DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jsb.2011.683

مقایسه ملاس چغندرقند و نیشکراز نظرتأثیر روی تولید و کارایی باکتری *Pseudomonas fluorescens* عامل بیوکنترل قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*

Comparison of sugar beet and sugar cane molasses regarding their influence on production and efficiency of *Pseudomonas fluorescens,* the biocontrol agent of *Sclerotinia sclerotiorum*

فرشته حیدری تاج‌آبادی[1]*، مسعود احمدزاده[2] و اسما معین‌زاده[3]

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۱۲

ف. حیدری تاج‌آبادی، م. احمدزاده و ا. معین‌زاده. ۱۳۹۰. مقایسه ملاس چغندرقند و نیشکراز نظرتأثیر روی تولید و کارایی باکتری *Pseudomonas fluorescens* عامل بیوکنترل قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*. **مجله چغندرقند ۲۷(۱): ۵۲- ۳۹**

چکیده

برای کنترل قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* استفاده از برخی باکتری‌های آنتاگونیست در مواردی با موفقیت همراه بوده است. از آن‌جا که فاکتورهای محیطی مانند منابع کربن روی استرین‌های بیوکنترلی مؤثر می‌باشد و استفاده از کربوهیدرات‌های خالص در تولید انبوه این عوامل صرفه اقتصادی نداشته از این‌رو در بسیاری موارد از ضایعات کشاورزی و صنعتی غنی از کربوهیدرات‌ها (مثل ملاس) استفاده می‌گردد. در این تحقیق جدایهUTPF61 از میان ۴۷ جدایه *Pseudomonas fluorescens* انتخاب شد. سپس تأثیر دو محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر در افزایش جمعیت و خاصیت آنتاگونیستی باکتری در شرایط آزمایشگاه و خاصیت بیوکنترلی باکتری در شرایط گلخانه روی میزبان آفتابگردان بررسی شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر از نظر تأثیر روی جمعیت و خاصیت بیوکنترلی باکتری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه وجود ندارد اما این دو محیط کشت با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. در شرایط گلخانه ۸۰ درصد گیاهان به‌وسیله خاصیت بیوکنترلی باکتری حاصل از محیط کشت ملاس چغندرقند و ۷۸ درصد گیاهان به‌وسیله خاصیت بیوکنترلی باکتری حاصل از محیط کشت ملاس نیشکر در مقابل قارچ محافظت شدند. بررسی پارامترهای رشدی گیاه آفتابگردان در شرایط گلخانه نشان داد که ملاس چغندرقند تأثیر بیشتری بر افزایش وزن خشک گیاه داشت اما از نظر تأثیر بر طول ساقه، طول ریشه و وزن‌تر بین این دو محیط کشت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، بیوکنترل، چغندرقند، سودوموناس فلورسنس، کربوهیدرات‌ها، ملاس، نیشکر

۱- فارغ التحصیل کارشناسی‌ارشد بیماری شناسی گیاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- کرج * - نویسنده مسئول
fereshteh855@yahoo.com
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- کرج
۳- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر - پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران- کرج

مقدمه

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های آفتابگردان در ایران محسوب می‌شود. این بیمارگر خاکزاد به‌وسیله اسکلروت‌ها می‌تواند در خاک زنده مانده و با حمله به گیاهچه‌های آفتابگردان باعث مرگ بوته‌ها شود. این بیمارگر هم‌چنین به ریشه‌های در حال رشد و بالغ گیاهان حمله کرده و باعث پوسیدگی ریشه، شانکر در پایین ساقه و پژمردگی می‌شود (Shojaalsadati 2003).

یکی از راه‌های بالا بردن عملکرد محصول آفتابگردان کاهش خسارت ناشی از بیماری‌های آن است، تأثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی خاکزاد، هزینه‌های بالای اقتصادی آن، آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از استفاده سموم، پسماندهای سموم شیمیایی در محصولات کشاورزی، پیدایش و توسعه جدایه‌های مقاوم عوامل بیماری‌زا به قارچکش‌ها باعث شده است تا محققین به‌دنبال روش‌های مناسب‌تر و منطقی‌تر با هدف توسعه کشاورزی پایدار باشند (Duffy and Defago 1999). کنترل بیولوژیک به‌خصوص با استفاده از برخی باکتری‌های آنتاگونیست در مواردی با موفقیت قابل ملاحظه‌ای همراه بوده و نقش آن در کنترل بیمارگرهای مهم خاکزی به اثبات رسیده است. از آن‌جا که آفتابگردان یکی از گونه‌های گیاهی است که به قارچ *S. sclerotiorum* حساس است و تهیه ارقام مقاوم به پوسیدگی اسکلروتینیایی در آفتابگردان تاکنون موفقیت‌آمیز نبوده و کنترل شیمیایی مؤثری نیز برای این بیماری شناخته نشده است، (Expert and Digat 1995) استفاده از عوامل بیوکنترل علیه این قارچ می‌تواند مؤثر باشد. بررسی‌ها نشان داده است که تیمار بذرها با باکتری‌های آنتاگونیست به‌طور معنی‌داری بر روی رشد گیاه از طریق حفاظت گیاهچه‌ها در مقابل بیمارگرهای خاکزاد مؤثر بوده است (Costa et al. 2001). طبق بررسی‌های مک‌لولین (McLoughlin et al. 1992) در یک آزمایش مزرعه‌ای، استرین های *Pseudomonas cepacia* جوانه‌زنی آفتابگردان را در حضور *S. sclerotiorum* افزایش داد.

تعدادی از استرین‌های گونه *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* به‌عنوان عوامل بیوکنترل قارچ‌های مختلف خاکزاد گزارش شده‌اند (Duffy and Defago 1999). عوامل محیطی زنده و غیرزنده‌ای مانند دما، اکسیژن، منابع غذایی و غیره عواملی هستند که بر روی فعالیت مؤلفه‌های بیوکنترل مؤثر بوده و هم‌چنین در بیوسنتز ترکیبات ضدمیکروبی مانند انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفورها و غیره نقش مهمی ایفا می‌کنند. یکی از مهم‌ترین مسائل در مورد استفاده عملی از عوامل بیوکنترل در سطح وسیع تولید انبوه آن‌ها می‌باشد. طراحی فرایندی که هم زمان با افزایش زادمایه، کارایی، ماندگاری و ثبات ژنتیکی باکتری را در مراحل تولید انبوه افزایش دهد از اهمیت به سزایی برخوردار است. به‌علاوه عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف موجود در شرایط طبیعی و محیط کشت در بقا و کارایی عامل بیوکنترلی نقش به‌سزایی دارند. منبع

کربن برای کلیه فعالیت‌های بیوسنتزی که منجر به تولید مثل، تشکیل فراورده و بقای سلول می‌شود مورد نیاز است. استفاده از کربوهیدرات‌های خالص مثل گلوکز، فروکتوز، ساکارز، لاکتوز و قندهای دیگر در میکروبیولوژی صنعتی برای تولید انبوه عوامل آنتاگونیست باعث بالا رفتن هزینه تمام شده برای تولید محصول می‌شود از این‌رو در بسیاری موارد از ضایعات کشاورزی و صنعتی که از این قندها غنی‌اند (مثل ملاس) استفاده می‌گردد (Vazquez et al. 1997). ملاس محصول جانبی چسبناک و قهوه‌ای رنگی است که در جریان تولید شکر از چغندرقند و نیشکر به‌وجود می‌آید. کیفیت ملاس بستگی به میزان بلوغ چغندرقند یا نیشکر، میزان شکر استخراج شده و روش استخراج دارد. ملاس چغندرقند و نیشکر دارای مواد با ارزشی هم‌چون موادمعدنی مثل قندها، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای طبیعی می‌باشند (Pyghami Ashenaee 2007). هم‌چنین مشخص شده ملاس یکی از با صرفه‌ترین و رایج‌ترین منبع برای تولید انبوه عوامل آنتاگونسیت می‌باشد(McNeil and Harvey 2008).

طبق نتایج بررسی‌های انجام شده محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند هم برای رشد سلول و هم در کارایی و خاصیت آنتاگونیستی استرین‌های مختلف از سودوموناس و باسیلوس بر روی کپک خاکستری سیب و رایزوکتونیای لوبیا مؤثر بوده است (Pyghami Ashenaee 2007). براساس بررسی‌های انجام شده برای پیدا کردن منابع کربنی که حداکثر بیومس *Pantoea agglomerans* استرین CPA-2 را با کمترین قیمت (در مقایسه با سایر منابع) ایجاد کنند مشخص شد کربوهیدرات‌های ارزان قیمتی مثل سوکروز و ملاس حداکثر بیومس را تولید می‌کنند (Costa et al. 2001). تعدادی از محققین گزارش کرده‌اند که بیشترین رشد باکتری باسیلوس در محیط کشت حاوی ملاس به‌عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن صورت می‌گیرد و هم‌چنین اسپوردهی سریع در یک محیط کشت که دارای تعادل خوبی از C/N باشد دیده شده است (Shojaalsadati 2003). هدف از این پژوهش یافتن منبع کربنی است که علاوه بر افزایش میزان رشد باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 که یک عامل بیوکنترل برای قارچ *S. sclerotiorum* محسوب می‌شود، باعث افزایش کارایی بیوکنترل شود و امکان استفاده از آن در مقیاس تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی امکان‌پذیر باشد. از آن‌جا که ملاس چغندرقند و ملاس نیشکر محصول جانبی کارخانه‌های تولید قند و شکر می‌باشند استفاده از این قبیل منابع کربن برای تولید انبوه باکتری‌های بیوکنترلی از جهات مختلف امکانپذیر است

مواد و روش‌ها

۱- انتخاب باکتری

در ابتدا ۲۶ جدایه باکتریایی از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید که

مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است و ۲۱ جدایه نیز از ناحیه ریزوسفر گیاهان آفتابگردان واقع در چند مزرعه در اطراف قم در سال ۱۳۸۶ جداسازی گردید. از میان این ۴۷ جدایه باکتریایی در نهایت باکتری *P. fluorescens* جدایه UTPF61 براساس چندین آزمون انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی به‌کار برده شد.

آزمون‌های انجام شده روی این ۴۷ جدایه باکتریایی برای انتخاب جدایه برتر شامل موارد ذیل بوده است:

الف- هاله بازدارندگی: برای بررسی قدرت بازداری از رشد بیمارگر *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه از روش هاجدرن و همکاران (Hagedorn et al. 1989) استفاده شد.

ب- سیانید هیدروژن: تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش آلستروم (Alstrom and Burns 1989) انجام گردید. در صورت تولید HCN توسط باکتری‌های رشد یافته کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ اولیه زرد به قهوه‌ای تغییر رنگ می‌یابند.

پ- پروتئاز: به منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری‌ها از محیط Skim milk agar (SMA) مطابق روش مارهوفر و همکاران (Maurhofer et al. 1995) با کمی تغییر استفاده شد. این محیط شامل ۱۵ گرم پودر شیر (Skim milk)، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۹/۱۳ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر می‌باشد. ایجاد هاله شفاف نشان‌دهنده تولید پروتئاز می‌باشد.

ت- تأثیر روی پارامترهای رشدی آفتابگردان در گلخانه: این آزمایش طبق روش اکسپرت و دیگات (Expert and Digat 1995) با تغییراتی به‌شرح ذیل انجام شد: ابتدا بذور آفتابگردان رقم آذرگل به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شد و بعد از شستشو با آب مقطر استریل، روی کاغذ صافی خشک و سپس در شرایط استریل ۱۵ الی ۲۰ عدد بذر در داخل تشتک پتری حاوی دو عدد کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده شدند. مجموعه حاضر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس بذور جوانه زده به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی حاوی 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر درون شیکر انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از این مرحله بذور به گلخانه منتقل شدند و درون هر گلدان محتوی خاک رس، خاک برگ و ماسه به نسبت حجمی ۳:۱:۱ استریل شده با اتوکلاو، سه عدد بذر کاشته شد و گلدان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و هشت ساعت تاریکی با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. صفات وزن‌تر گیاه، وزن خشک گیاه، طول ساقه و طول ریشه بعد از گذشت یک ماه اندازه‌گیری شدند. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با ۴۸ تیمار و سه تکرار اجرا شد که هر تکرار شامل چهار گیاه بود مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $P\leq۰/۰۱$ انجام شد.

جدول۱ مشخصات جدایه‌های باکتریائی تهیه شده از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

ردیف	منطقه جمع‌آوری جوان	میزبان	ملاحظات	جدایه
۱	–	کلزا	*Pseudomonas fluorescens*	UTPF2
۲	دانشکده کشاورزی کرج	گندم	*P. fluorescens*	UTPF10
۳	دانشکده کشاورزی کرج	گندم	*P. fluorescens*	UTPF18
۴	دانشکده کشاورزی کرج	گندم	*P. fluorescens*	UTPF24
۵	دانشکده کشاورزی کرج	گندم	*P. fluorescens*	UTPF30
۶	دانشکده کشاورزی کرج	گندم	*P. fluorescens*	UTPF32
۷	خمین	لوبیا	*P. fluorescens*	UTPF45
۸	خمین	لوبیا	*P. fluorescens*	UTPF54
۹	قره تپه	پیاز	*P. fluorescens*	UTPF59
۱۰	شموک الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF60
۱۱	الموت قزوین	برنج	*P. fluorescens*	UTPF61
۱۲	مازندران	کلزا	*P. fluorescens*	UTPF63
۱۳	مازندران	کلزا	*P. fluorescens*	UTPF65
۱۴	الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF75
۱۵	الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF76
۱۶	قسین رود	برنج	*P. fluorescens*	UTPF81
۱۷	الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF82
۱۸	الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF83
۱۹	گازرخان	برنج	*P. fluorescens*	UTPF85
۲۰	شموک	برنج	*P. fluorescens*	UTPF86
۲۱	رازمیان	برنج	*P. fluorescens*	UTPF87
۲۲	شموک	برنج	*P. fluorescens*	UTPF90
۲۳	الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF92
۲۴	الموت	برنج	*P. fluorescens*	UTPF93
۲۵	هند	–	*P. fluorescens*	UTPF94
۲۶	هند	–	*P. fluorescens*	UTPF95

۲- آماده‌سازی محیط کشت و مایه‌زنی با سوسپانسیون باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61

محیط پایه مورد استفاده، محیط M1 (Fuchs et al. 2000) با تغییراتی که شامل مواد زیر می‌باشد:

K_2HPO_4(0.98g/lit) + $MgSO_4$(0.4g/lit) + $CaCO_3$(0.4g/lit) + Sucrose(10g/lit) + Yeast extract(3g/lit)

نحوه تهیه محیط‌های کشت به این صورت بود که به محیط‌های پایه تهیه شده منابع کربن شامل ملاس چغندرقند (ملاس چغندرقند مورد استفاده در این تحقیق حدوداً دارای ۵۰ درصد ساکاروز بود) و ملاس نیشکر هر کدام به میزان ۱۰ گرم بر لیتر به‌طور جداگانه اضافه شد و برای شروع آزمایش درون فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از هر کدام از محیط‌های کشت در سه تکرار ریخته شد و محیط‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند (در این آزمایش یک فلاسک حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت Nutrient broth (NB) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد). سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری آنتاگونیست غلظت ۱×۱۰^{۶} سلول باکتری

در هر میلی‌لیتر به‌وسیله لام هماسیتومتر محاسبه شد و به‌میزان یک میلی‌لیتر به هرکدام از فلاسک‌های حاوی محیط کشت استریل، تحت شرایط کاملاً استریل اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰دور در دقیقه قرار گرفتند. نتایج براساس طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با دو تیمار و شش تکرار مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال P≤۰/۰۱ انجام شد.

۳- تأثیر محیط‌های مختلف کشت در جمعیت باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61

رشد باکتری به‌طور مستقیم با اندازه‌گیری کدورت نوری (Optical Density) در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Ulterospec Π صورت گرفت. نتایج در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با سه تیمار و شش تکرار اجرا و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال P≤۰/۰۱ انجام شد.

۴- تاثیر محیط‌های مختلف کشت بر قدرت بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 از رشد *S. sclerotiorum*

برای بررسی تأثیر محیط‌های مختلف کشت بر قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه از روش هاجدرن و همکاران (1989) استفاده شد. به این ترتیب که جدایه باکتری حاصل از محیط‌های مختلف کشت به صورت سه نقطه‌ای و در سه تکرار با فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA کشت داده شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت قطعات مساوی از کشت پنج روزه قارچ در وسط تشتک‌ها قرار گرفت و تشتک‌های پتری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت هفت روز هاله بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه قدرت بازدارندگی باکتری، فاصله کلنی باکتری تا کلنی قارچ اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی اجرا و تحلیل شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح P≤۰/۰۱ صورت گرفت.

۵- تاثیر محیط های مختلف کشت بر باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 و رشد رویشی گیاه آفتابگردان در شرایط گلخانه

برای بررسی تأثیر باکتری‌های حاصل از محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و ملاس نیشکر روی رشد رویشی گیاه آفتابگردان آزمایشی طبق روش اکسپرت و دیگات (Expert and Digat 1995) با تغییراتی به شرح ذیل انجام شد: ابتدا بذرهای آفتابگردان رقم آذرگل به‌مدت ۳۰ دقیقه در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و بعد از شستشو با آب مقطر استریل، روی کاغذ صافی خشک و سپس در شرایط استریل ۱۵ الی ۲۰ عدد بذر در داخل

تشتک‌های پتری حاوی دو عدد کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده شدند. مجموعه حاضر به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. سپس تعدادی از بذور جوانه زده در سوسپانسیون باکتری حاصل از محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند و تعدادی در سوسپانسیون باکتری حاصل از محیط کشت حاوی ملاس نیشکر درون شیکر انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۰/۵ ساعت قرار گرفتند (هر تیمار حاوی $۱۰^{۸}\times$ ۱ سلول در میلی‌لیتر باکتری به همراه کربوکسی متیل سلولز یک درصد بود)؛ بذور شاهد نیز به‌مدت ۰/۵ ساعت درون آب‌مقطر استریل به‌همراه کربوکسی متیل سلولز یک درصد درون شیکر انکوباتور ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس بذرهای حاصل از تیمارهای مختلف به‌طور جداگانه درون گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۷/۵ سانتی‌متر و عمق هشت سانتی‌متر کاشته شدند (گلدان‌ها حاوی مخلوط رس، خاک برگ و ماسه اتوکلاو شده به نسبت حجمی ۳:۱:۱ بودند و درون هر گلدان سه عدد بذر کاشته شد) سپس گلدان‌ها در گلخانه با نور روزانه ۱۴ ساعت و دمای ۳ ±۲۲ و رطوبت نسبی ۴۰ درصد قرار گرفتند و یک روز در میان آبیاری شدند.

این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با سه تیمار و شش تکرار اجرا شد که هر تکرار شامل چهار گیاه بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال $P\leq ۰/۰۱$ صورت گرفت. شاخص‌های مورد نظر شامل وزن‌تر گیاه (ساقه، برگ‌ها و ریشه)، وزن خشک گیاه (ساقه، برگ‌ها و ریشه)، طول ساقه و طول ریشه بعد از گذشت یکماه از شروع آزمایش اندازه‌گیری شدند.

۶- بررسی تأثیر محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر بر خاصیت آنتاگونیستی باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 علیه *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه

۶-۱- تهیه مایه قارچ بیمارگر

تهیه مایه تلقیح *S. sclerotiorum* به دو روش انجام شد:

روش اول: از روش سانسفورد و کولی (Sansford and Coley 1992) برای تهیه مایه قارچ استفاده گردید. ابتدا مقداری گندم رقم قدس درون الک زیر آب شسته شد و این گندم‌ها به منظور خیس شدن در داخل بشر به همراه مقداری آب و به‌مدت دو ساعت نگه‌داری گردیدند. سپس ۶۰ گرم از این دانه‌های گندم خیس خورده در داخل ارلن ۳۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد و ۶۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل گردید. پس از سرد شدن ارلن‌ها، هر کدام با قارچ بیمارگر مایه‌زنی شدند. بدین منظور از کشت سه روزه قارچ *S. sclerotiorum* روی محیط کشت PDA استفاده شد. بعد از آن ارلن‌ها در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت سه هفته نگه‌داری گردیدند. ارلن‌ها هر سه روز یک بار تکان داده شدند.

روش دوم: در این روش برای تهیه مایه تلقیح از دانه‌های ارزن استفاده شد بدین ترتیب که ابتدا ارزن‌ها درون الک زیر آب شسته، سپس به‌مدت دو ساعت

خیس خوردند. بعد از آن، دو بار و در دو روز متوالی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند و هر کدام با قارچ بیمارگر مایه‌زنی شدند. بدین منظور از کشت سه روزه قارچ *S. sclerotiorum* روی محیط کشت PDA، استفاده شد. بعد از آن تشتک‌های پتری در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو هفته نگه‌داری شدند.

۶-۲- مایه‌زنی قارچ عامل بیماری

برای مایه‌زنی از بذر گندم یا ارزن حاوی *S. sclerotiorum* استفاده شد بدین ترتیب که ابتدا گلدان‌ها با مخلوط خاک رس، خاک برگ و ماسه به نسبت حجمی ۳:۱:۱ استریل شده با اتوکلاو پر گردیدند. سپس درون هر گلدان چهار عدد بذر رقم آذر گل جوانه زده کاشته شد (جوانه‌دار کردن بذور قبلاً شرح داده شد هم‌چنین این بذور مانند آنچه که در بالا شرح داده شد شامل بذور آغشته به سوسپانسیون باکتری و بذور شاهد بودند). لازم به ذکر است که خاک این گلدان‌ها ۲۴ ساعت قبل از کشت با یک گرم از مایه قارچ آلوده شده بود.

گلدان‌ها در گلخانه با نور روزانه ۱۴ ساعته و در دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۰ درصد قرار گرفتند و یک روز در میان آبیاری شدند و بعد از مرگ گیاهان شاهد تعداد گیاهان سالم محاسبه و درصد آن‌ها محاسبه شد. هم‌چنین درصد گیاهان سالم نیز یکماه بعد از مرگ کامل گیاهان شاهد محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با سه تیمار و شش تکرار انجام شد که هر تکرار شامل چهار گیاه بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال P≤۰/۰۱ صورت گرفت.

نتایج

۱- انتخاب جدایه باکتریایی

از میان ۴۷ جدایه باکتری *P. fluorescens* جدایه UTPF61 دارای بیشترین هاله بازدارندگی (۲۱ میلی‌متر) در شرایط آزمایشگاه بود (جدول۲) و از نظر تأثیر بر پارامترهای رشدی گیاه آفتابگردان در شرایط گلخانه بیشترین تأثیر را بر افزایش طول ساقه، طول ریشه و وزن خشک گیاه داشت (جدول ۳). هم چنین این جدایه متابولیت‌هایی نظیر پروتئاز و سیانید هیدروژن را نیز تولید می‌کرد.

جدول ۲ اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست برتر در جلوگیری از رشد بیمارگر *S. sclerotiorum*

ردیف	نام جدایه باکتری	اندازه هاله بازدارندگی(میلیمتر)
۱	UTPF61	۲۱ a*
۲	UTPF93	۲۰/۳ ab
۳	UTPF92	۱۹/۵ abc
۴	UTPF60	۱۷/۶۷ abc
۵	UTPF59	۱۷ bc
۶	UTPF83	۱۶ c
۷	UTPF82	۱۶ c

* اعداد دارای حروف مشترک در ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد است (آزمون دانکن)

جدول ۳ بررسی تأثیر برخی از جدایه‌های سودوموناس فلورسنت روی پارامترهای رشدی گیاه آفتابگردان

ردیف	نام جدایه های باکتری	وزن خشک (گرم)	وزن تر (گرم)	طول ساقه (میلی متر)	طول ریشه (میلی متر)
۱	UTPF61	۰/۲۸a	۴/۰۳cde	۳۱ab	۲۵a
۲	UTPF24	۰/۲۳cde	۴/۴۳abc	۲۸abcde	۲۲/۶۷ab
۳	UTPF90	۰/۲۸a	۴/۲bcd	۲۸/۶۷abcde	۲۱/۳۳bc
۴	UTPF95	۰/۲۸a	۳/۴۷efg	۲۸/۳abcde	۲۰bc
۵	UTPF45	۰/۲۶abc	۴/۰۳cde	۲۹/۳abcd	۱۸cd
۶	UTPF2	۰/۲۱edf	۴/۰۶cde	۳۰/۳abc	۱۸cd
۷	UTPF63	۰/۲۳cde	۴/۴۳abc	۲۸/۳abcde	۱۸cd
۸	UTPF87	۰/۱۷ij	۲/۸h	۲۷cdefg	۱۶/۳de
۹	UTPF86	۰/۲۸a	۴/۸a	۳۱/۳a	۱۶def
۱۰	UTPF85	۰/۲۲cde	۳/۷def	۲۶/۶۷cdefg	۱۶def
۱۱	UTPF59	۰/۲۲cde	۳/۹۳cdef	۲۶/۳defgh	۱۵/۶۷def
۱۲	UTPF93	۰/۱۹efghi	۲/۶۳h	۲۳/۳ghi	۱۵/۶۷def
۱۳	UTPF18	۰/۲۲cde	۳/۶def	۲۶defgh	۱۴/۶۷defg
۱۴	UTPF60	۰/۲efghi	۳/۵efg	۲۸/۳abcde	۱۴/۶۷defg
۱۵	UTPF83	۰/۲۱defg	۳/۵۷fe	۲۶defgh	۱۴efg
۱۶	UTPF94	۰/۲۶ab	۴/۶۷ab	۳۰/۳abc	۱۳/۶۷efg
۱۷	UTPF75	۰/۱۸fghij	۳/۴۷efg	۲۶/۳defgh	۱۳/۶۷efg
۱۸	UTPF32	۰/۲۳cde	۳/۹۳cdef	۲۵/۶۷defghi	۱۳/۳۳efg
۱۹	UTPF30	۰/۲۴bcd	۴/۸a	۳۱/۳a	۱۲/۶۷efg
۲۰	UTPF76	۰/۲۱defgh	۳/۷def	۲۷/۳bcdef	۱۲/۶۷efg
۲۱	UTPF81	۰/۱۸ghij	۳/۳۷fg	۲۸abcde	۱۲/۶۷efg
۲۲	UTPF88	۰/۱۸ghij	۲/۶۷h	۲۲/۶۷hi	۱۲/۳۳fg
۲۳	UTPF92	۰/۱۷hij	۲/۷h	۲۵/۳efghi	۱۱/۶۷g
۲۴	UTPF65	۰/۱۷hij	۲/۷h	۲۳/۶۷fghi	۱۱g
۲۵	UTPF54	۰/۲defghi	۲/۹۷gh	۲۵/۶۷defghi	۱۱g
۲۶	control	۰/۱۵j	۲/۴۳h	۲۲i	۱۱g

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد است (آزمون دانکن)

۲- بررسی تأثیر محیطهای مختلف کشت در میزان جمعیت و قدرت بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 از رشد قارچ *S. sclerotiorum*

مطابق جدول ۴ بین محیـطهای کشت حاوی مـلاس چغنـدرقند و نیشکـر از نظـر تأثیر روی جمعیت باکتری تفاوت زیادی وجود نداشت اما بین این دو محیط کشت و محیط کشت NB (Nutrient broth) که در اینجا به‌عنوان شاهد است اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. از طرفی در بررسی اثر محیط کشت روی قدرت بازدارندگی باکتری در شرایط آزمایشگاه مشخص شد که محیطهای کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر در کشت دو نقطه به‌ترتیب با هاله بازدارندگی ۱۵/۳۳ و ۱۴/۶۷ میلی‌متر از نظر تأثیر بر جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند اما هر دو این محیطها با شاهد (باکتری رشد یافته در محیط NB با هاله بازدارندگی ۱۰ میلی‌متر) اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

جدول۴ تأثیر محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر روی جمعیت و قدرت بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* از رشد *S. sclerotium*

ردیف	محیط کشت	جذب نوری (OD600)	هاله بازدارندگی (میلی متر)
۱	M1+ sugar beet molasses	۰/۳۵**a	۱۵/۳۳a*
۲	M1+ sugar cane molasses	۰/۳۲ab	۱۴/۴۷a
۳	NB (شاهد)	۰/۳b	۱۰b

* اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد است (آزمون دانکن)

** میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده است

۳- بررسی تأثیر محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر بر پارامترهای رشدی گیاه آفتابگردان

بررسی اثر باکتری حاصل از محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر روی پارامترهای رشدی گیاه (طول ریشه، طول ساقه، وزن‌تر و وزن خشک گیاه) پس از یک ماه نشان داد باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 رشد یافته در این دو محیط از نظر تأثیر بر طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک و وزن‌تر گیاه تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان دادند اما در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری از نظر وزن‌تر و طول ساقه نداشته ولی از نظر تفاوت وزن خشک طول ریشه تفاوت معنی‌داری نشان دادند. به‌طوری که بیشترین تأثیر بر پارامتر مذکور مربوط به باکتری رشد یافته در محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند بود (جدول ۵).

جدول۵ تأثیر باکتری حاصل از محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر بر صفات رشدی گیاه آفتابگردان پس از گذشت یک ماه

ردیف	محیط کشت	وزن‌خشک (گرم)	وزن‌تر (گرم)	طول ساقه (سانتی‌متر)	طول ریشه (سانتی‌متر)
۱	M1+ sugar beet molasses	۰/۲۳a	۲/۹۲a	۱۹/۵a*	۱۳/۳a
۲	M1+ sugar cane molasses	۰/۱۹b	۲/۸a	۱۹/۳۳a	۱۳ab
۳	Control (شاهد)	۰/۱۳c	۱/۴۸b	۱۳/۶۷b	۱۰/۹b

*اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد است (آزمون دانکن)

۴- بررسی تأثیر محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر بر خاصیت آنتاگونیستی باکتری *P. fluorescens* استرین UTPF61 علیه *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه

بررسی تأثیر جدایهUTPF61 حاصل از محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر در خاک آلوده به قارچ *S. sclerotiorum* نشان داد که در هر دو تیمار بعد از مرگ کامل گیاهان در شاهد، صد در صد گیاهان سالم باقی ماندند اما بعد از یک ماه که از

مرگ گیاهان شاهد گذشت هیچ کدام از تیمارها به‌طور کامل از مرگ گیاه جلوگیری نکردند به‌طوری که درصد گیاهان سالم در دو تیمار باکتری محصول محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر به ترتیب ۸۰ و ۷۸ درصد بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند (شکل۱).

بحث

کنترل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه آفتابگردان به‌دلیل خاکزی بودن عامل بیماری با روش‌های شیمیایی کار آسانی نمی‌باشد، هم‌چنین استفاده از ارقام مقاوم در کنترل بیماری کارایی نداشته و لازم است از روش‌های دیگر مانند کنترل بیولوژیکی و زراعی استفاده کرد (Cook 2000; Musial et al. 2004). بررسی‌ها نشان می‌دهد که سودوموناس‌های فلورسنت در اغلب خاک‌های زراعی وجود دارند و مسئول کاهش برخی از بیماری‌های ناشی‌از عوامل بیماری‌زای خاکزی بیماری می‌باشند (Weller 1983).

تجاری کردن فراورده‌های تخمیری، مستلزم اقتصادی کردن فرایندها و کاهش هزینه‌ها است، کاهش قیمت تمام شده محصول نیز با استفاده از محیط کشت ارزان‌تر امکان‌پذیر است. ملاس محصول فرعی تولید قند از چغندر و یا نیشکر است و ارزان‌ترین و متداول‌ترین منبع ساکارز می‌باشد نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر از نظر تأثیر روی خاصیت بیوکنترلی باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرینUTPF61 در شرایط آزمایشگاه وجود ندارد اما از نظر تأثیر بر جمعیت باکتری در شرایط آزمایشگاه و از نظر تأثیر بر پارامترهای رشدی گیاه آفتابگردان در شرایط گلخانه بین این دو محیط کشت تفاوت جزئی وجود دارد به طوری که عملکرد باکتری در محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند اندکی بهبود یافته بود. در این تحقیق مشاهده شد که بین دو محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند و نیشکر در اکثر موارد شباهت‌هایی وجود دارد که این می‌تواند به‌دلیل وجود مواد مشابه زیادی در این دو محیط باشد، اما به‌طور کلی عملکرد باکتری در محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند مقدار جزئی بهبود یافت که این می‌تواند به‌دلیل وجود درصد بالاتری از ساکاروز، روی و ویتامینی مانند بیوتین در ملاس چغندرقند نسبت به ملاس نیشکر باشد.

مطابق نتایج سایر تحقیقات مشخص شد که وجود ملاس در محیط کشت بر خاصیت آنتاگونیستی سودوموناس مؤثر است (Pyghami Ashenaee 2007). از طرفی میزان بالای ساکاروز موجود در ملاس چغندر استفاده شده می‌تواند تا حدود زیادی تکثیر سلول‌های باکتریایی را در یک زمان مشخص به حداکثر ممکن برساند. امروزه در جهان از ملاس جهت تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (Costa et al. 2001). از آن جا که استفاده از هیدروکربن‌های خالص مثل گلوکز، فروکتوز، ساکارز، لاکتوز و قندهای دیگر در میکروبیولوژی صنعتی برای تولید انبوه عوامل آنتاگونیست باعث بالا رفتن هزینه تمام شده برای تولید محصول می‌شود از این‌رو در

بسیاری موارد از ضایعات کشاورزی و صنعتی که از این قندها غنی‌اند (مثل ملاس) استفاده می‌گردد (Vazquez et al. 1997).

از آن‌جا که محیط کشت روی بسیاری از توانایی‌های باکتری به‌خصوص روی بقا و دوام آن مؤثر می‌باشد در این پژوهش سعی شد که ارزش ملاس چغندرقند و نیشکر و تأثیر آن‌ها بر عملکرد باکتری مشخص شود و در نهایت محیط کشتی معرفی شود که در مقیاس تجاری و صنعتی قابل توجیه باشد و در عین حال حداکثر عملکرد را در شرایط آزمایشگاه در پی داشته باشد، اما از آن‌جا که نتایج این پژوهش در شرایط مزرعه بررسی نشد این موضوع می‌تواند یکی از اهداف اصلی در تحقیقات آینده باشد. در ضمن جزئیات محیط‌های کشت تجاری موجود در برخی کشورهای توسعه یافته در دسترس نیست و حالت محرمانه دارد.

بنابراین وظیفه ماست تا با تحقیق و پژوهش بیشتر در مورد مکمل‌های غذایی و بهبود مراحل فرمانتاسیون، به تکنولوژی تولید انبوهی دست یابیم که از نظر حفظ قدرت حیات و افزایش کارایی عوامل آنتاگونیست بسیار مؤثر بوده و رضایت‌بخش باشد تا در نهایت عامل آنتاگونیست به‌صورت انبوه و تجاری تولید شده و در اختیار کشاورزان قرار گیرد.

سپاسگزاری

این طرح از محل اعتبارات پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به شماره گرنت ۷۱۱۰۰۲۴/۰۱/۴ و با حمایت قطب علمی کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی گروه گیاه‌پزشکی صورت گرفته است که صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده: References:

Alstrom S, Burns RG. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biol. Fertil. Soils. 1989; 7: 232-238.

Cook RJ. Advances in plant heath management in the twentieth century. Annu. Rev. Phtopathol. 2000; 38: 95-116.

Costa E, Teixdo N, Usall J, Atares E, Vinas I. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. Appl. Microbiol. Biotecnol. 2001; 56: 367-371.

Duffy BK, Defago G. Environmental factors modulating antibiotic and sidrophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65: 2429-2438.

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

Farzaneh M. Study on the effect of some antagonistic bacteria on Phytophthora cactorum the agent of apple crown and root rot disease. MSc thesis. University of Tehran, Iran. 2007. 88pp. (in Persian, abstract in English)

Fuchs JG, Moenne-Loccoz Y, Defago G. The laboratory medium used to grow biocontrol *Pseudomonas* sp. Pf153 influences its subsequent ability to protect cucumber from black root rot. Soil Biol. Biochem. 2000; 32: 421-424.

Hagedorn C, Gould WD, Bradinelli RT. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 1989; 55: 2793-2797.

Heidary Tajabadi F. Study on the effect of some carbon and nitrogen sources on production process of fluorescent pseudomonads for controlling of sunflower sclerotinia rot disease. MSc thesis. University of Tehran. 2008. Iran.63pp. (in Persian, abstract in English)

Khodaeean F. Study on synthetic growth and production of Canthaxanthin by Dietzia natronalimnaea in batch systems. Ph.D thesis. University of Tehran. Iran. 2007. (in Persian, abstract in English)

Maurhofer M, Keel C, Haas D, Defago G. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. Plant Pathol. 1995; 44: 40-50.

McLoughlin TS, Quinn JP, Betterman A, Bookland R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. Appl. Environ. Microbiol. 1992; 58: 1760-1763.

McNeil B, Harvey LM. Practical fermentation technology. John Wiley Press. 2008; pp. 488.

Musial I, Rymowicz W, Cibis E. Optimization of single-cell-biomass production by *Yarrowia lipolytica* using response surface methodology and pulse method. Electronic J. Polish Agricultural Universities. 2004; vol. 7.

Pyghami Ashenaee S. Influence of culture media on growth and antagonistic efficacy of some strain of Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis .MSc thesis. University of Tehran, Iran. 2007. 71pp. (in Persian, abstract in English)

Sansford CE, Coley JR. Production and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol. 1992; 41: 154-156.

Shojaalsadati A. Industerial biotechnology.University of Tarbiat Moddares. 2003. 43-45pp.

Vazquez M, Santos V, Parajo JC. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhadozyma* strains. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1997; 19: 263-268.

Weller DM. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take all. Phytopathology. 1983; 73: 1548-1553.