رایج کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و یک تیمار شاهد در مجموع با هشت تیمار فرعی و دو تیمار اصلی با طرح آماری کرت‌های یک بار خرد شده^۲ در دو سال زراعی ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ با روش پوشش بذری^۳ در چهار تکرار تحت بررسی قرار گرفتند. تاثیر جدایه‌ها و قارچکشیها بر اساس تعداد گیاهچه‌های سالم ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ روز بعد از کشت انجام گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که جدایه (Q42) از گونه *Pseudomonas fluorescens* در دو رقم (ساحل و سای اکرا) و جدایه های GM-5 و GM-4 از جنس *Bacillus spp* بترتیب در ارقام سای اکرا و ساحل به همراه قارچکشیهای کاربندازیم و کاربوکسین تیرام بیشترین تاثیر را از نظر حفاظت گیاهچه هادر مقابل بیماری مرگ گیاهچه داشتند. نتایج بدست آمده برای دو رقم مورد استفاده و سالهای مختلف اندکی متفاوت بود که البته این تفاوتها از نظر آماری معنی دار نبودند. نتایج کلی این آزمایش نوید بخش این امر است که ممکن است بتوان قارچکشیهای شیمیایی را با باکتریهای آنتاگونیست جهت کنترل بیماری مرگ گیاهچه در مزرعه جایگزین نمود که هم مقرون به صرفه تر بوده و هم برای محیط زیست کم خطر تر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پنبه، سودوموناس، باسیلوس، کنترل بیولوژیک، مرگ گیاهچه، پیتیوم، رایزوکتونیا

مقدمه

و *Rhizoctonia solani* می‌باشند. (۱۴). این بیماری که در ابتدای رشد بوته‌ها حادث می‌شود دارای دو حالت بوده که یکی قبل از سر بر آوردن بوته از خاک^۴ می‌باشد که ریشه چه و ساقه چه در هنگام زدن مورد حمله قارچ قرار می‌گیرند و دیگری بعد از سر بر آوردن بوته از خاک^۵ حادث می‌شود، که سبب پوسیدگی طوقه و ریشه گیاهچه گشته و

بیماری مرگ گیاهچه یکی از مهمترین بیماریهای پنبه بوده و مهمترین عوامل این بیماری قارچهای *Pythium spp*.

۱. به ترتیب محقق موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی، تهران

Email: Snasrollanejad@yahoo.com

* نویسنده مسئول

4. preemergence damping –off
5. post emergence damping –off

2. split plot
3. seed coating

oxysporum fsp dianti را در شرایط مزرعه کاهش دهد (۲۰).

احمد زاده و همکاران (۱) با کاربرد یک جدایه از باکتری *Pseudomonas fluorescens* توانستند بیماری مرگ گیاهچه نخود ایرانی ناشی از *Pythium ultimum* را کاهش دهند همچنین زاکی و همکاران (۲۷) یک جدایه از گونه *Burkholderia cepacia* را از خاک مزارع پنبه در آریزونا جدا کردند و نقش آن را بعنوان عامل کنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* (عامل مرگ گیاهچه پنبه) به اثبات رساندند. هول و همکاران (۱۶) یک جدایه *Trichoderma virens* را علیه بیماری مرگ گیاهچه پنبه در شرایط مزرعه در کالیفرنیا، آرکانزاس، هندوستان، می سی سی پی و اوکلاهما امریکا به مدت دو سال در مزرعه‌ای که سابقه بیماری مرگ گیاهچه در شرایط طبیعی بوده آزمایش کردند و نتیجه گرفتند که تیمار بذر پوشش داده شده با *T.virens* و قارچکش متالاکسیل به طور معنی داری نسبت به شاهد، با کاهش بیماری مرگ گیاهچه همراه بوده است. فتاحی راد و همکاران (۷) امکان استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست برای کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه پنبه را شرایط آزمایشگاه و گلخانه با جدایه‌هایی از *Pseudomonas fluorescens* فلورسنت و جنس *Bacillus* بررسی کردند و نتیجه گرفتند هفت جدایه از گروه‌های فوق بیشترین تاثیر را در کنترل بیماری داشتند. امروزه ضد عفونی بذر با قارچکشیهای محافظت کننده عمده ترین روش مبارزه شیمیایی با بیماری مرگ گیاهچه پنبه می‌باشد قارچکشیهای مورد استفاده در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه علی رغم موثر بودن دارای معایبی نیز می‌باشند از آن جمله می‌توان به تاثیرات سوء بر روی میکروارگانیسم‌های غیر هدف، آلوده سازی محیط زیست و ایجاد مقاومت اشاره نمود. علوی و آهون منش (۶)، حسن زاده (۴)، حیدری و همکاران (۱۴). مشکلات فوق لزوم جستجو و آزمایش روش‌های غیر

نهایتاً "ممکن است به مرگ کامل گیاهچه منجر گردد (۲۷). چندین گونه قارچ *Pythium* از جمله *P. ultimum* , *P. debaryanum* , *P. irregulare* , *P. aphanidermattum* در این پوسیدگی‌ها دخالت دارند. گونه *Pythium ultimum* یکی از عوامل مهم مرگ گیاهچه پنبه در قبل و بعد از رویش گیاهچه‌ها در منطقه گزارش شده است (۵). عامل مهم دیگر قارچ *R. solani* از گروه آناتوموزی AG-4 می‌باشد که در ایران بعنوان بیمارگر مرگ گیاهچه معرفی شده است (۲).

مطالعات انجام شده طی صد سال گذشته ثابت کرده است که انواع بسیار زیادی از میکروارگانیسم‌ها دارای اثرات آنتاگونیستی بر عوامل بیماری‌زا گیاهی دارند (۱۲). خاک یک اکوسیستم بسیار پیچیده حاوی موجودات زنده مختلف شامل میکروارگانیسم‌ها، بی‌مهرگان مختلف و موجودات دیگر است که در آن رقابت برای مواد غذایی بسیار شدید است. میکروارگانیسم‌های مفید خاک مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها حجم زیادی از خاک اطراف ریشه گیاه را اشغال کرده‌اند این میکروارگانیسم‌ها از مواد آلی و ترشحات ریشه تغذیه میکنند. رقابت آنها با عوامل بیماری‌زا مانند *Pythium spp* و *Rhizoctonia spp* اهمیت زیادی در کاهش خسارت عوامل بیماری‌زا از خاک دارد (۱۵).

در سال‌های اخیر پژوهش‌های چندی در مورد مبارزه بیولوژیک با بیمارهای گیاهی انجام شده است. در این پژوهش‌ها، پژوهشگران با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست موفق به کنترل موثر بیماری‌های گیاهی گردیده‌اند. کلپر و همکاران (۱۹۸۰) آنتاگونیست‌های زیادی از جمله *P. fluorescens* , *Burkholderia* , *P. putidae* , *Bacillus subtilis* را در این رابطه مورد آزمایش قرار دادند و ثابت کردند که گونه‌های مذکور بطور موثری باعث کنترل بعضی از بیمارگرهای گیاهی شده‌اند، همچنین نشان دادند، جدایه H237 از *P. fluorescens* می‌تواند درصد بالائی از جمعیت قارچ *Fusarium*

این ایستگاه یکی از ایستگاههای اسکرین بیماریهای پنبه می باشد. جدایه های باکتری استفاده شده در این طرح از گروههایی بودند که قبلاً خاصیت آنتاگونیستی آنها در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده بود و بهترین تاثیر را در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در آزمونهای گلخانه ای داشتند برای اینکار نمونه های مختلفی از خاک مزارع پنبه از ناحیه ریزوسفر بوته های سالم واقع در مجاورت بوته های آلوده جمع آوری گردید و در محیط کشت های عمومی نوترینت آگار (NA) و آب آگار (WA) و اختصاصی کینگ بی (Kings, B) خالص سازی و جدا شدند و بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موجود در منابع و با کلید شناسایی باکتری ها در طرح جداگانه ای در سال ۱۳۸۰ در آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی مورد شناسایی قرار گرفتند. کد گذاری جدایه ها بر اساس منطقه جمع آوری نمونه ها (K برای کارکنده، GM برای گرجی محله) و شماره جدایه ها انجام گردید در ضمن جدایه های (Q) از جدایه های اهدایی بودند. جهت غربال نمودن باکتریهای آنتاگونیست از آزمونهایی چون آزمون کشت متقابل و آزمون چهار نقطه ای انجام پذیرفت همچنین در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد آزمایش قرار گرفتند و از نظر خاصیت آنتاگونیستی نسبت به جدایه های دیگر برتری نشان دادند. جدایه های فوق در آزمایشگاه نباتات صنعتی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی تهران بصورت کلکسیون نگهداری می شوند. (۷)

تیمار بذور پنبه با جدایه های باکتری و قارچ کش ها

برای این کار از روش حیدری و میساقی (۱۴) به شرح ذیل استفاده گردید. ابتدا سه کیلوگرم بذر پنبه از هر یک از ارقام پنبه ساحل و سای اکرا ۳۲۴ با قوه نامیه بالای ۹۸ درصد تهیه گردید. بذور فوق با اسید سولفوریک غلیظ کرک زدایی (دلپتته) شدند. ابتدا ۲۰۰ تشتک پتری حاوی محیط

شیمیایی را اجتناب ناپذیر نموده است. هدف از اجرای این تحقیق بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با بیماری مرگ گیاهچه پنبه و همچنین عوامل این بیماری با استفاده از باکتریهای آنتاگونیست در شرایط مزرعه بوده است.

مواد و روش ها

نوع طرح

این مطالعه در طرح آزمایشی با کرت های یک بار خرد شده^۱ در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار تکرار که در آن دو رقم پنبه ساحل و سای اکرا ۳۲۴ در کرت های اصلی و پنج جدایه باکتری های آنتاگونیست از گروه سودوموناس فلورسنت (Q97، KK-7، Q42) و باسیلوس (GM-4، GM-5) و دو قارچکش کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و یک تیمار شاهد منفی در مجموع با هشت عامل فرعی در کرت های فرعی قرار گرفتند در ایستگاه تحقیقات پنبه کارکنده (واقع در ۳۵ کیلومتری غرب گرگان) در سالهای (۸۲-۱۳۸۱) به اجراء در آمد. مزرعه تحت آزمایش بعد از شخم عمیق زمستانه بر اساس آزمون خاک (نمونه برداری ها) کود پاشی از نوع سولفات پتاسیم و اوره و فسفات آمونیوم انجام گرفت و بعد از دیسک زنی در چند نوبت بطور متناوب و استفاده از علف کش سونالان و ترفلان، کاشت آزمایش در نیمه دوم اردیبهشت انجام شد. هر کرت فرعی با چهار خط کاشت به طول ۶ متر و با تراکم کاشت ۲۰×۸۰ سانتی متر کشت گردید. در هر چال کاشت ۳ عدد بذر با قوه نامیه بالای ۹۸ درصد در همه کرتها به طور یکسان کاشته شد. ملاک سنجش تاثیر عوامل آزمایش تعداد گیاهچه باقیمانده^۲ بود که به فاصله هر ۱۵ روز در چهار نوبت در دو خط وسط کرت های فرعی انجام شد.

1. split plot
2. stand

کشت اختصاصی Kings, B (۴۰ تستک پتری برای هر جدایه) تهیه گردید. و هر پتری بوسیله ۳۰۰ - ۲۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه باکتری کشت گردید. تستکهای پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند (۴). پس از ۷۲ ساعت کلنی‌های هر جدایه بوسیله آب مقطر استریل از محیط کشت شسته و بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر از هر جدایه با غلظت 10^9 cfu/ml تهیه گردید از طرف دیگر جهت پوشش کامل و تیمار جدایه‌ها با بذور پنبه محلول ۲ درصد متیل سلولز درون فلاسک شیشه‌ای در پیچ دار تهیه گردید. برای حل شدن کامل پودر متیل سلولز در آب، ابتدا آب را گرم کرده، به آرامی پودر مذکور به آن افزوده و پس از یکنواخت شدن محلول توسط دستگاه ورتکس به سوسپانسیون جدایه‌های باکتری اضافه گردید. سپس بذور پنبه را به بشر محتوی سوسپانسیون جدایه‌ها و متیل سلولز اضافه نموده تا پوشش بذر کامل انجام گیرد. بعد از ۴ - ۳ ساعت بذور را از درون بشر با استفاده از دستکش سترون خارج نموده و در زیر هود استریل پخش گردید تا خشک گردند. قابل ذکر است که در جهت ارزیابی کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه توسط جدایه‌های آنتاگونیست در مقایسه با قارچکشهای رایج، قارچکشهای کاربوکسین تیرام و کاربندازیم انتخاب شدند. تیمار بذور با قارچ کش‌ها بر اساس توصیه شرکت سازنده و منابع موجود به میزان ۴۰۰ - ۲۰۰ گرم از ماده موثر در ۱۰۰ کیلوگرم بذر (۴ - ۲ در هزار) مصرف شد (۳) به طوریکه لایه بسیار نازکی از سم بذور پنبه را پوشش داد. برای تیمار شاهد منفی بذور فقط با محلول متیل سلولز ۲ درصد پوشش داده شدند.

جهت تعیین اثر عوامل فرعی، اصلی، اثر سال و اثرات متقابل آنها در صفات، یادداشت برداری تجزیه آماری مرکب (دوساله) با نرم افزار MSTATC انجام گرفت و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند. برای اطمینان از وجود عوامل بیماری مرگ گیاهچه

پنبه و آلودگی طبیعی مزرعه، طوقه و ریشه‌های گیاهچه آلوده و بذور پوسیده از مزرعه جمع آوری گردید. پس از شستشوی ملایم بافت در زیر جریان آب شیر به مدت چند دقیقه، ضد عفونی آن با فروربردن در محلول ۱۰ درصد مایع سفید کننده موجود در بازار (حاوی ۵٪ هیپو کلریت سدیم) و خشک کردن روی کاغذ صافی استریل قطعات از مرز بافت آلوده و سالم انتخاب گردید و بر روی تستکهای پتری حاوی محیط کشت آب آگار (WA) انتقال داده شد. پتری‌ها در انکوباتور (در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند و پس از ۱۲ تا ۴۸ ساعت نگهداری و مشاهده ریشه‌های نظیر ریزوکتونیا، پی تیوم، فوزاریوم، آسپرژیلوس، پنی سیلیوم که بیشترین آنها از گروه ریزوکتونیا و پی تیوم بودند در استریومیکروسکوپ از نوک ریشه‌ها نمونه‌ای برداشت شد و به لوله آزمایش حاوی PDA انتقال داده شد. این لوله‌ها در تاریکی و در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد انکوباتور به مدت ۳ - ۲ هفته نگهداری شد تا کلنی جدایه‌های قارچی کاملاً رشد نموده و در آنها سختینه تولید شود و سپس درب لوله‌ها بوسیله پارافلم بسته شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس مرکب در بررسی تاثیر عوامل باکتریایی (فاکتور فرعی) و ارقام پنبه و اثرات متقابل آن در تعداد بوته‌های سبز جدول (۱) نشان می‌دهد که اثر سال در تعداد گیاهچه در ۱۵ روز بعد از کاشت در سطح یک درصد و در روزهای ۳۰، ۴۵، ۶۰ روز بعد از کاشت در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد. تاثیر ارقام پنبه بر صفات فوق در هیچ یک از مراحل یادداشت برداری معنی دار نمی‌باشد و این در حالی است که جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) روی تعداد گیاهچه سبز در

دار نبودند و به عبارت دیگر جدایه‌های مناسب برای کنترل عوامل مرگ گیاهیچه برای اکثر ارقام قابل تعمیم می‌باشد. اثرات متقابل ارقام × جدایه‌های باکتری × سال در هیچ یک از مراحل یادداشت برداری صفات معنی دار نبودند و نتیجه کلی اینکه جدایه‌های مناسب برای پنبه در سالهای مختلف قابل تعمیم می‌باشد.

مقایسه میانگین تعداد گیاهیچه سبز در جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) و ارقام پنبه حاصل از تجزیه مرکب بروش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در جدول (۱) نشان می‌دهد که تیمارهای قارچکش کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و جدایه باکتری Q42 به لحاظ برخورداری از بالاترین تعداد گیاهیچه سبز در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از کاشت در یک کلاس واقع شده و اختلاف بین آنها معنی دار نمی‌باشد و نسبت به تیمار کنترل (شاهد) در کلاس بالاتری قرار دارند به بیان دیگر اینکه جدایه باکتری Q 42 می‌تواند به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک جهت عوامل بیماری مرگ گیاهیچه پنبه محسوب گردد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل ارقام × جدایه‌های باکتری (عوامل فرعی) جدول (۲) حاصل از تجزیه واریانس مرکب نشان می‌دهد که در رقم ساحل جدایه Q42 و GM-5 به لحاظ برخورداری از بیشترین تعداد گیاهیچه در کلیه مراحل از مؤثرترین عوامل بعد از قارچکشها در کنترل بیماری می‌باشند و در رقم سای اکرا ۳۲۴ جدایه GM-4 و Q42 در صفات فوق با قارچکشها در یک کلاس واقع هستند و در کنترل بیماری مؤثر هستند بنابراین با دو سال بررسی مزرعه‌ای با آغشته سازی جدایه‌ها با بذور^۱ دو رقم پنبه این نتیجه مهم به دست می‌آید که جدایه باکتری Q42 از گروه *Pseudomonas fluorescens* برای ارقام ساحل و سای اکرا ۳۲۴ و جدایه GM-4 از گروه *Bacillus spp* برای رقم سای اکرا ۳۲۴ و جدایه GM-5 از همین گروه برای رقم ساحل در کنترل بیماری مؤثر می‌باشند.

۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از کاشت به طور معنی داری در سطح آماری یک درصد موثرند. اثر متقابل سال × ارقام در هیچ یک از مراحل یادداشت برداری در صفت فوق معنی دار نمی‌باشد و اثر متقابل سال × جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) در ۱۵ روز بعد از کاشت در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد و در بقیه مراحل یادداشت برداری در صفت فوق اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود. اثر متقابل ارقام × جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) در تعداد گیاهیچه سبز در ۱۵ و ۳۰ روز بعد از کاشت در سطح ۵ درصد معنی دار می‌باشد و اختلاف در بقیه مراحل یادداشت برداری در صفات فوق معنی دار نمی‌باشد. اثرات متقابل سه عامل ارقام × جدایه‌های باکتری (فاکتور فرعی) × سال روی تعداد گیاهیچه سبز در هیچ یک از مراحل یادداشت برداری معنی دار نبوده است (جداول ۱ و ۲). نتایج تحقیقات دو ساله نشان می‌دهد که اثر سال بر فعالیت عوامل بیماری مرگ گیاهیچه تاثیر دارد و این تاثیر در اوایل کاشت بذور بیشتر مشاهده می‌شود. بذرها دو رقم پنبه از نظر خسارت عوامل مرگ گیاهیچه عکس العمل یکسان داشتند این نتیجه جدایه باکتری مناسب را برای کنترل بیماری مرگ گیاهیچه برای پنبه فراهم می‌کند. ارقام پنبه تحت تاثیر سال عکس العملی مشابه در خسارت عوامل بیماری داشتند. جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) تحت تاثیر سال روی تعداد گیاهیچه‌های سبز در اوایل کاشت بذور یعنی حداکثر دو هفته بعد از کاشت که با نوسانات تغییرات آب و هوایی توأم است متفاوت بوده و پس از سپری شدن ایام فوق و با مساعد شدن شرایط آب و هوایی و مناسب شدن رشد بوته‌ها عکس العمل یکسانی داشتند و به بیان دیگر اینکه جدایه‌های مناسب معرفی شده برای کنترل عوامل بیماری مرگ گیاهیچه پنبه وابسته به شرایط سال نمی‌باشد. ارقام پنبه تحت تاثیر جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی) بعد از سپری شدن حدود ۳۰ روز از کاشت تاثیر جدایه‌ها روی ارقام معنی

جدول (۱) مقایسه میانگین مرکب * تعداد گیاهچه سبز^۱ در ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۵۰ روز بعد از کاشت در ارقام و جدایه‌های باکتری (فاکتورهای فرعی)

تعداد گیاهچه ۶۰ روز ه	تعداد گیاهچه ۴۵ روز ه	تعداد گیاهچه ۳۰ روزه	تعداد گیاهچه ۱۵ روز ه	تیمارها
a107	a108	a109	a113	ارقام
a108	a109	a111	a117	ساحل
				سای اکرا - ۳۲۴
				عوامل فرعی
bcd107	bc108	bcd109	bcd114	جدایه GM-5
abc113	ab114	ab116	ab120	جدایه Q 42
d100	c102	d103	cd108	جدایه Q 97
bcd105	bc107	bcd108	bcd114	جدایه GM-4
d99	c101	cd101	d107	جدایه KK-7
a122	a123	a123	a127	قارچکش کاربوکسین تیرام
ab114	ab115	ab116	abc119	قارچکش کاربندازیم
cd109	c101	d104	bcd110	شاهد

*: در هر ستون تفاوت اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نمی باشد

جدول (۲) مقایسه میانگین مرکب * تعداد گیاهچه سبز در ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز بعد از کاشت در اثر متقابل ارقام پنبه بر جدایه‌های باکتری (فاکتور فرعی)

تعداد گیاهچه ۶۰ روزه	تعداد گیاهچه ۴۵ روزه	تعداد گیاهچه ۳۰ روزه	تعداد گیاهچه ۱۵ روزه	اثر متقابل
abcd112	abcde113	abcde113	abcde118	ساحل
abc116	abcd116	abc119	abc122	جدایه Q 42
bcde104	bcdef105	cde105	cde109	جدایه Q 97
cde99	def100	cde101	cde108	جدایه GM-4
bcde104	bcdef106	cde106	bcde112	جدایه KK-7
ab119	abc119	abc119	abc124	کاربوکسین تیرام
abcde106	abcdef108	bcde108	cde109	کاربندازیم
cde95	ef96	de97	de103	شاهد
bcde103	cdef103	cde104	bcde111	سای اکرا
abcde110	abcdef112	abcde114	abcde118	جدایه Q 42
de95	ef98	de100	cde108	جدایه Q 97
abcd112	abcde114	abcd115	abcd120	جدایه GM-4
e93	f94	e96	e101	جدایه KK-7
a124	a125	a127	a130	کاربوکسین تیرام
ab121	ab122	ab124	ab128	کاربندازیم
bcde104	bcdef105	abcde111	abcde116	شاهد

*: در هر ستون تفاوت اعداد که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار نمی باشد.

برگر و همکاران در سال ۱۹۸۶ نشان دادند که فعالیت عوامل بیوکنترل مشخصی توسط گونه های گیاهی خاصی محدود می گردند. در واقع متابولیت های گیاهی ترشح یافته مثل ترکیبات ضد میکروبی می توانند به صورت انتخابی از احاطه سازی ریشه توسط گروه های خاصی از میکروارگانیسم ها جلوگیری نمایند. بنابراین یکی از دلایل تنوع عوامل بیوکنترل در کاهش بیماری یا افزایش محصول می تواند پاسخ نوع رقم به عوامل بیوکنترل باشد. نان داکومار و همکاران در سال ۲۰۰۰ اعلام کردند که کنترل بیولوژیک توسط سودو مونسهای فلورسنت یک استراتژی مؤثر مدیریت بیماری های خاکزاد می باشد. توانایی سودو مونسهای فلورسنت در اشغال سریع ریزوسفر بسیاری از گیاهان این گروه از باکتریها را یک گروه تاکسونومیک جالب برای مطالعات بیوکنترل می سازد. سودو مونس فلورسنت در هر ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد یک نسل تولید می کند ولی گونه های باسیلوس در هر ۳۹ ساعت در همین دما یک نسل به وجود می آورد رشد سریع گونه های سودو مونس و انتخابی عمل نمودن آنها به خاطر تمایل بالای باکتریهای گرم منفی در جذب شدن به سمت ترشحات اسیدهای آمینه در آنها یک ویژگی برتر در رقابت با سایر میکرو فلور ریزوسفر می دهد. (ساسلو و سچروس، ۱۹۸۲). از طرفی دیگر عوامل بیوکنترل جنس باسیلوس از جمله گونه *Bacillus subtilis* در دامنه وسیعی از شرایط محیطی زنده باقی مانده و به صورت موفقیت آمیزی میزبان را احاطه می سازند. (۲۴).

همانگونه که در جدول (۲) نشان داده شد از میان پنج جدایه باکتری استفاده شده در آزمایش جدایه باکتری Q42 از گروه *Pseudomonas fluorescens* در دو رقم پنبه و دو جدایه (GM-4, GM-5) از گروه *Bacillus spp* برترتیب در

رویدادهاست و نتایجی که از هر دو روش غربال کردن (انتخاب اولیه) به دست می آید ممکن است فقط در همان شرایط معتبر باشد و تغییر در هر یک از متغیرها از قبیل محیط کشت، حرارت، زمان و مکان ارزیابی مزرعه ای ممکن است نتایج متفاوتی نشان دهد (۹). بنابراین مطالعات زیادی از صفات میکروارگانیسم ها مورد نیاز می باشد و این اطلاعات باید هنگام انتخاب اولیه عوامل بیوکنترل در اختیار باشد تا به کار گرفته شوند اما تهیه این اطلاعات مفصل از تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها در مرحله انتخاب اولیه نیاز به آزمایشات بسیاری داشته و کاری دشوار، گران و غیر ممکن است. بنابراین آزمایشات مزرعه ای برای تعیین ثبات اثر عوامل بیوکنترل در شرایط مختلف محیطی مورد نیاز است. عموماً اعتقاد به این است که هیچ ارتباطی بین بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی و بازدارندگی بیماری در شرایط مزرعه ای وجود ندارد. محققان زیادی بیان داشته اند که آنتاگونیسم (آنتی بیوزپس) در شرایط آزمایشگاهی اشتباه آمیز بوده و هیچ ضمانتی برای ویژگی آنتاگونیستی در شرایط زنده محسوب نمی شود و ممکن است منجر به حصول نتیجه مطلوب نگردد اگر به عنوان تنها ویژگی انتخاب یک جدایه به حساب آید. (۲۱) بهترین روش برای انتخاب استرین های کارا این است که ابتدا آنها در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه ای آزمایش گردند قبل از آنکه برای ارقام توصیه شوند اگر چه حصول بیوکنترل ثابت یک شکل ویژه در کاربرد عوامل بیوکنترل باکتریایی محسوب می گردد ولی در این میان درک بیشتر شرایط اکولوژیکی عوامل بیوکنترل می تواند کمک زیادی نماید. (۲۵) اثر عوامل بیوکنترل به میزان زیادی تحت تاثیر طبیعت فیزیکی - شیمیایی خاک، رطوبت و دمای خاک واقع می شود. (۲۲).

ارقام ساحل و سای اکرا به طور مؤثر و معنی داری در شرایط مزرعه در دو سال اجرای آزمایش باعث افزایش تعداد گیاهچه‌های سبز شدند و عوامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه با کاهش میزان مرگ و میر بوته‌ها کنترل شد. همچنین در مقایسه میان عملکرد جدایه‌های فوق با تیمار شاهد (کنترل) و تیمارهای مربوط به قارچکش‌های کاربوکسین تیرام و کاربندازیم انجام شده جدول (۱) ملاحظه گردید جدایه‌های فوق در سطح آماری همانند قارچکشهای کاربوکسین تیرام و کاربندازیم و بهتر از جدایه‌های دیگر و شاهد (کنترل) عمل کردند. با توجه به نتایج به دست آمده از محاسبات آماری مشخص شد که سطوح عملکرد بهتر جداول را باکتریهای گروه *Pseudomonas fluorescens* اشغال نموده اند.

البته در بررسیهای که در سال ۱۹۹۰ توسط توماسو و ولر انجام گرفت، اهمیت تولید آنتی بیوتیکی به نام فنازین - کربوکسیلیک اسید توسط این باکتریها مورد تأیید قرار گرفته است. عامل دیگر ضد قارچی این گروه از باکتریها به نام آنترانیلیک اسید نیز مورد شناسایی این دانشمندان قرار گرفته است به علاوه اینکه تولید سیدروفور نیز به عنوان عامل دیگر شناسایی شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت عواملی مثل تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور در این آزمایش نقش مهمی داشته است و یا در بررسیهایی به عمل آمده بعضی از باکتریهای *Pseudomonas* به شدت ریشه‌ها را کلنیزه نموده و باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند این افزایش رشد یا اینکه ممکن است از طریق عوامل رشدی حاصل شود اما یک دلیل مهم برای این واکنش شکست رقیبان پاتوژنی در ریزوسفر و متعاقباً حفاظت ریشه‌ها علیه بیماری توسط بعضی از باکتریها می‌باشد. به هر حال در مورد مکانیزم عمل دو جدایه فوق در کاهش و جلوگیری از رشد قارچهای عوامل بیماری نظرات مختلفی وجود دارد به عنوان

مثال (۲۵) رقابت برای جذب مواد غذایی یا تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور (که از خواص سود و موناساهای فلورسنت) می‌باشد را مؤثر در این زمینه می‌داند و محققین دیگر این مطلب را تأیید می‌کنند. دکون وبری (۱۹۹۳)، میلوس و روتروک (۱۸). تولید آنتی بیوتیک‌های مختلف توسط اکثر جدایه‌های سود و موناساهای فلورسنت و جنس *Bacillus* مورد استفاده در کنترل بیولوژیک به عنوان مکانیزم اصلی جلوگیری از رشد قارچ و کنترل بیماری ذکر شده است.

پس از آنتی بیوتیک‌ها مهمترین نقش را سیدروفورهای باکتریهای سود و مونااس دارند. سیدروفورها به علت جذب آهن سه ظرفیتی و انتقال آن به ریشه‌های گیاه خصوصاً در خاکهاییکه‌چار کمبود آهن می‌باشند سبب کنترل بیماری می‌شوند. در خصوص نقش سیدروفورها در محدود شدن رشد و فعالیت قارچ *R. solani* نیز گزارشات وجود دارد. عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه برای رشد هیف خود به آهن نیازمند است. هر عاملی که از دسترسی میکرو ارگانسیم‌ها به آهن موجود در محیط ممانعت به عمل آورد در واقع اکولوژی میکرو ارگانیزم را تغییر داده است. سیدروفورها ترکیبات خارج سلولی^۱ با وزن مولکولی کم هستند که میل ترکیبی بالایی نسبت به آهن فریک (سه ظرفیتی) دارند. آهن با تمام فراوانی در خاک به طور آزاد و محلول در pH قلیایی یافت نمی‌شود. بنابراین در شرایط قلیایی وقتی دسترسی به آهن محدود می‌شود میکرو ارگانیزم در صورت نداشتن یک سیستم جذب مناسب آهن مثل سیدروفور، از آهن محروم می‌ماند در واقع پیوند سازی سیدروفورها با آهن سه ظرفیتی آن را به شکل غیر قابل استفاده برای عامل بیماری زا مبدل می‌نماید

1. Extera cellular

ریشه این است که آنها باید در برابر مکانیسم های دفاعی میزبان مقاومت نمایند روی سطوح ریشه ها آنزیم هایی وجود دارند که می توانند باعث تولید موادی اکسیژن دار مثل پراکسید هیدروژن و O₂ شوند بنابراین لازم است کلنیزه کنندگان خود را در برابر این عوامل مصون نگه دارند (۸).

این تحقیق یک بررسی جهت شناسایی و کاربرد تعدادی از جدایه های باکتری موفق در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای در شرایط مزرعه و شرایط طبیعی می باشد و همانگونه که عنوان شد یکی از اهداف بررسی های آزمایشگاهی و گلخانه ای کاربرد عوامل بیولوژیک و استفاده آن در شرایط مزرعه و طبیعی است و جا دارد در آینده بررسی های مزرعه ای بیشتری در مناطق مختلف پنبه کاری کشور و بهینه سازی فرمولاسیون آنتاگونیست ها، پیدا کردن مواد همراه مناسب و روشهای مختلف کاربرد مواد فوق از جمله محلول پاشی در بستر کاشت که مواد بیولوژیک بیشتر در تمامی محیط و بذر قرار می گیرند انجام گیرد.

و در نتیجه از مقدار و یا میزان فعالیت پاتوژن کاسته می شود (۷).

از جمله مکانیزم های مورد اشاره برای باکتریهای سود و موناس آنتاگونیست عوامل بیماری زا تولید ترکیب فرار سیانید هیدروژن می باشد (۱۳). محققین متذکر می شوند که ترکیب مذکور برای قارچها ماده ای سمی به شمار می آید و نیز این ترکیب با تاثیر بر متابولیسم گیاه موجب انگیزش تشکیل ریشه های موین فراوانی می گردد. همچنین احتمال داده که این ترکیب در افزایش مقاومت گیاه میزبان مؤثر باشد نکته جالب آنکه تولید سیانید هیدروژن بر اثر حضور عنصر آهن انجام می گیرد به عبارت دیگر می توان این گونه نتیجه گرفت که در هنگام کمبود آهن باکتریهای سود و موناس فلورسنت تولید ترکیب سیدروفور و در شرایطی که عنصر آهن به مقدار کافی در دسترس می باشد تولید سیانید هیدروژن می کنند.

بعد از گروههای *P. fluorescens* به لحاظ آماری باکتریهای *Bacillus spp* جای گرفتند این باکتریها ترکیباتی را به نام باسیلیسین^۱ و فتجیامایسین^۲ که از یک بخش چربی c18 - c15 و یک بخش پپتید^۳ حاوی هشت باقی مانده اسید آمینه تشکیل شده تولید می کنند. قابل ذکر است که فتجیامایسین مانع از رشد قارچهای ریشه ای می گردد. بنابراین استنباط می شود دلیل عملکرد گروه *Bacillus spp* در آزمایش مزرعه ای شاید مساله فوق باشد. می توان نتیجه گرفت که در خصوص عدم توانایی جدایه های دیگر در کنترل این بیماری در این آزمایش شاید عدم توانایی آنها در کلنیزه کردن ریشه یا تولید پائین آنتی بیوتیکها و به طور کلی مواد ضد قارچی است. و در واقع یک مشخصه برای کلنیزه کنندگان

1. bacilysin
2. Fengyamyacin A, B
3. peptide

منابع

۱. احمد زاده، م. کریمی، ع. ۱۳۷۹. مهار بیولوژیک عوامل بیماری زای گیاهی خاکزی در محیط اطراف ریشه (ریزوسفر) توسط باکتریها (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران، شماره ۱۹، ۲۶ (ص).
۲. ارشاد، ج. ۱۳۷۴. فارچهای ایران. انتشارات سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی. ۸۷۴ (ص).
۳. بامدادیان، ع. ۱۳۷۵. قارچکش و کاربرد آنها در کشاورزی. انتشارات برهمند. ۲۳۵ (ص)
۴. حسن زاده، ن. ۱۳۷۴. اصول و روشهای باکتریای شناسی گیاهی، مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی چاپ اول، ۶۴۱ (ص)
۵. حمداله زاده، الف. منصوری، ب. ۱۳۷۳. بررسی تکمیلی بیماریهای قارچی پنبه در ایران. گزارش نهایی بخش آفات و بیماریهای گیاهی. مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان و گنبد.
۶. علوی، ا.ع، آهون منش. ۱۳۷۶. کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی خاکزاد (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران، جلد اول، ۴۰۴ (ص)
۷. فتاحی راد، ه. حیدری، الف و زمانی زاده، حمید رضا. ۱۳۸۰. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری ریزوکتونیایی مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از باکتریهای آنتا گونیست. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران
۸. مژدهی، ح. ۱۳۷۳. کنترل بیماریهای گیاهی (ترجمه). مرکز انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۵۱۴ (ص).
9. Anderws, J.H. 1992. Biological control in the Phylosphere. Ann. Rev. Phytopathology : 30 : 603-635.
10. Berger, F., L., White, D., Frazer, R., and Leifert, C. (1986). Effect of pathogen inoculum , antagonist density and plant species on biological control of *Phytophthora* and *pythium* damping off by *Bacillus subtilis* cot1 in high humidity fogging glasshouses. phytopathology 86 : 428-433.
11. Blakeman, j. p., and Fokkema , N. J. (1982). Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Ann. Rev. phytopathology 20: 167- 192.
12. Cook, R.J. 2000. Advances in plant health management in the 20th century. Annual Review of phytopathology 38:95-116.
13. Defago , G. and Hass. D. 1990 , *Pseudomonas* as antagonists of soil - born plant pathogens ; Mode of action and Genetic analysis soil Biochemistry , 16 : 397-403.
14. Heydari , A. and Misaghi , I. J. 1998, Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide treated soils. Plant and Soil 202: 109-116.
15. Honitink, H.A.J. and Boechm, M.J. 1999. Biocontrol with in the contex of soil microbial communities : A substrate dependent phenomenon. Annual Rewiew of Phytopathology 370, 427-446.
16. Howell, C. R, James E. Devary. Richard H. Garber , and william E. Batson. 1997. Field control of cotton seedling Diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments Journal of cotton Science 1: 15 -20.
17. Leben, C. (1994). In fluence of bacteria isolated from healthy cucumber Leaves on two leaf disease of cucumber. Phytopathology 54: 405-406.
18. Milus , E.A., and Rothrock, C.S. 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling Pytium root rot of winter wheat Plant Disease 81: 180-184.
19. Nandakumar, R., Babus, S., viswanathan, R., Reguchandeer, T. and Samiapan , R. 2000. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil biology and Biochemistry 33 (2001), 603-612.

20. Raaijmakers, J.M. Leeman, M. Schippers, B. and Baker, P.A. 1995. Dose-response relationships in biological control of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85:1075-1081.
21. Sakltivel, N., and Gnanamanicham, S. S. (1987). Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oriza sativa* L.) *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9). 2056-2059.
22. Suslow, T. V., Schroth, M. N. and Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathol.* 72:917-918.
23. Thomashow, L. S., and Weller, D. M. (1990). Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant and soil*. 129: 93-99.
24. Turner, J. T., and Backman, P.A. (1991). Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Dis.* 75: 347-353.
25. Weller, D. M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. phytopathol.* 26 : 379- 407.
26. West, A.M., Burges, H.D., Dixon, T.J., and Wybon, C.H. (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* and *B. subtilis* spore inocula in soil. Effects of pH, Moisture, Nutrient availability and indigenous.
27. Zaki, K. I, J. Misaghi, and A. Heydari. 1998. Control of cotton seedling damping-off in the field by *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Plant Disease* P: 291 - 293.

Biocontrol potential of some *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolates on seedling damping –off of cotton in field condition

H. Mahmoodjanlou - S. Nasrollanejad* - A. Heydari¹

Abstract

One of the most important cotton diseases in Iran is post emergence cotton seedling damping –off which causes significant losses annually. The most important agents of these diseases in Iran are *Pythium* spp. and *Rhizoctonia solani*. In this study the possibility of biological control using bacterial antagonists in the field was investigated. Five bacterial isolates (three belonging to *Pseudomonas fluorescens* and two *Bacillus* spp.) were selected for this study based on their performances in the greenhouse experiments. Two cotton varieties (Sahel and Saiokra) were used in this experiment and seed coating procedure was followed for bacterial application. The study was carried out in a cotton fields in Golestan province during 1381 and 1382 (2002 and 2003) growing seasons. Two commonly used fungicides (Carbendazim and Carboxin thiram) were also used for comparison. The efficacy of bacterial isolates and fungicides was evaluated based on the number of healthy seedlings (stand) 15, 30, 45 and 60 days after sowing. Results indicated that three bacterial isolates (one *Pseudomonas fluorescens* and two *Bacillus* spp.) along with fungicides showed the most effectiveness in control of cotton seedlings against damping-off disease in both years. The results obtained for two cotton varieties in different years varied but the differences were not statistically significant. The differences in the obtained results in different years may be due to the variation in environmental conditions. The overall result of this study shows the possibility of using antagonistic bacteria and fungicides in the cotton fields as biological control agents (BCA).

Key words: Cotton, *Pseudomonas*, *Bacillus*, Biocontrol, Damping-off *Pythium*, *Rhizoctonia*

* Corresponding author Email: Snasrollanejad@yahoo.com

1. Cotribution From Cotton Research Institute of Iran, Gorgan. University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan. Plant Protection Reserch Institute, Tehran