فصلنامه گیاه‌پزشکی
دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
۱۳۹۷ - ۹ (۳) : ۲۳۷-۲۴۶

کنترل بیولوژیکی پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی ناشی از *Ralstonia solancearum* ، با استفاده از سویه اندوفیت *Burkholderia cepacia* جداشده از ساقه گیاه گوجه فرنگی، در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

مینا علی خانی، ساغر کتابچی*

(*) گروه بیماری شناسی گیاهی ، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. ketabchis@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۶/۱۳

چکیده

Ralstonia solancearum از باکتری های بیماری زای گیاهی و عامل بیماری پژمردگی آوندی گوجه فرنگی است. عامل بیماری در شرایط محیطی مساعد می تواند باعث پژمردگی سریع و خسارت بسیار زیادی شود و برای درمان آن راهکار عملی وجود ندارد. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری اندوفیت *Burkholderia cepacia* از ساقه گوجه فرنگی رقم محلی و سپس بررسی اثر بیوکنترلی این باکتری در برابر *R. solancearum* می باشد. در این مطالعه چهار باکتری اندوفیت از ساقه گوجه فرنگی جدا شده و پس از شناسایی با استفاده از آزمون های استاندارد باکتری شناسی، جهت بررسی اثر آنتاگونیستی احتمالی آنها و نیز تاثیر در میزان رشد گیاهان، در شرایط آزمایشگاه با استفاده از روش فرو بردن بذردر محیط کشت آگار ، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون های بیوشیمیایی نشان داد که کلیه سو یه های اندوفیت جداشده از ساقه گوجه فرنگی، *B. cepacian* می باشند. در شرایط آزمایشگاه با بذرهای گوجه فرنگی آغشته با باکتری های اندوفیت در محیط کشت های تلقیح شده با باکتری *R. solanacearum* هاله هایی در حدود ۴/۵- ۲ سانتی متر ایجاد شد. در شرایط گلخانه ای این باکتری باعث سرکوب بیماری تا حدود ۶۰ درصد و افزایش رشد قابل توجهی در بوته های گوجه فرنگی نسبت به شاهد شد.

واژه‌های کلیدی: *Ralstonia solanacearum, Burkholderia cepacia*، باکتری های اندوفیت، کنترل بیولوژیکی

مقدمه

R. solanacearum یکی از مهم ترین بیمارگر های گوجه فرنگی است که خسارت آن در مواردی تا صد در صد محصول گزارش شده است. تاکنون از روش های گوناگونی مانند استفاده از باکتری کش ها وآنتی بیوتیک ها برای کنترل این بیمارگر استفاده شده که اثرات زیست محیطی مخرب را به همراه دارند، استفاده از آنتی بیوتیک برای کنترل این بیماری هم مقرون به صرفه نیست و هم مرسوم نیست. بنابراین استفاده از روش های بیولوژیک در راستای حفظ محیط زیست می تواند بسیار کار آمد باشد (Purnawati *et al*., 2014). اتخاذ هرگونه استراتژی از طریق به کارگیری مستقیم یا غیر مستقیم میکرو ارگانیسم ها که منجر به کاهش وقوع بیماری و یا کاهش شدت آن

گردد و هم چنین روش های بیولوژیکی از طریق وارد نمودن عوامل آنتاگونیست و یا تقویت آن ها در محیط طبیعی یکی از مناسب ترین روش هایی است که برای کنترل بیماری ها مطرح می باشد (Ahoonmanesh, 2010).

یکی از روش های کنترل بیولوژیکی این بیماری استفاده از باکتری های اندوفیت است. باکتری های اندوفیت باکتری هایی هستند که در بافت های گیاهی حضور دارند بدون اینکه آسیب یا خسارتی به گیاه وارد کنند (Schulz *et al*., 2006). جمعیت باکتری های اندوفیت در بخش های مختلف گیاه با توجه به سن گیاه، نوع بافت متفاوت است. در اغلب موارد، جمعیت باکتری های اندوفیت در ریشه از سایر قسمت بیشتر بوده و در ساقه و برگ اندوفیت ها جمعیت کمتری دارند. تعداد اندکی از این باکتری ها را می توان در اندام های تولید مثلی گیاه مانند گل ، میوه و دانه یافت (Bandara *et al*., 2006).

هدف از این تحقیق جداسازی برخی باکتری های اندوفیت از گوجه فرنگی و بررسی خاصیت آنتاگونیستی این باکتری در برابر *R. solanacearum*، عامل پژمردگی گوجه فرنگی به عنوان یک عامل بیوکنترل می باشد.

مواد و روش‌ها

* جداسازی *Ralstonia solanacearum*

جهت جداسازی عامل بیماری قطعات کـوچکی از ساقه گیاهی با علایم پژمردگی و پلاسیدگی برگ ها و تغییر رنگ قهوهای در ساقه جدا و با آب مقطر سترون شست و شو شد. پس از ضد عفونی سطحی توسط محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریـت سدیم تجاری و شست و شو در آب مقطر سترون خرد گردید. سوسپانسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقـه در دمای ۲۸ -۲۶ درجـه سلسیوس نگهداری شده و پس از انتقضای این مدت، بـر روی محیط تترازولیوم کلرید (TZC) کشـت گردیـد. محیط کشت ها ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تک کلونی های شیری رنگ که در مرکز به رنگ صـورتی دیده می شد، انتخاب و خالص سـازی گردیـد (Hayward, 1964).

* اثبات بیماری زایی

سوسپانسیون باکتری با غلظت تقزیبی ۱×۱۰^{۸} سلول در هرمیلی لیتر از کشت جوان *R. solanacearum* ($D_{600}=0.1$) تهیه و از طریق زخم یا تزریق به اندام های جوان گوجه فرنگی محلی آلوده شدند. گیاهان تلقیح شده به مدت ۱۰روز در دمای ۲۴ درجه سیلسیوس و رطوبت ۶۵-۷۰ درصد قرار داده شدند و با گیاهان شاهد مقایسه شدند.

* جداسازی باکتری های اندوفیت ازساقه گوجه فرنگی

به این منظور، ابتدا ساقه ی گوجه فرنگی رقم محلی به ترتیب با کلرید سدیم ۱/۲۵٪ به مدت یک دقیقه و اتانول به مدت ۵ ثانیه ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون به مدت ۵ ثانیه شست و شو شد. پس از آن، نمونه ها روی کاغذ صافی سترون به مدت ۵ دقیقه زیر هود لامینار قرار گرفت تا کاملا خشک شوند. سپس نمونه ها از وسط برش خورده و روی محیط نوترینت طوری قرار داده شد که با سطح داخلی محیط کشت در تماس باشد. محیط کشت ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای۲۶درجه سلسیوس نگهداری شدند (Purnawati *et al*., 2014). پس از رشد کلونی ها و به منظور خالص سازی باکتری های جدا شده از ساقه ، محیط کشت نوترینت آگار تهیه و کلونی های محدب درشت با حاشیه مضرسی کرم تا خاکستری روی آن بصورت خطی کشت داده شدند.

* نگهداری باکتری های جدا شده

به منظور نگهداری باکتری در مدت زمان طولانی، ابتدا ۱۰میلی لیتر از محیط آگار مغذی در لوله آزمایش به صورت مورب تهیه و از باکتری های خالص در آن کشت داده شد. لوله ها ۴۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شده و پس از انقضای این مدت پنج میلی لیتر از گلیسرول سترون اضافه شد. نمونه ها تا زمان استفاده در یخچال و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند (Hasanzade, 2005).

* آزمون خاصیت آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی

ابتدا بذور گوجه فرنگی محلی با هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شده و در آب مقطر سترون غوطه ور شدند. سپس روی کاغذ صافی سترون زیر هود لامینار خشک شدند. بذرهای حاصله درون سوسپانسیون باکتری اندوفیت جداشده از ریشه با غلظت^{9} ۱۰ CFU/ml (OD_{600}=1/00)که از قبل تهیه شده بود، برای مدت زمان ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰دقیقه قرار داده شدند. از طرف دیگر، با استفاده از سوآپ، سوسپانسیون *R. solanacearum* با غلظت^{9} ۱۰ CFU/ml (OD_{600}=1/00) تهیه و روی محیط کشت نوترینت آگار کشت شد. بذور گوجه فرنگی به ترتیب بعد از طی شدن زمان های ذکر شده از سوسپانسیون خارج شدند و در وسط محیط کشت های تلقیح شده با *R. solanacearum* قرار گرفته ودر دمای ۲۸ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. بعد از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت باکتری هایی که هاله بازدارنده در اطراف بذر ایجاد کرده بود به عنوان آنتاگونیست انتخاب و جهت شناسایی و آزمایش گلخانه ای استفاده شد. بعد از اندازه گیری هاله ها درب پتری دیش ها را باز نموده شد و در درب هرپتری دیش به مقدار یک میلی لیترکلروفرم ریخته شد و پتری دیش ها بصورت وارونه تا دو ساعت در دمای محیط قرارداده شدند بعد از دو ساعت پتری ها به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سیلسیوس برگردانده شدند و پس از ۲۴ ساعت مجددا هاله ها مورد بررسی قرار گرفتند. هدف از انجام این کار مشخص کردن اینکه آیا حضور باکتری زنده برای اعمال اثر بازدارندگی نیاز است یا موادی که تولید کرده است به تنهایی نقش بازدارندگی دارد. که با ایجاد هاله ممانعت از رشد قابل تفسیر است. (Purnawati *et al*., 2014).

* شناسایی باکتری های آنتاگونیست

بر اساس ویژگی های مورفولوژی (شکل، حرکت، رنگ کلونی و زمان ظهور کلونی ها)، رنگ آمیزی گرم، صفات فیزیولوژیکی (رشد هوازی و غیر هوازی) و صفات بیوشیمیایی(هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، کاتالاز و اکسیداز) شناسایی سویه های آنتاگونیست انجام شد (Garrity & George, 2006).

* آزمایش در گلخانه

- آماده سازی بذرها

به این منظور بذورگوجه فرنگی محلی، دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی و پس از آن چند بار با آب مقطر سترون شست و شو شدند. بعد از اتمام شست و شو، بذرها روی کاغذ صافی سترون قرار داده شد تا کاملا خشک شوند (Algam *et al*., 2010).

- کاشت بذرها

جهت کاشت بذر گوجه فرنگی از ترکیبی از شن، ماسه، کود گیاهی به نسبت۱:۱:۱ درون سینی کشت ریخته و بذرهای گوجه فرنگی در عمق ۳ سانتی متر قرار داده شدند (Algam *et al*., 2010).

- تهیه گلدان ها و تلقیح *Ralstonia solanacearum* به خاک گلدان ها

مقدار ۵۰۰ گرم خاک (شن، ماسه، کود گیاهی با نسبت ۱:۱:۱) در هر گلدان ۲۰ سانتی متری ریخته شد. سپس ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون *R. solanacearum* با غلظت 10^9 CFU/ml (OD_{600}=1/00) به هر گلدان اضافه و گلدان ها با پلاستیک پوشانده شدند. این گلدان ها دو روز در دمای ۲۴-۲۰ درجه سیلسیوس و رطوبت ۷۰-۶۵ درصد قرار گرفته و سپس نشا به آن ها انتقال یافت (Purnawati *et al*., 2014).

- انتقال نشاء ها به گلدان ها

پس از رشد مناسب نشاء ها (به مدت یک ماه و چند برگی شدن)، هر نشاء به مدت زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه، درون ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست با غلظت 10^9 CFU/ml قرار گرفته و سپس به گلدان های از قبل تهیه شده منتقل شدند (Oliwa *et al*., 2010). بعد از گذشت سه هفته نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

- محاسبه و اندازه گیری شاخص های رشدی گیاه در شرایط گلخانه

یک ماه بعد از رشد نشاها، شاخص های رشدی گیاهان در حضور و عدم حضور *R. solanacearum* اندازه گیری شد. به این منظور گیاه از قسمت طوقه جدا و ارتفاع بوته، طول ریشه ها، وزن تر و وزن خشک بوته اندازه گیری گردید. جهت تعیین ارتفاع بوته از قسمت طوقه تا آخرین برگ رشد کرده و جهت تعیین ارتفاع ریشه اصلی از قسمت طوقه تا انتهای ریشه اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری وزن تر هر گیاه، کل بوته از قسمت طوقه جدا و با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن شدند. برای اندازه گیری وزن خشک، هرگیاه به مدت دو روز در آون با دمای ۶۰ درجه سیلسیوس قرار گرفته و سپس توزین شد (Algam *et al*., 2010).

- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش ها چه در شرایط آزمایشگاه و چه در شرایط گلخانه ای با سه تکرار، بر اساس طرح کاملا تصادفی و آنالیز واریانس یک طرفه و میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

* شناسایی باکتری های استخراج شده

در مجموع چهار جدایه ی اندوفیت از ریشه گیاهان گوجه فرنگی رقم محلی جداسازی شد که پس از بررسی اثرات آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاه، یک سو یه به عنوان آنتاگونیست علیه *R. solanacearum* شناسایی شد. بر اساس آزمون های استاندارد باکتری شناسی، جدایه ی آنتاگونیست، با ۹۸ درصد شباهت بعنوان *B. cepacia* تشخیص داده شد (جدول ۱)

جدول۱- نتایج آزمون های باکتری شناسی

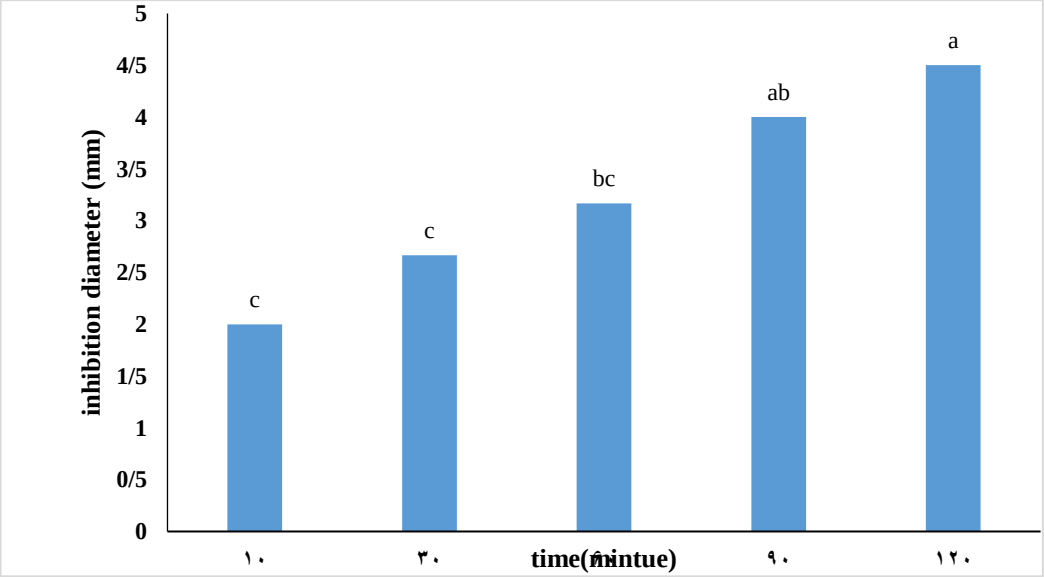
Table1. Results of bacteriology tests

Biological test	Antagonist
Shape	Straight rods
Gram stain	+
Oxidase	+
Moltility	+
Gelatin liquifaction	+
Catalase test	-
Hidrolation starch	-
Oxidation and fermentation (OF)	-

* آزمون آنتاگونیستی در آزمایشگاه

از چهارجدایه ی اندوفیت ساقه، تنها یک سو یه ی *B. cepacia* دارای خاصیت آنتاگونیستی در برابر *R. solanacearum* برمبنای آزمون آنتاگونیستی، با استفاده از روش پوشش دانه شد و در نمونه شاهد اثر آنتاگونیستی مشاهده نشد.

نتایج این بررسی نشان داد در کلیه زمان های مورد مطالعه (۱۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه) هاله بازدارنده توسط *B.cepacia* ایجاد شد اما اندازه این هاله ها در زمان های مختلف، متفاوت بود. بیشترین قطرهاله ی بازدارنده در بازه های زمانی ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه ایجاد شد که به ترتیب ۴ و ۴/۵ میلی متر بود که باهم تفاوت معنی دار نداشتند. کمترین قطر هاله ی ایجاد شده در بازه های زمانی ۱۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه ایجاد شد که آن ها نیز تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان ندادند؛ ولی قطر این هاله ها در بازه های زمانی۱۰ و ۳۰ با ۹۰و ۱۲۰ تفاوت معنی دار را با یکدیگر نشان دادند (شکل ۱). هاله های بازدانده بعد از استفاده از کلروفرم به مدت ۲ساعت و سپس قرار گرفتن در انکو باتوربا دمای ۲۶ درجه سلسیوس در مدت زمان ۲۴ ساعت از بین رفتند.



شکل۱- رابطه میان زمان تیمار بذر با سوسپانسیون *Burkholderia cepacia* و قطر هاله بازدارنده ی رشد *Ralstonia solanacearum*

(میانگین‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند)

Figure 1. Association between seed treatment time with *Burkholderia cepacia* suspension and inhibition of the antagonism on growth of *Ralstonia solanacearum*

(The meanings of the same letters do not have a significant difference in the Duncan test at 5% probability level)

* بررسی اثر آنتاگونیستی در شرایط گلخانه

نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف نشان داد درصد بازدارندگی تیمارهای آنتاگونیست نسبت به شاهد که کاملا خسارت دیده بود، به طور معنی داری متفاوت بود. بیشترین درصد بازدارندگی در تیمار بیمارگر و *B. cepacia* در ۶۰ دقیقه با ۶۶/۶۶ درصد و کمترین درصد بازدارندگی در تیمار بیمارگر *B. cepacia* در ۹۰ دقیقه با ۵۰ درصد مشاهده شد. لازم به ذکر است که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو تیمارهای ۶۰ و ۹۰ دقیقه مشاهده نشد و هر دو تیمار در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر درصد بازدارندگی درگلخانه

Table 2. Inhibition of the antagonism on growth of *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions.

Treatment	Inhibition zone diameter
Control	00.00± 00.00 b
Pathogen+ *Burkhplderia cepacia* (90 minutes)	50.00± 25.00 a
Pathogen+ *Burkhplderia cepacia* (60 minutes)	66.66± 14.43 a

*میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

* The meanings of the same letters in each column do not have a significant difference in the Duncan test at 5% probability level.

* نتایج شاخص های رشدی در گلخانه

طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش باکتری آنتاگونیست *B. cepacia* باعث افزایش رشد در گیاه گوجه فرنگی گردید. این افزایش هم با تلقیح آنتاگونیست به تنهایی و هم با تلقیح همزمان آنتاگونیست و بیمارگر مشاهده شد.

اندازه طول ریشه در زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب برابر ۵/۵۶، ۷/۰۰ سانتی متر بود که تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان نمی دهد، از طرف دیگر تیمار *B. cepacia* و بیمارگر در ۹۰ دقیقه با تیمار *B. cepacia* تفاوت معنی داری دارند. طول ساقه در زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب برابر با ۱۷/۵۰و۱۵/۶۶ سانتی متراندازه گیری شد که تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. دو تیمار مذکور با تیمار تلقیح منفرد *B. cepacia* تفاوت معنی داری نشان دادند. در طول ساقه و ریشه هر سه تیمار *B. cepacia* و *B. cepacia* و بیمارگر در زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه تفاوت معنی داری با شاهد سالم و تیمارنشان دادند.

اندازه گیری وزن تر گیاهان تیمار نیز نشان داد در بازه زمانی ۶۰ و ۹۰دقیقه، وزن گیاه به ترتیب برابر با ۵/۱۰ و ۴/۰۳ گرم بود که از لحاظ آماری باهم تفاوت معنی داری ندشتند؛ اما در مقایسه با تیمار به وسیله *B. cepacia* تفاوت معنی داری را نشان دادند هم چنین هر سه تیمار تفاوت معنا داری با شاهد سالم و بیمار داشتند.

اندازه گیری وزن خشک تیمارها نیز نتایج مشابهی نشان داد. در زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه، وزن گیاهان تیمار به ترتیب معادل ۰/۶۲، ۰/۵۷ گرم اندازه گیری شد که آن ها نیز با یکدیگر تفاوت معنی داری نشان ندادند و در قیاس با تیمار به وسیله *B.cepcsia* تفاوت معنی داری نداشتند. تیمار *B. cepacia* و هر دو تیمار در ۶۰ و ۹۰ دقیقه تفاوت معناداری با شاهد سالم و بیمار داشتند (جدول ۳).

در این پژوهش ابتدا باکتری اندوفیت از ساقه گوجه فرنگی محلی جدا شد. سپس خاصیت آنتاگونیستی این باکتری در آزمایشگاه و سپس در گلخانه در دو زمان مختلف ۶۰ و ۹۰ دقیقه در برابر باکتری *R. solanacearum* مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این پژوهش نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی *B. cepacia* خاصیت آنتاگونیستی مطلو بی در برابر *R. solanacearum*، عامل بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی دارد. در آزمایشی برروی همین باکتری*R. solanacearum* انجام شد باکتری های اندوفیت متعلق به جنس *Pseudomonas sp.* از گیاه گوجه فرنگی محلی جداسازی گردیدکه دارای خاصیت آنتاگونیستی مطلو بی بودند.

در این پژوهش، مواجهه هاله های بازدارنده با کلروفرم به مدت دو ساعت، موجب ناپدید شدن این هاله ها شد. این نتیجه با نتایج پژوهش مشابه مغایرت داشت. در آن آزمایش نشان داده شد که پس از تیمار هاله ها با کلروفرم، هاله ها از بین نرفته و اندازه هاله ها با گذشت زمان افزایش یافت. علت این امر، متفاوت بودن آنتاگونیست های مورد مطالعه در دو پژوهش مورد بحث است. در آزمایشی مشابه ، باکتری های آنتاگونیست متعلق به جنس *Pseudomonas* sp. بود که مولد سیدروفور هستند که همین ماده باعث ایجاد خاصیت آنتاگونیستی و ایجاد هاله شده بود . احتمالا درپژوهش حاضر،*B. cepacia* متابولیت هایی تولید کرده که با ازبین رفتن باکتری آنتاگونیست بوسیله کلروفرم، تولید این ماده متوقف شده و مانند سیدروفور عمل نکرده و هاله ها از بین می روند (Purnawati *et al.*, 2014).

جدول ۳- مقایسه میانگین طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک، وزن تر بوته ها تحت تاثیر تیمارهای انتاگونیست در زمان های مختلف

Table 3. Growth promotion effect (GPE) of applying bacterial antagonists on tomato plants grown under greenhouse conditions

Treatment	Dry matter	Fresh weight	Plant height	Root length
Disease control	0.42±0.07c	2.72±0.26d	12.50±2.17d	5.00±0.50d
Healthy control	0.038±0.09c	3.57±0.31c	14.50±0.50cd	5.66±0.57cd
Burkholderia cepacia	0.55±0.01b	5.06±0.48ab	21.66±2.08a	7.40±0.17ab
pathogen+ *Burkholderia* cepacia (60 minutes)	0.57±0.14b	4.03±1.9ab	17.50±2.29b	7.00±1.50ab
pathogen+ *Burkholderia cepacia* (60 minutes)	0.62±0.03ab	5.10±0.36ab	15.66±0.57bc	5.56±0.81bc

*میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

* The meanings of the same letters in each column do not have a significant difference in the Duncan test at 5% probability level.

در پژوهش حاضر، *B. cepacia* که از ریشه گوجه فرنگی جداسازی شده بود، در آزمایشگاه و با استفاده از روش پوشش دانه توانست در برابر خاصیت آنتاگونیستی *R. solanacearum* نشان دهد. که اندازه هاله ها در زمان های مختلف بین ۲-۴ میلی متر بود این باکتری *B. cepacia* قطر هاله بیشتری در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه ایجاد کرد. این نشان دهنده این است که درهمه زمان های بین ۱۰ تا ۱۲۰ دقیقه باکتری روی بذر کلونیزه شده است اما با مدت زمان بیشتری قرار گرفتن در سوسپانسیون باکتری اندوفیت تعداد باکتری بیشتری کلونیزه شده است بنابراین خاصیت آنتاگونیستی بذرها افزایش می یابد. در پژوهشی مشابه در سال ۲۰۱۴ انجام شد باکتری هایی از جنس *Pseudomonas sp.* باعث ایجاد هاله هایی بین ۴ تا ۷ میلی متر در برابر عامل پژمردگی باکتری شدند که بیشترین هاله ایجاد شده در مدت زمان ۶۰ دقیقه بود (Purnawati *et al*,. 2014).

در پژوهش اخیر، در شرایط گلخانه ای *B. cepacia* باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر*R.solanacearum* در مقایسه با شاهد شد و بیمارگر *B. cepacia* در ۶۰ دقیقه بیشترین اثر بازدارندگی نشان دادند و باعث کاهش بیماری بعد از دو هفته تا حدود ۶۰درصد در بوته های گوجه فرنگی شدند.

در پژوهشی انجام شده نیز سه باکتری *Pseudomonas brassicacearum* ، *Pseudomonas fluorescens* ، *Pseudomonas mosselii* خاصیت آنتاگونیستی در برابر *R.solanacearum* نشان داده و باعث کاهش شدت بیماری بین ٤٠ تا ٧٥ درصد در شرایط گلخانه شدند و گزارش شد که این باکتری های اندوفیت می تواند در کنترل باکتری عامل پژمردگی عملکرد خوبی را نشان دهند (Safdarpour & Khodakaramian, 2017). گیاهان از حضور باکتری های اندوفیتیک سود می برند زیرا آن ها ترکیب یا متابولیسم ثانویه و آنتی بیوز تولید می کنند که باعث تحریک رشد هورمون هایی می شود که در رشد گیاه موثر است و باعث افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر می شود (*Bandara et al*,. 2006). این نشان دهنده تاثیر باکتری های اندوفیت از جنس های مختلف در افزایش رشد در گیاهان است. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش نیز *B. cepacia* باعث افزایش رشد در گیاه گوجه فرنگی هم زمانی که به تنهایی مایه زنی شد و هم زمانی که با بیمارگر مایه زنی شد بطوری که در شرایط گلخانه بیمارگر و*B. cepacia* در ۹۰ دقیقه بیشترین طول ریشه ایجاد کرد و بیشترین اندازه طول بوته توسط بیمارگر و *B. cepacia* در۹۰ دقیقه و بیشترین وزن تر توسط بیمارگر و*B. Cepacia* در ۶۰ دقیقه ، بیمارگر و *B. cepacia* در ۹۰ دقیقه و هم چنین بیشترین وزن خشک توسط بیمارگر و *B. cepacia* در ۹۰ ایجاد شد. این نتایج نشان دهنده تاثیر قابل توجه باکتری های اندوفیت *B. cepacia* در افزایش رشد بوته های گوجه فرنگی است.

درپژوهشی انجام شده سو یه هایی از *Bacillus* sp. و *Pseudomonas* sp. توانستند با تولید مقادیر متفاوتی از هورمون های رشدی

اکسین و جیبرلین، موجب افزایش رشد قابل توجه در بوته ها شوند (Etminani & Harighi, 2018). هم چنین از شش باکتری جداشده دو باکتری خاصیت آنتاگونیستی در شرایط گلخانه بر علیه عامل پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی نشان دادند و بعد از حدود ۶ هفته، هر یک از دو جدایه باعث کاهش تقریبی ۳۳درصدی در مقدار بیماری شدند. ولی طول گیاهان تحت تاثیر این باکتری های آنتاگونیست قرار نگرفت (Nawangsihi *et al*., 2011). بنابراین این نتایج نشان می دهد که همیشه باکتری های اندوفیت باعث افزایش رشد در گیاهان تلقیح شده نخواهند شد.

بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی ناشی از *R. solanacearum* از مهمترین باکتری های گوجه فرنگی است که سالیانه خسارت زیادی به محصولات کشاورزان وارد می کند. علاوه براین کنترل آن چه با کود شیمیایی و سایر عوامل کنترل بسیار سخت و وقت گیر و پر هزینه می باشد. هدف اصلی در این تحقیق جدا سازی و شناسایی باکتری های آنتاگونیست برای مقابله با این بیماری است. با توجه به نتایج به دست آمده بالاترین درجه بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی مربوط به مدت زمان ۱۲۰ دقیقه (قرار گرفتن بدر گوجه فرنگی در سوسپانسیون بیمارگر) بود. همچنین در شرایط گلخانه ای *B. cepacia* موجب کاهش ۷۰درصدی میزان بیماری در مقایسه با شاهد گردید. علاوه براین تیمار با این باکتری موجب افزایش ۵۰ درصدی رشد تیمارها در مقایسه با شاهد گردید. بنابر نتایج حاصله، بنظر می رسد در صورتی که ریشه نشاهای گوجه فرنگی، قبل از کاشت، به مدت ۶۰ تا ۹۰ دقیقه با سوسپاسیونی از *B. cepacia* با غلظت تقریبی 10^9CFU/ml تیمارکنیم، به صورت همزمان بیماری پژمردگی گوجه فرنگی کاهش یافته و رشد گیاه گوجه فرنگی نیز افزایش می یابد. استفاده از این باکتری های اندوفیت از نظر زیست محیطی کاملا بی خطر است .پس توجه بیشتر به این گونه روش های بیولوژیک در آینده نتیجه بهتری چه از لحاظ هزینه چه اثرات زیست محیطی و اثر بخشی برای مبارزه با بیماری های گیاهی خواهد داشت.

منابع

Algam, S.A., Xie, G., Li, B., Yu, S., Su, T. & Larsen, J. 2010. Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia* wilt in tomato. *Journal of Plant Pathology*, 92:593-600.

Ahoonmanessh, A. 2010. *Principle of Plants Diseases Control*. Isfahan University of Technology Press, Isfahan, Iran

Bandara, W. M. M. S., Seneviratne, G. & Kulasooriya, S. A. 2006. Interaction among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences*, 31:645-650.

Etminani, F. & Harighi, B. 2018. Isolation and Identification of Endophytic Bacteria with Plant Growth Promoting Activity and Biocontrol Potential from Wild Pistachio Trees. *The Plant Pathology Journal*, 34:208-217.

Garrity, S. D. & George, M. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Springer Press, New York, US.

Hasanzadeh, N. 2005. *Identification and classification of phytopathogenic bacteria*. Islamic Azad University, Science and Besearch Branch Press, Tehran, Iran

Hayward, A.C. 1964. Characterization of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27:265-277.

Nawangsihi, A. A., Damayan, I., Wiyono, S. & Kartika, J. G. 2011. Selection and Characterization of Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. *Hayati Journal of Bioscience*, 18:66-70

Oliwa, K., Molnar, C. L., Arshak, K., Bartosszcze, M. & Adley, C. C. 2010. Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus* cereus group species. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 266-273.

Purnawati, A., Sastrahidayat , I., Abadi, A. & Hadiastono, T. 2014. Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. *Journal of Tropical Life Science*, 4: 33-36.

Safdarpour, F. & Khodakaramian G. 2017. Endophytic Bacteria Suppress Bacterial Wilt of Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum* and Activate Defense-related Metabolites. *Biological Journal of Microorganism*, 6: 39-52.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A. K. & Krohn, K .2002 .Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *British Mycological Research*, 106: 996-1004.

Plant Protection Journal
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2018 – **9** (**3**): 237-246

Biological control of bacterial wilt disease of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* by using isolated endophytic bacteria, *Burkholderia cepacia*, from tomato stems in vitro and in vivo

Mina Alikhani, Saghar Ketabchi*
(*) Department of Plant Pathology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. ketabchis@gmail.com

Abstract

Ralstonia solanacearum is the cause of tomato bacterial wilt. Under favorable environmental conditions, it can cause rapid wilt and a lot of damage, and there is no practical remedy for it. The aim of this study was to separate endophytic bacteria *B. cepacia* from tomato stems of local cultivar and then to study the biocontrol effect of this bacteria against the bacterial wilt of tomatoes.

In this study four endophytic bacteria from tomato stem were isolated. Then after identification with bacteriology standard tests in order to investigation of their antagonistic effect and also effect on the growth rate of the plant in vitro with seed diffusion agar method were examined. Result of biochemical tests showed that all of endophytic bacteria which isolated from tomato stem were *B. cepacia*. In in vitro condition on the seed with *B. cepacia* bacteria in medium containing *R. solanacearum* bacteria showed the formation of 2- to-4.5 –mm haloes. In greenhouse conditions, these bacteria caused a suppression of the disease by about 60% and a significant increase in tomato plants, and a significant difference with the control was observed.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, *Burkholderia cepacia*, Endophytic bacteria, Biological control