دانشگاه زابل
دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی
پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی
عنوان:

بررسی امکان کنترل بیولوژیکی قارچ *Phoma lingam*، عامل بیماری ساق سیاه کلزا، توسط باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست در آزمایشگاه و گلخانه

استادان راهنما:
دکتر ناصر پنجه‌که
دکتر همایون افشاری آزاد

استاد مشاور:
دکتر محمد سالاری

تهیه و تدوین:
امیر صابریان

مهر ۸۸

چکیده

در سالهای اخیر کشت کلزا در ایران برای تامین روغن خام توسعه یافته است. آفات و عوامل بیماریزا از مهمترین عوامل محدود کننده کشت این محصول بوده و منجر به کاهش عملکرد می‌شوند. یکی از مهمترین بیماریهایی محدود کننده کشت کلزا در ایران، بیماری ساق سیاه کلزا است. فرم غیر جنسی عامل این بیماری قارچ *Phoma lingam* می‌باشد. مبارزه بیولوژیک با توجه به مزایایی که نسبت به سایر روشهای مبارزه با این بیماری دارد، بهترین شیوه مبارزه با این بیماری است.در این تحقیق ابتدا بوته‌های آلوده و سالم کلزا از مناطق مازندران، خوزستان و مغان جمع آوری و در آزمایشگاه جدایه های باکتریایی شامل: P1، BE3، N4، BC6، B7، BC8، P10، P16، B24، B31، B39، B51، B66، B67، B68، B69 و B70 و همچنین جدایه های قارچی Tr.2901 و Tr.2910 از منطقه ریزوسفر بوته های کلزا جداسازی گردیدند. در مرحله بعد اثرات آنتاگونیستی عوامل باکتریایی و قارچی روی قارچ *P. lingam* در آزمایشگاه به روش کشت متقابل بررسی گردید و جدایه های باکتریایی BE3، B31، B66، B67، B68، B69 و B70 و از بین جدایه های قارچی نیز جدایه های Tr.2901 و Tr.2910 جهت آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند و در شرایط گلخانه اثرات بازدارندگی این جدایه ها در کنترل بیماری ساق سیاه به دو روش تیمار بذر با آنتاگونیست‌ها و اسپری نمودن اندام‌های هوایی کلزا با سوسپانسیون عوامل آنتاگونیست ارزیابی شد. در نهایت جدایه های B67 ، Tr.2901 و B70 که در روش تیمار بذر به ترتیب ۸۰، ۵۶/۷ و ۳۶/۷ درصد بیماری را کنترل نمودند و همچنین جدایه های Tr.2901 و Tr.2910 نیز که در روش تیمار اندام های هوایی کلزا به ترتیب ۶۰ و ۴۳/۳ درصد درکنترل بیماری موثر بودند تا سطح گونه شناسایی شدند. جدایه های باکتریایی B67 و B70 به گونه *Bacillus subtilis* و جدایه های قارچی Tr.2901 و Tr.2910 به گونه *Trichoderma koningii* تعلق داشتند. به منظور مقایسه تاثیر کاربرد سم با عوامل کنترل بیولوژیک، در آزمایشات گلخانه‌ای از قارچکش کاربوکسین تیرام (با غلظت ۲/۵ در هزار) نیز استفاده شد که در روش تیمار اندام های هوایی کلزا با ۷۶/۷ درصد کنترل بیماری موثرترین تیمار بود.

کلمات کلیدی: کنترل بیولوژیک، *Phoma lingam*، ساق سیاه کلزا، آنتاگونیست

فصل اول

مقدمه

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* متعلق به خانواده چلیپاییان[1] است (عزیزی وهمکاران، ۱۳۷۸). خاستگاه اصلی کلزا (*Brassica napus*) کرانه‌های دریای مدیترانه بوده و یک گیاه دانه روغنی است که در حال حاضر در بسیاری از کشورهای جهان کشت شده و مهمترین تولیدکنندگان این محصول کشورهای کانادا، چین، هندوستان، آلمان، فرانسه و انگلستان هستند (معتمدی و جاویدفر، ۱۳۷۹). کشت کلزا در سال‌های گذشته در ایران آغاز شده وتحقیقات متعددی روی آن انجام گرفته است.

کلزا همانند سایر محصولات کشاورزی در معرض حمله آفات و عوامل بیماریزای متفاوتی که منجر به کاهش عملکرد می‌شوند، قرار دارد. لذا کنترل عوامل بیماریزا در جهت افزایش عملکرد از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. از بین بیماریهای مختلفی که کشت کلزا را محدود می‌کنند، بیماری ساق سیاه کلزا که عامل آن قارچی از گروه آسکومیستها که نام علمی آن در فرم جنسی *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces and De Not. و در فرم غیر جنسی *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desm. می‌باشد (Boerema *et al.*, 2004) ، بسیار حائز اهمیت است. این بیماری در بسیاری از مناطق اروپا، آسیا، آمریکای شمالی، مرکزی و جنوبی، آفریقا و اقیانوسیه گسترش داشته و گاهی موجب بروز خسارت به میزان ۹۰ درصد شده است (EPPO, 2005; Hershman, 1992). در ایران نیز این بیماری در استانهای اردبیل، خوزستان، قزوین، گلستان، گیلان و مازندران مشاهده شده است اما از میزان خسارت ناشی از آن گزارشی در دست نیست (افشاری آزاد و همکاران، ۱۳۸۷).

عامل بیماری در طول فصل زراعی، گیاهان خانواده چلیپاییان را مورد حمله قرار داده و در گیاهان حساسی نظیر کلزا قادر به ایجاد آلودگی در تمام اندام‌ها می باشد. علاوه بر روشهای مختلف به‌زراعی و

[1] Cruciferacea

به‌نژادی، مبارزه بیولوژیک به دلیل مزایای اکولوژیک و اقتصادی، یکی از روشهای مناسب در قالب مدیریت تلفیقی می‌باشد که با توجه به اینکه تا کنون در ایران در این زمینه تحقیقی صورت نگرفته است، در قالب پایان نامه اخیر کنترل بیولوژیک این بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

برای این منظور ابتدا از کلزاهای سالم و آلوده به بیماری ساق سیاه در مناطق مازندران، خوزستان و مغان نمونه برداری گردید و در شرایط آزمایشگاه جدایه های عامل بیماری از اندام های آلوده و همچنین جدایه های قارچی و باکتریایی موجود در ناحیه ریزوسفر جداسازی شدند و در مرحله بعد قدرت بیماریزایی جدایه های عامل بیماری و همچنین اثرات آنتاگونیستی عوامل قارچی و باکتریایی به دست آمده بر روی قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. با انجام این آزمایشات جدایه ای از قارچ عامل بیماری که از قدرت بیماریزایی بالایی برخوردار بود و همچنین تعدادی از جدایه های قارچی و باکتریایی به دست آمده از ریزوسفر که تاثیر بازدارندگی بیشتری را نسبت به سایر جدایه ها بر روی عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه نشان دادند، انتخاب شده و در شرایط گلخانه به منظور بررسی اثرات بازدارندگی آنها بر روی عامل بیماری مورد استفاده قرار گرفتند و در نهایت جدایه های آنتاگونیستی که در شرایط آزمایشگاه و گلخانه تاثیر مثبتی را در کنترل بیماری از خود بروز دادند تا سطح گونه شناسایی شدند.

فصل دوم

بررسی منابع

۱-۲- بیماریهای مهم کلزا

عوامل بیماریزای زیادی در نقاط مختلف دنیا بسته به شرایط اقلیمی به کلزا حمله کـرده و باعـث وارد آمدن خسارت های سنگین اقتصادی می‌گردند. از بین بیماریهـای مختلـف کلـزا، بیماریهـای قـارچی کـه فهرست مهمترین آنها در جدول ۱-۲ آمده است (افشاری آزاد، ۱۳۸۰)، هم از نظر تنوع عامل و پراکنش و هم ازنظر میزان خسارتی که به این محصول وارد می سازند، بیش از سایر بیماریها حـائز اهمیـت هـستند. بیماریهای باکتریایی و فیتوپلاسمایی کلزا در مقایسه با سایر بیماریهای پاتوژنیک از تنوع و اهمیت زیـادی برخوردار می باشند. از بین ویروسهای بیماریزای گیاهی نیـز بـیش از ۱۱ ویـروس شـناخته شـده‌انـد کـه گیاهان جنس *Brassica* را آلوده می‌سازند.

جدول ۱-۲- فهرست مهمترین بیماریهای قارچی کلزا (افشاری آزاد، ۱۳۸۰)

نام فارسی بیماری	نام انگلیسی بیماری	عامل بیماری
پوسیدگی سفید ساقه	Sclerotinia stem rot	*Sclerotinia sclerotiorum*
شانکر ساقه یا ساق سیاه	Stem canker - Blackleg	*Leptosphaeria maculans* (Ana: *Phoma lingam*)
سوختگی آلترناریایی	Alternaria blight	*Alternaria* spp.
سفیدک داخلی	Downy mildew	*Peronospora parasitica*
سفیدک سطحی	Powdery mildew	*Erysiphe cruciferarum*
ریشه گرزی	Club rot	*Plasmodiophora brassicae*
زنگ سفید یا تاول سفید	White rust – White blister	*Albugo candida*

۲-۲- بیماری شانکر ساقه یا ساق سیاه کلزا

۱-۲-۲- مناطق انتشار و اهمیت بیماری

بیماری ساق سیاه یا شانکر ساقه مدت زیادی است کـه در سـبزیجات خـانواده چلیپائیـان در اروپـا و آمریکا شناخته شده است (EPPO, 2005). وجود این بیماری روی کلزا تاکنـون از کـشورهـای اسـترالیا (Bokor, 1972; Salisbury *et al*., 1995) ، کانـادا (Petrie, 1978) ، آلمـان (Kruger, 1976; Kruger, 1980; Daebeler *et al*., 1976)، فرانـسه (Alabouvette and Brunin, 1970) ، هلنـد (van Poeteren, 1932)، کنیـا (Piening *et al*., 1975)، نیوزلنـد (Neil and Brien, 1933) ، سـوئد (Ndimande,1994) و انگلـستان (McGee, 1977; West *et al*., 2001; Rawlinson and Muthyalu, 1979)گزارش شده است.

گسترش کشت کلزای پاییزه در فرانسه در سالهای ٦٥ – ١٩٦٤ موجب بروز اپیدمی بیماری ساق سیاه در سال ١٩٦٦ گردید (Gugle and Petrie, 1992). خسارت این بیماری در کشور فرانسه تا سال ٢٠٠٤ سالیانه ٢٠ – ٥ درصد میانگین عملکرد، برآورد شده است (INRA, 2004). ظهور گسترده این بیماری در مزارع کلزای استرالیا در سال ١٩٧٢ به دنبال کشت وسیع ارقام کانادایی اتفاق افتاد و خسارت به حدی بود که سطح زیر کشت کلزا در غرب استرالیا از٤٩٠٠٠ هکتار در سال ١٩٧٢ (Walker and Macleod, 1972) به ٣٢٠٠ هکتار در سال ١٩٧٣ و تنها به ٢٠٠٠ هکتار در سال ١٩٧٤ تقلیل یافت و میزان عملکرد محصول نیز از حداقل یک تن در هکتار به ١٥٩ کیلوگرم در سال ١٩٧٢ و ٣١٨ کیلوگرم در سال ١٩٧٣ کاهش پیدا کرد (Bokor *et al*., 1975). این بیماری تا سال ٢٠٠٤ در استرالیا از جمله خسارت زا ترین بیماریهای کلزا محسوب می گردید (Marcroft and Sprague, 2004).

بررسی وضعیت این بیماری در سال ۷۷ – ۱۹۷٦ در انگلستان نیز نشان داد که بیماری در شرق و جنوب شرقی این کشور گسترش داشته وخسارت قابل توجهی وارد می‌سازد و در برخی مزارع انگلستان میزان خسارت تا ۵۰ درصد برآورد شده است (MacGee, 1977).

این بیماری در سال ۱۹۷۵ از کانادا گزارش شد (Petrie, 1978) و برحسب منطقه میزان خسارت ٥٦ – ۰ درصد و به طور متوسط ٦ درصد برآورد گردید (Kharbanda *et al*., 1989; Petrie, 1985). همچنین میزان خسارت ناشی از ساق سیاه کلزا در آلمان تا ۵۰ درصد گزارش شده است (Seidel *et al*., 1984). در امریکا گسترش شدید نژاد بیماریزای ساق سیاه (PG4) ، که برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در ایالت کنتاکی مشاهده گردید موجب بروز خسارت به میزان ۷۵ تا ۹۰ درصد گردید (Hershman, 1992).

وجود این بیماری در ایران روی کلزا تاکنون از استان اردبیل (دشت مغان و نمین)، خوزستان (کشت و صنعت شهید رجایی و بهشتی دزفول)، قزوین (کشت و صنعت مگسال)، گلستان (بندر ترکمن، آق قلا، حومه گرگان، علی آباد و بندر گز)، گیلان (بندر انزلی) و مازندران (جویبار، دشت ناز و بابلسر) گزارش شده است ولی از میزان خسارت آن هنوز اطلاعی در دست نیست (افشاری آزاد و همکاران، ۱۳۸۷).

۲-۲-۲- علائم بیماری

علائم بیماری ممکن است در تمام اندام‌های هوایی گیاه دیده شود. در مرحله گیاهچه علائم بیماری نخست روی کوتیلدونها به صورت لکه‌های گرد تا نامنظم سفید تا خاکستری با نقاط سیاهرنگ فراوان که همان پیکنیدهای[1] قارچ هستند، ظاهر می‌شود. علائم روی برگها به صورت لکه‌های گرد تا بی‌شکل دیده می شود. رنگ لکه‌ها در قسمت مرکز سفید تا خاکستری و در حاشیه معمولا بنفش است. در روی لکه‌ها اغلب نقاط سیاهرنگ دیده می‌شوند که همان پیکنیدهای قارچ هستند (Buchanan, 1996).

[1] Pycnidium

. پیکنیدیوسپورهای[1] تولید شده روی کوتیلدون‌ها یا برگهای آلوده می‌توانند سبب بروز آلودگی‌های ثانوی شده و قسمت‌های پایین ساقه را آلوده ساخته و منجر به ایجاد شانکر طوقه گردند که خسارتزاترین مرحله بیماری است. اندازه شانکر ممکن است بتدریج افزایش یابد به نحوی که پوست دور تا دور گیاه تخریب شده و گیاه در نزدیکی سطح خاک شدیدا خسارت دیده، و در این صورت گیاه ورس می‌کند (افشاری آزاد، ۱۳۸۰).

۳-۲-۲- عامل بیماری

فرم جنسی: *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not.

فرم غیر جنسی: *Plenodomus lingam* (Tode: Fr.) Höhn.

مترادف: *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desm.

فرم غیر جنسی قارچ، متعلق به شبه رده قارچهای ناقص، شبه راسته اسفروپسیدال[2] بوده و در طول فصل رشد گیاه در اندام های آلوده (برگ، ساقه، طوقه و غلاف بذر) تولید پیکنید می کند. فرم جنسی آن به رده لوکولوآسکومیست[3]، راسته پلئوسپورال[4] و خانواده لپتوسفریاسه[5] تعلق دارد (صارمی و همکاران، ۱۳۸۰). در فرم جنسی این قارچ سودوتسیوم[6] تولید میکند که سودوتسیوم ها ممکن است چند هفته بعد از برداشت محصول روی بقایای گیاهی ظاهر شوند (Gladders and Musa, 1980).

٤-۲-۲- پایداری و انتشار

عامل بیماری بعد از برداشت محصول، روی بقایای کلزا در مزرعه حالت ساپروفیتی داشته و شدیدا فعال است. در شرایط نامساعد، این قارچ به صورت میسلیوم، پایدار می‌ماند و در شرایطی که رطوبت و دمای معتدل وجود داشته باشد، روی بقایای گیاه تشکیل سودوتسیوم می‌دهد که منبع اصلی پایداری قارچ

[1] Pycnidiospore
[2] Sphaeropsidales
[3] Loculoascomycetes
[4] Pleosporales
[5] Leptosphaeriaceae
[6] Pseudothecium

است (Boerema *et al*., 2004). عامل بیماری ممکن است در داخل بذر نیز پایدار بماند (McGee, 1977). طبق گزارش زنده دل و همکاران در ایران از ۱۶۰ توده بذری داخلی مورد بررسی کلزا (۱۶۰۰۰ عدد بذر)، تعداد ۱۷۶۰ جدایه قارچ بذرزاد، جداسازی گردیده است (۱۱٪ آلودگی) که تنها ۱۶ جدایه (۰/۱ ٪) را قارچ *P. lingam* تشکیل می داد (زنده‌دل و همکاران، ۱۳۸۷). اما آلودگی بذر به عنوان یک منبع آلوده‌کننده اولیه کشت کلزا، آن گونه که در کشت کلم در خزانه قبل از انتقال به مزرعه مطرح است، مهم نمی‌باشد (Petrie, 1975).

۳-۲- روش‌های مدیریت و کنترل بیماری

۱-۳-۲- مقاومت میزبان

دسترسی به لاین‌های مقاوم در چند گونه از گیاهان روغنی تیره خاجیان گزارش شده است. به نظر می‌رسد *Brassica juncea* (با فرمول ژنوم AABB) در مقابل بیماری ساق سیاه در مقایسه با *Brassica campestris* (با فرمول ژنوم AA) و *Brassica carinata* (با فرمول ژنوم BBCC) مقاومتر باشد. *Brassica napus* (با فرمول ژنوم AACC) ظاهرا در برابر بیماری حساس‌تر است (Boudart and Lacoste, 1972).

مقاومت ارقام مختلف به بیماری نیز متفاوت است به طوریکه در ارقام Novoski ، Ceska و Zollergold که از تیپ های بهاره *B. napus* می‌باشند، مقاومت گیاهچه وگیاه مسن از طریق آزمون‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در استرالیا به اثبات رسیده است (Cargeeg and Thuling, 1980).

اختلاف مقاومت به ساق سیاه در ارقام کلزا، به تولید دو ماده که یکی از این مواد به نظر می‌رسد فرآورده ناشی از تغییر فنل طبیعی در میزبان بوده و دیگری یک ماده القا شده توسط پاتوژن در میزبان بعد از آلودگی است، ارتباط داده شده است (Boudart and Lacoste, 1972).

مقایسه شکل شناسی ارقام مقاوم و حساس نیز نشان داده است که در ارقام مقاوم، متمایز شدن سریع تر آوند چوبی در ناحیه طوقه، مانع از ورود قارچ می‌گردد (Brunin, 1972).

۲-۳-۲- روش‌های زراعی

از آنجا که بقایای کلزای آلوده سال قبل، مهم‌ترین منبع آلودگی می‌باشد، کنترل بیماری از طریق روش‌های زراعی از اهمیت خاصی برخوردار است (Rempel and Hall, 1993). از بین بردن کاه و کلش آلوده باعث کاهش خطر آلودگی می‌گردد (Wherrett *et al*., 2003). شخم عمیق و زیر خاک نمودن بقایای محصول، باعث تسریع پوسیدن بقایا و در نتیجه کاهش آلودگی خواهد شد (Kharbanda and Ostashewski, 1997).

انتخاب تاریخ کشت نیز در کاهش بیماری، تاثیر زیادی دارد (McGee, 1977)، چرا که حساس‌ترین مرحله رشد نسبت به این بیماری مرحله ٦ برگی است، لذا جهت کنترل بیماری می توان تاریخ کشت را به گونه‌ای تغییر داد که زمان آزاد شدن آسکوسپورها با مرحله حساس رشد گیاه بر هم منطبق نگردد.

انتخاب محل مناسب برای کشت به منظور جلوگیری از توسعه بیماری حائز اهمیت است. بوکور و همکاران (Bokor *et al*., 1975) نشان دادند که رعایت ۵ تا ۸ کیلومتر فاصله از مزارعی که در سال قبل زیر کشت کلزا بوده‌اند، محصول جدید را به نحو رضایت بخشی عاری از بیماری نگه می‌دارد.

۳-۳-۲- کنترل شیمیایی

براون و همکاران (Brown *et al*., 1975) و باربتی (Barbetti, 1982) موفق شدند بیماری را از طریق سمپاشی اندام‌های هوایی با استفاده از قارچکش بنومیل (٥٠٦ گرم در هکتار) تا ٦ هفته پس از سبز شدن مزرعه کنترل کنند. مکنزی و ورما (Mckenzie and Verma, 1990) با استفاده از قارچکش‌های اسپورتاک و HWG1608 به صورت سمپاشی اندام‌های هوایی و آغشته‌سازی بذر قادر به کنترل بیماری ساق سیاه شدند. بالینجر و همکاران (Ballinger *et al*., 1988) از طریق آغشته‌سازی کود سوپرفسفات

با قارچکش فلوتریافول به مقدار ۲۵۰ گرم در هکتار در زمان بذرپاشی نتیجه خوبی در کنترل بیماری بدست آوردند.

۴-۲- کنترل بیولوژیک بیماری ساق سیاه کلزا

۱-٤-۲- کنترل بیولوژیکی بیماری ساق سیاه کلزا با باکتریهای آنتاگونیست

یک گونه از باکتری جنس باسیلوس یافت شده است که قادر است با تولید پروتین‌های ضد قارچی، در محیط کشت تاثیر بازدارندگی بر روی *L. maculans* نشان دهد (Yang *et al*. 1997). خاربانداو همکاران (Kharbanda *et al*., 1999) نیز اعلام کردند که سویه PKB1 باکتری *Paenibacillus polymyxa* (Syn:*Bacillus polymyxa*) قادر است با تولید پپتید ضد قارچ، رشد *L. maculans* را در محیط کشت و نیز روی برگها، ساقه، کلش و بقایای کلزا کاهش دهد. آنها همچنین نشان دادند که سویه PKB1 باکتری *P. polymyxa* به طور معنی داری جوانه زنی و طول لوله تندش حاصل از پیکنیدیوسپورهای *P. lingam* را تحت شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد و زمانی که برگ‌ها بطور هم‌زمان با سوسپانسیونی از سلول‌های سویه PKB1 و پیکنیدیوسپورهای *P. lingam* تلقیح شوند، از گسترش و توسعه بیماری ساق سیاه روی کلزا ممانعت می‌نمایند.

ژائو (Zhao, 2001) تعداد ۵۸ جدایه باکتریایی را از کمپوست و ریزوسفر محصولات مختلف، جداسازی نمود و نشان دادکه همه آن‌ها می توانند از رشد *L. maculans* در محیط کشت ممانعت نمایند. گیاهچه‌هایی که درنتیجه تلقیح با سودوموناداهای فلورسنت و *Serratia plymuthica* کلنیزه شده بودند، در مقایسه با سویه‌های *Bacillus* تاثیر بازدارندگی بیشتری روی پاتوژن داشتند.

۲-٤-۲- کنترل بیولوژیکی بیماری ساق سیاه کلزا با قارچ‌های آنتاگونیست

تواری و همکاران (Tewari *et al.*, 1997) دو گونه از قارچ های آشیانه پرنده ای تحت عناوین *Cyathus striatus* و *Cyathus olla* را به عنوان عوامل موثر در کنترل بیولوژیکی قارچ *L. maculans* معرفی نمودند. این قارچ‌ها، بقایای گیاهی میزبان *L. maculans* در مزارع کلزا را تجزیه نموده و لذا باعث کاهش میزان اینوکلوم روی کلش و بقایای کلزا شده و میزان آلودگی اولیه را کاهش می‌دهند. علاوه بر آن *C. striatus* با تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز و لیگنین، در مقایسه با *L. maculans* از توانایی بیشتری در تصرف منابع اولیه آلودگی برخوردار است (Maksymiak and Hall, 2000). علاوه بر آن ماکسیمیاک و هال (Maksymiak and Hall, 2000) حدس زدند که ترکیبات آنتی بیوتیکی که توسط گونه‌های *Cyathus* تولید می شوند نیز ممکن است برای *L. maculans* مضر باشند.

خاربانـدا و داهیـا (Kharbanda and Dahiya, 1990) مکـانیزم آنتاگونیـستی یـک سـویه از قـارچ *Penicillium verrucosum* را که یک قـارچ هـوازاد اسـت و از رشـد *Leptosphaeria maculans* و *Rhizoctonia solani* جلوگیری مـی‌کنـد، مـورد مطالعـه قـرار دادنـد. آن‌هـا یـک متابولیـت زرد رنـگ کریستالیزه، که بعدا مشخص شد که مشابهت‌هـای زیـادی بـا Citrinin دارد، را از فیلتـرات کـشت *P. verrucosum* جداسازی نمودند و آزمایشات نشان داد که این ترکیـب یـک بازدارنـده قـوی بـرای *L. maculans* و سایر قارچ‌های بیماریزا در کلزا و خانواده چلیپاییان نظیر *R. solani* و *S. sclerotiorum* می‌باشد.

در آزمایشی، بیرد و همکاران (Baird *et al.*, 1999) قارچ *L. maculans* و دیگر قارچ‌ها را از بقایای کلزایی که بطور طبیعی، آلوده به ساق سیاه بود و بیش از یک سال در خاک دفن شده بودند، جداسازی نموده و مشخص شد که طول این مدت، جمعیت گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma*

spp.) بیش از ۲۷ درصد افزایش یافته است اما ارتباط بین *L. maculans* و گونه‌های تریکودرما یا دیگر قارچ‌های وابسته به بقایای گیاهی مشخص نگردید.

مصرف یک فرآورده زیستی با نام تجاری سوپرسیویت[1] که شامل اسپورهای قارچ *Trichoderma harzianum* به میزان ۵ گرم در هرکیلو کود معدنی است، شدت لکه برگی‌های ناشی از *P. lingam* را روی کلزا در شرایط مزرعه تا ۱۰ درصد کاهش می‌دهد. (Hysek *et al.*, 2002).

[1] Supresivit®

فصل سوم

مواد و روش ها

۱-۳- جمع آوری نمونه و جداسازی عامل بیماری

۱-۳-۱- جمع آوری نمونه

به منظور جمع آوری نمونه‌های کلزای آلوده به بیماری ساق سیاه، در طول فصل پائیز سال ۱۳۸۵و بهار سال ۱۳۸٦ از مزارع کلزا در مناطق جویبار ، دزفول و قزوین، بازدید بعمل آمد. بوته‌هایی که دارای علائم تیپیک ساق سیاه نظیر لکه برگی و شانکر طوقه بودند جمع‌آوری شده و در داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲-۳-۱- جداسازی عامل بیماری

نمونه‌های کلزای آلوده به بیماری ساق سیاه پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا با آب جاری شستشو داده شدند و سپس عامل بیماری مطابق روش ناصری (Naseri, 2006) جداسازی گردید. برای این منظور بخش‌های آلوده برگ، ساقه و طوقه به قطعات کوچک یک سانتی‌متر مربعی تقسیم شدند و سپس در هیپوکلریت سدیم (NaClO) ۵٪ به مدت یک تا سه دقیقه (یک دقیقه برای بافت نرم برگ و سه دقیقه برای بافت خشبی ساقه و طوقه) ضدعفونی سطحی گردیدند. پس از آن، نمونه‌ها را سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده و پس از خشک کردن آن‌ها بر روی کاغذ صافی استریل، از مجموع نمونه‌های تهیه شده از هر اندام آلوده، تعداد سه قطعه در پتری دیش‌های نه سانتی‌متری محتوی محیط کشت PDA[1] با غلظت ۳۹ گرم در لیتر قرار داده شدند. بعد از دو تا سه روز نگهداری کشت‌ها در انکوباتور با دمای$^{\circ}$C۱±۲۵، پرگنه‌های قارچ به روش نوک ریسه (Idnurm and Howlett, 2002) بر روی محیط کشت PDA خالص سازی شدند و کشت ها جهت مطالعات بعدی در دمای $^{\circ}$C ٤ نگهداری گردیدند.

[1] Potato Dextrose Agar

۲-۳- جداسازی میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی از منطقه ریزوسفر

۱-۲-۳- جداسازی باکتری‌ها

برای جداسازی باکتری‌ها، ابتدا نمونه‌های متعددی از بوته های سالم و آلوده کلزا همراه با ریشه و خاک اطراف آن از مناطق قزوین، جویبار و دزفول جمع آوری و در داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه ابتدا خاک اضافی اطراف ریشه‌ها حذف گردید و خاک باقیمانده در ناحیه ریزوسفر (فاصله یک سانتی متری اطراف ریشه)، از بوته‌ها جداسازی گردید و عمل جداسازی باکتری‌ها طبق روش هر (Herr, 1959) انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا نمونه خاک تهیه شده را از الکی با مش ۱۰ گذرانده و سپس ۱۰ گرم از این خاک بهمراه ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در داخل یک ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری خوب بهم زده شد. از سوسپانسیون حاصل، سری رقتی از 10^{-1}تا 10^{-6}تهیه شد. رقت های 10^{-1}و10^{-2} به دلیل تراکم بالای باکتری‌ها حذف گردید و از هر کدام از رقت‌های باقیمانده، یک میلی‌لیتر به تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری استریل ریخته شد. سپس به هر تشتک ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت KB[1] که پس از استریل شدن توسط اتوکلاو، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۱۲۱، سرد شده و دمای آن به$^{\circ}C$ ۴۵ رسیده بود، اضافه گردید. سپس تشتک های پتری با ملایمت حرکت داده شدند تا سوسپانسیون خاک به طور یکنواخت با محیط کشت مخلوط شود. بعد از انعقاد محیط کشت، پتری‌دیش‌ها به انکوباتور با دمای $^{\circ}C$ ۱±۲۵ منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت که پرگنه های باکتریایی در محیط کشت ظاهر شدند، سوسپانسیون تهیه شده از اسپورهای قارچ *P. lingam* (با غلظت 10^{6}اسپور در هر میلی لیتر) توسط اسپورپاش روی محیط کشت اسپری گردید.

برای تهیه سوسپانسیون اسپور از کشت های هفت روزه قارچ عامل بیماری روی محیط کشت PDA استفاده شد. برای این منظور در داخل هر پتری‌دیش کشت قارچ فوما، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل

[1] King ' B

اضافه گردید و با یک اسکالپل استریل، سطح محیط کشت تراشیده شد تا اسپورهای تولید شده توسط قارچ از محیط کشت جدا شوند. سوسپانسیون حاصل پس از گذراندن از صافی و شمارش اسپورها توسط لام هموسیتومتر برای اسپورپاشی آماده گردید.

پس از اسپورپاشی، تشتک های پتری مجددا در انکوباتور قرار گرفتند تا بعد از۲٤ تا ٤۸ ساعت جهت مشاهده اثر آنتاگونیستی مورد بررسی قرار گیرند. در مرحله بعد تک کلونی‌های باکتریایی که هاله بازدارندگی در اطراف آن‌ها دیده می شد را با دقت توسط سوزن کشت جدا کرده و به محیط کشت NA[1] انتقال داده شدند و پس از انکوباسیون مجدد در دمای ۲۵±۱ $^{\circ}C$ برای آزمایشات بعدی در دمای ٤ $^{\circ}C$ نگهداری شدند.

۲-۲-۳- جداسازی قارچ‌ها

برای این منظور مطابق روش داوه (Davet, 1979) عمل شد. مقدار۵۰۰ گرم خاک تا عمق ۲۰ سانتی‌متری از ناحیه ریزوسفر بوته های کلزا، جدا و درون گلدان ریخته شد و با اضافه کردن آب، رطوبت کافی تامین گردید. بعد از یک هفته نگهداری گلدان‌ها در دمای اتاق، مقدار ۲۰ گرم از خاک در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به حالت تعلیق در آورده شد تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید. به سوسپانسیون فوق یک میلی‌لیتر اسید سیتریک برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و یک قطره مویان (مایع ظرفشویی) برای معلق ماندن اسپورهای قارچ اضافه گردید. از سوسپانسیون حاصل به میزان دو میلی‌لیتر به تشتک‌های پتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب آگار اتوکلاو شده که پس از سرد شدن دمای آن به ٤۵ $^{\circ}C$ رسیده بود، اضافه شد و با حرکت دادن ملایم تشتک‌های پتری روی میز، محلول خاک با آب آگار کاملا مخلوط گردید. پس از انعقاد آگار از هر تشتک، دیسک‌هایی به قطر یک سانتی‌متر با چوب پنبه سوراخ کن تهیه و در وسط محیط کشت انتخابی داوه قرار داده شدند. تشتک‌ها به مدت ٤۸ ساعت در اتوکلاو

[1] Nutrient Agar

با دمای C° ۱±۲۵ نگهداری گردیدند تا میسلیوم قارچ به خوبی رشد کند. سپس تشتک‌ها در معرض نور فلورسنت قرار داده شدند تا کنیدی‌ها تشکیل شوند، آنگاه پرگنه‌های قارچی بدست آمده به روش نوک ریسه خالص سازی و جهت مطالعات بعدی در دمای C° ٤ نگهداری شدند.

۳-۳- بررسی اثر آنتاگونیستی عوامل قارچی و باکتریایی ریزوسفر در آزمایشگاه

۱-۳-۳- بررسی و ارزیابی اثرات آنتاگونیستی عوامل باکتریایی

بررسی اثرات آنتاگونیستی عوامل باکتریایی روی قارچ *P. lingam* با استفاده از روش کشت متقابل (Michael and Nelson, 1972) صورت گرفت. برای این کار از تشتک‌های نه سانتی‌متری استفاده گردیدو محیط کشت‌های مورد استفاده در این آزمایش عبارت بودند از: PDA و SEA[1].

ابتدا باکتری‌های مورد نظر در راستای قطر تشتک پتری به صورت خطی کشت داده شدند. پس از ٢٤ ساعت نگهداری تشتک‌ها در دمای C° ۱±۲۵، دو عدد دیسک میسلیومی قارچ *P. lingam* به قطر هفت میلی‌متر در حاشیه تشتک و به فاصله ٤٠ میلی متری از خط وسط، قرار داده شدند. برای این منظور از یک چوب پنبه سوراخ کن به قطر هفت میلی متر و کشت هفت روزه قارچ بر روی محیط کشت PDA استفاده شد. تشتک فاقد باکتری به عنوان شاهد آزمایش، مورد استفاده قرار گرفت که حاوی محیط کشت و دو حلقه میسلیومی *P. lingam* بود. پتری‌ها مجددا در دمای C° ۱±۲۵ نگهداری شدند. پس از آنکه در پتری شاهد دو کلونی قارچ *P. lingam* با یکدیگر تماس پیدا کردند آنگاه در سایر تیمارها شعاع کلنی قارچ عامل بیماری و فاصله بازدارندگی حاصل از تقابل بین قارچ و باکتری اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد و داده‌های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و

[1] Soil Extract Agar