دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره سوم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

گزارش کوتاه علمی

بررسی بیوکنترل عامل بوته میری گوجه‌فرنگی (*Rhizoctonia solani* Kuhn) توسط *Bacillus subtilis*

***میرمعصوم عراقی[۱]، کامران رهنما[۲] و میثم تقی‌نسب[۳]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳]مربی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۸

چکیده

در این پژوهش اثرات آنتاگونیستی جدایه‌هایی از باکتری *Bacillus subtilis* علیه قارچ عامل بوته میری گوجه‌فرنگی (*Rhizoctonia solani*) تحت شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. جدایه B4 با ۵۰/۳ و جدایه B18 با ۵۸/۶ به‌ترتیب بیشترین درصد بازدارندگی را در آزمون تأثیر مواد فرار و غیرفرار داشتند. از بین ۲۵ جدایه اثر آنتاگونیستی، شش جدایه تحت شرایط گلخانه‌ای و به دو صورت آغشته‌سازی خاک و آغشته‌سازی ریشه و طوقه گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. تعامل بین جدایه‌های باکتری و قارچ عامل بیماری به‌صورت درصد افزایش طول گیاه، درصد افزایش وزن خشک گیاه و درصد گیاهان بیمار نشان داده شد. نتایج آزمون نشان داد که جدایه‌های مزبور اثرات آنتاگونیستی متفاوتی دارند. در شرایط گلخانه‌ای جدایه B2 در هر دو روش آغشته‌سازی بهتر از بقیه جدایه‌ها عمل کرد و باعث کاهش معنی‌دار در میزان بیماری و افزایش معنی‌دار در فاکتورهای رشدی مورد بررسی در این آزمون گردید.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، بیوکنترل، *Bacillus subtilis*، *Rhizoctonia solani*

* مسئول مکاتبه: iraqi602@yahoo.com

مقدمه

قارچ *Rhizoctonia solani* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زی است که باعث مرگ گیاهچه بسیاری از محصولات مهم زراعی مانند برنج، لوبیا، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی می‌شود (جونز و همکاران، ١٩٩٣). یکی از مهم‌ترین گونه‌های جنس باسیلوس (از نظر بیوکنترل)، *B.subtilis* می‌باشد و تاکنون به روش‌های مختلف نظیر آغشته کردن بذر، فرو بردن گیاه در سوسپانسیون باکتری و مخلوط کردن با خاک علیه بسیاری از بیمارگرهای خاک‌زی به‌کار رفته است. در این تحقیق سعی شده است تا به بررسی اثرات مختلف آنتاگونیستی جدایه‌های مختلف باکتری *B.subtilis* علیه قارچ *R.solani* (عامل بوته میری گوجه‌فرنگی) در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

در انجام این پژوهش از جدایه IR-4 که از ناحیه طوقه بوته‌های گوجه‌فرنگی بیمار مزارع اطراف گرگان جداسازی و شناسایی شده بود (اسنه و همکاران، ١٩٩١)، استفاده شد. برای انجام اثبات بیماری‌زایی از روش مایه‌زنی در خاک به روش آساکا و شودا (١٩٩٦) استفاده گردید. ٢٥ جدایه باکتری *B.subtilis* براساس شاد و همکاران (٢٠٠١) از ناحیه فرا ریشه و خاک مزرعه جداسازی و شناسایی شدند. برای بررسی اثرات آنتاگونیستی، ابتدا براساس روش کیل و دفاگو (١٩٩٧) باکتری‌ها به‌صورت خطی روی محیط کشت مالت آگار به فاصله تقریبی ٠/٥ سانتی‌متر از لبه تشتک کشت داده شد. ١٢ ساعت بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ عامل بیماری در وسط تشتک پتری قرار داده شد. پتری‌ها به‌مدت ٥ تا ٧ روز در دمای ٢٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی به‌عنوان واکنش مثبت بازداری محسوب شد.

بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضدقارچی مطابق روش فدامین و روزال (١٩٩٤) انجام گرفت. در مرحله اول از PDA جهت کشت باکتری استفاده گردید. در مرحله دوم پس از کشت حلقه‌ای از قارچ عامل بیماری در مرکز پتری حاوی PDA، تشتک‌های پتری حاوی قارچ و باکتری روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود و به‌مدت ٤ روز در دمای ١±٢٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای بررسی تولید مواد بازدارنده رشدی مطابق روش تقی‌نسب و همکاران (٢٠٠٧) عمل شد. مقدار ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی و آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد به محیط

PDA اضافه و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط پخش شد. سپس برای مدت ۳ روز در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از سه روز، با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شده و پتری‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. آنگاه یک قرص به قطر ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت ٦ روزه قارچ با رعایت شرایط سترون در وسط پتری کشت داده شد. تشتک‌ها در دمای ۱±۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

انجام آزمون گلخانه‌ای: در انجام این آزمون از سوسپانسیون باکتریایی 5×10^{9} سلول در میلی‌لیتر، شش جدایه از بین ۲۵ جدایه باکتری و به دو روش آغشته‌سازی ریشه نشاءها در هنگام کاشت و آغشته‌سازی خاک هم‌زمان با اضافه نمودن قارچ عامل بیماری به خاک استفاده گردید. در روش اول پس از ایجاد چند زخم کوچک در ریشه و نزدیک طوقه به‌وسیله چاقوی جراحی استریل، ریشه و طوقه نشاءها به‌مدت یک دقیقه در داخل سوسپانسیون باکتری نگهداری شدند (مونتالگره و همکاران، ۲۰۰۳). در نهایت پس از گذشت یک دوره ١٤ روزه پس از کاشت نشاءها، تعامل بین جدایه‌های باکتری و قارچ عامل بیماری به‌صورت تعیین درصد افزایش طول گیاه، درصد افزایش وزن خشک گیاه و درصد گیاهان بیمار شده به‌دست آمد. برای تهیه مایه تلقیح قارچ نیز از روش آساکا و شودا (١٩٩٦) استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که جدایه‌های مختلف باسیلوس از طریق ترشح مواد بازدارنده رشدی باعث ایجاد تغییر شکل، تورم و قطعه‌قطعه شدن ریسه قارچ عامل بیماری می‌شوند. نتایج آماری نشان داد که جدایه‌های باکتری از نظر اثرات آنتاگونیستی علیه عامل بیماری دارای اختلاف معنی‌دار آماری هستند. همچنین جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نیز در مقایسه با یکدیگر متفاوت عمل نمودند. در آزمون کشت دو طرفه، جدایه B18 و B10 به‌ترتیب با ٥٢/٢ و ٤٦/٤ درصد بیشترین درصد بازدارندگی را داشتند. در آزمون اثر ترکیبات غیرفرار جدایه B18 با ٥٨/٦ درصد بهتر از بقیه جدایه‌ها عمل نمود ولی در آزمون بررسی تأثیر مواد فرار، این جدایه B4 بود که با ٥٠/٣ درصد بیشترین درصد بازدارندگی را باعث شد و این در حالی است که جدایه‌های B13 و B18 کمترین درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری را در این آزمون داشتند.

در شرایط گلخانه‌ای شرایط تا حدودی متفاوت از آزمون آزمایشگاهی بود. جدایه B2 که در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با ۵ جدایه دیگر متوسط عمل کرده بود در هر دو روش آغشته‌سازی به خاک و ریشه گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه‌ای بهتر از جدایه‌های دیگر عمل کرد. نتایج نشان داد که جدایه B2 نه تنها باعث کاهش معنی‌داری در بیماری شد بلکه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش رشد گیاهچه‌ها (فاکتورهای رشدی شامل طول گیاه و افزایش وزن خشک گیاه پس از ١٤ روز از انتقال نشاءها در گلدان‌ها) گردید. همچنین نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که تمام جدایه‌های باکتری در روش آغشته‌سازی در خاک بهتر از روش آغشته‌سازی ریشه و طوقه گیاهچه‌ها عمل کردند.

منابع

1.Asaka, O., and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* Rb14. Appl. Environ. Microbiol. 62: 11. 4081-4085.

2.Fiddaman, P.J., and Rossal, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 76: 395-405.

3.Jones J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. 1993. Compendium of Tomato Diseases. APS Press, 73p.

4.Keel, C., and Defago, G. 1997. Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanism and ecological impact, P 27-46. In: Gange, A.C., and Brown, V. (eds). Multitrophic interaction in terrestrial systems, Black Well Scientific Publishers, London, UK.

5.Montealegre, J.R., Reyes, R., Perez, L.M., Herrera, R., Silva, P., and Besoain, X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Elect. J. of Biotechnol. 6: 2. 115-127.

6.Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chum, W. 2001. Laboratory guide for Identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, 379p.

7.Sneh, B., Lee, B., and Akira, O. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The APS. St. Paul, Minnesota, USA, 129p.

8.Taghinasab, M., Ruhani, H., and Karimi, E. 2007. Evaluation of antagonistic activity of *Bacillus subtilis* isolates on *Pythium ultimum* causal agent of cucumber damping-off. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 14:1. 83-92.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(3), 2009
www.gau.ac.ir/journals

A survey on biocontrol of *Rhizoctonia solani* Kuhn damping-off of tomato with *Bacillus subtilis*

***M.M. Iraqi[1], K. Rahnama[2] and M. Taghinasab[3]**

[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Instructor, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

In this research, the antagonistic effects of *Bacillus subtilis* isolates against the causal agent of tomato damping-off, *Rhizoctonia solani* were surveyed under laboratory and greenhouse conditions. Isolates B4 and B18 showed the most inhibition ratio in the volatile and non-volatile metabolites tests which were 50.3% and 58.6% respectively. The six out of 25 isolates studied more and their antagonistic effects were surveyed under greenhouse conditions as inoculated into soil and covered on root and crown of seedlings. Interaction among the bacterial isolates and the fungus was calculated as percent of increasing of seedling length, percent of increasing of seedling dry weight and percent of decreasing of diseased plants. The results showed that bacterial isolates have different antagonistic effects. In the greenhouse tests, both methods, B2 isolate was the best at significant decreasing of disease rate and at significant increasing of considered growth factors in this test.

Keywords: Tomato, Biocontrol, *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*

* Corresponding Author; Email: iraqi602@yahoo.com