دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال چهارم، شماره اول، بهار و تابستان 1395
صص 78-67

کنترل بیولوژیک *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* توسط باکتری‌های آنتاگونیست باسیلوس و سودوموناس ریزوسفر گوجه‌فرنگی در لرستان

سجاد جلالی[1]، **ناصر پنجه که**[2]، مصطفی درویش نیا*[3]، محمد سالاری[4]، احمد صالحی[5]

تاریخ دریافت: 93/12/16 تاریخ پذیرش: 94/3/5

چکیده

در این تحقیق اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* علیه بیمارگر در آزمایشگاه و روی گوجه‌فرنگی رقم اچ‌فلات در گلخانه بررسی شد. میزان بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی از رشد بیمارگر به روش کشت متقابل روی محیط کشت PDA ارزیابی گردید. دو جدایه از *P. fluorescens* و یک جدایه از *B. subtilis* بر بیمارگر در گلخانه به روش آغشته سازی ریشه گیاهچه‌ها با سوسپانسیون باکتری قبل از انتقال دادن گیاهچه‌ها به گلدان‌ها بررسی شد. یک‌سوم فوقانی خاک گلدان‌ها قبل از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها به نسبت 10 درصد وزنی با مایه تلقیح قارچ بیمارگر آلوده شده بود. برهم‌کنش بین آنتاگونیست‌ها و بیمارگر در گلخانه، 60 روز پس از مایه‌کوبی گیاهچه‌ها با اندازه‌گیری فاکتورهای رشدی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های *P. fluorescens* (P1)، *P. fluorescens* (P2) و *B. subtilis* در آزمایشگاه به ترتیب 28/8، 25/74 و 10/52 درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر را داشتند. آنتاگونیست‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* در آزمایش‌های گلخانه‌ای موجب کاهش شدت آلودگی و افزایش فاکتورهای رشدی بوته‌های گوجه‌فرنگی در حضور قارچ بیمارگر شدند. در روش کشت متقابل جدایه‌های *P. fluorescens* از قدرت آنتاگونیستی بالاتری برخوردار بودند، در حالی که در آزمایش گلخانه‌ای جدایه *B. subtilis* در افزایش رشد گیاه و کاهش بیماری مؤثرتر است.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی ریزوسفر، ضد قارچی، عوامل بیوکنترل طبیعی.

[1]- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
[2]- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
3- استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
4- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
5- مربی، گروه بیماری شناسی گیاهی، سازمان جهاد کشاورزی خراسان رضوی، مدیریت جهاد کشاورزی طرقبه شاندیز، خراسانی رضوی، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: mdarvishnia44@yahoo.com

مقدمه

بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی که عامل آن *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* است از بیش از 32 کشور جهان گزارش شده است (Jones *et al*., 1991). بر اساس تحقیقات انجام گرفته کنترل شیمیایی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی باید قبل از کاشت با ضدعفونی خاک انجام شود که اغلب این عمل با متیل بروماید صورت می‌گیرد (Sivan and Chet, 1986). استفاده از سموم شیمیایی برای مبارزه با بیماری‌ها باعث از بین رفتن میکروارگانیسم‌های مفید و به هم خوردن تعادل اکولوژیکی می‌گردد (Behboudi *et al*., 2005). استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست برای مبارزه با عوامل بیماری‌زای قارچی گیاهان از روش‌های مؤثر برای کاهش مصرف سموم و درنتیجه جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست است (Behboudi *et al*., 2005). طبق بررسی‌های انجام گرفته، جدایه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* موجب افزایش جوانه‌زنی بذرهای گوجه‌فرنگی در خاک آلوده به قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* و همچنین باعث کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌شود (Asha *et al*., 2011). در تیمار بذر منداب آغشته به باکتری‌های *B. subtilis*، *P. fluorescens* و *Stenotrophomonas maltophilia*، بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در شرایط مزرعه به ترتیب به میزان 16/5، 18 و 22/9 درصد کاهش پیدا کرد و میزان محصول 4/2، 2/9 و 9/01 درصد افزایش یافت (Berg, 1996). در این تحقیق اثرات آنتاگونیستی دو جدایه از *P. fluorescens* و یک جدایه از *B. subtilis* علیه عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد.

مواد و روش ها

جداسازی قارچ عامل بیماری

در طول فصل‌های تابستان و پاییز 1391 بوته‌های گوجه‌فرنگی دارای نشانه‌های بارز پژمردگی فوزاریومی از مزارع گوجه‌فرنگی مناطق مختلف استان لرستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی قارچ بیمارگر با استفاده از محیط کشت PDA اسیدی انجام شد. میان گره بالای طوقه و بندهای اول و دوم ساقه‌های آلوده جدا شد و با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت 1 تا 3 دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس، نمونه‌ها سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و پس از خشک کردن آن‌ها بر روی کاغذ صافی سترون، با استفاده از چاقوی جراحی سترون پوست رویی ساقه برداشته شد و از بافت‌های آوندی تغییر رنگ داده، قطعات 5 میلی‌متری برش داده شد. از مجموع نمونه‌های تهیه‌شده از هر اندام آلوده، به‌طور جداگانه دو قطعه در یک تشتک پتری حاوی محیط PDA کشت گردید و تشتک‌ها در انکوباتور در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از 2 روز توده‌های میسلیومی هر تشتک به یک تشتک پتری جدید حاوی محیط کشت PDA منتقل شد و تشتک‌ها تا 4 روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد پرگنه قارچ، از آن‌هایی که ظاهری شبیه پرگنه‌های گونه‌های فوزاریوم داشتند کشت جدید تهیه شد. پس از جداسازی قارچ نسبت به خالص‌سازی آن با استفاده از روش تک اسپور کردن اقدام شد (Banihashemi and De Zeeuw, 1969). قارچ‌های فوزاریوم جداسازی شده شامل گونه‌های

F. oxysporum، *F. solani*، *F. javanicum*، *F. equiseti*، *F. pseudoanthophilum* و *F. virguliforme* بودند. شناسایی فرم *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* بر اساس رنگ و شکل پرگنه و مشخصات اندام‌های زایشی شامل فیالیدها، ماکروکنیدیوم‌ها، میکروکنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها صورت گرفت. شناسایی گونه‌های فوزاریوم با استفاده از کلیدهای معتبر قارچ شناسی انجام شد (Leslie and Summerell, 2006؛ Gerlach and Nirenberg, 1982؛ Nelson *et al*., 1983).

آزمون اثبات بیماری‌زایی قارچ روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی

جهت تهیه مایه تلقیح قارچ فوزاریوم ابتدا مقدار 10 گرم کلش خردشده گندم را به همراه 250 میلی‌لیتر آب مقطر در یک ارلن مایر 1 لیتری ریخته و دو بار متوالی و هر بار به مدت 24 ساعت در 121 درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. یک قطعه 5 میلی‌متری از کشت چهارروزه قارچ را به آن اضافه نموده و به مدت 4 روز روی دستگاه شیکر در 120 دور در دقیقه قرار داده شد تا به‌اندازه کافی اسپور تولید کند (Banihashemi, 2010). با استفاده از لام هماسیتومتر جمعیت اسپور تعیین و سپس، روی 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید. برای بررسی عکس‌العمل گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی به هر یک از جدایه‌های بیمارگر، کشت بذور و تولید گیاهچه گوجه‌فرنگی رقم اچ فلات صورت گرفت. در این روش بذور بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت 1 دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون، به مدت 48 ساعت لای پارچه ململ مرطوب خیسانده شدند. بذرها پس از جوانه‌زنی به بسترهای کشت مخلوط خاک و پرلیت به نسبت 1:1 انتقال داده شدند. بیست روز بعد از نگهداری بسترها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری 12 ساعت روشنایی، گیاهچه‌های دو تا چهار برگی حاصله برای مایه‌زنی در نظر گرفته شدند (Manafi *et al*., 2012). ریشه گیاهچه‌ها به‌آرامی از بستر خارج و پس از شستشو زیر جریان ملایم شیر آب به مدت 3 تا 5 دقیقه در سوسپانسیون میکروکنیدی فوزاریوم با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر آب فروبرده شدند. سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک، کوکوپیت و پرلیت به نسبت 1:1:3 کشت و در گلخانه در دمای 2±23 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در گلدان‌های شاهد به‌جای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر سترون استفاده گردید. گیاهچه‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفته و نشانه‌های ظاهری و تعداد گیاهچه‌های سالم و بیمار و درصد پژمردگی هر گیاهچه یادداشت برداری شد (Banihashemi, 2010).

ارزش‌گذاری شدت بیماری، 30 روز بعد از مایه‌زنی با معیار نمره دهی پنج عددی صورت گرفت که در آن صفر: گیاه سالم و مصون از هرگونه علائم بود، 1: ظهور نشانه‌های کلروز و پیچیدگی در برگ‌ها تا 25 درصد، 2: ظهور نشانه‌ها از 26 تا 50 درصد، 3: ظهور نشانه‌ها از 51 تا 75 درصد، و 4: ظهور نشانه‌ها از 76 تا 100 درصد بود (Kamal *et al*., 2009؛ Amini, 2009).

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

نمونه‌برداری از ناحیه ریزوسفر بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی از مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان‌های خرم‌آباد و پلدختر استان لرستان صورت گرفت. برای جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست، از هر نمونه خاک ریزوسفر گوجه‌فرنگی، 10 گرم با 100 میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط شد و از آن به‌طور سریالی غلظت‌های 10^{-1} تا 10^{-6}

تهیه گردید. سپس، 100 میکرو لیتر از هر یک از غلظت‌ها به‌طور جداگانه روی محیط کشت آگار غذایی ریخته شد و به‌طور یکنواخت در سطح محیط کشت پخش گردید. درب تشتک‌های پتری در شرایط سترون تا زمان خشک شدن سطح محیط کشت باز نگه‌داشته شد. سپس تشتک‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ظهور پرگنه‌ها روی سطح محیط کشت، پرگنه‌هایی که از نظر شکل ظاهری و رنگ متفاوت بودند، انتخاب شده و جهت خالص‌سازی به محیط کشت آگار غذایی انتقال داده شدند. به‌منظور شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست، از روش‌های متداول بیوشیمیایی و مرفولوژیکی استفاده شد (Schaad *et al*., 2001).

ارزیابی اثرات آنتاگونیست‌ها بر بیمارگر در آزمایشگاه

اثرات آنتاگونیست‌ها بر بیمارگر *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* با استفاده از روش کشت متقابل صورت گرفت. برای این کار از تشتک‌های پتری 9 سانتی‌متری و از محیط کشت PDA استفاده شد. ابتدا آنتاگونیست‌ها به‌طور جداگانه در راستای قطر تشتک پتری به‌صورت خطی کشت داده شدند. پس از 24 ساعت نگهداری تشتک‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد، دو عدد دیسک میسلیومی 5 میلی‌متری قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* در حاشیه هر تشتک و به فاصله 4 سانتی‌متری از خط وسط آن قرار داده شدند. تشتک فاقد باکتری به‌عنوان شاهد آزمایش مورداستفاده قرار گرفت که حاوی محیط کشت و دو دیسک 5 میلی‌متری میسلیومی از قارچ بیمارگر بود. تشتک‌ها مجدداً در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن‌که در تشتک شاهد دو پرگنه قارچ بیمارگر به هم رسیدند در تشتک‌های آزمایشی شعاع پرگنه قارچ بیمارگر و فاصله بازدارندگی حاصل از تقابل بین قارچ و باکتری اندازه‌گیری شد (Michael and Nelson, 1972). درصد بازدارندگی آنتاگونیست‌ها از رشد میسلیوم بیمارگر با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازدارندگی آنتاگونیست از رشد قارچ بیمارگر} = \frac{\text{قطر ناحیه رشدی در شاهد} - \text{قطر ناحیه رشدی در تیمار}}{\text{قطر ناحیه رشدی در شاهد}} \times 100$$

بررسی اثرات بازدارندگی آنتاگونیست‌ها در گلخانه

به‌منظور تهیه مایه تلقیح فوزاریوم، قارچ روی مخلوطی از ماسه و آرد ذرت مرطوب (95 گرم ماسه+ 5 گرم آرد ذرت بعلاوه 50 میلی‌لیتر آب) که به مدت 30 دقیقه اتوکلاو شده بود کشت گردید. بدین منظور سوسپانسیون قارچ بیمارگر با غلظت 6×10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد و 2 میلی‌لیتر از آن به فلاسک حاوی 100 گرم مخلوط ماسه و آرد ذرت اضافه شد و پس از 20 روز نگهداری در انکوباتور با دمای 2±28 درجه سانتی‌گراد مورداستفاده قرار گرفت. مایه تلقیح بیمارگر به نسبت 10 درصد وزنی با خاک سترون گلدانی مخلوط و به یک‌سوم فوقانی گلدان‌ها اضافه شد. حجم دوسوم تحتانی گلدان‌ها به‌وسیله خاک پاستوریزه پرشده بود. گلدان‌ها 25 روز در گلخانه با دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر 3 روز یک‌بار آبیاری شدند تا قارچ فوزاریوم به‌خوبی در خاک مستقر گردد (Niknejad Kazempour *et al*., 2000). آزمون گلخانه‌ای، به روش آغشته‌سازی ریشه گیاهچه‌ها در سوسپانسیون باکتریایی در هنگام انتقال دادن گیاهچه‌ها به گلدان‌ها استفاده گردید. ابتدا چند زخم کوچک در ریشه در نزدیک طوقه به‌وسیله چاقوی جراحی سترون ایجاد شد و سپس ریشه و طوقه گیاهچه‌ها در داخل سوسپانسیون باکتری

آنتاگونیست با غلظت 1×10^9 cfu/ml فرو برده شدند و به مدت 1 دقیقه نگهداری شدند و سپس در گلدان کشت گردیدند. در تیمار شاهد به‌جای سوسپانسیون اسپور باکتری از آب مقطر دو بار سترون استفاده شد (Montealegre *et al.*, 2003).

برهم‌کنش بین جدایه‌های آنتاگونیست با قارچ بیمارگر، 60 روز پس از مایه‌کوبی گیاهچه‌ها از طریق تعیین درصد افزایش طول گیاه، درصد افزایش وزن خشک و تر گیاه به دست آمد. در تیمار شاهد به‌جای سوسپانسیون اسپور باکتری از آب مقطر دو بار سترون استفاده شد (Amini, 2009؛ Kamal *et al.*, 2009). جهت تعیین درصد افزایش وزن یا ارتفاع گیاهچه‌ها مطابق روش *اکرمی و ابراهیموف* از فرمول زیر استفاده شد (Akrami and Ebrahimof, 2010).

$$\text{درصد افزایش وزن یا ارتفاع گیاهچه} = \frac{\text{وزن یا ارتفاع گیاهچه شاهد}-\text{وزن یا ارتفاع گیاهچه در تیمار آنتاگونیست}}{\text{وزن یا ارتفاع گیاهچه در تیمار آنتاگونیست}} \times 100$$

ارزش‌گذاری شدت بیماری، با معیار نمره دهی پنج عددی که در قسمت آزمون بیماری‌زایی پژوهش حاضر شرح داده شد صورت گرفت (Kamal *et al.*, 2009؛ Amini, 2009). درصد کاهش بیماری با استفاده از فرمول DR%=(1-DT/DC)*100 محاسبه شد که در این فرمول DR: disease reduction به معنی کاهش بیماری، DC: disease in inoculated control به معنی بیماری در شاهد و DT: disease in treatment به معنی بیماری در تیمار می‌باشد (Sivan and Chet, 1986).

این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و سه تکرار انجام شد. به علت وجود عدد صفر در بین داده‌ها، جهت نرمال کردن داده‌ها از تبدیل $\sqrt{X + 0.5}$ استفاده شد. داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5% صورت گرفت.

نتایج و بحث

جدایه‌های عامل بیماری

میسیلیوم‌های پنبه‌ای و متراکم، با رنگ‌های سفید و بنفش کم رنگ تولید می‌کند. رشد در PDA سریع، میکروکنیدی فراوان، یک تا دو سلولی، بیضوی تا تخم مرغی، تشکیل بر روی فیالید به صورت سر کاذب، انواع یک سلولی به ابعاد 1/8 تا 3/6 × 3/6 تا 10/2 و انواع دو سلولی 3 تا 3/9 × 9/6 تا 16/2میکرون، ماکروکنیدی تا حدی داسی شکل و دیواره‌های طولی آن اغلب با خمیدگی غیر یکسان، سلول رأسی نازک و باریک و سلول پایه به شکل پاشنه، دارای 2 تا 5 جداره عرضی، به ابعاد 3 تا 5/04 × 27/6 تا 50/4 میکرون، کنیدیوفور منوفیالیدی کوتاه ساده یا منشعب، طول فیالیدها 7/2 تا 14/4میکرون، کلامیدوسپور به صورت انفرادی و جفت به قطر 5/4 تا 5/4 میکرون می‌باشد.

در این تحقیق از بین جدایه‌ها شناسایی شده، سه جدایه از قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* که از بوته‌های گوجه‌فرنگی آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی از مزارع گوجه‌فرنگی رباط و دوره چکنی (شهرستان خرم‌آباد) و مزارع چم انجیر (شهرستان پلدختر) جداسازی شده بود جهت انجام تست بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفت که به آن‌ها به ترتیب کدهای FOM، FOK و FOS اختصاص داده شد.

جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

از خاک ریزوسفر مجموع نمونه‌های گوجه‌فرنگی جمع‌آوری‌شده از استان لرستان، 15 باکتری که دارای کلنی‌های متفاوت بودند شناسایی شد. با ارزیابی اثر بازدارندگی این جدایه‌ها از رشد بیمارگر، سه جدایه با ایجاد هاله بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر جلوگیری کردند. این جدایه‌ها شامل *Bacillus subtillis*، *Pseudomonas fluorescens* (P1) (جداسازی شده از ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی شهرستان خرم‌آباد) و *P. fluorescens* (P2) (جداسازی شده از ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی شهرستان پلدختر) بودند. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده توسط *منافی و همکاران* که گزارش کردند که جدایه باکتریایی *P. fluorescens* جداشده از مزارع، در آزمایشگاه از رشد میسلیومی بیمارگر *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* جلوگیری کرد مطابقت داشت (Manafi *et al*., 2012). *صدفی و همکاران* موفق به جداسازی باکتری‌های تولیدکننده اسپور، متعلق به جنس *Bacillus* شدند که اثر آنتاگونیستی علیه قارچ *Fusarium roseum* var. *sambucinum* را داشتند (Sadfi *et al*., 2002).

نتایج آزمون اثبات بیماری‌زایی

هر سه جدایه FOM، FOK و FOS قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* از قدرت بیمارگری زیادی برخوردار بودند. بین دو جدایه FOM و FOK به ترتیب با 100 و 83/20 درصد بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P\leq0.05$) ولی این دو جدایه با جدایه FOS با 38/87 درصد بیماری‌زایی و مرگ گیاهچه اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P\leq0.05$). جدایه FOM، با دارا بودن قدرت بیماری‌زایی بالاتری نسبت به سایر جدایه‌های مورد آزمایش، در تست‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورداستفاده قرار گرفت.

تأثیر آنتاگونیست بر بیمارگر در آزمایشگاه

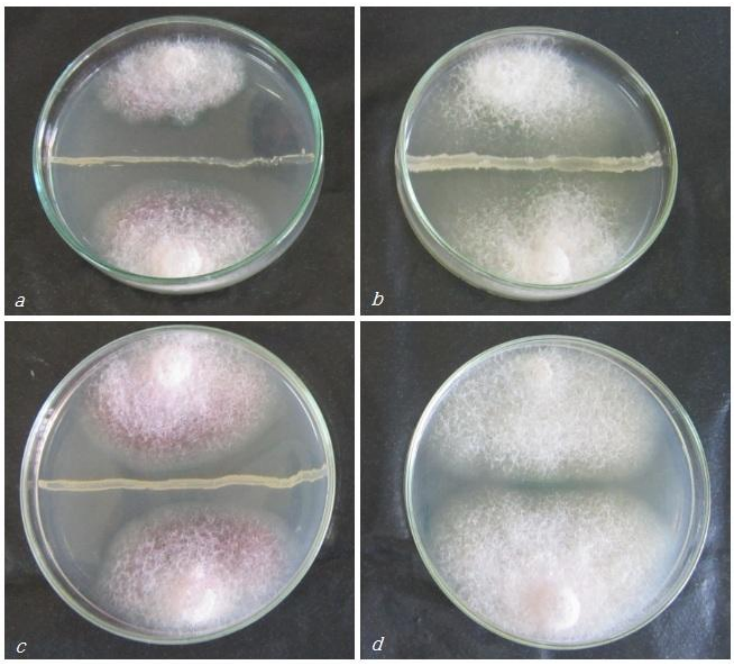
اثر جدایه‌های آنتاگونیستی بر بیمارگر در دو زمان 5 و 6 روز بعد از مایه‌کوبی با بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* مربوط به دو جدایه *P. fluorescens* (P1) با 35/19 درصد بازدارندگی و *P. fluorescens* (P2) با 32/97 درصد بازدارندگی، در زمان 5 روز بعد از مایه‌کوبی بیمارگر بود. در این زمان جدایه *B. subtillis* با 3/41 درصد بازدارندگی اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت. جدایه *B. subtillis* فقط در زمان 144 ساعت بعد از مایه‌کوبی با بیمارگر اختلاف معنی‌داری ($P\leq0.05$) نسبت به شاهد از خود نشان داد. مقایسه درصد بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست از رشد بیمارگر نشان داد که جدایه‌های *P. fluorescens* (P1) و *P. fluorescens* (P2)، در زمان‌های 120 و 144 ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، میزان بازدارندگی بیشتری از رشد میسلیومی بیمارگر داشتند و بین این دو جدایه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P\leq0.05$) و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول 1، شکل 1). نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی *منافی*

و همکاران نشان داد که درصد بازدارندگی جدایه باکتریایی *P. fluorescens* از رشد قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی به میزان 33/08 درصد بود که با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش مطابقت داشت (Manafi *et al*., 2012).

جدول 1- مقایسه میانگین فاصله بازدارندگی جدایه‌های *Bacillus subtillis* و *Pseudomonas fluorescens* از رشد *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در محیط کشت PDA.

تیمارها	120 ساعت پس از مایه‌کوبی		144 ساعت پس از مایه‌کوبی	
	بازدارندگی (درصد)	گروه	بازدارندگی (درصد)	گروه
B. subtillis	3/41	b	10/52	b
P2	32/97	a	25/74	a
P1	35/19	a	28/8	a

- اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند.
- داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.



شکل 1- بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست از رشد بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در محیط کشت PDA در 144ساعت بعد از مایه‌کوبی: *Pseudomonas fluorescens* (P1) (a)، *Bacillus subtilis* (b)، *Pseudomonas fluorescens* (P2) (c) و شاهد (d).

اثر عوامل آنتاگونیست بر بیمارگر در گلخانه

جدایه *P. fluorescens* (P1) در حضور بیمارگر باعث کاهش بیماری به میزان 62/5 درصد شد ولی نتوانست باعث افزایش معنی‌داری ($P\leq0.05$) در ارتفاع ریشه، وزن‌تر و خشک ریشه نسبت به شاهد آلوده شود. جدایه *B. subtilis* در حضور عامل بیماری باعث جلوگیری کامل از ایجاد بیماری در گیاه شد و هیچ‌گونه نشانه و علائمی از بیماری مشاهده نشد و به جز ارتفاع ریشه و وزن خشک ریشه در دیگر فاکتورهای رشدی گیاه افزایش معنی‌داری ($P\leq0.05$) نسبت به شاهد آلوده داشت (جدول 2 و 3).

جدول 2- تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtillis* و *Pseudomonas fluorescens* بر فاکتورهای مختلف رشدی گوجه‌فرنگی و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در خاک آلوده به *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در گلخانه.

تیمار	ارتفاع ساقه (cm)	ارتفاع ریشه (cm)	وزن‌تر اندام هوایی(gr)	وزن‌تر ریشه(gr)	وزن خشک اندام هوایی(gr)	وزن خشک ریشه(gr)	شدت بیماری (درصد)
P1	30/22a	22/17a	8/66ab	2/59a	1/2a	0/33a	-
P1+ *F. oxysporum*	27/33abc	18/77b	6/75b	1/52bc	0/98ab	0/2c	15b
B. subtilis	29/72ab	25/64a	10/51a	2/46a	1/15a	0/28ab	-
B. subtilis + F. oxysporum	26/83bc	19/39b	6/47b	1/83b	0/91b	0/21bc	0/00a
Control	24/44c	19/22b	7/73b	2/36a	1/21a	0/22bc	-
F. oxysporum	19/83d	15/42b	4/27c	1/18c	0/56c	0/15c	40b

- اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند. داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.

جدول 3- تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtillis* و *Pseudomonas fluorescens* بر فاکتورهای رشدی گیاهچه گوجه‌فرنگی و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در گلخانه. ریشه نشاها در سوسپانسیون 1×109cfu/ml باکتری فروبرده شد و فاکتورهای رشدی گیاه و شدت بیماری‌زایی در مقایسه با شاهد آلوده به‌صورت درصد تأثیر یادداشت برداری شده است.

تیمار	افزایش ارتفاع ساقه (%)	افزایش ارتفاع ریشه (%)	افزایش وزن‌تر اندام‌های هوایی (%)	افزایش وزن‌تر ریشه (%)	افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی (%)	افزایش وزن خشک ریشه (%)	کاهش شدت بیماری (%)
P1	34/38a	43/25a	50/69ab	54/44a	53/33a	54/55a	-
P1 + *F. oxysporum*	27/44abc	17/85b	36/74b	22/37bc	42/86ab	25/00c	62/50b
B. subtilis	33/28ab	39/86a	59/37a	52/03a	51/30a	46/43ab	-
B. subtilis + F. oxysporum	26/09bc	20/47b	34/00b	35/52b	38/46b	28/57bc	100a
Control	18/86c	19/77b	44/76b	50/00a	53/72a	31/82bc	-
F. oxysporum	0/00d	0/00b	0/00c	0/00c	0/00c	0/00c	0/00c

- اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند. - داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.

کنترل شیمیایی این بیماری در سطوح وسیع به دلیل هزینه و مشکلات کاربرد سموم در طی فصل زراعی تقریباً غیر ممکن می‌باشد (Taylor *et al*., 2007)، ولی به دلیل اثرات مضر مصرف آفت‌کش‌ها مثل آلودگی محیط زیست و به خطر افتادن سلامتی انسان‌ها و مسئله مقاومت بیمارگر، کنترل بیولوژیک جایگزین مناسبی برای کنترل شیمیایی می‌باشد (Hajieghrari *et al*., 2008). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بین نتایج حاصله از آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای رابطه‌ای وجود نداشت است. جدایه *B. subtilis* در آزمایشگاه از قدرت بازدارندگی کم‌تری نسبت به جدایه‌های *P. fluorescens* برخوردار بود، اما در شرایط گلخانه توانایی بالایی در کنترل بیماری و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه داشت، دلیل این امر را می‌توان علاوه بر ترشح مایع بازدارنده رشدی به سایر مکانیسم‌های کنترلی مانند عدم تجزیه ترکیبات ضد قارچی در شرایط محیطی و همچنین ترشح هورمون‌های گیاهی توسط این جدایه دانست. کاربرد *B. subtilis* در گلخانه اثر بهتری در کنترل بیمارگر نسبت به شاهد منفی داشت که در آن‌ها گیاهچه‌ها با عامل بیمارگر مایه‌کوبی شده بودند ولی فاقد آنتاگونیست بود. *احمدی‌فر و همکاران* طی بررسی کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی خیار به وسیله جدایه‌های باکتریایی باسیلوس و سودوموناس به این نتیجه رسیدند که در آزمون کشت متقابل تمامی جدایه‌های آنتاگونیست باعث کاهش رشد میسلیوم *V. dahlia* شده که از بین آنها جدایه P4 با 49/93 درصد کاهش رشد بیشترین و جدایه B4 با 12/5 درصد کاهش رشد کمترین تأثیر را داشت و در شرایط گلخانه‌ای جدایه B1 در تمامی شاخص‌های مورد مطالعه (کاهش شدت بیماری، افزایش ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه) در آزمون تیمار خاک و بذر بیشترین تاثیر را در حضور و عدم حضور قارچ بیمارگر داشت (Ahmadifar *et al*., 2006). مطالعات سایر محققان نشان داده است که استرین‌های باکتریایی فراریشه با مکانیسم‌های گوناگونی چون رقابت بر سر غذا و مکان، کلونیزاسیون ریشه، تولید آنتی‌بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی در گیاه میزبان و تولید متابولیت‌هایی نظیر اکسین و سیتوکنین سبب افزایش جذب آب و مواد غذایی و تحمل به تنش‌های محیطی و در نهایت، باعث افزایش رشد گیاه می‌گردند (Loper and Schroth, 1986). به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر، جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست از طریق دخالت چنین متابولیت‌هایی در افزایش فاکتورهای رشدی گیاهچه نقش داشته باشند. *نژاد و جانسون* با جداسازی باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas* spp. و *Serratia* spp. از ریشه و ساقه‌های گوجه‌فرنگی و کلزا نقش آن‌ها را در افزایش رشد این گیاهان بررسی نمودند. آن‌ها نشان دادند که این باکتری‌ها علاوه بر بهبود جوانه‌زنی بذر، افزایش طول گیاهچه و القای رشد، قادر به کنترل پژمردگی آوندی کلزا (*Verticillium dahliae*) و پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) از طریق تولید متابولیت‌های فرار و HCN می‌باشند (Nejad and Johnson, 2000). طبق بررسی‌های انجام‌شده توسط *آشا و همکاران* باکتری *P. fluorescens* موجب افزایش جوانه‌زنی بذرهای گوجه‌فرنگی آلوده به قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* می‌شود و همچنین موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌شود (Asha *et al*., 2011). *کیلین و همکاران* طی بررسی‌هایی به این نتیجه رسیدند که جدایه *B. subtilis* در تیمار خاک موجب افزایش 5% وزن خشک ریشه و 12% ارتفاع گیاه می‌گردد. مکانیسم‌های مختلفی برای *B. subtilis* ذکر نموده‌اند که شامل رقابت، کلونیزاسیون ریشه، تولید آنتی بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی در گیاه میزبان و تولید

ترکیبات هورمونی مشابه سیتوکنین و اکسین می‌باشد که در نهایت موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Kilian *et al.*, 2000). بر اساس تحقیقات *خان و خان* تیمار ریشه‌های گوجه‌فرنگی با میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات از قبیل *P. fluorescens* و *B. subtilis* هم سبب کاهش و هم سبب پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *F. oxysporum f.sp. lycopersici* و هم سبب افزایش عملکرد محصول می‌شود و جدایه *P. fluorescens* با تولید فنازین بیماری را به میزان 9/29 درصد کاهش و سبب 11/62 درصد افزایش محصول شد (Khan and Khan, 2002).

نتیجه‌گیری

بررسی حاضر نشان داد که در روش کشت متقابل جدایه P1 با 35/19 درصد بازدارندگی، بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر را دارد و در شرایط گلخانه جدایه *B. subtilis* نسبت به جدایه‌های دیگر تأثیر بهتری دارد و باعث جلوگیری کامل از ایجاد بیماری در گیاه می‌شود و به‌جز ارتفاع ریشه و وزن خشک ریشه در دیگر فاکتورهای رشدی گیاه افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده دارد. عوامل آنتاگونیستی *P. fluorescens*، *B. subtilis* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی باعث تحریک رشد گیاه و افزایش شاخص‌های رشدی شده‌اند، بنابراین می‌تواند از این عوامل در کنترل و مدیریت این بیماری استفاده نمود.

References

1. Akrami M and Ebrahimof, A. 2010. Investigation on efficiency of combining two *Trichoderma* species in the biological control of *Fusarium* diseases of chickpea under greenhouse conditions. Journal of Agricultural Science (University of Tabriz) 1: 75–83.
2. Amini K. 2009. Physiological race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* in Kurdistan Provice of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. Plant pathology 8: 68–73.
3. Asha BB, Chandra Nayaka S, Udaya Shankar AC, Srinivas C and Niranjana SR. 2011. Biological control of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Microbiology Research 3: 79–84.
4. Banihashemi Z and Dezeeuw DJ. 1969. Two improved methods for selectively isolating *Fusarium oxysporum* from soil and plant roots. Plant Disease Reporter 53: 589–591.
5. Banihashmi Z. 2010. Reaction of Cucumis melo cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. Journal of Plant Diseases 46: 5–7.
6. Behboudi K, Sharifi Tehrani A, Hejaroud GH and Zad J. 2005. Antagonistic effects of *Trichoderma* species on *Phytophthora capsici*, the causal agent of pepper root and crown rot. Plant Pathology 41: 345–362.
7. Gerlach W and Nirenberg H. 1982. The Genus *Fusarium*- a pictorial atlas. First edition, Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanst fur Land-und Forstwirtschaft Berlin- Dahlem. 406 p.
8. Jones JB, Jones JP, Stall RE and Zitter TA. 1991. Compendium of tomato diseases. First edition, Minnesota: APS Press, 100 p.
9. Kamal AM, Elyousr A and Mohamed HM. 2009. Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by plant growth-promoting yeast and Rhizobacteria. Plant Pathology 25: 199–204.
10. Khorasani aghazadeh A, Alizadeh A and Safaie N. 2008. Biological control of *Fusarium* wilt of potato using antagonistic strains of bacteria. Journal of Plant Diseases 44: 1–21.
11. Kilian MV, Steiner B, Krebs H, Junge G, Schmiedeknecht L and Hain R. 2000. F2B24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer 1: 72–93.
12. Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA. 388 p.
13. Little TM and Hills FJ. 1978. Agricultural experimentation design and analysis. John Wiley and Sons Inc. New York, USA. 350 p.
14. Loper JE and Schroth MN. 1986. Influence of bacterial sources of indole 3-acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology 76: 386–389.
15. Manafi Dizaji R, Babai Ahri A, Arzanlou M and Valizadeh M. 2012. Assessment of resistance in tomato varieties under greenhouse conditions against *Fusarium* wilt, and biological control of the disease. Quarterly Journal of Agricultural Science (University of Tabriz) 22: 145–158.
16. Michael A and Nelson PE. 1972. Antagonistic effect of bacteria on *Fusarium roseum "culmorum"* from carnation. Annual Review of Phytopathology 62: 1052–1056.

17. Montealegre JR, Reyes R, Perez LM, Herrera R, Silva P and Besoain X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Electronic Journal of Biotechnology 6: 115–127.
18. Nejad P and Johnson PA. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control 18: 208–215.
19. Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 p.
20. Niknejad Kazempour M, Sharifi Tehrani A and Okhovat M. 2000. Effect of Antagonistic fungi *Trichoderma* spp. On the control of *Fusarium* wilt of tomato caused *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* under Greenhouse condition. Iranian Journal of Agricultural Sciences 31: 31–37.
21. Sadfi N., Cherif M, Hajlaout M.R, Boudabbous A and Belanger R. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. Annual Microbiology 52: 323–337.
22. Schaad NW, Jones JB and Chum W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third eds. American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA. 373 p.
23. Sivan A and Chet I. 1986. Biological control of *Fusarium* species in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology*, 116: 39–47.

Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by antagonistic bacteria *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from tomato rhizosphere in Lorestan province

S. Jalali[1], N. Panjekeh[2], M. Darvishnia*[3], M. Salari[4], A. Salehi[5]

Abstract

Fusarium wilt of tomato is a worldwide disease causing significant damage in more than 32 countries. In this experiment the antagonistic effects of locally isolated strains of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* against the pathogen were studied in the laboratory and greenhouse. Results showed that in dual culture tests the isolates *P. fluorescens* (P1), *P. fluorescens* (P2) and *Bacillus subtilis* inhibited growth of *Fusarium* by 28/8, 25/74 and 10/52 percent respectively. In the greenhouse experiments roots of tomato seedlings were separately dipped in the bacterial suspensions before transplanting into pots, the top one-third soil of which was inoculated with the pathogen. The interaction between antagonists and pathogen in the greenhouse, 60 days after inoculation of seedlings was evaluated by measurement of growth factors, root and shoot wet and dry weights, of tomato plants and the severity of *Fusarium* wilt disease. Both *P. fluorescens* and *B. subtilis* decreased disease incidence and increased growth factors of tomato plants in the presence of the pathogenic fungus but, in contrast to results of dual culture tests, *Bacillus subtilis* was more effective in reducing disease severity.

Keywords: Natural biocontrol agents, Rhizosphere, Anti-Fungal, *Fusarium* wilt.

[1] - Former MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

4- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

5- Research Instructor, Torghabeh Shandiz Agriculture of Jahad Organization, Khorasan Razavi, Iran.

*Corresponding author: mdarvishnia44@yahoo.com