آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۵، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۶

ارزیابی توان آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر سیب‌زمینی در کنترل *Ralstonia solanacearum* در شرایط گلخانه

المیرا حسنی[۱] و غلامرضا خداکرمیان[۲]✉
۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی؛ استاد؛
گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۴؛ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۶)

چکیده

این پژوهش، با هدف ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتری‌های *Pseudomonas fluorescent* علیه *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در گلخانه انجام شد. تعداد ۸۰ استرین سودوموناس روی محیط کشت King's B از خاک پیرامون ریشه و غده سالم گردآوری شده از ۱۰ مزرعه جدا شد. باکتری *R. solanacearum* از سیب‌زمینی آلوده روی محیط کشت اختصاصی دارای تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) جداسازی شد. توانایی استرین‌های باکتری‌های *P. fluorescent* در جلوگیری از رشد بیمارگر با استفاده از آزمون کشت سه نقطه‌ای و اندازه‌گیری هاله بازدارنده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. نتایج نشان داد که استرین‌های EH87، EH203 با میانگین قطر هاله بازدارنده ۳/۷۸ و ۳/٦٥ سانتی‌متر و استرین‌های EH27 و EH40 با میانگین قطر هاله بازدارنده ۱/۸۵ و ۱/٥٤ سانتی‌متر به ترتیب بیشترین و کمترین درصد بازدارندگی از رشد را نشان دادند. بر مبنای نتیجه آزمایش بازدارندگی در آزمایشگاه از میان استرین‌های بررسی شده، تعداد نه استرین به عنوان نماینده برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. نتایج تعیین ویژگی‌های فنوتیپی و واکنش فوق حساسیت در برگ‌های توتون نشان داد که این نه استرین به گونه‌های *Pseudomonas putida* و بیووارهای یک، دو و چهار *P. fluorescens* تعلق دارند. توان آنتاگونیستی استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت علیه باکتری *R. solanacearum* در شرایط گلخانه با روش آغشته‌سازی نشاء در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار بررسی و فاکتورهای رشد پس از سه ماه اندازه‌گیری و ثبت شد. نتایج نشان داد که استرین‌های EH70، EH49 کارایی بیوکنترلی بالایی نسبت به شاهد آلوده داشته و توانستند به ترتیب میزان بیماری را ٨٤ و ۷۵ درصد کاهش دهند. ژن‌های کد کننده 16SrRNA استرین‌های برگزیده با استفاده از پرایمرهای همگانی توسط PCR تکثیر و سپس توالی یابی شد. نتایج نشان داد که استرین EH53، ۹۸ درصد به باکتری‌های، *Pseudomonas fluoresent* شباهت دارد.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، سیب‌زمینی، *Pseudomonas fluorescens*، *Ralstonia solanacearum*.

Assessment of antagonistic activity of fluorescent pseudomonads isolated from potato rhizospher towards *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions

E. HASANI[1] and G. KHODAKARAMIAN[2]✉
1 and 2- MSc. Student, Professor, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran

Abstract

This study was conducted to evaluate of the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Ralstonia solanacearum* in greenhous. A total of 80 strains of fluorescent pseudomonads were isolated from the soil around the healthy potato roots and tubers collected from 10 farms on King' s B medium (KB). The bacterial *R. solanacearum* strains were isolated on nutreient agar (NA) medium containing triphenyltetrazolium chloride (TTC). Antagonistic activity of pseudomonads strains was evaluated in a completed randomized design with three replicates *in vitro*. The bacterial strains EH87 and EH203 with 3.78 and 3. 65 cm growth inhibition zone were the most effective and EH27 and EH40 strain with 1. 85 and 1.54 cm had the least effect. The phenotypic feature of the antagonistic representative's strains and their hypersensitive reaction on tobacco leaf showed that they were belonged to *Pseudomonas putida* and *P. fluorescens* (bv. I, II & IV). Based on the result of laboratory experiment nine representative strains were selected for further studies in a randomized design under greenhouse condition. After three months, growth factors of the plants and disease severity were measured and recorded. Results showed that EH70, EH49 bacterial strains had a high biocontrol effect in compare to contaminated control. They reduced the potato wilt disease caused by *R. solanacearum* 84% and 75% respectively. Total DNA from antagonistic representaives strains were used as a template to amplify 16SrRNA encoding gene using universal primers in PCR. Results showed that the strain EH53 had 98 percent sequence similarity to *Pseudomonas fluoresens*.

Key words: Biological control, Potato, *Pseudomonas fluorescent*, *Ralstonia solanacearum*.

✉ **Corresponding author: khodakaramian@yahoo.com**

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tubersum* L.) یکی از محصولات غده‌ای است که نقش مهمی در تغذیه مردم جهان به‌ویژه کشورهای جهان سوم دارد. این محصول با سطح زیر کشت ۲۲ میلیون هکتار و به علت داشتن محتوای کربوهیدراتی و کولتیوارهای چند منظوره چهارمین محصول غذایی جهان به شمار می‌رود (Secor and Gudmestad, 1999). در ایران استان‌های اردبیل، اصفهان، همدان، آذربایجان شرقی، خراسان، گلستان، سمنان و تهران به ترتیب به ترتیب رتبه‌های برتر تولید سیب‌زمینی آبی کشور را دارند (Khajehpour, 2012). از لحاظ اهمیت، باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل دومین بیماری مهم سیب‌زمینی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان بعد از بلایت دیررس سیب‌زمینی می‌باشد (Champoiseau *et al*., 2010). خسارت این بیماری در ۸۰ کشور جهان در ۱/۷ میلیون هکتار سطح زیر کشت سیب‌زمینی، بالغ بر ۹۵۰ میلیون دلار در سال گزارش شده است (Champoiseau *et al*., 2009). بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در بیش از ۹۰٪ موارد توسط گروهی از استرین‌ها بنام استرین سیب‌زمینی (بیووار۲/نژاد۳) ایجاد می‌شود. این استرین اگرچه اختصاصی سیب‌زمینی است ولی در شرایطی که مقدار اینوکلوم آن زیاد و دما مساعد باشد، می‌تواند برخی گیاهان دیگر را نیز آلوده کند (French, 1994; Hayward, 1991). دامنه میزبانی این باکتری بسیار وسیع و متنوع بوده و شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، بادمجان، فلفل، بادام‌زمینی، تنباکو، موز دیپلوئید و تعداد زیادی از گیاهان سولاناسه می‌باشد. همچنین بسیاری از گیاهان در خانواده‌های دیگر میزبان این باکتری می‌باشند (Denny, 2007) خاک آلوده، بقایای گیاهی، غده‌های آلوده، فرا ریشه گیاهان میزبان، آب‌های سطحی و علف‌های هرز به عنوان پناهگاه‌های مناسب برای حفظ و بقای *R. solanacearum* معرفی شدند (Denny, 2007). با توجه به وجود باقیمانده‌های سموم شیمیایی در فراورده‌های کشاورزی و به دنبال آن بروز آسیب‌های فراگیر در سلامتی مصرف‌کنندگان، جایگزینی سموم و کودهای شیمیایی با موادی که بتوانند در عملیات کشاورزی پایدار مورد استفاده قرار گیرند، بدون اینکه محیط زیست را تحت تاثیر قرار دهند، ضروری به نظر می‌رسد (Prabhat *et al*., 2013). در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، به خصوص باکتری‌های متعلق به سودوموناس‌های فلورسنت از قبیل *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفته است. میکروارگانیسم‌های ناحیه ریزوسفر گیاهان، گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیک می‌باشند، زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزاد است (Weller, 1988). توانایی تولید آنتی‌بیوتیک (Fravel, 1988; Picard *et al*., 2000)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین (Leong, 1986; Schippers *et al*., 1987)، سیانید هیدروژن (Voisard *et al*., 1989) و آنزیم پروتئاز (Keel and Deffago, 1997) از مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی توسط این سودوموناس‌های فلورسنت به شمار می‌رود. این باکتری‌ها محیط اطراف ریشه را کلونیزه کرده و با تولید متابولیت‌هایی مانند سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند فنازین-۱-کربوکسیلات، pyoluteorin و DAPG (۴ و ۲- دی استیل فلورو گلوسینول) ترکیب میکروفلور ریزوسفر را تغییر می‌دهند (Cronion *et al*., 1997; Xu and Gross, 1986). استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت در تولیدات کشاورزی، بستگی به دانش و آگاهی ما از روابط بین آن‌ها و گیاهان و همچنین توانایی ما در حفظ، تکثیر و تغییر جمعیت باکتری‌های مفید در شرایط مزرعه‌ای دارد (Hallmann *et al*., 1997). با توجه به سطح زیر کشت سیب‌زمینی در استان همدان و همچنین به دلیل اهمیت جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست و به کارگیری آنها در کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های

فلورسنت مرتبط با ریزوسفر سیب‌زمینی و ارزیابی اثرات آنتاگونیستی آن‌ها بر علیه *R. solanacearum* در شرایط گلخانه‌ای انجام شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت: به‌منظور جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت محرک رشد، طی بازدیدهای به عمل آمده از مزارع سیب‌زمینی در استان همدان، بوته‌های شاداب و دارای رشد مطلوب به همراه ریشه و خاک اطراف ریشه نمونه‌برداری و برای جداسازی و بررسی‌های بعدی به آزمایشگاه منتقل شد. جدایه‌های باکتری با استفاده از روش سری رقت و محیط‌های کشت King's B و آگار غذایی (Nutrient Agar) جداسازی شدند. به این منظور، ابتدا خاک اطراف ریزوسفر بوته‌ها، جمع‌آوری شده و سپس از نمونه خاک هر مزرعه یک گرم برداشته و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حل و رقت‌های سریال تهیه شد. یک میلی‌لیتر از هر رقت با استفاده از پیپت پاستور سترون در تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت آگار غذایی کشت شد. تشتک‌های کشت داده شده در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، از هر تشتک تک کلنی یا تک کلنی‌هایی که ویژگی‌های تیپ *Pseudomonas* را داشتند، به‌طور تصادفی انتخاب و به منظور خالص سازی روی محیط کشت جدید به صورت مخطط کشت شد. برای بررسی‌های بعدی، سوسپانسیون غلیظی از باکتری‌های تازه کشت شده در میکروتیوب‌های حاوی آب مقطر سترون تهیه و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استرین‌ها مطابق روش‌های استاندارد شناسایی باکتری‌ها مورد بررسی شد (Klement *et al*., 1990; Schaad *et al*., 2001).

جداسازی استرین عامل بیماری: غده‌ها و ساقه‌های آلوده با علائم پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی، با آب شسته، خشک، با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی و درون تشتک پتری سترون قرار داده شد و سپس همراه با مقداری آب مقطر سترون، به قطعات کوچک‌تر خرد شده؛ پس از ۱۵ دقیقه، یک لوپ از سوسپانسیون حاصل، روی محیط کشت افتراقی حاوی تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) مخطط شد. همچنین سطح غده‌ها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی و روی شعله گرفته شد. سپس با استفاده از اسکالپل سترون برش داده شد. لوپ سترون را درون حلقه آوندی زده و در تشتک پتری حاوی محیط کشت TTC به صورت مخطط کشت شد و ظروف پتری در انکوباتور و در دمای ۲۸-۳۰ درجه سیلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت کلنی‌های برآمده، لعاب‌دار و سفید رنگ یا دارای مرکزی به رنگ قرمز روشن انتخاب و به منظور خالص‌سازی بر روی محیط آگار غذایی (NA) مخطط شد. به منظور بررسی‌های بعدی، سوسپانسیون غلیظی از کشت تازه باکتری تهیه و در یخچال نگهداری شد.

اثبات بیماری‌زایی *Ralstonia solanacearum*: اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها براساس روش وینستد و کلمن روی گوجه‌فرنگی انجام شد (Winstead and Kelman, 1952). در طوقه بوته‌های گوجه‌فرنگی کاشته شده (۳-۴ برگی) زخمی ایجاد و سپس سوسپانسیون باکتری با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به محور زخم اضافه شد. برای هر استرین سه تکرار در نظر گرفته شد و به بوته‌های شاهد هم آب سترون تزریق شد. پس از ظهور علائم بیماری پژمردگی باکتریایی (زردی و پژمردگی برگ‌ها)، عامل دوباره جدا و ویژگی‌های آن با باکتری تلقیح شده تطبیق داده شد.

ارزیابی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده در آزمایشگاه علیه *R. solanacearm*: به این منظور از روش کشت متقابل (Dual culture) و بخار کلروفرم با کمی تغییر استفاده شد (Ryan *et al*., 2004). باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی به صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک‌های پتری و به فاصله یک سانتی‌متر از حاشیه روی محیط آگار غذایی، کشت داده

شدند. همچنین در نمونه شاهد، به جای کشت باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۷۲–۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. دو قطره کلروفرم به هر تشتک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه به شکل وارونه در زیر هود قرار داده شدند. سپس درب تشتک‌ها را برداشته و به منظور از بین رفتن اثر کلروفرم به مدت ۳۰ دقیقه زیر هود هوادهی شدند. سپس سوسپانسیونی از باکتری *Ralstonia solanacearum* با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و دو میلی‌لیتر از آن به تشتک‌های هوادهی شده اضافه و به صورت چمنی پخش شد. تشتک‌ها به مدت ۷۲–۴۸ ساعت در دمای ۲۸–۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها ارزیابی شد. این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای انتخاب جدایه‌های مناسب جهت به کار بردن در شرایط گلخانه، میانگین‌های به دست آمده توسط آزمون دانکن مقایسه و نماینده گروه‌های عمده انتخاب شدند.

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده از رایزوسفر سیب‌زمینی براساس ویژگی‌های فنوتیپی: به‌منظور شناسایی جدایه‌ها از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی (بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و مولکولی) استفاده شد. براساس تولید رنگ دانه فلورسنت در محیط کشت افتراقی King's B و الگوی پروتئینی و همچنین با توجه به نتایج حاصل از تعامل در شرایط آزمایشگاهی، هفده جدایه به عنوان نماینده انتخاب و برای انجام آزمون‌های فنوتیپی به کار برده شدند. ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های نماینده به شرح زیر بررسی شد:

آزمون حساسیت به KOH 3% به روش Suslow *et al.* (1982)، آزمون هوازی یا بی‌هوازی بودن (O/F) به روش Hugh and Leifson (1953)، آزمون اکسیداز به روش Kovacs (1956)، آزمون فوق حساسیت در توتون به روش Klement *et al.*, (1964)، تولید لوان روی محیط کشت دارای سوکروز ۵٪ و احیای نیترات به روش Lelliot and Dickey (1984)، هیدرولیز آرژنین به روش Thornley (1960)، آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، تحمل نمک طعام پنج درصد، لهانیدن سیب‌زمینی، رشد در دمای ۴ و ۴۱ درجه سلسیوس و تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت کینگ بی به روش Schaad *et al.* (2001)، هیدرولیز نشاسته به روش Graham and Hodgkiss (1967) و ذوب ژلاتین به روش Mac Faddin (1980) انجام شد. برای بررسی تولید قند از کربوهیدرات‌های گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، مانیتول، سوکروز، زایلوز، آرابینوز، آدونیتول، سوربیتول، اتانول و گلیسرول و استفاده استرین‌ها از اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه شامل، سیترات و آرژنین از محیط پایه Ayer *et al.* (1919) استفاده شد. تمامی قندها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی پس از تندال شدن به غلظت نهایی ۰/۲ درصد به محیط Ayer *et al.* (1919) که حاوی ۱/۲٪ آگارز بود اضافه شده و نتیجه آزمون‌ها در موارد ضروری تا یک ماه پس از کشت بررسی شد.

ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتری‌های *P. fluorescent* جدا شده از رایزوسفر سیب‌زمینی علیه باکتری عامل پژمردگی سیب‌زمینی در شرایط گلخانه: به دلیل دامنه میزبانی وسیع باکتری بیماری‌زای *R. solanacearum*، ارزیابی روی گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد. بذور گوجه‌فرنگی رقم فلات از مرکز تحقیقات استان همدان تهیه و به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضدعفونی سطحی و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده و سپس در سینی‌های نشاء سترون حاوی ورمی کمپوست کاشته شد. پس از یک ماه که نشاءها ۴ الی ۶ برگی شدند، سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (10^8 cfu/ml) تهیه و نشاءها به مدت یک ساعت در سوسپانسیون حاوی باکتری آنتاگونیست قرار گرفت و پس از آن به مدت ۶ ساعت در معرض هوای زیر هود قرار داده شد تا به‌طور کامل خشک شوند. سپس به گلدان‌هایی با تراکم $۱۰^۸$ واحد تشکیل دهنده پرگنه از باکتری *R. solanacearum* انتقال داده شدند (سه بوته در هر گلدان و در سه تکرار). به‌منظور مشاهده اثر باکتری‌های

آنتاگونیست روی رشد گیاه گوجه‌فرنگی در خاک فاقد بیمارگر، گیاهان با باکتری آنتاگونیست به تنهایی نیز تیمار شدند. در گلدان‌های شاهد نیز بوته آغشته به سوسپانسیون باکتری بیمارگر قرار داده شد. در سه گلدان نیز بوته‌های آغشته شده با آب سترون کشت شد. گلدان‌های کشت شده به مدت حدود ۲ ماه در گلخانه نگهداری شد. در این آزمون نه استرین از باکتری‌های آنتاگونیست در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار آزمایش شد. بعد از رشد کامل بوته‌ها، نتایج فاکتورهای مورد بررسی ثبت و بوته‌های گوجه‌فرنگی برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از اندازه‌گیری فاکتورهای رشد، بوته‌های گوجه‌فرنگی به مدت سه روز در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در آون قرار داده شد تا به‌طور کامل خشک شود و سپس وزن خشک ساقه و ریشه بوته‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد. شدت بیماری هم با نمره‌دهی صفر تا چهار انجام شد (Park *et al*., 2007). برای سنجش شدت بیماری، فاکتور شادابی در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با نه تیمار در سه تکرار انجام گرفت. برای ارزیابی شدت بیماری هم باتوجه به اینکه در بین داده‌ها عدد صفر وجود داشت برای نرمال کردن، درصدهای به دست آمده با استفاده از فرمول $\sqrt{X+0.5}$ تبدیل گردیدند و تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SAS 9.2 و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): جداسازی DNA از سلول‌های باکتریایی به روش لایز قلیایی انجام شد (Drancourt *et al*., 2000). شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست ناحیه‌ی رایزوسفر سیب‌زمینی، علاوه بر تعیین ویژگی‌های فنوتیپی به روش‌های استاندارد باکتری شناسی، از آغازگرهای تکثیر16SrRNA استفاده شد. توالی ژن 16SrRNA استرین EH53، که به وسیله آغازگرهای FD1 و RD1 تکثیر شدند، محصول واکنش آن‌ها به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. توالی ژن 16SrRNA به دست آمده با سایر توالی‌ها در بانک اطلاعات NCBI به وسیله نرم افزار بلاست مقایسه شد.

با توالی بدست آمده و توالی‌های مستخرج از بانک ژن، کلادوگرام استرین‌ها با روش اتصال همسایه‌ای (Neighbour-joining) و با استفاده از نرم افزار MEGA5 با bootstrap۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید.

نتیجه و بحث

تعداد ۲۰۰ جدایه باکتری از مزارع سیب‌زمینی در استان همدان جداسازی و خالص‌سازی شد. ۸۰ جدایه با استفاده از محیط کشت افتراقی King's B، سودوموناس‌های فلورسنت تشخیص داده شدند و اثر آنتاگونیستی آن‌ها علیه باکتری عامل بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی روی محیط کشت آگار غذایی (NA) بررسی شد. ۱۷جدایه علیه *R. solanacearum* هاله بازدارنده ایجاد کردند. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های انتخاب شده براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استاندارد تعیین شد. تمام جدایه‌های انتخابی و بررسی شده قادر به تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت King's B بودند و هیچیک از جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در شمعدانی و رشد در دمای چهار و ۴۱ درجه نبودند. تولید لوان روی محیط دارای ساکارز ۵٪ در جدایه‌های مورد بررسی مثبت بود. و غالب جدایه‌های بررسی شده قادر به استفاده از کربوهیدرات‌ها بودند. نتایج آزمون‌های فنوتیپی در جدول شماره یک آمده است. بر اساس خصوصیات فنوتیپی ارایه شده توسط Shaad *et al*. (2001) جدایه‌های مورد بررسی به گونه‌های *P. fluorescent* منتسب شدند. نتیجه ارزیابی توان آنتاگونیستی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه *R. solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه به صورت مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی تیمارها در جدول ۲ و تجزیه واریانس آن‌ها در جدول ۳ خلاصه شده است.

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سودوموناس‌های فلورسنت جدا شده از رایزوسفر سیب‌زمینی

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of fluorescent pseudomonads isolated from potato rhizospher

Test	Reaction
O/F	O
KOH 3%	+
Catalase	+
NaCl 5%	-
Strach hydrolysis	-
Nitrate reduction	+
Lipase	+
Urease	+
Florescent	+
Diffusible non – fluorescent pigment	-
Arginine dihydrolase	+
Oxidase	+
Growth at 41 ℃	-
Growth at 4 ℃	-
Gelatine liguifection	+
Potato rot	-
HR	-
Levan	+
Use of:	
L-arabinose	+
D-Xylose	+
D-galactose	V
Sucrose	+
Glucose	+
Manitol	V
Glyceol	+

-: واکنش منفی ۸۰٪ یا بیشتر جدایه‌ها (Negative reaction) ، +: واکنش مثبت ۸۰٪ یا بیشتر جدایه‌ها (Positive reaction) ، V: متغییر (۲۱ تا ۷۹٪ استرین‌ها مثبت).

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های قطر هاله بازدارنده سودوموناس‌های فلورسنت علیه باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط آزمایشگاه با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

Table 2. Groping of fluorescent seudomonads based on their inhibition zone towards *Ralstonia solanacearum in vitro* using using Duncan test at a probability level 1%

میانگین قطر هاله بازدارنده Inhibition zone (cm) [x]	استرین باکتری Bacterial strain
3.78[a]	EH87
3.65[ab]	EH203
3.22[abc]	EH73
3.11[abc]	EH49
3.06[abc]	EH80
2.81[bdc]	EH53
2.68[dc]	EH42
2.67[dc]	EH16
2.61[dc]	EH70
2.50[dc]	EH46
2.44[edc]	EH54
2.43[edc]	EH144
2.02[edf]	EH38
2.03[edf]	EH60
1.85[edf]	EH56
1.54[ef]	EH27
1.39[f]	EH40
0[g]	C+

میانگین‌هایی با گروه آماری متفاوت در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری دارند.

X: Means showed with different letters had significant differences in 1% level.

جدول ۳- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قطر هاله بازدارنده باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی علیه *Ralstonia solanacearum*

Table 3. Statistical analyses of fluorescent pseudomonades inhibition zone data against *Ralstonia solanacearum*

منابع تغییرات Source	درجه آزادی DF	جمع مربعات SS	میانگین مربعات M	F
کل Total	53	45.65	-	
تیمار Treatment	17	40.50	2.38	16.66**
خطا Error	36	5.14	0.14	

** : معنی‌دار در سطح ۱٪

**: Significant difference at 1% level

بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌ها علیه *R. solanacearum* در شرایط آزمایشگاه نشان داد که یک سوم جدایه‌ها دارای توانایی تولید هاله بازدارنده از رشد بوده و از این نظر در گروه‌های آماری متفاوت قرار گرفتند. در بین جدایه‌های مورد مطالعه در آزمایشگاه، جدایه‌های EH87، EH203 و EH73 به ترتیب بیشترین توانایی آنتاگونیست را نشان دادند. مکانیسم‌های دخیل در توانایی آنتاگونیستی این باکتری‌ها می‌تواند شامل تولید سیدروفور، هورمون اکسین، آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن و یا ترکیبی از این‌ها باشد (Beneduzi *et al.*, 2012). این موضوع می‌تواند دلیل محکمی بر انتخاب جدایه‌های مورد مطالعه برای بررسی‌های گلخانه‌ای باشد. با توجه به نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی تعداد نه جدایه انتخاب و در یک غلظت به صورت آغشته‌سازی ریشه نشاهای گوجه‌فرنگی به کار رفت. تمام این جدایه‌ها توانایی کاهش مرگ و میر بوته‌های گوجه‌فرنگی در اثر *R. solanacearum* را داشتند، ولی هیچکدام قادر به کنترل کامل بیماری نبودند (شکل ۱). همچنین Priou (2004) نیز کاهش ۸۰٪ بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *R. solanacearum* را در گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با *Pseudomonas putida* در شرایط گلخانه به دلیل تولید آنتی بیوتیک و مواد محرک رشد گزارش کردند که با نتایج به دست آمده از این آزمایش مشابه است.

اثر آنتاگونیستی *Pseudomonas* sp. در بازدارندگی پژمردگی باکتریایی در تنباکو توسط Lio *et al.* (1999) از طریق تولید آنتی بیوتیک‌ها و متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است که مشابه نتایج به دست آمده در این پژوهش مبنی بر اثر بازدارندگی استرین های سودوموناس به دلیل تولید آنتی بیوتیک و متابولیت‌های ثانویه است. بررسی اثر سویه‌های باکتری روی شاخص‌های رشدی گیاه از جمله ارتفاع ریشه و ساقه، وزن تر در نمودار یک و دو نشان داده شده است و گروه‌بندی ارزیابی شدت بیماری تیمارها در جدول چهار خلاصه شده است.

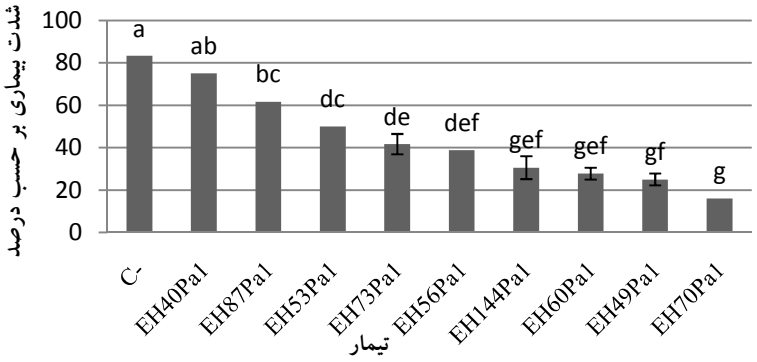
جدول ٤- گروه‌بندی شدت بیماری ناشی از *Ralstonia solanacearum* در خاک آغشته به تعداد نه استرین باکتری آنتاگونیست

Table 4. Groping of disease severity caused by *Ralstonia solanacearum* in soil infested with nine antagonistic bacterial strains

استرین باکتری	شدت بیماری
کنترل منفی	83.33^{a}
$EH40Pa_1$	75^{ab}
$EH87Pa_1$	61.66^{bc}
$EH53Pa_1$	49.99^{dc}
$EH73Pa_1$	41.66^{de}
$EH56Pa_1$	38.88^{def}
EH144Pa1	30.56^{gef}
$EH60Pa_1$	27.77^{gef}
$EH49Pa_1$	25^{gf}
$EH70Pa_1$	16^{g}

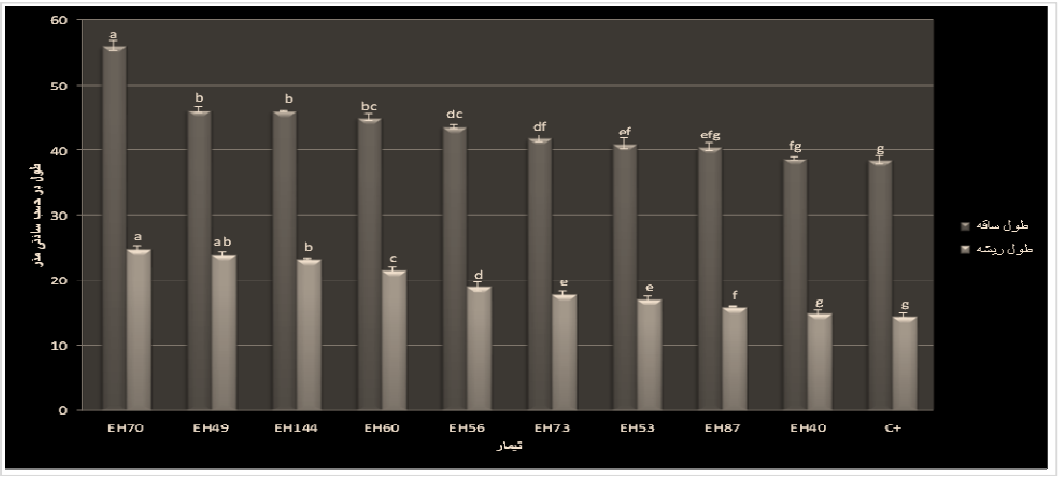
Pa1: عامل بیماری، EH: جدایه های سودوموناس فلورسنت؛ X: میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری ندارند.

X: Columns with the same letters are not significantly different based on Duncan test (P≤0.01).



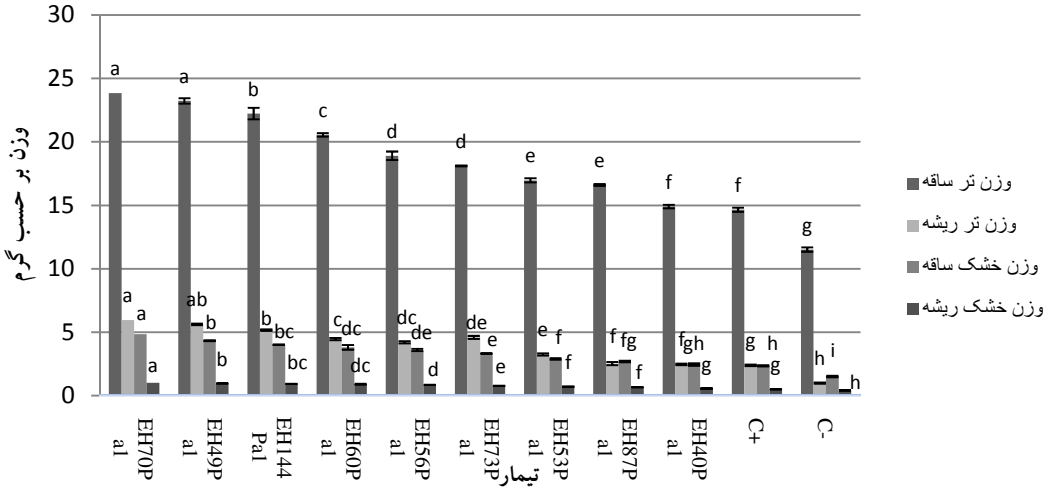
نمودار ۱- اثر باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جدا شده از سیب‌زمینی بر کاهش شدت بیماری گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با *Ralstonia solanacearum*

Fig. 1. The effect of *Pseudomonas florescent* bacteria isolated from potato on the reduction of tomato disease severity inoculated with *Ralstonia solanacearum*



نمودار ۲- میانگین ارتفاع اندام هوایی و ریشه تیمارهای مایه‌زنی شده با *R. solanacearum* (مقایسه آماری در سطح احتمال ۵٪ انجام شده است).

Fig. 2. The average length of shoot and root treatments inoculated with *R. solanacearum*



نمودار ۳- میانگین وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ی مایه زنی شده با *R. solanacearum*(مقایسه آماری در سطح احتمال ۵٪ انجام شده است).

Fig. 3. The average fresh and dry weight of tomato aerial parts and roots inoculated with *R. solanacearum*

شکل ۱- بررسی اثر جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر شاخص‌های رشد گیاه گوجه‌فرنگی و قابلیت بیوکنترل *Ralstonia solanacearum*.

به ترتیب از سمت چپ به راست: شاهد کنترل مثبت، گیاه بیمار (کنترل منفی)، آنتاگونیست و بیمارگر

Fig. 1. Effect of antagonistic isolates on growth promoting efficacy and biocontrol of *Ralstonia solanacearum*.

Respectively from left to right: positive control, negative control antagonist and pathogen treatment

در بین نه باکتری سودوموناس فلورسنت بررسی شده در گلخانه، بیشترین میزان افزایش در بیوماس گیاهی (ارتفاع و وزن خشک و تر گیاه)، توسط جدایه‌های 70EH، 49EH و 144EH ثبت شد و بیشترین کاهش شدت بیماری هم توسط جدایه EH70 و EH49 بود که همه جدایه‌ها نسبت به کنترل منفی و مثبت تفاوت معنی داری داشتند. بر این اساس، نتایج حاصل از این بررسی در خصوص اثرات آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنتی مورد بررسی، با نتایج بیشتر مطالعات انجام شده مطابقت داشت و این مطالعات مشخص کردند که جدایه‌های فلورسنتی به‌طور معنی‌داری از رشد باکتری پاتوژن جلوگیری می‌کند (Ran *et al*., 2005; Henok *et al*., 2007; Lemessa and Zeller, 2007).

با توجه به کلادوگرام حاصله استرین EH53، ۹۸٪ شباهت با *Pseudomonas fluorescent* داشت. میزان و ترتیب بازدارندگی استرین‌های بررسی شده در شرایط آزمایشگاه با گروه‌بندی جدایه‌ها در شرایط گلخانه تا حدودی متفاوت است. برخی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه دارای بالاترین بازدارندگی بودند ولی در شرایط گلخانه در رده‌های بعدی قرار گرفتند. جدایه‌هایی نیز در شرایط آزمایشگاهی توانایی بازداری از رشد کمی را داشتند اما در شرایط گلخانه از خود توان بازدارندگی بیشتری را نشان دادند. مشاهده این پدیده گویای پیچیده بودن و تنوع مکانیسم‌های بازدارندگی بوده که برخی از این مکانیسم‌ها مانند رقابت بر سر مکان، غذا و توان کلونیزه کردن ریشه در آزمایشگاه به دلیل شرایط حادث شده، فرصت بروز پیدا نمی‌کنند. در گزارش‌های منتشر شده محققین دیگر نیز این پدیده به ثبت رسیده است (Abdelghafar and Abdelsayed, 1997; Cronin *et al*., 1997; Xu and Gross, 1986). در شرایط آزمایشگاهی محیط آزمایشگاه به‌صورت کنترل شده و بدون دخالت میزبان، شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک و سایر میکروارگانیسم‌های خاکزی می‌باشد. تفاوت‌هایی که در عملکرد میکروارگانیسم‌های مختلف در شرایط متفاوت دیده می‌شود را می‌توان به دخالت شرایط محیط، میزبان و وجود سایر مکانیسم‌های بیوکنترل نسبت داد، چرا که شرایط طبیعی بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاه بوده و میکروارگانیسم از تمام پتانسیل خود برای بقاء و رقابت با سایر موجودات ریز اطراف ریشه استفاده می‌نمایند. وجود چنین شرایط پیچیده‌ای در محیط و اثر متقابل این شرایط تعیین کننده سهم هریک از مکانیسم‌های بیوکنترل می‌باشد (Cronin *et al*., 1997; Xu and Gross, 1986).

References

ABDELGHAFAR, N. Y. and W. M. ABDELSAYED, 1997. Biological control of bacterial soft rot of potato by using fluorescent pseudomonads. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences, Egypt.

AYER, S. H., P. RUPP and W. T. JOHNSON, 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. U. S. Dept. Agric. Bull. 782.

BENEDUZI, A., A. AMBROSINI and L. M. PASSAGLIA, 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology, 35: 1044-1051.

CHAMPOISEAU, P. G., J. B. JONES and C. ALLEN, 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Plant Health Progress, 10: 1-10.

CHAMPOISEAU, P. G., J. B. JONES, T. M. MOMOL, J. PINGSHENG, C. ALLEN, D. J. NORMAN, K. CALDWELL, 2010. *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 causing brown rot of potato, bacterial wilt of tomato and southern wilt of geranium [Online]. Available at http://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/NRI_Project/Projectsummary.html, (Accessed 25 June 2010), American Phytopathological Society. Madison, WI.

CRONIN, D., Y. MOËNNE-LOCCOZ, A. FENTON, C. DUNNE, D. N. DOWLING and F. O'GARA, 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2, 4-

mechanisms and ecological impact, In Gange, A. C. and Brown, V. K. (eds.), Multitrophic interactions in terrestrial systems. Blackwell Scientific Publishers, London, United Kingdom. pp. 27-46.

KLEMENT, Z., G. L. FARKAS and L. LOVREKOV, 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474.

KLEMENT, Z., K. RUDOLPH and D. C. SAND, 1990. Methods inphytobacteriology. Akademiai Kiado Budapest, 540 pp.

KAJEHPOUR, M. 2012. Industerial Plants. Iran Isfahan University Jahad publication, 582 pp.

KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178: 703.

LELLIOT, R. A. and R. S. DICKEY, 1984. Genus VII Erwinia, In: Krieg, eds. N. R., Halt, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co., The Baltimore Vol, 1: 469-476.

LEMESSA, F. and W. ZELLER, 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biological Control, 42: 336-344.

LEONG, J. 1986. Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 24: 187-209.

LIU, Q. G., Z. LI, Z. TANG and X. M. ZENG, 1999. "Control of tobacco bacterial wilt with antagonistic bacteria and soil amendment". Chinese Journal of Biological Control 15: 94-95.

MAC FADDIN, J. F. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore.

PARK, E. J., S. D. LEE, E. J. CHUNG, M. H. LEE, H. Y. UM, S. MURUGAIYAN and S. W. LEE, 2007. MicroTom-A model plant system to study bacterial wilt by *Ralstonia solanacearum*. The Plant Pathology Journal, 23: 239-244.

PICARD, C. DI., F. CELLO, M. VENTURA, R. FANI and A. GUCKERT, 2000. Frequency and biodiversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Applied and Environmental Microbiology, 66: diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. FEMS Microbiology Ecology, 23: 95-106.

DENNY, T. 2007. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In Plant-associated bacteria (pp. 573-644). Springer Netherlands.

DRANCOURT, M., C. BOLLET, A. CARLIOZ, R. MARTELIN, J. P. GAYRAL and D. RAOULT, 2000. 16S ribosomal sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. Journal of Clinical Microbiology, 38: 3623-3630.

FRAVEL, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology, 26: 75-91.

FRENCH E. R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) Bacterial wilt. The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum. CAB International, Wallingford, Oxon UK, pp 199 – 207.

GRAHAM, D. C. and W. HODGKISS, 1967. Identity of gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. Journal of Applied Bacteriology, 30: 175-189.

HALLMANN, J. A. QUADT-HALLMANN, W. F. MAHAFFEE and J. W. KLOEPPER, 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43: 895-914.

HAYWARD, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology, 29: 65-87.

HENOK, K., A. FASSIL and H. YAYNU, 2007. Evaluation of of *Pseudomonas fluorescens* isolates as biocontrol agents against bacterial wilt caused by *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*. Pest Management Journal of Ethiopia, 11: 9-18.

HUGH, R. and E. LEIFSON, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology, 66: 24.

KEEL, C. and G. DEFAGO, 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens:

948-955.

PRABHAT, N. J., G. GARIMA, J. PRAMEELA and R. MEHROTRA, 2013. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: A potential gateway to sustainable agriculture. Greener Journal of Agricultural Sciences, 3: 073-084.

PRIOU, S. 2004. Integrated management of bacterial wilt and soil-borne diseases of potato in farmer communities of the inter-Andean valleys of Peru and Bolivia. Final Technical Report DFID-funded project CRF 7862(C). Lima: CIP.

RAN, L. X., C. Y. LIU, G. J. WU, L. C. VAN LOON and P. A. H. M. BAKKER, 2005. Suppression of bacterial wilt in Eucalyptus urophylla by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. Biological Control, 32: 111-120.

RYAN, A. D., L. L. KINKEL and J. L. SCHOTTEL, 2004. Effect of pathogen isolate, potato cultivar and antagonist strain on potato scab severity and biological control. Biochemical Science and Technology, 14: 301-311.

SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 373 pp.

SCHIPPERS, B., A. W. BAKKER and P. A. BAKKER, 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology, 25: 339-358.

SECOR, G. A. and N. C. GUDMESTAD, 1999. Managing fungal diseases of potato. Canadian Journal of Plant Pathology, 21: 213-221.

SUSLOW, T. V., M. N. SCHROTH and M. ISAKA, 1982. Application of a rapid method for Gram-differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.

THORNLEY, M. J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology, 23: 37 52.

VOISARD, C., C. KEEL, D. HAAS and G. DÈFAGO, 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. The EMBO Journal, 8: 351.

WELLER, DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407.

WINSTEAD, N. N. and A. KELMAN, 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 42: 3946-3951.

XU, G. W. and D. C. GROSS, 1986. Field evaluations of the interactions among *Pseudomonads fluorescent*, *Erwinia carotovora*, and potato yields. Phytopathology, 76, 4: 423-430.