مقاله تحقیقی

تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست ریزوسفر توت در کنترل عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه آن در شرایط گلخانه

مهسا مشیدی [۱،*]، هادی رهاننده [۲]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، باشگاه پژوهشگران جوان، رشت، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده کشاورزی، رشت، ایران

* **مسئول مکاتبات:** مهسا مشیدی، لاهیجان، خیابان شهید بهشتی، کوچه ۱۸، پلاک ۹۵، شماره تماس: ۰۹۱۸۱۶۲۲۵۶۱، ۰۱۴۱۲۲۴۲۰۷۹، پست الکترونیکی:r_mahsa2004@yahoo.com

محل انجام تحقیق: موسسه تحقیقات ابریشم ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۸

چکیده

در این مطالعه، قدرت آنتاگونیستی پنج جدایه باکتریایی جداسازی شده از ریزوسفر درختان توت در مناطق شرقی استان گیلان علیه قارچ‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه توت *Fusarium solani*، *F. oxysporum* و *Lasiodiplodia theobromae* در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از میان پنج جدایه باکتریایی که در شرایط گلخانه روی قارچ *Lasiodiplodia theobromae* آزمایش شده بود، جدایه‌های H-24 و H-25 به ترتیب با ۶۹/۹۳ و ۶۹/۵۳، درصد بازدارندگی، بیشترین تاثیر را در کاهش بیماری داشتند. در این آزمون، قارچ‌کش مانکوزب با ۷۲/۵۷ درصد موجب بیشترین کاهش بیماری شد. در بررسی روی قارچ *Fusarium solani*، جدایه H-25 با ۶۷/۱۳ درصد و قارچ‌کش مانکوزب با ۶۷/۴ درصد بازدارندگی بیشترین تاثیر را در کاهش بیماری داشتند. در خصوص کنترل بیولوژیک قارچ *Fusarium oxysporum*، جدایه H-25 با ۶۵/۹۷ درصد، کاهش بیماری، در گروه مشابه با قارچ‌کش مانکوزب با ۶۷/۶۷ درصد کاهش بیماری قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه توت، پوسیدگی ریشه توت، باکتری‌های آنتاگونیست، *Fusarium solani*، *F. oxysporum*، *Lasiodiplodia theobromae*

مقدمه

تاکنون بیماری‌های متعددی روی درخت توت از سراسر دنیا گزارش شده است که یکی از بیماری‌های خاکزی آن، پوسیدگی ریشه و طوقه است (۱). بیماری پوسیدگی ریشه توت، از معضلات باغات توت در کشورهای پرورش‌دهنده کرم ابریشم مانند هند، ژاپن، روسیه، چین و تایلند (۵) است. عامل پوسیدگی ریشه توت در کشور ژاپن *Helicobasidium mompa* و *Rosellinia necatrix* گزارش شده است. اولین گزارش از پوسیدگی ریشه و طوقه توت با عامل *Botryodiplodia theobromae* از کشور هند در سال ۱۹۸۲ بوده است. در سال ۱۹۸۷، عامل فوق به عنوان یک پارازیت اختیاری در ریزوسفر درختان توت در هند شناخته شد (۶). در یک بررسی در کشور هند، عامل بیماری پوسیدگی ریشه توت را *Fusarium solani* دانستند (۷). در بررسی عوامل

بیماری‌زا در تامیل نادو، یکی از عوامل بیماری‌زا *B. theobromae* معرفی شد (۸). در یک بررسی در قلمستان‌های توت در هند که توسط فیلیپ و همکاران (۷) انجام گرفت، بیشترین خسارت بالغ بر ۴۴درصد توسط قارچ *theobromae* وارد می‌شد و در *F. solani* و *Phoma sorghina* با خاک مخلوط می‌شدند خسارت به ۵۱/۴ درصد تا ۶۱/۴ درصد می‌رسید. *B. theobromae* برگ قلمه را به میزان ۵۰ تا ۶۰ درصد آلوده می‌کند و سبب die-back می‌شود. در ایران، اولین بار جداسازی عوامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت از استان گیلان در سال ۷۸-۷۶ توسط مرات انجام شد، و قارچ‌های *F. solani*، *F. oxysporum* و *B. theobromae* مورد شناسایی و تایید قرار گرفت (۳). در بررسی‌های تکمیلی جهت کنترل بیولوژیک عوامل قبل، پنج استرین باکتریایی جداسازی و قدرت بازدارندگی رشد ریسه‌ای قارچ‌ها توسط باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲). در این تحقیق، تاثیر پنج جدایه باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه توت در شرایط گلخانه، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه زاد مایه قارچ‌های عامل بیماری

بدین منظور، جدایه قارچ‌های عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توت (*F. solani*، *F. oxysporum* و *Lasiodiplodia theobromae*) از بخش تحقیقات شرکت ابریشم واقع در رشت تهیه گردید. تهیه زادمایه قارچ‌های بیمارگر مطابق روش روزالز و همکاران انجام گرفت (۹). در ابتدا، محیط کشت حاوی پوسته برنج (۳ قسمت)، دانه برنج و شلتوک (۱ قسمت) و آب (۲۰۰ میلی‌لیتر) جمعاً به مقدار ۴۰۰ گرم از مخلوط فوق در فلاسک به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر تهیه گردید. درب فلاسک‌ها با پنبه و ورقه آلومینیومی کاملاً پوشانیده شد و ۳ روز متوالی به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردیدند. سپس یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت خالص ۵ روزه جدایه‌های قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط استریل به‌صورت جداگانه به این مخلوط اضافه گردید و در حرارت ۲۵ الی ۲۸ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۵ روز نگهداری شد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه قارچ‌های عامل بیماری

دو سوم ۹۵ گلدان از خاک سترون پر شد و زادمایه قارچ‌های تهیه شده به نسبت وزنی ۱ به ۱۰ با خاک سترون، مخلوط و یک سوم قسمت بالایی هر گلدان، با خاک آلوده به قارچ، پر شد. در هر گلدان، قلمه یک ساله ریشه‌دار شده توت کاشته شد و در تیمار شاهد، محیط محتوی شن و پوسته برنج به خاک سترون اضافه شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس قرار داده شدند. برای اطمینان از مرگ ناشی از قارچ ها، طبق اصل کخ، ریشه قلمه‌های آلوده مجددا روی محیط کشت PDA کشت شد و قارچ‌های عامل بیماری دوباره جدا و خالص شدند.

آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های باکتری که از خاک جداسازی شده بودند و در شرایط آزمایشگاهی موثر بودند، بر اساس خصوصیات مهم مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، مورد شناسایی قرار گرفتند. این آزمایش‌ها شامل واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسانت، تولید لوان، آزمون‌های لهیدگی سیب‌زمینی، آرژنین دی‌هیدرولیز، احیای نیترات، دهیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، MR/VP، آزمون فوق حساسیت، استفاده از برخی منابع کربنی و سدیم استات انجام گرفت (۱۰،۱۱).

تهیه مایه تلقیح باکتری‌های آنتاگونیست

روی محیط کشت آگار مغذی، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کدر کشت جوان جدایه‌ها به وسیله میله شیشه‌ای پخش گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کشت ۴۸ ساعت باکتری‌ها، با اضافه

نمودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون کدر تهیه شد. سوسپانسیون هر جدایه به درون لوله‌های آزمایش، منتقل و به آرامی تکان داده شد تا یکنواخت گردد. جهت تعیین جمعیت هر جدایه، عمل رقیق‌سازی به طور سریال و متوالی انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کدر هر جدایه، به ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه گردید و پس از هشت بار رقیق-سازی، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به تشتک‌های پتری حاوی آگار مغذی، منتقل و به کمک میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شمارش پرگنه‌های باکتریایی، بعد از گذشت ۴۸ ساعت انجام گردید (۱۲).

در روش آغشته‌سازی خاک، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه، حاوی ۵×۱۰^{۱۰} واحد تشکیل دهنده پرگنه (cfu ۱×۱۰^{۹} به ازاء هر گرم خاک) به هر گلدان مرطوب اضافه شد. جهت تنظیم غلظت جدایه‌های باکتریایی، از فرمول زیر استفاده شد (۴):

$N = X . D . 20$

N = تعداد سلول باکتری

D = فاکتور رقت

X = تعداد کلنی‌های باکتری شمارش شده در هر رقت

آزمون تأثیر آنتاگونیست‌ها در جلوگیری از پوسیدگی ریشه و طوقه توت در شرایط گلخانه

جهت تعیین میزان تأثیر جدایه‌های باکتریایی در کاهش و یا کنترل پوسیدگی ریشه و طوقه توت در گلخانه، پنج جدایه باکتریایی که قدرت بازدارندگی بیش از ۳ میلی‌متر را در بررسی‌های آزمایشگاهی نشان دادند، مورد مطالعه قرار گرفتند. در روش آغشته‌سازی خاک، جدایه‌های باکتریایی پس از کاشت قلمه توت به خاک مرطوب اضافه شد و پس از ۷۲ ساعت، زادمایه قارچ‌های عامل بیماری، به نسبت ۱۰ درصد حجمی با خاک گلدان مخلوط گردید. از قارچ‌کش مانکوزب جهت مقایسه با جدایه‌های آنتاگونیست به میزان یک گرم در متر مربع خاک استفاده گردید. در تمامی بررسی‌های گلخانه‌ای، از گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتی‌متر استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه و در حرارت ۲±۲۵ درجه سلسیوس با تناوب نور ۱۵ ساعت روشنایی و ۹ ساعت تاریکی، نگهداری شدند. بررسی‌های گلخانه‌ای در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۱۵ تیمار در ۳ تکرار انجام شد.

پس از چهار هفته از تلقیح قارچ، علائم بیماری در قلمه‌های شاهد آلوده به *Fusarium solani* و *F. oxysporum* و دو هفته بعد در شاهد آلوده به *Lasidiplodia theobromae* کاملا مشهود شد و قلمه‌ها پس از در آوردن از گلدان، به ۲۰ قطعه از محل ساقه محل قهوه‌ای شدن آوندها تا ناحیه ریشه-های فرعی، تقسیم و پس از ضدعفونی سطحی قطعات آلوده با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و شستشوی سه‌گانه با آب مقطر سترون (هر بار به مدت۱۰ دقیقه) قطعات روی محیط کشت PDA به ازای هر پتری ۱۰ قطعه آلوده کشت گردیدند. پس از ۳ تا ۵ روز نگهداری پتری‌ها در دمای ۲۶ درجه سلسیوس، تعداد قطعاتی که پرگنه قارچ روی آن‌ها رشد کرده بود، شمارش شدند.

درصد کاهش بیماری (DR%) از فرمولاسیون وچت محاسبه شد.

DR% (Disease Reduction) = (1-DT/DC) 100

DC = بیماری در شاهد

DT = بیماری در تیمار

تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از:

شاهد آلوده حاوی ۳ گرم مایه تلقیح قارچ *F. solani* در هر گلدان. شاهد آلوده حاوی ۳ گرم مایه تلقیح قارچ *F. oxysporum* در هر گلدان. شاهد آلوده حاوی ۳ گرم مایه تلقیح قارچ *L. theobromae* در هر گلدان. شاهد غیرآلوده حاوی ۳ گرم پوسته برنج، شلتوک برنج و آب سترون شده فاقد مایه تلقیح قارچ‌های عامل بیماری در هر گلدان، آغشته‌سازی خاک گلدان با ۵۰ میلی‌لیتر از قارچ‌کش مانکوزب به میزان یک گرم ماده موثره در متر مربع. آغشته‌سازی خاک گلدان‌ها با ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه در غلظت ۱×۱۰^{۹} سلول باکتری در هر گرم خاک توام با افزودن ۳ گرم مایه

تلقیح قارچ‌های عامل بیماری به‌طور جداگانه.

آزمون تأثیر قارچ‌کش مانکوزب روی جدایه‌های آنتاگونیست

این آزمایش مطابق روش روزالز و همکاران (۱۳) انجام شد. غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ پی‌پی‌ام از قارچ‌کش در آب تهیه گردید. جدایه‌های آنتاگونیست، روی محیط کشت آگار مغذی کشت شد. پنج عدد حلقه کاغذ به قطر یک سانتی‌متر در هر تشتک پتری قرار داده شد. سپس، غلظت‌های مذکور به گونه‌ای به حلقه‌های کاغذی اضافه گردید که تمام حلقه کاغذ به حد اشباع برسد. به حلقه کاغذ شاهد، آب مقطر سترون اضافه شد و در مرکز تشتک پتری قرار گرفت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. این آزمایش بر اساس طرح کامل تصادفی با ۵ تیمار در سه تکرار انجام شد.

نتایج

آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ‌های بیماری‌زا

قلمه‌های توت تموچی، بسته به نوع قارچ، بعد از دو هفته در مورد قارچ *L. theobromae* و تا چهار هفته در مورد قارچ‌های *F. oxyporum* و *F. solani* علائم پوسیدگی ریشه را به‌طور کامل نشان دادند. بررسی‌های تکمیلی نشان داد خصوصیات میکروسکوپی قارچ جدا شده از بوته‌های مرده، مطابق قارچ تلقیح شده بود.

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

در بررسی‌های گلخانه‌ای، تأثیر جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست و قارچ‌کش مانکوزب روی قارچ *Lasiodiplodia theobromae* مشخص گردید، تیمارهای باکتریایی از نظر میانگین تعداد ریشه‌های آلوده پس از دو هفته در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. تیمار خاک گلدان‌ها با قارچ *Lasiodiplodia* به تنهایی (شاهد آلوده) موجب مرگ کامل قلمه‌ها پس از دو هفته گردید. قارچ‌کش مانکوزب میزان بیماری را نسبت به شاهد آلوده، ۷۲/۵۷ درصد کاهش داد. بین جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست، جدایه‌های H-25 و H-24 بیشترین تأثیر را به ترتیب با ۶۹/۹۳ و ۶۹/۵۳ درصد کاهش بیماری داشتند (جدول ۱).

جدول ۱ - تأثیر جدایه‌های باکتریایی و قارچ‌کش مانکوزب در کاهش آلودگی قلمه‌های توت توسط قارچ *Lasiodiplodia theobromae* در شرایط گلخانه.

تیمار	میانگین درصد کاهش بیماری[1]	گروه‌بندی تیمارها (۰/۰۵)
شاهد آلوده	۰	f[2]
H-1	۶۳/۰۱	d
H-4	۶۰/۱۷	e
H-16	۶۴/۸۳	d
H-24	۶۹/۵۳	c
H-25	۶۹/۹۳	c
مانکوزب	۷۲/۵۷	b
شاهد غیر آلوده	۱۰۰	a

۱ –(DR%)Disease Reduction Percentage قطعات ریشه و طوقه از تیمارهای مختلف روی محیط کشت PDA کشت داده شد و سپس قطعات آلوده با قارچ *Lasiodiplodia* پس از سه روز شمارش گردید.

۲- تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

بررسی‌های گلخانه‌ای جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست و قارچ‌کش روی قارچ *F. solani* نشان داد که تیمارهای باکتریایی از نظر میانگین تعداد ریشه‌های آلوده پس از چهار هفته در سطح ۵ درصد

تفاوت معنی‌دار داشتند. تیمار خاک گلدان‌ها با قارچ *F. solani* به تنهایی (شاهد آلوده) موجب مرگ کامل قلمه‌ها پس از چهار هفته گردید. از طرفی، قارچ‌کش مانکوزب، میزان بیماری را نسبت به شاهد آلوده، ۶۷/۴ درصد کاهش داد که با کاهش میزان بیماری توسط جدایه باکتری H-25 تفاوت معنی-داری نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲ - تأثیر جدایه‌های باکتریایی و قارچ‌کش مانکوزب در کاهش آلودگی قلمه‌های توت توسط قارچ *F. solani* در شرایط گلخانه.

تیمار	میانگین درصد کاهش بیماری[1]	گروه‌بندی تیمارها (۰/۰۵)
شاهد آلوده	۰	g[2]
H-1	۴۴/۵۳	f
H-4	۴۰/۵۷	e
H-16	۵۱/۴۰	d
H-24	۵۷/۸	c
H-25	۶۷/۱۳	b
مانکوزب	۶۷/۴۰	b
شاهد غیر آلوده	۱۰۰	a

۱ – Disease Reduction Percentage (DR%) قطعات ریشه و طوقه از تیمارهای مختلف روی محیط کشت PDA کشت داده شد و سپس قطعات آلوده به قارچ *F.solani* پس از پنج روز شمارش گردید.

۲ – تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

در خصوص تأثیر جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست و قارچ‌کش روی قارچ *F. oxysporum* نیز مشخص گردید تیمارهای باکتریایی از نظر میانگین تعداد ریشه‌های آلوده پس از چهار هفته در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. تیمار خاک گلدان‌ها با قارچ *F. oxysporum* به تنهایی (شاهد آلوده) موجب مرگ کامل قلمه‌ها پس از چهار هفته گردید. قارچ‌کش مانکوزب، میزان بیماری را نسبت به شاهد آلوده، ۶۷/۶۷ درصد کاهش داد و با جدایه H-25 در یک گروه آماری قرار گرفت. سایر تیمارهای باکتریایی در مقایسه با قارچ‌کش مانکوزب، تاثیر کمتری نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳ - تأثیر جدایه‌های باکتریایی و قارچ‌کش مانکوزب در کاهش آلودگی قلمه‌های توت توسط قارچ *F. oxysporum* در شرایط گلخانه.

تیمار	میانگین درصد کاهش‌بیماری[1]	گروه‌بندی تیمارها(۰/۰۵)
شاهد آلوده	۰	g[2]
H-1	۴۸/۱	e
H-4	۴۲/۴	f
H-16	۵۳/۶	d
H-24	۶۳/۲۷	c
H-25	۶۵/۹۷	b
مانکوزب	۶۷/۶۷	b
شاهد غیر آلوده	۱۰۰	a

۱ –Disease Reduction Percentage (DR%) قطعات ریشه و طوقه از تیمارهای مختلف روی محیط کشت PDA کشت داد شده و سپس قطعات آلوده به قارچ *F.oxysporum* پس از پنج روز شمارش گردید.

۲ – تیمارهایی که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

آزمون تاثیر قارچ‌کش مانکوزب روی رشد جدایه‌های آنتاگونیست

بر اساس نتایج مندرج در جدول ۳، غلظت‌های متفاوت قارچ‌کش مانکوزب مانع رشد باکتری‌های آنتاگونیست نشد و چنین به‌نظر می‌رسد که قارچ‌کش مذکور، تاثیر منفی روی رشد باکتری‌های آنتاگونیست نداشته باشد.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

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، غیرهوازی اختیاری 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. بر اساس آزمون‌های انجام شده، جدایه‌های H-1، H-16 ، H-24 و H-25 در جنس *Bacillus* و جدایه H-4 در گروه پسودوموناس فلورسنت قرار داده شدند. بر اساس آزمون‌های تفکیکی (بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) دو باکتری در سطح گونه H-16 *B.megaterium*، H-24 *B.coagulans* و دو باسیلوس دیگر در همان سطح شناسایی شدند (جدول ۴).

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

خصوصیات	واکنش جدایه‌های آنتاگونیست			
جدایه	H-1 *Bacilluse*	H-4 *P.fluorescens*	H-16 *B.megaterium*	H-24 *B.coagolans*	H-25 *Bacilluse*
رنگ آمیزی	+	−	+	+	+
رشد هوازی در محیط کشتO/F	+	−	+	+	+
تولید رنگدا نه فلورسانت	−	+	−	−	−
فوق حساسیت	−	−	−	−	−
تولید اسپور	+	−	+	+	+
لهانیدن سیب زمینی	−	+	−	−	−
دهیدرولیز آرژنین	+	+	+	+	+
تولید لوان	−	−	−	−	−
احیاء نیتروژن	+	−	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	−	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	−	+	+	+
استفاده از سیترات	−	+	+	−	−
زایلوز	−	+	−	−	−
آرابینوز	−	+	−	−	+
مانیتول	−	−	−	−	−
آزمون VP	−	−	−	−	−

بحث

آندروز (۱۴) معتقد است که صفات زیادی از یک آنتاگونیست در موفقیت آزمون در امر بیوکنترل دخالت دارند و در واقع بیوکنترل، نتیجه یک‌سری از رویدادهاست و نتایجی که از روش غربال (انتخاب اولیه) به دست می‌آید ممکن است فقط برای همان شرایط معتبر باشد و هر گونه تغییر در متغیرهایی چون محیط کشت، حرارت، زمان و مکان ارزیابی مزرعه‌ای ممکن است نتایج متفاوتی به‌بار آورد. بنابراین، مطالعات زیادی از صفات میکروارگانیسم‌ها مورد نیاز است و این اطلاعات باید هنگام انتخاب اولیه عوامل بیوکنترل در اختیار باشند تا به کار گرفته شوند. اما اخذ این اطلاعات از تعداد زیادی میکروارگانیسم در مرحله انتخاب اولیه، نیاز به انجام

آزمایش‌های متعدد دارد که کاری بس دشوار، گران و تقریباً غیرممکن است. بنابراین، آزمایش‌های بعدی مزرعه‌ای برای تعیین ثبات اثر عوامل بیوکنترل در شرایط مختلف محیطی، مورد نیاز است. عموماً این اعتقاد وجود دارد که ارتباطی بین بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی و بازدارندگی بیماری در شرایط مزرعه‌ای وجود ندارد، مع الوصف، این آزمایش‌های به‌عنوان یک غربال برای شناسایی جدایه‌هایی که دارای ویژگی‌های آنتاگونیستی هستند، مفید است (۸).

نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که از پنج جدایه باکتریایی، جدایه H-25 توانست تاثیر نسبتاً یکسانی با قارچ‌کش مانکوزب از لحاظ درصد کاهش بیماری داشته باشد و بعد از آن، جدایه H-24 در سطح بعدی قرار گرفت. سایر باکتری‌ها به میزان کمتری در شرایط گلخانه باعث کاهش بیماری شدند. قارچ‌کش مانکوزب نیز در غلظت‌های مختلف، تاثیر منفی روی رشد و تکثیر باکتری‌های آنتاگونیست نداشت. بنابراین، در بررسی‌های بعدی می‌توان در سطح مزرعه به‌عنوان یک مبارزه تلفیقی از این قارچ‌کش و باکتری‌های آنتاگونیست استفاده نمود. البته قبل از استفاده از این باکتری‌های آنتاگونیست می‌بایستی تاثیرات آن‌ها روی کرم ابریشم بررسی شود تا تاثیر منفی بر این حشره که روی برگ درختان توت پرورش می‌یابد، نداشته باشد. در مجموع، استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست، نیازمند مطالعاتی در زمینه بهینه‌سازی غلظت آنتاگونیست‌ها، پیدا کردن مواد همراه مناسب برای استفاده تلفیقی قارچ‌کش همراه با محلول‌پاشی جدایه‌های باکتریایی در پای درخت توت است.

تقدیر و تشکر

از جناب آقای مهندس غنی پور که در تجزیه آماری این طرح کمک کردند کمال تشکر را دارم.

منابع مورد استفاده

۱. جوانشیر، ک.۱۳۷۴. توت برای ابریشم و ابریشم‌های بدون توت. انتشارات دانشگاه تهران. ص: ۲۲۶.

۲. رهاننده، ه. نیک نژاد، م. حسن زاده، و ن. ۱۳۸۵. بررسی تاثیر باکتری-های آنتاگونیستی عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه توت در استان گیلان. مجله علوم کشاورزی، سال دوازدهم شماره ۱ص ۲۳۲-۲۲۳

۳. مرات، ا، میرحسینی مقدم، س. روحانی، ح.۱۳۸۳. معرفی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه توت در استان گیلان. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص: ۴۳۶.

۴. نیک نژاد، م، شریفی تهرانی، ع. ۱۳۸۰. بررسی تاثیر قارچ آنتاگونیست تریکودرما روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersicum* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص: ۱۶۵

5. Philip, T., Janardhan, L., Govindaiah Mallikarjuna, B., Mandal, K. C., Bajpai, A. K., 2001. Some observations on the incidence, associated microflore and control of root-rot disease of mulberry in soth India. Indian Journal of Sericulturel Research and Training 40: 370-374.
6. Teotia, R. S., Sen, S. K., 1994. Mulberry diseases in India and their control. Serological 34: 1-18.
7. Philip, T., Sharma, D. D., 1997. *In vitro* evaluation of leaf and oil cake extracts of Azadirachta indica and pongamia glabra on mulberry root rot pathogens. Indian Journal of Sericulture 36: 2,150-152,9 ref.
8. Gangwar, S. K., Thangavelu, K., 1991. Occurrence of mulberry diseases in Tamil Nadu. Indian Phytopathology 44: 4,545-549;6 refs.
9. Rosales, A. M., Nugue, F. L., Mew, T. W., 1986. Biological control of bakanae disease of rice with antagonistic bacteria. Philippine Phytopathol 22: 29-25.
10. Fahy, P. C., Persley, G. J., 1983. Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. Academic Press. Academic Press, Sydney, Australia.
11. Schaad, N. W., 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.(2nd ed.) .A. P. St. Paul. Minnesota. U.S.A. pp. 164.
12. Burr, T. J., Schroth, M. N., Suslow, T., 1978. Increased potato yields by trreatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. Phytopathology 63: 1377-1383.

13. Rosales, A. M., Nugue, F. L., Mew, T. W., 1986. Biological control of bakanae disease of rice with antagonistic bacteria. Philippine Phytopathol 22: 29-25.
14. Andrews. J. H., 1992. Biological control in phyllosphere. Ann Rev Phytopatology 30: 603-633.