کنترل بیولوژیک *Phoma lingam* عامل ساق سیاه کلزا با جدایه‌هایی از تریکودرما و *Bacillus subtilis* *

BIOLOGICAL CONTROL OF *Phoma lingam*, THE CAUSAL AGENT OF RAPESEED BLACKLEG, BY *Trichoderma* AND *Bacillus subtilis* ISOLATES

ناصر پنجه‌که [۱]، امیر صابریان [۱]، همایون افشاری آزاد [۲] و محمد سالاری [۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۳۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۲۷)

چکیده

بسیاری از جدایه‌های *Trichoderma* spp. و *Bacillus subtilis* از عوامل کنترل کننده طبیعی تعداد زیادی از عوامل بیماریزای قارچی و باکتریایی گیاهان می‌باشند. جدایه‌های *Trichoderma* و *Bacillus subtilis* از خاک ریزوسفر گیاهان کلزای آلوده و سالم، و عامل ساق سیاه کلزا از قسمت‌های مختلف کلزاهای آلوده و خاک ریزوسفر گیاهان کلزای آلوده به این بیماری جداسازی شد. بررسی آثار آنتاگونیستی این جدایه‌ها با استفاده از روش کشت متقابل (Dual culture) صورت گرفت. در آزمایش‌های گلخانه‌ای تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در کنترل بیماری به دو روش تیمار بذر کلزا و تیمار اندام‌های هوایی کلزا بررسی شد. در مجموع ۲۰ جدایه از قارچ *Phoma lingam*، ۱۵ جدایه از تریکودرما و ۱۷ جدایه از *B. subtilis* جداسازی گردید. جدایه‌های باکتریایی BE3، B31، B66، B67، B68، B69 و B70 و جدایه‌های تریکودرمایی Tr.2901، Tr.2903، Tr.2904، Tr.2910 و Tr.2913 دارای خواص آنتاگونیستی روی بیمارگر بودند. نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که در روش تیمار بذر کلزا، جدایه‌های باکتریایی B70 و B67، و جدایه‌های تریکودرمایی Tr.2910 و Tr.2901 به ترتیب ۴۳/۳، ۸۰، ۱۶/۶ و ۵۶/۶ درصد بیماری را کاهش دادند. در تیمار اندام‌های هوایی کلزا با جدایه‌های باکتریایی هیچ گونه کاهش بیماری دیده نشد. با این روش جدایه‌های Tr.2910 و Tr.2901 به ترتیب ۶۰ و ۷۶/۶ درصد بیماری را کاهش دادند. جدایه‌های باکتریایی B70 و B67 از گونه *B. subtilis* تشخیص داده شدند. گونه تریکودرما مشخص نگردید.

واژه‌های کلیدی: آثار آنتاگونیستی، عوامل آنتاگونیست، ریزوسفر، تیمار بذر، تیمار اندام‌های هوایی

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: naserpanjekeh@gmail.com

۱. استادیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L. از جمله گیاهان دانه روغنی است که در حال حاضر در بسیاری از کشورهای جهان کشت می‌شود (West *et al*. 2001). یکی از عوامل اصلی محدود کننده کشت کلزا مخصوصاً در مناطق مرطوب، بیماری ساق سیاه کلزا می‌باشد که توسط قارچ *Phoma lingam* (Tod & Fr.) ایجاد می‌شود، در صورتی که شرایط محیطی برای رشد عامل بیماری مساعد باشد خسارت بیماری به ۹۰% هم می‌رسد (EPPO 2005). این بیماری از استان‌های اردبیل، خوزستان، قزوین، گلستان، گیلان و مازندران گزارش شده است، اما میزان خسارت ناشی از آن مشخص نیست (Afshari Azad *et al*. 2008). علاوه بر روش‌های به‌زراعی و به‌نژادی که برای مدیریت این بیماری اعمال می‌شوند، مبارزه بیولوژیک، در قالب مدیریت تلفیقی، از روش‌های مناسب این بیماری است. استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به خصوص عوامل باکتریایی و قارچی زمینه مناسبی را برای مبارزه با قارچ *Phoma lingam* فراهم آورده است. جدایه‌هایی از باکتری *Bacillus subtilis* با تولید پروتئین‌های ضد قارچی تأثیر بازدارندگی بر رشد بیماری گرهای گیاهی در محیط کشت دارد (Li *et al*. 2009). جدایه PKB1 باکتری *Paenibacillus polymyxa* قادر است با تولید پپتید ضد قارچ، رشد *P. lingam* را در محیط کشت و نیز روی برگ‌ها، ساقه، کلش و بقایای کلزا کاهش دهد (Kharbanda *et al*. 1999; Beatty & Jensen 2002).

هدف از اجرای این تحقیق، تعیین قدرت بازدارندگی جدایه‌های *B. subtilis* و تریکودرما از رشد *P. lingam* در آزمایشگاه و گلخانه بود.

روش‌های بررسی

جداسازی *Phoma lingam*

در طول فصل‌های پاییز ۱۳۸۷ و بهار ۱۳۸۸ بوته‌های کلزای دارای علائم تیپیک ساق سیاه مانند لکه‌برگی و شانکر طوقه از مزارع کشت آن در مناطق مازندران، خوزستان و قزوین جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه پس از شستشوی اندام‌های آلوده زیر جریان ملایم شیر آب، بخش‌های آلوده به قطعات کوچک یک سانتی‌متری تقسیم شده و این قطعات با هیپوکلریت سدیم ۲% بسته به ضخامت بافت‌ها به مدت یک تا سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس نمونه‌ها را با آب مقطر سترون سه بار شستشو داده و پس از خشک کردن آنها روی کاغذ صافی سترون در تشتک پتری نه سانتی‌متری محتوی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) قرار داده و در دمای ۲۵ °C انکوبه شدند. پس از ۳-۲ روز از پرگنه‌های قارچی به دست آمده، به روش کشت نوک هیف (Hyphal tip) بر روی محیط کشت PDA خالص‌سازی صورت گرفت. محیط‌های خالص برای مطالعات بعدی در یخچال در دمای ۴ °C نگهداری گردیدند.

آزمون‌های بیماری‌زایی

به منظور اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری و انتخاب جدایه‌ای با بیماری‌زایی بالا آزمون‌های زیر صورت گرفت:

الف) آلوده‌کردن گیاهچه‌ها با دانه‌های گندم آلوده به فوما

در این روش ابتدا قارچ *P. lingam* در ارلن‌های محتوی گندم سترون کشت داده شد. پس از ۱۴ روز در گلخانه،

تعداد ۱۰ عدد دانه گندم آلوده به فوما در هر گلدان حاوی ماسه سترون به طور پراکنده با فاصله تقریبی ۳ سانتی‌متر فرو برده شد. بعد از یک هفته که میسلیوم قارچ از روی دانه گندم به فضای اطراف در ماسه پیشروی کرد، در کنار هر دانه گندم، یک بذر کلزا کشت شد. در تیمار شاهد، در هر گلدان حاوی ماسه سترون ۱۰ عدد دانه گندم سترون ولی آلوده نشده به قارچ *P. lingam* به طور پراکنده با فاصله تقریبی ۳ سانتی متر فرو برده شد و در کنار هر دانه گندم، یک بذر کلزا کشت شد. چهار هفته بعد از کشت یادداشت برداری از تعداد گیاهچه‌های سالم و آلوده بر مبنای چهار درجه‌ای مک گی (McGee 1977) صورت گرفت. درجات آلودگی به شرح زیر بود.

۱: بیماری‌زایی کم، صفر تا ۱۰ درصد گیاهچه‌ها آلوده،
۲: بیماری‌زایی متوسط، ۱۱ تا ۵۰ درصد گیاهچه‌ها آلوده،
۳: بیماری‌زایی زیاد، ۵۱ تا ۹۰ درصد گیاهچه‌ها آلوده و
۴: بیماری‌زایی خیلی زیاد، ۹۱ تا ۱۰۰ درصد گیاهچه‌ها آلوده.

در نهایت جدایه‌هایی از قارچ را که درصد آلودگی بیشتری را در مقایسه با شاهد و دیگر جدایه‌ها از خود نشان دادند به عنوان جدایه با بیماری‌زایی بالا انتخاب شد.

ب) آلوده کردن برگ جدا شده با میسلیوم فوما

بر اساس روش *استارزیکی و استارزیکا* (Starzycki 1993 & Starzycka) ابتدا برگ‌های دوم، سوم و چهارم گیاهچه‌های کلزا را در مرحله چهار برگی جدا نموده و در آزمایشگاه در تشتک‌های پتری که هر یک حاوی مقدار کمی آب مقطر سترون بودند، قرار داده شدند. برای هر جدایه قارچ چهار تکرار در نظر گرفته شد. سپس از هر یک از جدایه‌های قارچ فوما یک گرده میسلیومی روی PDA به قطر ۷ میلی‌متر را جدا کرده و به‌طور جداگانه در وسط برگ روی رگبرگ میانی قرار داده شد. در تیمار شاهد، یک گرده ۷ میلی‌متری از محیط PDA روی رگبرگ میانی قرار داده شد. تشتک‌های پتری روی میز آزمایشگاه قرار داده و علائم ایجاد شده روی برگ‌ها به طور روزانه بررسی و علائم و نشانه‌های بیماری مانند ایجاد کلروز و نکروز برگ، قطر لکه‌های نکروز ایجاد شده روی برگ، تولید یا عدم تولید پیکنیدیوم در متن لکه‌های نکروزه ثبت شد و در نهایت قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از معیار چهار شماره‌ای *استارزیکی و استارزیکا* (۱۹۹۳) به شرح زیر ارزیابی شد.

۰: فاقد قدرت بیماری‌زایی، عدم تولید لکه نکروز روی برگ.
۱: قدرت بیماری‌زایی کم، لکه‌های نکروز با میانگین قطر کمتر از ۱۰ میلی‌متر ایجاد شد و فاقد پیکنیدیوم بود.
۲: قدرت بیماری‌زایی متوسط، لکه‌های نکروز با میانگین قطر ۱۲-۱۰ میلی‌متر ایجاد شد و حداقل یک پیکنیدیوم وجود داشت.
۳: قدرت بیماری‌زایی زیاد، لکه‌های نکروز با میانگین قطر بیش از ۱۲ میلی‌متر ایجاد شد و بیش از یک پیکنیدیوم وجود داشت.

ج) آلوده کردن برگ جدا شده با اسپورهای فوما

برای هر جدایه قارچ چهار تکرار در نظر گرفته شد. هر تکرار برگ‌های دوم تا چهارم کلزا در مرحله چهار برگی بود که روی کاغذ صافی سترون مرطوب در یک تشتک پتری قرارداده شد. ابتدا از کشت‌های ۷ تا ۱۰ روزه جدایه‌های مختلف قارچ فوما، سوسپانسیون اسپور به غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه گردید. مقدار ۵/. میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل با اسپورپاش روی هر

برگ جدا شده کلزا اسپری گردید. در تیمار شاهد، هر برگ جدا شده کلزا با ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اسپری گردید. علائم ایجاد شده روی برگ‌ها روزانه بررسی شد و ارزیابی قدرت بیماری‌زایی با ثبت علائم کلروز، تولید پیکنیدیوم و نکروز رگبرگ و با توجه به معیار زیر صورت گرفت (Alabouvette *et al.*1974) میانگین علائم و نشانه‌های سه برگ موجود در یک تشتک پتری به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد.

۱: فاقد قدرت بیماری‌زایی، عدم تولید علائم و پیکنیدیوم، ۲: قدرت بیماری‌زایی کم، ایجاد علائم و فاقد پیکنیدیوم، ۳: قدرت بیماری‌زایی متوسط، ایجاد علائم و تشکیل به طور متوسط کمتر از یک پیکنیدیوم و ۴: قدرت بیماری‌زایی زیاد، ایجاد علائم و میانگین بیشتر از یک پیکنیدیوم.

پس از انجام آزمون‌های فوق در نهایت جدایه‌ای از قارچ *P. lingam* که با هر سه روش قدرت بیماری‌زایی بالایی از خود بروز داد، به عنوان جدایه برتر انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه استفاده شد.

جداسازی قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست

جدایه‌های تریکودرما و *B. subtilis* از ناحیه ریزوسفر بوته‌های سالم و آلوده کلزا از مزارع کلزای شهرستان‌های جویبار، دزفول و قزوین جداسازی شدند. جداسازی باکتری‌ها به روش هر (Herr 1959) صورت گرفت. به این نحو که مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به همراه ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون خوب به هم زده شد. از سوسپانسیون حاصل سری رقت تا 10^{-6} تهیه شد. از هر کدام از رقت‌ها یک میلی‌لیتر به تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری سترون ریخته شد. سپس به هر تشتک ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت King's B سترون اضافه شد. بعد از انعقاد محیط کشت، تشتک‌ها به انکوباتور با دمای ۲۵ ± ۱ ^{o}C منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، سوسپانسیون اسپور قارچ *P. lingam* با غلظت 10^{6} اسپور در میلی‌لیتر با اسپورپاش روی محیط کشت پاشیده شد و تشتک‌ها مجدداً در انکوباتور قرار گرفتند. تشتک‌ها بعد از ۴۸ ساعت جهت مشاهده اثر آنتاگونیستی بررسی شدند. باکتری‌هایی که هاله بازدارندگی در اطراف آنها دیده می‌شد، به عنوان آنتاگونیست در نظر گرفته شدند و با دقت توسط سوزن کشت به محیط کشت NA انتقال داده شدند. دو روز پس از انکوباسیون مجدد، به منظور خالص‌سازی باکتری‌ها، تک پرگنه آنها را به محیط‌های NA انتقال داده و برای آزمایش‌های بعدی در یخچال در دمای ۴+ ^{o}C نگهداری شدند.

جداسازی جدایه‌های تریکودرما از نمونه‌های خاک به روش داوه (Davet 1979) صورت گرفت. مقدار ۲۰ گرم از خاک در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به حالت تعلیق در آورده شد تا سوسپانسیون یک‌نواختی به دست آید. به سوسپانسیون فوق ۱ گرم اسید سیتریک برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و یک قطره مویان (مایع ظرفشویی) برای معلق کردن اسپورهای قارچ اضافه گردید. دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل را در هر تشتک پتری ریخته و سپس ۲۰ میلی‌لیتر محیط آب- آگار ۲% سترون که دمای آن حدود ۴۵ ^{o}C بود، اضافه شد. پس از انعقاد آگار از هر تشتک گرده‌هایی به قطر ۱سانتی‌متر با چوب پنبه سوراخ‌کن تهیه و در وسط محیط کشت انتخابی داوه Davet به طور وارونه قرار داده شد. برای تهیه ۱ لیتر از این محیط مقدار ۱ گرم نیترات کلسیم، ۱ گرم کلرید کلسیم دو آبه (CaCl2.2H2O)، ۲۵۰ میلی‌گرم نیترات پتاسیم، ۲۵۰ میلی‌گرم سولفات منیزیم هفت آبه

($MgSO_4.7H_2O$)، ۱۲۵ میلی‌گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، ۲ گرم ساکاروز، ۵۰ میلی‌گرم اسید سیتریک جامد و ۲۵ گرم آگار را در ۱ لیتر آب مقطر حل کرده و در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. زمانی که دمای آن به حدود ۴۵ °C رسید، pH آن را به ۴/۵ رسانده و مقدار ۳۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین، ۰/۵ میلی‌لیتر آلیل الکل و ۲/۵ میلی‌گرم وینکلوزین به آن اضافه شد. روش آماده‌سازی تیمار شاهد مشابه روش جداسازی قارچ بود، با این تفاوت که در اینجا به جای سوسپانسیون خاک از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند تا میسلیوم قارچ به خوبی رشد کند. سپس تشتک‌ها در معرض نور فلورسنت قرار داده شدند تا کنیدی‌ها تشکیل شوند آنگاه قارچ‌های به دست آمده به روش نوک ریسه (Hyphal tip) خالص‌سازی شد.

بررسی آثار عوامل آنتاگونیست در آزمایشگاه

برای بررسی آثار آنتاگونیستی جدایه‌های *B. subtilis* از محیط کشت‌های PDA، Soil Extract Agar (SEA) و Nutrient Agar (NA) به روش *میکائیل و نلسون* (Michael & Nelson 1972) و برای بررسی آثار آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما از محیط کشت‌های PDA، Malt Agar (MA) و Czapek به روش *دنیس و وبستر* (Dennis & Webster 1971) از شیوه کشت متقابل (Dual culture) استفاده شد. آثار متقابل هر یک از جدایه‌های قارچی و باکتریایی و عامل بیماری در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در مطالعات قارچی، در هر تشتک، یک گرده به قطر ۷ میلی‌متر از کشت ۷ روزه قارچ *P. lingam* در یک حاشیه تشتک پتری قرار داده شد وسپس تشتک‌ها به مدت دو روز در انکوباتور با دمای ۲۵ ± ۱ °C قرار گرفتند. سپس در نقطه مقابل، در حاشیه دیگر تشتک پتری، از کشت ۷ روزه قارچ آنتاگونیست، گرده دیگری گذاشته شد و مجدداً تشتک‌ها به انکوباتور در دمای ۲۵ ± ۱ °C منتقل شدند. در تشتک‌های پتری تیمار شاهد در هر یک از دو حاشیه تشتک، یک گرده به قطر ۷ میلی‌متر از کشت ۷ روزه قارچ *P. lingam* قرار داده شد. با بازدید روزانه تشتک‌های پتری و ثبت مشخصات ماکروسکوپی پرگنه قارچ آنتاگونیست و بیمارگر مانند سرعت رشد، توانایی جدایه‌های قارچ آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. lingam*، سرعت پیشروی جدایه‌های آنتاگونیست روی میسلیوم قارچ *P. lingam* پس از متوقف نمودن رشد آن و اسپورزایی قارچ آنتاگونیست روی پرگنه قارچ عامل بیماری، قدرت آنتاگونیستی جدایه‌ها ارزیابی شد.

برای بررسی‌های آثار آنتاگونیستی جدایه‌های *B. subtilis* روی بیمارگر، ابتدا هر یک از جدایه‌های باکتری به‌طور جداگانه در راستای قطر پتری به صورت خطی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت نگهداری تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ ± ۱ °C، دو عدد گرده میسلیومی قارچ *P. lingam* به قطر ۷ میلی‌متر در حاشیه تشتک قرار داده شدند. تشتک‌های پتری مجدداً در انکوباتور در دمای ۲۵ ± ۱ °C نگهداری شدند. پس از به هم رسیدن دو پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد، شعاع پرگنه قارچ و فاصله بازدارندگی حاصل از تعامل بین قارچ و باکتری اندازه‌گیری شد.

داده‌های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند وگروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵% صورت گرفت.

بررسی آثار بازدارندگی عوامل آنتاگونیست در گلخانه

ارزیابی آثار بازدارندگی عوامل آنتاگونیست در گلخانه به دو روش تیمار بذر با آنتاگونیست‌ها و اسپری نمودن اندام‌های هوایی کلزا با عوامل آنتاگونیست صورت گرفت.

تیمار کردن بذرهای کلزا با عوامل آنتاگونیست

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر جدایه آنتاگونیست اجرا شد. هر واحد آزمایشی یک گلدان پلاستیکی حاوی ماسه سترون بود که در آن اثر یک جدایه آنتاگونیست در جلوگیری از اثر بیمارگر بر روی بذر کلزا بررسی شد.

بذرهای گندم با *P. lingam*، مطابق آنچه در قسمت آزمون بیماری‌زایی گفته شد، آغشته گردید. تعداد ۱۰ بذر گندم آلوده به فوما به‌طور پراکنده در هر گلدان محتوی ماسه سترون فرو برده شد. پس از یک هفته که میسلیوم‌های قارچ از سطح بذور گندم به داخل ماسه پیشروی کرد، در مجاورت هر بذر گندم یک بذر کلزا که با سوسپانسیون یک عامل آنتاگونیست آغشته شده بود، قرار داده شد. آغشته کردن بذرهای کلزا با سوسپانسیون 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای جدایه‌های قارچی و 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر برای جدایه‌های باکتریایی صورت گرفت. بذرهای کلزا ابتدا در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰% به مدت پنج دقیقه ضد عفونی سطحی شدند و پس از شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن آنها، با سوسپانسیون عوامل آنتاگونیست آغشته شدند. سپس بذرهای کلزا روی کاغذ صافی سترون خشک شدند و هر بذر آغشته در مجاورت یک بذر گندم آلوده در ماسه قرار گرفت. در این آزمایش یک تیمار شاهد به فوما در نظر گرفته شد. در تیمار شاهد بذرهای کلزای ضدعفونی شده در مجاورت دانه های گندم آلوده به فوما قرار داده شد.

پس از گذشت دو هفته درصد بذور جوانه زده و تعداد گیاهچه‌های سالم که معرف میزان تأثیر عوامل آنتاگونیست روی عامل بیماری بود ثبت شد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵% مورد تفسیر قرار گرفت.

تیمار کردن اندام‌های هوایی کلزا با عوامل آنتاگونیست

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر جدایه آنتاگونیست اجرا شد. ابتدا بذرهای کلزا در گلدان‌های محتوی ماسه در گلخانه با دمای $25 \pm 3\ ^{o}C$ کشت شدند. بعد از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۶-۴ برگی، ابتدا سوسپانسیون عوامل آنتاگونیست با غلظت‌های گفته شده در روش قبلی با اسپورپاش بر روی گیاهچه‌های کلزا پاشیده شد. بعد از حدود ۳-۲ ساعت که سطح برگ‌ها خشک شد، سوسپانسیون عامل بیماریزا با غلظت 10^6 اسپور بر میلی‌لیتر را بر روی گیاهچه‌های کلزا پاشیده و سپس سطح گلدان‌ها با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. در تیمار شاهد، گیاهچه‌ها فقط با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری اسپری شدند. پس از گذشت دو هفته با شمارش گیاهچه‌های سالم و آلوده و درصد آلودگی بر اساس آنچه در (قسمت الف) آزمون بیماری‌زایی گفته شد، میزان تأثیر عوامل آنتاگونیست مشخص گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵% ارزیابی شد.

روش‌های شناسایی جدایه‌های باکتریایی و قارچی آنتاگونیست

شناسایی جدایه‌های باکتریایی که در آزمایشگاه و گلخانه به عنوان عوامل آنتاگونیست برتر انتخاب شدند، با آزمون‌های تولید رنگ فلورسنت، رنگ‌آمیزی گرم، تولید اندوسپور، رشد غیر هوازی در گلوکز مایع، رشد در دمای ۴۵ °C و رشد در pH: ۵/۷، رشد در نمک طعام ۷%، هیدرولیز نشاسته، تولید اسید از قندهای مانیتول، زایلوز و آرابینوز، مطابق روش *شاد و همکاران* (Schaad *et al.* 2001) و حلالیت در پتاس ۳% (Suslow *et al.* 1982)، رشد هوازی و غیر هوازی (Hugh & Leifson 1953) و کاتالاز (Lelliott *et al.* 1966) که مبتنی بر خصوصیات موفولوژیکی و بیوشیمیایی سلول باکتری می‌باشند، صورت گرفت.

تشخیص جدایه‌های آنتاگونیست قارچی با استفاده از کلید تشخیص تریکودرما (Bisset 1991) و با در نظر گرفتن ویژگی‌هایی از قبیل میزان رشد و مشخصات ماکروسکوپی پرگنه و اختصاصات میکرومورفولوژی آنها شامل شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفور، کنیدیوم، فیالید، کلامیدوسپور، ریسه‌های هوایی و ریسه‌های رشد یافته در محیط کشت صورت گرفت.

نتایج و بحث

جدایه‌های عامل بیماری

در این بررسی در مجموع تعداد ۲۰ جدایه از قارچ *P. lingam* شامل جدایه‌های ۱۷۰۱ و ۱۷۰۲ (از طوقه کلزاهای جمع‌آوری شده از جویبار)، ۱۷۰۵ و ۱۷۰۹ (از طوقه کلزاهای جمع‌آوری شده از شهرستان قزوین)، ۱۷۱۱ و ۱۷۱۲ (از برگ‌های کلزاهای جمع‌آوری شده از شهرستان دزفول)، ۱۷۱۵، ۱۷۱۶، ۱۷۱۷، ۱۷۱۹، ۱۷۲۰، ۱۷۲۱، ۱۷۲۲، ۱۷۲۳، ۱۷۲۷، ۱۷۳۰، ۱۷۳۱، ۱۷۳۲، ۱۷۳۴ و ۱۷۳۵ (از ساقه کلزاهای جمع‌آوری شده از شهرستان دزفول) جداسازی شدند.

جدایه‌های باکتریایی و قارچی آنتاگونیست

در مجموع ۱۷ جدایه باکتریایی P1، P10، BC6، B7، B66، B67 و B68 (جداسازی شده از ریزوسفر بوته های کلزای شهرستان جویبار)، BE3، BC8، B24، B31، B39 و B51 (جداسازی شده از ریزوسفر بوته های کلزای شهرستان دزفول)، N4، P16، B69 و B70 (جداسازی شده از ریزوسفر بوته های کلزای شهرستان قزوین) و ۱۵ جدایه قارچی Tr.2901، Tr.2902، Tr.2903، Tr.2904، Tr.2906، Tr.2910، Tr.2912 و Tr.2914 (از ناحیه ریزوسفر بوته‌های کلزا در منطقه جویبار)، جدایه‌های Tr.2905، Tr.2909، Tr.2911 و Tr.2913 (از ناحیه ریزوسفر بوته‌های کلزا در شهرستان قزوین) و جدایه‌های Tr.2907، Tr.2908 و Tr.2915 (از ناحیه ریزوسفر بوته‌های کلزا در شهرستان دزفول) به دست آمدند.

آثار جدایه‌های *Trichoderma* و *Bacillus subtilis* بر *Phoma lingam* در آزمایشگاه

جدایه‌های باکتریایی BE3، B31، B66، B67، B68، B69 و B70 که در روش کشت متقابل در محیط‌های کشت PDA و SEA هاله بازدارندگی با شعاع بیش از ۵ میلی‌متر تولید نمودند، قدرت آنتاگونیستی بیشتری در برابر قارچ عامل بیماری از خود نشان دادند و برای انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای استفاده شدند. محیط کشت NA برای آزمون توان آنتاگونیستی باکتری‌ها در مقابل *P. lingam* مناسب نبود زیرا پس از گذشت ۱۰ روز، به

دلیل عدم رشد *P. lingam* روی این محیط، فاصله بازدارندگی تیمارها با شاهد، اختلاف معنی‌دار نداشته و تمام تیمارها در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول۱).

در بررسی آثار متقابل جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما و قارچ *P. lingam*، از بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌های Tr.2901، Tr.2903، Tr.2904، Tr.2910 و Tr.2913 (گروه‌های آماری a وb) نسبت به سایر جدایه‌ها در هر دو محیط کشت PDA و MA سرعت رشد بالاتری داشته و شعاع پرگنه ایجاد شده توسط آنها پس از هفت روز در محدوده ۴۷/۶ تا ۸۳ میلی‌متر قرار داشت (جدول ۲). از بین این جدایه‌ها، دو جدایهTr.2901 و Tr.2910 در هر دو محیط پس از متوقف نمودن رشد پرگنه قارچ عامل بیماری شروع به پیشروی و کلنیزاسیون ریسه‌های قارچ *P. lingam* نمودند که از این لحاظ جدایه Tr.2901 در مقایسه با جدایه Tr.2910 از سرعت پیشروی و کلنیزاسیون بالاتری برخوردار بود. هم‌چنین پس از گذشت هفت روز تنها جدایهTr.2901 موفق به اسپورزایی روی پرگنه قارچ عامل بیماری شده بود.

نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی

نتایج نشان داد که جدایه ۱۷۰۲ قارچ *P. lingam* در هر سه روش آزمایش از قدرت بیماری‌زایی زیادی برخوردار بود. به طوری که در روش آلوده‌کردن گیاهچه‌ها با دانه‌های گندم آلوده، ۸۰٪ گیاهچه‌ها آلوده شدند. این جدایه در روش آلوده‌کردن برگ‌های جدا شده با گرده میسلیومی، لکه‌های نکروزه با میانگین قطر ۲۹ میلی‌متر ایجاد کرد و به طور متوسط ۴/۶ عدد پیکنیدیوم در متن لکه‌های نکروزه ایجاد شد. در روش آلوده‌کردن برگ‌های جدا شده با اسپورهای قارچ، لکه‌های نکروزه و کلروزه برگی و به طور متوسط ۲/۳ عدد پیکنیدیوم در هر برگ ایجاد شد. این جدایه قدرت بیماری‌زایی بالاتری را نسبت به سایر جدایه‌های مورد آزمایش از خود نشان داد و به عنوان جدایه با بیماری‌زایی بالا انتخاب شد و در تست‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به منظور بررسی آثار بازدارندگی عوامل آنتاگونیست از آن استفاده شد.

آثار عوامل آنتاگونیست روی *Phoma lingam* در گلخانه

تیمار کردن بذر با آنتاگونیست: درصد کاهش بیماری توسط هر جدایه آنتاگونیست با استفاده از فرمول:

تعداد کل گیاهچه‌های کشت شده در هر گلدان/۱۰۰× تعداد گیاهچه‌های سالم در هر گلدان محاسبه گردید. تیمارهای باکتریایی و شاهد از نظر میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم اختلاف معنی‌داری (P≤ ۰/۰۵) را نشان دادند. جدایه‌های B67 با ۸۰ درصد و B70 با ۴۳/۳ درصد کاهش بیماری به ترتیب تیمارهای موثر در کنترل بیماری بودند. سایر جدایه‌های باکتریایی با کمتر از ۲۰٪ کاهش بیماری اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان ندادند (جدول ۳ و شکل۱).

از میان پنج جدایهTr.2901، Tr.2903، Tr.2904، Tr.2910 و Tr.2913 تریکودرما که برای تیمار کردن بذرهای کلزا به کار رفتند، تنها جدایه مؤثر، جدایه Tr.2901 بود. به طور متوسط ۵۶/۶ درصد از بذرهای تیمار شده با این جدایه جوانه‌زده و گیاهچه‌های عاری از علائم به وجود آوردند. سایر جدایه‌های *Trichoderma* از این لحاظ اختلاف معنی‌داری را با شاهد (P≤ ۰/۰۵) نشان ندادند (جدول ۲ و شکل ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین فاصله بازدارندگی جدایه‌های *Bacillus subtilis* از رشد *Phoma lingam* در محیط‌های کشت PDA, NA و SEA

Table 1. Mean comparison of inhibitory distance of *Phoma lingam* by *Bacillus subtilis* in PDA, NA and SEA cultures

SEA		NA		PDA		تیمارها
بازدارندگی (Inhibitory)	گروه(Group)	بازدارندگی (Inhibitory)	گروه(Group)	بازدارندگی (Inhibitory)	گروه (Group)	(Treatments)
0*	e	25*	a	0*	f	شاهد(Control)
0	e	24.3	a	0	f	P1
8	c	23.33	a	14.5	c	BE3
2.16	e	26	a	0	f	N4
2	e	25.33	a	1.16	f	BC6
0	e	26	a	0	f	B7
0	e	23.66	a	1.33	f	BC8
1.5	e	24.66	a	1.66	f	P10
0	e	26	a	0	f	P16
0	e	25	a	0	f	B24
6.83	cd	24.6	a	13.16	cd	B31
2	e	26.3	a	0	f	B39
1.83	e	26	a	0	f	B51
6.33	cd	24	a	12.66	d	B66
10	b	23.66	a	16.33	b	B67
5.5	d	25	a	11.16	e	B68
5.33	d	24	a	10.50	e	B69
12	a	25	a	18.33	a	B70

* : میلی‌متر (mm) گروه‌های با حروف یکسان در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۲. مقایسه میانگین شعاع پرگنه جدایه‌های *Trichoderma* در محیط‌های کشت MA و PDA

Table 2. Mean comparison of colony radius of *Trichoderma* isolates on MA and PDA cultures

MA		PDA		تیمارها (Treatments)
گروه(Group)	شعاع پرگنه (Colony radius)	گروه(Group)	شعاع پرگنه (Colony radius)	
c	30*	c	30.6*	شاهد (Control)
a	81.3	a	83	Tr.2901
c	32	c	31.3	Tr.2902
b	51.6	b	51	Tr.2903
b	51	b	52.6	Tr.2904
c	31.6	c	30.6	Tr.2905
c	32.3	c	31.6	Tr.2906
c	33	c	31.3	Tr.2907
c	32.3	c	31	Tr.2008
c	32.3	c	31.3	Tr.2909
b	53	b	55.6	Tr.2910
c	31.6	c	30.6	Tr.2911
c	31.3	c	31	Tr.2912
b	50.3	b	53	Tr.2913
c	33.3	c	31.3	Tr.2914
c	31.6	c	31	Tr.2915

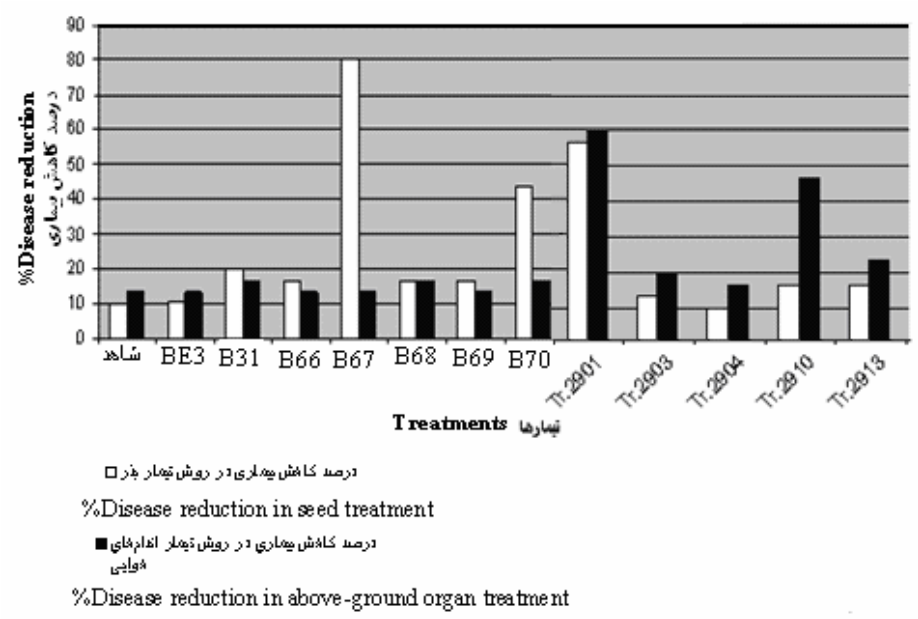
* : میلی‌متر (mm) گروه‌های با حروف یکسان در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۳. مقایسه میانگین تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* و *Bacillus subtilis* در کاهش بیماری ساق سیاه کلزا با روش تیمار کردن بذر در گلخانه

Table 3. Mean comparison of antagonistic effects of *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* isolates in reduction of rapeseed blackleg disease by treating seeds in greenhouse

%جوانه‌زنی (Germination%)	گروه (Group)	تیمار (Treatments)	%جوانه‌زنی (Germination%)	گروه (Group)	تیمارها (Treatments)
56.66	b	Tr.2901	13.33	c	BE3
13.33	c	Tr.2903	20	c	B31
10	c	Tr.2904	16.66	c	B66
16.66	c	Tr.2910	80	a	B67
16.66	c	Tr.2913	16.66	c	B68
10	c	شاهد (control)	16.66	c	B69
			43.33	b	B70

گروه‌های با حروف یکسان در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۱. تأثیر تیمار بذر و اندام‌های هوایی کلزا با جدایه‌های *Bacillus subtilis* و *Trichoderma* در کنترل بیماری ساق‌سیاه کلزا

Fig. 1. Effect of seed and aboveground treatments of rapeseed by antagonistic isolates of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* on rapeseed blackleg

نتایج تأثیر تیمار اندام‌های هوایی کلزا با عوامل آنتاگونیست روی *Phoma lingam*

در اسپورپاشی اندام‌های هوایی کلزاهای آلوده به بیماری ساق سیاه با سوسپانسیون جدایه‌های *B. subtilis*، هیچ یک از جدایه‌های باکتری قادر به کنترل بیماری نبوده و از این لحاظ اختلاف معنی‌داری با شاهد ($P\leq$ ۰/۰۵) مشاهده نشد (شکل ۱). به ترتیب ۶۰ و ۴۶/۶ درصد گیاهچه‌های کلزایی که ابتدا با اسپورهای *P. lingam* آلوده شدند و سپس با اسپورهای جدایه‌های Tr.2901 و *Trichoderma* Tr.2910 اسپورپاشی شدند، هیچ‌گونه علامت و نشانه بیماری را نشان ندادند. سایر جدایه‌های مورد استفاده، اختلاف معنی‌داری را ($P\leq$ ۰/۰۵) با شاهد نشان نداده و در کنترل بیماری بی تأثیر بودند (شکل ۱).

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

از بین جدایه‌های باکتریایی فقط آنهایی که هم در بررسی‌ای آزمایشگاهی و هم در آزمایش‌های گلخانه‌ای اثرات بازدارندگی خوبی از رشد *P. lingam* داشتند مورد شناسایی قرار گرفتند. پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مشخص گردید که جدایه‌های B67 و B70 که نسبت به سایر جدایه‌های باکتریایی در کنترل بیماری تأثیر بیشتری را از خود بروز دادند، باکتری‌هایی هستند گرم مثبت و با قابلیت تولید اندوسپور با موقعیت مرکزی، قادر به رشد در حرارت ^{o}C ۴۵ و pH:۵/۷ ، با قابلیت رشد در نمک طعام ۷% و رشد غیر هوازی در گلوکز مایع و همچنین با قابلت هیدرولیز نشاسته و تولید اسید از قندهای آرابینوز، زایلوز و مانیتول. این ویژگی‌ها با اختصاصات گونه *Bacillus subtilis* مطابقت داشت (Schaad *et al.* 2001). شناسایی سایر جدایه‌های باکتریایی از جمله P1، P10، P16 و N4 که در آزمایش‌های گلخانه‌ای، اختلاف کاهش بیماری معنی‌داری را با شاهد نشان ندادند، اهمیتی نداشت.

تأثیر بازدارندگی گونه‌های مختلف جنس باسیلوس بر عامل بیماری ساق‌سیاه کلزا توسط *دنیلسون و همکاران* (Danielson *et al.* 2007)، *راماراتنام و فرنادو* (Ramarathnam & Fernando 2002) و *خاربندا و همکاران* (Kharbanda *et al.*1999) نیز به اثبات رسیده است. مهم‌ترین مکانیسم‌های بازدارندگی *B. subtilis*، تولید ترکیبات ضدقارچی مانند Zwittermicin A (Ramarathnam & Fernando 2002)، و متابولیت‌های ثانویه به خصوص Bacilycin، Iturin A، Fengymycin، Bacillomycin و Mycobacillin عنوان شده است (Schreiber *et al.* 1988). در روش تیمار اندام‌های هوایی کلزا، جدایه‌های باکتریایی در کنترل بیماری بی تأثیر بوده و اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان ندادند که به نظر می‌رسد مهم‌ترین دلیل آن مساعد نبودن شرایط محیطی برای استقرار و بقای باکتری‌ها روی اندام‌های هوایی کلزا باشد.

جدایه‌های Tr.2901 و Tr.2910 تریکودرما که در آزمایشگاه و گلخانه در کنترل بیماری تأثیر مثبتی داشتند، سریع الرشد بوده و چهار روز پس از کشت در محیط MA ۲% در دمای ^{o}C ۲۰ قطر پرگنه آنها به ۷ تا ۹ سانتی‌متر رسید. پرگنه‌ها در ابتدا بی‌رنگ بوده، اما به محض اسپورزایی سفید و سپس به تدریج سبز متمایل به خاکستری شده و نهایتاً به سبز تیره تغییر رنگ دادند. سطح زیرین پرگنه‌ها به رنگ زرد روشن مشاهده گردید. ریسه‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره صاف و به عرض ۱۰-۲ میکرومتر بوده و کلامیدوسپور تشکیل ندادند. کنیدیوفورها دارای انشعابات فراوان بوده و معمولاً به صورت دسته‌های ۳-۲ تایی با زاویه نسبتاً باز از محور اصلی منشعب شدند. به

علت پهن بودن پایه نسبت به نوک کنیدیوفور، شکل کلی کنیدیوفور به صورت هرم است. انشعابات اولیه معمولاً انشعابات ثانویه را تولید نموده که اینها نیز مجدداً منشعب می‌شوند. معمولاً انشعابات به صورت جفتی و متقابل تولید می‌شوند. فیالیدهای تنگی شکل تا آمپولی شکل بوده و معمولا به صورت جفتی در مقابل یکدیگر تشکیل شده و اندازه آنها ۳/۵-۲/۵ × ۱۲-۶ میکرومتر بود. فیالوسپورها مستطیلی تا بیضوی متمایل به استوانه‌ای با دیواره صاف و به رنگ سبز روشن تا سبز بوده و اندازه آنها ۳-۱/۹ × ۵-۳/۱ میکرومتر بود.

جدایه‌های Tr.2901، Tr.2903، Tr.2904، Tr.2910 و Tr.2913 تریکودرما نسبت به سایر جدایه‌ها از سرعت رشد بالایی برخوردار بودند که از بین آنها، دو جدایه Tr.2901 و Tr.2910 قادر به کلنیزاسیون میسلیوم قارچ *P. lingam* نیز بودند. جدایه Tr.2901 علاوه بر سرعت کلنیزاسیون بالاتر نسبت به Tr.2910، پس از یک هفته موفق به اسپورزایی روی پرگنه بیمارگر نیز گردید.

کشت متقابل *Leptosphaera maculans* و قارچ‌های سریع‌الرشد دیگری مانند *Trichoderma viride*، *Aspergillus sp.* و *Sordaria sp.* در محیط کشت PDA توسط ناصری (Naseri 2006) موید تأثیر آنتاگونیستی این قارچ‌ها بر روی عامل بیماری ساق سیاه کلزا بوده، به گونه‌ای که پرگنه *L. maculans* در مراحل اولیه دچار توقف رشد شده و سپس به وسیله پرگنه قارچ‌های مذکور به سرعت پوشانده می‌شود.

در روش تیمار اندام‌های هوایی جدایه‌های Tr.2901 و Tr.2910 به ترتیب با دارا بودن ۶۰ و ۴۶/۶ درصد گیاهچه‌های سالم بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری داشتند. روش کاربرد گونه‌های تریکودرما در گلخانه و مزرعه حایز اهمیت بوده و این مسئله در قدرت و مدت پایداری این عوامل در خاک تأثیر گذار است. به عنوان مثال، مصرف یک فرآورده زیستی با نام تجاری سوپرسیویت (Supresivit®) که دارای اسپورهای قارچ *Trichoderma harzianum* به میزان ۵ گرم در هرکیلو کود معدنی است، شدت لکه برگی‌های ناشی از *P. lingam* را در کلزا در شرایط مزرعه تا ۱۰ درصد کاهش می دهد (Hysek *et al.* 2002). تحقیقات سینق و همکاران (Singh *et al.* 007) نشان داد که هنگامی که تریکودرما روی برگ‌های چای تکثیر شود پس از ۳۰ روز جمعیت آن به ۸×۱۰^{۸} واحد تولیدکننده پرگنه در هر گرم (cfu/g) می‌رسد و استقرار و پایداری آن از زمان کاربرد، ۲۱۰ روز خواهد بود. استفاده از عوامل آنتاگونیست قارچی، زمینه مناسبی برای مدیریت بیماری ساق سیاه کلزاست. اگر چه برای این منظور لازم است که تحقیقات در خصوص شرایط اکولوژیکی مناسب برای این عوامل و بقای آنها در خاک و اندام‌های هوایی و هم‌چنین نحوه کاربرد آنها در سطح مزرعه ادامه یابد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (3-5) متن انگلیسی مراجعه شود.