Archive of SID

جداسازی، انتخاب و ارزیابی باکتریهای آنتاگونیست درکنترل بیولوژیک بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی دکمه‌ای

Isolation, screening and evaluation of the efficacy of potentially antagonistic bacteria for the biocontrol of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*

حسین خبّازجلفائی*، ابراهیم محمّدی‌گل‌تپّه و حشمت‌اله رحیمیان

گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت‌مدرس و دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران

دریافت ١٣٨٤/٤/١٧ پذیرش ١٣٨٤/٨/٢٥

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای باکتریایی ناشی از *Pseudomonas tolaasii* یک بیماری مهم و شایع در سالن‌های پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای *(Agaricus bisporus)* در ایران است. روش‌های مختلفی برای کاهش خسارت و کنترل بیماری از جمله رعایت بهداشت، کنترل شرایط محیطی موثر در توسعه بیماری، به کارگیری مواد شیمیایی و عوامل آنتاگونیست برای کنترل بیماری در دنیا به کار برده می‌شود. در بررسی حاضر کارآیی تعدادی از باکتری‌های بالقوه آنتاگونیست، جدا شده از منابع مختلف از جمله سطح کلاهک قارچ، خاک‌های زراعی، خزه تورب و کمپوست، برای کاهش میزان و شدت بیماری، مورد ارزیابی قرار گرفت. از ٤٠٦

* مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه بدست آمده ازخاک وپیت، هفت جدایه در شرایط آزمایشگاه علیه *P. tolaasii* فعالیت باز دارنده داشته و به هنگام تلقیح توأم با تراکم‌های جمعیتی برابر یـا ده برابـر عامـل بیمـاریزا از تشکیل حفرات فرو رفته برروی قارچ خوراکی جلوگیری کردند.

سه جدایه از این آنتاگونیست‌های بالقوّه که براساس خصوصیات فنـوتیپی *P. fluoresences* تشخیص داده شدند، در شرایط سالن علیه *P. tolaasii* فعالیت بازدارندگی نشان داده و به‌طـور مشخص وقوع وشدت لکه قهوه‌ای را برروی قارچ‌های پرورش داده شده تحت شرایط تولیـد تجاری کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: لکه قهوه‌ای، قارچ خوراکی، کنترل بیولوژیکی

مقدمه

لکه قهوه‌ای قـارچ‌هـای خـوراکی (*Agaricus bisporus* و . spp *Pleurotus*) از مهمتـرین و شایع‌ترین بیماری‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای درسالن‌های پرورش صنعتی و سنّتی اسـت. ایـن بیماری توسط *Pseudomonas tolaasii* ایجاد مـی‌شـود (Preece 1979, Fermor & Wong 1986). بیماری لکه قهوه‌ای درقارچ کاری‌های استان تهران، همدان، آذربایجان‌شرقی، اصفهان و کرمـان (*محمّدی و پورجم* ۱۹۹۵، *خبازجلفائی و رحیمیـان*، ۲۰۰۲) و مازنـدران (*رحیمیـان و زارعـی* ۱۹۹۵) و نیز روی قارچ های جنس *Scleroderma* در جنگل‌های مازندران (*رحیمیان و زارعـی* ۱۹۹۶) وجود دارد. روش‌های متعددی مبتنی بر رعایت اصول بهداشـتی، کـاربرد ضـدعفونی کننده‌ها، محلول‌پاشی با سموم یا بازدارنده‌های رشد باکتری، مدیریت صحیح آبیـاری و تنظـیم شرایط محیطی سالن پرورش برای پیشگیری از وقوع و انتشار بیماری لکه قهوه‌ای در دنیا به کار گرفته می‌شود (Fermor 1986, Royse& Wuest 1980, Stoller 1978, Dough 1976, Sinden 1971).

در سه دهه اخیر کوشش‌هایی در جهت ارزیابی تأثیر و به کـارگیری میکروارگانیسـم‌هـای بازدارنده و آنتاگونیست در پیشگیری و مبـارزه بـا بیمـاری لکـه قهـوه‌ای انجـام شـده اسـت (Miller & Spear 1995, Khanna & Olivier 1989, Liao *et al*. 1980, Nair & Fahy 1976). اولـین بار پژوهشگران استرالیائی اثر آنتاگونیست‌ها را علیه بیماری لکه قهوه‌ای مـورد آزمـایش قـرار

www.SID.ir

Archive of SID

دادند (Nair & Fahy 1972). انجام بررسی‌های بیشتر در استرالیا (Nair & Fahy 1976) و تـایوان (Liao *et al*. 1980) منجربه تهیه و عرضه فرآورده‌هایی از عوامل آنتـاگونیست (شامل جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* و گونه‌هایی از جنس *Pseudomonas*) گردید که درسالن‌های پرورش قارچ قابل استفاده بودند. در هند جدایه‌هایی از بیوار یک (biovar I) *P. fluorescens* که از خاک پوشش و کلاهک قارچ خوراکی‌جداسازی‌شده بـود، کـارآیی مـوثری در کنتـرل بیمـاری لکـه قهوه‌ای داشتند (Khanna & Olivier 1989). هدی و هروی نشان دادند که رشـد عامـل بیمـاری لکه قهـوه‌ای در اثـر اسـتقرار قبلـی جدایـه‌هـایی از *P. fluorescens* بشـدت کـاهش مـی‌یابـد (Heady & Harvey 1989). اثر یک فـرآورده بیولوژیـک حـاوی *P. fluorescens* بنـام ویکتـوس (Victus) علیه *P. tolaasii* مورد ارزیابی قرار گرفتـه و نتـایج قابـل قبـولی را ارائـه داده اسـت (Miller & Spear 1995).

هدف از بررسی اخیر جداسازی و شناسایی عوامل بالقّوه آنتاگونیسـت باکتریـایی از منـابع مختلف وبررسی کارآیی این عوامل در پیشگیری از آلـودگی یـا کـاهش شـدت بیمـاری لکـه قهوه‌ای قارچ خوراکی رشد یافته در شرایط ایران می‌باشد.

روش بررسی

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

یکصد نمونه از کمپوست، خاک پوششی سالن‌هـای پـرورش قـارچ، کلاهـک‌هـای قـارچ خوراکی دکمه‌ای، خاک مزارع، مراتع و جنگل‌های مناطق مازندران، گیلان و کلیبر جمـع‌آوری شده وتا زمان مصرف در سردخانه (٤+ درجهٔ سانتی‌گراد) نگهداری گردید. جهـت جداسـازی باکتری‌های آنتاگونیست ازاین نمونه‌ها از روش *فرمور و لینچ* (Fermor & Lynch 1988) استفاده شد. از نمونه‌های خاک و کمپوست جمع‌آوری شده از سالن‌های پرورش قارچ، رقّت‌های 10^{8} تا 10^{10} ودرمورد نمونه کلاهک‌های قارچ با شستن توسط آب مقطر و خـاک‌هـای جمـع‌آوری شده از طبیعت، رقّت‌های 10^{4} و 10^{5} درآب مقطرسترون تهیه شد. از هر رقّـت۱۰۰ میکرولیتـر بـه سـطح محـیط کشـت نوترینـت آگـار مغـذی سـوکروز دار (NAS) وکینـگ ب

www.SID.ir

Archive of SID

(King medium B , KB) منتقل وبه کمک میله شیشه‌ای خم بطور یکنواخت پخش گردید. در جداسازی باکتریها از کلاهک، لایهٔ بیرونی (پریدرم) کلاهک با تیغ سترون از بقیه قسمت‌ها جدا، درآب مقطرسترون بمدت ۲۰ دقیقه تکان داده شده و۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله روی محیط‌های NAS وKB پخش گردید. برای هر رقّت دو تشتک پتری از هر محیط کشت به کار برده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از ٤٨ ساعت کلنی‌هایی با شکل و اندازه‌های متفاوت، از باکتری‌های فلورسنت و غیرفلورسنت بطور تصادفی انتخاب و مجدداً روی محیط‌کشت NAS مخطط گردیدند.

آزمون بیماریزایی به منظورانتخاب جدایه‌های غیربیماریزا و بالقّوه آنتاگونیست

آزمون بیماریزایی ٤٠٠ جدایه باکتری بدست آمده از بسترهای قارچ، خاک و سطح کلاهک به همراه ٦ اکتینومیست – کرینه فرم روی بلوک‌های *A. bisporus* به روش *خان* و همکاران (Khanna *et al.* 1990) انجام گردید. برای هر جدایه سه تکرار به کار برده و در هر تکرار چهار بلوک از کلاهک درون تشتک سترون قرار داده شد. پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت نگهداری تشتک‌ها در دمای۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد ایجاد حفره یا بروز عوارض احتمالی دیگر روی بلوک‌های مایه‌زنی شده ارزیابی گردید.

بررسی تأثیر جدایه‌ها روی رشد ریسه *A. bisporus*

اثرات جدایه‌هایی که قادر به آلوده نمودن بلوک‌های قارچ نبودند، روی رشد ریسه (میسلیوم) *A. bisporus* نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا هر جدایه باکتری در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط KB به صورت خطی کشت گردید. پس از٢٤ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت ۷ روزه قارچ خوراکی در هر دو سوی محل تلقیح باکتری با فاصلهٔ ۳ سانتی‌متر در سطح همان محیط KB قرار داده شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. قطر کلنی‌های قارچ بعد از ۷ روز اندازه‌گیری و با شاهد (فاقد مایه باکتری در تشتک پتری) مقایسه گردید.

بررسی خاصیت بازدارندگی جدایه‌ها به روش‌ارزیابی سریع (Rapid screening)

آزمایش ارزیابی قابلّیت آنتاگونیستی جدایه‌ها براساس روش *خان و اولیور* (Khanna & Olivier 1989) انجام شد. از هر جدایه باکتریایی که درآزمون‌های قبلی روی قارچ

www.SID.ir

Archive of SID

خوراکی بیماریزا نبودند، سوسپانسیون به غلظت تقریبی ۱×۱۰^۸ سلول باکتری (cfu)[1] در میلی‌لیتر در آب مقطر سترون تهیه شد. سوسپانسیونی از یک جدایه بیماریزای *P. tolaasii* از بررسی قبلی (Khabbaz-Jolfaee & Rahimian 2002) نیز به همان غلظت تهیه و دو سوسپانسیون به نسبت ۵ : ۱ و ۱۰ : ۱ (عدد سمت چپ مربوط به *P. tolaasii* می‌باشد) مخلوط شدند. مخلوط سوسپانسیون‌ها روی تکان دهنده (شیکر) دورانی با ٦٠ دور در دقیقه به مدت سه ساعت تکان داده شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط روی هر بلوک و کلاهک قرار داده شد. بلوک و کلاهک‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Khanna & Olivier 1989). وقوع و میزان آلودگی پس از گذشت ٢٤ و ٤٨ ساعت ارزیابی و با شاهد (بلوک وکلاهک مایه‌زنی شده با سوسپانسیون تنها *p. tolaasii*) مقایسه گردید.

بررسی خصوصیات آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط *in vitro*

جدایه‌هایی که در آزمون ارزیابی سریع مانع آلودگی کلاهک و بلوک‌های قارچ خوراکی به *P. tolaasii* یا موجب کاهش شدت علایم لکه قهوه‌ای گردیدند انتخاب شده و خصوصیت آنتاگونیستی آنها براساس تولید سیدروفور یا آنتی‌بیوتیک (Henry *et al*. 1991) بررسی گردید:

الف- خصوصیت بازداری ازرشد برپایه تولید سیدروفور، طبق روش *میشاقی* و همکاران و *فرمور و لینچ* (Fermor & Lynch 1988, Misaghi *et al.* 1982) تعیین گردید. برای این منظور در نصف تشتک‌های پتری محیط KB و در نصف دیگر محیط KB باضافهٔ ۱۰ میکروگرم در میلی‌یتر $FeCl_3$ ریخته شد.سپس جدایه‌ای آنتاگونیست بصورت لکه‌ای در فواصل یکسان از هم روی محیط KB با یا بدون $FeCl_3$ کشت شدند. پس از ٢٤ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون کدر (حاوی۱×۱۰^۸ cfu/ml) *P. tolaasii* روی محیط با محلول‌پاش پاشیده و تشتک‌های پتری دوباره در۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. قطر هاله بازداری از رشد*P. tolaasii* برای هر جدایه ٤٨ ساعت بعد اندازه‌گیری گردید.

[1] Colony forming unit

www.SID.ir

Archive of SID

ب- نقش آنتی‌بیوتیک تولیدی جدایه‌های آنتاگونیست دربازداری از رشد *P. tolaasii* با به کارگیری محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato dextrose agar, PDA) و براساس روش *هنری* و همکاران (Henry *et al.* 1991) ارزیابی گردید. بطوری‌که جدایه‌های آنتاگونیست رشد کرده روی محیط‌کشت KB بصورت لکه‌ای در فواصل یکسان روی محیط PDA کشت شدند و پس از ۹۶ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، سوسپانسیون کدر (حاوی ۱×۱۰^{۸} cfu/ml *P. tolaasii*) روی محیط با محلول‌پاش پاشیده و تشتک‌های پتری دوباره در۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. قطر هاله بازداری از رشد *P. tolaasii* برای هر جدایه ٤٨ ساعت بعد اندازه‌گیری گردید.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

به‌منظور شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست در سطح جنس یا گونه آزمون‌های تولید لعاب روی محیط YDC (yeast dextrose calcium carbonat agar)، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط KB، واکنش گرم، رنگ‌آمیزی تاژک، اکسیداز، آرجی‌نین‌دی‌هیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، احیا نیترات، رشد در دمای ٤١ درجه سانتی‌گراد ، تولید لوان، لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و مصرف ادونیتول، ال- آرابینوز، ا ل- والین، دی‌آلانین و اتانول (Fahy & Hayward 1983, Schaad 1988)برای هر جدایه انجام شد.

بررسی کنترل بیولوژیکی لکه قهوه‌ای در شرایط سالن پرورش

ریسه‌های قارچ *A. bisporus* سویه ۵۱۲ که روی گندم سترون به مدت ۱۵ روز رشد کرده بود به بسته‌های ۱/۵ کیلوئی حاوی کمپوست (به نسبت یک درصد وزن کمپوست) مایه‌زنی شد و جهت پنجه دوانی در سالن کشت در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از پوشیده شدن کمپوست از ریسه‌های قارچ، خاک پوششی به ضخامت دو سانتی‌متر روی بستر پخش شد. سوسپانسیون سه جدایه ١١٤ ،١١٩ و١٢٠ آنتاگونیست که در بررسی‌های آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی مناسبی داشتند و امیدبخش بودند (جدایه‌های ١١٤، ١١٩ و١٢٠) و *P. tolaasii* در غلظت ۱×۱۰^{۸} cfu/ml آب مقطرسترون تهیه شد. نسبت‌های صفر: صفر، صفر:۱ ، ۱:۱ ، ۵ : ۱ و ۱۰ :۱ (اعداد سمت راست آنتاگونیست و سمت چپ *P .tolaasii*

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد) از مخلوط سوسپانسیون‌های جدایه آنتاگونیست با باکتری عامل بیماری تهیه و در قالب یک طرح بلوک‌های خرد شده با زمینهٔ پلات روی خاک پوششی و روی کلاهک‌ها در زمان ظهور آنها در هر چین محلول‌پاشی گردید. با ظهور کلاهک‌ها در سه چین، تعداد و وزن کلاهک‌ها و نیز میزان آلودگی (نمره‌دهی براساس وجود و شدت علایم بیماری روی کلاهک‌ها بر پایه روش *ونگ و پریس* (Wong & Preece 1982)تعیین گردید. هر کیسه یک تکرار محسوب شده و برای هر نسبت سه کیسه منظور گردید. تجزیه داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan's multiple range test) در سطح اطمینان ۹۹ درصد انجام شد (Valizadeh & Moghadam 1994).

نتیجه

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

از یکصد نمونه خاک جمع‌آوری شده از سالن‌های پرورش قارچ، کلاهک قارچ‌ها، رویش‌های طبیعی و کمپوست جمعاً ٤٠٦ جدایه باکتری بدست آمد. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

عدم بیماریزایی باکتری‌های آنتاگونیست احتمالی روی قارچ خوراکی

تمامی ٤٠٦ جدایه باکتری بدست آمده روی بلوک‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای مایه‌زنی شده و واکنش بلوک‌ها بررسی گردید. از ٤٠٦ جدایه، ٢٥٤ جدایه هیچگونه علایمی روی بلوک‌های قارچ ایجاد نکردند (جدول ۱). جدایه‌های مزبور برای بررسی قابلیت بازداری از رشد میسلیوم *A. bisporus* به کار برده شدند. هیچکدام از جدایه‌های انتخابی اثر سوئی روی رشد میسلیومی قارچ نداشتند.

خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها به روش ارزیابی سریع

سوسپانسیون غلیظ جدایه‌ها وقتی با *P. tolaasii* به نسبت‌های ۵ : ۱ و ۱۰ : ۱ مخلوط و روی بلوک کلاهک سالم بکار برده شد، مانع از آلودگی و بروز علایم لکه قهوه‌ای یا موجب کاهش شدت علایم گردیدند. از بین ٢٥٤ جدایه، جدایه‌های شماره ١١٤، ١١٩ و ١٢٠ بطور

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های باکتریهای بدست آمده ازمنابع و بسترهای مختلف جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی علیه *Pseudomonas tolaasii*

Table 1 . Sources and Characteristics of bacterial strains isolated and evaluated for potential antagonistic activity against *Pseudomonas tolaasii*

کد نمونه‌ها Code of specimens	محل نمونه‌برداری Source of isolates	تعداد نمونه جمع‌آوری شده Number of samples	تعداد جدایه جدا سازی شده No. of strains isolated	تعداد جدایه‌های واجد رنگدانه No. of strains with diffusible pigment	تعداد جدایه‌های فاقد رنگدانه No. of strains lacking diffusible pigment	تعداد جدایه های غیر مضر به پلاک و کلامک‌های قارچ No. of strains without inhibitory effect on mushroom growth
PE	پیت (Peat moss)	10	40	14	26	31
CO	کمپوست (Compost)	5	20	9	13	17
CU	کلامک (Pilei of *Agaricus bisporus*)	5	20	12	8	9
MR	مرتع و چمنزار (Forages, sods)	40	160	104	56	48
GA	جنگل (Forest soil)	8	32	20	12	31
MZ	مزرعه (Field soil)	20	80	37	43	73
AB	کنار نهر آب (Stream bank)	12	48	11	37	45

www.SID.ir

Archive of SID

کامل از ظهور علایم جلوگیری نمودند.

تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌ها

از بین هفت جدایهٔ نامزد جهت بررسی خصوصیت بازداری از رشد با تولید سیدروفور یا آنتی‌بیوتیک، سه جدایه (۱۱٤، ۱۱۹ و ۱۲۰) توانستند در بخشی از سطح محیط KB که فاقد $FeCl_3$ بود هالهٔ بازدارندگی به قطرمتوسط ۱۲ میلی‌متر در اطراف خود ایجاد کنند. در حالی که در بخشی که $FeCl_3$ اضافه شده بود، این هاله دیده نشد.در مورد تولید آنتی‌بیوتیک نیز در سطح محیط PDA هر سه جدایهٔ مذکور، در اطراف خود هالهٔ بازدارندگی به قطر متوسط ۱٤ میلی‌متر ایجاد کردند.

خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها علیه *P. tolaasii* در شرایط *in vitro*

از هفت جدایه انتخابی بررسی شده، سه جدایه (شماره ۱۱٤، ۱۱۹ و۱۲۰)با اختلاف جزیی از هم موجب بازداری از رشد باکتری *P. tolaasi* شدند و چهار جدایه دیگر (شماره ۱۰۲ ، ۱۱۵ ، ۲۱۵ و ۳۱٤) تأثیری در رشد باکتری پاتوژن نداشتند (جدول ۲). از بین هفت جدایه مقایسه شده جدایه‌های شماره ۱۱٤ ، ۱۱۹ و ۱۲۰ با تولید آنتی‌بیوتیک از رشد باکتری پاتوژن بازداری کردند (جدول ۲). هیچگونه اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد در میزان قطر هاله بازداری بین سه جدایه مشاهده نشد.

شناسایی آنتاگونیست‌ها

جدایه‌های شماره ۱۱٤، ۱۱۹ و ۱۲۰ همگی گرم منفی، میله‌ای شکل و فلورسنت بوده ولی قادر به رشد در دمای ٤۱ درجه سانتی‌گراد نبودند. هر سه جدایه لوان، کاتالاز، اکسیداز، ژلاتیناز و آرجی‌نین‌دی–هیدرولاز تولید کرده و توانستند از آدونیتول، آرابینوز، دی–آلانین، سوکروز و سوربیتول استفاده نمایند. هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به استفاده از اتانول نبودند. براساس مشخصات یاد شده، هرسه جدایه آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شدند (Bradbury 1986, Kreig & Holt 1984).

کنترل بیولوژیکی بیماری لکه قهوه‌ای

هر سه جدایه آنتاگونیست (شماره ۱۱٤، ۱۱۹و ۱۲۰) درسطح قابل توجهی باعث کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- خصوصیات باکتری‌های بالقوه آنتاگونیست علیه باکتری عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ‌های خوراکی (*P. tolaasii*)

Table 2. Characteristics of the potantially antagonistic bacterial strians isolated from various sources towards *Pseudomonas tolaasii*

باکتری Strain	محل جداسازی Isolated from	میانگین قطر منطقه بازداری از رشد کلنی Inhibition of growth of *P.tolaasii*(mean diameter,in mm)	تولیدآنتی بیوتیک Antibiotic production	آزمون بافت برپایه Pathogehnicity on mushroom blocks	آزمون خط سفید White line reaction
102	چمن(Lawn)	0	–	–	–
114	مزرعه(Field soil)	14.99	+	–	–
115	کنارجوی آب(Stream bank)	0	–	–	–
119	پیت (Peat moss)	18	+	–	–
120	مرتع (Pasture soil)	14.77	+	–	–
215	چمن (Lawn)	0	–	–	–
215	باغ (Orchard soil)	0	–	–	+
P.tolaasii-2	پیت (Peat moss)	=	–	+	

+ , Production or positive reaction

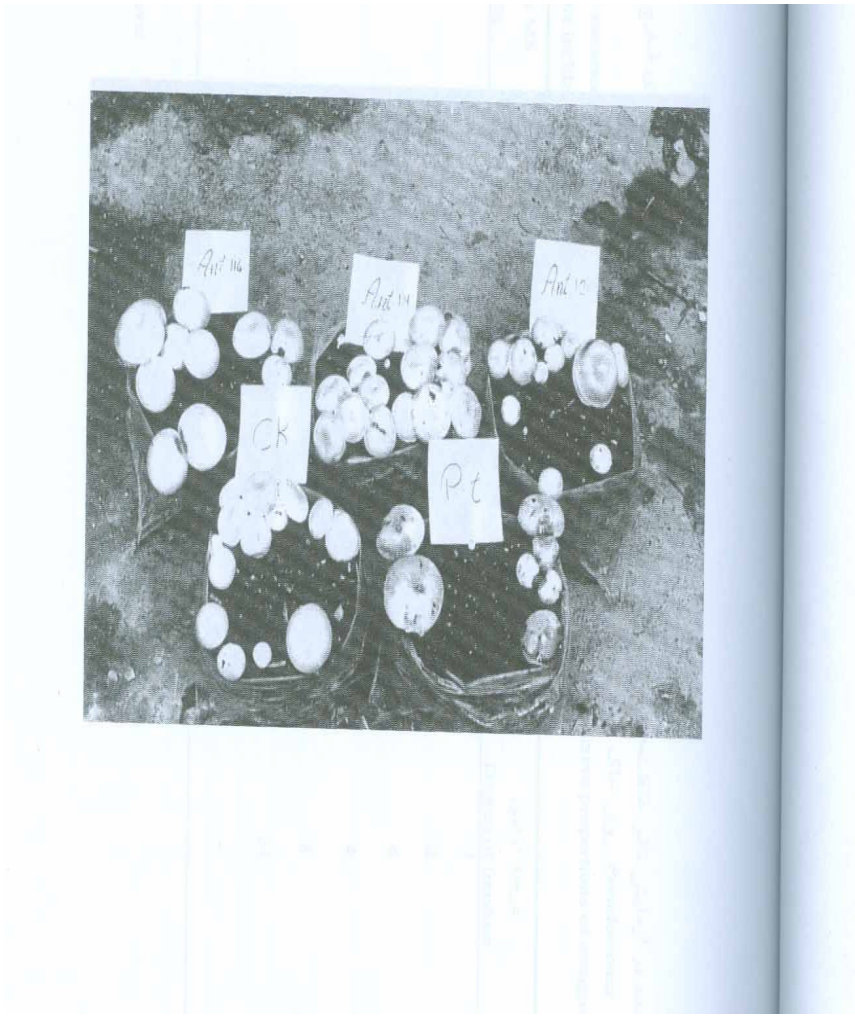
– , Non production or negative reaction

+ ، تولید یا ایجاد واکنش

– ، عدم تولید یاایجاد واکنش

www.SID.ir

Archive of SID

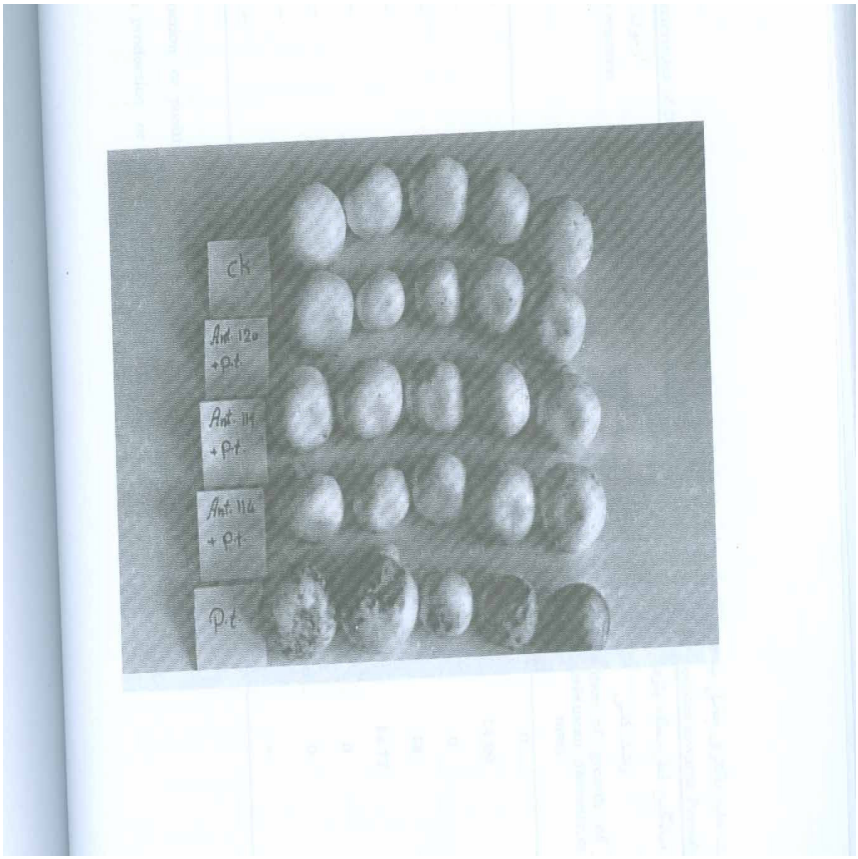


شکل ۱- مقایسه چگونگی علائم لکه قهوه‌ای روی کلاهک‌های تیمار شده با آنتاگونیست‌ها توام با *Pseudomonas tolaasii*، شاهد بدون آلودگی (CK) و شاهد با آلودگی توسط *P. tolaasii* (Pt.).

Fig. 1. Comparison of *Pseudomonas tolaasii* brown blotch symptoms on the pilei synchronously treated with antagonists (Ant. 114, Ant. 119, Ant. 120), control with no infection (ck) and control, infected with *P. tolaasii* (Pt.).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- مقایسه چگونگی علائم لکه قهوه‌ای در تیمارهای مختلف: شاهد بدون آلودگی (CK)، شاهد با آلودگی توسط *Pseudomonas tolaasii* (Pt.)، تیمار شده با سوسپانسیون پاتوژن- آنتاگونیست شماره 114 (Ant. 114)، با پاتوژن-آنتاگونیست شماره 119 (Ant. 119) و با پاتوژن-آنتاگونیست شماره 120 (Ant. 120).

Fig. 2. Comparsion of brown blotch symptoms in different treatments; control with no infection (Ck), *Pseudomonas tolaasii* infected control (pt.), treated with pathogen-Ant. 114, Pathogen-Ant. 119, and Pathogen-Ant. 120 suspensions. (Ant= antagonist strain).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ – تأثیر غلظت های مختلف سه باکتری آنتاگونیست در تقلیل بیماری لکه قهوه ای قارچ خوراکی (*A. bisporus*) در روش پاشیدن آنتاگونیست در مخلوط با *P. tolaasii*

روی خاک پوشش درزدی کلاهکها

Table 3. Effect of different proportions (population proportion) of antagonistic strains - *P. tolaasii* on the level of brown blotch control on *Agaricus bisporus* .

The mixed suspensions of the antagonists– pathogen, at different proportions, were applied to the soil at casing or later to the growing pilei

جدایه‌های آنتاگونیست Antagonist strains	شاهد Control: بدون آنتاگونیست و پاتوژن ۱ 1. no pathogen no antagonist		Control: فقط پاتوژن ۲ Pathogen, *P. tolaasii* only		تیمارها Treatments: ۱ : ۱ پاتوژن: آنتاگونیست Pathogen-antagonist at 1:1 ratio			۱:۵ پاتوژن: آنتاگونیست Pathogen-antagonist at 5:1 ratio			درصد کنترل بیماری (Control achieved %)
	تعداد کلاهک (No.of pileli)		تعداد کلاهک (No.of pileli)		تعداد کلاهک (No.of pileli)			تعداد کلاهک (No.of pileli)			
	سالم (Heaelty looking)	بیمار (Blotched)	سالم (Heaelty looking)	بیمار (Blotched)	سالم (Heaelty looking)	بیمار (Blotched)	درصد کنترل بیماری (Control achieved %)	سالم (Heaelty looking)	بیمار (Blotched)	درصد کنترل بیماری (Control achieved %)	
P. agglomerans	0	79	66	64	91	38	56.94	81	29	63.08	26
P. fluorescens	0	78	59	50	85	32	61.71	78	31	59.57	15
P. putida	0	72	70	68	92	39	56.37	86	28	66.49	18

* Three replications per treatment used

**% Control calculated by the equation 100- T/C 100

Where T = No, of blotched pilei in each treatment

and C = No, of blotched pilei in the control # 2 (inoculated with *P. tolaasii* alone)

* تیمارهای آزمایش ها در سه تکرار انجام شده است .

** درصد تنقل آلودگی بارابطه ۱۰۰ – (T/C) × ۱۰۰ محاسبه شده است.

T : تعداد کلاهک آلوده در تیمار

C : تعداد کلاهک آلوده در شاهد ۲

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- تجزیه واریانس پارامترهای اندازه‌گیری شده در آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف سه باکتری آنتاگونیست در تقلیل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی، در روش پاشیدن آنتاگونیست مخلوط با *Pseudomonas tolaasii* روی خاک پوششی وروی کلاهک‌ها در زمان ظهور کلاهک

Table 4. Analysis of variance of the parameters calculated in evaluation of the effects of different proportions of antagonists/ pathogen *(P. tolaasii)* applied (as mixture) on reducing the incidence of brown blotch on *Agaricus*

منابع تغییر	درجه آزادی	MS تعداد کلاهک	MS وزن کلاهک	MS درجه بندی آلودگی
Source of variation	Degree of freedom	MS, No .of pilei	MS, mushroom weight	MS, disease rating
(Replicates) تکرار	2	2.95	97.80	0.001
(Bacterial strains) باکتری	2	13.48	1740.01	0.002
(Error a) خطای a	4	5.55	1636.99	0.012
(Density) غلظت	4	81.74**	8320.96**	7.72**
(Strain x density) غلظت × باکتری	8	4.71	455.02	0.01
(Error b) خطای b	24	4.52	502.67	0.008
CV	-	8.25	6.61	5.12

MS = Mean squares

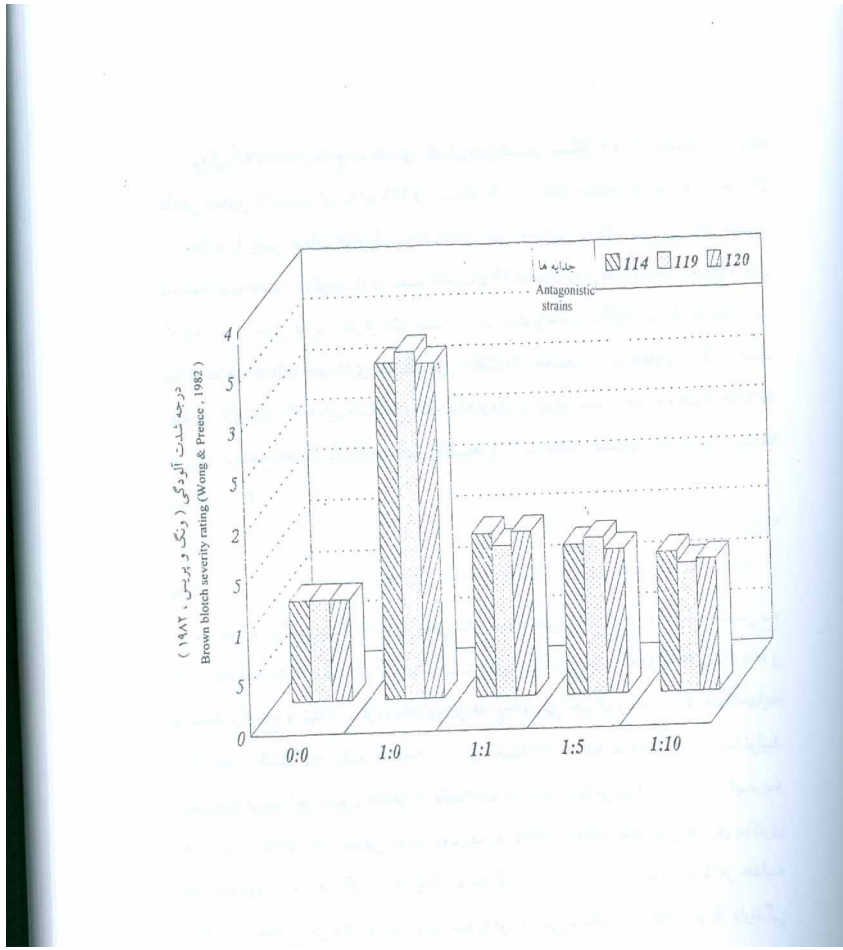
** Significant at 1% level

MS، متوسط مربع‌ها

**معنی دار در سطح یک درصد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- اثر نسبت‌های مختلف جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست نسبت به پاتوژن *Pseudomonas talaasii* در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی.

Fig. 3. Effect of different proportions of antagonist strains-pathogen on the level of control of brown blotch of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus)* caused by *Pseudomonas tolaasii.*

www.SID.ir

Archive of SID

آلودگی کلاهک‌های قارچ به بیماری لکه قهوه‌ای شدند (شکل ۱ و ۲). بیشترین سطح کاهش بیماری با استفاده از جدایه ۱۱۹ در نسبت ۱۰ : ۱ با عامل بیماریزا بدست آمد (جدول ۳). تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش بیانگر این بود که غلظت سوسپانسیون جدایه آنتاگونیست در سطح اطمینان ۹۹ درصد روی سه صفت تعداد و وزن کلاهک و نیز تقلیل علایم بیماری تأثیر مثبت دارد. باکتری‌های آنتاگونیست از لحاظ تأثیر نسبت به هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی غلظت‌های مختلف اثرات متفاوتی را نشان دادند (جدول ٤ و شکل ۳) .مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار درسطح احتمال یک درصد بین غلظت‌ها و اثرات متقابل غلظت و باکتری بین تیمارها بود (جدول ٤).

بحث

سه جدایه آنتاگونیست انتخاب وارزیابی شده (جدایه‌های ۱۱٤، ۱۱۹ و۱۲۰) که متعلق به گونه *P. fluorescens* بودند، اثرات آنتاگونیستی قابل توجهی علیه *P. tolaasii* نشان داده و توانستند از وقوع و شدت بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی جلوگیری نمایند. هر سه جدایه در شرایط آزمایشگاه از رشد *P. tolaasii* روی محیط‌کشت KB بازداری کرده، لذا تولید سیدروفور توسط آنها مسئول قسمتی از قابلیت بازدارندگی آنان می‌تواند به‌حساب آید. به علاوه شدت بازدارندگی مشابهی نیز در روی محیط PDA توسط هر سه جدایه روی باکتری عامل لکه قهوه‌ای مشاهده گردید که بیانگر تولید یک یا چند نوع آنتی‌بیوتیک توسط هر جدایه می‌باشد. در مجموع می‌توان توانایی تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک را در مکانیسم باز دارندگی این جدایه‌ها از رشد *P. tolaasii* دخیل دانست. نتایج بررسی‌های *فرمور و لینچ* (Fermor & Lynch 1988)، *هنری* و همکاران (Henry *et al*. 1991) و *خانا* وهمکاران (Khanna *et al*. 1990) نیز موید نقش تولید سیدروفور وآنتی‌بیوتیک‌ها در قابلیت کنترل بیولوژیک بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی توسط جدایه‌های *P. fluorescens* biov. 1 است. سه جدایه دارای قابلیت‌های بازدارندگی و کنترل کنندگی بیماری لکه قهوه‌ای، هیچ‌یک روی

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ خوراکی بیماریزا نبوده و اثر سو یا منفی در رشد ریسه‌های *A. bisporus* و یا در کمیت و کیفیت کلاهک‌های تولیدی نداشتند. این جدایه‌ها از خاک مزرعه (شماره ۱۱٤)، تورب (پیت، peat) (شماره ۱۱۹) و از خاک مرتع (شماره ۱۲۰) جداسازی شده بودند. با توجه به متفاوت بودن منابع یا زیستگاه اصلی آنها، هر سه قابلیت مشابهی در تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک و نیز کنترل بیماری لکه قهوه‌ای نشان دادند.

جدایه‌های آنتاگونیست معرفی شده به‌علت نداشتن اثرات سو روی سرعت رشد ریسه‌ای *A. bisporus* و یا روی میزان و کیفیت محصول کلاهک تولیدی می‌توانند به عنوان عوامل سودمندی در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (232-229) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: حسین خبّازجلفایی، بخش تحقیقات بیماریهای گیاهی موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران؛ ابراهیم محمدی گل‌تپّه، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس حشمت‌اله رحیمیان، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری

www.SID.ir