مجله کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
شماره دوم، ۱۳۹۱ (۱۱۹-۱۰۹)

بررسی اثر باکتری‌های آللوپاتیک *Pseudomonas fluorescens* و قارچ آنتاگونیست *Fusarium* spp. در کنترل انگل گل جالیز روی گوجه‌فرنگی

سلیمان قاسمی[1*]، حسین صارمی[2]، سیاوش ترابی[3]، مجید حسینی[3]
۱، دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد دانشگاه تهران و کارشناس ارشد شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا
۲، استاد گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳، کارشناسان بخش تحقیق و توسعه شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا
(تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۱۰/۳ - تاریخ تصویب:۱۳۹۲/۱/۲۶)

چکیده

گل جالیز انگل ریشه بسیاری از گیاهان دولپه‌ای مانند گوجه‌فرنگی، خیار، خربزه، توتون و غیره می‌باشد. این انگل در بیشتر مناطق گوجه‌کاری، به خصوص شمال غرب کشور گسترش داشته و به صورت یک مشکل عمده بروز کرده است. جدایه‌های آنتاگونیست قارچی *Fusarium* spp. و باکتریایی *Pseudomonas fluorescens* به عنوان عوامل بیولوژیک موثر در کنترل بیولوژیک این علف هرز شناخته شده هستند. در این راستا در سال زراعی ۱۳۹۰ نمونه‌برداری از مناطق عمده گوجه‌کاری شهرستان‌های استان البرز از جمله کرج، هشتگرد و نظرآباد انجام شد. پس از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌های این دو عامل بیولوژیک، غربالگری آنها در گلخانه روی کنترل گل‌جالیز در محصول گوجه‌فرنگی انجام شد، تا بهترین آنها برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شوند. در این تحقیق ۶۹ جدایه قارچ فوزاریوم شامل ۲۶ جدایه *F. oxysporum*، ۴۳ جدایه *F. solani* و ۱۰ جدایه باکتری سودوموناس جداسازی شدند. با غربال این جدایه‌ها در گلخانه روی گل‌جالیز گوجه‌فرنگی ۵ جدایه قارچی Fso84، Fso106، Fox116، Fox135 و Fso145 و ۳ جدایه باکتری PfN2، PfN4 و PfX8 که حدود ۶۵ تا ۷۳ درصد بازدارندگی از رشد گل جالیز داشتند، برای تست‌های تکمیلی انتخاب شدند. تلفیق‌های قارچی و باکتریایی PfX7-Fox104 و PfX9-Fso68 نیز توانستند به خوبی از رشد این انگل جلوگیری کنند.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas fluorescens*، *Fusarium* spp.، کنترل بیولوژیک، گل جالیز، گوجه‌فرنگی.

مقدمه

امروزه مشکل تامین مواد غذائی با دو برابرشدن جمعیت ظرف ۳۰ سال گذشته جدی‌تر شده است. لذا بشر برای تامین مواد غذایی مورد نیاز این جمعیت نیاز به افزایش تولید محصولات زراعی دارد. یکی از راه‌ها برای افزایش تولید، کاهش خسارت ناشی از علف‌های هرز می‌باشد (Shaw 1985). گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L.) گیاهی یکساله و از خانواده بادنجانیان (Solanaceae) است و یکی از محصولات کشاورزی است که می‌تواند نقش بسزایی در رشد اقتصادی کشور داشته باشد (Mazaheri-tehrani *et al.* 2007). یکی از دلایل عمده پایین بودن عملکرد در

* نویسنده مسئول: سلیمان قاسمی تلفن: ۰۹۱۲۴۲۰۵۲۹۰ E-mail: s_ghasemi@alumni.ut.ac.ir

واحد سطح در کشور ما موضوع وجود علف‌های هرز و بویژه انگل گل جالیز می‌باشد. گل جالیز (*Orobanche* spp.) یکی از علف‌های هرز انگل می‌باشد که حضورش در بیش از ۸۰ کشور جهان و ۱۶ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی دنیا به اثبات رسیده و به عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشت برخی گیاهان زراعی در بسیاری از نقاط دنیا مطرح می‌باشد. گل جالیز انگل ریشه بسیاری از گیاهان دولپه‌ای مانند گوجه‌فرنگی، خیار، خربزه، توتون و غیره می‌باشد. شدت آلودگی این انگل به گونه‌ای است که در برخی موارد زارعین زمین مورد کشت را رها می‌کنند (Minbashimoeini 2004). کنترل این گیاه انگلی فوق‌العاده مشکل است، زیرا گل جالیز دقیقاً با ریشه میزبان پیوند برقرار کرده، بیشتر سیکل زندگی خود را زیر زمین می‌گذرانند (Dhanapal *et al*. 1996, Valderrama *et al*. 2004). برای مبارزه با گل جالیز می‌توان به روش‌های مکانیکی، شیمیایی، زارعی، بیولوژیکی و تلفیقی از روش‌های موجود عمل نمود (Minbashimoeini 2004). کنترل شیمیایی این علف هرز انگل به علت عدم وجود علف‌کش‌های انتخابی نتایج رضایت‌بخشی در پی نداشته است (Forouzesh *et al*. 2007). در حال حاضر استفاده از بیمارگرهای خاکزی که بتوانند بذر یا گیاهچه انگل گل جالیز را پیش از وارد نمودن خسارت از بین ببرند، در جهان مطرح است. از میان میکروارگانیسم‌های گوناگون جدایه‌های فوزاریوم که تولید توکسین‌های گوناگون می‌کنند (Vurro 2002) بیش از سایر بیمارگرها مورد پژوهش قرار گرفته‌اند. در کشورهای گوناگون مانند ایتالیا، یونان، آلمان، مجارستان و فلسطین اشغالی پژوهش‌های نسبتا گسترده‌ای برای دستیابی به جدایه‌های کارآمد در کنترل گل جالیز انجام شده است (Boari and Abouzeid 2002, Abouzeid *et al*. 2004).

کاربرد باکتری‌های زیان‌آور[1] ساکن در محیط رایزوسفر نیز امروزه توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است. از آنجایی که این باکتری‌ها پتانسیل خوبی در جلوگیری از رشد علف‌های هرز دارند، به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در نظر گرفته می‌شوند. از جمله اینها باکتری *Pseudomonas fluorescens*، استرین strain Bf7-9 است که نه تنها باعث کاهش رشد گل جالیزهای گونه *O. crenata* و *O. foetida* به میزان ۶۴ تا ۷۶ درصد می‌شود، بلکه سبب افزایش رشد و وزن خشک میزبان گل جالیز نیز می‌گردد (Nadjia *et al*. 2007). باکتری‌های *P. fluorescens* QUBC3، *P. aeruginosa* QUBC1 و *Bacillus subtilis* QUBC18 می‌توانند جلوی رشد و جوانه‌زنی هر دو گونه گل جالیز *O. cernua* و *O. aegyptiac*a را به طور معنی‌داری بگیرند (Barghouthi and Salman 2010).

با توجه به وسعت کشت گوجه‌فرنگی و پراکنش زیاد این انگل خطرناک در کشور و خسارت بالای آن در میزبان گوجه‌فرنگی و به منظور افزایش عملکرد در واحد سطح این محصول، این پژوهش با هدف کاهش خسارت انگل گل جالیز از طریق یافتن جدایه‌های آنتاگونیست قارچی *F. oxysporum*، *F. solani* و باکتریایی *P. fluorescens* به عنوان عوامل بیولوژیک موثر در کنترل بیولوژیک این علف هرز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

قارچ آنتاگونیست *Fusarium* spp.

نمونه‌برداری گل جالیز آلوده از منطقه

به منظور جمع‌آوری جمعیت قارچ عامل بیماری روی گل‌جالیز، در سال زراعی ۱۳۹۰ نمونه‌برداری از مناطق عمده گوجه‌کاری شهرستان‌های استان البرز از جمله کرج، هشتگرد، نظرآباد و همچنین خنجین اراک انجام شد. در هر مزرعه با توجه به سطح زیر کشت آن و فراوانی گل جالیز، به طور متوسط یک تا هفت نمونه به طور تصادفی از قسمت‌های مختلف مزرعه (حدوداً یک نمونه از هر محدوده ۱۰۰-۵۰ متری) با علائم ظاهری لکه‌های نکروتیک روی ساقه و طوقه، پژمردگی و توقف رشد انتخاب شد. پس از خروج بوته گل جالیز از خاک، با ایجاد برشی طولی در ریشه گیاه، بوته‌هایی که تغییر رنگ از قهوه‌ای تا قرمز در آوند طوقه و ساقه آنها دیده می‌شد، جمع‌آوری شدند. مشخصات نمونه‌ها از قبیل تاریخ نمونه‌برداری، محل نمونه‌برداری و نام مزرعه ثبت گردید. نمونه‌ها در داخل کیسه‌های کاغذی گذاشته و به

1. Deleterious Rhizobacteria

آزمایشگاه تحقیقاتی شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا منتقل شدند.

جداسازی قارچ *Fusarium* spp.

به منظور جداسازی گونه‌های قارچ عامل بیماری گل جالیز از روش نش و اشنایدر (Nash & Snyder 1962) استفاده شد. پس از قطع اندام‌های هوایی ناحیه ریشه و طوقه و بخشی از ساقه علف هرز- تا قسمتی که تغییر رنگ آوندی مشاهده می‌شد- به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در معرض جریان ملایم آب شیر قرار گرفت تا بصورت سطحی کاملاً شسته شوند. سپس در زیر هود سترون قطعات کوچکی به اندازه حدوداً پنج در پنج میلی‌متر از نواحی مشکوک به آلودگی جدا گردید. قطعات با محلول هیپوکلریت سدیم (کلراکس) رقیق‌شده، حاوی یک درصد کلر فعال، به مدت دو تا سه دقیقه و سه بار شستشوی سطحی با آب مقطر سترون ضدعفونی گردیدند. سپس سطح بافت گیاه توسط کاغذ صافی سترون خشک شده و به تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری حاوی محیط غذایی (جدول-۱) منتقل گردیده و در هر تشتک سه تا چهار قطعه با فاصله از یکدیگر قرار داده شد.

جدول شماره ۱- ترکیب محیط نش و اشنایدر یا Peptone PCNB Agar (PPA)

اجزای محیط کشت	میزان مصرف
پپتون	۱۵ گرم
پتاسیم فسفات	۱ گرم
منیزیم سولفات	۰/۵ گرم
آگار	۲۰ گرم
پنتاکلرونیتروبنزن(PCNB)	۱ گرم
استرپتومایسین سولفات	۳۰۰ پی پی ام
آب مقطر	۱ لیتر

تشتک‌های پتری به مدت چهار تا پنج روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد کلنی قارچ، خالص‌سازی به روش تک‌هاگ صورت گرفت و تک‌هاگ قارچ‌ها به محیط کشت PDA منتقل و در انکوباتور قرار گرفتند. برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌های قارچی از ماسه‌بادی سترون استفاده شد (Fisher *et al.* 1982). بدین منظور، میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، سه‌چهارم حجم آنها حاوی ماسه‌بادی، برای دو روز متوالی در اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه سترون گردیدند. انگاه از کشت خالص قارچ سوسپانسیون اسپور تهیه کرده و ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر با میکروپیپت (sampler) داخل میکروتیوب‌ها قرار گرفت. درب آنها با پارافیلم مسدود شده و پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای اتاق به یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس منتقل شدند.

تشخیص گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم

تشخیص و شناسایی گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم با استفاده از کلید شناسایی متخصصین فوزاریوم (Leslie and Summerell 2006, Saremi 2005) با کاربرد محیط کشت‌های PPA، PDA و CLA انجام شد.

در این بررسی، ویژگی‌های ماکروسکوپی نظیر سرعت و نحوه رشد کلنی، وجود یا عدم وجود ریسه‌های هوایی نیز خصوصیات میکروسکوپی قارچ مثل اندازه و شکل ماکروکنیدی‌های تشکیل شده در اسپوردوشیوم مورد برسی قرار گرفت. همچنین شکل و چگونگی تولید میکروکنیدی، سلول انتهایی و پایه ماکروکنیدی، شکل فیالید، وجود یا فقدان کلامیدوسپور و نیز چگونگی تشکیل آن در شناسایی گونه‌های فوزاریوم مورد توجه بودند.

جداسازی ریزوباکتری‌های گل جالیز با تمرکز بر سودوموناس‌ها

نمونه‌های فراریشه شامل ریشه‌های گوجه‌فرنگی به همراه خاک‌های چسبیده به آن، و نیز قسمت پایینی ساقه و ریشه گل جالیز از مزارع گوجه‌فرنگی شهرهای نظرآباد، هشتگرد و نیز مهرشهر استان البرز جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در کیسه‌های تمیز و به صورت منفرد به آزمایشگاه آورده شد و تا مرحله جداسازی در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال نگهداری شدند.

برای استخراج باکتری‌های محیط فراریشه[1] و نیز سطح[2] گل جالیز نمونه‌های ریشه تکان داده شدند تا خاک‌های چسبیده به آن جدا شده و بریزد. سپس زیر جریان ملایم آب شسته شدند. نمونه‌ها به قطعاتی به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر خرد شدند و ۵ گرم از آن در داخل ۹۵ میلی لیتر آب مقطر سترون ریخته و ۲۰ دقیقه با شدت ۱۸۰ دور در دقیقه درون شیکر انکوباتور قرار گرفتند. از سوسپانسیون سری رقت 10^{-5} و 10^{-6} بر روی محیط کشت King's B Agar (KBA) پخش گردید. برای جلوگیری از ایجاد آلودگی قارچ‌ها از قارچ‌کش سیکلوهگزامید با غلظت۱۵۰ ppm در محیط کشت استفاده گردید.

جهت جداسازی باکتری‌های مستقر در نسوج داخلی[3] گل جالیز این قسمت‌ها جدا شده و به قطعات ریزتر خرد شدند و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت‌سدیم و شستشو با آب مقطر سترون در داخل ۱ میلی‌لیتر آب مقطر سترون له شدند. سپس یک لوپ از این سوسپانسیون بر روی محیط کشت KB پخش گردیدند.

جهت نگهداری باکتری‌ها از لوله‌های حاوی پنج میلی‌لیتر محلول سولفات‌منیزیوم ۰/۱ مولار سترون استفاده شد. مقداری از باکتری رشد یافته روی محیط کشت NA به طور جداگانه درون لوله‌ها منتقل و در دمای ۴ درجه سلسیوس یخچال نگهداری شدند.

برای تهیه زادمایه باکتری یک حلقه کوچک از کشت ۴۸ ساعته باکتری روی محیط آگار مغذی به فلاسک‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع مغذی[4] منتقل شده و به مدت ۳۶ ساعت روی دستگاه شیکر انکوباتور (۲۰۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق قرار گرفت.

اثر جدایه‌ها بر گل جالیز روی میزبان گوجه‌فرنگی

خاک مورد استفاده در این آزمایش باید نسبتا فقیر باشد تا اینکه احتمال آلودگی میزبان به انگل تسهیل و تسریع شود. ترکیب خاک مورد استفاده در گلخانه شامل ۴۰ درصد پرلیت (سایز دانه ۱ میلی‌متر)، ۲۰ درصد ماسه و ۴۰ درصد خاک رسی بود.

به دلیل بالا بودن تعداد جدایه‌ها از بین ۶۹ جدایه قارچی با توجه به شکل پرگنه و نوع اسپورهای تولیدی و کنار گذاشتن جدایه‌های احتمالا مشابه، حدود ۲۴ جدایه برای تست گلخانه‌ای بر روی گل جالیز انتخاب شدند (جدول ۳). ۵ جدایه باکتری استفاده شده در مرحله تست گلخانه‌ای شامل Pfx6، Pfx8، Pfx10، Pfn2 و Pfn4 بودند. ۵ تلفیق باکتری و قارچ مورد استفاده در مرحله تست گلخانه‌ای شامل PfN1-Fox16، Fso66-PfN5، PfX2-Fso84، PfX7-Fox104، PfX9-Fso68 بودند. انتخاب این پنج جدایه باکتری و نیز نوع ترکیب قارچ با باکتری به صورت کاملا تصادفی صورت پذیرفت. در این مرحله یک تیمار شاهد مثبت که فاقد تیمار باکتری، قارچ و گل جالیز بود، و یک تیمار شاهد منفی فاقد باکتری و قارچ آنتاگونیست جهت مقایسه با تیمارهای دیگر استفاده شد. این ۲۴ جدایه قارچ فوزاریوم، ۵ جدایه باکتری و ۵ تیمار تلفیقی قارچ و باکتری به همراه تیمارهای شاهد در مجموع در قالب ۳۶ تیمار در این آزمون مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر جدایه ۴ بوته میزبان در ۴ گلدان تکرار شد. در نتیجه ۱۴۴ گلدان پلاستیکی ۲/۵ کیلویی به همراه زیر گلدانی مناسب جهت آبیاری از زیر گلدان استفاده شد.

برای مایه‌زنی قارچ، ۴۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^{7} اسپور در میلی‌لیتر برای هر گلدان استفاده شد. در مورد باکتری‌های مورد استفاده در این مرحله نیز از ۴۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با جمعیت حدود 10^{8} کلنی در میلی‌لیتر استفاده شد. همچنین میزان ۰/۰۱ گرم بذر گل جالیز برای هر گلدان تلقیح شد. بوته‌های گوجه‌فرنگی قبلا در گلدان‌ها نشاء شده بودند. دمای گلخانه در طول آزمایش حدود ۲۶ درجه سلسیوس با خطای ۱ تا ۲ درجه اعمال شد. جهت کاهش شستشوی اسپورها از اطراف ریشه آبیاری اوایل به صورت زیرگلدانی انجام می‌گرفت. رطوبت گلخانه در حدود ۴۰ تا ۸۰ درصد تنظیم شد.

داده‌های مربوط به آزمایش پس از یادداشت‌برداری، با نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس شده و میانگین تیمارها

1. Exorhizosphere
2. Rhizoplane
3. Endorhizosphere
4. Nutrient Broth (NB)

با آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. رسم نمودار نیز با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج جداسازی قارچ و باکتری از روی گل جالیز

در این پژوهش ۶۹ جدایه قارچ فوزاریوم شامل ۲۶ جدایه *F. oxysporum*، ۴۳ جدایه *F. solani* و ۱۰ جدایه باکتری سودوموناس جداسازی و خالص‌سازی شدند و برای انجام آزمایش‌های بعدی در شرایط نگهداری مخصوص قرار گرفتند. از بین ۱۰ جدایه باکتری سودوموناس جداشده ۵ جدایه از ناحیه خارجی فراریشه جدا شدند که با حروف PfX نامگذاری شدند و ۵ جدایه از قسمت اندوریزوسفر جدا گردیدند که با حرف PfN نامگذاری شدند. فهرست جدایه‌های باکتری و قارچ به‌دست آمده به ترتیب در جدول‌های۲ و ۳ آورده شده است.

جدول شماره۲- جدایه‌های باکتری *P.fluorescens* بدست آمده از گل جالیز

ردیف	نام جدایه
1	Pfx2
2	Pfx6
3	Pfx7
4	Pfx8
5	Pfx9
6	Pfx10
7	Pfn1
8	Pfn2
9	Pfn4
10	Pfn5

جدول شماره ۳- جدایه‌های فوزاریوم بدست آمده شامل *F. oxysporum* (Fox) و *F. solani* (Fso)

ردیف	محل نمونه برداری	نام جدایه	ردیف	محل نمونه برداری	نام جدایه
1	خنجین (اراک)	Fso5*	36	هشتگرد	Fso99
2	خنجین (اراک)	Fso6*	37	هشتگرد	Fso102*
3	خنجین (اراک)	Fox10	38	هشتگرد	Fox103
4	خنجین (اراک)	Fox11	39	هشتگرد	Fox104*
5	خنجین (اراک)	Fox12	40	هشتگرد	Fso106*
6	مهر شهر کرج	Fso16*	41	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso108
7	مهر شهر کرج	Fso17	42	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox109
8	مهر شهر کرج	Fso28*	43	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso111
9	مهر شهر کرج	Fox30	44	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso112*
10	مهر شهر کرج	Fso31*	45	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox113
11	بختیار کرج	Fso44	46	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox114
12	بختیار کرج	Fso51	47	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox115
13	حسین آباد کرج	Fso55	48	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox116*
14	حسین آباد کرج	Fox58	49	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso117
15	هشتگرد	Fso61	50	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso118*
16	هشتگرد	Fso63	51	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox121*
17	هشتگرد	Fso66*	52	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso122
18	هشتگرد	Fox67	53	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox123
19	هشتگرد	Fso68*	54	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso124
20	هشتگرد	Fso71	55	نظرآباد(جاده بادامک)	Fso125*
21	هشتگرد	Fso74	56	نظرآباد(جاده بادامک)	Fox127

ادامه جدول شماره۳- جدایه‌های جنس فوزاریوم بدست آمده از گل جالیز

22	هشتگرد	Fox75	57	نظرآباد (جاده بادامک)	Fox129
23	هشتگرد	Fso78*	58	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso131*
24	هشتگرد	Fso79	59	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso132
25	هشتگرد	Fso80*	60	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso133
26	هشتگرد	Fso81	61	نظرآباد (جاده بادامک)	Fox134
27	هشتگرد	Fso84*	62	نظرآباد (جاده بادامک)	Fox135*
28	هشتگرد	Fox86	63	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso136
29	هشتگرد	Fso88	64	نظرآباد (جاده بادامک)	Fox138
30	هشتگرد	Fso90	65	نظرآباد (جاده بادامک)	Fox139*
31	هشتگرد	Fox91	66	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso141
32	هشتگرد	Fso92	67	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso142
33	هشتگرد	Fso95	68	نظرآباد (جاده بادامک)	Fox143*
34	هشتگرد	Fso97*	69	نظرآباد (جاده بادامک)	Fso145*
35	هشتگرد	Fox98			

*جدایه های مورد استفاده در تست گلخانه ای

شناسایی گونه های فوزاریوم

Fusarium oxysporum

متوسط قطر کلنی قارچ پس از سه روز در حرارت ۲۵ درجه سلسیوس و در محیط PDA، ۴-۲/۵ سانتیمتر بود. کلنی قارچ در محیط PDA پس از تولید میسیلیوم هوایی پنبه‌ای سفید به تدریج رنگدانه‌های کم‌رنگ و یا صورتی متمایل به قرمز در داخل آگار ایجاد نموده و سطح زیرین کلنی به رنگ صورتی تا قرمز در آمد. برخی جدایه‌ها نیز اساسا بی‌رنگ بودند.

میکروکنیدی‌ها به صورت غیرزنجیری در سرهای کاذب (False Head) و روی منوفیالیدهای کوتاه و ساده تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها در روی محیط CLA و بر روی اسپوردوشیوم‌های نارنجی رنگ تولید گردیدند. ماکروکنیدی‌ها اندکی خمیده، داسی شکل و اغلب دارای ۲-۳ دیواره عرضی بوده و سلول انتهایی باریک و سلول پایه پاشنه‌ای شکل بود. کلامیدوسپورها پس از ۲۰-۱۴ روز به فراوانی تشکیل شده و اغلب کروی و مجتمع بودند. مشخصات این گونه با توضیحات ارائه شده توسط لزلای و سامرل (۲۰۰۶) و صارمی (۲۰۰۵) در مورد معرفی گونه *F. oxysporum* مطابقت داشت.

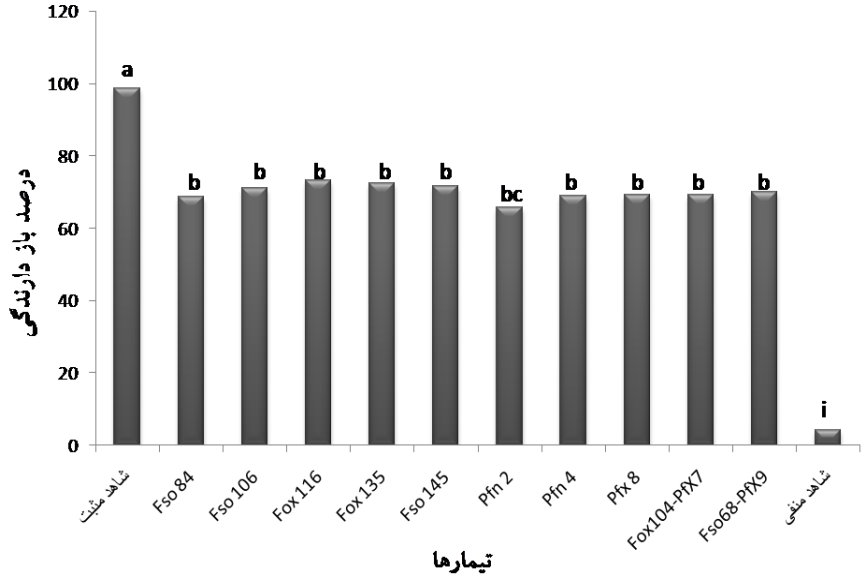
Fusarium solani

متوسط قطر کلنی قارچ پس از سه روز در حرارت ۲۵ درجه سلسیوس و در محیط PDA، ۳-۲ سانتیمتر بود. کلنی قارچ در محیط PDA سفید شیری رنگ بوده و میسیلیوم هوایی سفیدرنگ و غیر متراکم تولید کرد. اسپوردوشیوم‌ها به صورت نقاط سفید کرم رنگ و به فراوانی بر روی محیط CLA تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها دوکی‌شکل و اغلب دارای ۴-۳ دیواره عرضی بودند. میکروکنیدی‌ها بیضی شکل یا تخم مرغی، یک یا دو سلولی و بر روی کنیدیوفورهای ساده و طویل تشکیل شده بودند. میکروکنیدیوفورها طویل‌تر از نمونه-های مشابه در گونه *F. oxysporum* بوده و کنیدیوفورها منوفیالید بودند. کلامیدوسپورها به اشکال بیضوی تا کروی منفرد یا دوتایی و به صورت انتهایی یا بین هیفی تشکیل می‌گردید. مشخصات این گونه با توصیف ذکر شده توسط لزلای و سامرل (۲۰۰۶) در مورد معرفی گونه *F. solani* مطابقت داشت.

نتایج بررسی جدایه‌های قارچ و باکتری روی گل جالیز در گلخانه

در این مرحله از پژوهش چندین جدایه باکتریایی و قارچی جهت تست‌های تکمیلی‌تر انتخاب شدند. نتایج حاصل نشان دادند که جدایه‌های قارچی Fso84، Fso106، Fox116، Fox135 و Fso145 دارای اثرات بهتری روی گل جالیز در گلخانه هستند. جدایه‌های PfN2، PfN4 و PfX8 باکتری سودوموناس نیز در این مرحله از بین باکتری‌های دیگر غربال شدند. همچنین نتایج این تحقیق مشخص کرد که تلفیقی از جدایه‌های PfX7-Fox104 و PfX9-Fso68 اثر خوبی در کنترل

این علف هرز دارند (شکل ۱). سه نوع تیمار غربال شده حدود ۶۵ تا ۷۳ درصد بازدارندگی از رشد گل جالیز از خود نشان دادند. از آنجایی که این تیمارها در گروه‌بندی آماری در یک گروه قرار گرفتند، لذا برای تست‌های تکمیلی و مزرعه‌ای همه این تیمارها انتخاب شدند. به بیان دیگر از بین ۳۴ تیمار آزمایش شده ۵ تیمار قارچی سه تیمار باکتری سودوموناس و ۲ تیمار تلفیقی برای تست نهایی انتخاب شدند.



شکل شماره۱- درصد بازدارندگی تعدادی از تیمارها شامل قارچ، باکتری و تلفیق این دو روی انگل گل جالیز در گوجه‌فرنگی.
شاهد مثبت: بدون آنتاگونیست و گل جالیز; شاهد منفی: دارای گل جالیز و بدون هیچ تیمار آنتاگونیست

بحث

گل جالیز (*Orobanche* spp.) از خطرناک‌ترین علفهای هرز مزارع جالیزی می‌باشد که همواره باعث کاهش کمی و کیفی محصولات از جمله خیار، گوجه‌فرنگی و سایر محصولات می‌گردد. پراکنش گل جالیز در بیشتر از ۸۰ کشور جهان و ۱۶ میلیون هکتار اراضی کشاورزی دنیا به اثبات رسیده است (Saremi and Zand 2003, Ghanam *et al*. 2007) در حقیقت این گیاه به عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشت برخی گیاهان زراعی در بسیاری از نقاط مطرح می‌باشد.

شدت آلودگی این انگل در بعضی مناطق ایران به گونه‌ای است که تولید کنندگان ارضی خود را مورد کشت گیاهان جالیزی قرار نمی‌دهد. با توجه به اینکه دامنه میزبانی گل جالیز وسیع بوده برای کنترل آن باید میزبان‌های متنوعی مورد ارزیابی قرار گیرد. از طرفی چرخه زندگی گل جالیز به گونه‌ایست که مشاهده آن در سطح خاک بعد از خسارت عمده آن به گیاه میزبان صورت می‌گیرد. لذا کنترل آن بسیار ضروری و با یک روش مناسب باید باید انجام شود (Thomas *et al*. 1998, Mehrabi and Alizadeh 2000, Boari and Vurro 2004).

یکی از بهترین راه‌های کنترل گل جالیز استفاده از روش کنترل بیولوژیکی بوده است که نه تنها اثرات منفی بر محیط زیست ندارد بلکه در کنترل آن تاثیر بیشتری خواهد داشت. عموما استفاده از قارچ برای کنترل گل جالیز توسط محققین مورد توجه قرار گرفته است (Linke *et al*. 1992, Butt *et al*. 2001, Evans *et al*. 2001, Muller *et al*. 2002). محققین در ایران نیز در گذشته استفاده از گونه *Fusarium solani* را مطرح کرده‌اند (Mazaheri *et al*. 1991). استفاده از گونه‌های فوزاریوم بویژه گونه *Fusarium oxysporum* در مزارع کشت گیاهان جالیزی تاثیر بیشتری روی کنترل گل جالیز داشته است (Zonno and Vurro 2002, Ghanam *et al*. 2007). محققین در دنیا در تلاش هستند تا با پیدا کردن گونه اختصاصی به عنوان عامل بیماری گل جالیز، این علف هرز را بصورت مناسب کنترل نمایند (Thomas *et al*. 1998) با بررسی اولیه روی گونه *Fusarium*

oxysporum f.sp. *orthoceras* موضوع کنترل بیولوژیک گل جالیز با قارچ اختصاصی به عنوان یک عامل بیماری موثر و مفید در دست اقدام است (Bedi 1994, Thomas *et al*. 1999, Shabana *et al*. 2003).

برای کاهش اثرات زیست محیطی سموم و نیز تاثیر بهتر جهت مقابله با این عوامل استفاده از قارچ‌های کنترل‌گر رواج بیشتری یافته است. این تحقیق در نظر دارد برای مقابله با علف هرز خطرناک گل جالیز که با استفاده از روش‌های شیمیایی و زراعی قابل کنترل نمی‌باشد، از روش‌های بیولوژیک مانند استفاده از قارچ-های کنترل‌گر بهره گیرد. بسیار دیده می‌شود که گل جالیز در اثر ابتلا به بیماری‌های قارچی پژمرده و بیمار می‌گردد. در مجارستان مجموعه‌ای از قارچ‌ها از جمله *Fusarium oxysporum* را به کار برده و بیش از ۹۰ درصد *Orobanche ramose* را در گوجه‌فرنگی کنترل کرده است. همچنین در بلغارستان آزمایشات موفقیت آمیزی با استفاده از *Fusarium oxysporum* f.sp. *orthoceras* برای کنترل گونه *O. cernua* روی آفتابگردان انجام شده است (Shabana *et al*. 2003). در این آزمایش‌ها از محیط‌های غذایی مختلفی متشکل از آرد، ذرت، جو، کاه، گندم و خاک استفاده شد و هیچ‌گونه آلودگی روی خود محصول مشاهده نشده است (Butt *et al*. 2001). با استفاده از قارچ *Fusarium solani* در مزرعه گوجه‌فرنگی نیز گل جالیز گونه *O. ramose* تا ۹۰ درصد کنترل شده است (Morris 1991). گونه عمده عامل بیماری پژمردگی جالیز *F. oxysporum* در مزرعه توتون نیز برای کنترل *O. aegyptiaca* بکار رفته است و توانسته تا ۷۵ درصد جالیز را کاهش و ۸۰ درصد محصول را افزایش داده است. آغشته نمودن بذر یا نشاء میزبان گل جالیز با زادمایه عامل بیماری قبل از کشت آنها در مزارع به منظور ارزیابی میزان آلودگی گل جالیز و حساسیت یا مقاومت میزبان کمک شایانی خواهد نمود. اصولا تولید انبوه فرم اختصاصی و استفاده گسترده آن نه تنها خسارتی برای میزبان و سایر محصولات کشاورزی نخواهد داشت بلکه به حفظ سلامت محیط زیست و کاهش استفاده از سموم گیاهی نیز کمک شایانی خواهد نمود. لذا بررسی‌های بیشتر ضرورت داشته و توسعه نتایج و کاربرد آن تاثیر بسزایی خواهد نمود. اصولا استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست در کنترل بیولوژیک علاوه بر کمک به محیط زیست از نظر اقتصادی نیز از مصرف مواد شیمیایی و سموم برای کشور و تولید کنندگان مناسب‌تر خواهد بود. بررسی‌های به عمل آمده در اکثر مناطق کشود حاکی از آن است که اقدامات مبارزه‌ای اعم از مبارزه شیمیایی، زراعی و مکانیکی برای کنترل این علف هرز تاثیر مطلوبی نداشته است و لذا روش کنترل بیولوژیک بیشتر مورد توجه است. در این تحقیق نیز گونه‌هایی از قارچ فوزاریوم شامل *F. oxysporum* و *F. solani* برای کنترل گل جالیز جداسازی و برروی انگل گل جالیز بررسی شدند که نتیجه خوبی را بدست داد. طبیعتا تحقیقات بیشتر در مناطق مختلف و روی میزبان‌های متعدد برای آزمایش بیماری‌زایی، مورد نیاز است.

در صورت موفقیت در یافتن یک جدایه کارا و بی-خطر در مراحل بعدی می‌توان نسبت به تجاری‌سازی یک محصول بیوکنترل علیه انگل خطرناک گل جالیز اقدام کرد. امری که از اهداف نهایی این تحقیق بوده است.

نتیجه‌گیری کلی

مهمترین دستاورد این تحقیق جداسازی سه جدایه موثر قارچ *F. oxysporum* و دو جدایه *F. solani* روی انگل خطرناک گل جالیز بود. این جدایه‌ها باید در آزمایش مزرعه‌ای مورد ارزیابی و تایید نهایی قرار گیرند. در صورت تایید اثر آنتاگونیستی این جدایه‌ها روی گل جالیز مطالعات در خصوص تولید تجاری آن بایستی صورت پذیرد.

سپاسگزاری

از جناب آقای مهندس عسگری‌نیا مدیرعامل شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا به خاطر تمام حمایت‌هایشان و از جناب آقای دکتر احمدزاده عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران به واسطه نظرات ارزشمندشان در اجرای این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم. همچنین از کارشناسان شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا بخصوص آقایان کامران حقیقی، مهدی فرضی و کیانوش رضایی به واسطه مساعدت‌هایشان در اجرای این پژوهش تشکر می‌نماییم.

REFERENCES

Abouzeid MA, Boari A, Zonno MC, Vurro M, Evident A (2004) Toxicity profiles of potential biocontrol agents of *Orobanche ramose*. Bio.One 52, 326-332.

Barghouthi S, Salman M (2010) Bacterial inhibition of *Orobanche aegyptiaca* and *Orobanche cernua* radical elongation. Biocontrol Science and Technology 20(4): 423-435.

Bedi JS (1994) Further studies on control of sunflower broomrape with *Fusarium oxysporum f.sp. orthocera* potential mycoherbicide In: Pieters AH, Verkleij JAC, TerBorg SJ, eds. Proceedings of the 3rd international Workshop on *Orobanche* and related Striga Research. Amsterdam, the Netherlands. Royal Tropical Institute 539-544.

Boari A, Abouzeid M (2002) Progress in biological control of *Orobanche* in Italy. In proceeding of the meeting, integrated control of broomrape, *Obermarche*, Germany 25-27 July 2002.

Boari A, Vurro M (2004) Evaluation of *Fusarium* spp. And other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramose*). Biological control 30: 212-219.

Butt TM, Jackson C, Magan N (2001) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI publishing 234 pp.

Dhanapal GN, Struik PC, Udayakumar M, Timmermans PCJM (1996) Management of broomrape (*Orobanche* spp.): A review. J. Agron. Crop Sci. 175:335–359.

Evans H, Mike C, Greaves P, Watson K (2001) Fungal biocontrol agents of Weeds. Fungal Biocontrol agents. CABI publishing.

Fisher NL, Burgess W, Toussoun TA, Nelson PE (1982) Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. Phytopathology 72(1):151-153.

Forouzesh S, Baghestani MA, Alizadeh HM, Rahimianemashhadi H, Minbashi-e moeini M (2007) Chemical control of broomrape (*Orobanche aegyptiaca*) in tomato. Weed Science Congress, Mashhad, Iran 1: pp. 506-503 (In Persian).

Ghanam I, Barakat R, Al-masri M (2007) Biological control of Egyptian broomrape (*Orobanche aegyptiaca*) using *Fusarium* spp. Phytopathol. Mediterr 46:177-184.

Haware MP, Nene YL (1982) Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. Plant Disease 66(9):809-810.

Leslie JF, Summerell BA (2006) The Fusarium Laboratory Manual. Iowa: Blackwell Publishing Ltd.

Link KH, Scheibel C, Saxena MC, Sauerborn J (1992) Fungi occurring on *Orobanche* spp. And their preliminary evaluation for *Orobanche* control. Tropical Pest Management 38: 127-130.

Mazaheri A, Moazami NA, Vaziri M, Moayedzadeh N (1991) Biological control of *Orobanche* spp. In tabaco fields by *Fusarium solani*, Tenth crop protection congress, Kerman, Iran.

Mazaheri-tehrani M, Mortazavi I, Ziaalhagh HR, Ghandi W (2007) Processing tomato Vol. 1, MarzeDanesh press (In pershian).

Mehrabi A, Alizadeh A (2000) Phenological investigation *Orobanche aegyptiaca* , fourteen crop protection congress, Isfahan, Iran.

Minbashimoeini M (2004) Broomrape: botany, biology, ecology and control methods.

Morris MJ (1991) The use of plant pathogen for biological weed control in South Africa. Agriculture, Ecosystems and Environment 37: 239-255.

Muller D, Kroschel J, Thomas H, Sauerborn J (2002) Chlamydospores of *Fusarium oxysporum f.sp. orthocera*, Blai as inoculum for wheat-flour-kaolin granules to be used for the biological control of *Orobanche cumana* Wallr. European Journal of Plant Pathology 108: 221-228.

Nadjia Z, Thouraya S, Jurgen K, Richard S (2007) Biocontrol of broomrape (*Orobanche crenata* Forsk. and *Orobanche foetida* Poir.) by *Pseudomonas fluorescens* isolate Bf7-9 from the faba bean rhizosphere. Biocontrol Science and Technology 2007; 17(5): 483-497.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WF (1983) *Fusarium* Species .The Pennsylvania State University Press 193 P.

Saremi H (2005) Fusarium, Biology, Ecology and taxonomy. Iran: Jihad Daneshgahi press, University of Mashhad.

Saremi H, Zand E (2003) Fungi and biological control pests, pathogens, herbs. Zanjan university press, 142 pp. (In persian).

Shabana YM, Musller-Stosver D, Sauerborn J (2003) Granular pesta formulation of *Fusarium oxysporum f.sp. orthocera* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. Biological Control 26(2): 189-201.

Shaw WC (1985) Integrated weed management systems technology for agroecosystem management. In *CRC Handbook of Natural Pesticides: Methods*, ed. NB, Mandava, Vol. 1, 123-139. Boca Raton, FL.: CRC Press, Inc.

Thomas H, Heller A, Sauerborn J, Muslle‌r-Stosver D (1999) *Fusarium oxysporum f.sp. orthocera* a potential mycoherbicide, parasitizes seeds of *Orobanche cumana* (Sunflower Broomrape): a cytological study, Annals of Botany 83:453-458.

Thomas H, Sauerborn J, Muslle‌r-Stosver D, Ziegler A, Bedi JS, Kroschel J (1998) The potential of *Fusarium oxysporum f.sp. orthocera* as biological control agent for *Orobanche cumana* in sun, Biological control 13: 41-48.

Valderrama MR, Román B, Satovic Z, Rubiales D, Cubero JI, Torres AM (2004) Locating quantitative trait loci associated with *Orobanche crenata* resistance in pea. Weed Research 44, 323-328.

Vurro M (2002) Integration of fungal toxins with pathogens. In proceeding of the meeting, Integrated control of broomrape, Obermarchtal, Germany, 25-27 July 2002.

Zonno MC, Varro M (2002) Inhibition of germination of *Orobanche ramose* seeds by *Fusarium* toxin. Phytoparasitica 30: 519-524.

Evaluation of the effect of allelopatic bacteria *Pseudomonas fluorescens* and antagonistic fungi *Fusarium* spp. on biological control of tomato broomrape

GHASEMI S.*[1], SAREMI H.[2], TORABI S. [3] and HOSSEINI M.[3]

1, MSc of Plant Pathology, Univ. of Tehran; Researcher in Nature Biotechnology Co., Karaj, Iran, 2, Plant protection Dept. University of Tehran, Karaj, Iran, 3, Researchers in Nature Biotechnology Co., Goldasht, Karaj, Iran.

(Received: December 23, 2012 - Accepted: April 15, 2013)

Abstract

Broomrape (*Orobanche* spp.) is one of the most serious weed pathogen on many dicotyledonous plants such as tomato, cucumber, melon, tobacco and others. This weed parasite caused serious problem in tomato cultivation fields, especially in North West Iran. Some isolates of *Fusarium* spp. and *Pseudomonas fluorescens* are known as effective biological agents in biocontrol of this weed. In order to find the pathogens from broomrape, infected bromrapes were sampled from different tomato cultivation areas of Alborz province including Karaj, Hashtgerd and Nazarabad during 2011. All isolated pathogens were cultured and identified according to key references. The effect of antagonists was evaluated against tomato broomrape in greenhouse condition and the best isolates were selected for subsequent experiments. Finally, 69 isolates of the fungus including 26 isolates of *F. oxysporum*, 43 isolates of *F. solani* and then 10 bacteria contain *Pseudomonas* spp. were isolated. Only five isolates of *Fusarium* spp. including Fso84, Fso106, Fox116, Fox135, Fso145 and 3 isolates of *P. fluorescens* including PfN2, PfN4 and PfX8 were experienced on tomato plant in greenhouse condition. Results showed these isolates inhibited the broomrape weed growth about 65 to 73%. The combinations of fungal and bacterial Isolates including Fox104-PfX7 and Fso68-PfX showed also a good percentage of inhibition on broomrape growth.

Keywords: Biological control, *Pseudomona fluorescens*, *Fusarium oxysporum*, Broomrape, Tomato.

* Corresponding author: S. GHASEMI E-mail: s_ghasemi@alumni.ut.ac.ir