

آفات و بیماری‌های گیاهی

جلد ۷۲ شماره ۱، شهریور ۱۳۸۳

بررسی امکان استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست برای کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه

Investigation on the possibility of using bacterial antagonists for biological control of cotton seedling damping-off in green house

اصغر حیدری^۱، هیوا فتاحی^۲، حمیدرضا زمانی زاده^۲، نادر حسن زاده^۲، لاله نراقی^۱

۱- موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی

۲- واحد علوم و تحقیقات-دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

در این تحقیق امکان کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۵۰ جدایه باکتریایی جدا شده از خاک و ریزوسفر مزارع پنبه و چغندر قند استان‌های خراسان، سمنان و گلستان از کلکسیون موجود در آزمایشگاه انتخاب و خواص آنتاگونیستی آنها بر علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه بر روی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده ۱۷ جدایه از موثرترین جدایه‌ها جهت انجام آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند. جدایه‌های فوق در گلخانه با دو روش پوشش بذری (Seed coating) و افزودن سوسپانسیون به خاک (Soil drench) بر علیه دو شکل بیماری مرگ گیاهچه در حالت قبل و بعد از سر برآوردن گیاهچه از خاک (Pre- and post emergence damping-off) و در مقایسه با قارچکش‌های یتاواکس و کاربوکسین- تیرام مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده در مجموع ۷ جدایه باکتری موثرترین جدایه‌ها از نظر کاهش بیماری مرگ گیاهچه در

حالت‌های مختلف بودند. جدایه‌های فوق با استفاده از آزمایش‌های استاندارد باکتری شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند که در نتیجه ۴ جدایه متعلق به جنس *Bacillus* و ۳ جدایه دیگر *Pseudomonas fluoresces* تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: پنبه، مرگ گیاهچه، مبارزه بیولوژیک، باکتری، آنتاگونیست

مقدمه

از مهمترین بیماری‌های پنبه که هر ساله خسارت فراوانی به کشت و محصول این گیاه وارد می‌آورند بیماری‌های پژمردگی و رتیسلیومی و بیماری مرگ گیاهچه پنبه می‌باشند که بنا بر گزارش زارعین در اغلب مناطق پنبه کاری ایران مشاهده شده‌اند. بیماری مرگ گیاهچه یکی از مهمترین بیماری‌های پنبه بوده و مهمترین عوامل این بیماری قارچ‌های *Pythium spp.* و *Rhizoctonia solani* می‌باشند (Heydari and Misaghi, 1998, Zaki et al., 1998). بیماری مرگ گیاهچه که در اوایل رشد بوته‌ها حادث می‌شود دارای دو حالت بوده که یکی قبل از سر برآوردن گیاهچه از خاک (Pre-emergence damping-off) می‌باشد که ریشه‌چه و ساقه‌چه در حال جوانه‌زدن مورد حمله قارچ قرار می‌گیرند و در دیگری که بعد از سر برآوردن گیاهچه از خاک (Post emergence damping - off) می‌باشد بیماری باعث پوسیدگی طوقه و ریشه گشته و نهایتاً ممکن است به مرگ کامل گیاهچه منجر گردد (Zaki et al., 1998).

امروزه ضدعفونی بذر با قارچکش‌های شیمیایی محافظت کننده عمده‌ترین روش شیمیایی مبارزه با بیماری مرگ گیاهچه پنبه می‌باشد. قارچکش‌های مورد استفاده در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه علی‌رغم موثر بودن دارای معایبی نیز می‌باشند که از آن جمله می‌توان به تأثیرات سوء بر روی موجودات غیر هدف، آلوده‌سازی محیط زیست و هزینه‌های فراوان آن‌ها اشاره نمود (Heydari et al., 1997, Hassanzadeh, 1992, Alavi & Ahoonmanesh, 1997). وجود مشکلات فوق لزوم جستجو و آزمایش روش‌های غیرشیمیایی را اجتناب ناپذیر نموده است. یکی از روش‌هایی که اخیراً به عنوان جایگزینی مناسب برای

روش‌های شیمیایی پذیرفته شده‌است روش مبارزه بیولوژیک می‌باشد. مبارزه بیولوژیک برای محیط زیست و موجودات غیر هدف بی‌خطر بوده و در مقایسه با روش‌های شیمیایی کم هزینه‌تر می‌باشد. در سال‌های اخیر پژوهش‌های چندی در مورد مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های گیاهی انجام شده است. در این پژوهش‌ها پژوهشگران با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست موفق به کنترل موثر بیماری‌های گیاهی گردیده‌اند (Heydari et al., 1997, Heydari and Misaghi 1998, Kleopfer et al., 1980, Misaghi et al., 1982, Zaki et al., 1998) از جمله قارچ‌ها و باکتری‌هایی که به طور موفقیت‌آمیز در این رابطه مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *T. viride* و همچنین باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Burkholderia cepacia*, *P. putida*, *Pseudomonas fluorescence* اشاره نمود که به طور موثری باعث کنترل بیماری‌های گیاهی گردیده‌اند. هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با بیماری ریزوکتونیایی مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست جهت معرفی یک روش غیرشیمیایی برای کنترل این بیماری بوده است.

روش بررسی

۱- نمونه برداری

مزارع پنبه گرگان و ورامین برای بررسی در نظر گرفته شد و از گیاهچه‌های پنبه این مزارع که دارای علائم مرگ گیاهچه بودند نمونه‌برداری گردید. نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان جداسازی قارچ در یخچال نگهداری شدند.

۲- جداسازی قارچ بیماری‌زا از اندام‌های گیاهی

طوقه و ریشه گیاهچه‌های آلوده پس از شستشوی ملایم زیر جریان آب شیر به مدت چند دقیقه و ضدعفونی آن با محلول ۱۰ درصد مایع سفیدکننده موجود در بازار (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم) به مدت ۱۰ تا ۶۰ ثانیه و سپس سه‌بار

شستشو در سه ظرف جداگانه با آب مقطر استریل و خشک کردن روی کاغذ صافی استریل و یا بوسیله کشیدن پنبه استریل آغشته به اتانل ۹۵ درصد روی منطقه آلوده انجام شد. پس از آن با استفاده از اسکالپل استریل بافت دارای لکه قطعه قطعه شده و قطعات بریده شده از مرز بافت آلوده و سالم انتخاب گردیده و بر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آب آگار (WA) انتقال داده شد. پتری‌ها در انکوباتور (در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند و پس از ۱۲ تا ۴۸ ساعت نگهداری و مشاهده ریشه‌های نظیر رایزوکونیا در زیر میکروسکوپ نوک ریشه‌ها به محیط کشت تازه PDA انتقال داده شد. نوک ریشه‌ها برای مرتبه دوم برداشته شد تا از خلوص قارچ اطمینان حاصل شود و همچنین نوک ریشه‌ها نیز به لوله‌های آزمایش حاوی PDA منتقل شد. این لوله‌ها در تاریکی و در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲-۳ هفته نگهداری شدند تا کلنی جدایه‌های قارچی کاملاً رشد نموده و در آنها سختینه تولید شود، سپس درب لوله‌ها بوسیله پارافیلیم بسته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان کشت منبع نگهداری شد. در این جداسازی تعداد ۵ جدایه *R. solani* جدا گردید که با کدهای R_0 ، R_1 ، R_2 ، R_3 ، R_4 نامگذاری گردید و برای شناسایی جدایه‌ای با قدرت بیماری‌زایی برتر، هر یک بطور جداگانه در آزمون بیماری‌زایی ارزیابی شدند.

۳- شناسایی عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه

برای شناسایی قارچ *R. solani* یکسری مشاهدات ظاهری و میکروسکوپی انجام و با اطلاعات موجود در منابع مقایسه گردید.

۳-۱- مشاهده ظاهری میسلیوم قارچ: چگونگی رشد و رنگ قارچ روی محیط PDA بصورت روزانه به مدت ۲ هفته مورد بازبینی قرار گرفت.

۳-۲- مشاهدات میکروسکوپی: با استفاده از میکروسکوپ نوری چگونگی انشعاب ریشه‌ها، دیواره عرضی، وجود سختینه‌ها در جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تعلق آنها به گونه *R. solani* مورد تأیید قرار گرفت.

۴-آزمون اثبات بیماری زایی: این آزمون بر طبق اصول کخ انجام گرفت. بدین ترتیب که پس از جداسازی قارچ عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه از گیاهچه بیمار روی محیط کشت WA، جدایه جهت خالص سازی روی محیط PDA منتقل شد. کشت ۷۲ ساعته قارچ به خاک استریل گلدان های حاوی بذر پنبه و همچنین گلدان های حاوی گیاهچه های ۱۵ روزه پنبه اضافه گردید (جهت بررسی دو شکل بیماری Post & Pre-emergence). مراحل کامل این آزمون به شرح زیر بود.

۴-۱-تهیه مایه تلقیح قارچ (روش اول): برای تهیه مایه تلقیح ۵۰۰ گرم دانه گندم به همراه ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر در داخل یک ارلن یک لیتری ریخته و ۲۴ ساعت نگهداری شد تا آب در بذر نفوذ کند. سپس در ارلن ها با پنبه و فویل آلومینیوم پوشانده شد و دوبار، هر بار به مدت ۴۰ دقیقه درون اتوکلاو به فاصله ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار ۱/۱ اتمسفر استریل گردید. پس از خارج کردن ارلن ها از اتوکلاو و سرد شدن آن ها، تحت شرایط استریل زیر هود قطعاتی از حاشیه کشت ۵ روزه قارچ *R. solani* روی PDA به ارلن ها اضافه گردید. ارلن ها حدود ۳-۴ هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و هر چند روز یکبار تکان داده می شدند تا مایه تلقیح درون ظرف ها بصورت توده بهم چسبیده در نیاید. محتویات ارلن ها تحت شرایط استریل خشک شده و توسط دستگاه آسیاب برقی خانگی خرد گردیدند. سپس مطابق روش (Wilkinson et al., 1985) توسط الک ذراتی به ابعاد ۰/۲۵ و ۱ میلی متر تهیه گردیده و در تمام آزمون های گلخانه ای مورد استفاده قرار گرفتند.

۴-۲-ضد عفونی خاک: خاک تهیه شده از مزارع پنبه، پس از سرند شدن و جدا شدن سنگ ها و ذرات درشت آن توسط دستگاه استریل کننده خاک به مدت ۳ ساعت استریل گردید.

۴-۳-آزمون بیماری زایی درحالت قبل ازسربر آوردن گیاهچه از خاک: مایه تلقیح مذکور با خاک استریل کاملاً مخلوط گردید و در هر گلدان مقدار ۴۰۰ گرم خاک آلوده شده و ۴ گرم مایه تلقیح قارچ (۱ در صد وزن خاک)، اضافه گردید و سپس تعداد ۱۰ بذر پنبه رقم ورامین بعد از ضد عفونی سطحی با محلول ۱۰ درصد مایع سفیدکننده خانگی (۵درصد هیپوکلریت سدیم) درون خاک هر گلدان قرار داده شد. در این آزمون برای هر تیمار ۴ تکرار و یک شاهد در نظر گرفته شد و در چارچوب یک طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. آبیاری گلدان ها بطور

یکنواخت برای تمام گلدان‌ها از طریق زیر گلدانی صورت گرفت. در تمام مدت آزمون دمای گلخانه ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. نتایج پس از گذشت یک هفته تا حداکثر یک‌ماه براساس تعداد گیاهچه‌های جوانه‌زده و سالم ارزیابی گردید. در ضمن از گیاهچه‌های بیمار قارچ *R. solani* مجدداً جداسازی و شناسایی گردید.

۴-۴- آزمون بیماری‌زایی درحالت بعد از سربرآوردن گیاهچه از خاک: مشابه روش بالا بذرها پس از ضدعفونی سطحی درون خاک استریل گلدان‌ها قرار داده شد و پس از ظهور گیاهچه خاک مایه تلقیح با دقت با خاک گلدان‌ها با ریختن بر روی خاک گلدان در اطراف گیاهچه‌ها و مخلوط کردن آن با خاک با استفاده از دستکش و یک قاشقک استریل بطوریکه گیاهچه صدمه‌ای نبیند کاملاً مخلوط گردید و بعد از یک هفته لغایت یک‌ماه نتایج بر اساس وجود علائم در طوقه و مرگ گیاهچه پنبه مورد ارزیابی قرار گرفته و عامل بیماری نیز جداسازی و شناسایی گردید.

۴-۵- تهیه مایه تلقیح قارچ جهت اثبات بیماری‌زایی (روش دوم): برای تهیه مایه تلقیح، از کشت ۷۲ ساعته قارچ در محیط PDA استفاده شد بدین ترتیب که برای هر گلدان با وزن ۴۰۰ گرم خاک استریل، ۷ دیسک ۲ سانتی‌متری از حاشیه کلنی قارچ انتخاب و پس از خرد کردن با یک تیغ استریل به دو روش زیر مورد بررسی قرار گرفت. برای آزمون Pre-emergence ابتدا مایه تلقیح فوق با خاک گلدان‌ها کاملاً مخلوط گردید و ۱۰ عدد بذر پنبه در خاک آلوده کاشته شد. سپس بیماری‌زایی بر اساس گیاهچه‌های سبز نشده مورد ارزیابی قرار گرفت. از بذور پوسیده و جوانه نزده قارچ *R. solani* جداسازی گردید. برای آزمون Post-emergence ابتدا بذرها درون گلدان‌ها کاشته شد و پس از رویش گیاهچه‌ها مایه تلقیح مذکور با خاک سطحی گلدان‌ها کاملاً مخلوط گردید و پس از یک هفته تا یک ماه نتایج براساس تعداد گیاهچه از بین رفته (مرگ گیاهچه) مورد ارزیابی قرار گرفت. در طول هر دو آزمون برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد و گلدان‌ها بطور یکنواخت از طریق زیر گلدانی آبیاری شدند.

۵- جمع‌آوری و نام‌گذاری جدایه‌های باکتریایی: برای این کار نمونه‌های مختلفی از خاک‌های مناطق مختلف پنبه‌کاری مورد استفاده قرار گرفتند. این نمونه‌ها از خاک مزارع پنبه و چغندر قند از ناحیه ریزوسفر بوتچه‌های سالم واقع در مجاورت بوته‌های آلوده جمع‌آوری

و در آزمایشگاه نباتات صنعتی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی تهران بصورت کلکسیون نگهداری گردیدند. کدگذاری جدایه‌های باکتری بر اساس نام میزبان (C برای پنبه و S برای چغندر قند) و منطقه محل جمع‌آوری نمونه‌ها (K برای کارکنده، G برای گرجی محله، Ch برای چناران و Sh برای شاهرود) و شماره جدایه‌ها انجام گردید. مثلاً SCh-5 نشان دهنده جدایه شماره ۵ جدا شده از مزارع چغندر قند چناران می‌باشد. در ضمن جدایه‌های (Q) از جدایه‌های اهدایی بودند.

۶- غربال نمودن باکتری‌های آنتاگونیست قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاه: در طول این آزمون همواره خواص یک آنتاگونیست خوب در نظر گرفته شد. در این جهت آزمون‌هایی چون، آزمون کشت متقابل و آزمون چهارنقطه‌ای و آزمون غربال سریع باکتریهای آنتاگونیست انجام پذیرفت که هر یک از آزمون‌ها به شرح زیر می‌باشد:

۶-۱- آزمون چهار نقطه‌ای: این روش مطابق روش (Weller & Cook 1983) به منظور بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفت. در این آزمون ۴ جدایه مختلف با فواصل معین روی پتری‌های حاوی محیط کشت (Potato Dextrose Agar (PDA و King's Medium B (KMB به صورت نقطه کشت گردیدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن یک دیسک به قطر ۶ میلی‌متر از کشت تازه قارچ *R. solani* و از حاشیه کلنی قارچ از روی محیط کشت PDA برداشته شد و بطور وارونه در وسط هر یک از پتری‌های حاوی PDA، KMB قرار داده شد و مجدداً در انکوباتور قرار داده شد. هنگامی که قارچ در پتری‌های شاهد بطور کامل سطح محیط کشت را در مدت ۷۲ ساعت پوشش داد. در پتری‌های دیگر درجه و قدرت بازدارندگی هر یک از باکتری‌های آنتاگونیست با اندازه‌گیری ناحیه بازدارندگی (Inhibition zone) در تیمارها تعیین گردید.

۶-۲- آزمون کشت متقابل: برای محاسبه دقیق فاصله بازدارندگی هر یک از جدایه‌های باکتری‌های مورد نظر و بدلیل جلوگیری از اثر تداخلی سایر جدایه‌ها همانند آزمون قبلی این روش نیز مورد آزمایش قرار گرفت. بدین ترتیب که هر جدایه باکتری در وسط یک پتری ۹ سانتی‌متری با محیط کشت PDA، KMB بصورت خطی کشت داده شد و سپس دو دیسک ۶ میلی‌متری از حاشیه کلنی قارچ سه روزه *R. solani* با فاصله مساوی از خط باکتری

بصورت وارونه کشت شد. پس از آنکه دو کلنی قارچ در پتری شاهد در مدت ۷۲ ساعت به هم رسیدند میزان باردارندگی در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. این آزمون در ۴ تکرار انجام شد و باکتری‌هایی که درصد خوبی از باردارندگی را نشان داده بودند برای آزمون گلخانه انتخاب شدند.

۷- آزمون کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه: این آزمون به دو روش انجام پذیرفت. روش تیمار بذری و روش محلول پاشی خاک. تهیه خاک، ضدعفونی کردن آن و تهیه مایه تلقیح قارچ و آلوده نمودن مایه تلقیح قارچ با خاک همانند آزمون اثبات بیماری‌زایی در گلخانه صورت پذیرفت و تیمار بذرها یا خاک بصورت زیر انجام شد.

۷-۱- روش تیمار بذری: ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ هر جدایه باکتری روی محیط کشت NBYA کشت گردید. محیط کشت مذکور شامل ۲ گرم Nutrient broth ۲ گرم Yeast extract، ۰/۵ گرم K_2HPO_4 ، ۲/۵ گرم KH_2PO_4 و ۱/۵ گرم Glucose در هر لیتر بود. مواد فوق و Agar به یک لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از اتوکلاو شدن به ظروف پتری سترون منتقل شدند پتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با استفاده از این کشت‌ها و آب مقطر استریل و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر سوسپانسیونی از هر جدایه با غلظت 10^8 cfu/ml تهیه گردید. از طرف دیگر محلول ۲ درصد متیل سلولز درون فلاسک شیشه‌ای در پیچ‌دار تهیه گردید. برای حل شدن کامل پودر متیل سلولز در آب، ابتدا آب را گرم کرده، به آرامی پودر مذکور به آن اضافه گردید. پس از یکنواخت شدن محلول و اتوکلاو کردن آن مقدار ۵ میلی لیتر از محلول حاصل به درون هر لوله در پیچ‌دار کوچک منتقل گردید و دو لوپ پر از هر جدایه باکتری به هر لوله اضافه شد. بعد از آن توسط دستگاه ورتکس سوسپانسیون یکنواختی حاصل گردید و تعداد ۱۰ عدد بذر پنبه را که پیشتر ضدعفونی سطحی شده بودند تحت شرایط استریل از درون لوله‌ها خارج و در پتری‌های استریل پخش شدند و بعد سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شده با متیل سلولز به پتری‌ها اضافه گردید و بذور با عمل تکان دادن به سوسپانسیون باکتری‌ها آغشته گردید. بذور آغشته شده به مدت چند ساعت در زیر هود خشک شده و بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

همچنین قابل ذکر است که در جهت ارزیابی کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه توسط باکتری‌های آنتاگونیست در مقایسه با قارچ کش‌های رایج، قارچ‌کش‌های کاربوکسین-تیرام و

ویتاواکس انتخاب شدند. قارچکش کاربوکسین - تیرام بصورت‌های پودر و تابل ۷۵ درصد و ۲۵ درصد و مایع روان ۲۰ و ۳۷ درصد موجود است و به میزان ۱۵۰-۲۰۰ گرم از ماده موثر در ۱۰۰ کیلو بذر (۱/۵-۲ در هزار) مصرف می‌شود. قارچ‌کش ویتاواکس نیز همانند فرمولاسیون فوق مصرف می‌شود. برای این آزمایش بذرها تیمار شده با قارچکش‌های فوق از موسسه پنبه تهیه گردید. برای تیمار شاهد نیز، بذرها فقط با محلول متیل سلولز یک درصد پوشش داده شدند. در شاهد منفی بذرها در خاک آلوده شده با مایه تلقیح قارچ *R. solani* کاشته شدند. در صورتیکه در شاهد مثبت بذور در خاک استریل بدون وجود قارچ کاشته شدند. برای تمام تیمارها ۴ تکرار در نظر گرفته شد و گلدان‌های انتخاب شده با عمق ۱۵ سانتی‌متر و قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر مورد استفاده قرار گرفتند و درون هر گلدان ۱۰ عدد بذر پنبه کاشته شد. بدین ترتیب گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد تا یک‌ماه نگهداری شدند. این آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و نتایج براساس تعداد گیاهچه سالم و رویش یافته ثبت گردید.

۲-۷: روش محلول پاشی خاک: این آزمون براساس آزمایش‌های انجام شده توسط Weller & Cook, 1983 طراحی گردید، برای این منظور همانند روش مذکور در آزمون تیمار بذری (۱-۷) پس از تهیه سوسپانسیون غلیظ از هر جدایه باکتری درون ارلن‌های ۲۰۰ ml و تعیین میزان جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر برای هر جدایه باکتری با توجه به فرمول‌های ذکر شده، سوسپانسیون‌هایی با غلظت 10^8 cfu/ml از هر جدایه تهیه گردید و برای هر گلدان حاوی ۵۰۰ گرم خاک استریل شده ۱۰ عدد بذر پنبه رقم ورامین و ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه در نظر گرفته شد. این آزمون در دو حالت بیماری بصورت پیش از سر برآوردن گیاهچه از خاک و پس از سربرآوردن گیاهچه از خاک انجام گرفت.

حالت اول: ابتدا در هر گلدان مایه تلقیح قارچ *R. solani* با خاک آن کاملاً مخلوط گردید و سپس تعداد ۱۰ عدد بذر پنبه داخل گلدان‌ها کاشته شد و سپس ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه باکتری به خاک گلدان‌ها اضافه شد. به تیمار شاهد اول (مثبت) بدون مایه تلقیح قارچ تنها ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به شاهد دوم (منفی) اینوکولوم قارچ و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. در این آزمایش برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه و در دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بر حسب نیاز آبیاری

گردیدند. نتایج بر اساس تعداد گیاهچه‌های سالم و سبز شده بعد از ۴۵ روز در تیماهای مختلف تعیین و بررسی گردید.

حالت دوم: در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر پنبه کاشته شد و بعد از گذشت حدود دو هفته تا یک ماه پس از جوانه‌زدن، تعداد ۵ گیاهچه سالم نگهداری و بقیه از گلدان‌ها حذف گردید. این عمل به این علت انجام گردید که تعداد گیاهچه‌ها در تمام تیمارها برابر باشد زیرا تمامی ۱۰ بذر کاشته شده در همه گلدان‌ها سبز نشده بودند. به هر گلدان ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون غلیظ از جدایه هر باکتری پس از مخلوط کردن مایه تلقیح قارچ *R. solani* با خاک هر گلدان اضافه شد. در این آزمون نیز مانند روش اول برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد و در یک تیمار تنها ۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل استفاده و به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد و در تیمار بعدی بعد از مخلوط کردن مایه تلقیح قارچ ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید و به عنوان شاهد منفی بررسی شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بر حسب نیاز آبیاری گردیدند. نتایج پس از گذشت یک‌ماه با در نظر گرفتن تعداد گیاهچه از بین رفته مورد ارزیابی قرار گرفت.

۸- شناسایی باکتریهای آنتاگونیست موثر: شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست با استفاده از آزمایش‌های استاندارد باکتری‌شناسی ذکر شده در منابع انجام گردید (Hassanzadeh, 1995).

نتیجه و بحث

۱- آزمون اثبات بیماری‌زایی: در این آزمون ۵ جدایه قارچ *R. solani* جدا شده از ناحیه طوقه و ریشه گیاهچه‌های بیمار پنبه در دو حالت بیماری (پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک و پس از سر بر آوردن گیاهچه از خاک) از نظر قدرت بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در هر دو حالت بیماری جدایه R5 بترتیب با ۸۷٫۵ و ۸۵ در صد مرگ و میر گیاهچه‌ها بیماری‌زاترین جدایه بود (جدول ۱ و ۲). این جدایه برای بقیه آزمایش‌ها انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت.

۲- آزمون بازاری‌نگی از رشد کلنی قارچ در شرایط آزمایشگاه: در این آزمون حدود ۵۰ جدایه باکتری به روش کشت متقابل (Dual culture) بر علیه جدایه R5 قارچ *R. solani* مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت که بر اساس نتایج بدست آمده

تعداد ۱۷ جدایه که بیشترین خاصیت بازدارندگی را نشان داده بودند جهت آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب گردیدند.

۳-آزمون کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه: در این آزمون که به دو روش تیمار بذری (Seed coating) و محلول پاشی خاک (Soil drench) انجام گردید. ۱۷ جدایه باکتری انتخاب شده در دو حالت بیماری مرگ گیاهچه (پیش و پس از سر بر آوردن گیاهچه از خاک) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته و کارایی آنها با قارچکش‌های کاربوکسین تیرام و ویتاواکس مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این آزمون به شرح ذیل بود:

۳-۱- روش تیمار بذری برای حالت پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک: همانطوریکه جدول ۳ نشان می‌دهد در این آزمایش از ۱۷ جدایه باکتری و ۲ قارچکش مورد آزمایش ۱۶ جدایه باکتری و هر دو قارچکش باعث کاهش معنی‌دار بیماری (افزایش تعداد گیاهچه‌های جوانه زده و سالم) در مقایسه با شاهد منفی (دارای قارچ تنها) گردیدند. البته میزان تاثیر این باکتری‌ها متفاوت بود بطوریکه جدایه‌های Q97, Q42, CG-4, CK-7, CK-6 همراه با قارچکش‌های کاربوکسین تیرام و ویتاواکس موثرترین و جدایه Sch-11 کمترین تاثیر را داشتند.

۳-۲- روش محلول پاشی خاک برای حالت پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک: نتایج این آزمایش در جدول ۴ آورده شده است. همانطوریکه مشاهده می‌شود در این آزمایش از باکتری‌های استفاده شده ۱۴ جدایه همراه با دو قارچکش کاربوکسین تیرام و ویتاواکس بطور معنی‌داری وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه را در حالت pre-emergence در مقایسه با شاهد منفی کاهش دادند. از میان این جدایه‌ها جدایه‌های Q97, Q42, CG-4, CK-7 موثرترین بوده و جدایه‌های Sch-3, Q71, کمترین تاثیر را داشتند.

۳-۳- روش محلول پاشی خاک برای حالت پس از سر بر آوردن گیاهچه از خاک: بر طبق جدول ۵ در این آزمایش از بین جدایه‌های مورد استفاده تنها ۸ جدایه باکتری باعث کاهش بیماری (مرگ و میرگیاهچه‌ها) در مقایسه با شاهد منفی گردیدند. بقیه جدایه‌ها و دو قارچکش مورد استفاده تاثیر معنی‌داری در این مورد نداشتند.

۴-شناسایی جدایه‌های باکتری: شناسایی جدایه‌های باکتری با استفاده از روش‌های استاندارد و تست‌های معمول با کتری‌شناسی (Hassanzadeh, 1995) انجام گردید. لازم به ذکر است که از بین جدایه‌های بررسی شده تعداد ۷ جدایه (Q-97, Q-42, CK-9, CK-7, CK-6, Sch-7, CG-4) جهت شناسایی انتخاب گردیدند. براساس نتایج آزمایشات جدایه‌های Q-97, Sch-7, CG-4 و CK-6 و CK-9 مربوط به جنس *Bacillus* و ۳ جدایه دیگر یعنی CK-7, Q-42, و Q-97 به جنس *Pseudomonas* متعلق بودند. باکتری‌های *Pseudomonas* بر اساس خصوصیات مرفولوژیک بخصوص تولید رنگدانه فلوئورسانس و نیز خواص بیوشیمیایی و بر اساس نتایج آزمایش‌های انجام شده متعلق به گونه *fluorescens Pseudomonas* تشخیص داده شدند.

بررسی بیماری‌زایی ۵ جدایه *R. solani* روی گیاهچه پنبه رقم ورامین در گلخانه نشان داد که یکی از جدایه‌ها (R5) قدرت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به دیگر جدایه‌ها دارد. البته این آزمون در هر دو شکل بیماری (Pre-emergence و Postemergence) نتایج مشابهی داشت. در کلیه آزمایشات گلخانه‌ای تنها از جدایه R5 به عنوان عامل بیماری ریزوکتونیایی پنبه استفاده شد.

جدایه‌های باکتریایی در آزمایش‌های اولیه بر روی محیط کشت (بازدارندگی از رشد قارچ) به‌طور متفاوتی عمل کردند. از ۵۰ جدایه آزمایش شده ۱۷ جدایه بطور موثر و معنی‌دار باعث کاهش رشد کلنی قارچ *R. solani* گردیدند.

عدم تاثیر معنی‌دار تعدادی از جدایه‌ها ممکن است به‌علت عدم تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و یا دیگر متابولیت‌های ضدقارچی باشد. همانطوریکه در تحقیقات مختلف در مورد بررسی خواص آنتاگونیستی باکتری‌ها ذکر شده است قابلیت تولید متابولیت‌های ضدقارچی و در نتیجه قابلیت آنتاگونیستی باکتری‌ها متفاوت می‌باشد (Klopper et al., 1980, Misaghi et al., 1982, Thomashow and Weller 1990). در بین ۱۷ جدایه انتخاب شده نیز از نظر خاصیت بازدارندگی رشد کلنی قارچ‌ها تفاوت وجود داشت که این می‌تواند به علت تعلق جدایه‌ها به گونه‌های متفاوت و اختلاف در خواص آنها باشد.

در بخش دیگری از تحقیق که در گلخانه انجام گرفت صفات مشخصی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شکل آزمایشی پوشش بذری از میان ۱۷ جدایه باکتریایی مورد آزمایش، ۱۶ جدایه بطور موثر و معنی داری باعث افزایش جوانه زنی بذرها و افزایش تعداد گیاهچه سالم در مقایسه با شاهد گردیدند. البته تفاوت‌هایی نیز از نظر شاخص‌های مورد بررسی در میان این جدایه‌ها مشاهده شد. همچنین در مقایسه‌ای که میان عملکرد جدایه‌های مذکور با تیمار شاهد و تیمارهای مربوط به قارچکش‌های کربوکسین تیرام و ویتاواکس انجام شد، ملاحظه گردید تعدادی از این جدایه‌ها در سطح آماری مانند قارچکش‌ها و یا بهتر از آنها عمل کردند. با توجه به شناسایی باکتری‌ها مشخص شد که سطوح عملکرد بهتر جداول را باکتری‌های گونه *Pseudomonas fluorescens* اشغال نموده‌اند. البته در بررسی‌هایی که در سال ۱۹۹۰ توسط Thomashow و Weller انجام گرفت، اهمیت تولید آنتی‌بیوتیکی بنام Phenazin-1-Carboxylic acid، توسط این باکتری‌ها مورد تأیید قرار گرفته است. عامل دیگر ضدقارچی این گروه از باکتری‌ها بنام Anthranilic acid 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 که احتمالاً عواملی مثل تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور در این آزمایش نقش مهمی داشته است و یا در بررسی‌هایی که به عمل آمده بعضی از باکتری‌های جنس *Pseudomonas* ریشه‌ها را کلنیزه نموده و باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. این افزایش رشد با اینکه ممکن است از طریق تولید عوامل رشدی حاصل شود، اما یک دلیل مهم برای این واکنش، شکست رقیبان پاتوژنی در ریزوسفر و متعاقباً حفاظت ریشه‌ها علیه بیماری توسط بعضی باکتری‌ها می‌باشد.

بخش دیگری از آزمایشات گلخانه‌ای به شکل محلول پاشی خاک انجام پذیرفت. در آزمون Pre-emergence از میان ۱۷ جدایه مورد بررسی تعداد ۱۴ جدایه بطور معنی داری باعث افزایش تعداد گیاهچه سالم (جوانه زده) شدند.

در این ارزیابی نیز نتایج نشان داد که جدایه‌های متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* در بیوکنترول بیماری ریزوکتونیایی گیاهچه پنبه عملکرد بهتری را حتی نسبت به شاهد (بدون قارچ) نشان دادند. به دنبال آن باکتری‌های جنس *Bacillus* با تیمارهای قارچکش در یک سطح آماری قرار گرفتند.

جدول ۱: مقایسه قدرت بیماریزایی جدایه‌های مختلف قارچ *Rhizoctonia solani* در آزمون‌های گلخانه‌ای پیش و پس از سر بر آوردن گیاهچه از خاک

Table 1. A comparison among different *Rhizoctonia solani* isolates in pathogenicity on cotton seedlings in pre- and post emergence-damping-off experiments

درصد آلودگی در آزمایش بعد از ظهور گیاهچه Percent infection in Post emergence test	درصد آلودگی در آزمایش قبل از ظهور گیاهچه Percent infection in pre-emergence test	جدایه قارچ Fungal isolate	ردیف No.
5.0	5.0 ^a	R ₁	1
20.0	5.0	R ₂	2
15.0	10.5	R ₃	3
15.0	12.5	R ₄	4
85.0	87.5	R ₅	5
5.0	2.5	Control	6

میانگین درصد آلودگی ۴ تکرار = a

a=Averag percent infection of 4 replicates

در آزمون Post emergence نیز که تعداد گیاهچه از پا در آمده ارزیابی گردید از میان ۱۷ جدایه مورد آزمایش ۹ جدایه بطور موثر و معنی داری مرگ گیاهچه پنبه را در تیمارهای مختلف کاهش داد. در این آزمون نیز همانند دو آزمون ذکر شده از میان جدایه‌های مذکور باکتری‌های *P. fluorescens* تاثیر بهتری را به لحاظ آماری در مقایسه با دیگر جدایه‌ها همچون گروه‌های باکتریایی *Bacillus* به نمایش گذاردند.

به این ترتیب می‌توان استنباط کرد که باکتری‌های *P. fluorescens* در آزمایشات گلخانه‌ای دارای عملکرد بهتری حتی نسبت به شاهد و تیمارهای قارچ‌کش داشته‌اند و این شاید به این دلیل باشد که تولید مواد ضدقارچی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید سیدروفور، تولید کلنی روی ریشه گیاهچه در رقابت با میکروارگانسیم‌های بیماریزا نسبت به دیگر جدایه‌ها از میزان بیشتری برخوردار باشد.

جدول ۲. تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری‌های آنتاگونیست در حالت پوشش بذری

بر وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه

Table 2. Effect of bacterial isolates used as seed coating on pre-emergence cotton seedling damping-off disease

گروه‌بندی آماری	گیاهچه‌های جوانه‌زده	تیمارها	ردیف
Statistical grouping	Emerged seedlings	Treatments	No.
F	2.25 ^b	Control (-)	1
F	3.50	SCh-3	2
E	5.75	SCh-11	3
DE	6.00	SCh-12	4
DE	6.00	Q-18	5
DE	6.50	CG-5	6
DE	6.50	Q-71	7
DE	6.50	CK-3	8
CDE	7.00	CK-8	9
BCDE	7.50	CK-5	10
BCD	7.75	CG-3	11
ABC	8.00	SCh-7	12
ABC	8.00	Vitavax	13
AB	8.75	Carboxin-thiram	14
AB	8.75	CK-6	15
AB	9.00	Control(+)	16
AB	9.25	CK-9	17
AB	9.25	CG-4	18
AB	9.50	CK-7	19
AB	9.50	Q-97	20
AB	9.75	Q-42	21

b = میانگین تعداد گیاهچه‌های سر بر آورده از خاک در ۴ تکرار

b= The average number of emerged seedlings in 4 replicates

همچنین در مقایسه دو روش Seed coating و Soil drench ، محلول پاشی جدایه‌های باکتریایی در خاک گلدان‌های مورد آزمایش نتایج بهتری را به لحاظ کنترل بیماری نشان دادند. به نظر می‌رسد به‌کار بردن باکتری‌های آنتاگونیست بصورت سوسپانسیون غلیظ و پاشیدن آن روی سطح خاک گلدان‌ها به دلیل افزایش سطح تماس باکتری‌ها با بذرها و سطوح مختلف خاک این تفاوت را باعث شده است و این امکان برای باکتری‌های آنتاگونیست فراهم می‌شود که بتوانند براحتی در رقابت با قارچ عامل بیماری پیروز باشند و نیز مواد ضدقارچی باکتری‌ها بطور یکنواخت در سطح خاک پخش گردد و می‌توان نتیجه گرفت که دلیل عدم توانایی

جدایه‌های دیگر در کنترل این بیماری در این آزمایشات شاید عدم توانایی آنها در کلنیزه کردن ریشه یا تولید پائین آنتی‌بیوتیک‌ها و بطور کلی مسواد ضدقارچی است (Weller 1988, Weller and Cook 1983.)

به هر حال مکانیزم عمل این ۷ جدایه انتخاب شده در کاهش و جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری به درستی مشخص نمی‌باشد و این امر را میتوان به عوامل احتمالی مختلفی نسبت داد. به عنوان مثال رقابت در اشغال ریشه، رقابت برای جذب مواد غذایی، تولید سیدروفور (که از خواص سودوموناس‌های فلورسنت می‌باشد) و یا تولید دیگر متابولیت‌های فرار و غیر فرار را می‌توان در این زمینه موثر دانست و محققین دیگر این مطلب را تأیید می‌کنند (Defago and Hass 1990, Heydari and Misaghi 1998, Pierson and Weller 1994, Wilkinson et al 1985, Zaspei, 1992)

باید اذعان داشت که موثر بودن جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای دلیلی قاطع بر موفق بودن آنها در شرایط مزرعه نبوده و لازم است که این جدایه‌ها در شرایط واقعی مزرعه و گیاه مورد بررسی قرار گیرند. زیرا در شرایط واقعی عوامل زیست محیطی تأثیرات به سزایی بر رشد و فعالیت باکتری‌های آنتاگونیست گذاشته و کارایی آنها را تحت تأثیر قرار دهند (Heydari et al., 1997 Heydari and Misaghi 1998.) این تحقیق یک بررسی و آزمایش جهت جداسازی، جمع‌آوری و شناسایی تعدادی از جدایه‌های باکتری بر علیه قارچ *R. solani* بوده است که با هدف دستیابی به تعدادی باکتری آنتاگونیست جهت استفاده در طرح‌های تحقیقاتی مزرعه‌ای در مبارزه با قارچ فوق که از عوامل بیماری‌زا و خسارت‌زای بسیار مهم بر روی پنبه و بسیاری از گیاهان می‌باشد انجام شده است.

جدول ۳. تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری‌های آنتاگونیست در حالت افزودن سوسپانسیون به خاک بر وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه در حالت پیش از سر بر آوردن گیاهچه از خاک

Table3. Effect of bacterial isolates used as soil drench on pre-emergence cotton seedling damping-off disease

گروه‌بندی آماری	گیاهچه‌های جوانه زده	تیمارها	ردیف
Statistical grouping	Emerged seedlings	Treatments	No.
F	2.0 ^c	Control (-)	1
EF	4.25	SCh-3	2
EF	4.00	SCh-11	3
EF	4.00	SCh-12	4
FE	4.00	Q-18	5
CD	6.50	CG-5	6
DE	4.25	Q-71	7
DE	5.00	CK-3	8
CD	6.50	CK-8	9
BC	7.50	CK-5	10
BC	7.50	CG-3	11
AB	9.25	SCh-7	12
AB	9.25	Vitavax	13
AB	9.00	Carboxin-thiram	14
AB	8.75	CK-6	15
A	9.75	Control(+)	16
AB	9.00	CK-9	17
A	9.50	CG-4	18
A	9.50	CK-7	19
A	9.50	Q-97	20
A	9.50	Q-42	21

C= میانگین تعداد گیاهچه‌های سر بر آورده از خاک در ۴ تکرار

C= The average number of emerged seedlings in 4 replicates

جدول ۴. تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری‌های آنتاگونیست در حالت افزودن سوسپانسیون به خاک بر وقوع بیماری مرگ گیاهچه پنبه در گلخانه

Table 4. Effect of bacterial isolates used as soil drench on post-emergence cotton seedling damping-off disease

گروه‌بندی آماری	گیاهچه‌های از بین رفته	تیمارها	ردیف
Statistical grouping	Dead seedlings	Treatments	No.
A	4.00 ^d	Control (-)	1
AB	2.50	SCh-3	2
BC	2.25	SCh-11	3
A	4.00	SCh-12	4
BC	2.25	Q-18	5
AB	2.50	CG-5	6
BC	2.25	Q-71	7
BC	2.25	CK-3	8
CD	1.75	CK-8	9
BC	2.25	CK-5	10
CD	0.50	CG-3	11
CD	0.50	SCh-7	12
CD	0.50	Vitavax	13
BCD	0.75	Carboxin-thiram	14
BCD	1.75	CK-6	15
D	0.25	(+)Control	16
CD	0.50	CK-9	17
AB	2.50	CG-4	18
CD	0.50	CK-7	19
D	0.25	Q-97	20
CD	0.50	Q-42	21

d= میانگین تعداد گیاهچه‌های از بین رفته در ۴ تکرار

d= The average number of dead seedlings in 4 replicates.

سپاسگزاری

نگارندگان بدینوسیله از همکاری صمیمانه آقای مهندس ابوالقاسم قاسمی و خانم ساناز صالحی مسؤل و کارشناس آزمایشگاه باکتری شناسی موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی در شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست سپاسگزاری می‌نمایند.

نشانی نگارندگان: دکتر اصغر حیدری و مهندس لاله نراقی، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، دکتر نادر حسن زاده، دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده و مهندس هیوا فتاحی، واحد علوم و تحقیقات- دانشگاه آزاد اسلامی