

کنترل بیولوژیک *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* توسط باکتری‌های آنتاگونیست باسیلوس و

سودوموناس ریزوسفر گوجه‌فرنگی در لرستان

سجاد جلالی¹، ناصر پنجه‌که²، مصطفی درویش نیا^{3*}، محمد سالاری⁴، احمد صالحی⁵

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 طرحه شاندریز، 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 در نتیجه 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 روش‌ها

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. میان‌گره 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. virguliforme و *F. pseudoanthophilum*، *F. equiseti*، *F. javanicum*، *F. solani*، *F. oxysporum* 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 (Nelson et al., 1983؛ Gerlach and Nirenberg, 1982؛ Leslie and Summerell, 2006).

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 به اندازه کافی اسپور تولید کند (Banhashemi, 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 ملامل 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 به آرامی 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 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در گلدان‌های شاهد به جای 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 (Banhashemi, 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 میسلیمی 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 مورد استفاده قرار گرفت که حاوی محیط کشت و دو دیسک 5 میلی‌متری میسلیمی 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 میسلیم بیمارگر با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

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

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 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد مورد استفاده 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 پر شده 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 به جای سوسپانسیون اسپور باکتری از آب مقطر دو بار سترون استفاده شد (Montealegre *et al.*, 2003).

برهم کنش 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 به جای 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).

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

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 $DR\% = (1 - DT/DC) \times 100$ 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 به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل 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 $3/6 \times 3/6$ تا $10/2$ و انواع دو سلولی 3 تا $3/9 \times 9/6$ تا $16/2$ میکرون، 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 $5/04 \times 27/6$ تا $50/4$ میکرون، کنیدیوفور منوفیالیدی کوتاه ساده یا منشعب، طول فیالیدها $7/2$ تا $14/4$ میکرون، 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 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 جمع‌آوری شده 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 میسلیم بیمارگر جلوگیری کردند. این جدایه‌ها شامل *Pseudomonas*، *Bacillus subtilis* (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* جداسازی شده از مزارع، در آزمایشگاه از رشد میسلیم 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 ($P \leq 0.05$) ولی این دو جدایه با جدایه FOS با 38/87 درصد بیماری‌زایی و مرگ گیاهچه اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P \leq 0.05$). جدایه FOM، با دارا بودن قدرت بیماری‌زایی بالاتری نسبت به سایر جدایه‌های مورد آزمایش، در تست‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد استفاده 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. subtilis* با 3/41 درصد بازدارندگی اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت. جدایه *B. subtilis* فقط در زمان 144 ساعت بعد از مایه‌کوبی با بیمارگر اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.05$) 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 میسلیم بیمارگر داشتند و بین این دو جدایه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P \leq 0.05$) و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول 1، شکل 1). نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی منافی

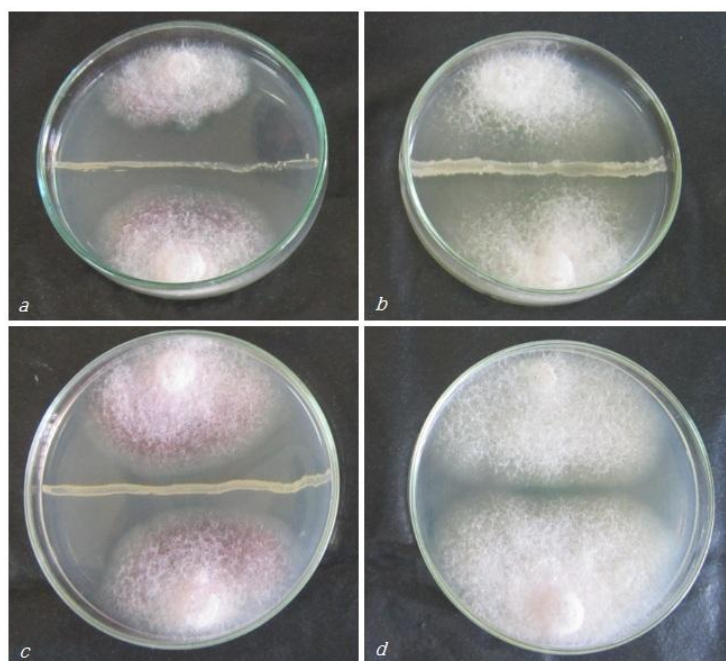
و همکاران نشان داد که درصد بازدارندگی جدایه باکتریایی *P. fluorescens* از رشد قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی به میزان 33/08 درصد بود که با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش مطابقت داشت (Manafi et al., 2012).

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

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

- 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 144 ساعت بعد از مایه‌کوبی: (a) *Pseudomonas fluorescens* (P1)، (b) *Bacillus subtilis* (P2)، (c) *Pseudomonas fluorescens* (P2) 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 ($P \leq 0.05$) در ارتفاع ریشه، وزن تر 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 ($P \leq 0.05$) نسبت به شاهد آلوده داشت (جدول 2 و 3).

جدول 2- تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtilis* 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)	وزن تر اندام هوایی (gr)	وزن تر 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 + <i>F. oxysporum</i>	27/33abc	18/77b	6/75b	1/52bc	0/98ab	0/2c	15b
<i>B. subtilis</i>	29/72ab	25/64a	10/51a	2/46a	1/15a	0/28ab	-
<i>B. subtilis</i> + <i>F. oxysporum</i>	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	-
<i>F. oxysporum</i>	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 subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* بر فاکتورهای رشدی گیاهچه گوجه‌فرنگی و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در گلخانه. ریشه نشاها در سوسپانسیون 1×10^9 cfu/ml باکتری فرورده شد و فاکتورهای رشدی گیاه و شدت بیماری‌زایی در مقایسه با شاهد آلوده به صورت درصد تأثیر یادداشت برداری شده است.

تیمار	افزایش ارتفاع ساقه (%)	افزایش ارتفاع ریشه (%)	افزایش وزن تر اندام‌های هوایی (%)	افزایش وزن تر 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 + <i>F. oxysporum</i>	27/44abc	17/85b	36/74b	22/37bc	42/86ab	25/00c	62/50b
<i>B. subtilis</i>	33/28ab	39/86a	59/37a	52/03a	51/30a	46/43ab	-
<i>B. subtilis</i> + <i>F. oxysporum</i>	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	-
<i>F. oxysporum</i>	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 میسلیم *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 تأثیر 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 سیتوکینین 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.) 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 آنتی‌بیوتیک، 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 میکروارگانیزم‌های حل‌کننده 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 میسلیم 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 Province 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 Bundesanstalt für 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. Jalali¹, N. Panjekeh², M. Darvishnia*³, M. Salari⁴, A. Salehi⁵

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 Jihad Organization, Khorasan Razavi, Iran.

*Corresponding author: mdarvishnia44@yahoo.com