مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۳۴۴-۳۳۳)

بررسی اثرچند فرمولاسیون پودری استرین *Pseudomonas fluorescens* P_4 در کنترل *Sclerotinia sclerotiorum* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان

فاطمه قربانی[1*]، کیوان بهبودی[2]، خلیل بردی فتوحی فر[3] و مسعود احمدزاده[4]
۱، ۲، ۳، ٤، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران و دانشیار
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/٦/۲۱ – تاریخ تصویب: ۹۱/۹/۲۹)

چکیده

در این بررسی توان آنتاگونیستی هفت استرین باکتریایی متعلق به کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه تهران بر اساس ناحیه بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* در آزمون سه نقطه ای مورد مطالعه قرار گرفت و در نهایت استرین برتر *Pseudomonas fluorescens* P_4 جهت آزمایشهای مقدماتی در گلخانه و آزمایشهای اتاقک رشد انتخاب شد. از استرین *P. fluorescens* P_4، نه نوع فرمولاسیون پودری بر مبنای پودر تالک با استفاده از سه محیط کشت NBY، KB و M1 و سه چسباننده صمغ زانتان (XG)، صمغ عربی (AG) و کربوکسی متیل سلولز (CMC) تهیه گردید. بررسی اثر این فرمولاسیونها در کنترل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه، روی رقم پروگرس آفتابگردان و در اتاقک رشد صورت گرفت. مطالعات پس از شش هفته نشان داد، گلدانهای تیمار شده با سلولهای آزاد باکتری با داشتن ۱۰۰ درصد گیاه سالم، گلدانهای تیمار شده با سلولهای آزاد باکتری به همراه قارچ با داشتن ۹۰ درصد گیاه سالم، گلدانهای تیمار شده با فرمولاسیونهای NBY-CMC، KB-CMC، NBY-XG، NBY-AG، M1-CMC با داشتن ۸۷/۵ درصد گیاه سالم و همچنین گلدانهای تیمار شده با فرمولاسیون M1-AG با داشتن ۷۵ درصد گیاه سالم، بدون داشتن اختلاف معنی دار با شاهد سالم بیشترین اثر را در کاهش بیماری داشتند و حتی از قارچکش بردوفیکس با ٦۲/۵ درصد کنترل موثرتر بودند. در میان فرمولاسیونهای پودری، ماندگاری و بقاء باکتری در فرمولاسیون انجام شده در محیط M1 با صمغ عربی، در دمای چهار درجه سلسیوس طی دوره نگهداری ۱۵۰ روزه از بقیه فرمولاسیونها بیشتر بود. نوع محیط کشت بر جمعیت و بقاء باکتری تاثیر قابل توجهی داشت و محیط کشت M1 بیشترین اثر را داشت.

واژه های کلیدی: صمغ عربی (AG)، صمغ زانتان (XG)، چسباننده کربوکسی متیل سلولز (CMC)، بردوفیکس، محیط کشت.

مقدمه

گیاه آفتابگردان مورد حمل۱ه عوامل متعددی قرار می گیرد که یکی از مهمترین آنها قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می باشد. قارچ مذکور خصوصا در فصول سرد و بارانی انتشار یافته و به آسانی قابل کنترل نمی‌باشد زیرا اسکلروتهای آن تا مدتها در خاک زنده باقی می مانند (Huang, 1993). گونه *S. sclerotiorum* تا ۱۰۰ درصد سبب کاهش محصول

* نویسنده مسئول: فاطمه قربانی تلفن: ۰۹۳۵۴۰۸۹۱۱۸ E-mail:ghorbani_f@ut.ac.ir

آفتابگردان می گردد (Purdy, 1979). این قارچ یکی از پلی فاژترین بیمارگرهای گیاهی است که سبب بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان می گردد (Dillard, 1995). کنترل شیمیایی بیماریهایی که توسط قارچهای خاکزی ایجاد می شوند مشکل و گاه بی تاثیر است (Weller and Cook, 1983). استفاده از مواد شیمیایی برای کنترل آفات و بیماریها در طول سه دهه اخیر مشکلات اکولوژیکی را افزایش داده است، در سالهای اخیر توجه دانشمندان به سوی تحقیق درباره توانایی میکروارگانیزمهای مفید کنترل کننده آفات و بیماریهای گیاهی معطوف شده است (Keel and Defago, 1997).

تعدادی از استرینهای گونه‌های *Pseudomonas fluorescens* Migula و *Pseudomonas putida* Migula (Trevisan) به عنوان عوامل بیوکنترل قارچهای مختلف خاکزاد گزارش شده اند (Weller and Cook, 1988). در تحقیقی دیگر مشخص شد که استرینهایی از گونه های *P. fluorescens* و *P. putida* به طور واضحی از تولید اسکلروت در محیط کشت و رشد میسلیومی اسکلروتینیا جلوگیری کردند. آغشته کردن بذرهای آفتابگردان به این دو باکتری (حداقل $۱۰^{۶}$ سلول باکتری برای هر بذر) آنها را در برابر قارچ *S. sclerotiorum* حفاظت کرده است (Expert and Digat, 1995).

حضور منابع مختلف کربن و نیتروژن در محیط کشت باعث افزایش بقاء باکتریهای آنتاگونیست *Bradyrhizobium japonicum* و *P. fluorescens* در شرایط *in vivo* شده است (Moenne-Loccoz *et al.*, 1999). در بررسی کارایی و توانایی سلولهای *Pseudomonas* sp. pf_{153} رشد داده شده در محیطهای کشت مختلف آزمایشگاهی، در خاک جهت حفاظت خیار در برابر بیماری پوسیدگی سیاه ریشه با عامل *Phomopsis sclerotioides* Kesteren مشخص شد، سلولهای حاصل از محیط KBB در مقایسه با سلولهای محیطهای کمتر غنی شده مثل KBB ۲۰ درصد یا محیط KBA (که حالت فیزیکی آگار باعث انتشار مواد قندی می شود) تاثیر کمتری در کنترل بیماری دارد. محیط کشت در فیزیولوژی سلولها اثر داشته و در توانایی بیوکنترل *Pseudomonas* sp. pf_{153} در ریزوسفر تاثیر می گذارد (Fuchs *et al.*, 2000).

استفاده از باکتریهای آنتاگونیست ممکن است تحت شرایط مزرعه در کنترل بیماریها تاثیری متوسط داشته باشد و یا بدون اثر باشد. قبل از رهاسازی عوامل کنترل بیولوژیکی نیاز به اقداماتی می باشد که بتوان پایداری و کارایی و رشد عوامل بیوکنترل را در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی (گلخانه و مزرعه) علیه بیماریهای گیاهی افزایش داد لذا سوسپانسیون باکتریهای آنتاگونیست باید در حاملهای معینی تثبیت شده و به صورت فرمولاسیونهایی برای کاربرد آسان، سهولت حمل و نقل، نگهداری طولانی مدت، حفظ قدرت حیات، افزایش کارایی در مزرعه و تجاری سازی مورد استفاده قرار گیرند (Nakkeeran *et al.*, 2005).

مواد حامل می توانند آلی یا غیر آلی باشند و همچنین ماده آلی باید مقرون به صرفه و در دسترس باشد (Nakkeeran *et al.*, 2005).

از جمله حاملهای آلی که در تولید فرمولاسیونهای مختلف به کار رفته است پودر تالک می باشد. تالک یک ماده معدنی طبیعی است که در soapstone یا steatite وجود دارد که شامل مواد معدنی مختلف در ترکیب با کلراید و کربنات می باشند. از نظر شیمیایی سیلیکات منیزیم است و فرمول شیمیایی آن $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ می باشد. در صنعت به صورت پودر استفاده می شود و دامنه کاربرد وسیعی دارد. همچنین جذب رطوبت در آن بسیار کم می باشد و از تشکیل پلهای هیدرات که دوره انبارداری را کاهش می دهند جلوگیری می کند. تالک به دلیل طبیعت بی اثری (خنثی) که دارد و همچنین در دسترس بودنش به عنوان یک ماده خام در نقش حامل در تولید فرمولاسیون به کار می رود (Nakkeeran *et al.*, 2005). فرمولاسیونهای جامد (گرانولها و پودرها) به علت ماندگاری زیاد و سهولت حمل یا انبار، معمولاً بر فرمولاسیونهای مایع ارجحیت دارند (Sabaratnam and Traquair, 2002).

علاوه بر این فرمولاسیونهای پودری می توانند در صورت نیاز به اسپری کردن و یا خیساندن ریشه و خاک، به صورت سوسپانسیونهای مایع در آیند (Lumsden *et al.*, 1995). فرمولاسیونهای پودر تالک جدایه های ۳۰ و ۱۸۰ از باکتری *P. fluorescens* در کنترل *Rhizoctonia solani* Kühn عامل مرگ

گیاهچه کلزا در گلخانه و مزرعه موثر بودند (Bora *et al.*, 2004). فرمولاسیونهای پودر تالک دو جدایه از باکتری *P. fluorescens* در کنترل *Rhizoctonia solani* موثر بوده‌اند (Saravanan *et al.*, 2004). فرمولاسیونهای میکروبی که در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند بادوامتر از فرمولاسیونهایی هستند که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شده اند (Bora *et al.*, 2004). هدف از این تحقیق انتخاب موثرترین استرین از میان استرینهای *P. fluorescens* متعلق به آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه بیماریهای گیاهی دانشکده کشاورزی کرج در جلوگیری از رشد قارچ عامل پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه آفتابگردان و فرموله کردن آن باکتری به صورت پودر، برای بهبود بخشیدن اثر آن در کنترل پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان در اتاقک رشد، افزایش میزان ماندگاری و حفظ جمعیت باکتری بود.

مواد و روش ها

تهیه جدایه قارچی مورد آزمایش و استرینهای باکتریایی مورد آزمایش

در این تحقیق یک جدایه قارچی از گونه *S. sclerotiorum* به نام GOL6 و هفت استرین باکتریایی از گونه *P. fluorescens* شامل Z_7، P_5، P_4، P_{61}، P_{86}، P_{68} و CHA0 مورد استفاده قرار گرفت. جدایه قارچی از کلکسیون آزمایشگاه قارچ شناسی و استرینهای باکتریایی از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه بیماریهای گیاهی دانشکده کشاورزی کرج تهیه شد. بررسی قدرت بازدارندگی برخی استرین های باکتریایی از رشد قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* GOL6 درون تشتک پتری برای بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه هر یک از استرین های مختلف باکتریایی به صورت سه نقطه ای با فاصله ۰/۵ سانتیمتر از لبه تشتک پتری حاوی PDA کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت یک قرص از کشت جوان قارچ بیمارگر وسط تشتک پتری قرار گرفت. برای مقایسه اثر باکتریها فاصله پرگنه باکتریها تا پرگنه قارچ (وقتی که قارچ در قسمت شاهد که فاقد باکتری است تا نزدیک به لبه تشتک پتری رشد کرد) با خط کش اندازه گیری شد و بهترین استرین که دارای بالاترین توان بازدارندگی بود برای انجام آزمایشهای گلخانه ای و اتاقک رشد انتخاب شد (Hagedron *et al.*, 1989).

بررسی گلخانه ای

آزمون اثبات بیماریزایی در گلخانه گروه پژوهشی بیماریهای گیاهی بخش کنترل بیولوژیک، با دمای ۵±۲۰ درجه سلسیوس انجام شد. خاک مورد استفاده در آزمایشات شامل یک قسمت خاک معمولی، دو قسمت ماسه و دو قسمت خاک برگ بود. خاکها قبل از استفاده به فاصله ۲۴ ساعت دو بار در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شدند. این آزمون بر روی رقم پروگرس آفتابگردان که از موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج دریافت شده بود، انجام شد.

تهیه زادمایه بیمارگر *S. sclerotiorum* GOL6

جهت تهیه زادمایه قارچ، بذور ارزن درون الک با آب شسته شده و سپس داخل ارلن ریخته شد و به مدت هشت ساعت به همان حالت نگهداری شد تا اینکه دانه ها خوب خیس بخورند. سپس ۱۰۰ گرم ارزن داخل ظرف ارلن ۱۰۰۰ میلی لیتر ریخته شد و ۶۰ میلی لیتر آب به آن اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس در اتوکلاو سترون گردید. بعد از ۲۴ ساعت ظرف ارلن حاوی ارزن برای بار دوم در همان شرایط درون اتوکلاو سترون گردید. پس از سرد شدن ظروف ارلن، با قارچ بیماریزا مایه زنی شدند. به این منظور از کشت سه روزه قارچ *S. sclerotiorum* GOL6 روی محیط کشت PDA قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر برداشته و استفاده شد. بعد از آن ظروف ارلن در دمای ۲۱ درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند. ضمنا هر سه روز یکبار ظروف ارلن تکان داده شدند (Sansford and Coley, 1992).

اثبات بیماریزایی با استفاده از بذر ارزن واجد *S. sclerotiorum* GOL6

در این روش از کشت ۲۱ روزه *S. sclerotiorum* GOL6 روی دانه های ارزن استفاده شد (Sansford and Coley, 1992). بدین صورت که مقادیر ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ گرم از زادمایه تهیه شده بذر ارزن را به یک کیلوگرم خاک داخل گلدان اضافه کرده و در هر گلدان

پنج عدد بذر آفتابگردان رقم پروگرس کاشته شد. یک گلدان نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که مانند سایر گلدانها پنج بذر آفتابگردان رقم پروگرس در یک کیلوگرم خاک عاری از زادمایه قارچ کاشته شد. به منظور ضدعفونی کردن، بذور آفتابگردان قبل از کاشت به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد قرار گرفتند. علائم بیماری پس از دو هفته بر روی طوقه ظاهر شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

آزمایشات اتاقک رشد

این آزمایشات به منظور انتخاب استرین برتر از میان استرینهای موجود و همچنین بررسی تاثیر فرمولاسیونهای مختلف آن استرین در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان صورت گرفت. شرایط اتاقک رشد عبارت بود از؛ دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس، رطوبت ۴۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی در برابر ۸ ساعت تاریکی. خاک مورد استفاده در این آزمایشات نیز شامل یک قسمت خاک معمولی، دو قسمت ماسه و دو قسمت خاک برگ بود. همچنین خاکها قبل از استفاده به فاصله ۲۴ ساعت دو بار در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت در اتوکلاو سترون شدند.

تهیه زادمایه استرین های آنتاگونیست *P. fluorescens*

برای تهیه زادمایه استرینهای آنتاگونیست باکتریایی ذکر شده، از کشت ۴۸ ساعته این استرینها که روی محیط کینگ-بی رشد داده شدند به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری تهیه شد و به ظرف ارلن ۲۵۰ میلی لیتر محیط کینگ-بی منتقل شد و به مدت ۳۶ ساعت درون دستگاه شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۶ درجه سلسیوس) قرار گرفت. سلولهای باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ (به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور) از محیط مایع جدا شدند و برای برطرف شدن باقی مانده محیط غذایی در محلول ۰/۱۵ مولار نمک طعام شستشو داده شدند. سپس سلولهای باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ مجدد از این محلول جداسازی شده و از آنها در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه شد و پس از رقیق سازی جمعیت آنها با استفاده از سری رقت تعیین گردید (Bora *et al*., 2004).

روش آغشته سازی بذر به باکتریهای آنتاگونیست

بذر آفتابگردان دریافت شده از موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج به مدت دو دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم دارای رقت ۱۰ درصد (رقیق شده با آب مقطر) ضدعفونی سطحی شده و پس از شستشو در آب مقطر، به منظور آغشته سازی بذر به جدایه های آنتاگونیست، هرگرم بذر به مدت سه ساعت در $۱۰^{۹}$ سلول باکتری از هر استرین به طور جداگانه قرار گرفت (Weller and Cook, 1983).

بررسی خواص بازدارندگی باکتریهای آنتاگونیست در اتاقک رشد علیه *S. sclerotiorum* GOL6

در آزمایشات اتاقک رشد در هر گلدان پنج بذر آفتابگردان کاشته شد. تیمارها شامل شاهد سالم (خاک گلدان عاری از زادمایه قارچ و بذور آفتابگردان فاقد سوسپانسیون باکتری)، شاهد آلوده (خاک گلدان همراه با زادمایه قارچ و بذور آفتابگردان عاری از سوسپانسیون باکتری)، بذور تلقیح شده با سوسپانسیون هفت استرین باکتریایی آنتاگونیست Z_7، P_5، P_4، P_{61}، P_{86}، P_{68} و CHA0 همراه با زادمایه قارچ بیمارگر (سوسپانسیون $۱۰^{۹}$ سلول باکتری در میلی لیتر همراه با زادمایه قارچ بیمارگر) بودند. گلدانها در اتاقک رشد در دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و یک روز در میان به مدت یک هفته آبیاری شدند و پس از آن به محض خشک شدن سطح خاک، آبیاری صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۹ تیمار ذکر شده و سه تکرار صورت پذیرفت.

پس از گذشت سه هفته شدت پوسیدگی تعیین شد. شاخص پوسیدگی عبارت بود از گیاهان مرده و زنده. سپس استرین *P. fluorescens* P_4 که در تشتک پتری دارای بالاترین توان بازدارندگی (بر اساس قطر هاله بازدارنده) و نیز در گلخانه بیشترین تاثیر را در کنترل پوسیدگی اسکلروتینیایی آفتابگردان نشان داد برای آزمایشات بعدی انتخاب گردید.

محیطهای کشت مورد استفاده

محیط کشت M1 شامل سوکروز به میزان ۱۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر پنج گرم در لیتر می باشد.

محیط کشت NBY شامل نوترینت بروث به میزان هشت گرم در لیتر و عصاره مخمر به میزان پنج گرم در

لیتر می باشد. محیط کشت KB شامل پروتئوز پپتون به میزان ۲۰ گرم در لیتر، گلیسرول به میزان ۱۵ سی سی در لیتر، سولفات منیزیم به میزان ۱/۵ گرم در لیتر و فسفات پتاسیم به میزان ۱/۵ گرم در لیتر می باشد.

تهیه فرمولاسیون بر مبنای پودر تالک

برای تهیه فرمولاسیون باکتری ۳۰ میکرولیتر از کشت ۳۰ ساعته (در دمای ۲۸ درجه سلسیوس) استرین P_4 در هر یک از محیطهای کشت KB، NBY و M1 به طور مجزا استفاده شد و سلولهای باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور جداسازی شدند و برای حذف باقیمانده محیط کشت رسوب حاصله در ۳۰ میکرولیتر بافر نمک کلرید سدیم ۰/۱۵ مولار حل شده سپس سلولهای باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه در ۶۰۰۰g دور از بافر کلرید سدیم جداسازی شده و از آنها در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم سوسپانسیون تهیه شد. گلیسرول به نسبت ۱۰ درصد به این سوسپانسیون اضافه شد.

به سوسپانسیون حاصل، هم حجم آن، محلول سدیم آلژینات دو درصد (وزن به حجم) سترون شده در اتوکلاو (در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه) اضافه شد و به مدت یک دقیقه در دمای اتاق ورتکس شد.

مخلوط باکتری و سدیم آلژینات به پودر تالک سترون به نسبت یک به چهار (حجم به وزن) مخلوط با چسباننده کربوکسی متیل سلولز، صمغ زانتان، و صمغ عربی استفاده شد. صمغ عربی به نسبت پنج درصد، کربوکسی متیل سلولز به نسبت یک درصد و صمغ زانتان به نسبت دو درصد به حجم پودر تالک اضافه شدند. مخلوط حاصل درون تشتک پتری به مدت یک ساعت در دمای اتاق، زیر هود روشن قرار گرفت تا رطوبت آن برای آسیاب کردن مناسب شود. فرمولاسیون حاصل در مخلوط کن پودر شد و درون ظروف مک کارتنی در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد (Bora *et al*., 2004).

بررسی ماندگاری فرمولاسیون پودر تالک در طی انبارداری

ماندگاری باکتری آنتاگونیست در فرمولاسیون پودر تالک که در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد هر ۳۰ روز یکبار در طی دوره زمانی ۱۵۰ روز بررسی شد. جمعیت باکتری یک بار پس از تهیه فرمولاسیون باکتری و نیز یکبار به فاصله دو هفته از انجام فرمولاسیون محاسبه شد. یک گرم از هر فرمولاسیون باکتری به نه میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ۱۰ سری رقت تهیه شد. از رقتهای هفت، هشت و نه سوسپانسیون پودر تالک P_4 *P. fluorescens* روی محیط غذایی نوترینت آگار به مقدار ۱۰ میکرولیتر در هر تشتک پتری با میله شیشه ای خم شده، پخش شد و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت تا پرگنه ها ظاهر شدند. سه تکرار برای هر رقت به کار رفت و تعداد سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیون با شمارش پرگنه های ظاهر شده در رقتهای هفت، هشت و نه و معدل گیری در میان آنها محاسبه شد (Sabaratnam and Traquair, 2002).

بررسی اثر فرمولاسیون تهیه شده از *P. fluorescens* P_4 در کنترل *S. sclerotiorum* GOL6 در اتاقک رشد

به منظور فرموله کردن بذور با فرمولاسیون پودری ابتدا از هر فرمولاسیون مقدار گرمی معادل 10^9 سلول باکتری، به ازاء هر گرم بذر آفتابگردان که از قبل ضد عفونی و جوانه دار شده در تشتک پتری اضافه گردید و به مدت سه ساعت در شرایط سترون (زیر هود) نگهداری شد (Nandakumar *et al*., 2001).

لازم به ذکر است که پیش از تیمار کردن بذور با فرمولاسیونها در گلدانهای نایلونی (غیر از گلدانهای مربوط به شاهد سالم)، زادمایه قارچ به میزان یک و نیم گرم در یک کیلوگرم خاک اضافه شده بود، سپس در هر گلدان چهار بذر تیمار شده کاشته شد.

تیمارها شامل شاهد سالم (خاک گلدان عاری از زادمایه قارچ و بذور آفتابگردان فاقد سوسپانسیون باکتری)، شاهد آلوده (خاک گلدان همراه با زادمایه قارچ بیمارگر و بذور آفتابگردان عاری از سوسپانسیون باکتری)، سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست (خاک

گلدان فاقد زادمایه قارچ بیماگر و بذور آفتابگردان حاوی سوسپانسیون $۱۰^{۹}$ سلول باکتری در میلی لیتر)، سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست همراه با زادمایه قارچ بیمارگر (سوسپانسیون $۱۰^{۹}$ سلول باکتری در میلی لیتر و زادمایه قارچ بیمارگر به نسبت ذکر شده) و نه فرمولاسیون شامل ترکیب سه محیط کشت کینگ بی، محیط کشت M1 و محیط کشت NBY و سه چسباننده کربوکسی متیل سلولز، صمغ زانتان و صمغ عربی و همچنین سم بردوفیکس یک درصد (مخلوط سولفات مس و هیدراکسید کلسیم) و زادمایه قارچ بیمارگر به نسبت ذکر شده بودند. گلدانها در شرایط مناسب در اتاقک رشد قرار گرفتند و یک روز در میان به مدت یک هفته آبیاری شدند. پس از آن به محض خشک شدن سطح خاک آبیاری صورت گرفت. پس از گذشت شش هفته، شدت پوسیدگی محاسبه شد.

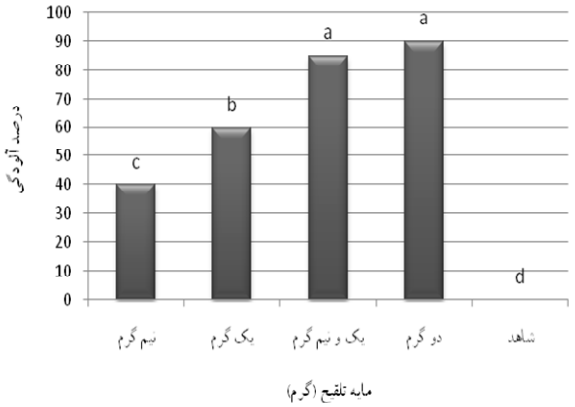
تجزیه و تحلیل آماری داده ها

این آزمایشها در قالب طرح کاملا تصادفی به اجرا در آمد. در ابتدا داده های بدست آمده از هر آزمـایش از طریق نرم افزار اکسل (Microsoft excel, 2007) وارد کامپیوتر گردید و به منظور تجزیه وتحلیل آماری اعداد برای فاکتورهای مورد ارزیابی و تجزیه واریانس از نرم افزار (SAS. version 9.2, 1997) استفاده شد. برای رسم جداول و شکلها از نرم افزارهای Microsoft Excell, 2007 و Microsoft Word, 2007 استفاده شد.

نتایج

اثبات بیماریزایی قارچ *S. sclerotiorum* GOL6 بر روی رقم پروگرس آفتابگردان

بعد از گذشت ۱۴ روز در حالیکه گلدانهای شاهد کاملاً سالم بودند علائم بیماری در گلدانهای آلوده به *S. sclerotiorum* GOL6 مشاهده شد. گیاهچه‌های آلوده شده افتادند و قسمت طوقه در نزدیکی سطح خاک به رنگ سبز مایل به سفید در آمد. ارزیابی میزان آلودگی ایجاد شده توسط قارچ مورد نظر با شمارش گیاهان بیمار شده در هر تیمار و بررسی نسبت آنها با گیاهان کاملا سالم صورت گرفت (شکل ۱).



شکل ۱- درصد آلودگی گیاهچه های آفتابگردان رقم پروگرس با مقادیر مختلف زادمایه قارچ *S. sclerotiorum* GOL6 (اعداد میانگین ۳ تکرار می باشند).

انتخاب استرین برتر آنتاگونیست

استرین آنتاگونیست *P. fluorescens* P_4 که نسبت به سایر استرین ها دارای بیشترین قطر هاله بازدارنده بود (شکل۲ الف) و همچنین بیشترین تاثیر را در کنترل بیماری در اتاقک رشد داشت (شکل ۲ ب) برای ادامه آزمایشات انتخاب گردید. قطر هاله بازدارنده که از مرکز پرگنه باکتری تا لبه پرگنه قارچ محاسبه شد، ۱/۳ سانتی متر بود (قطر تشتک پتری ۴/۵ سانتی متر).

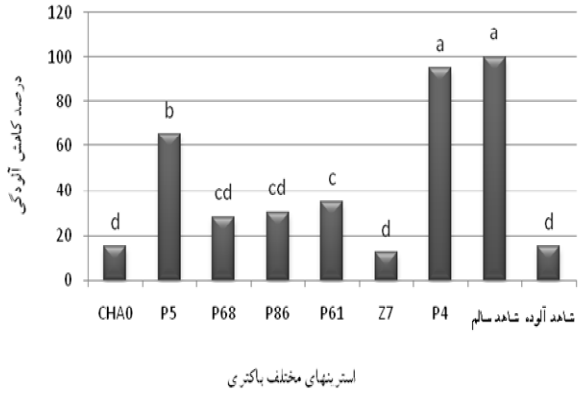
ارزیابی میزان کاهش بیماری توسط باکتریهای آنتاگونیست، از طریق شمارش گیاهان سالم نسبت به گیاهان آلوده شده توسط قارچ مورد نظر و سنجیدن نسبت آنها صورت گرفت.

بررسی اثر فرمولاسیون تهیه شده از *P. fluorescens* P_4 در کنترل *S. sclerotiorum* GOL6 در اتاقک رشد

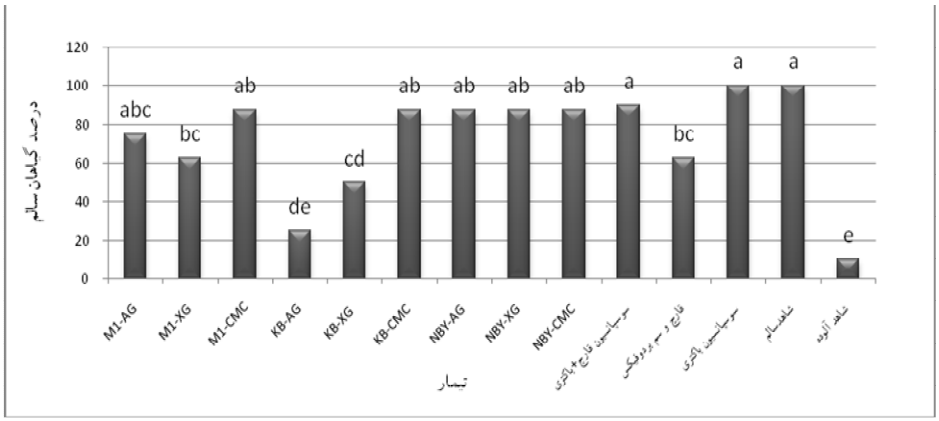
در این شکل AG نشان دهنده صمغ عربی، XG نشان دهنده صمغ زانتان و CMC نشان دهنده چسباننده کربوکسی متیل سلولز می باشد. همچنین میانگینهایی که دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون می باشند با یکدیگر در سطح آماری یک درصد اختلاف معنی داری ندارند.

شکل ۲ الف- هاله بازدارنده استرین باکتریایی *P. fluorescens* P_4 علیه قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* GOL6

همانطور که شکل ۳ نشان می‌دهد، گلدانهای تیمار شده با سوسپانسیون باکتری به همراه قارچ و فرمولاسیونهای M1-CMC، KB-CMC، NBY-AG، NBY-XG، NBY-CMC، M1-AG و M1-XG به ترتیب دارای بیشترین درصد گیاهان سالم بوده و بدون داشتن اختلاف معنی دار با یکدیگر، با گلدانهای تیمار شده با سوسپانسیون باکتری به تنهایی، شاهد سالم و همچنین سم بردوفیکس در سطح یک درصد اختلاف معنی داری را نشان ندادند. در این میان کمترین تاثیر مربوط به گیاهان تیمار شده با فرمولاسیون KB-AG بود که اختلاف معنی داری را نسبت به شاهد آلوده در سطح یک درصد از خود نشان ندادند.



شکل ۲ ب- تاثیر استرینهای آنتاگونیست باکتری *P. fluorescens* بر کنترل بیماری و افزایش درصد گیاهان سالم (اعدادمیانگین سه تکرار می باشند).

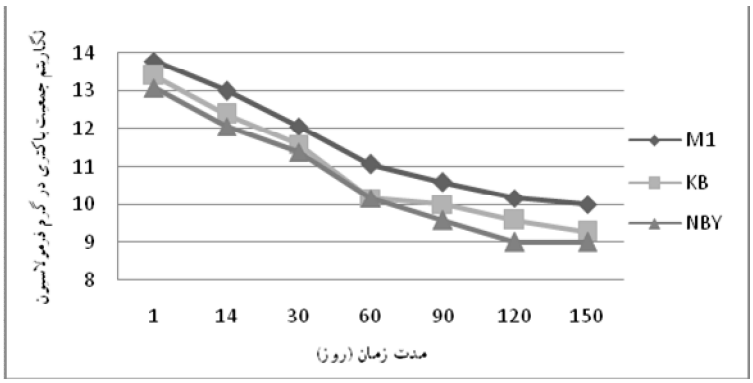


شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر تیمارها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه آفتابگردان در اتاقک رشد پس از شش هفته، (اعداد میانگین سه تکرار می باشند).

بررسی تاثیر نوع محیط کشت در بقاء باکتری در فرمولاسیون طی دوره ۱۵۰ روزه

همانطوریکه شکل ۴ نشان می دهد استرین *P. fluorescens* P_4 در محیط کشت M1 با $۶/۳\times۱۰^{۱۳}$ سلول باکتری در میلی لیتر محیط کشت، بیشترین میزان جمعیت باکتری را نشان داد. محیطهای کشت KB و NBY به ترتیب با $۲/۵\times۱۰^{۱۳}$ و $۱/۲\times۱۰^{۱۳}$ سلول باکتری در میلی لیتر محیط کشت، در مرتبه بعدی بودند. محیط کشت M1 در طی دوره ۱۵۰ روزه بیشترین میزان جمعیت باکتری را نشان داد و محیط کشت NBY کمترین میزان جمعیت باکتری را نشان داد.

میانگین تاثیر هر یک از محیطهای کشت بر جمعیت باکتری در فرمولاسیونها حاصل میانگین دمای چهار درجه سلسیوس می باشد.

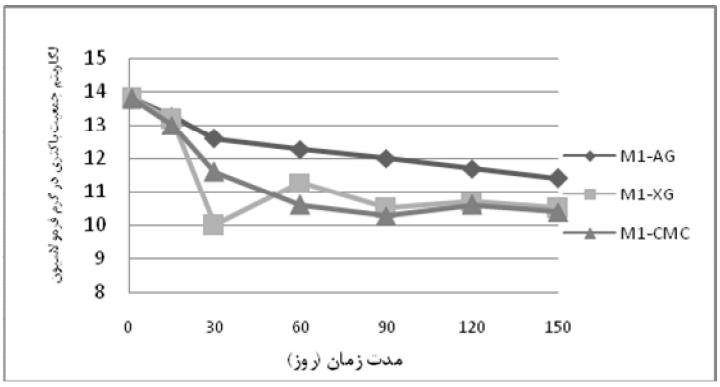


شکل ۴- تاثیر نوع محیط کشت بر جمعیت باکتری در فرمولاسیون در طی مدت نگهداری ۱۵۰ روز (اعداد میانگین سه تکرار می باشند).

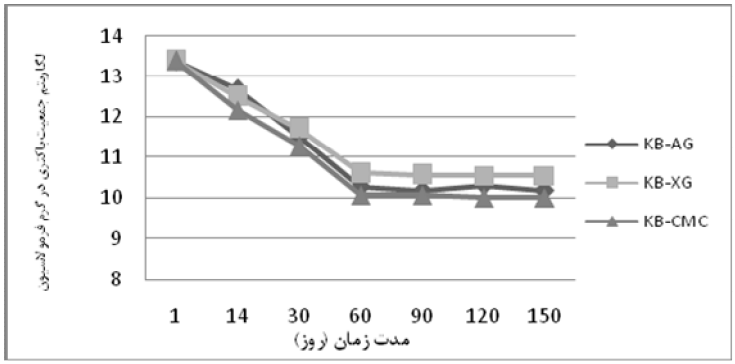
بررسی ماندگاری باکتری فرموله شده در حامل پودر تالک

بررسی ماندگاری باکتری *P. fluorescens* P_4 فرموله شده در حامل پودر تالک در دمای چهار درجه سلسیوس نشان داد که جمعیت اولیه این باکتری در فرمولاسیونهای مختلف از سه محیط کشت M1، KB و NBY و سه چسباننده صمغ عربی، صمغ زانتان و کربوکسی متیل سلولز طی مدت نگهداری حفظ نشده بود و جمعیت باکتری کاهش یافته بود. (شکلهای ۵، ۶ و ۷). البته کمترین کاهش مربوط به فرمولاسیون انجام شده در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ عربی است و در طی یک دوره ۱۵۰ روزه جمعیت آن از $۶/۳\times۱۰^{۱۳}$ به $۱۰^{۱۰}$ سلول باکتری در گرم فرمولاسیون کاهش پیدا کرد و جمعیت قابل قبولی از باکتری را در این شرایط در

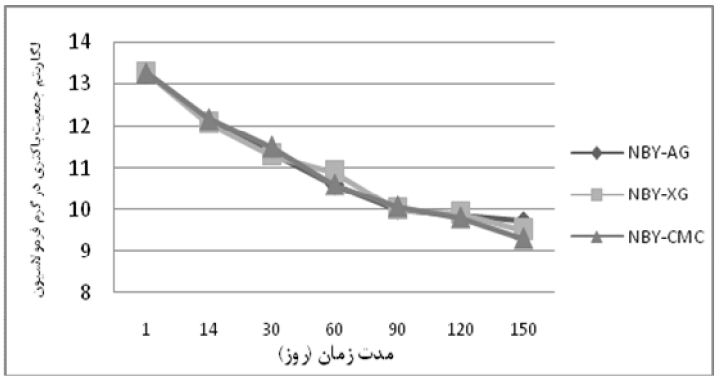
خود حفظ کرد و فرمولاسیون انجام شده در محیط کشت NBY با چسباننده کربوکسی متیل سلولز در دمای چهار درجه سلسیوس بیشترین میزان کاهش در جمعیت باکتری را از خود نشان داده و در طی دوره نگهداری ۱۵۰ روزه جمعیت آن از $۱/۸\times۱۰^{۱۳}$ به ۲×۱۰^{۹} سلول باکتری در گرم فرمولاسیون کاهش پیدا کرد.



شکل ۵- ماندگاری جمعیت باکتری P_4 *P. fluorescens* در فرمولاسیون پودر تالک در محیط کشت M_1 در طی مدت نگهداری (اعداد میانگین سه تکرار می باشند).



شکل ۶- ماندگاری جمعیت باکتری P_4 *P. fluorescens* در فرمولاسیون پودر تالک در محیط کشت KB در طی مدت نگهداری (اعداد میانگین سه تکرار می باشند).



شکل ۷- ماندگاری جمعیت باکتری P_4 *P. fluorescens* در فرمولاسیون پودر تالک در محیط کشت NBY در طی مدت نگهداری (اعداد میانگین سه تکرار می باشند).

فرمولاسیون پودری و به خصوص پودر تالک بهترین اثر را در بقا و پایداری باکتریهای آنتاگونیست داشته است (Bernhard and Burges, 1998; Bora *et al.*, 2004).

فرمولاسیون بر پایه پودر تالک می تواند به شکل پودر وتابل باشد که حمل و نقل و نگهداری آن آسان بوده و کاربرد آن در مزرعه با توجه به تجهیزات موجود امکان پذیر است (Klopper and Schroth, 1981). فرمولاسیونهای آزمایشی باکتریهای آنتاگونیستی که بر اساس پودر تالک بوده و در کاهش بیماریهای گیاهی موثر بوده اند در مقالات متعددی گزارش شده است که با نتایج این بررسی مطابقت دارد.

کاربرد فرمولاسیون *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto B190 در کنترل کپک خاکستری ناشی از قارچ *Botrytis elliptica* (Berk.) در شرایط گلخانه موثر شناخته شد (Chiou and Wu, 2003). فرمولاسیونهای پودر تالک دو جدایه *P. fluorescens* در کنترل *R. solani* موثر بوده است (Sabartnam and Traquir, 2002). به کار گیری فرمولاسیون پودری عوامل آنتاگونیست *B. subtilis*، *Trichoderma* spp. و *Coniothyrium minitans* Campbell علیه پوسیدگی سفید ریشه پیاز ناشی از *Sclerotium cepivorum* در شرایط گلخانه موثر است و استفاده از فرمولاسیون پودری باکتریایی *B. subtilis* در دو هفته قبل از نشاء کاری بیشترین تاثیر را در کاهش وقوع بیماری خواهد داشت (Sallam *et al*., 2009).

در این بررسی پس از انتخاب استرین آنتاگونیست موثر *P. fluorescens* P_4، نه فرمولاسیون بر پایه پودر تالک با استفاده از سه چسباننده صمغ عربی، صمغ زانتان و کربوکسی متیل سلولز و سه محیط کشت M1، KB، NBY ساخته شد و تاثیر آنها در کاهش شدت بیماریزایی جدایه قارچی *S. sclerotiorum* GOL6 در رقم پروگرس گیاه آفتابگردان نشان داد که تمامی فرمولاسیونها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه آفتابگردان موثر بودند.

نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر نشان داد گلدانهای تیمار شده با سلولهای آزاد باکتری با میانگین ۱۰۰ درصد، سلولهای آزاد باکتری به همراه قارچ با میانگین ۹۰ درصد، تیمارهای NBY-CMC، KB-CMC، NBY-XG، NBY-AG و M1-CMC با داشتن ۸۷/۵ درصد گیاه سالم و همچنین فرمولاسیون M1-AG با ۷۵ درصد گیاه سالم بدون داشتن اختلاف معنی دار با شاهد سالم بیشترین اثر را در کاهش بیماری داشتند و حتی از قارچکش بردوفیکس با ۶۲/۵ درصد کنترل موثرتر بودند که این مورد از نقاط امیدوار کننده این پژوهش و یکی از دستاوردهای عملی آن به شمار می رود. همچنین درصد بقا و پایداری باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* P_4 در محیط کشت M1 بیشتر بود پس نوع محیط کشت در حفظ بقاء و پایداری جمعیت موثر واقع شد. این محیط کشت دارای تاثیر بیشتری نسبت به محیط کشت های KB و NBY که در بیشتر پژوهشها استفاده می شوند بود.

همانطور که گفته شد فرمولاسیون استرین *P. fluorescens* P_4 با چسباننده صمغ عربی ماندگاری باکتری را بیش از سایر فرمولاسیونها افزایش داد در حالیکه در پژوهش های انجام شده توسط Krishnamurthy and Gnanamanickam, (1998)، چسباننده کربوکسی متیل سلولز به عنوان موثر ترین چسباننده در فرمولاسیون و بقاء باکتری آنتاگونیست معرفی شد.

نتیجه گیری کلی

آنچه از نتایج این تحقیق مشهود است آنکه یک چسباننده در یک محیط می تواند بالاترین کارایی را داشته باشد حال آنکه در محیطهای کشت دیگر اثری کاملا متفاوت دارد. به عبارت دیگر یک محیط یا چسباننده لزوما نمی تواند بهترین یا بدترین باشد. پس بایستی اثرات متقابل فاکتورهای دخیل در فرمولاسیونها از جمله نوع محیط کشت و نوع چسباننده درنظر گرفته شود. زیرا به طور کلی صرفا با یک جزء از اجزا موجود نمی توان قضاوتی صحیح و کلی داشت و تداخل عمل آن اجزا با سایر اجزا موجود در یک فرمولاسیون، بررسی های بیشتری را می طلبد که تا کنون در این مورد بررسی های مدونی توسط پژوهشگران کنترل بیولوژیک صورت نگرفته است.

آگاهی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محیطی که فرمولاسیون در آن استفاده می شود، گامی ضروری در جهت انتقال فرمولاسیون، پوشش هدف، افزایش چسبندگی و کاهش بیماری است زیرا این اطلاعات عوامل تعیین کننده در انتخاب نوع فرمولاسیون و مواد تقویتی اضافه شده به فرمولاسیون می باشد.

فرمولاسیونها به روشهای مختلفی انتقال می یابند. هدف از تحقیق انجام شده بکار گیری عملی روشهای بیوکنترلی موثر در کشاورزی می باشد. بنابراین به منظور نزدیکی به استانداردهای تجاری سازی و با در نظر گرفتن معیارهای کشاورزی عملی در مزرعه، در این بررسی از روش آغشته سازی بذر به فرمولاسیون باکتری آنتاگونیست استفاده شد. همچنین نوع و مقدار مواد به کار رفته در فرمولاسیون باعث حفظ قدرت حیات و کارایی استرین آنتاگونیست در طی مدت انبارداری شده و همچنین موجب حفظ شدت اثر آنها در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان در اتاقک رشد شدند.

REFERENCES

1. Bernhard, K. P. J., and Burges, H. D. (1998). A catalogue of formulation additives. *Formulation of Microbial Biopesticides*, 333-365.
2. Bora, T.,H., Ozakan, Gore, E., and Aslan, E. (2004). Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* by wettabe powder formulation of two strain of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology*, 152, 471-475.
3. Chiou, A. I., and Wu, W. S. (2003). Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of Lily Gray Mould (*Botrytis elliptica*). *Phytopathology*, 151, 13-18.
4. Cook, R. J. (2000). Advances in plant health management in the twentieth century. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 95-116
5. Dillard. H. R. (1995). Conditioning sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* from carpogenic germination. *Plant Diseases*, 79, 411-413.
6. Expert, J. M., and Digat, B. (1995). Biocontrol of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas putida* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 685-691.
7. Hagedron, C., Gould, W. D., and Bradinelli, R. t. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling desease pathogens. *Applied and Enviromental Microbiology*, 55, 2793-2797.
8. Haung, H. C., Kokko, E. G. I., Yanke, J., and Phillippe, R. C. (1993). Bacterial suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39, 227-233.
9. Keel, C., and Defago, G. (1997). Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gonge, A. C., Brown, V. K. (Eds.), *Multitrophic interaction in terrestrial system*. (pp. 27-46). Blackwell Scientific Publishers.
10. Klopper, J. W., and Schroth, M. N. (1981). Development of powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*, 71, 590-592.
11. Krishnamurthy, K., and Gnanamanickam, S. S. (1998). Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain PF7-140: Evaluation of a marker gene and formulation. *Biological Control*, B: 158-165.
12. Lumsden, R. D., Lewis, J. A., and Fravel, D. F. (1995). Formulation and delivery of biocontrol agents for using against soilborne plant pathogens. In: Hall, F. R., Barry, J. W. (Eds.*), Biorational pest control agents*. (PP. 166-182). ACS. Washington, DC.
13. Nandakumar, R., Babu, S. R., Viswanathan, J., Sheela, T., Raguchander, and Samiyappan, R. (2001). A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *Biocontrol*, 46, 493-510.
14. Nakkeeran, S., Dilantha Fernando, W. G., Siddiqui, Z. A. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria formulation and its scope in commercialization for the management of pest and disease. Z. A., Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. pp: 257-296. Springer.
15. Purdy, L. H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: History, disease and symptomology. *Phytopathology*, 69, 875-880.
16. Sabaratnam, S., and Traquair, A. j. (2002). Formulation of *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23, 245-253.
17. Sallam, N., Abd Elrazik, A. A., Hassan, M., and Koch, E. (2009). Powder formulation of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp. and *Coniothyrium minitans* for biological control of onion white rot. *Archives of phytopathology and plant protection*, 42 (2):142-174.
18. Sansford, C. E., and Coley, J. R. (1992). Production and germination of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology*, 41, 154-156
19. Saravanan, T., Bhaskaran, R., and Muthusamy, M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* induced

enzymological chages in banana roots (Cv. Rasthali) against Fusarium wilt disease. *Journal of Plant Pathology*, 3 (2), 72-80.

20. Schisler, D. A., Slininger, D. J., Behle, R.W., and Jakson, M. A. (2004). Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. *Phytopathology*, 94, 1267-1271.
21. Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Farzaneh, M., and Sarani, S. (2007). Powder, formulation of two strains of *Bacillus subtilis* for control of rape seed damping off caused by *Rhizoctonia solani*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 71 (2), 131-140.
22. Weller, D. M., and Cook, P. J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73, 463-469.