SID

فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه‌های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

۴۰ درصد تخفیف نوروزی ویژه کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۳، پاییز ۹۱

وقوع بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در استان زنجان و ارزیابی اثر بازدارندگی باکتری های ریشه گندم روی قارچ عامل بیماری

فهیمه ژولیده[۱]، علیرضا معرفت[۲]*و بیتا ناصری[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲ *- **نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲۳

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه یا پاخوره گندم که عامل آن قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) است، یکی از بیماری های مهم گندم به شمار می آید. در ایران این بیماری تاکنون از برخی مناطق مانند استان های مرکزی و گلستان گزارش شده است. طی چند سال اخیر علائم مشکوک به بیماری در برخی مزارع گندم استان زنجان مشاهده شده که با توجه به اهمیت کشت گندم در این استان بررسی دقیق بیماری الزامی بود. هدف اصلی این تحقیق شناسایی قارچ عامل بیماری پاخوره گندم و بررسی تاثیر باکتری های ریشه گندم علیه قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای بود. بدین منظور از خاک اطراف بوته های آلوده به پاخوره گندم و همچنین از ریشه و ساقه های آلوده در ۲۵ مزرعه گندم استان نمونه برداری صورت گرفت. از نمونه ها قارچ Ggt جداسازی شد. علاوه برشناسائی آن بر اساس کلید های معتبر، بیماریزائی آنها روی گندم اثبات گردید و به این ترتیب این بیمارگر برای اولین بار از استان گزارش گردید. همچنین حدود ۴۲۰ جدایه باکتری از خاک و نمونه ها جداسازی شد. این رایزوباکترها براساس شکل پرگنه و مناطق نمونه برداری شده گروه بندی شدند. در ادامه ۱۴۰ جدایه انتخاب و طبق روش های معمول آزمایشگاهی توانایی آنها جهت بازدارندگی از رشد قارچ Ggt با تولید آنتی بیوتیک، سیدرفور و یا مواد فرار بررسی شد. سپس آزمون های بیوشیمیایی لازم برای شناسائی ۳۴ جدایه با قدرت آنتاگونیستی قوی انجام شد. نتایج نشان داد که باکتری های آنتاگونیست قوی عمدتا متعلق به جنس های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Erwinia* بودند. به منظور مطالعه گلخانه ای تاثیر جدایه های نماینده این سه جنس روی شدت بیماری پاخوره گندم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون گلخانه ای مشخص نمود که تیمار بذر با باکتری های نماینده اثر قابل توجهی در کاهش شدت بیماری پاخوره گندم و افزایش شاخص های رشدی گندم در مقایسه با شاهد آلوده داشتند.

کلید واژه ها: گندم، پاخوره گندم، *Gaeumannomyces graminis var. tritici*، کنترل بیولوژیکی

مقدمه

پوسیدگی های ریشه و طوقه از جمله بیماری های مهمی هستند که هر ساله به گندم خسارت وارد می کنند. از جمله عوامل اصلی این بیماری ها، قارچ های خاکزی متعلق به جنس های *Rhizoctonia* ,*Fusarium Pythium* و *Gaeumannomyces* هستند (ویس[۱]، ۱۹۸۷). پاخوره[۲] یکی از بیماری های پوسیدگی طوقه و ریشه گندم است که به وسیله قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) ایجاد می شود (اسکات[۳]، ۱۹۶۹؛ والکر[۴]، ۱۹۷۳؛

1- Wiese
2- Take-all
3- Scott
4- Walker

Archive of SID

www.SID.ir

ویس، ۱۹۸۷). این قارچ در اغلب خاک های دنیا به وفور یافت شده و خسارت وارد می کند، اما در خاک های قلیایی و تا حدی خنثی، غیر حاصلخیز و فاقد زه کشی مناسب شدت دارد و در خاک های مرطوب و جاهایی که زراعت گندم سه چهار سال پی در پی و بطور مستمر انجام می شود، شدیدتر است. رشد گیاهان شدیداً آلوده به این بیماری متوقف شده و قبل از بلوغ کامل وارد مرحله زایشی می شوند. علایم پاخوره بیشتر هنگام تشکیل سنبله و شیری شدن دانه ها بروز می کند که در این هنگام گیاهان ارتفاع یکسانی نداشته و قبل از بلوغ شروع به مردن می کنند، سنبله ها سفید شده و اصطلاحاً گیاه دچار سر سفیدی[1] می شود. با گسترش بیماری، میسلیوم تار عنکبوتی قارچ عامل بیماری در سطوح ریشه و پایه ساقه ظاهر می شود و بتدریج بافت های طوقه و پایه ساقه به رنگ تیره در می آیند (وست و سرور[2]، ۱۹۶۳). کنترل بیولوژیکی برای زوال بیماری پاخوره گندم بسیار موثر بوده و با نام اختصاصی take-all decline (TAD) نامگذاری شده است. در پاخوره گندم بعد از چند سال تک کشتی و حداقل یک شیوع شدید بیماری، شدت آن در سال های بعد به خودی خود کاهش می یابد (رایجماکر و همکاران[3]، ۱۹۹۷). شواهد قوی پیدا شده که سودوموناس های تولید کننده آنتی بیوتیک فاکتور کلیدی کنترل بیماری در خاک های TAD هستند. اسمیلی[4] (۱۹۷۸) و سیواسی تمپارام و همکاران[5] (۱۹۷۹) نقش *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* در بازدارندگی طبیعی از رشد قارچ Ggt در ریزوسفر گندم را نشان دادند. ورانی و همکاران[6] (۱۹۸۱) با استفاده از سویه *P. putida* K11 در شرایط گلخانه ای توانستند علائم بیماری پاخوره گندم را در ریشه ها کاهش دهند. همچنین کوک و همکاران[7] (۱۹۸۸) در مزرعه با استفاده از سویه *P. aureofaciens* 30.84 بیماری پاخوره گندم را تا حد مطلوبی کنترل کردند. در ایران نیز مطالعاتی در زمینه امکان کنترل بیولوژیک بیماری پاخوره گندم توسط باکتری های آنتاگونیست و عمدتا باکتری های متعلق به سودوموناس های فلورسنت صورت گرفته است که بیانگر فراوانی این باکتری ها در مزارع گندم مناطق مورد بررسی و قدرت بازدارندگی بالای آنها از قارچ عامل بیماری است (احمد زاده و همکاران، ۱۳۸۷؛ صداقت فر و همکاران، ۱۳۸۱؛ نمازی فرد و همکاران، ۱۳۸۳). علی رغم مشاهده علائم مشکوک به بیماری پاخوره گندم در برخی از مناطق کشت گندم در استان زنجان، تا قبل از این تحقیق، هیچ بررسی در مورد آن انجام نشده بود. لذا این تحقیق انجام شد تا اولا وجود بیماری دراستان اثبات و عامل آن شناسائی گردد؛ ثانیا شناسایی مقدماتی باکتری های ریزوسفر گندم با توانایی کنترل قارچ عامل بیماری به عمل آید.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی قارچ عامل بیماری پاخوره گندم

طی بهار و تابستان ۱۳۸۸ در چهار مرحله از مزارع گندم پنج شهرستان استان زنجان شامل زنجان(خیرآباد)، خرمدره، ابهر، خدابنده و سلطانیه از گیاهان دارای علائم شاخص بیماری و یا مشکوک به بیماری شامل سفیدشدن خوشه، کوتولگی، پوسیدگی تیره رنگ ریشه و طوقه و پژمردگی نمونه برداری انجام شد. نمونه ها درون بسته های پلاستیکی به آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه زنجان منتقل شدند. در آزمایشگاه ریشه و طوقه هر نمونه با آب شستشو داده شد و قطعاتی به اندازه ۳-۵ میلی متر از حد فاصل ناحیه سالم و آلوده هر نمونه تهیه گردید. قطعات جمع آوری شده با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی و پس از شستشو با آب مقطر

1- White head
2-West & Thrower
3- Raaijmakers *et al.*
4- Smiley
5- Sivasithamparam
6- Vrany *et al.*
7- Cook *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

استریل و خشک شدن روی کاغذ صافی استریل، روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار[1] قرار داده شدند. تشتک ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ تا ۷ روز نگهداری و خالص سازی قارچ های رشد کرده به روش کشت نوک ریسه انجام شد (دینگرا و سینکلر[2]، ۱۹۹۵).

شناسایی و اثبات بیماریزایی قارچ عامل بیماری پاخوره گندم

جهت تشخیص قارچ *Gaeumannomyces graminis* از سایر قارچ های جدا سازی شده، پرگنه قارچ ها روی محیط کشت نیمه انتخابی سیب زمینی دکستروز آگار حاوی ریفامپیسین[3] کشت شد و در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بررسی مورفولوژی ریسه و هیفوپودیوم ها با استفاده از روش والکر با کلید CMI Description انجام شد (والکر، ۱۹۷۳). جهت بررسی فرم جنسی، به روش وست و سرور (۱۹۶۳) قارچ Ggt روی محیط گلوکز آسپاراژین آگار[4] آگار[4] کشت گردید. تشتک ها برای مدت سه روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و پس از آن چهار هفته در روشنایی قرار گرفت. همچنین جدایه ها روی محیط کشت انتخابی عصاره برگ گندم[5] جهت تولید پریتس و آسکوسپور کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جهت اثبات بیماریزایی جدایه ها، از بذور گندم رقم شهریار تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان و از روش مایه زنی گندم استفاده گردید. بذور ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و پس از خشک کردن آنها زیر هود، برای کشت نگهداری شدند. برای تهیه مایه تلقیح، بذور گندم در ارلن در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در دو روز متوالی اتوکلاو شدند. در ادامه ۱۰ قرص پنج میلی متری از قارچ تازه کشت شده در مجاورت بذور استریل قرار گرفتند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس در گلدان های پلاستیکی حاوی خاک اتوکلاو شده، پنج بذر آماده شده برای کشت در تماس با ۱۰ عدد بذر گندم پوشیده شده توسط قارچ (مایه تلقیح) کاشته شدند (ولر و کوک، ۱۹۸۳). این آزمون برای ۱۰ جدایه قارچ با چهار گلدان تکرار و یک شاهد (به ازای هر جدایه) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. شدت بیماریزائی جدایه ها به تفکیک منطقه طبق روش ولر و کوک (۱۹۸۳) با نرم افزار MSTATC مقایسه گردید.

بررسی امکان کنترل بیماری پاخوره با باکتری های خاکزی

نمونه برداری و جداسازی باکتری های فراریشه

بیست و پنج نمونه خاک مجاور و در تماس با ریشه گندم از مزارع شهرستان های خرمدره، ابهر، سلطانیه، خدابنده، ماه نشان و زنجان به صورت تصادفی جمع آوری شد و در نایلون های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس ۱۰۰ گرم از هر نمونه خاک در ۲۰۰ سی سی آب مقطر استریل ریخته شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر با حرکتی آهسته قرار داده شد. پس از آن ظروف برای پنج دقیقه بدون حرکت نگه داشته شده و پس از ته نشین شدن رسوب، ۱۰۰µl از محلول رویی روی محیط کشت های نوترینت آگار[6]، نوترینت آگار حاوی یک درصد سوکروز[7] و کینگ ب[8] کشت داده شد و تشتک ها به مدت پنج روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در مجموع ۴۲۰ پرگنه از تشتک ها انتخاب و به صورت لکه ای روی محیط نوترینت آگار کشت و نگهداری شدند. جهت گروه بندی ابتدائی، آزمونهای بیوشیمیائی من جمله گرم، اکسیداز و رشد هوازی/بی هوازی برای کلیه جدایه ها و

1- PDA
2- Dhingra & Sinclair
3- R-dPDA
4- GAA
5- WLA
6- NA
7- NAS
8- King's B

Archive of SID
www.SID.ir

طبق روش های توصیه شده شاد و همکاران[1] (۲۰۰۱) انجام گرفت. بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی جدایه ها روی محیط های کشت و نتایج آزمون ها، ۱۴۰ جدایه جهت بررسی اثر آنتاگونیستی روی قارچ عامل بیماری انتخاب شدند.

بررسی اثرات آنتاگونیستی باکتری ها روی قارچ *Gaeumannomyces graminis*

بررسی تولید ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار

این آزمون به روش کشت چهار نقطه ای هر یک از جدایه ها در چهار قسمت تشتک حاوی محیط سیب زمینی دکستروز آگار انجام شد، سپس یک قرص ۵ میلیمتری از کشت تازه قارچ در مرکز تشتک گذاشته شد، در تشتک های شاهد نیز به جای باکتری آب مقطر استریل قرار گرفت. کشت های فوق در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته نگهداری شدند (ولر و کوک، ۱۹۸۳). پس از آن قطر هاله بازدارندگی از رشد قارچ، در صورت وجود، اندازه گیری گردید.

بررسی تولید سیدروفور

این آزمون در محیط کشت کینگ ب انجام شد. برای این منظور جدایه مورد نظر در چهار طرف تشتک کینگ ب بدون و حاوی ۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلرید فریک کشت و تشتک ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس یک قرص پنج میلیمتری از کشت قارچ روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار برداشته و در مرکز تشتک های کینگ ب قرار داده شد. تشتک ها مجددا در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و پس از یک هفته قطر هاله بازدارندگی از رشد قارچ اندازه گیری گردید (پیرسون و ولر[2]، ۱۹۹۴؛ ولر و کوک، ۱۹۸۳).

بررسی تولید مواد فرار

براساس روش فیدامن و روزال[3] (۱۹۹۴) جدایه باکتری مورد نظر به صورت یکنواخت روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار کشت داده شد. سپس یک قرص پنج میلی متری از کشت هفت روزه قارچ در وسط تشتک دیگری حاوی محیط سیب زمینی دکستروز آگار کشت شد. زیر هود و در مجاورت شعله گاز تشتک های حاوی باکتری و قارچ به گونه ای روی هم قرار گرفتند که تشتک حاوی قارچ بالا قرار گیرد. اطراف تشتک ها با پارافیلم کاملاً احاطه گردید. در تشتک شاهد به جای باکتری، یک قطره آب مقطر استریل قرار داده شد. تشتک ها به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از آن قطر پرگنه قارچ اندازه گیری گردید.

آزمون های بیوشیمیایی لازم جهت شناسائی مقدماتی جدایه های باکتریائی

از بین جدایه هائی که در هر سه آزمون فوق اثرات آنتاگونیستی قابل توجهی از خود نشان دادند تعداد ۳۴ جدایه از مزارع گندم شهرستان های مختلف استان انتخاب و آزمون های بیوشیمیایی لازم برای شناسایی آن ها طبق روش های ذکر شده توسط شاد و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. مشخصات آزمون های انجام شده در جدول ۳ آمده است.

بررسی گلخانه ای اثر آنتاگونیستی جدایه های باکتریائی

بر اساس نتایج آزمون های بررسی اثرات آنتاگونیستی جدایه ها در آزمایشگاه و همچنین نتایج آزمون های بیوشیمیایی، سه جدایه شناسایی شده به عنوان *Bacillus* sp.، *Pseudomonas* sp. و *Erwinia* sp. به ترتیب با کد شناسایی ۳۱۰، ۲۳۲ و ۲۲۳ جهت آزمون گلخانه ای انتخاب شدند. مایه تلقیح قارچ (مخلوطی از جدایه های قارچ) به روش ذکر شده در قسمت آزمون اثبات بیماریزائی جدایه های قارچی،

1- Schaad *et al.*
2- Pierson & Weller
3- Fiddaman & Rossall

Archive of SID
www.SID.ir

تهیه و به میزان یک درصد وزنی به خاک با ترکیب خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۲ اضافه شد. از کشت ۴۸ ساعته جدایه های باکتریائی روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار، سوسپانسیون تهیه و از این سوسپانسیون به میزان ۱-۱/۵ میلی لیتر روی محیط کینگ ب کشت شد. پس از نگهداری تشتک ها در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت، از باکتری های رشد کرده در هر تشتک سوسپانسیون همگنی در ۳/۴ میلی لیتر محلول متیل سلولز ۱٪ تهیه شد و با ۱۴ گرم بذر مخلوط گردید. به منظور تعیین جمعیت باکتری های زنده روی هر بذر، تعداد ۱۰ بذر تیمار شده با هر باکتری به طور تصادفی انتخاب و هر گروه درون هاون چینی استریل نرم شدند. بذور نرم شده به ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH=7. اضافه و از مخلوط همگن حاصل سری رقت های(CFU/g) 10^{-3} تا 10^{-8} تهیه گردید. با کشت ۰/۱ میلی لیتر از رقت های مختلف روی محیط نوترینت آگار در سه تکرار و شمارش تعداد پرگنه های ظاهر شده در سه تکرار، جمعیت باکتری محاسبه گردید (۲۱). آزمون گلخانه ای به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب بلوک های کامل تصادفی با ۱۰ تیمار شامل شاهد سالم، شاهد آلوده، جدایه باکتری ۳۱۰ (*Bacillus* sp.) ، جدایه باکتری ۲۲۳ (*Erwinia* sp.)، جدایه باکتری ۲۳۲ (*Pseudomonas* sp.) و مخلوطی از جدایه های ۳۱۰ و ۲۲۳ در دو سری آزمایش با و بدون تلقیح قارچ عامل بیماری پاخوره و در سه تکرار انجام شد. پس از پنج هفته علائم ثبت شدند و شدت بیماری براساس درصد آلودگی با رتبه صفر تا ۵ بدین ترتیب مشخص شدند. صفر مساوی بدون علایم بیماری، یک مساوی سیاه شدن ۲۵ درصد ریسه ها، دو مساوی سیاه شدن ۱۰۰-۲۵ درصد ریسه ها، سه مساوی لکه هایی در محل پنجه، چهار مساوی لکه هایی در حال پیشرفت بالاتر از پنجه و پنج مساوی گیاهان شدیداً کوتاه یا مرده (ولر و کوک ۱۹۸۳). فاکتورهای ارتفاع بوته، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه نیز اندازه گیری شدند.

نتایج

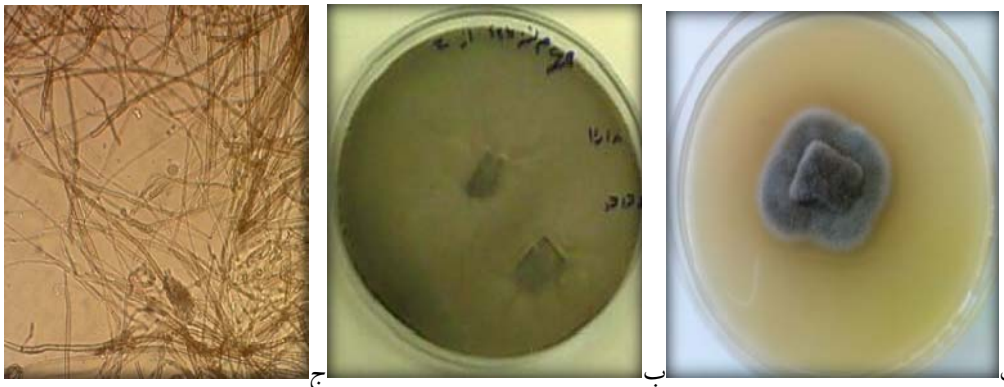
شناسایی قارچ بیمارگر

ده جدایه از نمونه های گیاهی جمع آوری شده از مناطق مختلف جداسازی شد. پرگنه های قارچ روی محیط انتخابی سیب زمینی دکستروز آگار حاوی ریفامپیسین به رنگ تیره در آمدند و پس از رشد کامل به صورت خاکستری مایل به زیتونی مشاهده شدند (شکل۱). ریسه ها مواج و متمایل به مرکز با قطر ۳-۷ میکرون، رونده، در دسته های چندتایی و به رنگ قهوه ای روشن؛ و هیفوپودها انتهایی یا بین ریسه ای، ساده و بدون لب، بیضوی و تیره تر از ریسه مشاهده گردید. به این ترتیب ویژگی های ریسه و هیفوپودیوم ها با مشخصات ذکر شده در کلید والکر (۱۹) کاملا" مطابقت داشتند و نهایتا" قارچ مذکور *Gaeumannomyces graminis* (Sacc) von Arx & Olivier var. *tritici* Walker شناسایی شد (شکل۱). قارچ Ggt روی هیچ کدام از محیط کشت های گلوکز آسپاراژین آگار و عصاره برگ گندم تولید پریتس نکرد. نتایج آزمون بیماری زایی عامل بیماری پاخوره گندم روی رقم شهریار نشان داد که این قارچ قادر به ایجاد علائم شاخص بیماری پاخوره روی ریشه گندم می باشد. قارچ مجددا" از ریشه تیمارهای تلقیح شده جدا شد اما از نمونه های شاهد که فاقد مایه تلقیح بودند قارچی رشد نکرد. بنابراین قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* برای اولین بار از استان زنجان گزارش گردید.

در مقایسه شدت بیماریزایی جدایه ها، بیماریزایی جدایه شماره ۹ از منطقه ابهر بطور معنی داری از بیماریزایی جدایه های ۱، ۳، ۷ و ۱۰ بترتیب از مناطق خرمدره، سلطانیه و خیراباد بیشتر بود (جدول۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- ویژگی های قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*؛ الف: پرگنه قارچ روی محیط PDA، ب: پرگنه قارچ روی محیطR-dPDA، ج: ریسه رونده و هیفوپودیوم ساده در مشاهده میکروسکپی

جداسازی و گروه بندی رایزوباکترها

از کل نمونه های جمع آوری شده و کشت روی سه محیط کشت نوترینت آگار، نوترینت آگار حاوی یک درصد سوکروز و کینگ ب، ۴۲۰ جدایه باکتری بدست آمد که پرگنه ها هم از نظر اندازه و رنگ و هم سرعت رشد با یکدیگر متفاوت بودند. جدایه ها براساس منطقه نمونه برداری، ویژگی های مورفولوژیکی روی محیط کشت و نتایج چند آزمون بیوشیمیایی اصلی، گروه بندی اولیه شدند و از هر گروه چند جدایه و در مجموع ۱۴۰ جدایه به عنوان نماینده انتخاب و در آزمون های بازدارندگی با قارچ مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی اثرات آنتاگونیستی در آزمایشگاه

نتایج بررسی تولید ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار نشان داد جدایه های زیادی قادر به ممانعت از رشد میسلیومی قارچ بودند بطوری که از ۱۴۰ جدایه مورد آزمون ۶۰ جدایه آنتاگونیست قوی بودند. در بررسی اثر بازدارندگی جدایه ها در محیط کینگ ب، ۸۰ جدایه آنتاگونیست قوی بودند. نکته مهم آن که اندازه ناحیه بازدارندگی با افزایش میزان کلرید فریک موجود در محیط کشت فقط در مورد برخی از جدایه های متعلق به جنس *Pseudomonas* کاهش نشان داد که بیانگر تولید سیدروفور توسط این جدایه ها بود؛ اما در مورد دیگر جدایه ها، اندازه ناحیه بازدارندگی با میزان کلرید فریک موجود در محیط کشت ارتباطی نشان نداد. از ۳۴ جدایه که در هر دو آزمون تولید ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار و تولید سیدروفور بیشترین اثر بازدارندگی را علیه قارچ نشان دادند، شش جدایه توانایی تولید مواد فرار را نیز داشتند و با این مکانیسم نیز قادر به بازدارندگی از رشد قارچ Ggt بودند (شکل۲).

بررسی گلخانه ای تاثیر آنتاگونیست ها بر شدت بیماری

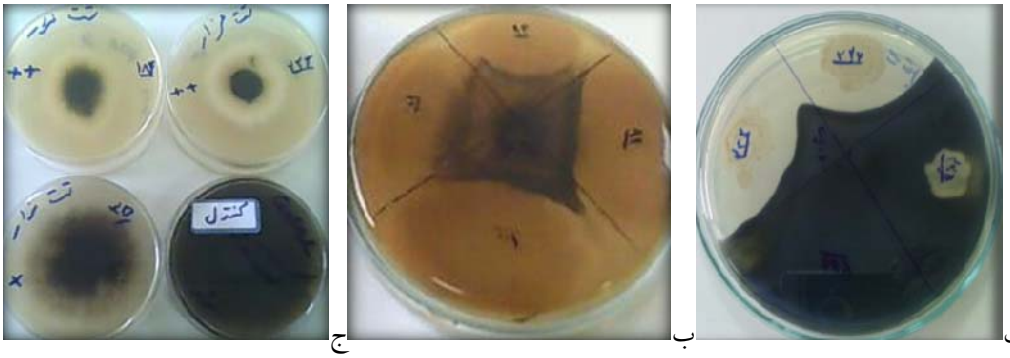
نتایج آزمایش گلخانه ای نشان داد که هر چهار تیمار حاوی جدایه های باکتریایی توانستند از شدت بیماری پاخوره در مقایسه با شاهد آلوده بطور معنی داری بکاهند؛ اما بین این چهار تیمار در تقابل با قارچ تفاوت معنی داری دیده نشد و تقریبا" همگی به یک اندازه شدت بیماری را کاهش دادند (جدول۲).

تاثیر آنتاگونیست ها بر فاکتورهای رویشی

جدایه های آنتاگونیست توانستند شاخص های ارتفاع بوته، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه را بطور معنی داری نسبت به شاهد آلوده افزایش دهند (جدول۲).

Archive of SID

www.SID.ir



الف ب ج

شکل ۲- اثرات بازدارندگی جدایه های باکتری روی قارچ Ggt؛ الف: تولید آنتی بیوتیک، ب: تولید سیدروفور، ج: تولید مواد فرار

میزان همبستگی (Correlation) شاخص های اندازه گیری شده

میزان همبستگی بین شاخص های اندازه گیری شده در شرایط گلخانه ای نشان داد که ضریب همبستگی شدت بیماری با سایر فاکتورها منفی بود و با افزایش شدت بیماری، شاخص های رشدی کاهش یافت. بقیه شاخص ها با یکدیگر همبستگی مثبت نشان دادند و بیشترین همبستگی بین شاخص های وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه مشاهده شد(جدول ۲).

شناسایی جدایه های آنتاگونیست

از ۱۴۰ جدایه مورد آزمون در بررسی اثرات آنتاگونیستی، ۳۴ جدایه به عنوان بهترین آنها انتخاب و برای شناسایی مورد آزمون های بیوشیمیایی قرار گرفتند. با مقایسه نتایج آزمون های بیوشیمیایی با خصوصیات ذکر شده برای باکتری ها توسط شاد و همکاران (۲۰۰۱)، جدایه ها در سه گروه قرار گرفتند. نتایج نشان داد حدود ۶۱/۷۶٪ جدایه های دارای قدرت آنتاگونیستی متعلق به جنس *Pseudomonas* ، ۲۰/۵۸٪ متعلق به جنس *Erwinia* و ۱۷/۶۴٪ متعلق به جنس *Bacillus* بودند. نتایج آزمون های انجام شده برای سه جدایه ۳۱۰،۲۲۳ و ۲۳۲ به عنوان سر گروهها در جدول ۳ آمده است.

جدول۱- میانگین شدت بیماری پاخوره گندم در مناطق مختلف استان زنجان

تیمارها	شدت بیماری(۰-۵)
خرمدره	۱/۶۰F
خرمدره	۲/۸۰cde
خدابنده	۳/۶۰bc
سلطانیه	۴/۲۰b
سلطانیه	۴/۲۰b
سلطانیه	۳/۲۰cd
سلطانیه	۲/۶۰de
ابهر	۳/۴۰bcd
ابهر	۵/۲۰a
خیرآباد	۲/۲۰ef

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲- مقایسه میانگین اثر باکتری های بازدارنده روی شدت بیماری پاخوره گندم و شاخص های رشدی اندازه گیری شده در شرایط گلخانه ای

تیمارها	شدت بیماری(۰-۵)	ارتفاع بوته(سانتی متر)	وزن تر ریشه(گرم)	وزن خشک ریشه
شاهد سالم	–	۱۵bc	۰/۰۷۷a	۲۷/۳۳bc
۳۱۰ (*Bacillus* sp.)	-	۱۸/۶۷a	۰/۱۰۷a	۳۸a
۳۱۰ و ۲۲۳ (*Bacillus* sp. و *Erwinia* sp.)	–	۱۶/ ۳۳b	۰/۰۹۷a	۳۲/۳۳b
۲۲۳ (*Erwinia* sp.)	-	۱۹/۶۷a	۰/۱۰۳a	۳۰/۳۳b
۲۳۲ (*Pseudomonas* sp.)	-	۱۹a	۰/۱۰۳a	۳۸/۶۷a
شاهد آلوده	۳/۰b	۷/۳۳e	۰/۰۴۷b	۱۳e
۳۱۰+Ggt	۰/۳۳a	۱۸/۳۳a	۰/۰۸۳a	۲۹/۶۷b
۲۲۳+۳۱۰+Ggt	۰/۳۳a	۱۳/۶۷cd	۰/۰۸۳a	۲۳/۶۷cd
۲۲۳+Ggt	۰/۶۶a	۱۲/۳۳d	۰/۱۰۰a	۲۰/۳۳d
۲۳۲+Ggt	۰/۶۶a	۱۹a	۰/۰۵۴c	۱۴/۳۳e

اعداد جدول میانگین ۳ تکرار می باشند. اعدادی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن در سطح p=0.05 با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند. در شاخص وزن خشک اعداد جدول اعداد اصلی هستند، اما برای آنالیز واریانس داده ها ۱۰۰۰برابر شدند.

بحث

طی این تحقیق وجود بیماری پاخوره در مزارع گندم استان زنجان تائید گردید و عامل آن بطور دقیق شناسائی شد. همچنین گروه های اصلی باکتری های خاکزی گندم شناسائی شدند و امکان استفاده از مهمترین آنها در کنترل بیولوژیک عامل بیماری پاخوره گندم بررسی گردید. طبق نتایج پرگنه قارچ عامل بیماری روی محیط انتخابی سیب زمینی دکستروز آگار حاوی ریفامپیسین تیره (خاکستری متمایل به زیتونی) رنگ می شود که این تغییر رنگ از مشخصات *Gaeumannomyces graminis* می باشد. از این خصوصیت در محیط نیمه انتخابی ارائه شده توسط پیرسون و ولر (۱۹۹۴) جهت جداسازی قارچ مذکور استفاده می شود. همچنین هیفوپودیوم های قارچ عامل بیماری از نوع ساده بود که از مشخصات واریته *tritici* می باشد (والکر، ۱۹۷۳). جدایه مذکور روی محیط گلوکز آسپاراژین آگار که توسط وست و سرور (۱۹۶۳) به منظور تحریک تولید پریتس بوسیله قارچ عامل بیماری پاخوره غلات پیشنهاد شده بود و همچنین روی محیط عصاره برگ گندم قادر به تولید پریتس نبود. طبق نتایج گلزار و همکاران (۱۳۷۲) برخی از جدایه های قارچ عامل بیماری پا خوره گندم قادر به تولید پریتس نمی باشند. تولید پریتس بوسیله قارچ Ggt می تواند تابع شرایط نوری، دما و سازگاری جنسی (sexual compatibility) باشد (هورنبی و همکاران[1]، ۱۹۹۸). شدت بیماری پاخوره گندم در مناطق مختلف استان زنجان متفاوت بود. طبق نتایج، شدت بیماری به ترتیب در شهرستان ابهر سپس در خرمدره و سلطانیه بیشتر از زنجان(خیرآباد) بود. عدم رعایت تناوب در برخی زمین های این منطقه می تواند یکی از دلایل بحث آلودگی بالای آن باشد. بنا بر نظر ولر (۱۹۸۸) تناوب گیاهان تیره بقولات با گندم نقش مؤثری در افزایش جمعیت سودوموناس های فلورسنت

1- Hornaby *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۳، پاییز ۹۱

جدول۳- ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه های آنتاگونیست جداشده از فراریشه گندم در استان زنجان

آزمون / جدایه	۳۱۰ (*Bacillus* sp.)	۲۲۳ (*Erwinia sp.*)	۲۳۲ (*Pseudomonas* sp.)
واکنش گرم	+	–	–
رشد هوازی	+	+	+
رشد بی هوازی	-	+	-
تولیدرنگدانه فلورسنت	–	–	+
فوق حساسیت در توتون	–	–	–
اکسیداز	–	-	+
کاتالاز	+	+	+
تولید لوان	–	–	+
لهانیدن سیب زمینی	–	–	–
رشد در حضور نمک ۶٪	+	+	+
رشد در ۳۷ درجه سانتیگراد	+	+	+
احیاء نیترات	–	+	+
تولید گازاز گلوکز	–	+	-
لسیتیناز	+	+	–
تولید سولفیدهیدروژن از سیستئین	+	–	-
هیدرولیز ژلاتین	-	–	+
هیدرولیز کازئین	-	+	-
هیدرولیز نشاسته	+	–	-
هیدرولیز توئین ۸۰	–	+	+
تولید اسیداز:			
مالتوز	–	+	+
سلوبیوز	–	+	–
مانیتول	+	+	–
لاکتوز	+	+	+
گالاکتوز	+	+	–
گلوکز	+	+	+
آرابینوز	+	+	+
فروکتوز	+	+	+
زایلوز	+	+	–
ملیبیوز	-	+	-

+: انجام واکنش، –: عدم انجام واکنش

www.SID.ir

دارد. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که ۳۰ درصد باکتری های جدا شده از خاک توانایی تولید هاله بازدارندگی ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی داشته اند (لیونس و همکاران[1]، ۱۹۸۹). بر اساس نتایج تحقیق حاضر تقریبا" ۵۰ درصد باکتری های بررسی شده توانایی بالایی در بازدارندگی از قارچ عامل بیماری در آزمون چهار نقطه ای روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار داشتند. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جدایه های *Pseudomonas* با فراوانی ۶۱/۷۶٪، جمعیت بیشتری در مقایسه با دیگر جدایه های آنتاگونیست داشتند. این مطلب با نتایج قبلی که نشان می دهد باکتری *Pseudomonas* هم از نظر جمعیت و هم از نظر تولید طیف وسیعی از متابولیت های میکروبی نقش موثرتری در بین باکتری های موجود در ریزوسفر دارد، مطابقت داشت (توماشو و ولر[2]، ۱۹۸۸). جمعیت جدایه گرم مثبت جنس *Bacillus* نسبت به *Pseudomonas* و *Erwinia* کمتر بود ولی هاله بازدارندگی وسیعی در تقابل با قارچ Ggt در محیط سیب زمینی دکستروز آگار ایجاد نمود. ولف و همکاران[3] (۲۰۰۲) وجود آنتی بیوتیک هایی نظیر Bacillomycin را در گونه های جنس *Bacillus* اثبات نمودند. بررسی اثر جدایه های آنتاگونیست روی قارچ Ggt در آزمون تولید مواد فرار نشان داد که جدایه های *Pseudomonas* موفق تر از دیگر آنتاگونیست ها عمل کردند. نوروزیان و همکاران[4] (۲۰۰۵) در بررسی تاثیر مواد فرار باکتری های *B. subtilis* و *P. fluorescens* bioI روی قارچ *F. garminearum* نتیجه گرفتند که *B. subtilis* بازدارندگی بیشتری نسبت به *P. fluorescens* داشت که این نتیجه با نتایج تحقیق حاضر متفاوت است. نتایج بررسی گلخانه ای تاثیر جدایه های باکتریایی روی بیماری پاخوره گندم نشان داد که جدایه های مورد آزمون از جنس های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Erwinia* توانستند به طور معنی داری از شدت بیماری پاخوره گندم در قیاس با شاهد آلوده بکاهند؛ همچنین توانستند وزن تر و خشک ریشه و ارتفاع بوته را در قیاس با شاهد آلوده بطور معنی داری افزایش دهند. اسمیلی (۱۹۷۸) و سیواسی تمپارام و همکاران (۱۹۷۹) نقش *P. fluorescens* و *P. putida* در بازدارندگی طبیعی از رشد قارچ Ggt در ریزوسفر گندم را نشان دادند. این پژوهش تلاش کرد تا علاوه بر شناسایی عامل پوسیدگی های ریشه گندم در منطقه زنجان، راهی برای کنترل غیر شیمیایی و طبیعی آن با بهره از میکروارگانیسم های خاک گندم فراهم آورد. در آینده پژوهش بیشتر در مورد مکانیسم های معرفی شده در راستای کنترل بیولوژیکی، روی آنتاگونیست های شناسایی شده ضروری به نظر می رسد. در نگاه وسیع تر موفقیت در کنترل بیولوژیک نیازمند مطالعات طولانی است و استفاده از این کنترل یک روش تکمیلی است. از این رو تلفیق این آنتاگونیست ها با سایر روش های کنترلی مانند روش های زراعی می تواند موثر باشد.

سپاس گزاری

از همکاری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی و همچنین سازمان جهاد کشاورزی استان زنجان در اجرای این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

1- Lievens *et al.*
2- Thomashow & Weller
3- Wulff *et al.*
4- Nourozian *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱. احمدزاده، م.، بهبودی، ک.، شریفی تهرانی، ع.، شیرزاد، ا.، ۱۳۸۷. بررسی فراوانی سودوموناده‌های فلورسنت مزارع گندم در اطراف آذرشهر تبریز و مطالعه قدرت بازدارندگی جدایه ها از رشد قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، ۲۴۸ ص.

۲. صداقت فر، ع.، حسن زاده، ن.، حیدری، ا.، ، فروتن، ع.،۱۳۸۱. بازدارندگی بیماری پاخوره گندم Take-all توسط جدایه هایی از باکتریهای *Pseudomonas* در شرایط گلخانه ای. پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران ،کرمانشاه، دانشگاه رازی، ۲۸ ص.

۳. گلزار، ح.، فروتن، ع.، ترابی، م. ۱۳۷۲. بیماری پاخوره گندم در گرگان و مازندران. آفات و بیماریهای گیاهی، ۶۱: ۱۴-۲۳.

۴. نمازی فرد، س.، اعتباریان، ح.، خداکرمیان، غ.، ترابی، م.، ۱۳۸۳. بررسی امکان کنترل بیولوژِیک پاخوره گندم بوسیله برخی باکتری های آنتاگونیست. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تبریز، دانشگاه تبریز،۴۶ ص.

5. Cook, R.J., Weller, D.M., and Bassett, E.N. 1988. Take-all and wheat. Biology Culture. Tests Control Plant Disease, 3:53.

6. Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B., 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Florida, USA, 434 pp.

7. Fiddaman, P.J., and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles. Bacteriology, 76: 345-405.

8. Hornby, D., Bateman, G.L., Gutteridge, R.J., Lucas, P., Osburn, A.E., Word, E., and Yarham, D.J. 1998. Take-all disease of cereals: A Regional Perspective. CAB international. London, UK, 384 pp.

9. Lievens, K.H., Van Rijsbergen, R., Leyns, F.R., Lambert, B., Tenning, p., Swings, J., and Joos, H. 1989. Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. Pesticide Science, 27: 141-154.

10. Nourozian, J., Etebarian, H.R., and Khodakaramian, G. 2005. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 28: 29-38.

11. Pierson, E.A., and Weller, D.M. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. Phytopathology, 84:940-947.

12. Raaijmakers, J., Weller, D., and Thomashow, L. 1997. Frequency of antibiotic producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. Applied and Environmental Microbiology, 63: 881-887.

13. Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edn. The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA, 396 p.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Scott, P.R. 1969. Control of survival of *Ophiobolus graminis* between consecutive crops of winter wheat. Annals of Applied Biology, 63: 37-43.

15. Sivasithamparam, K.C., Paker, A., and Edwards, C. S. 1979. Bacterial antagonists to the take-all fungus and fluorescent pseudomonads the rhizosphere of wheat. Soil Biology and Biochemistry, 11: 161-165.

16. Smiley, R.W. 1978. Colonization of wheat roots by *Gaeumannomyces graminis* inhibited by specific soils, microorganisms and ammonium-nitrogen. Soil Biology and Biochemistry, 10: 169-174.

17. Thomashow, L.S., and Weller, D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Bacteriology, 170: 3499-3508.

18. Vrany, J., Vancura, V., and Stanek, M. 1981. Control of microorganisms in the rhizosphere of wheat by inoculation of seeds with *Pseudomonas putida* and by foliar application of urea. Folia Microbiology, 26: 45-51.

19. Walker, J. 1973. *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. CMI Descriptions of Fungi and Bacteria. No: 381, 382 and 383.

20. Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-born plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Phytopatology, 26: 379-407.

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

22. West, G., and Thrower, L.B. 1963. Production of perithecia and microconidia in culture by *Ophiobolus graminis*. Phytopathology, 53: 534.

23. Wiese, M.V. 1987. Compendium of Wheat Disease. Second ed., APS Press, MN., pp 112.

24. Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mansfeid-Giese, K., Fels, J., Lubeck, M., and Itockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. subtilis* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv.*campestris*. Plant Pathology, 51: 574-584.

Archive of SID

www.SID.ir

SID

فیلم‌های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه‌های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

سامانه ویراستاری (ویرایش متون فارسی، انگلیسی، عربی)

۴۰ درصد تخفیف نوروزی ویژه کارگاه‌ها و فیلم‌های آموزشی

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران