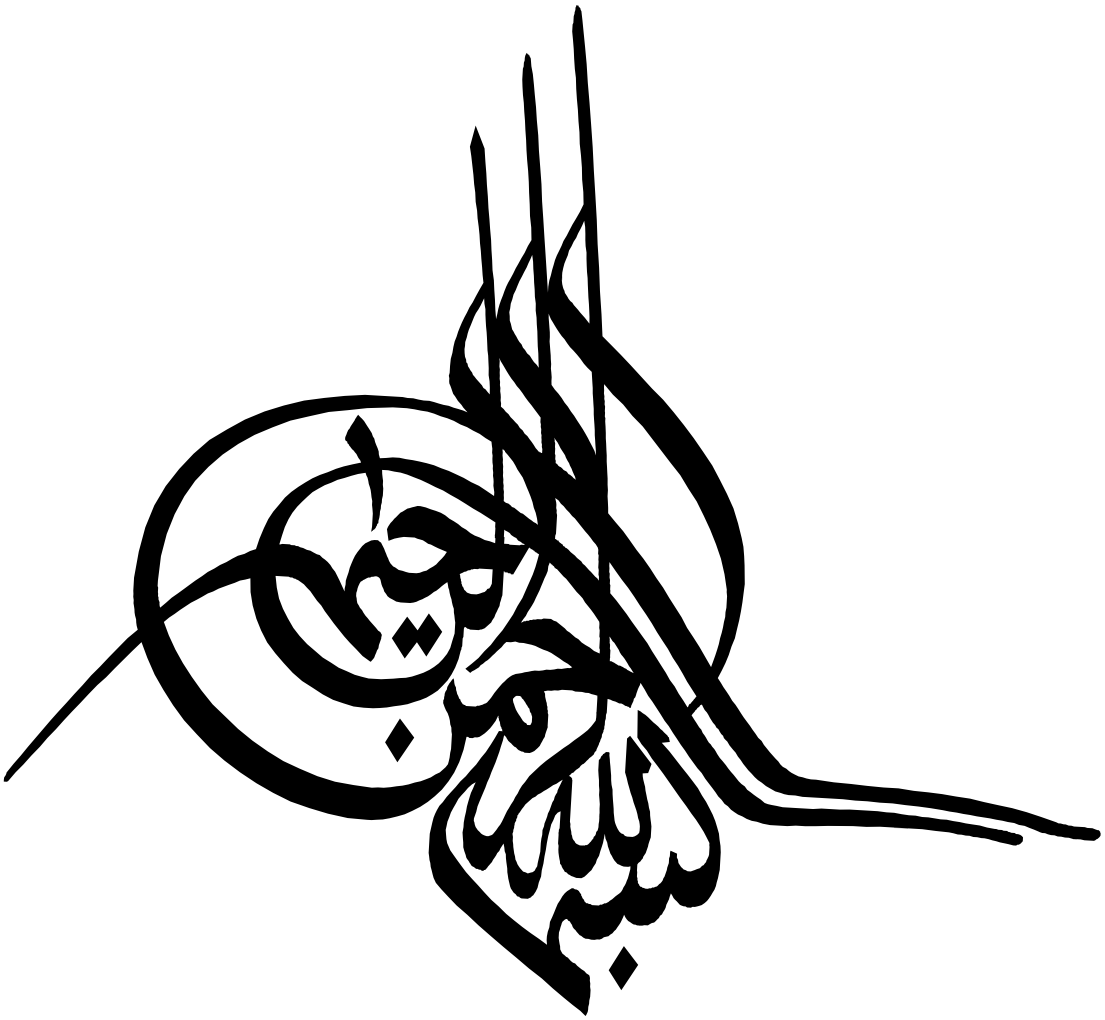
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیماری شناسی گیاهی

عنوان:

کنترل بیولوژیکی برخی عوامل مهم پوسیدگی قارچی ریشه‌ی باقلا توسط باکتری‌های آنتاگونیست فرا ریشه در استان لرستان

استاد راهنما:

دکتر دوستمراد ظفری- دکتر غلام خداکرمیان

پژوهشگر:

سمانه گلپایگانی

پائیز ۱۳۸۸

همه امتیازات این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی‌سینا تعلق دارد. در صورت استفاده ازتمام یا بخشی از مطالب پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی(یا استاد یا اساتید راهنمای پایان‌نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

چکیده

به منظور شناسایی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه باقلا در استان لرستان، در سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ بیش از ۴۳ بار از نمونه‌های مشکوک به پوسیدگی ریشه و طوقه باقلا، نمونه‌برداری شد و در مجموع ۱۲۱ جدایه قارچ از ریشه و طوقه گیاهان آلوده جدا شد.در این بررسی مشخص شد که فراوانی قارچ *Fusarium solani* که موجب پوسیدگی ریشه باقلا می‌شود، از سایر جدایه‌ها بیشتر و خسارت ناشی از آن در مزارع استان زیاد است و بعد از آن بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به گونه‌های *F. oxysporum*، *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Pythium* spp بود. نتایج حاصل از آزمون بیماریزایی در گلخانه نیز مؤید مطالب فوق بود با این تفاوت که گونه *F. oxysporum* با فراوانی زیاد، بیماری شدید ایجاد نکرد. *M. phaseolina* و *Pythium* spp برای اولین بار در ایران از گیاه باقلا گزارش می‌شوند. چون هدف اصلی این تحقیق، بررسی اثر بیوکنترلی عوامل باکتریایی موجود در ریزوسفر گیاه باقلا، علیه بیمارگرهای جدا شده از ریشه این گیاه بود، لذا ۴۴ استرین باکتریایی نیز از فرا ریشه گیاه باقلا جدا شد و برای اثبات خاصیت آنتی بیوز آزمایش شدند. استرین‌های بازدارنده با تشکیل هاله بازدارندگی در حضور بیمارگرها، برای انجام مراحل بعدی تحقیق انتخاب شدند. این باکتری‌ها با بررسی صفات بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شناسایی شدند، استرین‌های R10 و R14 به عنوان *Rhizobium leguminosarum* و استرین‌های E42، E38 , E34 و E8 به عنوان *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شدند. این استرین‌ها به دو صورت آلوده سازی خاک و آغشته سازی بذور باقلا با سوسپانسیون باکتری به کار رفتند. نتایج نشان داد که اضافه کردن این باکتری‌ها به خاک باعث افزایش فاکتورهای رشدی گیاه باقلا شد اما این افزایش در حالت آلوده سازی خاک با سوسپانسیون باکتری بیشتر بود. در نهایت مشخص شد که استرین‌های E42، E38 , E34 و E8 باعث افزایش معنی دار وزن خشک گیاه شدند.

واژه‌های کلیدی: *Fusarium solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Pseudomonas fluorescens*، *Rhizobium leguminosarum*

خداوند قادر و متعال را سپاسگزارم که بار دیگر جلوه هایی نو از قدرت لایزال خود را بر این حقیر نمایان نمود.

از همسر عزیزم و پدر و مادر مهربانم به خاطر تمامی حمایت ها و راهنمایی های ارزشمندشان و خواهر و برادر دوست داشتنی ام صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید راهنمای ارجمندم، جناب آقای دکتر دوستمراد ظفری و جناب آقای دکتر غلام خداکرمیان، به خاطر تمامی حمایت ها و راهنمایی های ارزشمندشان، صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از اساتید محترم، جناب آقایان دکتر محمدجواد سلیمانی و دکتر حسین مددی که زحمت داوری این پایان نامه را قبول فرمودند، صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

از دوستان و سروران عزیزم، سرکار خانم ها، مهندس شیرین فتاحی، مریم فضلی، بهار آزادی و ساقی یونسی و جناب آقای مهندس پیمان آباد که از کمک ها و راهنمایی های ایشان در طول انجام مراحل مختلف این پایان نامه بهره مند شدم صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

فهرست مطالب صفحه

مقدمه ۲

فصل اول – بررسی منابع

۱-۱- کنترل بیولوژیک ۶
۱-۱-۱- تاریخچه ۶
۱-۲- عوامل موثر در مبارزه بیولوژیک ۸
۱-۲-۱- میزبان ۸
۱-۲-۲- عامل بیماری ۹
۱-۲-۳- آب و هوا ۱۰
۱-۲-۴- آنتاگونیست‌ها ۱۱
۱-۳- نحوه عمل آنتاگونیست‌ها ۱۱
۱-۳-۱- حمله مستقیم ۱۱
۱-۴- رایزوباکترهای محرک رشد گیاه ۱۲
۱-۴-۱- کلونیزاسیون ریشه توسط باکتری‌ها ۱۳
۱-۴-۲- ویژگی‌های موثر در کلونیزاسیون ۱۳
الف- روش مستقیم ۱۴
ب- روش غیر مستقیم ۱۴
۱-۵- کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی توسط سودوموناس‌های فلورسنت ۱۵
۱-۶- کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی توسط رایزوبیوم لگومینوزاروم ۱۶
۱-۷- عوامل قارچی پوسیدگی ریشه لگومینوز و راه‌های کنترل آن‌ها ۱۸
۱-۸- عوامل پوسیدگی قارچی ریشه باقلا که تا به‌حال در دنیا گزارش شده است ۲۱

فصل دوم - مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها ۲۳
۲-۲- جدا سازی قارچ ۲۳
۲-۳- محیط‌کشت ها ۲۳
۲-۴- روش‌های خالص سازی قارچ‌ها ۲۸
۲-۴-۱- روش تک اسپور کردن ۲۸
۲-۴-۲- روش تک‌ریسه‌کردن ۲۸
۲-۵- روش وادارسازی فوزاریوم‌ها به اسپورزایی ۲۹
۲-۶- روش وادارسازی فوزاریوم‌ها به تولید کلامیدوسپور ۲۹
۲-۷- بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی جدایه‌های قارچی ۳۰
۲-۷-۱- ویژگی‌های ماکروسکوپی ۳۰
۲-۷-۲- ویژگی‌های میکروسکوپی ۳۰

الف- فیالید..... ۳۰
ب- ماکروکنیدیوم..... ۳۰
ج- میکروکنیدیوم..... ۳۱
د- کلامیدوسپور..... ۳۱
۲-۸- روش نگهداری کشت خالص قارچ‌های مورد بررسی..... ۳۱
۲-۹- آزمون بیماری‌زایی..... ۳۳
۲-۹-۱- آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی ریشه باقلا..... ۳۳
۲-۱۰- جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست..... ۳۴
۲-۱۱- نگهداری باکتری‌ها..... ۳۴
۲-۱۲- آزمون کشت متقابل..... ۳۴
۲-۱۳- شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست..... ۳۵
۲-۱۳-۱- آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص جنس استرین‌های آنتاگونیست..... ۳۵
۲-۱۳-۲- آزمون‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت شناسایی استرین‌های رایزوبیوم..... ۳۵
۲-۱۳-۳- آزمون‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت شناسایی استرین‌های سودوموناس فلورسنت..... ۳۷
۲-۱۴- بررسی تولید متابولیت‌های میکروبی موثر در خاصیت آنتاگونیستی..... ۳۸
۲-۱۴-۱- آزمون تولید پروتئاز..... ۳۸
۲-۱۴-۲- آزمون تولید سلولاز..... ۳۸
۲-۱۴-۳- آزمون تولید سیانید هیدروژن..... ۳۸
۲-۱۴-۴- آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی..... ۳۹
۲-۱۴-۵- آزمون تولید سیدروفور..... ۳۹
۲-۱۵- بررسی اثرات بازدارندگی استرین‌های آنتاگونیست در مقیاس میکروسکوپی..... ۳۹
۲-۱۶- بررسی‌های گلخانه‌ای..... ۴۰
۲-۱۶-۱- تهیه مایه تلقیح قارچ‌های بیمارگر..... ۴۰
۲-۱۶-۲- تهیه مایه تلقیح استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست..... ۴۰
۲-۱۶-۳- بررسی تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست..... ۴۰
الف- روش آلوده‌سازی خاک به باکتری ۴۰
ب- روش آغشته کردن بذور به باکتری..... ۴۱

۲-۱۶-۴- بررسی تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست بر روی شدت بیماری و درصد وقوع بیماری در حالت آلوده‌سازی خاک و آغشته سازی بذور..... ۴۱
الف- آلوده‌سازی خاک حاوی *Fusarium oxysporum* با استرین‌های باکتریایی..... ۴۱
ب- آغشته‌سازی بذور باقلا به استرین‌های باکتریایی و کاشت در خاک آلوده به قارچ‌های مورد نظر..... ۴۲
۲-۱۶-۵- بررسی تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی فاکتورهای رشدی گیاه در حالت آلوده‌سازی خاک و آغشته سازی بذور..... ۴۲

فصل سوم - نتایج

۳-۱- ویژگی‌های قارچ *F. oxysporum*..... ۴۵
۳-۱-۱- ویژگی‌های ماکروسکوپی..... ۴۵
۳-۱-۲- ویژگی‌های میکروسکوپی..... ۴۵
الف- فیالید..... ۴۶
ب- ماکروکنیدیوم..... ۴۶
ج- میکروکنیدیوم..... ۴۶
د- کلامیدوسپور..... ۴۷
۳-۲- ویژگی‌های قارچ *F. solani*..... ۴۶
۳-۲-۱- ویژگی‌های ماکروسکوپی قارچ..... ۴۶
۳-۳-۲- مشخصات میکروسکوپی..... ۴۸
الف- فیالید..... ۴۷
ب- ماکروکنیدیوم..... ۴۷
ج- میکروکنیدیوم..... ۴۷
د- کلامیدوسپور..... ۴۷
۳-۳- ویژگی‌های قارچ *R. solsni*..... ۴۸
۳-۳-۱- مشخصات ماکروسکوپی..... ۴۸
۳-۳-۲- مشخصات میکروسکوپی..... ۴۸
۳-۴- ویژگی‌های قارچ *M. phaseolina*..... ۴۹
۳-۴-۱- مشخصات ماکروسکوپی..... ۴۹
۳-۴-۲- مشخصات میکروسکوپی..... ۴۹
۳-۵- ویژگی‌های *Pythium*..... ۵۰
۳-۵-۱- مشخصات ماکروسکوپی..... ۵۰
۳-۵-۲- مشخصات میکروسکوپی..... ۵۰
۳-۶- ویژگی قارچ‌های ساپروفیت و آنتاگونیست جدا شده در این بررسی..... ۵۱
۳-۶-۱- ویژگی‌های قارچ *Colonostachys*..... ۵۱

۳-۶-۲- ویژگی‌های قارچ *Cladosporium*..... ۵۱
۳-۶-**۳** ویژگی‌های قارچ *Curvularia*..... ۵۲
۳-۷- آزمون بیماری‌زایی..... ۵۳
۳-۸- آزمون‌های شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست..... ۵۸
۳-۹- بررسی تولید متابولیت‌های میکروبی موثر در خاصیت آنتاگونیستی..... ۵۹
۳-۹-۱- آزمون تولید پروتئاز..... ۵۹
۳-۹-۲- آزمون تولید سلولاز..... ۶۰
۳-۹-۳- آزمون تولید سیانید هیدروژن..... ۶۰
۳-۹-۴- آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی..... ۶۰
۳-۹-۵- آزمون تولید سیدروفور..... ۶۳
۳-۱۰- بررسی اثرات بازدارندگی استرین‌های آنتاگونیست در مقیاس میکروسکوپی..... ۶۳
۳-۱۱- آزمون کشت متقابل و انتخاب استرین‌های آنتاگونیست..... ۶۴
۳-۱۲- بررسی‌های گلخانه‌ای..... ۶۹
۳-۱۲-۱- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست بر شدت بیماری (DS) ۶۹
۳-۱۲-۲- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست بر روی درصد وقوع بیماری..... ۷۶
۳-۱۲-۳- تأثیر استرین‌های باکتریایی بر روی وزن تر و خشک باقلا..... ۸۱
۳-۱۲-۴- تأثیر استرین‌های باکتریایی روی طول ساقه و ریشه باقلا..... ۸۶
۳-۱۲-۵- تأثیر استرین‌های باکتریایی روی تعداد گره‌های ریشه باقلا..... ۹۲
۳-۱۲-۶- تأثیر استرین‌های باکتریایی روی در صد جوانه زنی بذور باقلا..... ۹۶

فصل چهارم- بحث..... ۱۰۲

منابع..... ۱۱۶

فهرست جدول ها:

۳-۱- تأثیر جدایه‌های *F. oxysporum* در آزمون بیماری زایی، روی درصد وقوع بیماری..... ۵۳

۳-۲- تأثیر جدایه‌های *F. solani* در آزمون بیماری زایی، روی درصد وقوع بیماری..... ۵۵

۳-۳- تأثیر جدایه‌های *M. phaseolina* در انجام آزمون بیماری زایی..... ۵۵

۳-۴- تأثیر جدایه‌های *R. solani* در انجام آزمون بیماری زایی، بر روی درصد وقوع بیماری..... ۵۶

۳-۵- تأثیر جدایه‌های *Pythium* در انجام آزمون بیماری زایی، بر روی درصد وقوع بیماری..... ۵۶

۳-۶- ویژگی‌های فیزیولویکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری‌های*R. leguminosarum* و *P. fluorescens*... ۵۸

۳-۷- تأثیر متابولیت‌های فرار استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست *P. fluorescens* و *R. legominosarum*..... ۶۱

۳-۸- تأثیر متابولیت‌های فرار استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست *P. fluorescens* و *R. leguminosarum*..... ۶۲

۳-۹- تأثیر متابولیت‌های فرار استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست *P. fluorescens* و *R. leguminosarum*..... ۶۲

۳-۱۰- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی قارچ *F. solani* در آزمون کشت متقابل..... ۶۵

۳-۱۱- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* در آزمون کشت متقابل.. ۶۶

۳-۱۲- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی *R. solani* در آزمون کشت متقابل..... ۶۷

۳-۱۳- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی شدت بیماری باقلا در تیمار آلوده به *F. solani*..... ۷۰

۳-۱۴- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی شدت بیماری باقلا در تیمار با *M. phaseolina* ... ۷۰

۳-۱۵- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی شدت بیماری باقلا در تیمار *R. solani*..... ۷۳

۳-۱۶- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی شدت بیماری گیاه باقلا..... ۷۶

۳-۱۷- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا..... ۷۸

۳-۱۸- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا..... ۷۸

۳-۱۹- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا..... ۷۹

۳-۲۰- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا..... ۸۰

۳-۲۱- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی وزن تر وخشک باقلا در تیمار با *F. solani* ۸۲

۳-۲۲- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی وزن تر وخشک باقلا در تیمار با *M. phaseolina* .. ۸۲

۳-۲۳- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی وزن تر و خشک باقلا در تیمار با *R. solani*..... ۸۳

۳-۲۴- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی وزن تر خشک گیاه باقلا..... ۸۵

۳-۲۵- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی طول ساقه و ریشه باقلا در تیمار با *F. solani*..... ۸۸

۳-۲۶- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی طول ساقه و ریشه باقلا در تیمار با *M. phaseolina* ۸۸

۳-۲۷- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی طول ساقه و ریشه باقلا در تیمار با *R. solani*..... ۸۹

۳-۲۸- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی وزن تر گیاه باقلا..... ۹۱

۳-۲۹- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی تعداد گره‌های ریشه باقلا..... ۹۳

۳-۳۰- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی تعداد گره‌های ریشه باقلا ۹۴

۳-۳۱- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی تعداد گره‌های ریشه باقلا..... ۹۴

۳-۳۲- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی تعداد گره‌های ریشه باقلا..... ۹۶

۳-۳۳- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی درصد جوانه زنی بذور باقلا..... ۹۷
۳-۳۴- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی درصد جوانه زنی بذور باقلا..... ۹۷
۳-۳۵- اثر استرین‌های باکتریایی و روش به کارگیری آن‌ها روی درصد جوانه زنی بذور باقلا..... ۹۸
۳-۳۶- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی درصد جوانه زنی بذور باقلا..... ۹۹

فهرست شکل ها:

۳-۱- *F. oxysporum* ۴۶

۳-۲- *F. solani* ۴۸

۳-۳- محل انشعاب دیواره عرضی و فرورفتگی در پایه هیف قارچ *R. solani* ۴۹

۳-۴- *M. phaseolina* ۵۰

۳-۵- *Pythium* ۵۰

۳-۶- انشعابات ورتیسیلیت و کنیدی‌های تخم‌مرغی در قارچ *Colonostachys* ۵۱

۳-۷- *Cladosporium* ۵۲

۳-۸- *Curvularia* ۵۲

۳-۹- نشانه‌های آلودگی به قارچ‌های مورد آزمایش ۵۴

۳-۱۰- تأثیر جدایه‌های بیماری‌زای قارچی روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا در مرحله گلدهی ۵۷

۳-۱-. تأثیر جدایه‌های بیماری‌زای قارچی روی شدت بیماری گیاه باقلا در مرحله گلدهی ۵۷

۳-۱۲- تأثیر جدایه‌های بیماری‌زای قارچی روی وزن خشک گیاه باقلا در مرحله گلدهی ۵۸

۳-۱۳- تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه باکتری‌های آنتاگونیست درآزمون تولید پروتئاز ۶۰

۳-۱۴- تأثیر متابولیت‌های فرار استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست ۶۱

۳-۱۵- تأثیر متابولیت‌های فرار استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست ۶۳

۳-۱۶- اثر متابولیت‌های خارج سلولی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی خصوصیات میکروسکوپی ۶۴

۳-۱۷- أثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی قارچ *F. solani* در آزمون کشت متقابل ۶۵

۳-۱۸- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* ۶۶

۳-۱۹- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد میسلیومی *R. solani* در آزمون کشت متقابل ۶۷

۳-۲۰- تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی میانگین قطر پرگنه ۶۸

۳-۲۱- درصد بازدارندگی از رشداسترین‌های باکتریایی آنتاگونیست در آزمون کشت متقابل ۶۸

۳-۲۲- تاثیر استرین های باکتریایی آنتاگونیست بر شدت بیماری در تیمار آلوده به قارچ *F. solani* ۷۱

۳-۲۳- تاثیر استرین های باکتریایی آنتاگونیست بر شدت بیماری در تیمار با قارچ *M. phaseolina* ۷۲

۳-۲۴- تاثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست بر شدت بیماری در تیمار با قارچ *R. solani* ۷۴

۳-۲۵- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی شدت بیماری گیاه باقلا ۷۵

۳-۲۶- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی شدت بیماری گیاه باقلا ۷۵

۳-۲۷- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی شدت بیماری گیاه باقلا ۷۶

۳-۲۸- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا ۷۹

۳-۲۹- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا ۸۰

۳-۳۰- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی درصد وقوع بیماری گیاه باقلا ۸۱

۳-۳۱- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی وزن تر گیاه باقلا ۸۳

۳-۳۲- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی وزن خشک گیاه باقلا ۸۴

۳-۳۳- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی وزن تر گیاه باقلا..... ۸۴
۳-۳۴- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی وزن خشک گیاه باقلا ۸۵
۳-۳۵- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی وزن تر گیاه باقلا..... ۸۶
۳-۳۶- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی وزن خشک گیاه باقلا ۸۶
۳-۳۷- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی طول ساقه گیاه باقلا ۸۹
۳-۳۸- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی طول ریشه گیاه باقلا ۹۰
۳-۳۹- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی طول ساقه گیاه باقلا ۹۰
۳-۴۰- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی طول ریشه گیاه باقلا ۹۱
۳-۴۱- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی طول ساقه گیاه باقلا..... ۹۲
۳-۴۲- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی طول ریشه گیاه باقلا ۹۲
۳-۴۳- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی تعداد گره‌های ریشه باقلا ۹۵
۳-۴۴- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی تعداد گره‌های ریشه باقلا ۹۵
۳-۴۵- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی تعداد گره‌های ریشه باقلا ۹۶
۳-۴۶- اثراسترین‌های باکتریایی در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک روی درصد جوانه زنی بذور باقلا ۹۸
۳-۴۷- اثراسترین‌های باکتریایی در روش آغشته سازی بذور روی درصد جوانه زنی بذور باقلا ۹۹
۳-۴۸- اثر روش به کارگیری استرین‌های باکتریایی روی درصد جوانه زنی بذور باقلا ۱۰۰

معرفی گیاه باقلا

باقلا گیاهی یکساله، دو لپه‌ای با نام علمی (*Vicia faba* L.) واز خانواده *Fabaceae* (حبوبات) می‌باشد. منشا احتمالی باقلا جنوب غربی آسیا گزارش شده است (کوبرو[1]، ۱۹۷۴ و بوند[2]،۱۹۸۵)

این گیاه به عنوان منبع تغذیه در کشور های در حال پیشرفت، غذای خوک، اسب، ماکیان و کبوتر استفاده می‌شود. در نواحی مدیترانه، چین و اتیوپی به عنوان صبحانه مصرف می‌شود (بوند و همکاران، ۱۹۸۵).

مقدار پروتئین در بیشتر واریته‌ها ۲۰ تا ۴۱ درصد می‌باشد (چاون[3]. و همکاران، ۱۹۸۵) مقدار پروتئین تحت تأثیر ژنتیک و فاکتورهای محیطی است (بوند و همکاران، ۱۹۸۵). هر ۱۰۰ گرم از بذور خشک باقلا محتوی ۳۴۴ کالری، ۱۰/۱٪ رطوبت، ۱/۳ گرم چربی، ۵۹/۴ گرم کربوهیدرات، ۶/۸ گرم فیبر، ۱۰۴ میلی گرم کلسیم، ۳۰۱ میلی گرم فسفر، ۶/۷ میلی گرم آهن، ۸میلی گرم سدیم، ۱۳۰ میلی گرم بتا کاروتن، ۰/۳۸ میلی گرم تیامین، ۰/۲۴ میلی گرم ریبوفلاوین، ۲/۱ میلی گرم نیاسین و ۱۶۲ میلی گرم تریپتوفان می باشد.

۶۰ در صد محصول باقلا در کشور چین تولید می‌شود. این گیاه در مناطق سردسیر به عنوان یک محصول تابستانه و در مناطق گرمسیر به عنوان یک محصول زمستانه کشت می‌شود. باقلای زمستانه نسبت به بهاره پروتئین بیشتری دارد (بوند و همکاران، ۱۹۸۵). در اروپا انواع بذر ریز و بذر متوسط را field bean و انواع بذر درشت را broad bean می‌نامند. انواع بهاره و پاییزه‌ی بذر متوسط را horse bean نیز نام نهاده‌اند.

باقلا گیاهی یکساله و علفی با ساقه راست، قطور، توخالی و بدون انشعاب است (بوند و همکاران، ۱۹۸۵). برگ‌ها متناوب، شانه‌ای و شامل ۳ تا ۶ برگچه به فاصله ۸ سانتی متر و اغلب بدون تندریل هستند (کی[4]، ۱۹۷۱ و بوند، ۱۹۸۵). گل‌ها بزرگ و سفید با خط‌های مشکی می-باشد که از هر کدام ۱ تا ۴ غلاف حاصل می‌شود.

باقلا نسبت به بقیه گیاهان تیره *Fabaceae* مقاومت بیشتری به خاک‌های اسیدی دارد. این گیاه برای رشد بهتر نیاز به یک دوره سرما دارد طوری که می‌تواند تا ۱۵- درجه سانتی گراد را

[1] Cubero
[2] Bond
[3] Chaven
[4] Key

تحمل کند. دمای مناسب برای رشد آن ۲۷- ۱۸ درجه سانتی گراد است. دوره رشد باقلا از ۹۰ تا ۲۲۰ روز متغییر است که بستگی به کولتیوارها و آب و هوای منطقه کشت دارد. نیاز به رطوبت در ۹ تا ۱۲ هفته بعد از کاشت بیشتر است. تثبیت نیتروژن در باقلا بیشتر از عدس و لوبیا چشم بلبلی می‌باشد. این گیاه در خاکی که به سرعت خشک شود دچار تنش می‌شود. باقلا به خاک لومی و لومی رسی نیاز دارد و بارش سالانه مناسب برای آن بیش از ۵۰۰ میلی لیتر در سال می‌باشد (بوند، ۱۹۸۵).

عوامل زنده مثل قارچ‌ها، ویروس‌ها، نماتدها و حشرات و فاکتورهای غیر زنده مثل خشکی، دمای بالا، مواد معدنی و رطوبت نامناسب نقش مهمی در میزان محصول باقلا دارد. بیماری‌های مهم قارچی در باقلا شامل:

لکه شکلاتی ناشی از *Botrytis fabae* و *B.cinerea*، زنگ ناشی از *Uromyces fabae*، پوسیدگی سیاه ریشه ناشی از *Thielaviopsis basicola*، پوسیدگی ساقه ناشی از *Sclerotinia trifoliorum* و *S.sclerotiorum*، پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه ناشی از *Rhizoctonia* spp.، سفیدک پودری ناشی از *Peronospora vicia*، مرگ گیاهچه قبل از جوانه‌زنی ناشی از *Pythium* spp.، بلایت برگ ناشی از *Ascochyta fabae* و پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از *Fusarium* spp. می‌باشد. در طی این تحقیق سعی گردیده قارچ‌های مهم عامل پوسیدگی ریشه‌ی باقلا در استان لرستان جدا شوندهمچنین از خاک ریزوسفر و گره‌های تثبیت کننده‌ی ازت نیز جهت جداسازی باکتری‌های مورد نظر نمونه برداری به عمل آمده است.

نکته‌ی اصلی در اجرای این تحقیق این است که بیماری‌زایی قارچ‌های جدا شده، با استفاده از کشت باقلا در گلخانه و تلقیح این گیاهان با قارچ‌های مذکور ثابت شود ودر شرایط آزمایشگاهی برهم کنش باکتری‌های فوق و قارچ‌های مورد نظر بررسی شود تا به چگونگی اثر آن‌ها روی این قارچ ها پی برده شود، تا در آینده بتوان از این نتایج استفاده کرد. با توجه به بررسی‌های انجام شده در چند سال اخیر در مزارع باقلای استان لرستان مشخص شد که مزارع این استان دچار پوسیدگی ریشه هستند که باعث کاهش هر ساله میزان قابل ملاحظه‌ای از محصول در این مزارع می‌شود و در نتیجه کشاورزان تمایل کمتری به کشت مجدد این محصول در سال‌های آتی نشان دهند. ارزیابی‌های به عمل آمده نشان داد علی‌رغم اینکه بیماری‌های

برگی هم یافت می‌شود اما مشکل اساسی این مزارع از آلودگی ریشه‌ی گیاهان باقلا است. از این رو تصمیم گرفته شد که در زمینه‌ی شناسایی عوامل پوسیدگی ریشه‌ی باقلا و استفاده از باکتری‌های آنتاگونیستی که از ریشه‌ی این گیاه قابل جداسازی است برای کنترل عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه این گیاه استفاده شود.

۱-بررسی منابع

۱-۱. کنترل بیولوژیک

امروزه مسئله اصلی در کشاورزی مدرن عدم استفاده از سموم شیمیایی می‌باشد، چرا که استفاده از این سموم مضراتی از جمله مقاوم شدن بیمارگرها، اثرات سوء زیست محیطی و هزینه‌های بالا دارد. قارچ کش‌ها نیز همانند سایر سموم شیمیایی دارای اثرات زیست محیطی بوده و از لحاظ واکنش‌های مختلف، نه تنها علیه بیمارگرهای هدف وارد عمل می‌شوند، بلکه ممکن است روی فعالیت میکروارگانیسم‌های غیر هدف خاک نیز تأثیر بگذارند (تو، ۱۹۹۳)[1] و گاهی نیز ممکن است بعضی بیمارگرها نسبت به برخی سموم شیمیایی مقاومت پیدا کنند (فونک ینسن و لومسدون، ۲۰۰۲)[2]. از این رو محققان برآنند تا از راه‌های دیگری برای کنترل آفات و بیماری‌های مهاجم استفاده کنند. یکی از این راه‌ها استفاده از موجودات زنده علیه بیمارگرهاست، به این ترتیب که موجودات زنده موجود در طبیعت را علیه بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و ویروسی مورد بررسی قرار می‌دهند و به انتخاب موارد مناسب می‌پردازند. به نظر می‌رسد در بسیاری از موارد کنترل بیولوژیکی یک جایگزین مناسب، قوی و مهم برای سموم شیمیایی باشد.

۱-۱-۱. تاریخچه

اگرچه سابقه تاریخی تجربیات مبارزه بیولوژیکی را به ۳۴۸ سال قبل از میلاد حضرت مسیح نسبت می‌دهند ولی شرح مشخصی ازاین روش ارائه نگردیده است. به کارگیری تناوب زراعی، عملیات خاک‌ورزی و حذف گیاهان بیمار، توسط پاره‌ای از متخصصان مبارزه بیولوژیک به حساب می‌آید. این تجربه که انسان می‌تواند یک موجود زنده و یا یکی از عوامل محیط زیست را در جهت کنترل موجودات زنده دیگر بکار گیرد، عقیده‌ای بود که به‌تدریج حاصل گردید و بسیار طبیعی است اگر مفاهیم آن نیز با افزایش دانش انسان دائماً در حال تغییر باشد (بیکر و کوک،۱۹۷۴)[3].

اولین گزارش‌های تحقیقاتی در این مورد تحت عنوان "کنترل طبیعی" توسط حشره‌شناسان منتشر گردید که در آن از ثابت ماندن جمعیت حشرات در یک محدوده زمانی معین، در اثر دخالت عوامل محیطی سخن به میان آمده بود. در سال ۱۷۶۲ میلادی متخصصین مبارزه با آفات

[1] Tu
[2] Funk & Lumsden
[3] Baker and Cook

در موریس، برای مبارزه با ملخ قرمز[1]، اقدام به وارد کردن مرغ مینا[2] از هندوستان نمودند و این اولین مبارزه موفقیت‌آمیز علیه یک حشره بود که از طریق وارد نمودن دشمن طبیعی آن از یک کشور به کشور دیگر صورت می‌گرفت.

اولین مبارزه بیولوژیک حقیقی در سال ۱۸۸۸ میلادی علیه شپشک استرالیایی (در کالیفرنیا) صورت گرفت که در آن از کفشدوزک استرالیایی[3] استفاده گردید.

در سال ۱۹۱۶ اسمیت[4] آن را "مبارزه بیولوژیک" نام نهاد.

با کشف آنتی بیوتیک پنی‌سیلین توسط فلمینگ[5] در سال ۱۹۲۸ و کاربرد دارویی آن موجب توجه بیشتر به مسئله آنتاگونیسم در بیماری‌های گیاهی گردید (بیکر، ۱۹۸۷)[6]. از آنجایی که این روش از مبارزه، به تدریج مورد توجه قرار می‌گرفت مفاهیم آن نیز تدریجاً گسترده‌تر می‌شد به‌طوری که ونتوبوف در سال ۱۹۱۴ برای اولین بار واژه کنترل بیولوژیکی را در ارتباط با عوامل بیماری‌زای گیاهی تحت عنوان کاهش اینوکلوم یا کاهش فعالیت عامل بیماری که به وسیله یک یا چند موجود زنده از جمله گیاه میزبان و بدون دخالت انسان صورت گیرد، توصیف نمود (بیکر، ۱۹۸۷).

در سال ۱۹۶۴ دباک[7] آن را بدین‌گونه تعریف نمود (بیکر وکوک، ۱۹۷۴) هر گونه فعالیت انگل‌ها، شکارگرها و عوامل بیماری‌زا علیه یک موجود زنده دیگر، به‌طوری که میانگین جمعیت آن موجود زنده از زمانی که این عناصر وجود ندارند کمتر باشد.

بیکر و کوک در سال ۱۹۷۴ کنترل بیولوژیک را کاهش جمعیت یک بیمارگر و یا فعالیت بیماری زایی آن به وسیله یک یا چند ارگانیسم دیگر تعریف کردند.

ویلسون[8] در سال ۱۹۹۷ بیوکنترل را کنترل بیماری گیاه با یک فرآیند زنده تعریف کرد که شامل کنترل بیولوژیکی و شیمیایی توسط ارگانیسم زنده و ترشحات تولیدی آن می‌باشد. وی در جایی دیگر بیان کرد که کنترل بیولوژیک عبارتست از فعالیت انگل‌ها، شکارگرها و بعضی بیمارگرها برای پایین نگه داشتن جمعیت بیمارگری که موجب آسیب به گیاه می‌شود.

۱-۲. عوامل موثر در مبارزه بیولوژیک

[1] Red locust
[2] Myna bird
[3] Vedalia beetle
[4] Smith
[5] Fleming
[6] Baker
[7] De bach
[8] Wilson

۱-۲-۱. میزبان

در طبیعت دست نخورده، جمعیت میزبان همیشه از طریق روش‌های بیولوژیک کنترل می‌گردد زیرا در هر جامعه متعادل بیولوژیک، جمعیت عوامل بیماری‌زای گیاهی فعال نخواهند بود. مواد مترشحه از ریشه گیاهان و غذا، تحریک کننده رشد عوامل بیماری‌زا به‌حساب می‌آیند که علاوه بر آن غذای آنتاگونیست‌ها را نیز تأمین می‌نمایند. بقایای گیاهی میزبان (ریشه، ساقه و برگ‌ها) وقتی به خاک بر می‌گردد موجبات زنده ماندن عوامل بیماری‌زا را فراهم می‌آورد. این مواد منابع پر ارزشی از انرژی هستند که میکروارگانیسم‌های گندرو با استفاده از مواد غذایی موجود در آن موجبات پوسیده شدن این مواد و رها شدن عوامل مجدد بیماری به خاک شده و از این طریق باعث نابودی عوامل بیماری‌زای مزبور می‌گردند.

در جامعه گیاهی دست نخورده، گیاهانی وجود دارند که در تحریک و رشد عوامل بیماری‌زای گیاهی دخالت دارند. اگرچه این عوامل برای این گونه گیاهان مضر نیستند ولی از طریق فراهم آوردن موجبات رشد این گونه عوامل، گونه‌های رقیب (حساس) را از صحنه خارج می‌نمایند. گونه‌های گیاهی دیگر، به‌عنوان تله عمل نموده و موجب جذب پاره‌ای از عوامل بیماری‌زای گیاهی را شده و سپس، از بارآوری آن‌ها جلوگیری کرده و موجب کاهش جمعیت آن‌ها می‌گردد. هر یک از موارد فوق نمادهایی در جهت مبارزه بیولوژیک بوده و انسان می‌تواند از طریق به کارگیری آن روش‌های جدیدی از مبارزه بیولوژیک را آغاز نماید.

اگر میزبان به عامل بیماری‌زا حساس باشد، خسارت فراوانی را باعث می‌گردد مگر اینکه شرایط آب و هوایی ناسازگار بوده و یا جمعیت آنتاگونیست، عامل بیماری‌زا را محدود نموده باشد. در چنین حالتی جمعیت عوامل بیماری‌زا ناپایدار خواهند بود. اگر میزبان نسبت به عامل بیماری‌زا مقاوم باشد یا بیماری وجود ندارد و یا خسارت ناشی از آن بسیار ناچیز خواهد بود. در این مورد حتی اگر آب و هوا مساعد، جمعیت آنتاگونیست غیر موثر و جمعیت عوامل بیماری‌زا نیز پایدار باشند، خسارت قابل توجهی وارد نخواهد شد. میزبان‌های متحمل نیز دارای شرایط فوق بوده و دامنه خسارت وارده قابل توجه نخواهد بود.

نکته‌ای که در تجزیه و تحلیل بیماری های گیاهی کمتر مورد توجه قرار گرفته این است که میزبان خود یک سیستم بیولوژیک به حساب می‌آید. قسمت فوقانی گیاه از طریق فتوسنتز به ساختن هیدرات‌های کربن برای رشد تمام اندام‌های گیاه مشغول است و ریشه نیز آب و مواد معدنی را برای تمام گیاه جذب می‌کند، ریشه، همچنین محل مصرف هیدرات‌های کربن،

ساختن اسیدهای امینه و نیز مصرف ازت جذب شده از خاک است. بنابراین هر عاملی که حیات قسمت‌های فوقانی گیاه را تهدید نماید، بدون شک حیات ریشه را نیز تهدید خواهد نمود و موجب هجوم عوامل بیماری‌زای خاک به سمت ریشه خواهد شد (کوک و بیکر، ۱۹۸۳).

۱-۲-۲. عامل بیماری

غالب عوامل بیماری‌زا، در مراحل اولیه رشد میزبان به آن حمله نموده و با ورود به بافت‌های میزبان خود را از آنتاگونیست‌ها محفوظ می‌دارند. در این موارد ممکن است عوامل ثانویه‌ای به بافت‌های بیمار حمله کرده و آن‌ها را بپوسانند. بعد از مرگ بافت‌های میزبان، اشغال سلول‌ها و تخلیه مواد غذایی قابل حصول، تداوم می‌یابد و عامل بیماری ممکن است با ایجاد آنتی‌بیوتیک از هجوم عوامل گندرو مصون بماند و اینکه ریسه نیز ممکن است دیواره ضخیمی داشته و در مقابل چنین هجومی خود را حفظ کند.

عوامل بیماری‌زایی که داخل بافت‌های میزبان باقی می‌مانند از عواملی که در سطح میزبان قرار گرفته‌اند (مانند ریسه عوامل سفیدک‌های پودری) محفوظ‌ترند. قارچ‌های موفق در خاک دارای ریسه‌هایی با دیواره ضخیم بوده و یا دارای ساختمان‌های مقاوم از قبیل سختینه[1]، کلامیدوسپور[2] و یا ااسپور[3] هستند که بعد از پوسیده شدن بافت‌های میزبان آن‌ها را زنده نگاه می‌دارد.

عوامل بیماری‌زایی که به آوندها حمله می‌کنند (*Verticillium* spp., *Fusarium oxysporum* و غیره) اگرچه در داخل گیاه به‌خوبی محافظت می‌گردند، ولی به روش‌های خاصی تغذیه نموده و به آن عادت می‌کنند. همین وابستگی به روش‌های خاص موجب می‌گردد که در مقابل محیط خارج از میزبان و آنتاگونیست‌ها به شدت آسیب‌پذیر باشند. لذا می‌توان نتیجه‌گیری نمود که کم تخصص‌ترین میکروارگانیسم‌ها ، میکروارگانیسم‌های خاکزی هستند زیرا به صورت مساوی به طیف وسیعی از میزبان‌ها در حالت گندرویی حمله نموده و قادرند به‌عنوان عوامل گندروی خاک به‌صورت نامحدود زنده بمانند (گارت،۱۹۶۵)[4].

[1] Sclerotium
[2] Clamidospore
[3] Oospore
[4] Garrett