جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ *Pythium ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه

مسعود احمدزاده، عباس شریفی تهرانی و حشمت‌الله رحیمیان

به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و استاد دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۲/۳۰

خلاصه

در این تحقیق بااستفاده از محیط اختصاصی " اس یک " از ریزوسفر نخود ایرانی مزرعه دانشکده کشاورزی کرج دو باکتری گرم منفی با خواص آنتاگونیستی علیه قارچ Pythium ultimum و نیز خاصیت تحریک کنندگی رشد گیاه جداسازی شد . استرین شماره II (سودوموناس فلورسنت) تاثیر معنی داری نسبت به شاهد روی رشد بوته های نخود ایرانی داشت . اثر هر دو استرین روی توسعه رشد ریشه ها چشمگیر و قابل توجه بود . بعلاوه استرین II اثر بهتری نسبت به استرین I روی افزایش وزن‌تر بوته‌های نخود در شرایط عاری از پاتوژن داشت . استرین I روی محیط کشت NAG (گلوکز دو درصد) تولید نوعی آنتی‌بیوتیک نمود که توانست در غیاب خود باکتری از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت کند. استرین II در همین شرایط تولید آنتی‌بیوتیک، نکرد. استرین II روی‌محیط کشت NAG (گلوکز پنج درصد) که حاوی غلظتهای مختلف کلرید آهن بود تولید نوعی سیدروفور نمود که توانست از رشد قارچ Geotrichum sp. جلوگیری نماید . استرین I در همین شرایط مانع از رشد قارچ اخیر نگردید.

واژه های کلیدی : باکتریهای آنتاگونیست، ریزوسفر نخود ایرانی قارچ *Pythium ultimum*

مقدمه

استفاده از باکتریها برای افزایش رشد گیاه برای اولین بار درسال ۱۹۵۰ در روسیه آغاز شد و در سال ۱۹۷۰ اعتبار علمی آن به تایید رسید(۱). تاکنون باکتریهای متعددی از جنسهای مختلف بعنوان عوامل تحریک کننده رشد گیاه و نیز بعنوان عوامل کنترل بیولوژیکی شناسایی و معرفی شده است که در بین آنها سودوموناسهای فلورسنت اهمیت ویژه‌ای دارد(۱۹).

استفاده از برخی گونه های فلورسنت سودوموناس برای کنترل بیماریهای پاخوره گندم(۱۷)، پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی (۱۰ و ۱۶) و نخود فرنگی (۱۴)، پنبه(۶)، بوته‌میری خیار(۱۱)و پوسیدگی سیاه ریشه توتون (۱۹)با موفقیت همراه بوده است . کاربرد تلفیقی باکتریهای آنتاگونیست به همراه سموم قارچکش از مزایای مهم این روش محسوب می‌شود. به کار بردن استرینهای مختلف باکتری بجای استفاده از یک استرین چون به شرایط طبیعی شبیه تر است نتایج بهتری را بدست می‌دهد. تحقیقاتی که روی مکانیسم‌های عمل آنتاگونیستی این عوامل انجام گرفته است نشان می‌دهد که تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور، اشغال آشیانه های اکولوژیک در مکانهای خاصی از ریشه و بالاخره مقاومت القایی نقش عمده‌ای در بازداری از رشد پاتوژنهای گیاهی خاکزی ایفا می‌کند(۱۹). هاول و استیپانوویک در سال ۱۹۷۹ برای اولین بار موفق شدند نقش آنتی‌بیوتیک پایولوتئورین را در بازدارندگی رشد قارچهای *Pythium ultimum* و *Rhizoctonia solani* را به

اثبات برسانند(۸). کلوپر در سال ۱۹۸۰ برای اولین‌بار به اهمیت سیدروفورها بعنوان یکی از مکانیسم‌های اساسی کنترل بیولوژیکی پی‌برد(۱۲). این مواد، کلاته کننده‌های قوی آهن سه ظرفیتی، با وزن ملکولی کم بوده که در شرایط کمبود آهن تولید شده و تشکیل یک کمپلکس بایون آهن سه ظرفیتی می‌دهند(۱۲).

در این تحقیق خاک مزارع نخود دانشکده کشاورزی کرج از نظر وجود باکتریهای آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت و پس از جداسازی، اثر استرین‌های جدا شده علیه قارچ ***P.ultimum*** و نیز خاصیت تحریک کنندگی آنها روی رشد بوته‌های نخود ایرانی آزمایش شد. همچنین تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور توسط آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

۱ - جداسازی و شناسایی قارچ عامل بیماری - قارچ عامل بیماری از بذور پوسیده شده و گیاهچه های بیمار با استفاده از روش تارپرو کاساس و همکاران (۱۶)جداسازی شد و مراحل تشخیص آن با استفاده از منوگراف دک و شرح واترهوس انجام گرفت. مشخصات مختلف اووگون و اووسپور، نحوه انشعاب آنتریدی از پایه اووگون و نحوه اتصال آن به دیواره اووگون بررسی شد. برای سهولت ایجاد اندامهای جنسی قارچ و تشکیل اووسپور از محیط سیب زمینی، هویج آگار(PCA)استفاده شد.

۲ - جداسازی باکتریها از خاک - برای جداسازی باکتریها از محیط اختصاصی اس یک استفاده شد، اختصاصی بودن این محیط بر اساس دو ماده سدیم لائوریل سارکوزین(SLS) وآنتی بیوتیک تری‌متوپریم می باشد که اولی از رشد باکتریهایی گرم مثبت و دومی از رشد سود و موناسهای غیر فلورسنت ممانعت می‌کند. ترکیب این دو ماده اثر تشدید کننده روی قدرت انتخابی محیط دارد اجزای این محیط در یک لیتر عبارتنداز: سوکروز ۱۰g، گلیسرول ۱۰ ml، کازامینواسید ۵g، سدیم‌لائوریل‌سارکوزین ۱/۲g، تریمتوپریم ۲۰mg، 1g Mgso4.7H2o، 1g NaHco3، آگار ۱۸g، (۵). نمونه های خاک در اواخر فصل رویشی و حدود یک هفته مانده به زمان برداشت بطور تصادفی از نقاط مختلف مزرعه جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد پس از مخلوط کردن نمونه‌ها با یکدیگر، ۲۰ گرم در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته و غلظتهای مختلف بصورت پی درپی تا 10^{-5} برابر در محلول یک درصد پپتون تهیه گردید. از هر لوله یک دهم میلی لیتربه محیط " اس یک " منتقل و پخش گردید. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتیگراد، به تعداد لازم کلنی از سطح پتری ها انتخاب و روی محیط آگار غذایی (NA) درون لوله آزمایش منتقل شد. باکتریهای جدا شده برای انجام مراحل بعدی آزمایش در محلول یک دهم مولار سولفات منیزیوم نگهداری شدند و بعنوان منبع باکتری برای تمام آزمایشها استفاده گردید.

۳ - تاثیر باکتری روی تحریک رشد بوته های نخود - اثر باکتریها روی رشد گیاه و توسعه ریشه ها با استفاده از روش انجام شد. آغشته نمودن بذور به باکتری مطابق روش ولر (۱۷) صورت گرفت. بذور تیمار شده در لوله های مخصوصی که حاوی مخزن آب در انتها بودند درون ماسه استریل کاشته شدند. در تیمار شاهد از بذوری که فقط ضد عفونی سطحی شده بودند استفاده گردید. پس از پوشاندن سر لوله‌ها با پنبه استریل، آنها را در دمای ۲۰ الی ۲۲ درجه سانتیگراد قرار داده پس از دو هفته میزان رشد ریشه ها و وزن‌تر بوته هابایکدیگر مقایسه گردید.

۴ - تولید آنتی‌بیوتیک و سیدروفور - برای اثبات تولید آنتی‌بیوتیک روی محیط آگار غذایی بعلاوه گلوکز دودرصد از روش کراثوس و لوپر (۱۱) استفاده شد. در این روش پس از رشد باکتری بمدت چهار روز روی محیط مذکور، کلنی‌های رشد یافته از سطح پتری جمع آوری و برای اطمینان از عدم رشد بقایای کلنی‌ها ،از پنبه آغشته به فرمالین ۴۰% بمدت نیم ساعت درون پتری وارونه استفاده شد. عدم رشد قارچ پتیوم روی این محیط و مقایسه آن با شاهد که باکتری در آن کشت نشده بود نشانه وجود آنتی‌بیوتیک درون محیط غذایی تلقی شد. در پتری های شاهد نیز از پنبه آغشته به فرمالین استفاده شد.

برای بررسی تولید سیدروفور از روش ولر و کوک (۱۷) با اندکی تغییر استفاده شد. به این ترتیب که از محیط آگار غذایی حاوی گلوکز پنج درصد بجای محیط King B (که برای نشان دادن خاصیت فلورسنت باکتریها مناسب است)استفاده گردید. به این محیط غلظتهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومول کلرید آهن (FeCl3) اضافه شد. عدم رشد قارچ Geotrichum sp. در اطراف کلنی باکتریها و رشد آن در بقیه قسمت های پتری نشانه تولید

سیدروفور می‌باشد .

نتایج و بحث

با توجه به مشخصات قارچ مورد بررسی عامل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی در مزرعه دانشکده کشاورزی کرج Pythium ultimum var.ultimum تشخیص و بیماری زایی آن به اثبات رسید . این واریته تولید هیچگونه زئوسپور نمی‌کند بطوریکه یکی از وجوه تمایز آن با P.ultimum var.sporangiferum محسوب می‌شود . بعلاوه این قارچ تولید اسپورانژ نمی‌کند ولی تورم‌های هیفی قابل مشاهده است . از بین باکتریهای رشد یافته روی محیط " اس یک " تنها دو استرین با خواص آنتاگونیستی علیه قارچ عامل بیماری شناسایی شد .

روشهای مختلفی برای بررسی مقدماتی خواص بازدارندگی باکتریهای جدا شده روی رشد قارچ مورد نظر بکار رفت که از شرح آنها خودداری می‌شود . یکی از استرینها بوضوح تولید رنگدانه فلورسنت نمود و بعنوان یک سودوموناس فلورسنت معرفی گردید . استرینهای مورد آزمایش صرفنظر از خواص آنتاگونیستی ، تاثیر محسوسی روی رشد بوته‌های نخود داشتند بطوریکه در مورد استرین II این اختلاف نسبت به شاهد معنی‌دار بود (جدول ۱).

رشد ریشه هایی که از بذور آغشته به باکتری حاصل شده بودند توسعه بسیار بهتری نسبت به شاهد داشتند . استرین I در محیط

جدول ۱ـ تاثیر دواسترین باکتریایی درتحریک رشدگیاهچه نخودایرانی

تیمارها	میزان	وزن‌تر بوته‌ها(گرم)
استرین II	10^8-10^9 cfu*	۱/۵۹(a)
استرین I	10^8-10^9cfu	۱/۵۰(b)
شاهد	۰/۵ ml آب مقطر	۱/۰۰(b)

* cfu = تعداد کلنی‌های شمارش شده در یک میلی‌لیتر آب

- در هر لوله یک عدد بذر و برای هر تیمار ، چهار تکرار استفاده شد.

- اندازه‌گیری وزن‌تر بوته‌ها ۱۴ روز پس از کاشت صورت گرفت.

- اعدادی که با حروف یکسان مشخص شده‌اند در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

(LSD (۰/۰۵) = ۰/۳۰۹۵ و معیار خطای میانگین ها = ۰/۰۸۹۴)

کشت مورد آزمایش تولید نوعی آنتی بیوتیک نمود که توانست در غیاب خود باکتری از رشد قارچ عامل بیماری ممانعت کند .

در مورد استرین II کلنی‌های قارچ تقریبا به اندازه شاهد (محیط کشت NAG که هیچگونه باکتری روی آن کشت داده نشده بود) رشد کرده بودند . با وجود این ، هنوز نمی‌توان درباره تولید آنتی‌بیوتیک توسط این استرین اظهار نظر نمود. آزمایشهای تکمیلی با استفاده از سایر محیطهای غذایی لازم است.

استرین II درغلظتهای ۲۵ و ۵۰ و تاحدودی در ۷۵ میکرومول کلرید آهن تولید نوعی سیدروفور می‌کند که به احتمال قوی نقش مهمی در بازدارندگی روی ***P.ultimum*** دارد . استرین I در هیچیک از غلظتهای کلرید آهن سه ظرفیتی (یون فریک) اثر بازدارندگی روی رشد قارچ ***Geotrichum sp.*** نشان‌نداد. بنظر می‌رسد که این استرین تولید سیدروفور نمی‌کند .

بررسیهای مقدماتی نشان داد که در برخی خاکهای زراعی کشور باکتریهایی وجود دارد که احتمالا تا حدی در بازدارندگی و کاهش طبیعی بیماری نقش دارند . جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از مزارع نخود دانشکده کشاورزی کرج در مرداد ماه که تقریبا مصادف با پایان برداشت محصول می‌باشد انجام شد به دلیل کاهش جمعیت و فعالیت میکروبی خاک در زمان نمونه برداری ، پس از رقیق سازی خاک در محلول پپتون یک‌درصد ، فقط در اولین رقت ، باکتریها قابل جداسازی بود . براساس تحقیقات هاجدرون (۱۶(۶ هفته پس از کاشت پنبه میزان باکتری قابل جداسازی به حداقل می‌رسد . اگر جداسازی باکتری در هفته های اولیه پس از کاشت محصول انجام گیرد به احتمال قوی شانس بیشتری برای دستیابی به عوامل آنتاگونیست باکتریایی وجود خواهد داشت .

سیدروفور تولید شده بوسیله استرین II می‌تواند بعنوان یک دلیل احتمالی برای اثر تحریک کنندگی رشد گیاه مورد توجه قرار بگیرد . تاکنون دلایل متعددی برای اثر تحریک کنندگی این قبیل باکتریها ارائه شده است از جمله : بازدارندگی روی پاتوژنهای جزئی خاک (۱۹)، جذب بهتر مواد غذایی بوسیله گیاه و رشد بهتر سایر میکرو ارگانیسم‌های مفید خاک مانند میکوریزا (۲ و ۱۹) ؛ تولید سیدروفور (۱۲) و نیز تولید مواد تنظیم کننده رشد (۲) .

کرائوس و لوپر در بررسیهای خود درباره مکانیسم بازدارندگی از رشد قارچ پتیوم توسط استرین Pf-5 اعلام نموده که

این استرین روی محیط NAG تولید آنتی‌بیوتیک نمی‌کند ولی روی محیط آگار ۵۲۳ تولید آنتی‌بیوتیکهایی از نوع پیرول نیترین و پایولوتئورین می‌کند (۱۱).

هاول و استیپانوویک نیز قبلا اثبات کرده بودند که این دو آنتی‌بیوتیک به اندازه خود باکتری می‌تواند علیه ***Rhizoctonia solani*** و ***P.ultimum*** روی محیط کشت ایجاد بازدارندگی کنند.

تولید سیدروفور یکی از مکانیسم‌های مهم کنترل بیولوژیکی می‌باشد. این‌مواد ، آهن موجود در خاک را از دسترس سایر میکروارگانیسم‌ها خارج نموده و باعث اختلال در واکنشهای حیاتی آنها می‌شود . نقش سیدروفورها بعنوان یکی از عوامل اصلی در تحریک رشد گیاه مطرح شده است (۱۹). احتمالا می‌توان اثر تحریک کنندگی استرین II روی رشد گیاه نخود را ناشی از تولید سیدروفور آن دانست .

REFERENCES

1- Baker,K.F.1987.Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annu.Rev. Phytopathol .25:67-85.

2- Baker,R.& Kloepper,J. 1990. Recent work on growth promoting and biocontrol.pp 104-106. In Keel,C.,Koller,B.andDefago,G.(eds).plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth - promoting rhizobaceria. Interlacen, Switzerland.

3- De Bruyne,E., Renwick,A., Fattori,M.,Iriarte,V. 1990. Screening pseudomonas for the biocontrol of soil borne plant pathogens under in vitro and in vivo conditions. P 99.In keel,C.,koller,B.and Defago,G.(eds).plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth - promoting rhizobaceria. Interlacen,Switzerland.

4- Fravel,D.R.1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseaes. Ann.Rev.phtyopathol. 26:75-91.

5- Gould,W.D.,Hagedron,C.,Bardinelii,T.R.& Zablotowicz, R.1985.New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats . Appl. Environ. Microbiol.49:28 - 32.

6- Hagedron,C., Gould,W.D. & Bardinelii,T.R. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression seedling disease pathogens.Appl.Environ. Microbiol. 55:2793 - 2797.

7- Hornby,D. 1990. Biological control of soil-borne plant pathogens.C.A.B.International Wallingford,Uk.479 pp.

8- Howell,C.R., Stipanovic , R.D. 1979. Control of Rhizoctonia solani on cotton seedling with ***Pseudomonas fluorescens*** and with an antibiotic produced by the bacterium.28-084:96

10- Kaiser,W.J.,Hannan,R.M.& Weller,D.M.1989.Biological control of seed rot and preemergence damping-off of chickpea with fluoresent pseudomonads. Soil biol. Biochem. 21:269-273.

11- Kraus,J.& Loper,J.E. 1990. Biocontrol damping-off of cucumber by ***Pseudomonasf luorescens*** pf-5:mechanistic studies.pp 172-175. In keel,C.,koller,B.and Defago,G.(eds).plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth -promoting

rhizobacteria. Interlacen,Switzerland.

12- Leong,J. 1986. Siderophores:thier biochemistery and possible role in the biocontrol of plant pathogens.Ann.Rew. phytopathol. 24:187-209.

13- Parke,J.L. 1990. Efficacy of ***Pseudomonas*** cepacia AMMD and ***Pseudomonas fluorescens*** PRA25 in bicontrol of pea.pp30-33. In Keel,C.,Koller,B.and Defago,G.(eds).plant growth promoting rhizobacteria. The second international workshop on plant growth - promoting rhizobaceria. Interlacen,Switzerland.

14- Parke,J.L.,R &, R.E., Joy ,A.E.and King ,E.B. 1991. Biological control of Pythium damping-off and ***Aphanomyces*** root rot of peas by application of ***Pseudomonas cepacia*** or P.fluorescens to seed.plant Dis. 75:987-992.

15- Schroth,M.N.,Hancock,J.G.1982.Disease-suppressive soil and root colonizing bacteria. Science 216:1376-81.

16- Tarpero-Casas,A.,Kaiser,W,J.& Ingram, D.M. 1990. Control of ***pythium*** seed rot preemergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. plant Dis. 74:563-569.

17- Weller,D.M.,Cook,R.J.1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads.phytopathology 73:463-69.

18- Weller,D.M.1984.Distribution of a take-all suppressive strain of ***Pseudomonas fluorescens*** on seminal roots of winter wheat.Appl. Environ.Microbiol.48:897-99.

19- Weller,D.M. 1988.Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann.Rev.phytopathol.26:379-407.

Isolation of Antagonist Bacteria from Chickpea Rhizosphere and Study on Their Repression Againt *Pythium ultimum* Casual Agent of Seed Rot and Seedling Damping - off.

M.AHMADZADEH, A.SHARIFI TEHRANI AND H.RAHIMIAN

Former Graduate Student, Professor , College of Agicufture, University of Tehran, and Professor University of Mazandaran, Iran.

Accepted 20 May 1997

SUMMARY

In this study, two gram - negative bacteria were isolated on selective medium S1 from chickpea rhizosphere. The bacteria had the ability to suppress the Pythium ultimum and promote the plant growth of chickpea. Strain II(a fluorescent pseudomond) was significantly effective than the control on chickpea grow. Both strains had considerable effect on root development. Also, strain II had better on fresh weight of chickpea as compared to strain I.Strain I produced a kind of antibiotic on NAG (glucose 2%) that could inhibit the casual agent of seed rot and preemmergence of chickpea in the absence of bacterium. Under the same condition, strain II could not produce any antibiotic. StrainII produced siderophore on NAG (glucose 5%) amended with different concentration of FeCl3 and inhibited growth of Geotrichum sp., whereas strain I could not inhibit the growth of the fungus.