



# بررسی تاثیر باکتری‌های آنتاگونیستی عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان توت در استان گیلان

هادی رهاننده

مربی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

مصطفی نیک نژاد کاظم پور

استادیار گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

نادر حسن زاده

استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (تهران)

## چکیده

در این تحقیق تاثیر آنتاگونیستی باکتری‌های جداسازی شده از باغات توت استان گیلان علیه قارچهای *F. solani*، *F. oxysporum* و *Lasiodiplodia theobromae* عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه توت در شرق استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. ۵ جدایه منتخب قادر به ایجاد هاله بازدارندگی به میزان ۱ تا ۵ میلی متر روی هر سه قارچ بودند. چهار جدایه باکتریایی *H-16*، *H-24*، *H-25* و *H-4* متعلق به جنس *Bacillus* و جدایه *H-4* متعلق به جنس *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شد. در آزمون مربوط به تاثیر ترکیبات فرار، قدرت بازدارندگی باکتری‌ها از رشد رویشی قارچ‌های *F. solani*، *F. oxysporum* و *L. theobromae* به ترتیب به میزان ۲۵ الی ۳۵، ۳۶/۱۱ الی ۴۷/۳۵ و ۲۵/۱۸ الی ۷۶/۶۶ درصد بود. جدایه *H4* روی محیط کشت *King's B* محتوی ۵، ۵۰، ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن تولید سیدروفور نموده و از رشد قارچ *Geotrichum candidum* ممانعت بعمل آورد. ترشحات خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست انتخابی در غلظت‌های مختلف سبب بازداری رشد رویشی قارچ‌های مذکور شد و اغلب با افزایش غلظتها بازداری رشد قارچ‌ها نیز افزایش یافت. همه جدایه‌های آنتاگونیست قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند و بخوبی از رشد قارچهای عامل بیماری ممانعت کردند.

واژه‌های کلیدی: سیدروفور، توت، *F. solani*، *F. oxysporum*، *Lasiodiplodia theobromae*، *Geotrichum candidum*.

## مقدمه

تا کنون بیماری‌های متعددی از روی درخت توت از سراسر دنیا گزارش شده است که یکی از بیماری‌های خاکزی آن پوسیدگی ریشه توت می‌باشد (کریمی، ۱۳۷۴). بیماری پوسیدگی ریشه توت از مسائل عمده باغات توت در همه کشورهای چینی، ژاپن، روسیه،

چین و تایلند است که به پرورش کرم ابریشم می‌پردازند (Philip et al., 2001). عامل پوسیدگی ریشه توت در کشور ژاپن *Helicobasidium mompa* و *Rosellinia necatrix* می‌باشد (Aoki et al., 1959). در کشور روسیه مقاومت پیوندهای مختلف درخت توت نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه مورد بررسی قرار گرفت (Kakuliya et al., 1970). این بیماری در سال ۱۹۷۱ از تایلند نیز گزارش شد (Aoki, 1971). جیمز داک (Duke, 1983) عوامل پوسیدگی ریشه توت را *Armillaria mellea*، *Helicobasidium pureum*، *Rosellinia aguila* معرفی کرد. در کشور هند اولین گزارش بروز پوسیدگی ریشه و طوقه توت با عامل *Botryodiplodia theobromae* توسط Luke و همکاران در سال ۱۹۸۲ اعلام گردید (Teotia et al., 1994). در یک بررسی دیگر عامل بیماری پوسیدگی ریشه توت را *Fusarium solani* تشخیص داده شد (Philip et al., 1995). در تامیل نادو هند عامل بیماری قارچ *Botryodiplodia theobromae* معرفی شد (Gangwar et al., 1991). در یک بررسی در قلمستانهای توت در هند که توسط فیلیپ و همکاران (Philip et al., 1997) انجام گرفت بیشترین خسارت بالغ بر ۴۴٪ توسط قارچ *Botryodiplodia theobromae* تشخیص داده شد. چنانچه قارچهای *Fusarium solani* و *Phoma sorghina* با خاک مخلوط می‌شدند خسارت به ۵۱/۴٪ تا ۶۱/۴٪ بالغ می‌شد. *Botryodiplodia theobromae* برگ قلمه را به میزان ۵۰٪-۶۰٪ آلوده می‌کند و سبب die-back می‌شود. در شمال هند عامل پوسیدگی ریشه توت *Fusarium solani* شناسایی شد (Philip et al., 1997). اولین شناسایی عوامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت در استان گیلان در سال ۷۶-۷۸ انجام شد که قارچهای عامل بیماری را *Fusarium solani*، *Fusarium oxysporum* و *Botryodiplodia theobromae* تشخیص دادند (مرآت و همکاران ۱۳۸۳). برای برخی جدایه های پسودوموناس فعالیت آنتاگونیستی بر اساس تولید آنتی بیوتیک است در حالی که برای دیگر پسودوموناس ها مانند *P.putida* جدایه WCS358 فعالیت آنتاگونیستی بر اساس رقابت برای عنصر آهن می‌باشد (Vidhysaekaran et al., 1999). آزاد دیسفانی و همکاران (۱۳۷۹) اثر آنتاگونیستی برخی جدایه‌های *P.fluorescens* و *Bacillus sp.* روی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پنبه *Verticillium dahliae* بررسی کردند و بیان داشتند که این جدایه‌ها با تولید ترکیبات گازی و آنتی بیوتیک قادرند که از رشد ریشه‌ای قارچ عامل بیماری ممانعت نمایند. نیک‌نژاد کاظم‌پور و همکاران (۱۳۸۱) تاثیر چند قارچکش و قارچهای آنتاگونیست را علیه سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که قارچهای آنتاگونیست و قارچکش بنومیل در شرایط گلخانه قادرند بترتیب به میزان ۲۷/۵ و ۳۲/۵ درصد میزان بیماری را کاهش دهند. در این تحقیق میزان تاثیر و نحوه عملکرد تعدادی از جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از منطقه ریزوسفر درختان آلوده توت به عوامل بیماریزای طوقه و ریشه توت جهت کنترل عامل بیماری پرداخته شده است.

## روش بررسی

### ۱- تهیه قارچهای عامل بیماری

بدین منظور جدایه های قارچهای عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت از بخش تحقیقات شرکت ابریشم تهیه گردید و جهت حفظ خصوصیات بیماریزایی آن در مخلوط پوسته و دانه برنج (Mew & Rosales, 1986) کشت و نگهداری گردید.

### ۲- جداسازی باکتریهای آنتاگونیست

نمونه‌های خاک از منطقه ریزوسفر درختان توت آلوده از مناطق مختلف شرق استان گیلان جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد، نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از ۱۰ گیاه را با یکدیگر مخلوط کرده و از هر نمونه خاک مخلوط شده یک گرم برداشته شد و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون رقت‌های مختلف به طور سریال تهیه گردید. یکصد میکرو لیتر از هر رقت تهیه شده را در محیط کشت آگار مغذی (NA) کشت گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. کلنی‌هایی که از نظر شکل و رنگ در محیط آگار مغذی متفاوت بودند انتخاب و در درون لوله، خالص سازی گردیدند.

### ۳- بررسی ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای در چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA+NA به فواصل مساوی از مرکز، مایه‌کوبی شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس یک حلقه پنج میلیمتری از حاشیه کشت تازه قارچ در مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شدند. در تشتک پتری شاهد، آب مقطر سترون در چهار طرف تشتک پتری مایه‌کوبی شد و در مرکز محیط کشت قارچ قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از اینکه حاشیه پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد به دیواره تشتک پتری برخورد نموده بود، فواصل بازدارندگی بین حاشیه پرگنه جدایه‌های باکتریایی و قارچ اندازه‌گیری گردید.

### ۴- ویژگیهای آنتی بیوزیز عوامل بیوکنترول باکتریایی

#### ۴-۱) تولید مواد فرار ضد قارچی

بدین منظور مطابق روش فیدامن و روزال (Fiddaman & Rossal, 1993) جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی محیط کشت NA و همزمان جدایه قارچ عامل بیماری روی محیط عصاره سیب زمینی و قند (PDA) کشت شدند. سپس تشتک حاوی قارچ عامل بیماری به صورت وارونه روی تشتک حاوی باکتری قرار داده شد و اطراف تشتک‌ها با پارافیلیم کاملاً مسدود شدند. تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در تشتک پتری شاهد، حلقه‌هایی به قطر پنج میلیمتر از محیط کشت عصاره سیب زمینی و قند حاوی قارچ‌های عامل بیماری در مقابل تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت NA و فاقد جدایه‌های آنتاگونیست قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. قطر رشد ریشه‌ها اندازه‌گیری و سپس با روش مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. درصد بازداری از رشد ریشه‌های قارچ‌های عامل بیماری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$100 \times (\text{قطر رشد پرگنه شاهد} / (\text{قطر رشد پرگنه تیمار} - \text{قطر رشد پرگنه شاهد})) = \text{درصد بازداری از رشد}$$

#### ۴-۲) تولید سیدروفور

این بررسی مطابق روش ویلر و کوک (Weller & Cook, 1983) انجام شد. جدایه پسودوموناس فلورسانت روی محیط کشت King's B حاوی غلظتهای ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون اسپور قارچ *Geotrichum candidum* از یک کشت ۴۸ ساعته روی محیط کشت مایع (PDB) با فرمول ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، در یک لیتر آب مقطر تهیه گردید و بر سطح تشتک پتری حاوی جدایه آنتاگونیست افشانه شد. عدم رشد قارچ در اطراف باکتری، نشان دهنده تولید سیدروفور می‌باشد.

#### ۴-۳) تولید آنتی بیوتیک

این آزمون مطابق روش کراس و لوپر (Kraus & Loper, 1990) انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری و آب مقطر سترون به عنوان شاهد به محیط کشت PDA اضافه و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از این مدت با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، جدایه‌ها از سطح محیط کشت شسته و تشتک‌های پتری بطور وارونه به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس یک حلقه به قطر پنج میلیمتر از حاشیه کشت تازه قارچ‌ها، در مرکز هر تشتک پتری کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری و قطر رشد ریشه‌ها پس از ۷ روز اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً

تصادفی شامل ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد و داده‌های بدست آمده از آزمایش (قطر رشد ریشه) مورد تجزیه و تحلیل آماری به وسیله مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS قرار گرفتند.

#### ۴-۴) ترشحات خارج سلولی

مطابق با روش سینگ و دورال (Singh & Deverall, 1994) انجام شد. در بخش نخست، محیط کشت مایع (PDB) تهیه گردید. درون فلاسکهای با گنجایش ۲۵۰ میلی‌لیتر، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط مایع فوق را ریخته و در شرایط اتوکلاو، سترون شدند. پس از خنک شدن محیط مایع، به هر یک از فلاسکها یک لوپ کامل از کشت ۲۴ ساعته باکتری اضافه شد. فلاسکها حاوی باکتری روی شیکر دورانی با ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته قرار داده شدند و پس از عبور دادن محیط کشت مایع جدایه‌ها از کاغذ صافی واتمن شماره یک و سانتریفوژ آنها در  $5000 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه، هریک از جدایه‌ها بطور جداگانه توسط صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی صاف گردید و عصاره حاصل از هریک از جدایه‌های مذکور در آزمون بازدارندگی از رشد ریشه‌ای قارچها بکار برده شد. جهت بررسی تأثیر عصاره حاصله، ابتدا محیط کشت PDA به حجم‌های ۱۹، ۱۷ و ۱۵ میلی‌لیتر درون لوله ریخته شد و پس از سترون شدن در شرایط اتوکلاو به ترتیب ۱ میلی‌لیتر (غلظت ۵ درصد حجم به حجم)، ۳ میلی‌لیتر (غلظت ۱۵ درصد حجم به حجم) و ۵ میلی‌لیتر (غلظت ۲۵ درصد حجم به حجم) از عصاره هر یک از آنتاگونیست‌ها به لوله‌های PDA با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد اضافه و به خوبی مخلوط و در شرایط سترون به تست‌های پتری سترون، منتقل گردیدند. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع فوق بدون باکتری که از صافی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شده بود، استفاده گردید. پس از انعقاد محیط کشت، در مرکز هر تستک پتری یک حلقه به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت تازه قارچ، کشت داده شدند. اندازه گیری قطر ریشه هر روز و به مدت ۷ روز پس از کشت قارچ انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل با ۲ عامل و با متن کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. عامل اول جدایه آنتاگونیست در ۵ سطح و عامل دوم غلظت در ۳ سطح بود. برای هریک از غلظت‌ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. قطر رشد ریشه در هر غلظت مورد تجزیه و تحلیل آماری به وسیله مدل خطی عمومی در برنامه رایانه‌ای SAS قرار گرفتند.

#### ۵- آزمونهای افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های منتخب براساس خصوصیات مهم مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مورد شناسائی قرار گرفتند. این آزمایشات شامل واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسانت، تولید لوان، آزمون‌های لهیدگی سیب‌زمینی، آرژنین دی‌هیدرولیز، احیاء نیترات، دهیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، MR/VP، آزمون فوق حساسیت، استفاده از برخی منابع کربنی و سدیم استات انجام گرفت (Fahy & Persley, 1993 & Schaad, 1988).

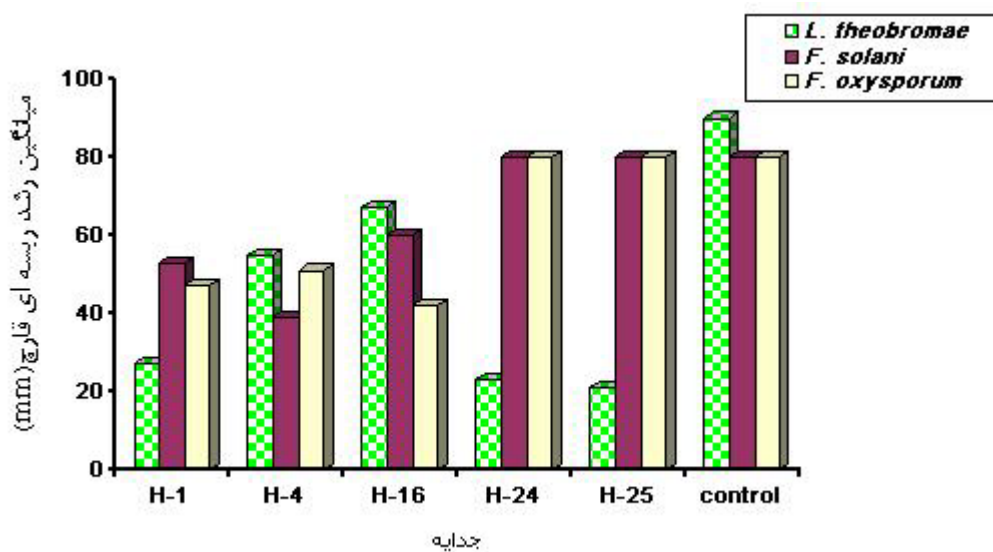
#### نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که از ۱۰۰ جدایه باکتریایی مورد بررسی ۱۶ جدایه روی قارچ *Lasioidiplodia theobromae*، ۱۲ جدایه روی قارچ *Fusarium solani* و ۷ جدایه روی قارچ *F. oxysporum* دارای اثر بازدارندگی بودند. از این تعداد تنها ۵ جدایه باکتری دارای توانایی ایجاد هاله بازدارندگی به میزان ۱ تا ۵ میلی‌متر روی هر سه قارچ عامل بیماری بودند. جدایه H-4 گرم منفی و جدایه‌های H-1، H-16، H-24 و H-25 گرم مثبت بودند. شرایط رشد جدایه‌های H-1، H-16، H-24 و H-25 هوازی و جدایه H-4 غیر هوازی بودند. تنها جدایه H-4 روی محیط کشت King's B دارای رنگدانه فلورسنت بود. چهار جدایه H-1، H-16، H-24 و H-25 دارای اسپور بودند. براساس آزمونهای انجام شده جدایه‌های H-1، H-16، H-24 و H-25 در جنس *Bacillus* و جدایه H-4 در گروه پseudomonas فلورسنت قرار داده شدند. براساس آزمونهای تفکیکی (بیوشیمیایی و فیزیولوژیک)

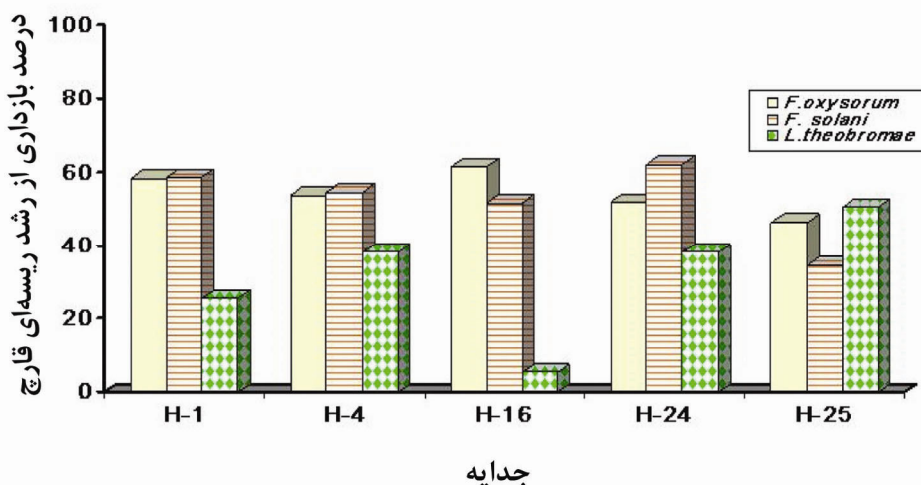
دو باکتری در سطح گونه *B. megaterium* H-16، *B. coagulans* H-24 و دوباسیلوس دیگر در همان سطح نامگذاری شدند (جدول ۱). در آزمایشات مربوط به تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه های باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریشه ای قارچ *L. theobromae* روی محیط کشت NA مشخص گردید که کلیه جدایه ها در سطح ۵٪ تفاوت معنی داری با شاهد دارند. جدایه *B. megaterium* H-16 با ۲۵/۱۸٪ و جدایه‌های H-1، *B. coagulans* H-24 و H-25 به ترتیب با ۷۰/۰۰٪، ۷۴/۴۴٪ و ۷۶/۶۶٪ کمترین و بیشترین تاثیر را در بازداری رشد ریشه ای قارچ *L. theobromae* از خود نشان دادند. در ارزیابی آزمون فوق روی قارچ *Fusarium solani* مشخص گردید که جدایه های *B. coagulans* H-24 و H-25 فاقد تاثیر بازداری می باشند اما سه جدایه *B. megaterium* H-16، H-1 و H-4 به ترتیب با ۲۵/۰۰، ۳۳/۰۵ و ۵۱/۲۵ درصد بازداری موجب محدودیت رشد ریشه ای قارچ *F. solani* شدند. در آزمون تاثیر ترکیبات فرار روی قارچ *F. oxysporum* مشاهده شد که جدایه های *B. coagulans* H-24 و H-16 و H-25 هیچگونه بازداری از رشد ریشه ای قارچ *F. oxysporum* از خود نشان ندادند و سه جدایه H-4، H-1 و H-16 *B. megaterium* به ترتیب با ۳۶/۱۱٪، ۴۱/۱۱٪ و ۴۷/۳۵٪ باعث بازداری رشد ریشه ای قارچ *F. oxysporum* شدند (شکل ۱). ترشحات خارج سلولی جدایه های آنتاگونیست در غلظت های مختلف ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد سبب بازداری از رشد رویشی قارچ های عامل بیماری گردید. با افزایش غلظت ترشحات خارج سلولی اغلب افزایش بازداری از رشد ریشه ای قارچ های عامل بیماری مشاهده شد. مقایسه میانگین ها نشان داد که تفاوت میان غلظت های مختلف و همچنین میان جدایه های آنتاگونیست معنی دار بوده و اثرات متقابل آنها نیز معنی دار گردید. در این آزمایش جدایه *B. megaterium* H-16 در غلظت ۲۵٪ بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *L. theobromae* از خود نشان داد (جدول ۳) و جدایه *B. coagulans* H-24 در غلظت ۲۵٪ بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *F. solani* داشت (جدول ۴) و جدایه های *B. megaterium* H-16 و H-1 در غلظت ۲۵٪ بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد رویشی قارچ *F. oxysporum* از خود نشان دادند (شکل ۲). نتایج تجزیه واریانس تاثیر آنتی بیوتیک استرین های آنتاگونیست روی رشد ریشه ای قارچ *L. theobromae* نشان داد که تیمارها در سطح ۵٪ با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند ولی با شاهد در سطح ۵٪ دارای تفاوت معنی دار بودند. نتایج حاصل از تاثیر آنتی بیوتیک تولید شده جدایه های باکتری های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریشه ای قارچ *F. solani* نشان داد که هر ۵ جدایه قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند. این جدایه ها تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ با شاهد داشتند. بر اساس مقایسه میانگین ها جدایه های H-1 و H-25 با ۹۱/۰۲٪ بازداری دارای بیشترین تاثیر بودند. جدایه H-4 با ۶۷/۹۵٪ کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد ریشه ای قارچ *F. solani* داشت. نتایج حاصل از تاثیر آنتی بیوتیک تولید شده جدایه های باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریشه ای قارچ *F. oxysporum* نشان داد که هر ۵ جدایه قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند. این جدایه ها در سطح ۵٪ با شاهد تفاوت معنی داری داشتند. بر اساس مقایسه میانگین ها جدایه های H-1، *B. megaterium* H-16 و H-25 به ترتیب با ۹۰/۷۳، ۸۹/۰۹ و ۸۹/۰۹ درصد بیشترین تاثیر را در بازداری از رشد ریشه ای قارچ *F. oxysporum* داشتند. جدایه های H-4 و H-24 *B. coagulans* در سطح پایین تری نسبت به سه جدایه دیگر قرار گرفتند. از بین تمام جدایه ها جدایه H-4 در غلظت ۵ میکرومول کلرید آهن از رشد ریشه ای قارچ *G. candidum* در محیط King's B جلوگیری کرد.

جدول ۴: خصوصیات افتراقی باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از ریزوسفر درختان توت

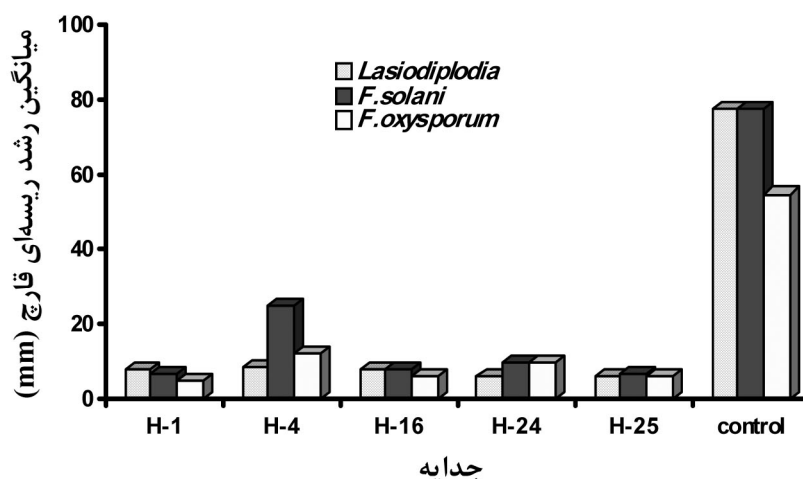
واکنش جدایه های آنتاگونیست					خصوصیات
H-25	H-24	H-16	H-4	H-1	جدایه
+	+	+	-	+	رنگ آمیزی
+	+	+	-	+	رشد هوازی در محیط کشت O/F
-	-	-	+	-	تولید رنگدانه فلورسانت
-	-	-	-	-	فوق حساسیت
+	+	+	-	+	تولید اسپور
-	-	-	+	-	لهانیدن سیب زمینی
+	+	+	+	+	دهیدرولیز آرژنین
-	-	-	-	-	تولید لووان
+	+	+	-	+	احیاء نیتروژن
+	+	+	-	+	هیدرولیز نشاسته
+	+	+	-	+	هیدرولیز ژلاتین
-	-	+	+	-	استفاده از سیترات
-	-	-	+	-	زایلوز
+	-	-	+	-	آرابینوز
-	-	-	-	-	مانیتول
-	-	-	-	-	آزمون VP



شکل ۱: مقایسه تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد ریشه ای قارچ های مولد پوسیدگی طوفه و ریشه توت



شکل ۲: مقایسه تاثیر ترشحات خارج سلولی باکتری‌های آنتاگونیست در غلظت ۲۵٪ روی قارچ‌های مولد پوسیدگی طوقه و ریشه توت



شکل ۳: مقایسه تاثیر آنتی بیوتیک جدایه های باکتری‌های آنتاگونیست روی قارچ‌های مولد پوسیدگی طوقه و ریشه توت (۵٪).

## بحث

عوامل بیوکنترل باکتریایی با تولید متابولیت های خارج سلولی از قبیل آنتی بیوتیک‌ها (فنازین‌ها، پیرول‌ها، باکتریوسین‌ها) سیدروفورها و مکانیزم‌هایی مانند کلنیزه کردن ریشه، ایجاد مقاومت القایی و تحریک رشد گیاهی در کاهش بیماری‌های گیاهی نقش دارند. اهمیت نسبی هر یک از این مکانیزم‌ها بر اساس شرایط ریزوسفر و همچنین در میان استرین‌ها تا حد زیادی متفاوت است (Weller, 1988). آنتی بیوتیک‌ها اغلب یک نقش اساسی را در کاهش بیماری توسط برخی باکتری‌ها ایفا می‌کند (Fravel, 1988). نتایج حاصل از بررسی اثرات آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل باکتریایی جداسازی شده از باغات توت استان گیلان نشان داد که آنها از قدرت تولید آنتی بیویز بالایی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار هستند. ۵ استرین باکتری آنتاگونیست قادر به

ایجاد هاله بازدارندگی بر روی هر سه قارچ عامل بیماری به میزان ۱ تا ۵ میلی متر در محیط کشت NA+PDA بودند. تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست روی رشد ریشه‌های قارچ‌های عامل بیماری مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که سه جدایه H-4، H-1 و H-16 روی محیط کشت NA تولید ترکیبات فرار ضد قارچی می‌کنند که در کنترل سه قارچ عامل بیماری موثر می‌باشد و دو جدایه دیگر (H-25 & H-24) فقط روی قارچ *L. theobromae* تأثیر داشتند. تولید مواد فرار ضد قارچی نیز یکی از مکانیزم‌های بیوکنترل عوامل باکتریایی محسوب شده که می‌تواند سرعت رشد میسلیومی و فعالیت آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهد. پاسخ میزبان به ترکیبات فرار باکتریایی همزمان به گونه، محیط، سن رشدی میزبان و عوامل بیوکنترل بستگی دارد (Fiddaman & Rosall, 1994). استرین‌ها آنتاگونیست دارای قدرت تولید آنتی بیوتیک در محیط NA بوده که از رشد رویشی قارچ‌های عامل بیماری جلوگیری نمود. در بررسی‌های آزمایشگاهی آنتی بیوتیک تولید شده توسط جدایه‌های باکتری، کنترل بسیار خوبی در جلوگیری از رشد ریشه‌های قارچ‌های عامل بیماری داشت. در آزمون تولید سیدروفور تنها یکی از باکتری‌ها که پسودوموناس فلورسانت بود توانست از رشد ریشه‌های قارچ *G. candidum* در غلظت ۵ میکرومول کلرید آهن سه ظرفیتی در محیط King's B جلوگیری نماید. طبق گزارشات، بیشتر جدایه پسود و مونسهای فلورسانس قادرند از رشد دیگر میکروارگانیسم‌ها در محیط با آهن کم جلوگیری نمایند و سیدروفورهای خالص شده نیز اثرات مشابهی دارند (Geels & Schippers, 1983 & Bakkar et al., 1991). در بررسی تأثیر ترشحات خارج سلولی باکتری‌های انتخابی بر روی رشد ریشه‌های قارچ‌های عامل بیماری اغلب با افزایش غلظت مایع خارج سلولی، افزایش میزان بازداری از رشد رویشی مشاهده گردید. البته در بعضی از جدایه‌ها با افزایش غلظت از ۵ به ۱۵ درصد هیچگونه تأثیر معنی‌داری روی قارچ نداشتند. با توجه به نتیجه حاصله از بررسی‌های آزمایشگاهی که نشان دهنده قدرت بالای تولید آنتی بیویز اکثر جدایه‌های آنتاگونیست می‌باشد، تلاش برای کاربرد مستقیم یا مواد مستخرج از جدایه‌های آنتاگونیست جهت کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت در آزمایشات صحرائی توصیه می‌گردد.

### سپاسگزاری:

نگارندگان لازم میدانند از خانم مهندس مرآت بخاطر اهداء قارچ‌های عامل بیماری، آقای دکتر سید اکبر خداپرست بخاطر شناسایی مجدد قارچ‌های عامل بیماری، آقای مهندس مازیار کامران و آقای مهندس شهاب حاج منصور بخاطر همکاری در آزمایشات عمیقاً قدردانی نمایند.

### منابع و مآخذ:

۱. آزاد دیسفانی، ف.ع. شریفی تهرانی، ق. حجارود و م. محمدی و ح. روحانی. ۱۳۷۹. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus, Pseudomonas* روی قارچ *V. dahlia* عامل پژمردگی پنبه، چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران صفحه ۵۷.
۲. کریمی، جوانشیر. ۱۳۷۴. توت برای ابریشم و ابریشم‌های بدون توت. انتشارات دانشگاه تهران. ص ۲۲۶۵.
۳. نیک‌نژاد کاظم پور، م. پدram فرح. و الهی نیا، س. ع. ۱۳۸۱. بررسی اثر چند قارچکش و قارچ آنتاگونیست علیه عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در اثر *Rhizoctonia solani kuhn*. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ششم. شماره چهارم. صفحه ۱۵۷-۱۵۱.



۴. مرآت، ا. میرحسینی مقدم، س. ع. روحانی، ح. ۱۳۸۳. معرفی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان توت در استان گیلان، شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۴۳۷.
5. Aoki, K. (1971). On the root rot of mulberry in Thailand. Bull. Thai Seri. Cent., 1: 13-17
  6. Aoki, T. & Matsu, O. (1959). Studies on root rot of the mulberry trees caused by *Helicobasidium mompa* & *Rosellinia necatrix*. J. Seric. Japan, 28: 120-129
  7. Bakker, P.A.H.M., Van Peer, R., Schippers, B. (1991). Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and prospects. In Biotic interaction and soil-borne diseases. Elsevier sciences publisher 1991 USA. pp. 217-230.
  8. Duke, J. A. (1983). Handbook of Energy Crops. [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/panicum-maximum.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/panicum-maximum.html)
  9. Fahy, P. C. and Persley, G.J. (1983). Plant Bacterial Diseases, a diagnostic guide. Academic Press. Academic Press, Sydney, Australia.
  10. Fiddaman, P.J. and Rossall, K. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis* J. Appl. Bacteriol. 76: 395-405.
  11. Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 75-91.
  12. Gangwar, S. K. and Thangavelu, K. (1991). Occurrence of mulberry diseases in Tamil Nadu. Indian-Phytopathology. 44: 4, 545-549.
  13. Geels, F. P., and Schippers, B. (1983). Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Phytopathol. Z., 108, 193-206.
  14. Gupta, V.P., Tewari, S.K., Govindaiah and Bajpai, A.K. (1999). Ultrastructure of mycoparasitism of *Trichoderma*, *Gliocladium*, and *Laetisaria* species on *Botryodiplodia theobromae*. Journal-of-phytopathology. 147: 1, 19-24.
  15. Kakuliya, M.A. & Gogeliya, I.F. (1970). A study of the resistance to root rot of ungrafted material from different mulberry varieties. Trudy Gruzinskogo Sel'sko Khozyaistvennogo instituta, 76-77: 271-282.
  16. Kraus, J. and Loper, J.E. (1990). Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic Studies pp. 177-175. In: Keel, C. Koller, B. and Defago, G. (eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, InerlaKen, Switzerland.
  17. Luke P.B., Sathiyap. (1982) Current Science., 51, 427
  18. Mew, T.W. and Rosales, A.M. (1986). Bacterization of rice plants for the control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 76: 1260-1264.
  19. Philip, T., Govindaiah, Bajpai, A.K., Nagabhushanam, G. and Naidu, N.R. (1997). A preliminary survey on mulberry disease in south India. Indian-Journal-of-Sericulture, 36: 2, 128-132
  20. Philip, T., Gupta, V.P., Govindaiah, Bajpai, A.K. and Datta, R.K. (1995). Disease of mulberry in India- Research priorities and management strategies. International-Journal-of-Tropical-Plant-Disease. 12: 1-21.
  21. Philip, T., Sharma, D.D. & Govindaiah (2001). Interaction between some biocontrol agents and mulberry root rot pathogen *Fusarium solani* and *F. oxysporum*. Sericologia 41: 569-576.
  22. Schaad, N. W. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. (2nd ed.). A.P. St. Paul. Minnesota. U.S.A. 164 pp.
  23. Shree, M.P. and Nataraja, S. (1993). Post-infectious biochemical and physiological changes in mulberry. Department of Sericulture Bangalore University, Bangalore 560 056, India.
  24. Sing, V. and Deverall, B.J. (1984). *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruits. Trans. Br. Mycol. Soc. 83: 487-490.
  25. Teotia, R.S. and Sen, S.K. (1994). Mulberry disease in India and their control. Sericologia 34: 1-18
  26. Vidhyasekaran, P., and M. Muthamilan. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for control of rice sheath blight. Biocontrol Science and Technology. 8: 67-74
  27. Weller, D.M. and Cook, R.J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73: 463-469.

# The Study of Bacterial Antagonistic Effect Decay Agents of Crown and Root of Mulberry Trees in Guilan Province.

**H. Rahanandeh**

*Lecture Department of Plant pathology, Arak, Islamic Azad University*

**M. Niknejad Kazempour**

*Assistant Professor, Department of Plant pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University*

**N. Hasanzadeh**

*Assistant Professor Department of Plant pathology, Science and Reseach, Islamic Azad University (Tehran-Iran)*

**Keywords:** siderophore, mulberry, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Lassiodiplodia theobromae*, *Geotrichum candidum*

## Abstract

In this study antagonistic effects of some bacteria isolated from mulberry trees were assessed against *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Lassiodiplodia theobromae* under laboratory condition. Five bacterial isolates were able to suppress the fungal growth at the rate of 1-5 mm on PDA. Four of the bacterial strains (H1, H16, H24, H25) were identified as *Bacillus* spp. and the strain H4 was assigned as *Pseudomonas fluorescense*. The volatile metabolites released from antagonistic bacteria could inhibit the growth of fungi *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Lassiodiplodia theobromae* at the rate of 25 to 35, 36.11 to 47.35, 25.18 to 76.66 percent, respectively. H4 strain produced siderophore on King B medium which contained 5, 50, 100  $\mu\text{mol FeCl}_3$  which inhibited the mycelial growth of the *Geotrichum candidum*. The extracellular extracts of selected antagonists reduced the vegetative growth of pathogenic fungi by increasing the extracts concentration. In addition antagonistic bacteria could produce antibiotic substances which led to stop the fungal growth.