بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه گیاه‌پزشکی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی

عنوان

کاربرد باکتری‌های اندوفیت برای کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی مهم در لوبیا

(*Phaseolus vulgaris*)

Application of Endophyte Bacteria for Biological Control of Important Fungal Diseases of Bean

استاد راهنما

دکتر رضا خاک‌ور

اساتید مشاور

دکتر ناصر علی اصغرزاد

دکتر غلامرضا نیکنام

پژوهشگر

معصومه غلامی

بهمن ماه ۱۳۹۰

شماره پایان نامه:

نام خانوادگی: غلامی **نام:** معصومه

عنوان پایان نامه: کاربرد باکتری‌های اندوفیت برای کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی مهم در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)

استاد راهنما: دکتر رضا خاک‌ور

استادان مشاور: دکتر ناصر علی اصغر زاد دکتر غلامرضا نیکنام

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** مهندسی کشاورزی- گیاه‌پزشکی **گرایش:** بیماری‌شناسی

دانشگاه: تبریز **دانشکده:** کشاورزی

تاریخ فارغ التحصیلی: بهمن ۱۳۹۰ **تعداد صفحات:** ۱۵۷

کلید واژه: باکتری اندوفیت، کنترل بیولوژیک، بیماری، لوبیا

چکیده

گونه *Phaseolus vulgaris* که با نام لوبیای معمولی شناخته می‌شود به علت محتوای بالای پروتئین (۲۲ درصد از وزن دانه) به عنوان یکی از مهمترین لگوم‌ها در جهان محسوب می‌شود که مکمل غلات بوده و منبع کربوهیدرات‌هاست. لوبیا به وسیله‌ی تعدادی از قارچ‌های بیماریزای گیاهی از جمله *Sclerotium rolfsii*، عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه، *Sclerotinia sclerotiorum* عامل کپک سفید ساقه و *Colletotrichum lindemuthianum* عامل آنتراکنوز لوبیا مورد حمله قرار می‌گیرد. یکی از استراتژی‌های مدیریت این بیماری‌ها، کنترل بیولوژیکی آنها با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست است. به نظر می‌رسد باکتری‌های اندوفیت جایگزین‌های نوید بخشی برای جایگزینی با کودها و آفت‌کش‌های شیمیایی در سیستم کشاورزی ارگانیک و پایدار باشند. در تحقیق حاضر، ۱۰۳ جدایه باکتری اندوفیت از ریشه، ساقه، برگ و غلاف گیاهان سالم عدس، نخود، لوبیا و یونجه جدا شدند. اندام‌های گیاهی قبل از جداسازی باکتری‌های اندوفیت، با استفاده از اتانول و هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. آزمایشات کنترل بیولوژیکی در آزمایشگاه برای تعیین کارآیی باکتری‌های اندوفیت علیه سه قارچ *S. rolfsii*، *S. sclerotiorum* و *C. lindemuthianum* در روش کشت متقابل روی محیط PDA انجام گرفت. هشت جدایه از این باکتری‌ها که آنتاگونیست‌های قویتری بودند برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند. شناسایی این جدایه‌ها بر اساس توالی ژن 16S rDNA نشان داد که چهار جدایه از این باکتری‌ها متعلق به جنس *Streptomyces* بوده که شامل گونه‌های *Streptomyces acrimycini*، *Streptomyces cyaneofuscatus*، *Streptomyces flavofuscus* و *Streptomyces parvus* بودند و چهار جدایه متعلق به جنس *Bacillus* بود که شامل گونه‌های *Bacillus subtilis subsp. subtilis*، *Bacillus atrophaeus*، *Bacillus tequilensis* و *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* بودند. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۷ تیمار و سه تکرار در هر تیمار انجام شد. هشت جدایه *Streptomyces* و *Bacillus* شدیداً از رشد میسلیومی *C. lindemuthianum* و *S. sclerotiorum* جلوگیری کرده و هفت جدایه از آنها علیه *S. rolfsii* بسیار فعال بودند. آزمایشات گلخانه‌ای با بررسی‌های آزمایشگاهی مطابقت داشت. هشت جدایه که توانایی بازدارندگی قویتری داشتند برای فعالیت علیه این قارچ‌ها در آزمایشات گلدانی بررسی شدند. در کل تعداد ٤٤ تیمار با سه تکرار در قالب

طرح کاملاً تصادفی انجام شد. ۳۰ روز پس از مایه‌زنی گیاهان با دقت از خاک درآورده و ریشه‌ها زیر جریان آب شیر برای برداشتن ذرات خاک چسبیده به آنها شسته شدند. شدت بیماری برای آلودگی با قارچ *S. rolfsii* بر اساس مقیاس برکت و همکاران (۲۰۰۷) و برای آلودگی قارچ *S. sclerotiorum* بر اساس مقیاس برادلی و همکاران (۲۰۰٦) ارزیابی شد. برای بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی بیماری آنتراکنوز، بذور لوبیا ضدعفونی شده و سپس در گلدان‌های محتوی خاک استریل کاشته شدند. پس از گسترش برگ‌های اولیه لوبیا سوسپانسیون 10^8 cfu/ml جدایه‌های باکتریایی روی برگ‌های گیاهان اسپری شد و ٤٨ ساعت بعد، سوسپانسیون 10^6 کنیدی قارچ *C. lindemuthianum* روی برگ-های این گیاهان مایه‌زنی شد ۱۰ روز بعد گیاهان برای علائم آنتراکنوز بر اساس مقیاس درایجفوت و داویس (۱۹۸۹) بررسی شدند.

نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که هر هشت جدایه به طور قابل توجهی شدت بیماری ایجاد شده به وسیله این قارچ‌ها را کاهش دادند. شدت بیماری ایجاد شده به وسیله *S. rolfsii* به میزان ۵۰-۲۵ درصد به وسیله جدایه‌های *Streptomyces* و ۵۸/۵۰-۵۰ درصد به وسیله جدایه‌های *Bacillus* کاهش یافت. کاهش شدت بیماری ایجاد شده به وسیله‌ی *S. sclerotiorum* از ۵۳/۸۱-۳۰/۷۱ درصد در جدایه‌های *Streptomyces* و ۸٤/۷۵-٤٦/۱۸ درصد در جدایه-های *Bacillus* مشاهده شد. شدت بیماری آنتراکنوز ناشی از قارچ *C. lindemuthianum* به میزان٦۳/٤۰-٤۰ درصد در جدایه‌های *Streptomyces* و ۷٦/۸۰-٤۰ درصد در جدایه‌های *Bacillus* کاهش یافت. نتایج حاصل از این تحقیق نشانگر پتانسیل بالای باکتری‌های اندوفیت در کنترل بیماریهای گیاهی بوده، و مفید و کاربردی بودن نتایج این تحقیق را هر چه بیشتر نشان می‌دهد.

فهرست | صفحه

مقدمه ۱
اهمیت کنترل بیولوژیک ۲
فصل اول : بررسی منابع
۱-۱- بیماری‌های مهم لوبیا ٤
۱-۲- پژمردگی اسکلروشیومی یا بلایت جنوبی (*Sclerotium rolfsii*) ٥
۱-۲-۱- تاریخچه، دامنه میزبانی و انتشار ٥
۱-۲-۲- زیست شناسی ٥
۱-۳- پوسیدگی ساقه یا کپک سفید (*Sclerotinia sclerotiorum*) ٦
۱-۳-۱- تاریخچه، دامنه میزبانی و انتشار ٦
۱-۳-۲- زیست‌شناسی ۷
۱-٤- آنتراکنوز لوبیا (*Colletotrichum lindemuthianum*) ۸
۱-٤-۱- تاریخچه، دامنه میزبانی و انتشار ۸
۱-٤-۲- زیست‌شناسی ۹
۱-٥- باکتری‌های اندوفیت ۹
۱-٦- تکامل اندوفیتیسم در باکتری‌ها ۱۰
۱-۷- اکولوژی باکتری‌های اندوفیت ۱۱
۱-۸- منشاء باکتری‌های اندوفیت ۱۱
۱-۹- تجمع و ارتباطات غذایی باکتری‌های اندوفیت در گیاهان ۱٤
۱-۱۰- نحوه ورود باکتری‌های اندوفیت به درون بافت های گیاهی ۱٥
۱-۱۱- حرکت باکتری‌های اندوفیت در بافت‌های گیاهی ۱۹
۱-۱۲- حرکت سلولی باکتری در درون گیاه ۲۰
۱-۱۳- محل استقرار باکتری‌های اندوفیت ۲۱
۱-۱٤- تغییرات جمعیتی باکتری‌های اندوفیت ۲۲
۱-۱٤-۱- فاکتورهای زنده ۲۳
۱-۱٤-۱-۱- میکروارگانیزم‌های همراه با گیاه ۲۳
۱-۱٤-۱-۲- ژنوتیپ گیاه ۲٤
۱-۱٤-۲- فاکتورهای غیر زنده ۲٦
۱-۱٥- تنوع باکتری‌های اندوفیت و میزبان ۲٦
۱-۱٦- اثرات مفید باکتری‌های اندوفیت گیاهی ۳۰
۱-۱٦-۱- کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی ۳۳
۱-۱٦-۲- افزایش رشد گیاه ۳۹
۱-۱٦-۳- پاک کننده‌های زیستی ٤٤
۱-۱٦-٤- استفاده از باکتری‌های اندوفیت در مهندسی ژنتیک ٤٥
۱-۱۷- اثرات منفی باکتری‌های اندوفیت ٤٥

فصل دوم: مواد و روش‌ها
۲-۱- تهیه مواد گیاهی ٤٧
۲-۲- محیط‌های کشت مورد استفاده ٤٧
۲-۲-۱- محیط نشاسته کازئین آگار (SCA) ٤٧
۲-۲-۲- Nutrient Agar (NA) ٤٨
۲-۲-۳- محیط کشت Nutrient Broth (NB) ٤٨
۲-۲-٤- محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) ٤٨
۲-۲-٥- محیط Mathur's medium ٤٩
۲-۲-٦- محیط مورد استفاده برای آزمون هوازی بی‌هوازی ٤٩
۲-۳- جدایه‌های قارچی مورد آزمایش ٤٩
۲-٤- نگهداری جدایه‌های قارچی ٤٩
۲-٥- جداسازی باکتری‌های اندوفیت از بافت‌های گیاهی ٥٠
۲-٦- ارزیابی روش ضدعفونی سطح بافت‌های گیاهی ٥٠
۲-۷- خالص سازی باکتری‌ها ٥١
۲-۸- نگهداری باکتری‌ها ٥١
۲-۹- بررسی‌های آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی ٥١
۲-۱۰- بررسی‌های گلخانه‌ای قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی و باکتریایی ٥٢
۲- ۱۰- ۱- محل انجام آزمایش ٥٢
۲-۱۰-۲- قارچ‌های خاکزاد *S. sclerotiorum* و *S. rolfsii* ٥٢
۲-۱۰-۲-۱- تهیه مایه بیمارگر قارچ‌های خاکزاد ٥٢
۲-۱۰-۲-۲- آلوده کردن خاک گلدان‌ها به مایه بیمارگر قارچ‌های خاکزاد ٥٣
۲-۱۰-۲-۳- تهیه مایه تلقیح باکتری‌ها ٥٤
۲-۱۰-۲-٤- مایه زنی بذور با سوسپانسیون باکتری‌ها ٥٥
۲-۱۰-۲-٥- تعیین جمعیت باکتریایی روی بذور ٥٦
۲-۱۰-۳- قارچ *C. lindemuthianum* ٥٦
۲-۱۰-۳-۱- تهیه مایه تلقیح قارچ *C. lindemuthianum* ٥٦
۲-۱۰-۳-۲- آزمایشات گلخانه‌ای برای سنجش قدرت آنتاگونیستی باکتری‌ها علیه *C. lindemuthianum* ٥٧
۲-۱۱- محاسبه صفات رشدی بوته‌های مورد آزمایش ٥٨
۲-۱۲- محاسبه بیماریزایی *S. rolfsii* ٦٠
۲-۱۳- محاسبه بیماریزایی *S. sclerotiorum* ٦٠
۲-۱٤- محاسبه بیماریزایی *C. lindemuthianum* ٦١
۲-۱٥- شناسایی باکتری‌ها ٦٢
۲-۱٥-۱- تست KOH ٦٣

۲-۱۵-۲- آزمون O/F یا رشد هوازی و غیر هوازی ٦٣
۲-۱۵-۳- آزمون هیدرولیز نشاسته ٦٤
۲-۱۵-٤- آزمون کاتالاز ٦٤
۲-۱۵-۵- آزمون سیترات ٦٥
۲-۱۵-٦- استخراج DNA ژنومیک باکتریایی ٦٥
۲-۱۵-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ٦٦
۲-۱٦- انجام الکتروفورز جهت آشکارسازی باند مربوطه بر روی ژل آگارز ٦۷
۲-۱۷- طرح آزمایش و نحوه اجرا ٦۸
۲-۱۷-۱- بررسی‌های آزمایشگاهی ٦۸
۲-۱۷-۲- بررسی‌های گلخانه‌ای ٦۸
۲-۱۷-۳- محاسبات آماری ٦۹

فصل سوم: نتایج و بحث
۳-۱- جداسازی باکتری‌های اندوفیت ۷۱
۳-۲- نتیجه ارزیابی روش ضدعفونی سطح بافت‌های گیاهی ۷۱
۳-۳- شناسایی باکتری‌ها ۷۱
۳-۳-۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی ۷۱
۳-۳-۲- نتایج پی سی آر ۷۳
۳-٤- نتایج تعیین جمعیت باکتریایی روی بذور تیمار شده با باکتری‌ها ۷٤
۳-۵- نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی با قارچ‌های مورد بررسی ۷۵
۳-۵-۱- نتایج کنترل زیستی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ *S. rolfsii* ۷۵
۳-۵-۲- نتایج کنترل زیستی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ *S. sclerotiorum* ۷۹
۳-۵-۳- نتایج کنترل زیستی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ *C. Lindemuthianum* ۸۲
۳-٦- بررسی‌های گلخانه‌ای قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ‌های مورد بررسی ۸۵
۳-٦-۱- مقایسه تیمارهای باکتری‌های آنتاگونیست با شاهد سالم ۸۵
۳-٦-۲- قارچ *S. rolfsii* ۸۸
۳-٦-۲-۱- طول ریشه ۹۰
۳-٦-۲-۲- طول شاخه ۹۰
۳-٦-۲-۳- وزن تر ریشه ۹۱
۳-٦-۲-٤- وزن تر شاخه ۹۲
۳-٦-۲-۵- وزن تر برگ ۹۳
۳-٦-۲-٦- وزن خشک ریشه ۹۳
۳-٦-۲-۷- وزن خشک شاخه ۹۵

۳-٦-۲-۸- وزن خشک برگ ۹۳
۳-٦-۲-۹- حجم ریشه ۹٦
۳-٦-۲-۱۰- شاخص شدت بیماری ۹۹
۳-٦-۳- *S. sclerotiorum* ۱۰۰
۳-٦-۳-۱- طول ریشه ۱۰۱
۳-٦-۳-۲- طول شاخه ۱۰۲
۳-٦-۳-۳- وزن تر ریشه ۱۰۳
۳-٦-۳-٤- وزن تر شاخه ۱۰٤
۳-٦-۳-۵- وزن تر برگ ۱۰۵
۳-٦-۳-٦- وزن خشک ریشه ۱۰۵
۳-٦-۳-۷- وزن خشک شاخه ۱۰٦
۳-٦-۳-۸- وزن خشک برگ ۱۰۷
۳-٦-۳-۹- حجم ریشه ۱۰۸
۳-٦-۳-۱۰- شاخص شدت بیماری ۱۱۰
۳-٦-٤- *C. lindemuthianum* ۱۱۱
۳-٦-٤-۱- طول شاخه ۱۱۲
۳-٦-٤-۲- وزن تر شاخه ۱۱۳
۳-٦-٤-۳- وزن تر برگ ۱۱۳
۳-٦-٤-٤- وزن خشک شاخه ۱۱٤
۳-٦-٤-۵- وزن خشک برگ ۱۱۵
۳-٦-٤-٦- شاخص شدت بیماری ۱۱٦
۳-۷- بحث ۱۲۰
۳-۸ نتیجه‌گیری کلی ۱۳۷
۳-۹- پیشنهادات ۱٤۰
منابع ۱٤۱

جدول ۱-۱- سطح زیر کشت و میزان تولید و عملکرد لوبیای سبز و خشک در جهان و ایران..... ۲

جدول ۲-۱- مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه یک لیتر محیط کشت (SCA)..... ٤٧

جدول ۲-۲- مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه یک لیتر محیط کشت PDA..... ٤٨

جدول ۲-۳- مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Mathur□s medium..... ٤٩

جدول ۲-٤- مواد لازم و مقادیر آن‌ها برای تهیه محیط کشت جهت آزمون هوازی بی هوازی O/F..... ٤٩

جدول ۲-۵- شرح درجه‌های مختلف مقیاس جهت تعیین شدت بیماری پژمردگی اسکلروشیومی..... ٦٠

جدول ۲-٦- شرح درجه‌های مختلف مقیاس جهت تعیین شدت بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه (برادلی و همکاران ۲۰۰٦)..... ٦٠

جدول ۲-۷- شرح درجه‌های مختلف مقیاس جهت تعیین شدت بیماری آنتراکنوز لوبیا به روش درایجفوت و دیویس (۱۹۸۹)..... ٦١

جدول ۳-۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی..... ۷۲

جدول ۳-۲- جمعیت باکتری‌های مختلف روی یک گرم بذر لوبیا..... ۷۵

جدول ۳-۳- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی جدایه‌های مختلف باکتریایی در برابر قارچ *S. rolfsii*..... ۷٦

جدول ۳-٤- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی جدایه‌های مختلف باکتریایی در برابر قارچ *S. sclrotiorum*..... ۷۷

جدول ۳-۵- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی جدایه‌های مختلف باکتریایی علیه قارچ *C. lindemuthianum*..... ۸۲

جدول ۳-٦- درصد بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ‌های مختلف روی محیط PDA..... ۸۵

جدول ۳-۷- تجزیه واریانس صفات مورد اندازه گیری در ۹ تیمار مورد مطالعه (۸ جدایه آنتاگونیست باکتریایی و شاهد سالم) در تیمار بذر لوبیا..... ۸٦

جدول ۳-۸- تجزیه واریانس صفات مورد اندازه گیری در ۹ تیمار مورد مطالعه (۸ جدایه آنتاگونیست باکتریایی و شاهد سالم) در مایه‌زنی برگ گیاهان لوبیا..... ۸۷

جدول ۳-۹- تجزیه واریانس صفات مورد اندازه گیری در آزمایش اثر جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی علیه قارچ *S. rolfsii*..... ۸۹

جدول ۳-۱۰- تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری قارچ *S. rolfsii* با تیمارهای مختلف باکتریایی.....۹۹

جدول ۳-۱۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی بین جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum*.....۱۰۱

جدول ۳-۱۲- تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری با قارچ *S. sclerotiorum* با تیمارهای مختلف باکتریایی.....۱۱۰

جدول ۳-۱۳- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی بین جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی و قارچ *C. lindemuthianum*.....۱۱۱

جدول ۳-۱٤- تجزیه واریانس شاخص شدت آلودگی قارچ *C. lindemuthianum* با تیمارهای مختلف باکتریایی.....۱۱٦

جدول ۳-۱۵- شاخص شدت بیماری تیمارهای مختلف باکتریایی با قارچ‌های مختلف.....۱۱۹

جدول ۳-۱٦- درصد کاهش شدت بیماری تیمارهای مختلف باکتریایی با قارچ‌های مختلف.....۱۱۹

شکل۱-۱- اثر باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 روی میسلیوم قارچ *C. lagenarium* ۳۳

شکل۱-۲- اثر باکتری اندوفیت *Phyllobacterium* sp. روی میسلیوم *S. sclerotiorum* ۳۳

شکل ۲-۱- تهیه مایه تلقیح قارچ‌های *S. sclerotiorum* و *S. rolfsii* جهت کنترل بیولوژیک ۵۳

شکل ۲-۲- تهیه مایه تلقیح قارچ‌های *S. sclerotiorum* و *S. rolfsii* جهت مخلوط کردن با خاک گلدان-ها ۵٤

شکل ۲-۳- قرار دادن گلدان‌های آلوده شده با قارچ‌های خاکزاد در شرایط گلخانه به مدت ۱۰ روز ۵٤

شکل ۲-٤- الف) کشت باکتری‌ها در محیط مایع NB و قرار دادن در شیکر انکوباتور ۵۵

شکل ۲-۵- تهیه سوسپانسیون 10^8 cfu/ml باکتری‌ها و فرو بردن بذور داخل سوسپانسیون ۵٦

شکل ۲- ٦- تهیه رقت‌های $10^{-٤}$، $10^{-٥}$، $10^{-٦}$ و $10^{-٧}$ (از چپ به راست) و کشت روی محیط NA ۵٦

شکل ۲-۷- مرحله گسترش برگ‌های اولیه لوبیا جهت مایه زنی با قارچ *C. lindemuthianum* ۵۷

شکل ۲-۸- پوشاندن گیاهان با کیسه‌های نایلونی شفاف پس از مایه زنی با قارچ *C. lindemuthianum* ۵۸

شکل ۲-۹- محاسبه وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ بوته‌ها ۵۹

شکل ۲-۱۰- (الف) اندازه‌گیری طول ریشه، (ب) اندازه‌گیری حجم ریشه ۵۹

شکل ۲-۱۱- کشت باکتری‌ها روی محیط Yeast malt extract agar ٦۲

شکل ۲-۱۲- کشت باکتری‌ها جهت تعیین آزمون هوازی بی‌هوازی ٦۳

شکل ۲-۱۳- کشت باکتری‌ها روی محیط NA به همراه نشاسته جهت تعیین آزمون هیدرولیز نشاسته ٦٤

شکل ۲-۱٤- کشت باکتری‌ها روی محیط NA جهت تعیین آزمون کاتالاز ٦٤

شکل ۲-۱۵- کشت باکتری‌ها روی محیط Simmons Citrate Agar جهت تعیین آزمون سیترات..... ٦٥

شکل ۳-۱- الکتروفرز در ژل آگارز ۱ ٪ قطعات دی ان ای افزایش یافته در پی سی آر با آغازگر های /ACT235f ACT878r..... ۷۳

شکل ۳-۲- الکتروفرز در ژل آگارز ۱ ٪ قطعات دی ان ای افزایش یافته در پی سی آر با آغازگر 1 -16s /24f و 2 -16s /1525r..... ۷٤

شکل ۳-۳- میانگین درصد بازدارندگی رشد قارچ *S. rolfsii* توسط جدایه‌های مختلف باکتریایی..... ۷٦

شکل ۳-٤- کشت متقابل قارچ *S. rolfsii* با جدایه‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنتاگونیستی..... ۷۷

ادامه شکل ۳-٤- کشت متقابل قارچ *S. rolfsii* با جدایه‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنتاگونیستی..... ۷۸

شکل ۳-۵- میانگین درصد بازدارندگی رشد قارچ *S. sclerotiorum* توسط جدایه‌های مختلف باکتریایی..... ۷۹

شکل ۳-٦- کشت متقابل قارچ *S. sclerotiorum* با جدایه‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنتاگونیستی..... ۸۰

ادامه شکل ۳-٦- کشت متقابل قارچ *S. sclerotiorum* با جدایه‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنتاگونیستی..... ۸۱

شکل ۳-۷- میانگین درصد بازدارندگی رشد قارچ *C. lindemuthianum* توسط جدایه‌های مختلف باکتریایی..... ۸۲

شکل ۳-۸- کشت متقابل قارچ *C. lindemuthianum* با جدایه‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنتاگونیستی..... ۸۳

ادامه شکل ۳-۸- کشت متقابل قارچ *C. lindemuthianum* با جدایه‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنتاگونیستی..... ۸٤

شکل۳-۹- تیمار بذور لوبیا با جدایه‌های باکتری‌های اندوفیت (از چپ به راست گیاه سالم، *B. subtilis* sub sp. *spizizenii*، *B. subtilis* sub sp. *subtilis*، *B. atrophaeus* و *B. tequilensis*)..... ۸۶

شکل ۳-۱۰- تیمار بذور لوبیا با جدایه‌های باکتری‌های اندوفیت (از چپ به راست *S. cyaneofuscatus*، *S. flavofuscus*، *S. acrimycini* و *S. parvus*)..... ۸۷

شکل۳-۱۱- تیمار برگ گیاهان لوبیا با جدایه‌های باکتری‌های اندوفیت (از چپ به راست *B. subtilis* subsp. *spizizenii*، *B. subtilis* subsp. *subtilis*، *B. atrophaeus*، *B. tequilensis* و گیاه سالم)..... ۸۸

شکل ۳-۱۲- تیمار برگ گیاهان لوبیا با جدایه¬های باکتری¬های اندوفیت (از چپ به راست *S. cyaneofuscatus*، *S. flavofuscus*، *S. parvus*، *S. acrimycini* و گیاه سالم)..... ۸۸

شکل ۳-۱۳- (الف) پیچیدگی شدید هیپوکوتیل و انهدام کامل ریشه‌ها در اثر آلودگی به *S. rolfsii*، (ب) رشد میسلیوم سفید رنگ روی طوقه و غلاف‌های گیاه لوبیا..... ۸۹

شکل ۳-۱٤- متوسط طول ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۰

شکل ۳-۱۵- متوسط طول شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۱

شکل ۳-۱٦- متوسط وزن تر ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۲

شکل ۳-۱۷- متوسط وزن تر شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۲

شکل ۳-۱۸- متوسط وزن تر برگ در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۳

شکل ۳-۱۹- متوسط وزن خشک ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹٤

شکل ۳-۲۰- متوسط وزن خشک شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۵

شکل ۳-۲۱- متوسط وزن خشک برگ در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۵

شکل ۳-۲۲- متوسط حجم ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. rolfsii*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۹۶

شکل ۳-۲۳- مقایسه رشد ریشه در تیمارهای شاهد سالم، گیاهان تیمار شده با قارچ *S rolfsii* و باکتری‌های *S. flavofuscus*، *S. cyaneofuscatus*، *S. acrimycini*، شاهد بیمار (از چپ به راست)..... ۹۷

شکل۳-۲٤- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ *S. rolfsii* و باکتری‌های *S. cyaneofuscatus*، *S. flavofuscus*، *S. acrimycini*، شاهد سالم و شاهد بیمار (از چپ به راست)..... ۹۷

شکل ۳-۲۵- مقایسه رشد ریشه در تیمارهای شاهد سالم، گیاهان تیمار شده با قارچ *S. rolfsii* و باکتریهای *B. subtilis* subsp. *subtilis*، *Bacillus atrophaeus*، *B. tequilensis*، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* و شاهد بیمار (از راست به چپ)..... ۹۸

شکل۳-۲٦- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ S. rolfsii و باکتری‌های *B. subtilis* subsp. *subtilis*، *Bacillus atrophaeus*، *B. tequilensis*، *B. subtilis* subsp. *spizizenii*، شاهد سالم و شاهد بیمار (از راست به چپ)..... ۹۸

شکل ۳-۲۷- مقایسه میانگین امتیاز شدت بیماری تیمارهای مختلف باکتریایی با قارچ *S. rolfsii*..... ۹۹

شکل۳-۲۸- ایجاد لکه قهوه‌ای در بن ساقه و رشد پوشش سفید پنبه‌ای قارچ *S. sclerotiorum*..... ۱۰۰

شکل ۳-۲۹- متوسط طول ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۲

شکل ۳-۳۰- متوسط طول شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۳

شکل ۳-۳۱- متوسط وزن تر ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰٤

شکل ۳-۳۲- متوسط وزن تر شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰٤

شکل ۳-۳۳- متوسط وزن تر برگ در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۵

شکل ۳-۳٤- متوسط وزن خشک ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰٦

شکل ۳-۳۵- متوسط وزن خشک شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۷

شکل ۳-۳٦- متوسط وزن خشک برگ در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۸

شکل ۳-۳۷- متوسط حجم ریشه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *S. sclerotiorum* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۸

شکل۳-۳۸- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ *S. sclerotiorum* و باکتری‌های *B. subtilis* subsp. *subtilis*، *B. tequilensis*، *Bacillus atrophaeus*، *B. subtilis* subsp. *spizizenii* شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۰۹

شکل۳-۳۹- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ *S. sclerotiorum* و باکتری‌های *S. cyaneofuscatus*، *S. flavofuscus*، *S. acrimycini*، *S. parvus* شاهد سالم و شاهد بیمار (از چپ به راست)..... ۱۰۸

شکل ۳-٤۰- مقایسه میانگین امتیاز شدت بیماری در تیمارهای مختلف باکتریایی با قارچ *S. sclerotiorum*..... ۱۱۰

شکل ۳-٤۱- تشکیل لکه‌های کشیده در حاشیه رگبرگ‌ها در سطح رویی و زیرین برگ‌های لوبیا در شاهد بیمار..... ۱۱۱

شکل ۳-۴۲- متوسط طول شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *C.lindemuthianum*، شاهد سالم و شاهد بیمار ۱۱۲

شکل ۳-۴۳- متوسط وزن تر شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *C.lindemuthianum*، شاهد سالم و شاهد بیمار ۱۱۳

شکل ۳-۴۴- متوسط وزن تر برگ در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *C.lindemuthianum*، شاهد سالم و شاهد بیمار ۱۱۴

شکل ۳-۴۵- متوسط وزن خشک شاخه در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *C.lindemuthianum*، شاهد سالم و شاهد بیمار ۱۱۴

شکل ۳-۴۶- متوسط وزن خشک برگ در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *C.lindemuthianum*، شاهد سالم و شاهد بیمار..... ۱۱۵

شکل ۳-۴۷- مقایسه میانگین امتیاز شدت بیماری در تیمارهای مختلف باکتریایی و قارچ *C.lindemuthianum*، شاهد سالم و شاهد بیمار ۱۱۶

شکل ۳-۴۸- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ *C. lindemuthianum* و باکتری‌های آنتاگونیست..... ۱۱۷

ادامه شکل ۳-۴۸- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ *C. lindemuthianum* و باکتری‌های آنتاگونیست..... ۱۱۸

مقدمه

زراعت یکی از ارکان اساسی تأمین زندگی انسانها در روی کره زمین است. با کشت گیاهان زراعتی انسان قادر می‌گردد انواع مواد غذایی مورد نیاز خود از جمله نشاسته، پروتئین، چربی‌های گیاهی و ویتامین‌ها را تهیه نماید. بیش از ۸۰۰ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه، به دلیل نداشتن منابع کشاورزی یا قدرت خرید، نمی‌توانند غذای کافی به دست آورند. فقر و گرسنگی در بسیاری از مناطق و کشورها خطرناک و جدی است. مطالعات نشان می‌دهد که ترکیب مناسبی از پروتئین حبوبات و غلات می‌تواند سوء تغذیه و کمبود اسیدهای آمینه را برطرف سازد (ترابی جفرودی و همکاران، ۱۳۸٤).

حبوبات دانه‌های خوراکی هستند که به خانواده بقولات (*Fabaceae*) تعلق دارند. بذور رسیده و خشک حبوبات دارای ارزش غذایی زیاد و قابلیت نگهداری خوبی هستند و یکی از مهمترین منابع سرشار از پروتئین می‌باشند. استفاده از پروتئین‌های گیاهی از جمله حبوبات و به خصوص لوبیا که دارای مقدار زیادی پروتئین بوده و گونه‌های مختلف آن از ۲۰ تا ۵۰ درصد پروتئین دارند می‌تواند اثرات سوء تغذیه ناشی از کمبود پروتئین را تا حدودی از بین برد. همچنین حبوبات با داشتن ٥٦-۵۰ درصد کربوهیدرات و غنی بودن از کلسیم نقش مهمی در تغذیه انسان دارند و به خاطر وجود باکتری-های تثبیت کننده ازت در ریشه و افزودن مقدار زیادی ازت به خاک، در حاصلخیزی زمین زراعی نیز مؤثرند، و با توجه به توانایی تثبیت ازت، قرار دادن آنها در تناوب، به پایداری سیستم‌های زراعی کمک می‌کند (واعظی راد و همکاران، ۱۳۸٦).

لوبیا مهمترین عضو خانواده بقولات به شمار می‌آید و یکی از انواع لوبیا، لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) است که گونه‌ای از محصولات کشاورزی مهم به ویژه در مناطق استوایی و نیمه استوایی کشورهای در حال توسعه است (سوزا و همکاران، ۲۰۱۰). لوبیا متعلق به زیر قبیله *Phaseolinae*، قبیله *Phaseoleae* و زیر خانواده *Papilionoidae* و خانواده *Leguminosae* است (ایسلی و پلهیل، ۱۹۸۰). و به خاطر درصد بالای پروتئین و سایر خصوصیات مطلوب زراعی، بیشترین سطح زیر کشت را در بین حبوبات به خود اختصاص داده است. از نظر سطح زیر کشت جهانی مقام اول را در بین حبوبات داشته (کوچکی و بنایان، ۱۳٦۸) و در عین حال هفتمین محصول عمده غذایی جهان می‌باشد (سمیعی، ۱۳۷۹، باقری و همکاران، ۱۳۸۰). بر اساس گزارش سازمان خوار و بار جهانی

سطح زیر کشت و میزان تولید و عملکرد متوسط لوبیای سبز و خشک سال ۲۰۱۰ در جدول ۱-۱ آورده شده است.

جدول ۱-۱: سطح زیر کشت و میزان تولید و عملکرد لوبیای سبز و خشک در جهان و ایران

انواع لوبیا	سطح زیر کشت جهان (هکتار)	تولید درجهان (تن)	عملکرد در جهان (کیلوگرم در هکتار)	سطح زیر کشت ایران (هکتار)	تولید درایران (تن)	عملکرد در ایران (کیلوگرم در هکتار)	سال
لوبیای خشک	۲۹۸۸۱۷۲۱	۲۳۲۲۹۲۲٤	۷۷۷٤	۹۰۸٤٤	۱۹٤۱۱۱	۲۱۳٦۸	۲۰۰۹
لوبیای سبز	۱٤۷۸۳۰۱	۱۷٦٦۲۰۲۸	۱۱۹٤۷٥	٤۹۰۰	٤۲۱۰۰	۸٥۹۱۸	۲۰۰۹

اهمیت کنترل بیولوژیک

بیماریهای گیاهی عامل محدود کننده کاشت یک گیاه در یک منطقه و یا یک کشور بوده و تمام گیاهان یک گونه را که به بیماری بخصوصی حساس هستند، می‌توانند نابود کند. قارچکش‌های شیمیایی به طور وسیعی در کشاورزی امروزی استفاده می‌شوند. عمده‌ترین معضلات ناشی از مصرف سموم کشاورزی بر جای ماندن بقایای سموم در محصولات کشاورزی و فرآورده‌های آنها، ایجاد مقاومت به قارچکش‌ها، آلودگی منابع طبیعی همچون هوا، آب و خاک، پخش ناخواسته سموم و ایجاد آلودگی در مناطق مسکونی، عوارض جانبی و زیست محیطی، سرطانزا بودن سموم و انباشتگی آنها در بدن موجودات زنده است. علاوه بر این از جنبه اقتصادی سالانه در کشور مبالغ زیادی صرف واردات سموم، توزیع آن‌ها و سمپاشی می‌شود. روش کنترل بیولوژیک می‌تواند در تلفیق با دیگر روش‌های کنترل برای کاهش مصرف سموم مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از استراتژی کنترل بیولوژیکی، میکروارگانیسم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و یا آنزیم‌های تجزیه کننده‌ای که تولید می‌کنند می‌توانند به طور مستقیم بر علیه بیماری‌های گیاهی گوناگون به کار روند (زاکالیوکینا و زنوا، ۲۰۰۷). بسیاری از باکتری‌های اندوفیت دارای خاصیت بازدارندگی علیه قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزای گیاهی هستند. گزارشات نشانگر این است که اغلب گونه‌های اندوفیت توانایی بسیار بالایی برای کنترل

بیمارگرهای گیاهی دارند. فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های اندوفیت با قارچ‌های پاتوژن به طور معمول مربوط به تولید ترکیبات ضد قارچی و آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشد (پراپاگدی و همکاران، ۲۰۰۸b). بر خلاف سموم شیمیایی، موادی که به صورت میکروبیولوژیکی از گونه‌های موثر گرفته شده‌اند سمیت کمتر داشته، به راحتی قابل تجزیه بوده، و آلرژی‌زایی کمی دارند. این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی‌شوند و نیز برای مصرف در مقیاس صنعتی ارزان و مناسب می‌باشند (زاکالیوکینا و زنوا، ۲۰۰۷). تهیه فرآورده‌های بیولوژیک متشکل از آنتاگونیست‌ها و بررسی آنها در کنترل عوامل بیماریزای قارچی، باکتریایی، نماتدی و کاربردی نمودن این فرآورده‌های بیولژیکی در مدیریت عملی بیماری‌های گیاهی از مسائلی هستند که باید مورد توجه قرارگیرند. لذا هدف از این پژوهش بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اندوفیت علیه قارچ‌های مهم بیمارگر لوبیا در ایران از جمله *Sclerotioum rolfsii* Sacc.، *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary و *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner می‌باشد.

۱-۱- بیماری‌های مهم لوبیا

در سرتاسر جهان قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در کشت گیاهانی که از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند مشکلات جدی اعم از آسیب به بافت‌های گیاهی و کاهش قابل توجه بسیاری از محصولات کشاورزی را ایجاد می‌کنند. در بسیاری اوقات آسیب ایجاد شده به وسیله این قارچ‌ها که به صنایع غذایی و کشاورزی خسارت وارد می‌کنند بیشتر از آسیب باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی است (پراپاگدی و همکاران، ۲۰۰۸b). بیماری‌های زیادی در نقاط مختلف دنیا بسته به شرایط اقلیمی، لوبیا را مورد تهدید قرار می‌دهند و باعث وارد آمدن خسارات سنگین اقتصادی می‌گردند.

بیماری‌های مهم قارچی

نام بیماری	عامل بیماری
بیماری ریزوکتونیایی حبوبات	*Rizoctonia solani* Kuhn
پوسیدگی خشک ریشه حبوبات	*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* Burk
زنگ لوبیا و باقلا	*Uromyces appendiculatus* Strauss
پوسیدگی زغالی	*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.
پژمردگی اسکلروشیومی	*Sclerotium rolfsii*
آنتراکنوز لوبیا	*Colletotrichum lindemuthianum*
پوسیدگی ساقه یا کپک سفید	*Sclerotinia sclerotiorum*

بیماریهای مهم باکتریایی

سوختگی معمولی لوبیا	*Xanthomonas compestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye
سوختگی هاله‌ای لوبیا	*Pseudomonas syringe* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Young, Dye & Wilkie

بیماریهای مهم ویروسی

ویروس موزاییک زرد لوبیا	Bean yellow mosaic virus
ویروس موزاییک عمومی لوبیا	Bean common mosaic virus