مهار زیستی بیماری پاخوره گندم با جدایه‌های بومی استان فارس *Pseudomonas fluorescens* و *Trichoderma harzianum*

آذین آریان‌پور[۱]، مهدی صدروی[۱*] و سیدمحسن تقوی[۲]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج.

۲- استاد بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

*مسئول مکاتبه: msadravi@yu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۳

چکیده

پاخوره ناشی از *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* از بیماری‌های مهم گندم در استان فارس است. پنج جدایه بیمارگر از بوته‌های بیمار گندم این استان جداسازی شدند و درجه پرآزاری آن‌ها روی رقم الوند آزمایش شد. برای یافتن روش مهارزیستی بیماری، ابتدا توانایی بازدارندگی از رشد پرگنه جدایه‌های بیمارگر توسط جدایه‌های بومی باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *T. virens* در کشت متقابل در شرایط آزمایشگاهی آزموده شد. سپس تاثیر مایه‌زنی سه جدایه برتر باکتری و دو جدایه *T. harzianum* به دو روش تیمار بذر و خاک در مهار بیماری ناشی از جدایه پرآزارتر بیمارگر در شرایط گلخانه آزمایش شد. در آزمون کشت متقابل، همه ریزسازواره‌ها توانایی بازدارندگی معنی‌دار از رشد پرگنه جدایه‌های بیمارگر را نشان دادند. در شرایط گلخانه نیز جدایه‌های باکتری با هر دو روش مایه‌زنی و جدایه‌های *T. harzianum* به روش تیمار بذر بیشترین تاثیر را در کاهش بیماری داشتند، بنابراین امکان کاربرد آن‌ها برای مهار زیستی این بیماری وجود دارد. توانایی جدایه‌های بومی استان فارس این باکتری و قارچ در مهارزیستی بیماری پاخوره گندم برای نخستین بار گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پاخوره، گندم، فارس.

مقدمه

بیماری پاخوره[۱] ناشی از قارچ خاک‌زی *Gaeumanomyces graminis* (Sacc.) Arex & D.L.Olivier var. *tritici* Walker از بیماری‌های مهم گندم در بیشتر مناطق کشت این گیاه در دنیا است، که موجب پوسیدگی و سیاه‌شده‌گی ریشه و طوقه و خشکیدگی بوته‌ها می‌شود (ویز ۱۹۸۷). این بیماری در ایران در استان‌های فارس، تهران، زنجان، مرکزی، کردستان و آذربایجان‌غربی شایع است (زارع و فصیحیانی ۱۳۸۸، ریحانی‌تبار و همکاران ۱۳۸۲، ژولیده و همکاران ۱۳۹۱، قلندر و همکاران۳۸۵، بهرامی‌کمانگر و همکاران ۱۳۸۵، روانلو ۱۳۸۵).

پدیده مهار زیستی[۲] طبیعی اولین بار برای این بیماری در خاک بعضی مزارع استرالیا شناخته شد. در این خاک‌ها شدت بیماری در سال دوم و سوم کشت گندم افزایش پیدا کرد، اما از سال چهارم به بعد کاهش یافته و به حد قابل تحمل رسید. کاهش بیماری در این نوع خاک‌ها را زوال پاخوره[۳] و این خاک‌ها بازدارنده[۴] نامیده شدند. سپس آشکار شد که زوال پاخوره یک مهار زیستی طبیعی به دلیل افزایش جمعیت باکتری خاک‌زی *Pseudomonas fluorescens* Migula,1895 (Flügge,1886) در طی کشت پی‌درپی گندم بوده است (کوک و همکاران ۱۹۹۵).

[1]Take-all

[2]Biological control

[3]Take-all decline

[4]Suppressive soils

با آگاهی از امکان مهار زیستی این بیماری پژوهش‌هایی به منظور جداسازی این باکتری از خاک و استفاده از جدایه‌های موثر آن در کشورهای استرالیا، چین، انگلستان، هلند، سوئیس، آمریکا و هند صورت گرفته است (کوک ۲۰۰۳). در ایران نیز پژوهش‌هایی برای یافتن جدایه‌های موثر بومی این باکتری در استان‌های تهران و زنجان انجام شده است (ریحانی‌تبار و همکاران ۱۳۸۲، ژولیده و همکاران ۱۳۹۱). از سوی دیگر توانایی مهار زیستی این بیمارگر توسط جدایه‌های بومی بعضی گونه‌های *Trichoderma* از استان‌های همدان و مرکزی نیز به اثبات رسیده است (ظفری و همکاران ۲۰۰۸، قلندر و همکاران ۱۳۸۵) .

نظر به این‌که بیماری در سال‌های اخیر در مزارع گندم آبی استان فارس شیوع یافته است (زارع و فصیحیانی ۱۳۸۸)، این پژوهش به منظور جمع‌آوری و شناسایی جدایه‌های بومی موثر باکتری *P. fluorescens* و گونه‌های *Trichoderma* برای مهارزیستی بیماری صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی بیمارگر

از مزارع گندم مرودشت، اقلید، نقش‌رستم، نظرآباد، حسن‌آباد و صفاشهر در استان فارس در بهار سال ۱۳۹۰ بازدید به عمل آمد و از بوته‌های گندم بیمار و خاک فراریشه آن‌ها نمونه‌برداری شد. بیمارگر از بافت طوقه و ریشه‌های بیمار پس از شستشو با جریان ملایم آب و ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت-سدیم نیم درصد و کشت روی محیط سیب‌زمینی/دکستروز/آگار حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین جداسازی و به روش نوک ریسه خالص‌سازی شد (دافی و ولر ۱۹۹٤) . خصوصیات ریخت‌شناسی پنج جدایه خالص شده قارچ با میکروسکوپ زمینه روشن مطالعه و با مقایسه با توصیف ویز (۱۹۸۷) در مورد قارچ عامل بیماری پاخوره گندم شناسایی شدند.

اثبات بیماریزایی وتعیین درجه‌ی پرآزاری جدایه‌های قارچ

بیماریزایی پنج جدایه‌ی قارچ روی گندم رقم الوند و یولاف با تکثیر زادمایه آن‌ها روی دانه‌های گندم سترون در گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی ، با شش تیمار (پنج جدایه بیمارگر و تیمار شاهد)، در گلدان‌های ۲۱×۲۷ سانتی‌متری حاوی خاک سترون مخلوط با زادمایه هر جدایه‌ی قارچ، با ۱۰ بذر در هر گلدان، و پنج تکرار برای هر تیمار انجام شد. پس از ۱۰ هفته، که نشانه‌های بیماری در تمام تیمارهای جدایه‌های قارچ مشاهده شدند، تعدادگیاهچه‌های سالم شمارش و درصد گیاهچه‌های بیمار محاسبه شد و داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. برای تعیین پرآزاری جدایه‌های قارچ از درجه‌بندی صفر تا پنج شامل صفر= ریشه کاملاً سالم و بدون لکه، ۱ = سیاه شده‌گی کمتر از ۱۰درصد طول ریشه، ۲= ۱۱تا ۲۵ درصد، ۳= ۲٦ تا ۵۰ درصد ، ٤=۵۱ تا ۷۵ درصد و ۵= ۷٦ تا ۱۰۰درصد، استفاده شد (شونی و همکاران ۱۹۹۸، هوانگ و همکاران ۲۰۰۱). سپس قطعه-ای یک سانتی‌متری از بافت سیاه شده ریشه در هر تیمار، پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت-سدیم نیم درصد روی محیط سیب زمینی/دکستروز/آگار حاوی آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین کشت شدند. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲٤ درجه‌ی سلیسیوس نگهداری و پس از رشد پرگنه قارچ، خصوصیات ریختی آن مطالعه وبا قارچ مایه‌زنی شده مقایسه شد.

جداسازی باکتری *P. fluorescens* از خاک

شش جدایه‌ی باکتری از خاک فراریشه نمونه‌های گندم جمع‌آوری شده، به روش رقیق سازی سوسپانسیون خاک در آب مقطر سترون و پخش روی محیط کشتKing–B جداسازی و خالص شدند. سپس آزمون‌های واکنش گرم، تعیین تحرک باکتری، اکسیداز، کاتالاز، رشد هوازی و بی‌هوازی، فوق

حساسیت در توتون، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، هیدرولیز ژلاتین، اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته، تولید رنگ فلورسنت، تولید لوان، آرژینین دهیدرولاز روی آن‌ها انجام و با مقایسه‌ی این خصوصیات با صفات باکتری *P. fluorescens* مورد شناسایی قرار گرفتند (شاد و همکاران ۲۰۰۱).

جداسازی و شناسایی گونه‌های *Trichoderma*

گونه‌های *Trichoderma* از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده و پودر تریکودرمین‌بی شرکت تلفیق‌دانه تهران (که به عنوان جدایه‌ای ایرانی از قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai معرفی شده بود) به روش رقیق‌سازی و پخش روی محیط اختصاصی مکفادن و ساتون (۱۹۷۵) جداسازی و سپس به روش تک هاگ، کشت خالصی از آن‌ها روی محیط سیب‌زمینی/دکستروز/آگار تهیه شد. خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها مطالعه و با استفاده از کلید گمس و بیست (۱۹۹۸) شناسایی شدند.

آزمون کشت متقابل

این آزمون که برای بررسی توانایی بازدارندگی ازرشد پرگنه جدایه‌های بیمارگر توسط ریزسازواره-های جداشده با کشت متقابل آن‌ها با بیمارگر، برای جدایه‌های *Trichoderma* به روش کوچوک و کیون (۲۰۰۴) و در مورد جدایه‌های باکتری به روش ولر و کوک (۱۹۸۳) انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر با استفاده از فرمول:

درصد بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر= (قطر پرگنه شاهد- قطر پرگنه بیمارگر در حضور ریزسازواره/ قطر پرگنه شاهد) × ۱۰۰

محاسبه شد (دسای و همکاران ۲۰۰۲). این آزمون، به صورت فاکتوریل (فاکتور اول جدایه‌های *Trichoderma* در چهار سطح، فاکتور دوم جدایه‌های باکتری در شش سطح و تیمارهای شاهد برای هر پنج جدایه‌ی بیمارگر، که برای محاسبه درصد بازدارندگی جدایه‌های این ریزسازواره‌ها از رشد پرگنه هر جدایه‌ی بیمارگر مورد نیاز بودند)، در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام و داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS9.1 تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند.

آزمایش مهارزیستی بیماری در گلخانه

این آزمایش با سه جدایه‌ی باکتری و دو جدایه‌ی *Trichoderma*، که در آزمون قبل از توانایی بازدارندگی بیشتری روی بیمارگر برخوردار بودند، در برابر یک جدایه‌ی بیمارگر که از قدرت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار بود، روی گندم رقم الوند به این شرح در گلخانه انجام گرفت. ابتدا زادمایه‌ی قارچ بیمارگر روی دانه‌های گندم رقم الوند به روش هوانگ و همکاران (۲۰۰۱) تکثیر و آماده شد. خاک سترون هر گلدان پلاستیکی ۲۱×۲۷ سانتی‌متری با ۲۰۰ گرم از این زادمایه مخلوط شد. برای تیمار شاهد سالم ۲۰۰ گرم دانه گندم سترون فاقد زادمایه‌ی قارچ اضافه شد. سپس زادمایه‌ی جدایه‌های باکتری و *Trichoderma* به دو روش تیمار بذر و محلول‌پاشی خاک به این شرح به گلدان‌ها اضافه شدند. در روش تیمار بذر، بذرهای گندم پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت-سدیم نیم‌درصد به مدت سه دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون، به سوسپانسیون به غلظت ۱×۱۰^{۹} یاخته‌ی باکتری، یا با غلظت ۱×۱۰^{۶} هاگ جدایه‌های *Trichoderma*، در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی پودر ژلاتین به مدت ۱۵ دقیقه آغشته شدند. سپس بذرها در زیر هود با جریان هوای سترون خشک و به تعداد ۱۰ عدد در هر گلدان کاشته شدند (بورگس و هپورث ۱۹۹۶). در روش محلول‌پاشی خاک، پس از ریختن مخلوط خاک سترون با زادمایه‌ی بیمارگر در گلدان‌ها و کاشت ۱۰ بذر ضدعفونی شده در هر گلدان و پوشاندن روی بذرها با آن مخلوط، روی سطح خاک هر گلدان ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون به غلظت ۱×۱۰^{۹} یاخته‌ی باکتری و یا ۱×۱۰^{۶} هاگ جدایه‌های *Trichoderma*، پاشیده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتور اول جدایه‌های *Trichoderma* در دو سطح، فاکتور

دوم جدایه‌های باکتری در سه سطح و تیمارهای شاهد بیمار با جدایه پرآزارتر بیمارگر و شاهد سالم)، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۳۰-۲۰ درجه سلیسیوس، به مدت ۱۰ هفته نگهداری و مراقبت شدند. آن‌گاه درصدگیاهچه‌های بیمار، طول، وزن تر و خشک ریشه و ساقه آن‌ها محاسبه شدند. داده‌ها با نرم‌افزار SAS9.1
مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و میانگین‌ها نیز
با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

شناسایی بیمارگر

از کشت بافت‌های بیمار گندم پس از هفت روز، قارچی رشد نمود که پرگنه آن در ابتدا بی‌رنگ و سپس به رنگ خاکستری مایل به زیتونی درآمد. ریسه‌ها بنددار و به قطر ۷-٤ میکرومتر، فیالوسپورها شفاف، به ابعاد ۷-٤ × ۱/۵-۱ میکرومتر بودند. در آزمون بیماری‌زایی با گذشت هفت هفته پریتسیوم‌های قارچ در پایین ساقه گیاهچه‌های بیمار ظاهر شدند. پریتسیوم‌ها سیاه، تخم‌مرغی تا بیضی شکل به قطر ٤۰۰-۲۰۰ میکرومتر و با گردنی بلند به طول ۳۰۰-۱۵۰ میکرومتر بودند. آسک‌ها بی‌رنگ، به ابعاد۱۱۲-۹۳ × ۱۲-۱۰ میکرومتر و حاوی هشت آسکوسپور نخی‌شکل به رنگ روشن با ۳ تا ۱۰ بند بودند. اندازه آسکوسپورها ۹۱-۷٦ ×٤-۳ میکرومتر، هیفوپودیوم‌ها تیره‌تر از ریسه‌ها و به قطر ۱٤-۱۱ میکرومتر بودند. بر اساس این خصوصیات ریخت‌شناسی و عدم بیماری‌زایی روی یولاف، هر پنج جدایه بیمارگر قارچ *G. graminis* var. *tritici* تشخیص داده شدند.

درجه پرآزاری جدایه‌های بیمارگر

بیماری‌زایی هر پنج جدایه‌ی قارچ روی گیاهچه‌های گندم به صورت کم‌رشدی، زردی برگ‌ها و سیاه شدگی طوقه و ریشه مشاهده شد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها در جدول یک آورده شده است، که حاکی از پرآزاری بیشتر جدایه‌ی نقش‌رستم بود. روی بوته‌های یولاف هیچ نشانه‌ای از بیماری مشاهده نگردید.

جدول ۱- نتیجه آزمون بیماری‌زایی پنج جدایه‌ی قارچ ***Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*** از استان فارس روی گندم رقم الوند*.

محل نمونه‌برداری جدایه	گیاهچه‌های بیمار (درصد)	درجه پرآزاری
نقش رستم	۹۰ a	۵
اقلید	٦۳ c	٤
مرودشت	۸۰ b	۵
نظر آباد	٦۳ c	٤
حسن آباد	٦٦ c	٤

*اعدادی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری ندارند **(DMRT)**.

شناسایی جدایه‌های باکتری

خصوصیات به دست آمده از آزمون‌های انجام شده روی شش جدایه‌ی باکتری نشان داد که همه آن‌ها گرم منفی، متحرک، دارای رنگدانه فلورسنت، هوازی اجباری، اکسیداز، کاتالاز و آرژینین دهیدرولاز مثبت و قادر به لهاندن ورقه سیب‌زمینی، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین و فاقد توانایی تولید واکنش فوق‌حساسیت در توتون و تولید لوان هستند و بر همین اساس آن‌ها *Pseudomonas fluorescens* شناخته شدند.

شناسایی گونه‌های *Trichoderma*

بر اساس خصوصیات ریخت شناسی از مجموع چهار جدایه‌ی *Trichoderma* از خاک و پودر تریکودرمین‌بی، سه جدایه *T. harzianum* Rifai و یک جدایه *T. virens* (J.H.Mill.,Giddens & A.A. Foster) Arx شناسایی گردیدند.

آزمون کشت متقابل

نتایج این آزمون که در جدول دو آمده است، نشان می‌دهد که تمام جدایه‌های هر دو گونه *Trichoderma* و جدایه‌های باکتری *P.fluorescens* به طور معنی‌داری در سطح یک‌درصد، توانایی بازدارندگی از رشد ریسه هر پنج جدایه‌ی بیمارگر را دارند. از میان این ریزسازواره‌ها، جدایه‌های *T. harzianum* از پودر تریکودرمین‌بی و مرودشت۱ توانایی بازدارندگی بیشتری از رشد ریسه جدایه‌های بیمارگر نشان دادند. همچنین از میان جدایه‌های این قارچ، جدایه‌ی مرودشت۱ بیشترین تاثیر بازدارندگی بر جدایه‌ی مرودشت بیمارگر داشت. از بین جدایه‌های باکتری نیز، نقش‌رستم۲، اقلید۱ و مرودشت۲ توانایی بازدارندگی بیشتری نسبت به سایر جدایه‌های این باکتری، بر جدایه‌های نقش‌رستم، اقلید و مرودشت بیمارگر داشتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در خاک بعضی مزارع گندم مناطق مرودشت، نقش‌رستم و اقلید در استان فارس جدایه‌های بومی کارآمد قارچ *T.harzianum* و یا باکتری *P.fluorescens* در بازدارندگی از قارچ بیمارگر حضور دارند.

عامل مهار زیستی طبیعی این بیماری در خاک بعضی مزارع استرالیا، یک جدایه باکتری *P.fluorescens* است، که تولید ماده پادزی اسید فنازین-۱-کربوکسیلیک می‌کند (مزولا و همکاران ۱۹۹۲). البته توانایی تولید آنزیم کیتیناز (تجزیه‌کننده کیتین دیواره یاخته‌ای قارچ‌ها) توسط بعضی از جدایه‌های این باکتری نیز به اثبات رسیده است (آجیت و همکاران ۲۰۰۶).

بعضی جدایه‌های قارچ *T. harzianum* نیز توانایی بالایی در تولید آنزیم کیتیناز و سرین پروتئاز از خود نشان داده‌اند (شاکری و فوستر ۲۰۰۶).

آزمایش مهارزیستی بیماری در گلخانه

نتایج این آزمایش که به صورت تیمار بذر و خاک با جدایه‌های برتر قارچ *T.harzianum* و باکتری *P.fluorescens* انجام شد در جدول سه نشان داده شده است.

جدول ۲- تاثیر جدایه‌های دو گونه *Trichoderma* و شش جدایه *Pseudomonas fluorescens* در بازدارندگی از رشد پرگنه پنج جدایه قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل بیماری پاخوره گندم در آزمون کشت متقابل*.

ریزسازواره	محل جمع‌آوری	درصد بازدارندگی از رشد پرگنه جدایه *G. graminis* var. *tritici*				
		نقش رستم	اقلید	نظرآباد	مرودشت	حسن آباد
T. harzianum	تریکودرمین بی	٦٩/٠٧ a	٧٥/٥٥ a	٥٥/٧٤ a	٥٩/٨١ ab	٦٢/٤٠ a
T. harzianum	مرودشت ۱	٦٧/٢٢ a	٦٨/١٤ b	٥٧/٤٠ a	٦٣/٨٨ a	٦٤/٦٣ a
T. harzianum	مرودشت۲	٦٠/١٨ ab	٥٦/٤٨ c	٥١/٨٥ a	٦١/٤٨ ab	٦٢/٢٢ a
T. virens	صفاشهر	٥٢/٢٢ bc	٤٥/٣٧ d	٥٧/٧٧ a	٥٠/٥٥ bc	٤٨/٨٨ b
P. fluorescens	نقش رستم۱	٤٢/٩٦ cde	٥٠/٣٧ cd	٢٠/٩٢ b	٤١/٤٨ cd	٣٣/٨٨ cd
P. fluorescens	نقش رستم ۲	٤٧/٥٩ cd	٤٨/٨٨ cd	١٦/٦٦ b	٣٥/٩٢ de	٢٢/٢٢ e
P. fluorescens	اقلید ۱	٤١/٦٦ cde	٥٠/٧٤ cd	٢٠/٩٢ b	٣٨/٥١ de	٢٧/٠٣ de
P. fluorescens	اقلید ۲	٣٥/٧٤ e	٤٦/٢٩ d	٢٠/٣٧ b	٢٩/٦٣ e	٣٦/١١ c
P. fluorescens	مرودشت ۱	٤٥/٥٥ cde	٤٧/٠٣ d	٢٠/٠٠ b	٤٠/٥٥cde	٤٧/٤٠ b
P. fluorescens	مرودشت ۲	٣٨/٨٨ de	٤٧/٥٩ d	٢٣/٧٠ b	٤٢/٤٠ cd	٢٩/٦٣ cde

*اعدادی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری ندارند (DMRT).

جدول ۳- اثر تیمارهای بذر و خاک جدایه‌های بومی قارچ ***Trichoderma harzianum*** و باکتری ***Pseudomonas fluorescens*** بر بیماری پاخوره، طول، وزن تر و خشک ریشه و ساقه گندم رقم الوند*.

تیمار	محل جداسازی	گیاهچه‌های بیمار (درصد)		ریشه وزن خشک (گرم)		ریشه وزن تر (گرم)		ریشه طول (سانتی متر)		ساقه طول (سانتی متر)		ساقه وزن تر (گرم)		ساقه وزن خشک (گرم)	
		تیمار													
		بذر	خاک	بذر	خاک	بذر	خاک	بذر	خاک	بذر	خاک	بذر	خاک	بذر	خاک
P. fluorescens	مرودشت ۲	۱۸/٦	۱۷/۳٦	۰/۲۲	۰/۱۲	۱/٤۰	۰/٦	۱۱/۸۸	۱۰/٦۷	۱٦/٥	۱۱/٦۷	۲/۸۸	۱/۸٦	۰/٥۹	۰/٤۹
		C	**d**	**a**	**cd**	**a**	**D**	**b**	**c**	**a**	**b**	**a**	**cd**	**ab**	**bc**
P. fluorescens	اقلید ۲	۲۳/٤	۲۲/۱٤	۰/۱٦	۰/۱۷	۱/۲۷	۰/۷۷	۱٦/۷٥	۸/۸۸	۱٤	۱٦/۸۸	۱/٦٤	۲/۰٤	۰/۳۳	۰/٦۰
		Bc	**d**	**b**	**b**	**a**	**C**	**a**	**c**	**ab**	**a**	**c**	**c**	**c**	**a**
P. fluorescens	مرودشت ۱	۲۳/۹	۱۸/٦٥	۰/۱۱	۰/۱٤	۰/۷	۱/۱٦	۱۱/٦۳	۱٤/۷٥	۱٥/٦۳	۱۲/۸	۲/۳۱	۲/۰٤	۰/٥۰	۰/٤٤
		Bc	**d**	**c**	**c**	**bc**	**B**	**b**	**b**	**ab**	**ab**	**b**	**c**	**b**	**bc**
T. harzianum	تریکودرمین بی	۲٤/۱	۲۸/۸۲	۰/۱٥	۰/۱۱	۰/۷٤	۰/۷٥	۱۰	۸/۷٥	۱٦/۳۸	۱٦	۲/۳٤	۱/۹۸	۰/٦۲	۰/٤۲
		Bc	**c**	**b**	**d**	**bc**	**C**	**b**	**c**	**a**	**ab**	**b**	**c**	**a**	**c**
T. harzianum	مرودشت ۱	۲٦/۲	٤۰/٥٤	۰/۱٥	۰/۱۰	۰/۹۳	۰/٥۹	۹/٥	۹/٥	۱۲/۸۸	۱٥/۷٥	۲/٥۹	۲/۳٥	۰/٥۱	۰/٥۰
		B	**b**	**b**	**d**	**b**	**D**	**b**	**c**	**ab**	**ab**	**ab**	**b**	**b**	**b**
شاهد بیمار	نقش رستم	۹۰/٤	۹۰/٤	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/٥۸	۰/٥۸	۸/٥	۸/٥	۱۱/٦٥	۱۱/٦٥	۱/٦٤	۱/٦٤	۰/۳۲	۰/۳۲
		A	**a**	**c**	**d**	**c**	**D**	**b**	**c**	**b**	**b**	**c**	**d**	**c**	**d**
شاهد سالم		۰/۰	۰/۰	۰/۲۲	۰/۲۲	۱/٤۱	۱/٤۱	۱۷	۱۷	۱٦/۹٥	۱٦/۹٥	۳/۰۸	۳/۰۸	۰/٦۳	۰/٦۳
		D	**e**	**a**	**a**	**a**	**A**	**a**	**a**	**a**	**a**	**a**	**a**	**a**	**a**

*اعدادی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری ندارند **(DMRT)**.

نتایج نشان می‌دهند که همه ریزسازواره‌های به کار رفته باعث کاهش معنی‌دار بیماری می‌گردند، اما جدایه‌های باکتری اثر بیشتری در کاهش بیماری در هر دو روش تیمار بذر و خاک داشته‌اند. در بین این جدایه‌ها نیز مرودشت۲ بیشترین کارآیی در مهارزیستی بیماری داشته است. همچنین این جدایه از کاهش طول ساقه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه در اثر بیماری در روش تیمار بذر جلوگیری کرده و بوته-های تیمار شده با آن در حضور قارچ بیمارگر نیز از نظر این صفات رویشی اختلاف معنی‌داری با شاهد سالم نداشته‌اند. کارآیی بیشتر آن‌ها در شرایط گلخانه در اثر توانایی تولید بیوفیلم در سطح ریشه گیاهان است. تشکیل بیوفیلم با چسبیدن و تثبیت باکتری در سطح ریشه آغاز می‌شود. سپس با تکثیر زیاد یاخته-های چند تاژکی باکتری در ماده زمینه‌ای لعابی، متشکل از پلی‌ساکاریدهای خارج یاخته‌ای باکتری، پروتیین‌ها و بیوسورفکتانت‌ها، توده متحرکی از باکتری به‌عنوان بیوفیلم در سطح ریشه گیاه میزبان بوجود می‌آید. تشکیل بیوفیلم به باکتری امکان دسترسی به محل‌های غذایی بیشتر، مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی و پادزیست‌ها را می‌دهد (دوی و اتول ۲۰۰۰، هوفمن و همکاران ۲۰۰۵). کارآیی بعضی جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* در مهارزیستی بیماری پاخوره گندم و جلوگیری از کاهش صفات رویشی گیاه در اثر بیماری، توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. به طوری که در آزمایشی با تیمار بذر ارقام گندم بهاره و پاییزه با سه جدایه این باکتری، به تنهایی یا مخلوط با یکدیگر، نه تنها کاهش معنی‌دار بیماری پاخوره، بلکه افزایش ۱۱ تا ۱۷ درصدی رشد گیاه مشاهده شده است (ولر و کوک ۱۹۸۳).

جدایه‌های کارآمد این باکتری که به عنوان تحریک کننده رشد گیاهان نیز شناخته شده‌اند، معمولا به صورت تیمار بذر و یا غده مورد استفاده قرار می-گیرند و با استقرار سریع روی ریشه گیاه میزبان، رقابت غذایی و تولید مواد پادزی مانع از استقرارو خسارت بیمارگرهای خاک‌زاد گیاهان می‌گردند. آن‌ها همچنین با تحریک تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید ایندول استیک، جیبرالین و اتیلن، جذب و انتقال آهن خاک به گیاه و تولید بعضی از اسیدهای‌آمینه باعث تحریک رشد گیاهان می‌گردند (حسن‌زاده ۱۳۷۱).

در این آزمایش هر دو جدایه تریکودرمین‌بی و مرودشت۱ قارچ *T.harzianum* نیز در هر دو روش تیمار باعث کاهش معنی‌دار بیماری شدند، هر چند که کارآیی آن‌ها در مهارزیستی بیماری در روش تیماربذر بیشتر از روش تیمارخاک بود، ضمن این‌که از نظر توانایی مهار بیماری با روش تیمار بذر بین جدایه‌ی این قارچ از پودر تریکودرمین‌بی با جدایه‌ی بومی استان فارس مرودشت۱ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین با روش تیمار بذر بین جدایه‌ی تریکودرمین‌بی این قارچ، اختلاف معنی‌داری در مهار بیماری با جدایه‌های باکتری وجود نداشت. از سوی دیگر این دو جدایه‌ی قارچ موجب عدم وجود اختلاف معنی‌دار در طول و وزن خشک ساقه گیاهچه‌های بیمار با شاهد سالم شده‌اند.

در آزمایش توانایی مهارزیستی بیماری پاخوره گندم توسط هشت جدایه‌ی پنج گونه‌ی *Trichoderma* ، از استان‌های مرکزی و همدان و *T. harzianum* از پودر تریکودرمین‌بی، به دو روش تیمار خاک و بذر، نیز آن‌ها باعث کاهش ۵۵-۲۲ درصدی شدت بیماری و افزایش ۵۸-۲۳ درصدی وزن خشک ریشه شده‌اند و کارآیی آن‌ها در روش تیمار بذر بیشتر از تیمار خاک بوده است (ظفری و همکاران ۲۰۰۸).

قارچ *T. harzianum* به دلیل نرخ تولیدمثلی و قدرت تهاجمی بالا، توانایی در استفاده از منابع غذایی مختلف، با رقابت و تولید مواد پادزی فرار و نافرار به عنوان یک عامل مهارزیستی مهم بیمارگرهای خاک‌زاد گیاهان شناخته شده است (کوک ۲۰۰۳).

توانـایی جدایـه‌هـای بـومی اسـتان فـارس بـاکتری *P. fluorescens* و *T. harzianum* ، در بازدارنـدگی از رشد ایـن بیمـارگر در شـرایط آزمایشـگاهی و کـاهش بیماری در شرایط گلخانه به روش‌هـای تیمـار خـاک و بذر، برای نخستین بار گزارش می‌شوند. بنابراین امکان کاربرد آن‌ها برای مهار زیستی این بیماری وجود دارد.

منابع

بهرامی کمانگر س، بستانی ک، کاظمی ه و مرادی م، ۱۳۸۵. سبب شناسی پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در مزارع استان کردستان. صفحه ۲۳، خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

حسن‌زاده ن، ۱۳۷۱. بیوکنترل عوامل بیماریزای خاکزاد گیاهان. وزارت کشاورزی، ۱۷۹صفحه.

روانلو ع، ۱۳۸۵. ظهور و گسترش بیماری پاخوره گندم در استان آذربایجان غربی. صفحه ۲۱، خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

ریحانی‌تبار ع، صالح‌راستین ن، محمـدی م و علیخـانی ح، ۱۳۸۲. بررسـی فراوانـی و انتشـار پسـودوموناس‌هـای فلورسنت در مزارع گندم دراستان تهران و مطالعهٔ توان بازدارندگی جدایه هـا از رشـد قـارچ *Gaeumannomyces graminis var.tritici* عامل پاخوره گندم. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۳٤ شماره ۳، صفحه‌های ۵۷۱ تا ۵۷۸.

زارع ل و فصیحیانی ع، ۱۳۸۸. واکنش تعدادی از غلات دانه‌ریز نسبت به یک جدایه ایرانی عامل بیماری پاخوره گندم *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) var. *tritici* Walker. مجله به‌نژادی نهال و بذر، جلد ۲۵ شماره۱، صـفحه-های ۸۳ تا ۹٤.

ژولیده ف، معرفت ع و ناصری ب،۱۳۹۱. وقوع بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در استان زنجان و ارزیابی اثر بازدارندگی ریشه گندم روی قارچ عامل بیماری. مجله گیاه‌پزشکی، جلد ۳۵ شماره ۳، صفحه‌های ۱۹ تا ۳۰.

قلندر م، محمدی ک و فتحی‌هفشجانی ا، ۱۳۸۵. کنترل بیولوژیک بیماری پاخوره گندم توسط باکتری‌های ناحیه ریزوسفر در استان مرکزی. صفحه ۲۰، خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

Ajit NS, Verma R and Shanumugan V, 2006. Extracellular chitinase of fluorescent Pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianti* causing carnation wilt. Current Microbiology 52:310-316.

Burgess DR and Hepworth G, 1996. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia minor*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virens*. Plant Pathology 45:583-592.

Cook RJ, 2003. Take-all of wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology 62:73–86

Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Fujimoto DK, Mazzola M, Bangera G and Kim DS, 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proceedings National Academy of Sciences 92: 4197-4201.

Davey ME and O'Toole GA, 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molcular Biology 64: 847–867.

Desai S, Reddy MS and Kloepper JW, 2002. Comprehensive testing of biological agents. Pp: 387–420, *In*: Gnanamanickam SS (Ed.). Biological Control of Crop Diseases. Marcel Dekker Inc, New York, USA.

Duffy BK and Weller DM, 1994. A semi selective and diagnostic medium for *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Phytopathology 84:1407-1415.

Gams W and Bissett J, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. Pp:3-34, *In:* Kubicek C P and Harman G E (Eds.). *Trichoderma* & *Gliocladium*.Vol.1, Taylor & Francis Ltd, London, England.

Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA and Miller SI, 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature 436:1171-1175.

Huang LL, Korschenhaus J, Heppner C and Buchenauer H, 2001. Effects of seed treatments with a novel fungicide Latitude (silthiofam) on fluorescent *Pseudomonads* and take-all of wheat. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd 53:165-171.

Kucuk C and Kivanc M, 2004. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turkish Journal of Biology 28:111-115.

Mazzola M, Cook RJ, Thomashaw LS, Weller DM and Pierson LS, 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *Pseudomonas* in soil habitants. Applied and Environmental Microbiology 58:2616-2624.

Mc Fadden AG and Sutton JC, 1975. Relationships of populations of *Trichoderma* spp. In soil to disease in maize. Canadian Journal of Plant Science 55:579-586.

Schaad NW, Jones JB and Chun W 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society, St.Paul, Minnesota,USA,373p.

Schoeny A, Jeuffroy MH and Lucas P, 1998. Influence of take-all epidemics on winter wheat yield formation and yield loss. Phytopathology 91:694–701.

Shakeri J and Foster HA, 2006. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. Enzyme and Microbial Technology 40(4): 961-968.

Weller DM and Cook RJ, 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent Pseudomonads. Phytopathology 73:463-469.

Wiese MV,1987. Compendium of Wheat Diseases. APS Press, MN,USA,112p.

Zafari, D, Mehrabi Koushki M and Bazgir E, 2008. Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. African Journal of Biotecnology 7:3653-3659.

Biological Control of Wheat Take-all Disease with Native Isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* from Fars Province

A Arianpour [1], M Sadravi [1*] and SM Taghavi [2]

[1]Former MSc Student and Associate Professor, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.

[2]Professor, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

[*]Corresponding author: msadravi@yu.ac.ir

Received: 16 Jun 2015 Accepted: 15 Nov 2015

Abstract

Take-all, caused by *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* is an important disease of wheat in the Fars province (south Iran). Five isolates of the pathogen were isolated from infected wheat plants of this province, and their virulence tested on Alvand cultivar. Biological control method of disease investigated with dual culture test of native isolates of *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro, at first. Then impact of treatments of seed and soil with three top isolates of bacterium and two of *T. harzianum* were tested on disease severity caused by the most virulent isolate of the pathogen, under greenhouse condition. All microorganisms significantly reduced hyphal growth of pathogen isolates, in dual culture test. *P. fluorescens* isolates in two treatment methods, and isolates of *T. harzianum* in seed treatment were most effective in reducing disease severity, in greenhouse test, therefore it is possible to use them for biological control of the disease. Ability of Fars province native isolates of these bacterium and fungus in biological control of wheat take-all disease is reporting for the first time.

Keywords: Fars, Take-all, Wheat.