دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال سوم، شماره دوم، پاییز و زمستان 1394
صص 42-29

بررسی امکان استفاده از برخی سویه‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از فراریشه پسته در کنترل *Phytophthora drechsleri* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته

صغری درودی [1]، حسین علایی [2*]، روح اله صابری ریسه [2]، امیر حسین محمدی [3]، محمد گرجی [4]

تاریخ دریافت: 93/10/7 تاریخ پذیرش: 94/1/17

چکیده

پوسیدگی طوقه و ریشه (انگومک) ازجمله بیماری‌های مهم درختان پسته درایران است که روش‌های مختلفی از جمله کنترل بیولوژیک برای مدیریت بیماری پیشنهاد شده است. سودومونادهای فلورسنت با توانایی تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و مواد تنظیم کننده رشد، از مهم‌ترین باکتری‌های خاکزی موثر در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی هستند. در این تحقیق اثر آنتاگونیستی سودومونادهای فلورسنت جدا شده از فراریشه درختان سالم و آلوده به گموز پسته برای بیوکنترل *Phytophthora drechsleri* مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور تعداد 75 جدایه باکتری سودوموناس با توجه به خصوصیت ایجاد نور فلورسنت در محیط KingB جداسازی شدند. از این تعداد، در غربالگری اولیه بر اساس آزمون کشت متقابل روی محیط کشت PDA، هفت جدایه (R41, A16, A17, R14, A41, B21, B13,)، هاله بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر *P.drechsleri* ایجاد کردند. بیشترین هاله بازدارندگی توسط جدایه-های R41 (≥15 mm) و A16 (≥5 mm) ایجاد شد که برای کنترل بیماری در آزمون‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. جدایه‌های انتخاب شده در شرایط گلخانه روی نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعات گلخانه‌ای نشان داد که جدایه R41، وزن خشک ریشه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد و بیشترین تاثیر در کاهش شدت بیماری داشت.

واژه‌های کلیدی: پسته، بیوکنترل، سودوموناس، فیتوفتورا، ترکیبات ضدقارچی

---

[1]- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج)رفسنجان، رفسنجان، ایران.
[2]- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران.
[3]- استادیار پژوهش، گروه گیاهپزشکی، موسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان، ایران.
[4]- مربی، مدیریت حفظ نباتات، جهادکشاورزی شهرستان انار، انار، ایران.
[*]- نویسنده مسئول مقاله: hossein.alaei@vru.ac.ir

مقدمه

نشانه‌های بیماری انگومک یا گموز پسته در ایران اولین بار توسط *شریف و تقی‌زاده* (Sharif and Taghizadeh, 1960) از استان کرمان گزارش شد ولی بیمارگر جدا نگردید. *مستوفی پور* (1969-مراجعه به ارشاد، 1971) اولین بار گونه‌هایی از *Phytophthora* را از طوقه و ریشه‌ی درختان پسته از قزوین جدا کرد و بیماری‌زایی آن را در گلخانه به اثبات رسانید. *ارشاد* (Ershad, 1971)، عامل بیماری را *P. citrophthora* تشخیص داد. *صابری ریسه و همکاران* *P. drechsleri* را به‌عنوان گونه‌ی غالب در مناطق مختلف رفسنجان معرفی کردند (Saberi-Riseh *et al*., 2004). *بنی‌هاشمی و مرادی* (2004) نیز با مطالعه فراوانی گونه‌های مختلف *Phytophthora* در استان‌های کرمان و فارس نشان دادند که از نظر فراوانی به‌ترتیب گونه‌های *P. drechsleri*، *P. cryptogea* و *P. citrophthora* دارای مقام اول تا سوم می‌باشند. در مواردی که روش‌های معمول کنترل بیماری‌های خاک‌برد از قبیل استفاده از قارچ‌کش، ارقام مقاوم و روش‌های زراعی نتوانسته است به‌طور موفقیت آمیز مسائل بیماری‌های ریشه را حل نماید استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به مشکلات متعددی که در زمینه کنترل بیمارگر پوسیدگی طوقه و ریشه پسته وجود دارد، استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید بخصوص باکتری‌های آنتاگونیست مورد توجه محققین قرار گرفته است. یکی از گروه‌های مهم میکروبی فراریشه که ریشه را کلنیزه می‌کنند و اثرات مفیدی روی رشد آن دارند توسط *کلوپر و اسکروج* در سال 1978 ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR)[1] نامیده شدند (Podile and Kishore, 2006). سودوموناس‌ها گروهی از باکتری‌های محرک رشد گیاه هستند که کارایی آن‌ها در کنترل تعدادی از بیماری‌های گیاهی ایجاد شده به‌وسیله‌ی بیمارگرهای خاک‌برد به‌خوبی مشخص شده است، این باکتری‌ها ترشحات ریشه را برای تولید متابولیت‌ها مورد استفاده قرار می‌دهند (Haas and Défago, 2005). باکتری‌های محرک رشد گیاه، توسط چند نوع سازوکار مختلف از جمله: تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی، ترشح سیدروفورهایی مانند زودوباکتین[2] و پیووردین[3]، تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی چون 2، 4- دی استیل فلوروگلوسینول[4]، فنازین[5]، پیرول‌نیترین[6] و پیولوتئورین[7]، تولید متابولیت‌های ضدقارچی با وزن مولکولی پایین پایین مانند سیانیدهیدروژن[8] صدمات وارده به گیاهان از سوی بیمارگرهای گیاهی را به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم در گیاه کاهش داده یا مهار می‌کنند (Chet *et al*., 1990). *ولر و کوک* بیان کردند که آنتی‌بیوتیک‌های اولیه که به‌وضوح در بیوکنترل بیمارگرها توسط سودوموناس‌های فلورسانت نقش داشتند از مشتقات فنازین بودند و کنترل بیماری پاخوره به‌وسیله‌ی سویه‌های *Pseudomonas fluorescens 2-79* و *P. aureofaciens 30-84* را موجب شدند (Weller and Cook, 1983). *صابری-ریسه و همکاران* بیوکنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه پسته ناشی از قارچ *P. citrophthora* را با استفاده از جدایه‌هایی از سودوموناس و باسیلوس مورد بررسی قرار دادند و دو جدایه 8 و

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria
[2] Pseudobactin
[3] Pyoverdin
[4] 2,4-Diactyle phloroglucinol (2,4- DAPG)
[5] Phenazin
[6] Pyrrolnitrin
[7] Pyoluteorin
[8] Hydrogen cyanid (HCN)

291 سودوموناس آنتاگونیست‌های موثر در تولید سیانید هیدروژن معرفی شدند (Saberi-riseh *et al*., 2004). در این تحقیق اثر آنتاگونیستی سودومونادهای فلورسنت جدا شده از فراریشه درختان سالم و آلوده به گموز پسته از مناطق رفسنجان و انار برای بیوکنترل *Phytophthora drechsleri* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جدایه بیمارگر

در این پژوهش برای بررسی اثر جدایه‌های باکتری روی عامل بیماری گموز پسته، جدایه‌ی PD1 قارچ *P. drechsleri* (گونه غالب) از موسسه تحقیقات پسته رفسنجان تهیه گردید و در تمام مراحل انجام کار به‌منظور نگهداری و تجدید کشت این جدایه‌ها، از محیط کشت عصاره ذرت (Corn Meal Agar) شرکت مرک استفاده گردید.

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های آنتاگونیست

جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت از فراریشه گیاهان پسته سالم و آلوده به گموز از مناطق رفسنجان و انار به روش تهیه رقت‌های سریالی خاک انجام شد بدین صورت که از عصاره خاک تا رقت 10^{-5} تهیه و از تمامی رقت‌ها روی محیط (King B) کینگ‌ب (King *et al*., 1954) کشت گردید و سپس تشتک‌های پتری به مدت 48 ساعت در انکوباتور در دمای 28 درجه سانتیگراد قرار داده و پس از این مدت تشتک‌های پتری از انکوباتور خارج و در یخچال نگهداری شد کلنی‌های سودوموناس برای خالص‌سازی مجدداً روی محیط کشت King B کشت گردید پس از اطمینان از خلوص باکتری‌ها برای نگهداری طولانی مدت نمونه‌ها، سوسپانسیونی از کشت جوان باکتری‌ها در محیط کشت مایع LB[1] به همراه 20 درصد گلیسرول، درون تیوپ‌های کوچک 2 ml تهیه شد و در ظروف مخصوص، در فریزر با دمای $-80^{o}C$ قرار داده شدند.

شناسایی جدایه‌های باکتری

تعیین گرم جدایه‌های باکتری با هیدروکسید پتاسیم 3% (Schaad *et al*., 2001) و آزمون تولید رنگدانه فلورسانت روی محیط کشت King B انجام شد. باکتری‌ها روی این محیط کشت داده شدند و پس از 24 ساعت تولید رنگدانه با استفاده از تابش نور ماورابنفش بررسی شد.

کشت متقابل جدایه‌های باکتری با *P. drechsleri*

بدین منظور چهار نقطه با فاصله یکسان از مرکز تشتک پتری تعیین و در سه نقطه باکتری‌ها با تماس نوک لوپ در آن‌ها کشت شدند و در نقطه چهارم، آب مقطر سترون با محیط تماس داده شد. سپس در مرکز تشتک پتری قرصی به قطر پنج میلی‌متر از محیط کشت CMA حاوی کشت سه روزه *P. drechsleri* قرار داده شد و تشتک‌ها در انکوباتور با دمای 25 درجه سانتیگراد نگهداری و پس از هفت روز بررسی شدند (Virgen-Calleros *et al*., 1996)، درصد بازدارندگی جدایه‌های باکتری از فرمول زیر محاسبه شد (Etebarian *et al*., 2005):

[1] Luria-Betani Media

فرمول1 $n = \frac{(a-b)}{a} \times 100$

n= درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ

a= قطر پرگنه قارچ در شاهد

b= قطر پرگنه قارچ در تیمار

بررسی در شرایط گلخانه

تهیه مایه تلقیح *P. drechsleri*

آلوده سازی نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند با استفاده از بذور شاهدانه انجام گرفت (Banihashemi, 2004). شاهدانه‌ها به مدت 20 دقیقه جوشانده شدند و پس از اینکه روی کاغذ صافی سترون کاملاً خشک گردیدند روی پرگنه‌های سه روزه قارچ روی محیط CMA قرار گرفتند وتشتک‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس 30 عدد شاهدانه‌ی کلونیزه شده (سه گرم مایه تلقیح) در اطراف طوقه‌ی هر گیاه قرار داده شدند.

تهیه مایه تلقیح جدایه‌های باکتریایی

عامل بیوکنترل با غلظت 1×10^9 CFU[1] به ازای هر گرم خاک در اطراف طوقه‌ی گیاه اضافه شد (Kim *et al.*, 1997). برای تهیه غلظت 10^9 ابتدا باکتری مورد نظر را بر روی محیط King B کشت داده و پس از 24 ساعت یک تک کلونی از انتخاب و به یک لوله آزمایش حاوی NB[2] اضافه گردید و به مدت سه تا چهار ساعت بر روی شیکر با سرعت 150 دور در دقیقه قرار داده شد و پس از آن 10 میلی‌لیتر از آن به نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد (10^{-1}) و تا رقت 10^{-7} تهیه گردید و سپس 100 میکرو لیتراز این رقت با سمپلر برداشته شد و روی محیط King Bبا لوپ شیشه‌ای کشت داده شد و پس از 24 ساعت کلنی‌ها شمارش گردید و با توجه به بررسی‌های اولیه استفاده از اسپکتروفوتومتر جمعیت هر کلنی باکتری در حدود 10^9 در نظر گرفته شد.

تیمار خاک با باکتری

با توجه به این‌که برای هر گرم خاک 1×10^9 CFU باکتری مورد نیاز بود ابتدا بر اساس وزن خاک، جمعیت مورد نیاز باکتریایی تعیین شد و بر اساس حجم و وضعیت رطوبتی گلدان‌ها، مقدار آب متناسب برای آن مشخص شد به نحوی که پس از افزودن این مقدار آب، از زیر گلدان بیش از چند قطره خارج نشود. برای تهیه این غلظت باکتری از فاکتور رقت[3] استفاده شد.

[1] Colony Forming Unit
[2] Nutrient Broth
[3] Dilution factor

بررسی اثر جدایه‌های باکتری روی *P. drechsleri* در گلخانه روی نهال‌های پسته

جدایه‌هایی که واجد هاله بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر *P.drechsleri* بودند، در شرایط گلخانه روی نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند (پایه غالب مورد استفاده) مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار با هفت تیمار در ناحیه طوقه بر روی نهال پسته به صورت آغشته‌سازی خاک آلوده به *P. drechsleri* با باکتری‌های آنتاگونیست انجام گرفت. در این تیمار همزمان مایه عامل بیماری به صورت 30 عدد شاهدانه کلونیزه شده و عامل بیوکنترل به صورت سوسپانسیون باکتری برای هر کدام از جدایه‌ها تهیه شد و برای هر جدایه با سه تکرار در اطراف طوقه گیاه اضافه شد. شدت بیماری براساس مقیاس صفر تا سه مشخص گردید که در این مقیاس 0 = گیاهان سالم، 1 = علائم بیماری روی طوقه قابل مشاهده بود (≥1 mm)، 2 = علائم بیماری روی طوقه و علائم پژمردگی بر روی اندام‌های هوایی قابل مشاهده بود و 3 = گیاهان کاملاً خشک شدند.

درصد بیماری‌زایی (Disease Severity) از فرمول زیر محاسبه شد (Thomas *et al*., 1987; Alaei *et al*., 2009; De Backer *et al*., 2011).

فرمول 2

$$DS\% = \frac{((0 \times n0) + (1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3)}{3 \times (n0+n1+n2+n3)} \times 100$$

ni = تعداد گیاهچه‌های آلوده مورد ارزیابی در نمره‌دهی i

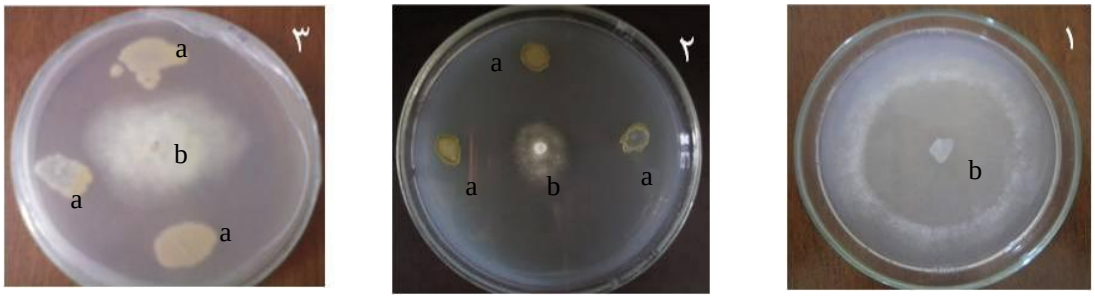
نمونه‌های شاهد نیز هر کدام با سه تکرار روی نهال پسته رقم بادامی ریز زرند از طریق 1- آغشته‌سازی خاک سترون با *P. drechsleri* و 2- خاک سترون بدون تیمار عامل بیماری و باکتری آنتاگونیست بررسی شدند. در تمام موارد فوق رطوبت نسبی با کشیدن سلفون اطراف نهال‌ها به مدت 24 ساعت حدود 90 درصد و دما حدود 25 درجه سانتی‌گراد تعیین شد. برای تامین نور مورد نیاز یک لامپ مهتابی روشن گذاشته شد و نهال‌ها هر دو روز یک بار آبیاری شدند. به‌منظور اطمینان از حضور *P. drechsleri* در خاک و بافت گیاه، بیمارگر از خاک با تله برگ مرکبات و از بافت آلوده با کشت روی محیط PDA جداسازی شد و برای اطمینان از حضور عامل بیوکنترل جداسازی جدایه‌های باکتری از خاک انجام شد. وزن خشک گیاهان تیمار شده با جدایه‌های باکتریایی، یک ماه پس از تلقیح بررسی شد. برای هر تیمار میانگین سه تکرار وزن خشک ریشه با شاهد مقایسه شدند. کلیه تیمارها با نرم-افزار SAS بررسی شدند.

نتایج

تعداد 75 جدایه باکتریایی در شهرستان‌های رفسنجان و انار از فراریشه‌ی درختان پسته جمع آوری گردید.

اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری روی *P. drechsleri* بر اساس روش کشت متقابل در شرایط آزمایشگاه

هفت درصد از 75 جدایه باکتریایی جمع آوری شده دارای هاله بازدارندگی کمتر از سه میلی‌متر، سه درصد بازدارندگی بیش از پنج میلی‌متر و 90 درصد جدایه‌ها فاقد هاله‌ی بازدارندگی در مقابل بیمارگر بودند. پنج جدایه باکتری A41, B21, B13, A17,R14 روی محیط PDA هاله‌ی بازدارندگی کمتر از سه میلی‌متر را ایجاد کرد که کاهش تراکم میسلیوم‌ها در ناحیه اطراف کلنی‌های باکتریایی مشهود بود. در این میان، جدایه آنتاگونیست A16 هاله-ی بازدارندگی به قطر پنج میلی‌متر ایجاد کرد که درصد بازدارندگی 46 درصد را نشان داد. جدایه آنتاگونیست R41 پس از یک هفته رشد در دمای 25 درجه سانتیگراد روی محیط PDA هاله‌ی بازدارندگی بیشتر از 15 میلی‌متر ایجاد کرد که بیشترین میزان بازدارندگی را داشت و درصد بازدارندگی آن با استفاده از فرمول1، 84/6 درصد محاسبه شد (شکل 1، جدول 1). 7 جدایه‌ی R41، A16، A17، R14، A41، B21 و B13 که دارای بیشترین خاصیت آنتاگونیستی بودند برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند.



شکل 1- میزان تاثیر جدایه‌های باکتری (a) روی شبه‌قارچ (b) *P. drechsleri*، میزان رشد پرگنه *P. drechsleri* **پس** از یک هفته در نمونه شاهد (1)، میزان بازداری رشد پرگنه *P. drechsleri* پس از یک هفته به وسیله‌ی جدایه R41 (2)، میزان بازداری رشد پرگنه *P. drechsleri* پس از یک هفته به وسیله‌ی جدایه A16 (3)

جدول 1- بررسی درصد بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست از رشد *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاهی

جدایه	درصد بازدارندگی
R41	≥15 mm
A16	≥5 mm
A17	3mm≥
A41	3mm≥
R14	3mm≥
B21	3mm≥
B13	3mm≥

شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

آزمون تست گرم با هیدروکسید پتاسیم[1] 3% انجام شد و 7جدایه منتخب گرم منفی بودند. آزمون تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King B انجام شد و با نور uv بررسی شد، که جدایه R41 بیش‌ترین میزان تولید رنگدانه را روی محیط کشت King B داشت.

بررسی اثر جدایه‌های آنتاگونیست در کنترل *P. drechsleri* در شرایط گلخانه

گیاهان تیمار شده با جدایه‌های آنتاگونیست و *P. drechsleri* یک ماه پس از تلقیح بررسی شدند، جدایه-های باکتریایی A41, B21, B13, A17,R14 تاثیری در کاهش شدت بیماری‌زایی *P. drechsleri* در گلخانه نداشتند و درصد بیماری‌زایی در این تیمارها 100% بود و گیاهان در این تیمارها همزمان با تیمارهای شاهد در هر دو آزمون آزمایش 2خشک شدند. نتایج در تیمار جدایه‌های باکتریایی A16 و R41 در دو آزمون تفاوتی نداشتند و درصد بیماری‌زایی در تیمارهای A16 و R41، به‌ترتیب 77 و 44 درصد برآورد شد. در گیاهان تیمار شده با *P. drechsleri* و جدایه R41 پس از یک ماه علائم پوسیدگی روی طوقه نهال‌ها ظاهر شد (شکل 2، جدول 2).

شکل 2- گیاهان تیمار شده یک ماه پس از آلودگی: گیاهان تیمار شده با *Phytophthora drechsleri* (ردیف بالا)، گیاهان تیمار شده با جدایه باکتری R41 و *Phytophthora drechsleri* (ردیف پایین).

[1] KOH

تاثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر وزن خشک ریشه

در تیمارهایی که با جدایه R41 که واجد بیشترین هاله بازدارندگی روی محیط PDA و کمترین شدت بیماریزایی در گیاهان مورد بررسی بود تلقیح شده بودند، بیشترین وزن خشک ریشه در سطح 5% مشاهده شد. در واقع این جدایه خاصیت تحریک کننده رشد گیاه را داشته است و موجب افزایش ریشه‌های فرعی شده است. کمترین وزن خشک ریشه در تیمارهایی دیده شد که با جدایه‌ی B13 تلقیح شده بودند (جدول 3، شکل 3).

جدول 2- بررسی درصد بیماری‌زایی گیاهان تیمار شده با جدایه‌های باکتری و *P. drechsleri* روی نهال های پسته رقم بادامی ریز زرند

تیمار جدایه‌های باکتری و *P. drechsleri*	مقیاس شدت بیماریزایی	درصد بیماریزایی
R41	1	44
A17	3	100
A41	3	100
R14	3	100
B21	3	100
A16	2	77
B13	3	100
Control	0	0
Control Fungi	3	100

جدول 3- بررسی تاثیر جدایه‌های باکتری بر میزان وزن خشک ریشه نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند. تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند از لحاظ آماری در سطح 5% آزمون دانکن تفاوت معنی‌دار ندارند.

تیمار	میانگین وزن خشک ریشه	گروه‌بندی آماری
R41	3/75	a
A17	3/38	ab
A41	3/06	abc
R14	2/98	abc
B21	2/7	bc
A16	2/59	bc
B13	2/47	c
Control	2/6	bc

شکل 3-بررسی اثر جدایه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر ریشه‌زایی نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند. جدایه B13 و شاهد (1) و جدایه R41 و شاهد (2).

بحث

کنترل پوسیدگی ریشه در گیاهان مختلف توسط عوامل میکروبی متعددی گزارش شده است (Pal *et al*., 2001، Kishore *et al*., 2005، Fernando *et al*., 2007). در این تحقیق 75 جدایه باکتری از فراریشه پسته جدا و خالص‌سازی شد که از این میان جدایه A16 و R41 به ترتیب با اعمال بازدارندگی 46 و 84/6 درصد، توانایی آنتاگونیستی خوبی را علیه شبه‌قارچ *P. drechsleri* در آزمایشگاه نشان دادند که این توانایی وابسته به متابولیت‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها از جمله تولید ترکیبات فعال ضد قارچی است. *احمدزاده و همکاران* (2006) توان بازدارندگی 47 استرین از سودوموناس‌ها را علیه *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Pythium* sp.، *P. nicotianae* و *Fusarium* sp. در آزمایشگاه بررسی کردند و نشان دادند که به ترتیب 76/59، 97/87و 17 درصد استرین‌ها تولید پروتئاز، سیدروفور و سیانیدهیدروژن کردند و استرین‌های CHA0 و P-48 بیشترین میزان بازدارندگی علیه *P. nicotianae* داشتند.

واصبی و همکاران (2009) کنترل بیماری پوسیدگی زغالی سویا با عامل *Macrophomina phaseolina* را در آزمایشگاه با 280 ایزوله‌ی باکتری انجام دادند که هفت جدایه *Bacillus* spp.، یک جدایه *Pantoea agglomerans*، یک جدایه *P. fluorescens* biov.I بازدارندگی بالای 50 درصد را علیه عامل بیماری در پلیت‌ها داشتند و جدایه *P. fluorescens* biov.I توانایی تولید ایندول استیک اسید را داشته است.

احمدی‌فر و همکاران (2006) تاثیر متابولیت‌های فرار استرین‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* را در کاهش رشد قارچ *Verticillium dahlia* گزارش کردند. از جمله ترکیبات فراری که توسط جدایه‌های *P. fluorescens* تولید می‌شود می‌تواند سیانید هیدروژن باشد که در بررسی‌های انجام شده توسط کاستریک و کاستریک (Castric and Castric, 1983) تولید آن توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنس به اثبات

رسید و همچنین *نادین و همکاران* (2010) یکی از مهم‌ترین سازوکارهای کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه را تولید سیانیدهیدروژن معرفی کردند.

جدایه‌های باکتری انتخاب شده در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند که درصد بیماری‌زایی در نهال‌های تیمار شده با جدایه باکتری‌های A41, B21, B13, A17,R14، 100 درصد بود ولی درصد بیماری‌زایی در گیاهان تیمار شده با دو جدایه باکتری A16 و R41 به‌ترتیب 77 و 44 درصد برآورد شد، نتایج *هس و دفاگو* (Haas and Défago, 2005) نشان داد که در تحریک رشد گیاه یا سرکوب بیماری به وسیله‌ی سودوموناس‌ها در گلدان‌ها در گلخانه کمتر از 5% استرین‌های انتخاب شده نتایج مثبت داشته‌اند و همچنین کلنیزه کننده‌ی قوی ریشه میکروارگانیسمی است که به فضای میان سلولی لایه‌ی اپیدرم و بافت کورتکس نفوذ کرده و یا محکم به سطح ریشه می‌چسبد و با شستن شدید نیز باقی می‌مانند و از ترشحات ریشه به عنوان منبع کربنی برای تولید متابولیت‌های ضد قارچی استفاده می‌کند. نتایج *هولتبرگ و همکاران* (Hultberg *et al*., 2008) نشان داد که سودوموناس فلورسنت در کشت‌های هیدروپونیک 26% بازدارنده رشد *Pythium ultimum* و 9% بازدارنده رشد *F. oxysporum* بودند. همچنین *شهیدی بونجار و همکاران* (2006) در گلخانه با استفاده از باکتری‌های اکتینومیست سعی در کنترل *P. drechsleri* نمودند. در آن پژوهش از 130 جدایه باکتری جداسازی شده، 12 جدایه خاصیت بازدارندگی علیه قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه داشتند و در گلخانه توانسته‌اند قارچ عامل بیماری را به خوبی کنترل کنند. *ترانه و همکاران* (Thrane *et al*., 2000) تولید متابولیت‌های ثانویه در سودوموناس‌ها را بازدارنده رشد عوامل بیماری‌زا دانست و این‌که ویسکوسینامید تولید زئوسپور اوومیست‌ها را کاهش می‌دهد. *ولر* (Weller, 2007) نشان داد که بیشتر استرین‌های *P. fluorescens* تولید Diacetyl phloroglucinol می‌کنند. *هوول و استیپانوویک* (Howell and stipanovic, 1980) و همچنین *مورهوفر و همکاران* (Maurhofer *et al*., 1995) پیولوتئورین را یک سم علیه *Pythium ultimum* و سایر پاتوژن‌های خاک‌برد می‌دانند. استفاده از باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک به طور مکرر توصیه شده است، زیرا از نظر ژنتیکی و بیوشیمیایی بیشتر آنالیز شده‌اند. از سوی دیگر تولید انبوه باکتری‌ها یا تولیدات باکتریایی نسبت به عوامل قارچی آسان‌تر بوده و لذا توسعه و پیشرفت عوامل کنترل کننده باکتریایی نسبت به عوامل قارچی خیلی بیشتر بوده است (Shoda, 2000). بر اساس نتایج این آزمایش، با استفاده از باکتری‌های سودوموناس می‌توان شدت بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه پسته ناشی از شبه‌قارچ *Phytophthora* spp. را کاهش داد. کاربرد جدایه‌های موثر باکتری سودوموناس علاوه بر کاهش شدت بیماری باعث بهبود رشد گیاه با افزایش ریشه‌های فرعی گیاه شدند. *اشرف‌الزمان و همکاران* (2009) استفاده از PGPR ها در کشاورزی را به عنوان روشی جایگزین برای کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و مکمل‌ها در راستای جلوگیری از آلودگی محیط زیست در حال افزایش بیان کردند. بنابراین کاربرد این باکتری‌ها می‌تواند راه مناسبی برای کاهش مصرف سموم، کودهای شیمیایی و حفظ محیط زیست انسان باشد اما از آن‌جایی‌که در شرایط مزرعه، عوامل محیطی زنده و غیرزنده بسیاری بر عملکرد این میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار است لذا توصیه می‌شود آن‌ها به صورت سوسپانسیون‌های باکتریایی با حامل‌های معینی (تالک، پیت، ورمی‌کولیت، آلجینات و ...) تثبیت شده و به صورت فرمولاسیون‌هایی برای کاربرد

آسان، سهولت حمل و نقل، نگهداری طولانی مدت، حفظ قدرت حیات و افزایش کارایی در مزرعه و تجاری‌سازی مورد استفاده قرار گیرند.

References

1. Ahmadifar F, Rustae A, Shahriari D and Khodakaramian, Gh. 2006. Biological control of cucumber wilt disease caused by *Verticillium dahliae* by using isolates of *Bacillus* and *Pseudomonas*. Agricultural research 6: 65–78
2. Ahmadzadeh M, Afsharmanesh H, Javan-Nikkhah M and Sharifi-Tehrani A. 2006. Identification of some molecular traits in fluorescent Pseudomonads with antifungal activity. Iranian Journal of Biotechnology 4: 245–253.
3. Alaei H, Baeyen S, Maes M, Höfte M and Heungens K. 2009. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum* x *morifolium* through conventional and real-time PCR. Journal of Microbiological Methods 76: 136–145.
4. Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque MA and Islam MZ. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancementof rice growth. African Journal of Biotechnology 8: 1247–1252.
5. Banihashemi Z and Moradi M. 2004. The frequency of isolation of *Phytophthora* spp. from crown and root of pistachio nut tree and reaction of the crown and root to the causal agent. Iranian Journal of Plant Pathology 40: 57–75 (In Farsi).
6. Banihashemi Z. 2004. A method to monitor the activity of *Phytophthora* spp. in the root zone of *Pistacia* spp. Phytopathology 43: 411–414.
7. Castric KF and Castric P. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 45: 701–702.
8. Chet I, Ordentligh R, Shapira R and Ooenheim A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. Plant and Soil 129: 85–92.
9. De Backer M, Alaei H, Van Bockstaele E, Roldan-Ruiz I, Van Der Lee T, Maes M and Heungens K. 2011. Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of *Chrysanthemum* x *morifolium*. European Journal of Plant Pathology 130: 325–338.
10. Ershad D. 1971. Beitrag zur Kenntnis der Phytophthora. Arten in Iran und ihrer phytopatologischen Bedeutung. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. 140 pp.
11. Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC and Sayler RJ. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Microbiology 51: 591–598.
12. Fernando D, Kievit TD, Zhang Y, Poritsanos N, Nakkeeran S, Habibian R and Ramarathnam R. 2007. Bacterial secondary metabolites in disease suppression and their mechanisms in plant health promotion. Paper presented at: Second Asian Congress of Mycology and Plant Pathology 'Microbial Diversity for Asian Prosperity'; 19–22 December; Hyderabad, India.
13. Fiddaman PJ and Rossall K. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal Applied Bacteriology 76: 395–405.
14. Haas D and Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews, Microbiology 3: 307–319.

15. Howell CR and Stipanovic RD. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopathology 70: 712–715.
16. Hultberg M, Bergstrand K-J, Khalil S and Alsanius B. 2008. Characterization of biosurfactant-producing strains of fluorescent pseudomonads in a soilless cultivation system. Antonie Van Leeuwenhoek 94: 329–334.
17. Kim DS, Weller DM and Cook RJ. 1997. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R$_{12}$ and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN$_{10}$ in the rhizosphere of wheat. Phytopathology 87:559–564.
18. King EO, Ward MK and Paney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44: 301–307.
19. Kishore GK, Pande S and Podile AR. 2005. Biological control of collar rot disease with broad- spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. Canadian Journal of Microbiology 51: 123–132.
20. Maurhofer M, Keel C, Haas D and De´fago G. 1995. Influence of plant species on disease suppression *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Journal of Plant Pathology 44: 40–50.
21. Nadine J, Coste De V, Gadkar J and Filion, M. 2010. *Verticillium dahlia* alters *Pseudomonas spp*. populations and HCN gene expression in therhizosphere of strawberry. Journal of Microbiology 56: 906–915.
22. Pal KK, Tilak KVBR, Saxena AK, Dey R and Singh CS. 2001. Suppression of maize root disease caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliform* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiology Research 156: 209–223.
23. Podile AR and Kishore GK. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. pp. 155–159. In: SS Gnanamanickam (eds). Plant-associated bacteria. Dordrecht, Netherlands: Springer.
24. Saberi-Riseh R, Hajieghrari B, Rouhani H and Sharifi-Tehrani A. 2004. Effects of inoculum density and substrate type on saprophytic survival of *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of gummosis (crown and root rot) on pistachio in Rafsanjan, Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 69: 653–659.
25. Schaad NW, Jones JB and Chum W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd ed.). American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 373 p.
26. Shahidi Bonjar GH, Barkhordar B, Pakgohar N, Aghighi S, Biglary S, Rasid Farrokhi P, Aminaii M, Mahdavi MJ and Aghelizadeh A. 2006. Biological control of *Phytophthora drechsleri* Tucker, The causal agent of pistachio gummosis, under greenhouse conditions by use of Actinomycetes. Journal of Plant Pathology 5: 20–23.
27. Sharif Gh and Taghizadeh F. 1960. The disease that is drying pistachio trees. Tehran, Iran: Publication of Agriculture Ministry Extension Organization. 7 p.
28. Shoda M. 2000. Bacterial control of plant disease. Jurnal of Bioscience and Bioengineering 89: 515–521.
29. Thomas CE, Indaba T and Cohen Y. 1987. Physiological specialization in *Pseudoperonospora cubensis*. Phytopathology 77: 1621–1624.
30. Thrane C, Nielsen TH, Nielsen MN, Sorensen J and Olsson S. 2000. Viscosinamide *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology 33: 139–146.

31. Vasebi Y, Alizadeh A and Safaie N. 2009. Antagonistic mechanisms of bacterial antagonists of soybean charcoal rot in vitro. Journal of Agricultural Science 19: 55–69.
32. Virgen-Calleros G, Saazar- Godoy M, Olalde- Protagal V, Aguilera- Gomez L and Hernadez- Delgadillo R. 1996. In vitro inhibition of *Fusarium* and *Verticillium* sp. with *Bacillus circulans*. pp. 206–207. In: T Wenhua, RJ Cook and A Rovira (eds). Advances in Biological Control of Plant Disease. Beijing: China Agricultural University Press.
33. Weller DM and Cook RJ. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with Fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73: 463–469.
34. Weller DM, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, De La Fuente L, Blouin Bankhead S, Allende Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV and Thomashow LS. 2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biology 9: 4–20.
35. Weller DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26: 379–407.

The study on biocontrol of *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of pistachio gummosis using some fluorescent Pseudomonads isolated from pistachio rhizospher

S. Daroodi[1], H. Alaei*[1], R. Saberi-Riseh[1], A. H. Mohammadi[2], M. Gorji[3]

Abstract

Phytophthora crown and root rot (Gummosis) is one of the most important diseases of pistachio trees in Iran for management of which various methods such as biocontrol have been recommended. Fluorescent Pseudomonads with the ability of producing a wide range of secondary metabolites such as different antibiotics and plant growth regulatory materials are among the most effective soil borne bacteria in biological control of plant diseases. Antagonistic fluorescent Pseudomonads were isolated from rhizosphere of infected (Gummosis) and healthy pistachio trees and their ability to control *Phytophthora dreschleri* was evaluated. A total of 75 *Pseudomonas* isolates emitting fluorescence in King B medium were obtained. In preliminary *in vitro* screening, seven isolates (R41, A16, A17, R14, A41, B21 and B13) showed inhibitory effect on mycelial growth of *P. drechsleri* based on bilateral culture test in PDA medium. The most inhibitory effect were obtained by R41 (≥15mm) and A16 (≥5mm) isolates which were selected for greenhouse tests on pistachio seedlings. The results of the greenhouse studies showed that R41 isolate exhibited greatest ability to reduce the disease severity.

Keywords: Antifungal compounds, biological control, *Phytophthora*, pistachio, Pseudomonads.

[1]- Former MSc student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.
[2]- Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.
[3]- Research Assistant Professor, Department of Plant Protection, Pistachio Research Institute of Iran, Rafsanjan, Iran.
[4]- Research Instructor, Plant Protection Management, Jihad-e-Agriculture, Anar, Anar, Iran.
*Corresponding author: hossein.alaei@vru.ac.ir