Nova Biologica Reperta 7(1): 64-75 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.1.64

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۱، صفحات ۶۴ الی ۷۵ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی اثر مهار زیستی قارچ *Macrophomina phaseolina* توسط باکتری سودوموناس فلورسنت بر روی لوبیا و ارزیابی میزان فنل کل ریشه

مژگان پاس[۱]، حدیث شهبازی[۲] و لیلا ابراهیمی[۳]

[۱]گروه گیاه‌پزشکی، موسسه آموزش عالی مهرگان، محلات، ایران؛ [۲]گروه گیاه‌پزشکی، موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران؛ [۳]گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران
* مسئول مکاتبات: حدیث شهبازی، ha.shahbazi@areeo.ac.ir

چکیده. بیماری پوسیدگی ذغالی ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد گیاهان مختلف از جمله لوبیا است که همه ساله خسارت قابل‌توجهی به این محصول وارد می‌سازد. مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی اهمیت زیادی دارد زیرا کنترل شیمیایی این بیماری علاوه بر تاثیر سو بر محیط زیست، میکروفلور و حاصل‌خیزی خاک، مشکل و گاه بی‌تاثیر است. سودوموناس‌های فلورسنت با تولید و ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، سیدروفورها و برخی هورمون‌های گیاهی، علاوه بر محدود کردن یا توقف رشد بیمارگرهای گیاهی به ویژه قارچ‌ها، سبب افزایش رشد گیاهان نیز می‌شوند. در این پژوهش به منظور مهار زیستی قارچ *M. phaseolina*، در تابستان ۱۳۹۴ نمونه‌برداری از مزارع لوبیای آلوده در شهرستان خرم‌آباد (لرستان، ایران) صورت گرفت. پس از شناسایی جدایه‌های قارچی، آزمون بیماری‌زایی در گلخانه انجام و جدایه بیمارگر با قدرت بیماری‌زایی بیش‌تر جهت ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد. توانایی آنتاگونیستی هشت سویه بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* که توانایی مهارزیستی آن‌ها در مطالعات قبلی به اثبات رسیده بود، در مقابل قارچ *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بازدارندگی از رشد *M. phaseolina* با استفاده از آزمون کشت متقابل، اثر ترکیبات خارج سلولی باکتری و ترکیبات فرار ضدقارچی تولید شده توسط سویه‌ها ارزیابی شد. سویه *P. fluorescens* UTPf125 که در تمامی آزمایش‌ها بیش‌ترین بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر را نشان داد به عنوان سویه منتخب در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفت و سبب کاهش معنی‌دار (۵۰ درصد) میزان بیماری و افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک بوته‌ها شد. محتوای فنل کل در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ پس از مایه‌زنی با بیمارگر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان فنل کل در روزهای سوم و پنجم پس از مایه‌زنی به بیش‌ترین مقدار خود رسید، سپس در روزهای هفتم و نهم کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی. آنتاگونیست، آنتی‌بیوتیک، بیماری‌زایی، پوسیدگی ذغالی، ترکیبات فرار

The biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against *Macrophomina phaseolina* and estimating the total phenol compounds of bean roots

Mozhghan Pas[1], Hadis Shahbazi[2] & Leila Ebrahimi[3]

[1]Department of Plant Protection, Mehregan Institute of Higher Education, Mahalat, Iran; [2]Department of Plant Protection, Rice Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran; [3]Department of Entomology and Plant Pathology, Aburaihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran
*Correspondent author: Hadis Shahbazi, ha.shahbazi@areeo.ac.ir

Abstract. Charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* is one of the most important soil borne diseases with a broad host range including bean, which annually brings a significant damage to this plant. Biological control of charcoal rot is very important because its chemical control harms the environment, microflora and soil fertility. Chemical control of charcoal rot is also difficult and sometimes ineffective. Fluorescent Pseudomonads are able to increase plant growth and inhibit the development of plant pathogens by producing and secreting antibiotics, enzymes, siderophores, and plant hormones. In this study, infected bean plants by *M. phaseolina* were collected from infected bean fields of Khorramabad (Lorestan Province, Iran) in the summer of 2015. Virulence of fungal isolates was evaluated in a greenhouse and one isolate with the highest pathogenicity was chosen for further experiments. The biocontrol potential of

Received 29.01.2018/ Revised 27.03.2018/ Accepted 30.03.2018/ Published 04.04.2020
دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۹/ اصلاح: ۱۳۹۸/۰۱/۰۷/ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۰/ انتشار: ۱۳۹۹/۰۲/۱۶

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

eight *Pseudomonas fluorescens* strains, whose biocontrol abilities were proved in previous studies, was examined against *M. phaseolina in vitro*. The growth inhibition of *M. phaseolina* was examined by dual culture test and the antifungal activity of bacterial volatile and nonvolatile metabolites. *P. fluorescens* UTPf125, which showed the highest inhibitory effect on the mycelial growth, was selected for greenhouse tests. UTPf125 strain led to a significant reduction (%50) of disease severity and increased fresh and dry weight significantly. Phenol compounds were evaluated 1, 3, 5, 7 and 9 days after inoculation by pathogen. The results showed that the highest value of total phenol content was obtained on the third and fifth days after inoculation, decreasing on the seventh and ninth days.

Keywords. antagonist, antibiotic, charcoal rot, pathogenicity, volatile metabolites

مقدمه

حبوبات پس از غلات دومین منبع غذایی به شمار می‌روند که سرشار از پروتئین بوده و به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی کشور از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند. لوبیا معمولی با نام علمی *Phaseolus vulgaris* یک محصول غذایی قدیمی در بین اقوام بشر بوده و در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ با سطح زیر کشت حدود ۱۰۷/۵ هزار هکتار، دومین گونه مهم حبوبات در کشور بود که استان لرستان با سطح زیر کشت ۱۷۸۳۴ هکتار پس از استان فارس دومین قطب تولید این محصول بود (Ministry of Agriculture Statistics, 2017). تاکنون روی لوبیا حدود ۲۰۰ بیمارگر گزارش شده است که باعث آلودگی و ایجاد خسارت می‌شوند (Majnoun Hosseini, 2008; Dadgar, 2009). قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid عامل بیماری پوسیدگی ذغالی یکی از عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد است که ریشه و طوقه را مورد حمله قرار می‌دهد. این قارچ دارای دامنه وسیع میزبانی بوده و بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی در ۱۰۰ خانواده، اعم از تک‌لپه و دولپه را آلوده می‌کند (Purkayastha et al., 2006; Dhingra & Sinclair, 1973).

اغلب گیاهان زراعی فاقد مقاومت ژنتیکی و پلی ژنتیکی به عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد هستند. همچنین روش‌های زراعی از جمله تناوب زراعی، به دلایل اقتصادی برای حذف عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد توسط کشاورزان مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. از طرفی تاثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد و هزینه‌های اقتصادی آن و همچنین کاهش تاثیر آن‌ها به علت ظهور نژادهای مقاوم به قارچ‌کش‌ها، سبب محدودیت کاربرد آن‌ها به‌خصوص در کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد شده است. علاوه بر این، نگرانی‌های زیست‌محیطی و آلودگی چرخه غذایی به باقیمانده آفت‌کش‌های شیمیایی، سبب کاهش مصرف آن‌ها شده است. لذا دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر به عنوان یک چالش جدی پیش روی محققان قرار گرفته است. در این میان مهار زیستی بیمارگرها به عنوان یک روش طبیعی جهت حفظ سلامت گیاهان از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. از سی سال پیش که استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفت، همواره سودوموناس‌های فلورسنت موجود در ریزوسفر به‌عنوان عوامل بیوکنترل مهم و پرکاربرد مطرح بوده‌اند. آن‌ها به‌طور مستقیم با تولید برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه از جمله ایندول استیک اسید (Obethasli et al., 1991) و نیز به‌طور غیرمستقیم از طریق مهار زیستی بیمارگرها و القا مقاومت در گیاهان سبب افزایش رشد آن‌ها و کاهش خسارت عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Weller, 1988). تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)) (Shanahan et al., 1992; Keel et al., 1992)، فنازین (Brisbane et al., 1987; Mazzola et al., 1992)، پائولوتئورین (Howell & Stipanovic, 1980) و پیرول‌نیترین (Chancey et al., 2002)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین (Leong, 1986; Schippers et al., 1987)، سیانید هیدروژن (Voisard et al., 1989) و آنزیم‌های پروتئاز (Keel & Defago, 1997) از مهم‌ترین سازوکارهای مؤثر در مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتری‌ها به شمار می‌روند. پژوهشگران با بررسی مهار زیستی قارچ *M. phaseolina* با استفاده از سویه‌های سودوموناس به صورت مخلوط با خاک و آغشته‌سازی بذور دریافتند که سویه‌های آنتاگونیست p42، p34، p38 و p8 نه تنها از رشد رویشی بیمارگر ممانعت می‌کنند بلکه سبب افزایش معنی‌دار وزن خشک گیاه نیز می‌شوند (Golpayegani et al., 2011).

پاسخ عمومی گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی شامل تقویت دیواره سلولی، تجمع پروتئین‌های ضدمیکروبی، تولید فیتوآلکسین‌ها و ترکیبات فنلی است. مواد فنلی که معمولا بـا عنوان فنل کل بررسی می‌شوند شامل تانن‌ها، فلاوونیدها و اسیدهای فنلی هستند که در برگ‌ها، ساقه‌ها و میوه‌های ارقام مقاوم تجمع می‌یابند (Bhatia et al., 1972). ترکیبات فنلی در شرایط محیطی مطلوب نیز در سلول‌های گیاهی تولید می‌شوند اما تنش‌های محیطی مختلف مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهد (Kliebenstein, 2004). تحقیقات زیادی در رابطه با بررسی اثر

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

ترکیبات فنلی در مقاومت بـه عوامل بیماری‌زا انجام شده است که نشان می‌دهد مقاومت گیاه بـه عامل بیماریزا، وابسته بـــه حضور مقادیر زیادی از ترکیبات فنلی است (Jain & Yadav, 2003; Parashar & Lodha, 2007; Shahbazi et al., 2010).

در این پژوهش، اثر بیوکنترلی سویه‌های باکتری *P. fluorescens* روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی ذغالی خالص‌سازی شده از ریشه و طوقه‌های آلوده لوبیا، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

قارچ عامل بیماری

نمونه‌برداری از ریشه و طوقه گیاهان آلوده مزارع کشت لوبیا در خرم‌آباد در تابستان سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. جداسازی عامل بیماری مطابق روش آزمایش شده پیشین انجام شد (Ammarlou et al., 2010; Chehri et al., 2010). خالص‌سازی قارچ *Macrophomina* به صورت نوک ریسه یا تک-اسکلروت روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) انجام شد (Dhingra & Sinclair, 1995). جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل سرعت رشد پرگنه، رنگ پرگنه، اندازه میکرواسکلروت و اندازه پیکنیدیوم و کنیدیوم و با استفاده از توصیف‌های در دسترس شناسایی شدند (Ershad & Shirazi, 2004). در مجموع ۵۰ جدایه قارچی *M. phaseolina* خالص‌سازی شد. در نهایت تعداد پنج جدایه بر اساس سرعت رشد پرگنه روی محیط‌کشت جهت انجام آزمون بیماری‌زایی انتخاب شدند.

تهیه زادمایه قارچ *Macrophomina phaseolina* جهت انجام آزمون‌های گلخانه‌ای

برای تهیه زادمایه این قارچ، مخلوط ۱۱۰ گرم ماسه، شش گرم آرد ذرت و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. این مخلوط، سه بار در سه روز متوالی و هر بار ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. سپس به هر ارلن چند قطعه پنج سانتی‌متری از محیط‌کشت هفت روزه قارچ روی محیط PDA اضافه شد. ارلن‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگهداری شدند (Etebarian et al., 2007).

آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina*

مخلوطی از خاک مزرعه و شن و خاک برگ به نسبت وزنی ۱:۱:۱ تهیه شد و در سه روز متوالی به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد و داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر ریخته شد. سپس زادمایه قارچ بیمارگر به نسبت ۱۰ درصد وزنی بطور یکنواخت با خاک مخلوط (Jimenez-Diaz et al., 1983) و داخل گلدان‌های پلاستیکی ریخته شد. در تیمار شاهد از مخلوط ماسه و آرد ذرت فاقد زادمایه قارچ استفاده شد. به سه سانتی‌متر فوقانی هر یک از گلدان‌ها خاک سترون اضافه شد. در تمامی گلدان‌ها بذر ضدعفونی شده لوبیا قرمز رقم محلی در عمق دو سانتی‌متری از سطح خاک سترون گلدان‌ها کشت شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۳۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. این آزمایش در شش تیمار (پنج جدایه قارچی و شاهد) در سه تکرار انجام شد. پس از ظهور علائم بیماری، از گیاهان آلوده نمونه‌برداری شد و پس از شستشو و سترون کردن در محیط‌کشت PDA کشت داده شدند. پس از پنج روز پرگنه‌ها تحت بررسی قرار گرفتند و از نظر خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی با ویژگی‌های جدایه اصلی مقایسه شدند. جدایه‌ای که شدت بیماری‌زایی بیش‌تری داشت برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد.

باکتری‌های بیوکنترل

هشت سویه مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* با نام‌های UTPf125، UTPf110،P13، UTPf105، UTPf106، UTRf104، UTPf127 و UTPf120 که در پژوهش‌های قبلی (Madloo, 2013; Shahbazi et al., 2016) توانایی مهارزیستی آنها به اثبات رسیده بود، از کلکسیون کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران دریافت شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی سویه‌های باکتری در شرایط آزمایشگاهی

آزمون کشت چهار نقطه‌ای

به منظور بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها، مخلوطی از دو محیط‌کشت KB (King's B medium) و PDA (به نسبت ۱:۱) تهیه شد. هشت سویه باکتری به‌صورت جداگانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر (cfu/ml) در چهار نقطه به فاصله سه سانتی‌متر از مرکز تشتک پتری کشت داده شد و به صورت همزمان قرصی به قطر پنج میلی‌متر از کشت چهار روزه قارچ *M. phaseolina* در وسط تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور نگهداری شدند. آزمایش در نه تیمار (هشت سویه باکتری و شاهد) و چهار تکرار انجام شد. پس از چهار روز، هنگامی که پرگنه قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد به نقاط ترسیم شده رسید، آزمایش متوقف شد. سپس فاصله بین پرگنه قارچ عامل بیماری و باکتری‌های آنتاگونیست اندازه‌گیری و میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی تعیین شد (Expert & Digat, 1995).

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

آزمون کشت متقابل

این آزمون بر اساس روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster, 1971) انجام شد. ابتدا در یک نیمه از تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA + NA (به نسبت ۱:۱)، ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰^۸ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر (cfu/ml) باکتری رشدیافته به مدت یک روز در محیط‌کشت مایع NB (Nutrient Broth) پخش و بعد از گذشت ۲۴ ساعت در فاصله یک سانتی‌متری از لبه نیمه دیگر تشتک پتری قرصی به قطر پنج میلی‌متر از کشت جوان قارچ قرار داده شد. در تشتک شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. آزمایش در ۹ تیمار (هشت سویه باکتری و شاهد) و چهار تکرار انجام شد. پس از این‌که در تیمار شاهد، قارچ به خط وسط تشتک پتری رسید، میزان رشد شعاعی جدایه قارچ اندازه‌گیری و سپس مساحت پرگنه قارچی محاسبه شد و در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ به شرح زیر (Etebarian et al., 2005) محاسبه شد.

$$n = (a-b)/a \times 100$$

n: درصد بازدارندگی رشد عامل بیماری

a: مساحت پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری شاهد

b: مساحت پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری بیمار

بررسی اثر ضدقارچی ترکیبات خارج سلولی باکتری

این آزمون بر اساس روش کراوس و لوپر انجام گرفت (Kraus & Loper, 1992). صد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت ۱۰^۸ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر (cfu/ml) و آب مقطر سترون (شاهد) روی محیط‌کشت PDA پخش شد و به مدت سه روز در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از حذف باکتری‌ها به کمک پنبه سترون از سطح پتری، پنبه آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری (به صورت وارونه) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از تهویه تشتک‌های پتری در زیر هود، یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه کشت چهار روزه قارچ در مرکز هر تشتک قرار داده شد. آزمایش در ۹ تیمار (هشت سویه باکتری و شاهد) و چهار تکرار انجام شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از پنج روز، هنگامی که پرگنه قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد به لبه پتری رسید، رشد میسلیومی قارچ اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر ضدقارچی ترکیبات فرار باکتری

این آزمون مطابق روش فیدامن و روزال انجام شد (Fiddaman & Rossall, 1993). صد میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۰^۸ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر (cfu/ml) از باکتری رشد یافته به مدت یک روز در محیط کشت مایع NB، روی محیط‌کشت NA پخش و همزمان یک قرص میسلیومی از کشت چهار روزه قارچ روی محیط‌کشت PDA کشت داده شد. دو تشتک پتری حاوی کشت باکتری و قارچ در مقابل هم قرار داده شدند و شکاف بین دو تشتک پتری با نوار پارافیلم کاملا مسدود شد تا از خروج ترکیبات فرار باکتریایی جلوگیری شود. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. آزمایش در ۹ تیمار (هشت سویه باکتری و شاهد) و چهار تکرار انجام شد. تشتک‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد کاهش رشد پرگنه بیمارگر نسبت به شاهد فاقد باکتری، به عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضدمیکروبی ترکیبات فرار مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثر بیوکنترلی باکتری منتخب روی بیماری پوسیدگی ذغالی لوبیا در شرایط گلخانه‌ای

زادمایه قارچ عامل بیماری قبل از کاشت بذرها به نسبت ۱۰ درصد وزنی بطور یکنواخت با خاک دو بار سترون شده (حاوی نسبت مساوی از خاک مزرعه، خاک‌برگ و ماسه) به گلدان‌ها اضافه شد (Jimenez-Diaz et al., 1983). بلافاصله پس از کاشت بذرها، ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱۰^۸ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر (cfu/ml) به خاک هر گلدان اضافه شد (Golpaygani et al., 2011). در تیمار شاهد منفی (آلوده) تنها از زادمایه قارچ بیمارگر و در شاهد مثبت تنها از سویه باکتری استفاده شد و در شاهد سالم از هیچ‌کدام استفاده نشد.

برای ارزیابی شدت بیماریزایی بیمارگر از شاخص شش درجه‌ای (۰-۵) استفاده شد (Pahlavani et al., 2006). ۰= گیاه بدون علائم، ۱= یک الی ۳ درصد آلودگی در ریشه، ۲= ۱۰ درصد آلودگی، ۳= ۲۵ درصد آلودگی، ۴= ۵۰ درصد آلودگی و ۵ = بیش از ۷۵ درصد آلودگی. به منظور بررسی اثرات متقابل بیمارگر و سویه منتخب باکتری در فاکتورهای رشدی گیاه، وزن تر و خشک گیاه اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری محتوای فنل کل در گیاهان تیمار شده با قارچ بیمارگر و باکتری بیوکنترل

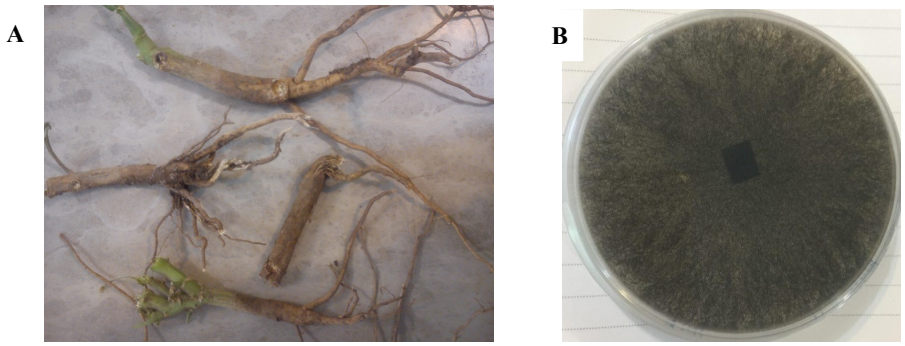
به منظور اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنلی موجود در عصاره ریشه از معرف فولین ساخت شرکت مرک آلمان، بر اساس روش پیشنهادی سیورز و دالی استفاده شد (Seevers & Daly, 1970). برای استخراج ترکیبات فنلی، به ترتیب در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ پس از مایه‌زنی در یک ساعت خاص از روز، مقدار نیم گرم ریشه نزدیک به طوقه نمونه‌برداری شد. ریشه‌ها داخل هاون چینی ریخته و پس از اضافه کردن پنج میلی‌لیتر متانول با استفاده از نیتروژن مایع کاملا له شدند. پس از به دست آمدن یک مخلوط

یکنواخت، عصاره حاصل در ۴۰۰۰×g به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول بالایی حاصل برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل استفاده شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره به دست آمده پنج میلی‌لیتر آب مقطر، ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین، یک میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع و یک میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق، مقدار جذب نور با طول موج ۷۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. لوله‌های شاهد شامل آب و معرف فولین بودند. از هر نمونه عصاره در سه نوبت جذب خوانش و به دلیل معنی‌دار نبودن تفاوت سه تکرار، میانگین آن‌ها در محاسبات منظور شد.

جهت تهیه منحنی استاندارد و معادله رگرسیون فنل کل، ابتدا غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکروگرم اسیدکافئیک (ساخت شرکت مرک آلمان) تهیه شد و پس از اضافه شدن معرف فولین و کربنات کلسیم اشباع، جذب نوری آن در دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده و در نهایت میزان ترکیبات فنلی موجود در نمونه‌ها به صورت میلی‌گرم اسیدکافئیک در هر گرم وزن تر گیاه تعیین شد (Yammamoto et Seevers & Daly, 1970; al., 1977).

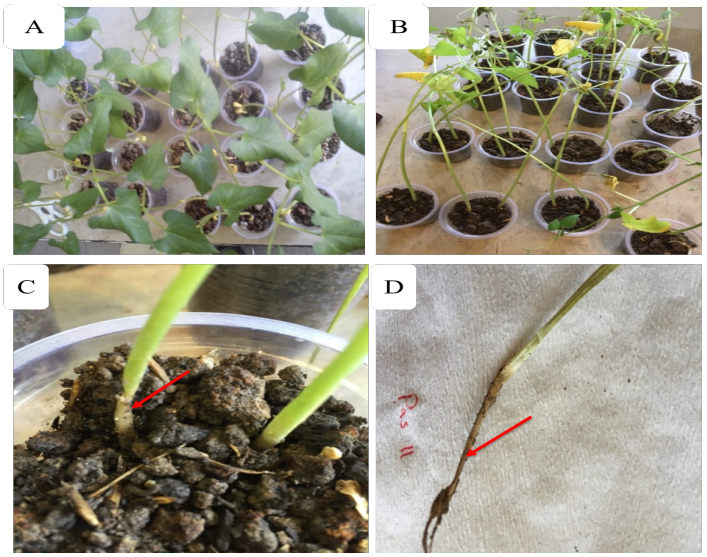
تجزیه آماری

تمامی آزمون‌ها در آزمایشگاه و آزمون بیماری‌زایی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در گلخانه به روش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. جهت تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS ver. 9.1 استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون حداقل دامنه معنی‌دار (LSD) در سطح ($P \leq \%1$) و ($P \leq \%5$) انجام شد. جهت رسم شکل‌ها از نرم‌افزار Microsoft excel, 2013 استفاده شد.



شکل ۱- A. علائم خسارت به ریشه و طوقه در بیماری پوسیدگی ذغالی. **B.** پرگنه قارچ *Macrophomina phaseolina*

Fig. 1. A. Charcoal rot symptoms in collar and root. **B.** Colony of *Macrophomina phaseolina*.



شکل ۲- A. علائم پژمردگی در آزمون اثبات بیماری‌زایی در گلخانه. **B.** پژمردگی تدریجی اندام های هوایی و زرد شدن آن‌ها. **C-D.** میکرواسکروت‌ها در ناحیه طوقه.

Fig. 2. A. Wilt symptoms in pathogenicity test in greenhouse. **B.** Gradual wilting and yellowing of plant aerial parts. **C-D.** Microsclerotia on bean collar.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

نتایج

قارچ عامل بیماری

پنجاه جدایه قارچی از ریشه و طوقه گیاهان آلوده به بوته‌میری (شکل ۱ A) از مزارع کشت لوبیا در شهرستان خرم‌آباد جداسازی و خالص‌سازی شد.

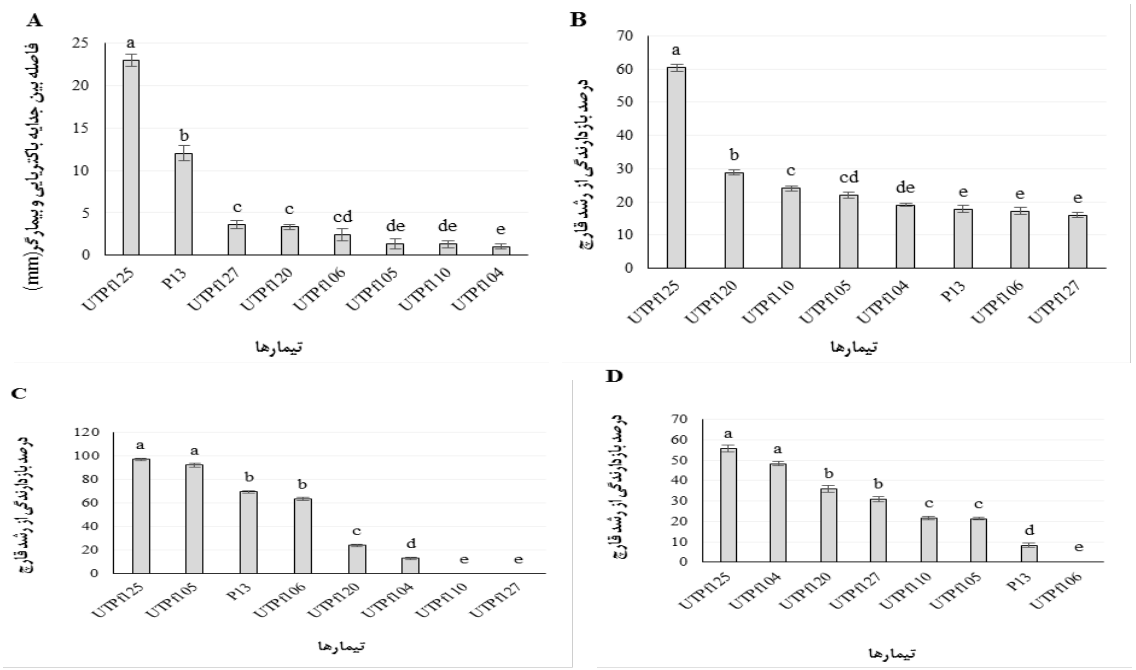
ویژگی‌های ریخت‌شناسی قارچ *M. phaseolina*: پرگنه در سطح محیط‌کشت نمدی بوده و ریسه‌ها به صورت متراکم و هوایی رشد کردند (شکل ۱ B). رشد میسلیوم در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد سریع بوده و پس از دو روز سطح تشتک پتری را پوشاند. روی محیط‌کشت تعداد زیادی میکرواسکلروت سیاه رنگ، گرد تا کشیده یا نامنظم تولید شد. اندازه و شکل میکرواسکلروت‌ها روی محیط‌های مختلف و در بین جدایه‌های مختلف متفاوت بود. جدایه‌های مورد بررسی در محیط کشت آب-آگار، تولید پیکنیدیوم‌های سیاه رنگ به قطر ۱۵۰-۱۰۰ میکرومتر و کنیدیوم‌های بی‌رنگ بیضوی تا تخم‌مرغی به ابعاد ۱۲-۶ × ۱۹-۱۶ میکرومتر کردند. در نهایت تعداد پنج جدایه بر اساس سرعت رشد پرگنه روی محیط‌کشت جهت انجام آزمون بیماری‌زایی انتخاب شدند.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina*

در آزمون اثبات بیماری‌زایی، پژمردگی تدریجی اندام‌های هوایی و زرد شدن آن‌ها دو هفته پس از جوانه‌زنی بذرها مشهود بود (شکل ۲، A-B). همچنین چهار هفته پس از مایه‌زنی، میکرواسکروت‌ها در ناحیه طوقه مشاهده شدند (شکل ۲، C-D). بوته‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل و از کشت مجدد بافت‌های آلوده روی محیط‌کشت PDA عامل بیماری جداسازی شد که ویژگی‌های جدایه اصلی را نشان می‌داد. در نهایت جدایه‌ای که شدت بیماری‌زایی بیش‌تری داشت برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد.

اثرآنتاگونیستی سویه‌های باکتری در شرایط آزمایشگاهی

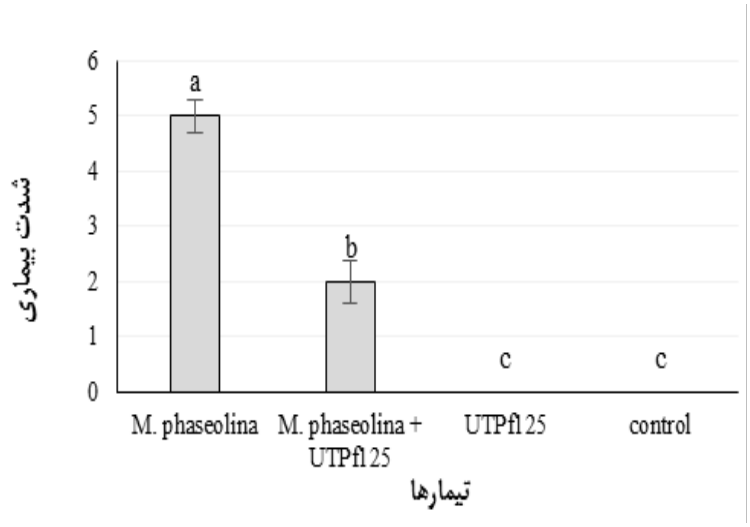
در تمامی آزمون‌های انجام شده در شرایط آزمایشگاهی (آزمون کشت چهار نقطه‌ای، کشت متقابل، متابولیت‌های غیرفرار و ترکیبات فرار) تفاوت معنی‌داری در رشد پرگنه بیمارگر میان سویه‌های مختلف *P. fluorescens* شامل UTPf125، P13، UTPf110، UTPf105، UTPf104، UTPf106، UTPf127، UTPf120 و شاهد مشاهده شد. نتایج حاصل از هر چهار آزمون نشان داد که سویه *P. fluorescens* UTPf125 بیش‌ترین بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* را به‌دنبال دارد (شکل ۳). بنابراین، این سویه جهت انجام آزمون‌های گلخانه‌ای انتخاب شد.



شکل ۳- تاثیر سویه‌های آنتاگونیست UTPf125، P13، UTPf110، UTPf105، UTPf106، UTPf104، UTPf127 و UTPf120 در بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseolina* در آزمون‌های **A**.کشت چهار نقطه‌ای. **B**. کشت متقابل. **C**. ترکیبات غیرفرار. **D**. ترکیبات فرار. هر ستون در نمودار میانگین ± خطای استاندارد چهار تکرار است. تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD، (P<0.01) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 3. The effects of antagonistic strains UTPf125, P13, UTPf110, UTPf105, UTPf106, UTPf104, UTPf127 and UTPf120 on *Macrophomina phaseolina* mycelial growth in **A.** Four point test. **B.** Dual culture. **C.** Nonvolatile metabolites. **D.** Volatile metabolites. Data are the means ± SE of four replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly (P<0.01) according to LSD test.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]



شکل ۴- شدت بیماری در تیمارهای مختلف با استفاده از شاخص شش درجه‌ای. هر ستون در نمودار میانگین ± خطای استاندارد چهار تکرار است. تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD، (P<0.01) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 4. The disease severity of different treatments obtained by using the six-point index. Data are the means ± SE of four replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly (P<0.01) according to LSD test.

اثر بیوکنترلی باکتری منتخب روی بیماری پوسیدگی ذغالی لوبیا در شرایط گلخانه‌ای

در آزمون‌های گلخانه‌ای، همان‌طور که انتظار می‌رفت در گیاهان شاهد که فاقد زادمایه بیمارگر بودند هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. در گیاهان لوبیا قرمز که با قارچ *M. phaseolina* مایه‌زنی شده بودند، علائم ۱۴ روز پس‌از مایه‌زنی ظاهر شد. در تمامی گیاهانی که تنها با بیمارگر تیمار شده بودند علائم ابتدا به‌صورت قهوه‌ای‌شدن بافت آوندی، پیری زودهنگام، سیاه‌شدگی در قسمت طوقه و رنگ پریدگی مشاهده شد و میانگین شدت بیماری پنج بود، یعنی بیش از ۷۵ درصد آلودگی در ناحیه ریشه و طوقه مشاهده شد (شکل ۴).

اگرچه در گیاهانی که مایه‌زنی آن‌ها با *M. phaseolina* و *P. fluorescens* UTPf125 انجام شده بود نیز اولین علائم پژمردگی و زرد شدن برگ‌ها ۱۴ روز پس از مایه‌زنی ظاهر شد اما شدت این علائم به صورت معنی‌داری کمتر از گیاهانی بود که تنها با *M. phaseolina* مایه‌زنی شده بودند و میانگین شدت بیماری در این تیمارها سه بود یعنی ۲۵ درصد آلودگی در ناحیه ریشه و طوقه مشاهده شد (شکل ۴). این نتایج نشان‌دهنده این امر بود که استفاده از باکتری آنتاگونیست باعث کاهش ۵۰ درصدی شدت بیماری شده است. در تیمارهایی که تنها با سویه باکتری مایه‌زنی شده بودند، علائم خاصی مبنی بر وجود بیماری مشاهده نشد و میانگین شدت بیماری در این تیمارها صفر بود و تمامی گیاهان تا انتهای دوره کشت شادابی و طراوت خود را حفظ کردند (شکل ۴).

وزن تر و خشک گیاه در تیمارهای مختلف

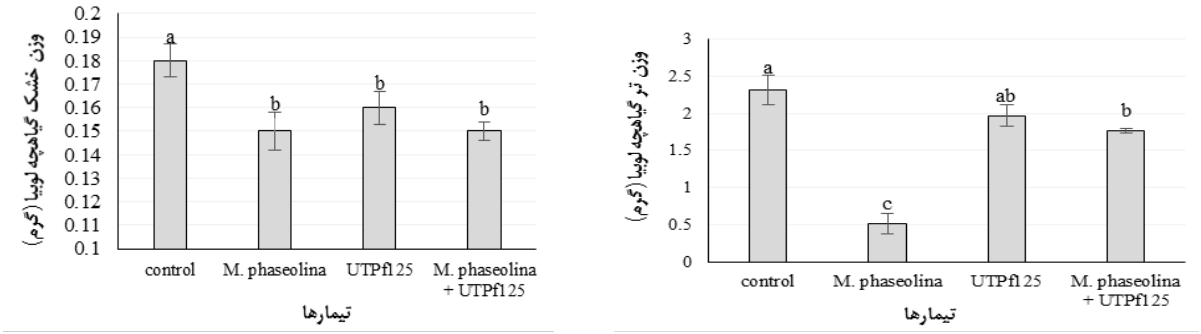
در این آزمایش، میانگین وزن تر بوته‌هایی که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند در روز هفتم ۲/۳۱ گرم بود. در حالی که در بوته‌هایی که با *M. phaseolina* مایه‌زنی شده بودند کاهش میانگین وزن تر بوته‌ها (۰/۵۲ گرم) به صورت معنی‌دار مشاهده شد. در تیمارهایی که مایه‌زنی آن‌ها با *M. phaseolina* و *P. fluorescens* انجام شده بود، میانگین وزن تر گیاهان ۱/۷۶ گرم بود. این امر نشان‌دهنده این است که باکتری توانسته تا حدود زیادی از رشد بیمارگر ممانعت به عمل آورد. از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری میان وزن تر تیمارهای مایه‌زنی شده با سوسپانسیون باکتری و شاهد وجود نداشت (شکل ۵).

وزن خشک بوته‌ها پس از ظهور اولین علائم ۱۵ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. میانگین وزن خشک بوته‌های تیمار شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند ۰/۱۸ گرم بود. در بوته‌هایی که با *M. phaseolina* مایه‌زنی شده بودند کاهش میانگین وزن خشک بوته‌ها به صورت معنی‌داری مشاهده شد. در بوته‌هایی که مایه‌زنی آن‌ها با قارچ و باکتری انجام شده بود، میانگین وزن خشک گیاهان ۰/۱۵ گرم بود. هر چند حضور باکتری بیوکنترل سبب کاهش شدت بیماری توسط بیمارگر شده بود، اما در روز پانزدهم اختلاف معنی‌داری میان وزن خشک بوته‌های آلوده در حضور و غیاب باکتری بیوکنترل مشاهده نشد. تیمارهای مایه‌زنی با سوسپانسیون باکتری دارای میانگین وزنی ۰/۱۶ بودند (شکل ۵).

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

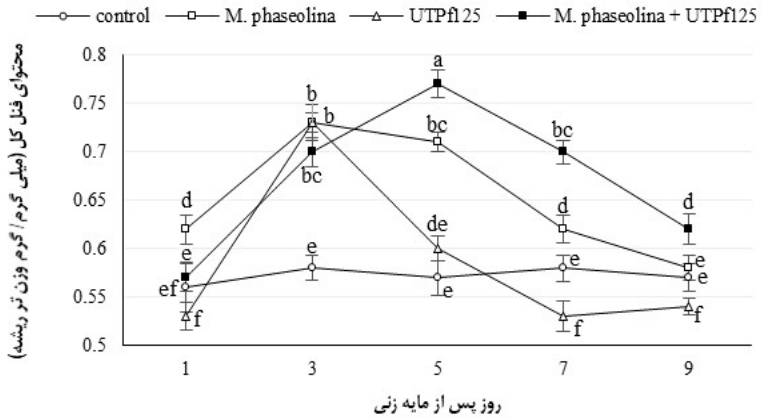
محتوای فنل کل در گیاهان تیمار شده با قارچ و باکتری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بین تیمارها در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ پس از مایه‌زنی و اثرات متقابل آن‌ها در محتوای ترکیبات فنلی ریشه اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) وجود دارد. همانطور که انتظار می‌رفت اختلاف معنی‌داری میان محتوای فنل کل در تمامی روزهای اندازه‌گیری شده در تیمار شاهد وجود نداشت. در سایر تیمارها، محتوای فنل کل در روزهای سوم و پنجم مایه‌زنی به بیش‌ترین مقدار خود رسید، سپس در روزهای هفتم و نهم کاهش یافت. محتوای فنل کل در روز اول پس از مایه‌زنی در مقایسه با سایر روزهای اندازه‌گیری دارای کم‌ترین میزان خود بود (شکل ۶). بیش‌ترین محتوای فنل کل در تیمارهای قارچ و باکتری بیوکنترل به تنهایی در روز سوم اندازه‌گیری شد و پس از آن روند نزولی را طی کرد. به‌طوری که در تیمار باکتری بیوکنترل میزان آن با سرعت بیش‌تری کاهش یافت و در روزهای هفتم و نهم از شاهد سالم نیز کمتر بود. در تیمار همزمان قارچ بیمارگر و باکتری بیوکنترل، بیشترین میزان در روز پنجم اندازه‌گیری شد که از لحاظ آماری به‌صورت معنی‌دار بیش‌ترین مقدار نیز بود. اگر چه در روزهای هفتم و نهم میزان محتوای فنل کل در این تیمار کاهش یافت اما به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارها بود.



شکل ۵- وزن تر و خشک گیاه در تیمارهای مختلف قارچ *Macrophomina phaseolina* و باکتری UTPf125 *Pseudomonas fluorescence* به ترتیب در هفت و ۱۵ روز پس از کاشت. هر ستون میانگین ± خطای استاندارد چهار تکرار است. تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD، ($P<0.01$) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 5. Fresh and dry weight of the plants in different treatments of *Macrophomina phaseolina* and *Pseudomonas fluorescence* UTPf125, 7 and 15 days after sowing, respectively. Data are the means ± SE of four replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly ($P<0.01$) according to LSD test.



شکل ۶- مقدار فنل کل در ریشه گیاهچه لوبیا پس از مایه‌زنی با قارچ *Macrophomina phaseolina* و باکتری UTPf125 *Pseudomonas fluorescence*. هرنقطه در نمودار میانگین ± خطای استاندارد چهار تکرار است. تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در آزمون LSD، ($P<0.05$) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 6. Total phenol content in bean seedling root after inoculation with *Macrophomina phaseolina* and *Pseudomonas fluorescence* UTPf125. Data are the means ± SE of four replicates. Treatments with the same letters do not differ significantly ($P<0.05$) according to LSD test.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

بحث

قارچ *M. phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی ذغالی، یکی از بیمارگرهای مهم خاکزاد است. این بیماری به خصوص در سال-های خشک و کم باران، باعث آلودگی مزارع و کاهش کیفیت و کمیت محصول می‌شود (Smith & Wyllie, 1999). دامنه میزبانی وسیع و توان تولید اسکلروت مقاوم در این قارچ باعث شده تا اقدامات زراعی (تناوب و آیش) به تنهایی جهت کنترل آن مفید نباشد. استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی نیز علاوه بر افزایش خطر ظهور نژادهای متحمل بیمارگر و آلودگی محیط زیست، اثر ناچیزی بر کنترل این بیماری داشته‌اند (Siddiqui & Mahmood, 1993; Eraghi & Rahnama, 2010). عوامل مهار زیستی مانند باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاهی (PGPR) علاوه بر اینکه رشد گیاه را افزایش می‌دهند، مکانیسم‌های مقاومت سیستمیک را نیز در میزبان فعال می‌کنند و در نتیجه باعث افزایش عملکرد و محصول می‌شوند. باکتری‌های آنتاگونیست محیط ریشه یکی از گروه‌های مهم باکتری‌های سودمند مسئول کنترل بیمارگرهای خاک‌زاد هستند (Weller, 1988). یکی از مهم‌ترین گروه‌های باکتری‌های PGPR که در خاک تحت مطالعه قرار گرفته، جنس سودوموناس است. سودوموناس‌های فلورسنت از مهم‌ترین عوامل مهار زیستی بیماری‌های گیاهی هستند که به صورت مستقیم، با تولید و ترشح متابولیت‌های بازدارنده و سیدروفورها، باعث محدودیت یا توقف رشد بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه قارچ‌ها می‌شوند و برخی نیز با تولید هورمون‌های مختلف سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Ahmadzadeh & Ghasemi, 2012).

آنتی‌بیوتیک‌ها با تاثیر روی بیمارگر و مختل ساختن اعمال حیاتی آن، از جمله سازوکارهای مهم در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شوند. در اغلب سیستم‌های بیمارگر-میزبان، سازوکار اولیه مهار زیستی بیمارگر توسط سودوموناس‌ها سازوکار آنتی‌بیوز است (Thomashow & Weller, 1991). به نظر می‌رسد که کارایی متغیر این باکتری‌ها ممکن است از تغییر در تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی در شرایط مختلف محیطی ناشی شود. محققان مختلف از جدایه‌های *P. fluorescens* انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید، ۵ هیدروکسی-فنازین ۲-کربوکسیلیک اسید، ۵-هیدروکسی-فنازین، ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول، پیولوتئورین و پیرول نیترین را گزارش و تاثیرات آن‌ها در بازداری از رشد ریسه قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها را اثبات کرده‌اند (Chin-A-Woeng et al., 1997; Savchuk et al., 2001). نتایج این تحقیق نشان داد که در آزمون تولید متابولیت‌های غیر فرار، سویه سودوموناس فلورسنت UTPf125 تاثیر قابل توجهی در کنترل بیمارگر داشت به‌طوری که این جدایه ۹۸ درصد کاهش رشد بیمارگر را سبب شد. همچنین تولید ترکیبات فرار توسط سویه‌های *P. fluorescens* یکی از سازوکارهای کنترل بیماری‌های قارچی است (Kraus & Loper, 1992; Laville et al., 1998). نتایج نشان داد که سویه سودوموناس فلورسنت UTPf125 دارای قدرت تولید مواد فرار بوده و با ۵۶ درصد بیش‌ترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ را سبب شد. پیشتر ژن‌های *hcnAB* و *phlD* که به ترتیب ژن‌های تولید سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک DAPG هستند در سویه UTPf125 ردیابی شدند (Shahbazi et al., 2016). در این پژوهش نیز سویه UTPf125 که با تولید ترکیبات فرار و غیرفرار بیش‌ترین بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر را در هر چهار آزمون سبب شد، برای ادامه آزمایش انتخاب شد. در شرایط گلخانه‌ای نیز این سویه قادر به کاهش معنی‌دار شدت بیماری شد.

یکی از اثرات قابل توجه ریزوباکتری‌ها، تاثیر آن‌ها در افزایش رشد گیاه میزبان است. نتایج بررسی وزن تر و خشک گیاه در تیمارهای مختلف نشان داد که استفاده از باکتری آنتاگونیست UTPf125 منجر به افزایش وزن گیاه در مقایسه با گیاه بیمار فاقد آن می‌شود. در باکتری‌های PGPR، افزایش رشد گیاه به واسطه تثبیت نیتروژن، حل کردن فسفات و تولید هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین و سیتوکینین و محرک‌های گازی رشد، نظیر اتیلن حاصل می‌شود (Vessey, 2003) و از طرفی توان آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنت علیه بیمارگرهای خاکزاد به آنزیم‌های تجزیه کننده تولید شده به وسیله این باکتری‌ها مربوط می‌شود (Meena et al., 2001; Velazhahan et al., 1999).

در مهار زیستی برای انتخاب سویه‌های آنتاگونیست باید سویه‌هایی را ارزیابی کرد که قادر به حضور و فعالیت در محیط ریزوسفر گیاه باشند. این مسئله از آن جهت حائز اهمیت است که خاک مانند یک بافر بیولوژیکی علیه باکتری‌های غیربومی عمل می‌کند و لذا هر نوع دستکاری در محیط اطراف ریشه ممکن است موقتی باشد. از این رو چه بسا یک سویه آنتاگونیست از نظر سازوکارهایی که در شرایط آزمایشگاهی در کنترل قارچ بیمارگر تحت بررسی قرار می‌گیرد، بسیار قدرتمند ظاهر شود، اما قادر به استقرار در ریزوسفر گیاه نباشد (Weller, 1988). در پژوهش قبلی تراکم جمعیت UTPF125 *P. fluorescens* را در اکتوریزوسفر گندم ۲۸ روز پس از مایه‌زنی بذر و کشت آن، $۱/۸ \times ۱۰^{۴}$ سلول باکتری در گرم ریشه بیان کردند (Shahbazi et al., 2016).

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

یکی از جنبه‌های مهم دفاعی گیاه میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، دفاع بیوشیمیایی و واکنش‌های پیچیده آن است (Steiner & Schonbeck,1995). سازوکارهای دفاعی گیاه در یک زمان بسیار کوتاه در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده فعال می‌شوند. یکی از اولین واکنش‌های دفاعی در سلول‌های زنده، افزایش غلظت گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species (ROS)) است. ROSها به طور طبیعی در غلظت کم در سلول‌های زنده وجود دارند و در شرایط تنش میزان آن‌ها افزایش می‌یابد. ROSها با اکسیداسیون پروتئین‌ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک و تجزیه مولکول‌های ضروری سلول سبب اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شوند. تولید و انتشار ROS توسط سلول گیاه اثر سمی مستقیم بر روی سلول‌های بیمارگر دارد و می‌تواند منجر به مرگ بیمارگر شود (Kulbat, 2016.). گیاهان به منظور محافظت از بافت‌های خود، سیستم آنتی اکسیدانی کارآمدی را توسعه داده‌اند که تجزیه ROS را بدنبال دارد. این سیستم شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند کاتالاز و غیر آنزیمی مانند اسید اسکوربیک (ویتامین C)، توکوفرول‌ها و توکوترینول‌ها (ویتامین E)، کاروتنوئیدها و چندین ترکیب فنلی است. ترکیبات فنلی از یک سو با عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود سبب حفظ سلول‌های گیاه در مقابل ROSهای تولیدی شده (Gill & Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012) و از سوی دیگر به‌عنوان پیش ساز بیوسنتز لیگنین عمل کرده و نقش مهمی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌کنند (Michalak, 2006). به‌منظور مطالعه نقش مهم لیگنین در بروز مقاومت گیاه، در آزمایشی گندم را با مهارکننده سنتز لیگنین تیمار کردند، که به کاهش مقاومت آن به بیماری زنگ با عامل *Puccinia graminis* منجر شد (Boudet, 2000).

میزان ترکیبات بیوشیمیایی تولید شده ازجمله ترکیبات فنلی در گیاهان مختلف و همچنین ارقام مختلف یک گیاه متفاوت است. این تفاوت در پاسخ گیاه به بیمارگر، سبب تفاوت در شدت بیماری ایجاد شده می‌شود (Shahbazi et al., 2010). در این پژوهش محتوای فنل کل به عنوان یک پاسخ دفاعی گیاه در برهمکنش با بیمارگر و عامل مهار زیستی افزایش یافت که این نتایج با نتایج Behrouzin (1997) مطابقت داشت. در تیمار باکتری آنتاگونیست و شاهد آلوده پس از افزایش اولیه تا روز سوم، میزان آن به شدت کاهش یافت. نتیجه قابل توجه این بود که کاهش آن در شاهد آلوده با بروز شدت بیماری به میزان ۷۵ درصد همراه بود، اما در تیماری که سویه باکتری آنتاگونیست و بیمارگر هر دو حضور داشتند هرچند بیش‌ترین میزان فنل کل ۵ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد و سپس کاهش یافت، اما در روزهای بعدی نیز به‌صورت معنی‌داری بیش‌تر از شاهد سالم و آلوده بود و شدت بیماری در این تیمار ۲۵ درصد اندازه‌گیری شد. پژوهشگران نشان دادند که اولین مرحله از واکنش‌های دفاعی گیاه میزبان شامل تجمع سریع ترکیبات فنلی در محل آلودگی است که رشد عامل بیماری را کند یا محدود می‌کند (Matern & Kneusel, 1988). با توجه به مشاهده میزان بیش‌تر ترکیبات فنلی در ریشه گیاهان گندم آلوده به قارچ عامل پاخوره گندم در مقایسه با ریشه گیاهان سالم، ترکیبات فنلی موجود در ریشه را در میزان حساسیت ارقام گندم به قارچ دخیل می‌دانند (Rengel et al., 1994). با توجه به این نتایج می‌توان تولید و حضور مداوم مقادیر بالای ترکیبات فنلی در بافت‌های مورد حمله بیمارگر را یکی از عوامل مؤثر در کنترل بیماری پوسیدگی ذغالی لوبیا دانست. البته نباید این نکته را فراموش کرد که در یک رابطه مهار زیستی، مجموعه‌ای از سازوکارهای مهارزیستی مانند تولید مواد فرار ضدقارچی، آنتی‌بیوتیک‌ها و رقابت در کنار القای مقاومت گیاه دخیل هستند که به افزایش وزن تر و خشک و کاهش ۵۰ درصدی شدت بیماری در گیاهان آلوده در این پژوهش منجر شدند.

سپاسگزاری

از همفکری و مشاوره دکتر دهقان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان قدردانی می‌نماییم.

REFERENCES

Ahmadzadeh, M. & Ghasemi, S. 2012. Introduction of *Pseudomonas fluorescens* as a new biocontrol agent in Iran. BCPPD 1: 49-60.

Ammarlou, A., Rouhani, M. & Mehdikhani-Moghaddam, A. 2010. Identification and investigation of pathogenicity of fungi causing root rot of wheat in North Khorasan province. JPP 24: 269-284.

Behrouzin, M. 1997. Effect of *Puccinia striformis* on some physiological, biochemical and histological phenomena of two wheat cultivars. Ph.D. dissertation in Plant Pathology. Tarbiat Modarres University. Tehran. 199 p.

Bhatia, I., Uppal, D. & Bajaj, K. 1972. Study of phenolic contents of resistant and susceptible varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*) in relation to early blight disease. Indian Phytopath. 25: 231-235.

Brisbane, P.G., Janik, L.J., Tate, M. & Warren, R. 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (NRRL B-15132). Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1967-1971.

Madloo, P. B., Behboudi, K., Tohidfar, M., Jouzani, G. S. & Ahmadzadeh, M. 2013. Response of some important Iranian wheat cultivars to *Fusarium culmorum* under genetic diversity of indigenous bio-control agent fluorescent *Pseudomonas* spp. Austral. J. Crop Sci. 7: 1003-1009.

Chancey, S.T., Wood, D.W., Pierson, E.A. & Pierson, L.S. 2002. Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3308-3314.

Chehri, k., Abbasi, S., Reddy, K. & Salleh, B. 2010. Occurrence and pathogenicity of various pathogenic fungi on cucurbits from Kermanshah province, Iran. African J. Microbiol. Res. 4: 1215-1223.

Chin-A-Woeng TF, de Priester W, van der Bij AJ, & Lugtenberg, BJ. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. MPMI 10: 79-86.

Dadgar, M. 2009**.** Flourishing in Lorestan agriculture. Jihad-e-Agriculture Organization of Lorestan Province Press, 174 pp.

Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of specific groups of *Trichoderma*: production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 25-39.

Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. 1973. Location of *Macrophomina phaseoli* on soybean plants related to culture characteristics and virulence. Phytopathol. 63: 934-936.

Dhingra, O.D., & Sinclair, J. B. 1995. Basic plant pathology methods. Boca Raton: Lewis publishers, 434 pp.

Eraghi, M.M. & Rahnama, K. 2010. Evaluation of *Bacillus subtilis* isolates in biological control of sunflower root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. JPP 34: 1-11.

Ershad, D. & Shirazi, G.H. 2004. Melon charcoal disease. JPP 5: 1-7.

Etebarian, H.R., Kheiri, A., Roustaei, A., Khodakaramian, G.H. & Aminian, H. 2007. Evaluation of *Pseudomonas* isolates for biological control of charcoal stem rot of melon caused by *Macrophomina phaseolina.* Acta Hort. 761: 157-162.

Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C. & Sayler, R.J. 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens.* Can. J. Microbiol. 51: 591-598.

Expert, J. & Digat, B. 1995. Biocontrol of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. Can. J. Microbiol. 41: 685-691.

Fiddaman, P. & Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 74: 119-126.

Gill, S. S. & Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiol. and biochem. 48: 909-930

Golpaygani, S., Zafari, D. & Khodakaramian, G. 2011. Biological control of important factors of root rot of bean by extra-root antagonist bacteria. Iranian J. Plant. Prot. Sci. 41: 283-292.

Howell, C. & Stipanovic, R. 1980. Suppression of *Pythium ultimium* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. Phytopathol. 70: 712-715.

Jain, A.K. & Yadav, H.S. 2003. Biochemical constituents of finger millet genotype associated with resistant to blast caused by *Pyricularia grisea*. Annu. Plant Protect. Sci. 11: 70-74.

Jimenez-Diaz, R.M., Blanco-López, M.A. & Sackston, W.E. 1983. Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. Plant Dis. 67: 1033-1036.

Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. & Dfago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. MPMI 5: 413.

Keel, C. & Defago, G. 1997. Interaction between Beneficial Soil Bacteria and Root pathogen: Mechanism and Ecological impact. Black well scientific publishers, London, pp: 27-46.

Kliebenstein, D.J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. Plant Cell Environ. 27: 675-684.

Kraus, J. & Loper, J. 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. Phytopathol. 82: 264-271.

Kulbat, K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. Biotechnol. Food Sci. 80: 97-108.

Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C. & Haas, D. 1998. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. J. Bacteriol. 180: 3187-3196.

Leong, J. 1986. Sidrophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annu. Rev. phtopathol. 24: 187-209.

Majnoun Hosseini, N. 2008. Agronomy and beans production. University of Tehran Press, 294 pp.

Matern, U. & Kneusel, R. 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica 16: 153-170.

Mazzola, M., Cook, R.J., Thomashow, L.S., Weller, D. & Pierson, L. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of *fluorescent pseudomonads* in soil habitats. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2616-2624.

Meena, B., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P. & Velazhahan, R. 2001. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. J. Plant. Dis. Prot. 108: 369-381.

Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Pol. J. Environ. Stud. 15: 523-530.

Ministry of Agriculture Statistics. 2017. Agricultural Statistics Crop Season 1391-92. *In* Economic and planning department. Center for Information and Communication Technology. Ministry of Agriculture Jihad Press, 154 pp.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]
[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]

Obethasli, T., Defago, G. & Haas, D. 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescences*: role of tryptophan side chain oxidase. J. Gen. Microbiol. 137: 2273-2279.

Pahlavani, M.H., Razavi, S.E., Mirizadeh, I. & Vakili, S. 2006. Field screening of safflower genotypes for resistance to charcoal rot disease. Int. J. Plant Prod. 1: 45-52.

Parashar, A. & Lodha, P. 2007. Phenolics estimation in *Foeniculum vulgare* infected with *Ramularia* blight. Annu. Plant Protect. Sci. 15: 396-398.

Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N. & Chaudthury, A. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot of cluster bean, using conventional techniques and PCR based molecular markers. Plant Pathol. 55: 106-116.

Rengel, Z., Pedler, J.F. & Graham, R.D. 1994. Control of Mn status in plants and rhizosphere: genetic aspects of host and pathogen effects in the wheat take-all interaction. *In* Manthey, J.A., Crowley, D.E. & Luster, D.G. (eds.), Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere. 125-145. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Savchuk S, Fernando WGD, Parks PS. 2001. Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. Can. J. Plant Pathol. 23: 205.

Schippers, B., Bkker, A.W. & Bakker, P. 1987. Interaction of deleterious and beneficial rhizospher microorganism and the effect of cropping practices. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 339-358.

Seevers, P.M. and Daly, J.M. 1970. Studies on wheat stem rust resistance controlled at the sr 6 locus 1- the role of phenolic compounds. Phytopathol. 60: 1322-1328.

Shahbazi, H., Aminian, H., Sahebani, N. & Halterman, D.A. 2010. Biochemical evaluation of resistance responses of potato to different isolates of *Alternaria solani*. Phytopathol. 100: 454-459.

Shahbazi, H., Behboudi, K, Javan Nikkhah, M. & Ahmadzadeh, M. 2016. Detection of *hcnAB* and *phlD* genes in fluorescent pseudomonads biological control agent of *Fusarium graminearum* and studying their ability to ectorhizosphere colonization of wheat. Biol. Control Pests Plant Dis. 4: 143-155.

Shanahan, P., O'Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D. & O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4 diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. Appl. Environ. Microbiol. 58: 353-358.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. & Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J. Botany 217037: 1-26.

Siddiqui, Z. A. & Mahmood, I. 1993. Biological control of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces lilacinus* and *Bacillus subtilis* alone and in combination in chickpea. Fund. Appl. Nematol. 16: 215-218.

Smith, G.S. & Wyllie, T.D. 1999. Charcoal Rot. *In* Hartman, G.L., Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (eds.), Compendium of soybean disease. 29-31. APS Press, American Phytopathological Society.

Steiner, U. & Schönbeck, F. 1995. Induced resistance to disease in plants. *In* Hammerschmialt, R. & Riyc, J. (eds.), Development in plant pathology. 86-110. Kluwer Academic Publishers.

Thomashow, L.S. & Weller, D.M. 1991. Role of antibiotics and sidrophores in biocontrol of take-all disease of wheat. Springer, Dordrecht, 245-251 pp.

Velazhahan, R., Datta, S.K. & Muthukrishnan, S. 1999. The PR-5 family: Thaumatin-like proteins. *In* Datta S.K., & Muthukrishnan, S. (eds.), Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press, pp: 107-129.

Vessey, K.J. 2003. Plant growth- promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-580.

Voisard, C.H., Keel, C.H., Haas, D. & Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescence* helps suppress black root rot of tobacco under gootobiotic condition. EMBO J. 351-358.

Weller, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizospher with bacteria. Annu. Rev. phytopathol. 26: 379-407.

Yamamoto, H., Hokin, H., Tani, T. & Kadota, G. 1977. Phenylalanine ammonia-lyase in relation to the crown rust resistance of oat leaves. J. Phytopathol. 90: 203-211.

*****

How to cite this article:

Pas, M., Shahbazi, H. & Ebrahimi, L. 2020. The biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against *Macrophomina phaseolina* and estimating the total phenol compounds of bean roots in this interaction. Nova Biologica Reperta 7: 64-75. (In Persian).

پاس، م.، شهبازی، ح. و ابراهیمی، ل. ۱۳۹۹. بررسی اثر مهار زیستی قارچ *Macrophomina phaseolina* توسط باکتری سودوموناس فلورسنت روی گیاه لوبیا و ارزیابی میزان فنل کل ریشه. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۷۵-۶۴.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.1.12.4]

[DOI: 10.29252/nbr.7.1.64]