بررسی تاثیر آنتاگونیستی باکتریهای فرموله شده در کودهای زیستی فسفاته روی عامل بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند و پوسیدگی خشک سیب زمینی

حسن مومنی[۱]، حجت الله ربانی نسب[۲] و فهیمه نظری[۳]
۱-موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور hm55gon@yahoo.com ۲-مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان شمالی ۳-دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

قسمت عمده ای از کودهای فسفاته که هر ساله به زمینهای زراعی داده می شود به فرم غیرقابل استفاده برای گیاه در آمده و جذب کولوئیدهای خاک می گردد. در طی سالیان متمادی میزان زیادی از این فسفاتهای غیرقابل استفاده در داخل خاک انباشته شده که گیاه نمی تواند از آنها بهره مند شود. باکتریهای موجود در کودهای زیستی فسفاته فسفات را از فرم غیر قابل استفاده برای گیاه به فرم قابل جذب در آورده و در دسترس گیاه قرار می دهند و در مواردی میزان مصرف کودهای فسفاته در زمین به نصف تقلیل می یابد که از نظر اقتصادی به نفع کشاورز و کشور است. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر آنتاگونیستی استرینهای P5 و P13 از باکتری *Psedomonas putida* فرموله شده در این کودهای زیستی روی دو عامل عمده پوسیدگی و بوته میری چغندرقند و همچنین پوسیدگی خشک سیب زمینی می باشد. از گروههای آناستوموزی AG4 و AG2-2 که به ترتیب عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندر هستند بیماریزاترین جدایه ها به عنوان نماینده انتخاب گردیدند.در مورد عامل مولد پوسیدگی خشک سیب زمینی بیماریزاترین جدایه با تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ روی غده های سیب زمینی به دست آمد. بررسی های بازدارندگی از رشد جدایه های قارچی ، تولید سیانید هیدروژن ، تولید پروتئاز ، تولید سیدروفور، تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی سترون شده در جلوگیری از رشد و تاثیر ترکیبات فرارضد قارچی در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ، همگی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دهنده تاثیر اندک استرینهای باکتری روی دو عامل بیماریزای مورد استفاده در این تحقیق بود هرچند همین اثرات اندک بازدارندگی و کنترلی در مورد قارچ *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه چغندر قند بیشتر از *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* عامل پوسیدگی خشک سیب زمینی ، آشکار بود.

کلمات کلیدی : کودهای زیستی فسفاته ، پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه چغندرقند، پوسیدگی خشک سیب زمینی

مقدمه

کودهای زیستی فسفاته جهت آزاد سازی فسفات ذخیره شده در خاک و تبدیل آن به فرم قابل جذب برای گیاه استفاده می گردند. این عمل توسط باکتریهای آزاد کننده فسفات انجام می گیرد که در کودهای زیستی فسفاته فرموله شده اند. برخی از این استرینهای باکتریایی به کاررفته شامل استرینهای P5 و P13 از باکتری *P. putida* می باشد.

در حال حاضر برخی از کودهای زیستی فسفاته در محصولات زراعی و باغی مورد استفاده قرار می گیرد و نتایج اثربخشی نیز از نظر تامین نیازهای غذایی خاک به همراه داشته است. اثرات آزاد کنندگی فسفات در برخی از این کودها مربوط به وجود دو استرین P5 و P13 از باکتری *P. putida* می باشد. این موضوع که مصرف کودهای حاوی این استرینهای باکتری ممکن است همزمان موجب کنترل برخی از بیماریهای خاکزی رایج در محصولات کشاورزی نیز بشود همواره بصورت یک پرسش جدی مطرح بوده است. جهت بررسی این موضوع کارایی دو استرین باکتری فوق الذکر در کاهش توسعه بیماری پوسیدگی و مرگ گیاهچه چغندرقند و همچنین پوسیدگی خشک سیب زمینی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت اثربخشی قابل قبول، مصرف این کودها در مناطقی که میزان خسارت وارده از طرف این عوامل زیاد است نیز توصیه گردد.

بیماری پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه چغندرقند از جمله بیماریهایی است که توسط قارچ *R. solani* ایجاد می‌شود. قارچ می‌تواند موجب مرگ گیاهچه قبل از سبز شدن شود، ولی معمولاً گیاهچه‌ها را بعداز سبز شدن تحت تأثیر قرار می‌دهد.

بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب زمینی یکی از مهمترین عوامل خسارتزای سیب زمینی از زمان کاشت تا مرحله نگهداری در انبار می باشد.گونه های مختلف جنس فوزاریوم این بیماری را ایجاد می نمایند که گونه *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* یکی از فراوانترین و مخربترین عوامل بیماری زا است.

موادو روش

جمع آوری جدایه های قارچی و اثبات بیماریزایی آنها

جدایه های قارچ *R. solani* از مناطق عمده چغندرکاری استان خراسان شامل شهرستانهای بجنورد، تربت حیدریه، تربت جام، چناران، سبزوار (جوین)، شیروان، فریمان، مشهد و نیشابور جمع آوری شد . محیط کشت‌های مورد استفاده شامل PDA ، WA و نیز محیط کشت اختصاصی Ko and Hora agar (٦) بود. رنگ آمیزی هسته جهت تشخیص جدایه های چندهسته ای از دو هسته ای با کمک KoH ۳٪ و طبق روش Bandoni انجام شد(۲). تعیین گروه آناستموزی جدایه های قارچ طبق روش Carling و همکاران(٤) انجام گرفت. درصد فراوانی آمیزش بین هیف ها طبق روش Ogoshi محاسبه گردید(۹). جدایه‌های ریزوکتونیا که متعلق به گروههای آناستوموزی AG4 و AG2-2 بودند.

جدایه های قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* طی نمونه برداری از مزارع و انبارهای نگهداری سیب زمینی در استان خراسان جمع آوری شد. برای جداسازی قارچ از محیط کشت PDA و Nash- Snyder استفاده شد.

بررسی تاثیر استرینهای باکتری *P. putida* روی قارچ های *R. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi*

استرینهای P5 و P13 از باکتری *P. putida* به کار رفته در کودهای زیستی فسفاته به صورت خالص از شرکت سازنده کودهای زیستی فسفاته دریافت گردید. آزمایشهای مربوطه در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرارانجام گرفت و داده های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS(Version v.6) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروهبندی میانگینها با استفاده از آزمون دانکن عمدتا در سطح ۵٪ انجام شد. برای بررسی قدرت بازداری از رشد قارچ در شرایط آزمایشگاه از روش هاجدرن و همکاران(۵) استفاده شد.

تولید سیدروفور

برای بررسی تولید سیدروفور از روش Schewyn و Neilands (۱۰) استفاده شد. در این روش از محیط آبی رنگ CAS (Chrome Azurol S) استفاده شد که خود از ترکیب سه محلول مختلف به دست آمد.

تولید پروتئاز

به منظور بررسی توانایی آنزیم پروتئاز توسط باکتری ها از محیط Skim milk agar (SMA) مطابق روش Maurhofer وهمکاران (۸) استفاده شد. باکتری ها به صورت نقطه ای در پتری های حاوی محیط SMA کشت داده شدند ودر دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شدند. تشکیل یک هاله بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری ها نشانه فعالیت پروتئاز است.

تولید سیانید هیدروژن (HCN)

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش پیشنهادی Alstrom (۱) انجام شد. در صورت تولید HCN توسط باکتری های رشد یافته کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ اولیه زرد به کرم ، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و نهایتا آجری تغییر رنگ می یابند. رنگ کرم بین حداقل میزان تولید HCN و رنگ آجری حداکثر تولید HCN را نشان می دهد بر این اساس توان تولید HCNدر ٤ سطح مختلف مطابق جدول یک گروه بندی گردید.

جدول یک: درجه بندی سطوح تولید سیانید هیدروژن توسط استرین های باکتری *Psedomonas putida*

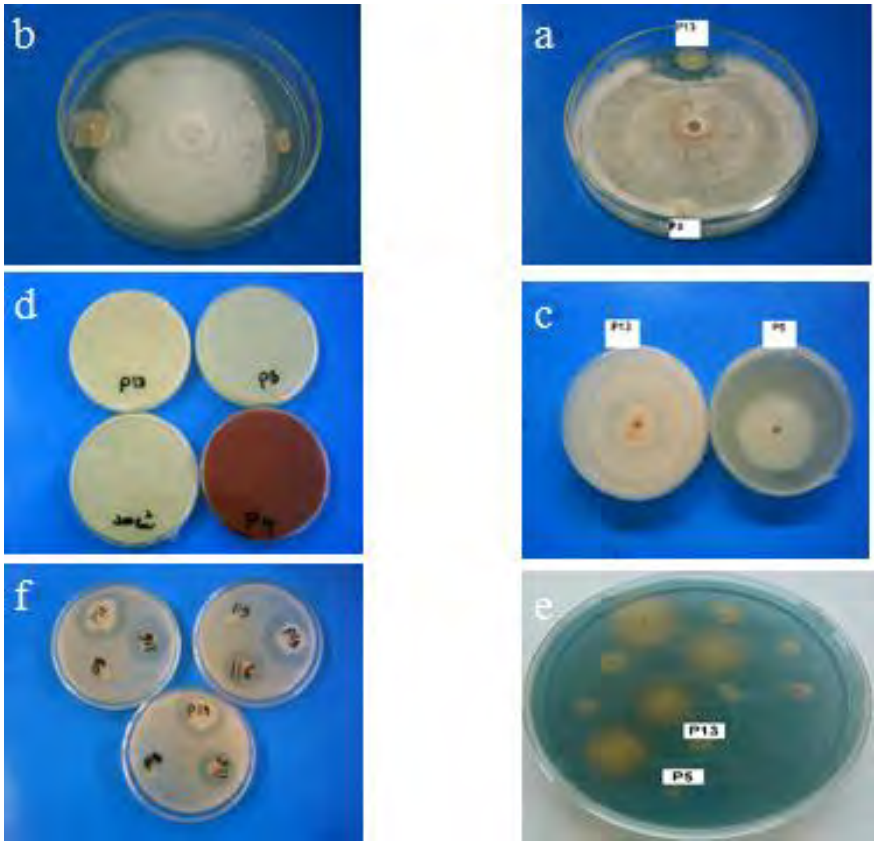
درجه بندی سطح سیانوژنی	رنگ کاغذ معرف	توان تولید HCN
۱	کرم	حداقل
۲	قهوه ای روشن	نسبتا کم
۳	قهوه ای تیره	نسبتا زیاد
٤	آجری	حداکثر

برای بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی از روش برگ (۳) استفاده شد.

در بررسی نقش ترکیبات فرارضد قارچی روی رشد قارچ های *R. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* مطابق روش Kraus و Loper (۷) عمل گردید.

نتیجه و بحث

در بررسی تأثیر استرینهای باکتری در جلوگیری از رشد جدایه های قارچهای بیماری‌زا (شکل ۱a و ۱b) مشاهده شد که استرین P13 از رشد کلنی قارچ *R. solani* ممانعت کرد اما علیه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* بازدارندگی ایجاد نکرد. هر دو استرین باکتری علیه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* هاله بازدارندگی مشخصی نداشتند.



شکل ۱: ایجاد هاله بازدارنده توسط استرین های باکتری *Psedomonas putida* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* (a) وقارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* (b) ، تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی(c)،توانایی تولید سیانید هیدروژن (d)،توانایی تولید سیدرفور(e) و توانایی تولید پروتئاز(f) توسط استرینهای باکتری آنتاگونیست

تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی سترون شده استرین های P13 و P5 در غلظت ۲۵٪ روی ممانعت از رشد میسلیوم قارچ *R. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* در سطح پنج درصد تفاوت معنی داری از خود نشان نداد. میانگین رشد کلنی قارچ *R. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* در حضور استرین P13 برابر با ۸۸ میلیمتر بود و تنها ۲٪ بازدارندگی نسبت به شاهد نشان داد. این مقدار در حضور استرین P5 برابر با ۸۹ میلیمتر برای *R. solani* و برابر با ۸۸ میلیمتر برای *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* بود.

تاثیر ترکیبات فرارضد قارچی در جلوگیری از رشد میسلیوم هر دو گونه قارچ (شکل ۱C) در هر دو استرین P13 و P5 نسبت به شاهد تفاوت معنی داری نشان داد. استرین P5 با ٦٦ درصد بازدارندگی نسبت به استرین P13 با ۸/۸ درصد اثر بیشتری در ممانعت از رشد میسیلیوم قارچ *R. solani* داشت. این مقادیر بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ برای استرین های P5 و P13 به ترتیب ٤٧/٧ ٪ و ۲۰٪ بود.

در این بررسی استرین P13 تولید سیدرفور کمی کرد اما استرین P5 توانایی تولید سیدرفور نداشت(۱e).نتایج نشان داد که استرین های P13 و P5 موجب تغییر رنگ کاغذ صافی در مقایسه با شاهد نشدند که نشان دهنده عدم تولید سیانید هیدروژن بود(۱d). فقط استرین P13 توانایی تولید پروتئاز را نشان داد . هاله ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری نشان دهنده تولید پروتئاز است(۱f).

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمونهای مختلف به نظر می رسد استرینهای P5 و P13 قدرت بازدارندگی بالایی روی جدایه های بیماریزای قارچ *R. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *tuberosi* نداشته باشند. هرچند این اثرات بازدارندگی روی

رایزوکتونیا چشمگیرتر است ولی نمی توان این استرینها را به عنوان آنتاگونیستهای قوی جهت کنترل قارچهای بیماریزا ریشه در چغندرقند و سیب زمینی توصیه کرد. اثرات کنترل کنندگی از رشد بیماریها که گاها به همراه استفاده کودهای فسفاته در مزارع مشاهده می گردد می تواند به دلیل اثر غیر مستقیم کود باشد زیرا این کودها با در اختیار قرار دادن میزان کافی عنصر فسفر و برطرف کردن احتیاجات غذایی ،گیاه را تا حدودی به عوامل بیماریزای مهمی از قبیل رایزوکتونیا و فوزاریوم مقاوم می سازد.

References:

1-**Alstrom, S.1987**. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant Soil. 102: 3-9.

2-**Bandoni, R.J. 1979**. Safranin a rapid nuclear stain for fungi . Mycologia. 71: 873-874.

3-**Berg, G., Ballin, G. 1995**. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. Phytopathology. 141: 99-110.

4-**Carling, D.E., Leiner,R.H., Kebler, K.M.1987**.Characterization of a new anastomosis group (AG9) of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 77:1609-1612.

5-**Hagedorn, C., Gould, W.D., Bradinelli, R.T. 1989**. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied Environmental Microbiology. 55:2793-2797.

6-**Ko, W.H., Hora,F.K .1971.** A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology. 61 : 707- 710.

7–**Kraus, J., Loper, J.E. 1992.** Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *pseudomonas fluorescens* pf-5 in biological control of pythium damping-off of cucumber.phytopathology. 82: 264-271.

8-**Maurhofer, M., Keel,C., Haas, D., Defago, G. 1995**. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. Plant pathology. 44: 40-50.

9-**Ogoshi A.1987**.Ecology and pathogenecity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Review Phytopathology. 25:125-143.

10-**Schwyn, B., Neilands, J.B. 1987**. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem.160: 47-56.

Abstract

The main part of phosphate fertilizers that are used in agricultural fields annually are transformed to a unusable form for plants and are absorbed to the soil. Throughout the years large amounts of these unusable phosphates are accumulated in the soil. Some bacteria in biological phosphorus fertilizers convert the unreachable form of phosphate to the usable form for plants. The objective of this study was to investigate the effects of P5 and P13 strains of *Psedomonas putida* that are formulated in some biological fertilizers in biological control of two important diseases including sugarebeet root rot and damping-off and also potato dry rot. The most virulent isolates from anastomosis groups including AG2-2 and AG4 were selected as representatives for biocontrol reactions. The most virulent isolate of the causal agent of potato dry rot was selected with inoculation of spore suspension on potato tubers. Results shows the low impact of the bacterium on pathogens, although even this low effects on growth inhibition and control was more considerable in *Rhizoctonia solani* comparing with *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi*.

Key words: biological phosphorous fertilizers, sugarbeet root rot and damping –off, potato dry rot