ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی

همایش ملی
ایده های نو در کشاورزی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

بررسی کنترل بیولوژیک عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* توسط *Pseudomonas fluorescens*

نیما خالدی*[۱]، جمیله ایرندگانی[۱]، مینا حسینی حاجی عبدال[۱]، مبینا هادی نژاد زرین آبادی[۱] و الهه صدیقی[۲]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه حشره شناسی و بیماری شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول: نیما خالدی، khnm13@gmail.com

چکیده

در این پژوهش اثرات آنتاگونیستی جدایه هایی از باکتری *Pseudomonas fluorescens* علیه قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* تحت شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای مورد بررسی قرار گرفت. جدایه P49 با ۵۳/۴۵ و جدایه P26 با ۶۸/۹۵ به ترتیب بیشترین درصد بازدارندگی در آزمون تاثیر مواد فرار و غیرفرار داشتند. از بین ۲۰ جدایه اثر آنتاگونیستی، پنج جدایه تحت شرایط گلخانه ای و به دو صورت آغشته سازی خاک و آغشته سازی ریشه و طوقه گیاهچه ها مورد بررسی قرار گرفت. تعامل بین جدایه های باکتری و قارچ عامل بیماری به صورت درصد جوانه زنی بذور، درصد افزایش طول گیاه، درصد افزایش وزن خشک و تر گیاه نشان داده شد. نتایج آزمون نشان داد که جدایه های مزبور اثرات آنتاگونیستی متفاوتی دارند. در شرایط گلخانه ای جدایه P49 در هر دو روش آغشته سازی بهتر از بقیه جدایه ها عمل کرد و باعث کاهش معنی دار در میزان بیماری و افزایش معنی دار در فاکتورهای رشدی مورد بررسی در این آزمون گردید.

واژگان کلیدی: گوجه فرنگی، کنترل بیولوژیک، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ، *Pseudomonas fluorescens*

مقدمه

گیاه گوجه فرنگی *Lycopersicom esculentum* Miller یک گیاه یکساله بوده متعلق به خانواده Solanacae می باشد. بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی یکی از بیماری های مهم این گیاه است که عامل آن *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* می باشد (۲). این بیماری در تمام دنیا وجود دارد و در ایران بخصوص در مزارع گوجه فرنگی خسارت زیادی وارد می کند و یکی از شایع ترین و مخربترین بیماریهای گوجه فرنگی ورامین می باشد. میانگین درصد آلودگی در مزارع گوجه فرنگی در منطقه ورامین حدود ۲۷/۳٪ بوده است(نیک نژاد و همکاران، ۱۳۷۸). یکی از راههای کنترل این بیماری استفاده از عوامل آنتاگونیست یعنی کنترل بیولوژیکی است. در این تحقیق سعی شده است تا به بررسی اثرات مختلف آنتاگونیستی جدایه های مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

عامل بیماری و آنتاگونیست:

بیست جدایه های باکتری *P.fluorescens* به عنوان آنتاگونیست و یک جدایه از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* به عنوان عامل بیمارگر از آزمایشگاه بیماری شناسی دانشگاه تهران (پردیس ابوریحان) دریافت شد.

آزمون اثبات بیماریزایی:

جهت ضدعوفنی بذور، بذور به مدت سه دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ قرار داده و سپس با آب مقطر استریل شستشو می دهیم. بذور گوجه فرنگی ضدعفونی شده، بر روی کاغذ صافی استریل که به سوسپانسون قارچ آغشته شده است قرار میدهیم و در شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۷ روز در انکوباتور نگهداری شد. سپس قارچ بر روی دانه ها گسترش پیدا کرده و توسط مشخصات رویشی ریسه و مورفولوژیکی کنیدی ها مورد شناسایی قرار می گیرد. نمونه ی قارچ را جهت خالص سازی به محیط کشت PDA انتقال می دهیم. طبق آزمون بیماری زایی انجام شده مشخص شد که قارچ توانایی آلوده سازی گوجه فرنگی دارد(Asha et al., 2011).

بررسی قدرت بازدارندگی جدایه ها *P.fluorescens* بر روی رشد *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در شرایط آزمایشگاهی:

تاثیر بیست جدایه باکتری بر رشد با استفاده از آزمون چهار نقطه ای بررسی شد. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه ها پس از ده روز بر اساس فاصله ای که بین حاشیه پرگنه جدایه ها و قارچ ایجاد شده بود اندازه گیری شد (ولر و کوک، ۱۹۸۳).

باکتری های با توانایی بازدارندگی با آزمون چهار نقطه ای در قالب طرح کاملا تصادفی بررسی شدند. داده های بدست آمده تجزیه و تحلیل شدند (لیتل و هیل، ۱۹۷۸).

آزمون کشت متقابل(کشت دو نقطه ای):

ابتدا یک قطعه از قارچ در فاصله یک سانتی متری از لبه تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. تشتکهای پتری در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس به کمک لوپ استریل نیمی از تشتک پتری با سوسپانسیون هر باکتری تلقیح شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک های پتری به مدت ۱۰ روز نگهداری گردیدند (ولر و کوک، ۱۹۸۳).

تولید ترکیبات فرار ضد قارچی توسط جدایه ها:

سوسپانسیون هر یک از جدایه ها به صورت چمنی روی محیط آگار غذایی کشت داده شد. تشتک های پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس یک پلاک به قطر پنج میلیمتر از حاشیه کشت تازه قارچ در وسط تشتک پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. تشتکهای پتری حاوی قارچ و باکتری آنتاگونیست روبروی هم و توسط نوار پارافیلم پوشانده و در انکوباتور در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷ روز نگهداری شدند (فیدامن و روزال، ۱۹۹۳).

تولید آنتی بیوتیک توسط باکتریهای آنتاگونیست:

سوسپانسیون جدایه های باکتری بر روی محیط کشت PDA و به مدت ۳ روز در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. پس از این مدت با استفاده از میله شیشه ای و آب مقطر استریل پرگنه های باکتری از سطح محیط کشت شسته شد، سپس پنبه آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (بصورت وارونه) قرار داده شد و پس از ۲۰ دقیقه یک حلقه از قارچ در وسط تشتک پتری قرار داده شد. در پتری شاهد نیز از پنبه آغشته به فرمالین استفاده گردید (کراس و لوپر، ۱۹۹۰).

درصد بازدارندگی باکتریها از رشد میسلیوم قارچ مطابق فرمول $n = (a - b) / a \times 100$ بر طبق روش اعتباریان (Etebarian et al., 2005) بررسی خواهد شد.

n = درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری، a = مساحت پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری شاهد، b = مساحت پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری بیمار

با استفاده از مقایسه میانگین داده ها، پنج جدایه (قوی، متوسط و ضعیف) برای آزمون های بعدی انتخاب شدند. تمام آزمونهای در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.00) صورت گرفت.

انجام آزمون گلخانه ای:

در انجام این آزمون از سوسپانسیون باکتریایی $۱×۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر، پنج جدایه (قوی، متوسط و ضعیف) از بین بیست جدایه باکتری و به دو روش آغشته سازی ریشه نشاءها در هنگام کاشت و آغشته سازی خاک هم زمان با اضافه نمودن قارچ عامل بیماری به خاک استفاده گردید. در روش اول پس از ایجاد چند زخم کوچک در ریشه و نزدیک طوقه به وسیله چاقوی جراحی استریل، ریشه و طوقه نشاءها به مدت یک دقیقه در داخل سوسپانسیون باکتری نگهداری شدند (مونتالگره و همکاران، ۲۰۰۳). در نهایت پس از گذشت یک دوره ۲۰ روزه پس از کاشت نشاءها، تعامل بین جدایه های باکتری و قارچ عامل بیماری به صورت تعیین درصد افزایش طول گیاه، درصد افزایش وزن خشک و تر گیاه به دست آمد. در روش دوم نیز تعامل بین جدایه های باکتری و قارچ عامل بیماری به صورت تعیین درصد جوانه زنی بذور به دست آمد.

نتایج و بحث

نتایج آماری نشان داد که جدایه های باکتری از نظر اثرات آنتاگو نیستی علیه عامل بیماری دارای اختلاف معنی دار آماری هستند. همچنین جدایه ها در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای نیز در مقایسه با یکدیگر متفاوت عمل کردند. در آزمون کشت دو طرفه، جدایه P26 و P39 به ترتیب با ۷۶/۹۰ و ۶۵/۶۷ بیشترین درصد بازدارندگی را داشتند.

در آزمون اثر ترکیبات غیرفرار جدایه P26 با ۶۶/۹۵ درصد بهتر از بقیه جدایه ها عمل نمود ولی در آزمون بررسی تأثیر مواد فرار، این جدایه P49 بود که با ۵۳/۴۵ درصد بیشترین درصد بازدارندگی را باعث شد و این در حالی است که جدایه های P11 و P19 کمترین درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری را در این آزمون داشتند.

جدول ۱- میانگین کاهش رشد پرگنه قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در تیمار با باکتری های آنتاگونیست *P.fluorescens* در شرایط آزمایشگاهی (تولید مواد فرار، تولید آنتی بیوتیک و آزمون کشت متقابل)

تیمار	درصد کاهش رشد پرگنه *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*		
	آزمون کشت متقابل	آزمون تولید آنتی بیوتیک	آزمون تولید مواد فرار
Control	N	M	M
P26	۷۶/۹۰A	۶۸/۹۵A	۵۰/۳۵B
P39	۶۵/۶۷B	۶۴/۱۰B	۴۷/۱۷C
P49	۶۱/۸۲C	۶۰/۰۰C	۵۳/۴۵A
P34	۵۴/۹۰D	۴۸/۹۰D	۴۲/۶۵D
P12	۴۷/۶۵E	۳۵/۶۵I	۲۶/۶۵I
P51	۴۵/۲۷FE	۴۴/۲۷E	۳۷/۷۷EF
P45	۴۴/۰۲F	۳۸/۵۲GH	۳۴/۲۷G
P17	۴۳/۹۷F	۳۴/۲۲IJ	۲۶/۴۷I
P22	۴۳/۲۲GF	۴۲/۲۲EF	۳۹/۷۲EF
P28	۴۲/۹۰GF	۳۸/۱۵H	۴۰/۱۵E
P32	۴۰/۵۰GH	۴۰/۷۵GF	۳۷/۵۰ EF
P37	۳۷/۹۲IH	۳۹/۱۷GH	۳۷/۴۲F
P21	۳۵/۶۵IG	۲۵/۱۵K	۲۱/۶۵ J
P13	۳۳/۱۷ KJ	۳۹/۲۷LK	۲۰/۹۲J
P41	۳۲/۷۰KJ	۳۱/۴۵J	۳۰/۷۰H
P43	۳۱/۲۰K	۳۱/۹۵J	۳۳/۹۵G
P52	۲۵/۹۷L	۲۴/۱۷K	۲۳/۲۲J

Chao	۲۵/۳۵L	۲۲/۹۰K	۲۰/۳۵ J
P11	۲۲/۸۲L	۲۲/۹۷K	۱۶/۸۲K
P19	۱۳/۹۰M	۱۳/۸۲L	۱۴/۶۵ L

-اعداد جدول میانگین چهار تکرار است.

-اعدادیکه با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند.

در شرایط گلخانه ای شرایط تا حدودی متفاوت از آزمون آزمایشگاهی بود. جدایه P49 که در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با بیست جدایه دیگر متوسط عمل کرده بود در هر دو روش آغشته سازی به خاک و ریشه گیاهچه ها در شرایط گلخانه ای بهتر از جدایه های دیگر عمل کرد. نتایج نشان داد که جدایه P49 نه تنها باعث کاهش معنی داری در بیماری شد بلکه به طور معنی داری باعث افزایش رشد گیاهچه ها (فاکتورهای رشدی شامل طول گیاه، افزایش وزن تر و وزن خشک گیاه پس از ۱۴ روز از انتقال نشاءها در گلدان ها و افزایش جوانه زنی) گردید. همچنین نتایج آزمون گلخانه ای نشان داد که تمام جدایه های باکتری در روش آغشته سازی در خاک بهتر از روش آغشته سازی ریشه و طوقه گیاهچه ها عمل کردند (جدول ۲).

جدول ۲- اثر چند جدایه روی پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر روی ارتفاع بوته و وزن بوته های گوجه فرنگی در شرایط گلخانه

تیمار	درصد جوانه زنی(٪)	ارتفاع(سانتیمتر)	وزن تر(گرم)	وزن خشک(گرم)
UA	۲۰/۴۲G	۶/۴۲F	۸/۳۰F	۱/۵۵F
U	۹۶/۱۰A	۵۷/۸۷A	۴۱/۵۰A	۴/۲۵A
P26	۸۰/۹۵C	۴۵/۹۲C	۳۰/۸۵C	۳/۲۵BC
P39	۷۱/۷۵D	۴۴/۳۵C	۲۹/۶۷C	۳/۰۲C
P49	۸۶/۰۲B	۴۹/۳۰B	۳۶/۸۷B	۳/۹۵B
P34	۵۲/۵۲E	۳۷/۲۵D	۲۱/۹۷D	۲/۴۷D
P11	۳۴/۹۲F	۱۰/۸۵E	۱۴/۶۰E	۲/۰۰E
LSD	۲/۹۷	۲/۳۹	۱/۶۵	۰/۴۴

-اعداد جدول میانگین چهار تکرار است.

-اعدادیکه با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن در سطح یک درصد (P<۰/۰۱) با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند.

-U شاهد غیرآلوده به *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

-UA شاهد آلوده به *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

-LSD یا Least Significant Difference **حداقل تفاوت معنی‌دار**

طبق بررسی های انجام شده توسط Asha و همکاران (۲۰۱۱) باکتری *P.fluorescens* ایزوله شماره ۲ موجب تشدید جوانه زنی بذور گوجه فرنگی آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* و همچنین موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می شود. Ownley و همکاران (۲۰۰۳) باکتری های *Pseudomonas* sp. به عنوان یکی از عوامل تقویت کننده رشد گیاهان (PGPR)، محسوب میشوند و همچنین موجب کاهش عوامل مضر خاک و بیمارگرهای گیاهی می شوند. Ramamoorthy و همکاران (۲۰۰۲) باکتری *P.fluorescens* بیووار شماره ۱ موجب کاهش انتشار بیماری در گوجه فرنگی و فلفل قرمز شده و همچنین باعث افزایش رشد گیاه در شرایط گلخانه میشود.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می توان گفت که استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به عنوان روش مناسبی جهت مدیریت بسیاری از بیماریهای گیاهی محسوب می شود. همچنین جدایه های مختلف باکتری *P.fluorescens* توانایی بالقوه ای در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* را دارد.

برخی از منابع

۱.نیک نژاد کاظم پور م. شریفی تهرانی ع. اخوت م. ۱۳۷۸. بررسی تاثیر قارچهای آنتاگونیست *Trichoderma* spp. علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* در شرایط گلخانه. مجله علوم و فناوری کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. دوره ۲. شماره ۳ .صفحه ۳۱ تا ۳۷.

2.Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Academic Press, USA. 922pp.

3.Asha, P. P., Chandra nayaka, S., Udaya Shankar, A. C., Srinivas, C., Niranjana, S. R. 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.Fiddaman, P. J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by Bacillus subtilis. Journal of Applied Bacteriology, 74: 119-126.

5.Kraus, J. and Loper, J. E. 1990. Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudornonas fluorescens* pf- 5: Mechanistic Studies. In: Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (Eds). Plant growth promoting rhizobacter. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria-Interlaken, Switzerland.

6.Montealegre, J.R., Reyes, R., Perez, L.M., Herrera, R., Silva, P., and Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Elect. J. of Biotechnol. 6: 2. 115-127.

7.Weller, D. M. and Cook, R. J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with *Pseudomonas fluorescent*. Phytopathology, 73: 463-469.

A survey on biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing Fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*

Nima Khaledi[1*], Jamileh Irandegani[1] , Mina Hosseini haji abdal[1], Mobina hadinezhad zarrinabadi[1] and Elahe Sedighi[2]

1-M.Sc. Student of Plant pathology, Department of Entomolgy and Plant pathology, Aboureyhan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

2- M.Sc. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Email: khnm13@gmail.com

Abstract:

In this research, the antagonistic effects of *Pseudomonas fluorescens* isolates against the causal agent of tomato damping-off, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* were surveyed under laboratory and greenhouse conditions. Isolates P49 and P26 showed the most inhibition ratio in the volatile and non-volatile metabolites tests which were 53.45% and 68.95% respectively. The five out of 20 isolates studied more and their antagonistic effects were surveyed under greenhouse conditions as inoculated into soil and covered on root and crown of seedlings. Interaction among the bacterial isolates and the fungus was calculated as the percent of increasing seed germination, percent of increasing of seedling length, percent of increasing of plant dry and fresh weight was shown. The results showed that bacterial isolates have different antagonistic effects. In the greenhouse tests, both methods, P49 isolate was the best at significant decreasing of disease rate and at significant increasing of considered growth factors in this test.

Keywords: Tomato, Biological control, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Pseudomonas fluorescens*