کنترل بیولوژیکی مرگ گیاه‌چه رایزوکتونیایی چغندرقند با استفاده از جدایه‌های بومی استرپتومایسس در شرایط گلخانه و مزرعه

Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off of sugar beet with native *Streptomyces* isolates under greenhouse and field conditions

اکرم صادقی[1]*، علیرضا حسان[2]، حسین عسکری[3]، داوود نادری قمی[4]، مریم فارسی[5]، ابراهیم کریمی[6]، اسلام مجیدی هروان[7]، مهتاب امیدواری[6] و پیمان عباس‌زاده دهجی[9]

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۲۴

ا. صادقی، ع. ر. حسان، ح. عسکری، د. نادری قمی، م. فارسی، ا. کریمی، ا. مجیدی هروان، م. امیدواری و پ. عباس‌زاده دهجی. ۱۳۸۸. کنترل بیولوژیکی مرگ گیاه‌چه رایزوکتونیایی چغندرقند با استفاده از جدایه‌های بومی استرپتومایسس در شرایط گلخانه و مزرعه. **مجله چغندرقند ۲۵(۲): ۱۹۱-۱۷۷**

چکیده

کنترل بیولوژیکی مرگ گیاه‌چه چغندرقند با عامل *Rhizoctonia solani* AG-4 با استفاده از دو جدایه بومی *Streptomyces* به نام‌های S2 و C در گلخانه و مزرعه ارزیابی شد. هر دو جدایه در آزمایش کشت متقابل از رشد میسلیومی *R. solani* AG-4 جلوگیری کردند. هم‌چنین ترکیبات فرآر جدایه‌های C و S2 به‌ترتیب به میزان ۷۲ و ۷٤ درصد از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر ممانعت کردند. تیمار خاک با هر یک از دو جدایه، باکتری مرگ گیاه‌چه رایزوکتونیایی را در خاک استریل تلقیح شده با قارچ بیماری‌زا به‌خوبی کنترل کرد. جدایه C با ۷٦ درصد افزایش گیاه‌چه سالم، عملکرد بهتری نسبت به جدایه S2 داشت. جهت مطالعه سازوکار آنتاگونیستی جدایه‌ها، فعالیت کیتینازی و تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد هر دو جدایه روی محیط حاوی کیتین کلوئیدی فعالیت کیتینازی داشتند و قادر به بیوسنتز سیدروفور بودند. یک مطالعه مزرعه‌ای سه ساله طی سال‌های ۱۳۸٦-۱۳۸٤ جهت ارزیابی قابلیت دو جدایه S2 و C در کنترل مرگ گیاه‌چه رایزوکتونیایی چغندرقند انجام شد. تیمار جدایه‌های باکتری در مقایسه با شاهد، مرگ گیاه‌چه را به‌طور معنی‌دار در سطح پنج درصد در مزرعه با آلودگی طبیعی (سال ۱۳۸٤) و مزرعه با آلودگی مصنوعی (سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸٦) کاهش داد. بین دو جدایه از نظر کنترل بیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. استفاده از جدایه‌های باکتری به طور معنی‌داری در سطح پنج درصد شدت پوسیدگی ریشه چغندرقند را کاهش داد. در سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸٦ جدایه‌های باکتری توانستند درصد ریشه‌های سالم و بدون علائم پوسیدگی را ۸۰ تا ۹۵ درصد افزایش دهند.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، مرگ گیاه‌چه، رایزوکتونیا سولانی، استرپتومایسس، چغندرقند

۱ـ مربی پژوهشی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی *ـنویسنده مسئول aksadeghi@abrii.ac.ir
۲ـ مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران
۳ـ استادیار دانشگاه شهید بهشتی
۴ـ دانشجوی دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۵، ۶ و ۷ـ به‌ترتیب کارشناس، مربی پژوهشی و استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
۸ و ۹ـ به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دکتری دانشگاه تهران

مقدمه

مرگ گیاهچه یکی از مشکلات معمول گیاهان در مزرعه و گلخانه به‌شمار می‌رود (Georgakopoulos et al. 2002). بیمارگر *Rhizoctonia solani* Kuhn یکی از مهم‌ترین قارچهای خاک‌زادی است که با مرگ گیاهچه گیاهان زراعی مرتبط است (Tarek and Moussa 2002). این بیمارگر قارچی موجب پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند نیز می‌شود. قارچهای دیگری از جنس‌های *Pythium*، *Fusarium* و *Phytophthora* نیز گیاهچه و ریشه چغندرقند را مورد حمله قرار می‌دهند. مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از این قارچهای بیمارگر از مناطق مختلف چغندرکاری ایران گزارش شده است (ارشاد ۱۳۷۴؛ عباسی‌مقدم و همکاران ۱۳۷۷). حفاظت از چغندرقند در برابر *R. solani* جهت بالا بردن کیفیت و کمیت محصول از اهمیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر، در ایران روش متداول کنترل بیماری‌های قارچی خاک‌زاد چغندرقند پوشش بذر با استفاده از قارچ‌کش کربوکسین تیرام است. با این وجود علاوه بر آلودگی‌های زیست‌محیطی و مشکلات اقتصادی ناشی از کاربرد سموم شیمیایی، مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند به‌طور کامل کنترل نشده و به صورت یکی از مشکلات عمده چغندرکاری در ایران مطرح است. توسعه سیستم‌های بیوکنترلی، راه‌کاری مؤثر جهت کاهش آلودگی محیط زیست و خطر ایجاد مقاومت ناشی از قارچ‌کش‌های شیمیایی محسوب می‌شود. گزارش‌های زیادی از کنترل بیولوژیکی بیماری‌های خاک‌زاد با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به ویژه گونه‌های *Streptomyces* به چاپ رسیده است (Crawford et al. 1993; EL–Abyad et al. 1993; Asaka and Shoda 1996; Jones and Samac 1996; Chamberlain and Crawford 1999; Whipps 2001; Xiao et al. 2002). گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* دارای اثر بازدارندگی روی قارچهای خاک‌زاد از جمله *Fusarium oxysporum* (Smith et al. 1990; Abd–Allah 2001; Getha and Vikineswary 2002)؛ *Pythium ultimum* (Crawford et al. 1993; Yuan and Crawford 1995; Paulitz and Belanger 2001)؛ *Verticillum* spp. (EL–Abyad et al. 1993; Aghighi et al. 2004)؛ *Rhizoctonia solani* (Asaka and Shoda 1996) هستند.

براساس مطالعات اخیر، کاربرد *Streptomyces* و یا کشت صاف شده آن برای کنترل مرگ گیاهچه رایزوکتونیایی مؤثر است. چونگ و همکاران (Chunga et al. 2005) بیوکنترل مرگ گیاهچه رایزوکتونیایی کلم‌چینی و ساباراتنام و تراکوآیر (Sabaratnam and Traquair 2002) بیوکنترل مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی را با استفاده از *Streptomyces* گزارش کردند. علاوه‌بر این، برخی از گونه‌های این جنس تحریک‌کننده رشد گیاه هستند که علت آن ممکن است تولید سیدروفورهای نوع هیدروکسامات (Tokala et

(al. 2002 و یا تولید سایر متابولیت‌های تحریک‌کننده رشد گیاه باشد (Nassar et al. 2003). عمده‌ترین مکانیسم اثر آنتاگونیستی *Streptomyces*، تولید آنتی بیوتیک‌های ضدقارچی (Smith et al. 1990; Gupte and Naik 1999)، رقابت برای جذب آهن از طریق تولید سیدروفور و تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده مانند کیتیناز و گلوکاناز (El-Tarabily et al. 2000) است. ترجواسترادا و همکاران (Trejo-Estrada et al. 1998) اثرات آنتاگونیستی *S. violaceusniger* را روی بیمارگرهای گیاهی گزارش کردند. این محققین نشان دادند که فعالیت بیوکنترلی این باکتری مربوط به سه ترکیب ضد قارچی آن است. هم‌چنین این باکتری قادر به تولید کیتیناز و گلوکاناز بود. نتایج دبور و همکاران (De Boer et al. 1998) روشن کرد که آنتی‌بیوتیک‌ها در فعالیت‌های ضدقارچی باکتری‌های تجزیه‌کننده کیتین درگیر بودند. ال-تارابیلی و همکاران (El-Tarabily et al. 2000) مشخص کردند که تولید کیتیناز و گلوکاناز مکانیسم اصلی مرتبط با فعالیت بیوکنترلی *S. violaceusniger* است. با وجود مطالعات متعدد در زمینه موفقیت کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی، تنها تعداد معدودی محصول تجاری جهت کاربرد در کشاورزی در بازار موجود است. علاوه‌بر این، اغلب این محصولات جهت کنترل بیماری‌های گیاهان گلخانه‌ای و تنها تعداد انگشت‌شماری برای استفاده در مزرعه معرفی شده‌اند (Stewart 2001; Paulitz and B´elanger 2001). اغلب محصولات کنترل بیولوژیک تجاری و مناسب جهت استفاده علیه بیمارگرهای خاک‌زاد حاوی یکی از سه جنس *Trichoderma*، *Bacillus* و *Streptomyces* هستند. طیف وسیع فعالیت کنترلی این باکتری‌ها و موفقیت آن‌ها در محافظت از گیاه در شرایط مزرعه از جمله عواملی است که این میکروارگانیسم‌ها را از سایر مواردی که تنها قادر به کنترل بیمارگرهای اختصاصی هستند، متمایز کرده است. تلاش‌های زیادی جهت توسعه گونه‌های *Streptomyces* به عنوان عوامل کنترل‌کننده بیماری‌های قارچی انجام شده است. یکی از دلایل عمده فعالیت بر روی این باکتری‌ها، چند عملکردی بودن آن‌ها بر علیه بیمارگرهای گوناگون گیاهی است که منجر به کاهش سلامت گیاه در طول دوره رشد می‌شوند، است.

در این مطالعه خصوصیات آنتاگونیستی دو جدایه *Streptomyces* با نام‌های (S2 و C) بر علیه *R. solani* AG-4 عامل مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که تیمار بذر با این دو جدایه باکتری موجب کنترل بیماری مرگ گیاهچه رایزوکتونیایی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتری و قارچ

در این بررسی از دو جدایه *Streptomyces* با نام‌های S2 و C که از خاک مزرعه گندمی واقع در کرج جداسازی و شناسایی شده بود، استفاده شد (Sadeghi and Ostadsaraie, 2004).

جهت احیاء باکتری، جدایه‌های لیوفیلیزه روی محیط MYA (حاوی ۱۰گرم عصاره جو، چهار گرم عصاره مخمر، چهار گرم گلوکز و ۱۸ گرم آگار، با اسیدیته ۷/۲) در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت هفت روز انکوبه شدند. این کشت‌ها تا زمان استفاده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از یک جدایه قارچ *R. solani* به نام Rh124 و با گروه آناستموزی AG-4، جدا شده از گیاهچه‌های چغندرقند بیمار (دریافتی از مؤسسه تحقیقات چغندرقند) به عنوان عامل بیمارگر استفاده شد. قارچ در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد روی محیط(Potato Dextrose Agar) PDA نگه‌داری شد.

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *Streptomyces* بر علیه قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی

به منظور بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *Streptomyces* در برابر قارچ *R. solani* از روش کشت دوطرفه یوآن و کراوفورد (Yuan and Crawford 1995) استفاده شد. به این ترتیب که یک لوپ کامل از اسپورهای باکتری در یک طرف محیط PDA به صورت خطی کشت شد و در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری شد. پس از ۴۸ ساعت در مقابل هر جدایه باکتری یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه قارچ در مرکز محیط کشت قرار داده شد. پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس‌از پنج روز میزان بازداری از رشد جدایه‌های قارچ، بر اساس کاهش شعاع رشد پرگنه قارچ نسبت به شاهد (به میلی‌متر) و براساس فرمول زیر بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و شامل سه تیمار (شاهد، C و S2) و سه تکرار بود.

$$\text{درصد ممانعت از رشد پرگنه قارچ} = \frac{\text{(میانگین قطر پرگنه قارچ در هر تیمار- میانگین قطر پرگنه قارچ در شاهد)} \times ۱۰۰}{\text{میانگین قطر پرگنه قارچ در شاهد}}$$

بررسی اثر متابولیت‌های فرآر *Streptomyces* در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *R. solani*

تأثیر متابولیت‌های فرآر جدایه‌های باکتری در جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری با استفاده‌از روش فیدامن و روزال (Fiddaman and Rossall 1993) انجام شد. جهت تهیه کشت چمنی باکتری سوسپانسیونی از اسپور باکتری با غلظت $۱۰^{۸}$ CFU/ml تهیه شد و بر روی پلیت حاوی محیط MYA پخش شد. سپس یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه جوان قارچ در مرکز پلیت حاوی محیط PDA قرار داده شد. هر دو پلیت به صورت رو در رو قرار گرفته و با استفاده‌از پارافیلم به یکدیگر متصل شدند. در تیمار شاهد به جای دیسک قارچ از دیسک محیط MYA استفاده شد. پلیت‌ها در حرارت ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و پس‌از پنج روز میزان بازداری از رشد قارچ با استفاده‌از فرمول فوق محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سه تیمار (شاهد، C و S2) و سه تکرار بود.

آزمون احیاءپذیری میسلیوم قارچ در کشت متقابل

جهت ارزیابی اثر قارچ‌کشی/قارچ ایستایی جدایه‌های آنتاگونیست، در انتهای روز پنجم بلوکی از حاشیه پرگنه قارچ‌ها واقع در ناحیه بازداشته شده از رشد در کشت متقابل، به محیط کشت PDA منتقل و رشد آن نسبت به رشد قارچ در پلیت شاهد بررسی شد.

بررسی فعالیت کیتینازی جدایه‌های *Streptomyces*

سه بلوک پنج میلی‌متری از کشت دو جدایه C و S2 به محیط جامد حاوی ۰/۴ درصد کیتین کلوئیدی (Hsu and Lockwood 1975) و ۱/۵ درصد آگار با اسیدیته ۷/۲ منتقل و در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. ظهور هاله شفاف (بیش از ۵ میلی‌متر) پیرامون باکتری به عنوان فعالیت کیتینازی ارزیابی شد. این آزمون در سه تکرار انجام شد.

بررسی تولید سیدروفور جدایه‌های *Streptomyces*

آزمون ردیابی سیدروفور بر اساس روش CAS (Alexander and Zuberer 1991) انجام شد.

کشت باکتری بر روی محیط حاوی معرف به صورت نقطه‌ای (با استفاده از سوزن ته‌گرد) انجام شد. پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی هاله (تغییر رنگ محیط اطراف هر کلنی از آبی به نارنجی) تشکیل شده و با محاسبه قطر هاله به کلنی در فواصل زمانی سه، پنج، هفت و نه روز ارزیابی شد. این آزمون در سه تکرار انجام شد.

بررسی تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی و مشاهده تأثیر مطلوب جدایه‌های باکتری در کاهش رشد قارچ بیمارگر، تأثیر باکتری بر کنترل مرگ گیاهچه چغندرقند به روش محلول‌پاشی خاک در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. جهت تهیه مایه تلقیح قارچ *R. solani*، ۱۰۰ گرم بذر گندم به مدت یک شبانه‌روز زیر شیر آب قرار گرفت، سپس آب اضافی آن گرفته شده و دو بار در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. بذور اتوکلاو شده به عنوان کشت پایه درون ارلن مایر یک لیتری ریخته شد. سپس قطعه‌های دو تا سه سانتی‌متری از کشت فعال *R.solani* به ارلن‌ها اضافه شد. ارلن‌ها به مدت چهار هفته در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. هر روز با تکان دادن ارلن‌ها محتویات آن‌ها به هم زده شد تا قارچ در تمام قسمت‌ها به‌طور یکنواخت رشد کند. مخلوطی از کشت پایه که به خوبی توسط قارچ کلونیزه شده بود، آرد ذرت سترون و ماسه سترون به نسبت پنج، پنج و ۹۰ درصد W/W تهیه و به‌عنوان مایه تلقیح قارچ مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه تیمار شاهد غیرآلوده از آرد ذرت سترون و ماسه سترون به نسبت پنج و ۹۵ درصد W/W استفاده شد. گلدان‌های یک کیلوگرمی پر شده با خاک مزرعه سترون به‌وسیله مایه تلقیح قارچ به نسبت یک به ۱۰ W/W آلوده شدند. برای تهیه سوسپانسیون سلولی

باکتری، اسپورها و میسلیوم‌های یک پلیت نه سانتی‌متری از کشت چمنی هر جدایه با استفاده‌از لوپ برداشته و در ۲۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (سدیم کلرید ۰/۹ درصد) سوسپانسیون شد. دو سوسپانسیون با غلظت‌های CFU/ml 10^9 و 10^5 تهیه و استفاده شد. از هر سوسپانسیون، مخلوطی به صورت یک میلی‌لیتر بر یک گرم شن تهیه و به‌مدت دو ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای تیمارهای باکتری و قارچ و یا باکتری به تنهایی ۸۰ گرم شن مخلوط با باکتری به سطح هر گلدان اضافه شد. از شن مخلوط شده با سرم فیزیولوژیک (سدیم کلرید ۰/۹ درصد) سترون به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. بذور مصرف شده در این آزمایش رقم شیرین بوده و قبل از کاشت به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و به‌طور کامل با آب مقطر استریل شسته شدند. در هر گلدان هفت بذر منوژرم چغندرقند کاشته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار تحت دمای ۱ ±۲۳ درجه سانتی‌گراد با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند و هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند. بعداز ۳۰ روز تعداد گیاهچه‌های سالم یادداشت شد.

بررسی تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* در جلوگیری از مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند در شرایط مزرعه

آزمون‌های مزرعه‌ای طی سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۶ در مزرعه آزمایشی مؤسسه گیاهپزشکی کشور واقع در مشکین‌آباد کرج در خاک لومی شنی (۱۷/۸ درصد رس، ۵۳ درصد شن و ۲۹ درصد سیلت) انجام شد. بذور چغندرقند، رقم شیرین پس از کشت با مخلوط شن و سوسپانسیون باکتری (مطابق قسمت قبل) پوشش داده شد. کشت پایه قارچ *R. solani* AG4، جدایه Rh124 جهت آلوده‌سازی مصنوعی زمین مطابق قسمت قبل تهیه شد. کشت پایه تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت هوا خشک و سپس آسیاب شد. مخلوط هشت گرم از این مایه تلقیح با ۲۰۰ گرم خاک مزرعه، قبل از کاشت بذر در هر شیار زمین ریخته شد. از بذرهای آغشته به سم کربوکسین تیرام (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات چغندرقند) به‌عنوان کنترل استفاده شد. ۳۰ روز پس از کشت نمونه‌برداری جهت بررسی تعداد گیاهچه سالم انجام شد. تعدادی از ریشه‌های دارای علایم پوسیدگی جهت شناسایی عامل ایجاد پوسیدگی به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شستشوی سطحی ریشه‌ها با آب شیر، قسمت‌های دارای پوسیدگی بر روی محیط کشت PDA منتقل و در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. قارچ رشد کرده جداسازی و مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن مورد بررسی قرار گرفت. در سال ۱۳۸۴، آزمایش در مزرعه با آلودگی طبیعی و در سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ در مزرعه تلقیح شده با قارچ *R. solani* به انجام رسید. این آزمایش با استفاده از طرح کرت‌های خرد شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار با چهار تیمار به اجرا درآمد. هر تیمار شامل یک کرت با چهار ردیف ۱۰ متری با فاصله ۷۵ سانتی‌متر از

هم‌دیگر و ۲۰ سانتی‌متر فاصله بین بوته‌ها طراحی شد. جهت ردیف‌ها شمال به جنوب بود.

آنالیزهای آماری

تجزیه واریانس بر پایه طرح آزمایشی به کارگرفته شده در هر آزمایش اجرا شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. نرم‌افزار مورد استفاده در تجزیه‌های آماری این مطالعه MSTATC بود.

نتایج

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *Streptomyces* در برابر *R.solani* در شرایط آزمایشگاهی

میانگین قطر هاله بازدارنده هر یک از جدایه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شد و درصد ممانعت از رشد پرگنه قارچ به‌دست آمد. نتایج این آزمون نشان داد که هر دو جدایه C و S2 دارای اثر بازدارندگی روی رشد میسلیومی قارچ بودند. اثرات آنتاگونیستی پس از دو روز بروز و در روزهای بعدی پیشرفت کرد. میزان ممانعت از رشد جدایه C (۴۵ درصد) در مقایسه با جدایه S2 (۳۱ درصد) بیش‌تر بود و از نظر آماری در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد (جدول ۱). آزمون احیاءپذیری نشان داد که پنج روز پس از انکوباسیون، میسلیوم‌های قارچ، واقع در حاشیه ناحیه بازدارندگی کشت متقابل هر دو جدایه باکتری در محیط کشت تازه قابلیت رشد داشتند.

جدول ۱ تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسس در برابر رایزوکتونیا سولانی (کشت متقابل)

جدایه باکتری	میانگین قطر کلنی (میلی‌متر)	درصد ممانعت
C	۳۹	۴۴/۷[a]
S2	۴۹	۳۱[b]
شاهد	۷۰	۰

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند براساس آزمون دانکن ($p< 0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار نیستند

بررسی اثر متابولیت‌های فرّار جدایه‌های *Streptomyces* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R.solani*

ترشحات فرّار هر دو جدایه توانستند به خوبی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر جلوگیری کنند. جدایه S2 با ۷۴ درصد و جدایه C با ۷۲ درصد بازدارندگی تقریباً رشد پرگنه‌های قارچ را متوقف کردند. از نظر آماری تفاوت تأثیر ترشحات فرّار دو جدایه معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲ تأثیر آنتاگونیستی متابولیت‌های فرّار جدایه‌های استرپتومایسس در جلوگیری از رشد رایزوکتونیا سولانی

جدایه باکتری	میانگین قطر کل کلنی (میلی‌متر)	درصد ممانعت
C	۲۰	۷۲[a]
S2	۱۹/۳	۷۴[a]
شاهد	۷۰	۰

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند براساس آزمون دانکن ($p< 0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار نیستند

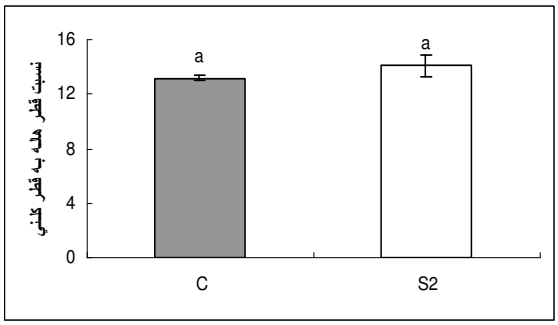
فعالیت کیتینازی

ایجاد هاله شفاف پیرامون کلنی جدایه‌های S2 و C در محیط کدر کیتین کلوییدی پس از به‌ترتیب سه و پنج روز انکوباسیون نشان داد که هر دو جدایه قادر

به تولید آنزیم کیتیناز، تجزیه کیتین و استفاده از آن به عنوان منبع کربن هستند.

تولید سیدروفور

با تشکیل هاله نارنجی در اطراف کلنی‌های باکتری مشخص شد که هر دو جدایه جهت انحلال آهن نامحلول محیط، سیدروفور تولید و در محیط آزاد می‌کنند. با گذشت زمان نسبت قطر هاله به کلنی برای هر دو جدایه افزایش یافت. این افزایش برای جدایه S2 به طور معنی‌دار بیش‌تر از جدایه C بود (شکل ۱).



تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن ($p< 0.05$) دارای اختلاف معنی دار نیستند

شکل ۱ بررسی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های استرپتومایسس با استفاده از روش CAS

بررسی تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه

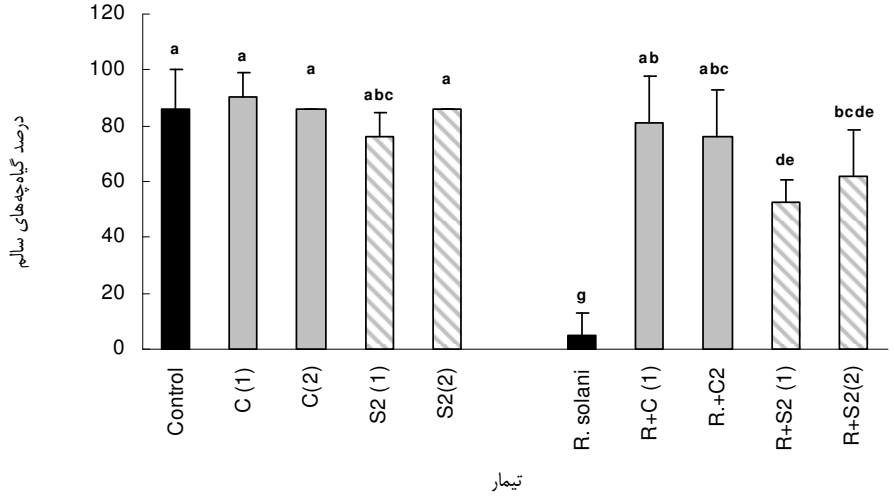
نتایج آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که هر دو جدایه نه تنها اثر گیاه‌سوزی نداشتند بلکه قارچ بیمارگر مولد مرگ گیاهچه را به خوبی کنترل کردند. تفاوت معنی‌داری بین دو غلظت یک جدایه باکتری بر روی جوانه‌زنی و کنترل بیماری دیده نشد. در رابطه با کنترل بیماری توسط دو جدایه باکتریایی در غلظت اول تفاوت معنی‌دار بین عملکرد جدایه‌ها دیده شد (شکل ۲).

بررسی تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* در جلوگیری از مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند در شرایط مزرعه

هر دو جدایه باکتریایی توانستند مرگ گیاهچه را به‌طور معنی‌دار در سطح پنج درصد در مزرعه با آلودگی طبیعی (سال ۱۳۸۴) و مزرعه با آلودگی مصنوعی (سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶) کاهش دهند، بین دو جدایه از نظر کنترل بیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مزرعه با آلودگی مصنوعی، تیمار با قارچ‌کش ۲۲ درصد و تیمار با جدایه C به میزان ۵۵ درصد مرگ گیاهچه را در مقایسه با بذر بدون تیمار کاهش داد (جدول ۳). بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که قارچ‌های جدا شده از ریشه‌های دارای علائم پوسیدگی *R. solani*؛ *Phytophthora* spp.؛ *Pythium* spp. و *Fusarium* spp. هستند. بذور تیمار نشده (کنترل) بیش از ۵۰ درصد پوسیدگی داشتند، در حالی که تیمار با جدایه‌های باکتری به‌طور معنی‌داری در سطح پنج درصد از شدت پوسیدگی کم شده بود. در سال‌های ۱۳۸۵و ۱۳۸۶ جدایه‌های باکتری توانستند درصد ریشه‌های سالم و بدون پوسیدگی را ۸۰ تا ۹۵ درصد افزایش دهند. از این نظر تفاوت معنی‌داری میان دو جدایه دیده نشد. در حالی‌که در مقایسه با کنترل، تیمار بذر با قارچ‌کش موجب کاهش پوسیدگی نشد (جدول ۴).

بحث

بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد هر دو جدایه *Streptomyces* استفاده شده در این مطالعه توانایی کنترل قارچ *R. solani* AG-4 عامل مرگ گیاهچه چغندرقند را دارا هستند. نتایج حاصل از کشت متقابل باکتری و قارچ مشخص کرد که قارچ *R.solani* نسبت به متابولیت‌های ضد قارچی آزاد شده توسط جدایه‌های باکتریایی C و S2 در محیط جامد حساس است. هم‌چنین ترشحات فرآر هر دو جدایه توانستند به خوبی از رشد میسلیومی قارچ جلوگیری کنند. در کشت متقابل، درصد ممانعت از رشد جدایه S2 (۳۱ درصد) به‌طور معنی‌داری کم‌تر از جدایه C (۴۵ درصد) بود؛ در صورتی‌که قدرت بازدارندگی متابولیت‌های فرآر هر دو جدایه برابر بود. قدرت آنتاگونیستی *Streptomyces* را به عوامل متعددی مانند تولید آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، آنزیم‌های هضم‌کننده دیواره سلولی قارچ و ترکیبات فرآر نسبت می‌دهند. ال تربیلی و همکاران (2000) نشان دادند که جدایه‌های آنتاگونیست *Streptomyces* قادر به تولید کیتیناز هستند.



شکل ۲ تأثیر جدایه‌های استرپتومایسس در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه۳۰ (روز پس از کشت)

C1 = تیمار شده با 10^5 CFU/ml *Streptomyces* isolate C

S2(2) = تیمار شده با 10^3 CFU/ml *Streptomyces* isolate S2

C2 = تیمار شده با 10^3 CFU/ml *Streptomyces* isolate C

R = تیمار شده با قارچ *Rhizoctonia solani*

S2(1) = تیمار شده با 10^5 CFU/ml *Streptomyces* isolate S2

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن ($p< 0.05$) دارای اختلاف معنی دار نیستند

جدول ۳ تأثیر جدایه‌های استرپتومایسس در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط مزرعه (سال ۸۶-۱۳۸۴)

تیمار	میانگین درصد گیاهچه‌های سالم		
	مزرعه با آلودگی طبیعی رایزوکتونیا سولانی	مزرعه با آلودگی مصنوعی رایزوکتونیا سولانی	
	۲۰۰۵	۲۰۰۶	۲۰۰۷
شاهد (تیمار نشده)	۵۹ a*	۳۸ a	۱۷/۷۵ c
C	۷۸/۵ b	۸۸ b	۷۱/۵ a
S2	۷۴/۲۵ b	۸۹ b	۶۹/۷۵ a
کربوکسین تیرام	-	-	۶۰/۲۵ b

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن ($p< 0.05$) دارای اختلاف معنی دار نیستند

اگرچه تولید کیتیناز می‌تواند عاملی مؤثر جهت فعالیت کنترلی باکتری بر علیه قارچ باشد اما الزاماً این فعالیت آنزیمی جهت کنترل مطلوب قارچ کافی نیست و معمولاً سایر عوامل کنترلی نیز در بیوکنترل دخالت دارند. نتایج دبور (1998) و گوپتا و همکاران (1995) روشن کرد که آنتی‌بیوتیک‌ها در فعالیت‌های ضد قارچی باکتری‌های تجزیه‌کننده کیتین درگیر هستند و فعالیت کیتینازی به‌تنهایی جهت کنترل قارچ‌ها کافی نیست. در این مطالعه نیز مشخص شد جدایه C و S2 علاوه بر تولید متابولیت‌های محلول و فرآر فعالیت کیتینازی دارد. از آن‌جا که بلوک‌های قارچ بیمارگر (برداشته شده از حاشیه پرگنه بیمارگر در ناحیه بازدارندگی آزمون کشت متقابل) در محیط تازه احیاء شدند، مشخص شد که متابولیت‌های ترشح شده در محیط کشت جامد روی قارچ *R. solani* اثر بازدارندگی (fungistatic) و نه کشندگی (fungicide) دارند. نتایج این مطالعه نشان دهنده وجود ارتباط بین آنتاگونیسم در شرایط *in vitro* و کنترل بیماری در شرایط *in vivo* است که با تحقیق انجام شده توسط یوان و کراوفورد (Yuan and Crawford 1995) و ال-تربیلی و همکاران (2000) مطابقت دارد. جدایه S2 با درصد بازدارندگی از رشد کم‌تر نسبت به جدایه C توانست در آزمون *in vivo* مرگ گیاهچه را به صورت معنی‌دار کاهش دهد. اگرچه عملکرد S2 نسبت به جدایه C کم‌تر بود با این وجود داده‌های به‌دست آمده از گلخانه نشان دادند که نتایج آزمایش‌های *in vitro* را نمی‌توان به سادگی به عنوان مقیاسی دقیق برای آزمون‌های *in vivo* به کار برد. این نتایج با داده‌های زیاو و همکاران (Xiao et al. 2002) مطابقت دارد. این محققین بیان داشتند اندازه ناحیه بازدارندگی جدایه‌های *Streptomyces* برای بیمارگرهای خاص و در شرایط *in vitro* با کنترل موفق آن بیمارگرها به‌طور معنی‌دار در ارتباط نیست. به عبارت بهتر، غربال عوامل بیوکنترل در شرایط *in vitro* باید با آزمون‌های *in vivo* دنبال شود. این موضوع می‌تواند ما را در حفظ جدایه‌های ضعیف‌تر، از نظر آزمون‌های آزمایشگاهی اما مؤثر از نظر سایر

جنبه‌های مورد استفاده در کشاورزی کمک کند. با استفاده از روش CAS مشخص شد که هر دو جدایه قابلیت تولید سیدروفور را داشتند. مطالعات قبلی نشان داده بود که گیاهان دولپه‌ای توانایی جذب یون آهن را از کلات‌های میکروبی (سیدروفور) دارند (Crowley et al. 1991). هم‌چنین مزایای سیدروفورهای میکروبی به عنوان منابع آهن و اثرشان در جلوگیری از تنش کمبود آهن و افزایش رشد گیاه گزارش شده است (Wang et al. 1993). سیدروفور از جمله ترکیباتی است که با ایجاد مقاومت القایی سیستمیک (Induced Systemic Resistance, ISR) گیاهان را در برابر طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی محافظت می‌کند (Bloemberg and Lugtenberg 2001). توکالا و همکاران (Tokala et al. 2002) نشان دادند *S. lydicus* WYEC108، یک عامل بیوکنترلی ضد قارچی و تحریک‌کننده رشد گیاه است که سیدروفور هیدروکساماتی تولید می‌کند.

در این مطالعه مقایسه نسبت قطر هاله به کلنی نشان داد که دو جدایه از نظر این شاخص تفاوت معنی‌دار داشته و افزایش این نسبت برای جدایه S2 بیش‌تر از جدایه C بود. با توجه به افزایش قابلیت جدایه C در کنترل بیماری و عملکرد گیاه به نظر می‌رسد که در اینجا تولید سیدروفور توجیه کننده تفاوت قابلیت‌های دو جدایه نیست. از طرفی اندازه‌گیری دقیق مقدار سیدروفور بر پایه روش‌های کمّی جهت مشخص کردن نقش سیدروفور در خصوصیات بیوکنترلی این دو جدایه در مطالعات بعدی ضروری است.

در آزمایش‌های مزرعه‌ای تیمار با جدایه‌های *Streptomyces* باعث کاهش شدت مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند شد. مطالعات ما نشان داد که جدایه‌های باکتری دارای پتانسیل بیوکنترل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند هستند. در این بررسی‌ها هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو جدایه C و S2 در کنترل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه مشاهده نشد. امکان استفاده از میکروارگانیسم‌ها در بیوکنترل بیماری‌های خاک‌زاد به‌خوبی موردمطالعه قرار گرفته است. در مورد مرگ گیاهچه کافی است عامل آنتاگونیست، بذر و گیاهچه را طی دوره زمانی کوتاه جوانه‌زنی و ظهور گیاه مورد حفاظت قرار دهد. با این وجود شناسایی و استفاده از آنتاگونیست‌هایی که بتوانند مدت زمان بیش‌تری گیاه را محافظت کنند از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است. این آنتاگونیست‌ها علاوه بر کنترل مرگ گیاهچه قادر خواهند بود بیماری‌های پس‌رویشی ـ مانند پوسیدگی‌های قارچی ریشه ـ که به کمیت و کیفیت محصول خسارت وارد می‌آورند را نیز کنترل کنند. از آن‌جا که هر دو جدایه C و S2 توانایی کنترل قارچ‌هایی از جنس‌های متفاوت مانند *Fusarium*، *Pyricularia* و *Rhizoctonia* را در شرایط آزمایشگاه نشان داده بودند (Sadeghi and Ostadsaraie 2004) انتظار می‌رفت در آزمون‌های مزرعه‌ای علاوه‌بر کنترل *R. solani*، دیگر بیمارگرها را

نیز کنترل کنند. نتایج نشان می‌دهند که این دو جدایه پوسیدگی ریشه ناشی از قارچهای *R. solani*، *Phytophthora* spp.، *Pythium* spp. و *Fusarium* spp. را کاهش داده و تعداد چغندرهای سالم را افزایش دادند. براساس نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت جدایه‌های C و S2 پتانسیل تجاری شدن را جهت کنترل مرگ گیاهچه و افزایش عملکرد چغندرقند دارند.

جدول ٤ تأثیر جدایه‌های استرپتومایسس در کاهش پوسیدگی ریشه چغندر قند در شرایط مزرعه

	درصد پوسیدگی ریشه	
تیمار	۲۰۰۶	۲۰۰۷
شاهد (تیمار نشده)	۶۰ a*	۵۰ a
C	۷/۵ bc	۱۰ b
S2	۵ c	۲۰ b
کربوکسین تیرام	-	۴۰ a

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن ($p< 0.05$) دارای اختلاف معنی دار نیستند

منابع مورد استفاده

References:

ارشاد، ج. ۱۳۷۴. قارچهای ایران. نشر سازمان تحقیقات کشاورزی. صفحه ۸۷۴

عباسی‌مقدم، ا. فلاحتی رستگار، م. جعفرپور، ب. ۱۳۷۷. اتیولوژی پوسیدگی‌های ریشه و طوقه چغندرقند در استان خراسان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۱۲۶

Abd–Allah EF (2001) *Streptomyces plicatus* as a model biocontrol agent. Folia Microbiology 46: 309–314.

Aghighi S, Shahidi Bonjar GH, Saadoun I (2004) First report of antifungal Properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (Strain101) against four Iranian phytopathogenic isolates of *Verticillium dahliae*, a new horizon in biocontrol agents. Biotechnology 3: 90-97.

Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils 12: 39-45.

Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology 62: 4081–4085.

Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Current Opinion in Plant Biology 4:343– 350.

Chamberlain K, Crawford DL (1999) *In vitro* and *In vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi *by Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 23: 641– 646.

Chunga WC, Huangb JW, Huangc HC (2005) Formulation of a soil biofungicide for control of damping off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. Biological Control 32: 287–294.

Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA (1993) Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Applied and Environmental Microbiology 59: 3899–3905.

Crowley DE, Wang YC, Reid CPP, Szaniszlo PJ (1991) Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. Plant and Soil. 130: 179–198.

De Boer W, Klein Gunnewiek PJA, Lafeber P, Janse JD, Spit BE, Woldendorp JW (1998) Antifungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. Soil Biology and Biochemistry 30:193–203.

EL–Abyad MS, EL–Sayed MA, EL–Shanshoury AR, EL–Sabbagh SM (1993) Toward the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant and Soil 149: 185–195.

El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithamparam K, McKenna F, Hardy GESJ (2000) Biological control of *Sclerotinia minor* using chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathology 49: 573-583.

Fiddaman PJ, Rossall S (1993) The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 74: 119–126.

Georgakopoulos DG, Fiddaman P, Leifert C, Malathrakis NE (2002) Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. Journal of Applied Microbiology 92: 1078-1086.

Getha K, Vikineswary S (2002) Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28: 303-310.

Gupte TE, Naik SR (1999) Isolation, taxonomic and fermentation studies on a new strain of *Streptomyces arenae var ukrainiana* producing a tetraene antibiotic. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 545-552.

Hsu SC, Lockwood JL (1975) Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. Applied Microbiology 29:422-426.

Jones CR, Samac DA (1996) Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease- suppressive strain of *Streptomyces*. Biological Control 7: 196–204.

Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K (2003) Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. Plant Growth Regulation 40:97-016.

Paulitz TC, Belanger RR (2001) Biological control in greenhouce systems. Annual Review of Phytopathology 39:103–133.

Sabaratnam S, Traquair JA (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Biological Control 23: 245-253.

Sadeghi A, Ostadsaraie R (2004) Isolation and characterization of two *Streptomyces* strains antagonists of plant pathogenic fungus. Proceedings of the Third National Congress on the Development in the Application of Biological Products and Optimum Utilization of Chemical Fertilizers and Pesticides in Agriculture. Karaj, Iran.

Smith J, Putnam A, Nair M (1990) *In vitro* control of *fusarium* diseases of *Asparagus officinalis* L. with a *Streptomyces* or its polyene antibiotic, faeriefungin. Journal of Agricultural and food Chemistry 38: 1729-1733.

Stewart A (2001) Commercial biocontrol—reality or fantasy? Australasian Plant Pathology 30: 127–131.

Tarek A, Moussa A (2002) Studies on biological control of sugar beet pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn. Online Journal of Biological Science 2: 800-804.

Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Applied and Environmental Microbiology 68: 2161-2171.

Trejo-Estrada SR, Sepulveda IR, Crawford DL (1998) *In vitro* and *In vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14: 865–872.

Wang Y, Brown HN, Crowley DE, Szaniszlo PJ (1993) Evidence for direct utilization of a siderophore, ferroxamine B, in axenically grown cucumber. Plant Cell Environment 16:579-585.

Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany 52: 487-511.

Xiao K, Kinkel LL, Samac DA (2002) Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biological Control 23: 285–295.

Yuan WM, Crawford DL (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Applied and Environmental Microbiology 61: 3119–3123.