

## جداسازی، انتخاب و ارزیابی باکتریهای آنتاگونیست در کنترل

### 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 خبازجلفائی\*، ابراهیم محمدی گل‌تپه و حشمت‌اله رحیمیان

گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس و دانشکده علوم

کشاورزی دانشگاه مازندران

پذیرش ۱۳۸۴/۸/۲۵

دریافت ۱۳۸۴/۴/۱۷

#### 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 ۴۰۶

\* مسئول مکاتبه

جدایه بدست آمده از خاک وپیت، هفت جدایه در شرایط آزمایشگاه علیه *P. tolaasii* فعالیت باز دارنده داشته و به هنگام تلقیح توأم با تراکم‌های جمعیتی برابر یا ده برابر عامل بیماریزا از تشکیل حفرات فرو رفته بر روی قارچ خوراکی جلوگیری کردند.

سه جدایه از این آنتاگونیست‌های بالقوه که براساس خصوصیات فنوتیپی *P. fluorescences* تشخیص داده شدند، در شرایط سالن علیه *P. tolaasii* فعالیت بازدارندگی نشان داده و به‌طور مشخص وقوع و شدت لکه قهوه‌ای را بر روی قارچ‌های پرورش داده شده تحت شرایط تولید تجاری کاهش دادند.

### واژه‌های کلیدی: لکه قهوه‌ای، قارچ خوراکی، کنترل بیولوژیکی

#### مقدمه

لکه قهوه‌ای قارچ‌های خوراکی (*Agaricus bisporus* و *Pleurotus* spp.) از مهمترین و شایع‌ترین بیماری‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای درسالن‌های پرورش صنعتی و سنی است. این بیماری توسط *Pseudomonas tolaasii* ایجاد می‌شود (Preece 1979, Fermor & Wong 1986). بیماری لکه قهوه‌ای در قارچ کاری‌های استان تهران، همدان، آذربایجان شرقی، اصفهان و کرمان (محمّدی و پورجم ۱۹۹۵، خبازجلفائی و رحیمیان، ۲۰۰۲) و مازندران (رحیمیان و زارعی ۱۹۹۵) و نیز روی قارچ‌های جنس *Scleroderma* در جنگل‌های مازندران (رحیمیان و زارعی ۱۹۹۶) وجود دارد. روش‌های متعددی مبتنی بر رعایت اصول بهداشتی، کاربرد ضدعفونی کننده‌ها، محلول‌پاشی با سموم یا بازدارنده‌های رشد باکتری، مدیریت صحیح آبیاری و تنظیم 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 کارگیری میکروارگانیسم‌های بازدارنده و آنتاگونیست در پیشگیری و مبارزه با بیماری لکه قهوه‌ای انجام شده است (Miller & Spear 1995, Khanna & Olivier 1989, Liao et al. 1980, Nair & Fahy 1976). اولین بار پژوهشگران استرالیایی اثر آنتاگونیست‌ها را علیه بیماری لکه قهوه‌ای مورد آزمایش قرار

دادند (Nair & Fahy 1972). انجام بررسی‌های بیشتر در استرالیا (Nair & Fahy 1976) و تایوان (Liao et al. 1980) منجر به تهیه و عرضه فرآورده‌هایی از عوامل آنتاگونیست (شامل جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* و گونه‌هایی از جنس *Pseudomonas*) گردید که در سالن‌های پرورش قارچ قابل استفاده بودند. در هند جدایه‌هایی از بیوار یک (*P. fluorescens* biovar I) که از خاک پوشش و کلاهک قارچ خوراکی جداسازی شده بود، کارآیی موثری در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای داشتند (Khanna & Olivier 1989). هدی و هروی نشان دادند که رشد عامل بیماری لکه قهوه‌ای در اثر استقرار قبلی جدایه‌هایی از *P. fluorescens* بشدت کاهش می‌یابد (Heady & Harvey 1989). اثر یک فرآورده بیولوژیک حاوی *P. fluorescens* بنام ویکتوس (Victus) علیه *P. tolaasii* مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج قابل قبولی را ارائه داده است (Miller & Spear 1995).

هدف از بررسی اخیر جداسازی و شناسایی عوامل بالقوه آنتاگونیست باکتریایی از منابع مختلف و بررسی کارآیی این عوامل در پیشگیری از آلودگی یا کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی رشد یافته در شرایط ایران می‌باشد.

### روش بررسی

#### جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

یکصد نمونه از کمپوست، خاک پوششی سالن‌های پرورش قارچ، کلاهک‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای، خاک مزارع، مراتع و جنگل‌های مناطق مازندران، گیلان و کلبر جمع‌آوری شده و تا زمان مصرف در سردخانه (+4 درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید. جهت جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از این نمونه‌ها از روش فرمور و لینچ (Fermor & Lynch 1988) استفاده شد. از نمونه‌های خاک و کمپوست جمع‌آوری شده از سالن‌های پرورش قارچ، رقت‌های ۱۰<sup>۸</sup> تا ۱۰<sup>۱۰</sup> و در مورد نمونه کلاهک‌های قارچ با شستن توسط آب مقطر و خاک‌های جمع‌آوری شده از طبیعت، رقت‌های ۱۰<sup>۴</sup> و ۱۰<sup>۵</sup> در آب مقطرسترون تهیه شد. از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر به سطح محیط کشت نوترینت آگار مغذی سوکروز دار (NAS) و کیننگ ب

(King medium B , KB) منتقل و به کمک میله شیشه‌ای خم بطور یکنواخت پخش گردید. در جداسازی باکتریها از کلاهک، لایه بیرونی (پریدرم) کلاهک با تیغ سترون از بقیه قسمت‌ها جدا، در آب مقطر سترون بمدت ۲۰ دقیقه تکان داده شده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله روی محیط‌های NAS و KB پخش گردید. برای هر رقت دو تشتک پتری از هر محیط کشت به کار برده شد. تشتک‌های پتری در دمای  $1 \pm 25$  درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از ۴۸ 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 منظور انتخاب جدایه‌های غیربیماریزا و بالقوه آنتاگونیست

آزمون بیماریزایی ۴۰۰ جدایه باکتری بدست آمده از بسترهای قارچ، خاک و سطح کلاهک به همراه ۶ 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 ۲۴ و ۴۸ ساعت نگهداری تشتک‌ها در دمای  $1 \pm 25$  درجه سانتی‌گراد ایجاد حفره یا بروز عوارض احتمالی دیگر روی بلوک‌های مایه‌زنی شده ارزیابی گردید.

### بررسی تأثیر جدایه‌ها روی رشد ریشه *A. bisporus*

اثرات جدایه‌هایی که قادر به آلوده نمودن بلوک‌های قارچ نبودند، روی رشد ریشه (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 از ۲۴ 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 فاصله 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 روش ارزیابی سریع (Rapid screening)

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

خوراکی بیماریزا نبودند، سوسپانسیون به غلظت تقریبی  $1 \times 10^8$  سلول باکتری<sup>۱</sup> (cfu) 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 ۶۰ 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 ۲۴ و ۴۸ ساعت ارزیابی و با شاهد (بلوک و کلاهک 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 فارچ خوراکی به *P. tolaasii* یا موجب کاهش شدت علائم لکه قهوه‌ای گردیدند انتخاب شده و خصوصیت آنتاگونیستی آنها براساس تولید سیدروفور یا آنتی‌بیوتیک (Henry *et al.* 1991) بررسی گردید: الف- خصوصیت بازداری از رشد بر پایه تولید سیدروفور، طبق روش میثاقی 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 باضافه ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر  $FeCl_3$  ریخته شد. سپس جدایه‌ای آنتاگونیست بصورت لکه‌ای در فواصل یکسان از هم روی محیط KB با یا بدون  $FeCl_3$  کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون کدر (حاوی  $1 \times 10^8$  cfu/ml) *P. tolaasii* روی محیط با محلول‌پاش پاشیده و تشتک‌های پتری دوباره در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. قطر هاله بازداری از رشد *P. tolaasii* برای هر جدایه ۴۸ ساعت بعد اندازه‌گیری گردید.

<sup>1</sup> Colony forming unit

ب- نقش آنتی‌بیوتیک تولیدی جدایه‌های آنتاگونیست در بازداری 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 محیط کشت KB بصورت لکه‌ای در فواصل یکسان روی محیط PDA کشت شدند و پس از ۹۶ ساعت رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون کدر (حاوی  $1 \times 10^8$  cfu/ml *P. tolaasii*) روی محیط با محلول پاش پاشیده و تشک‌های پتری دوباره در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. قطر هاله بازداری از رشد *P. tolaasii* برای هر جدایه ۴۸ 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، آرچی‌نین‌دی‌هیدرولاز، هیدرولیز ژلاتین، احیا نیترات، رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد، تولید لوان، لهانیدن برش‌های سیب‌زمینی و مصرف ادونیتول، ال-آرابینوز، ال-والن، 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  $1 \pm 25$  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 ۱۱۴، ۱۱۹، و ۱۲۰ آنتاگونیست که در بررسی‌های آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی مناسبی داشتند و امیدبخش بودند (جدایه‌های ۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰) و *P. tolaasii* در غلظت  $1 \times 10^8$  cfu/ml آب مقطرسترون تهیه شد. نسبت‌های صفر: صفر، ۱:۱، ۱:۵، ۱:۱۰ و ۱:۱۰ (اعداد سمت راست آنتاگونیست و سمت چپ *P. tolaasii*)

## Archive of SID

می‌باشد) از مخلوط سوسپانسیون‌های جدایه آنتاگونیست با باکتری عامل بیماری تهیه و در قالب یک طرح بلوک‌های خرد شده با زمینه 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 ۴۰۶ جدایه باکتری بدست آمد. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

#### عدم بیماری‌زایی باکتری‌های آنتاگونیست احتمالی روی قارچ خوراکی

تمامی ۴۰۶ جدایه باکتری بدست آمده روی بلوک‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای مایه‌زنی شده و واکنش بلوک‌ها بررسی گردید. از ۴۰۶ جدایه، ۲۵۴ جدایه هیچگونه علایمی روی بلوک‌های قارچ ایجاد نکردند (جدول ۱). جدایه‌های مزبور برای بررسی قابلیت بازداری از رشد میسلیم *A. bisporus* به کار برده شدند. هیچکدام از جدایه‌های انتخابی اثر سوئی روی رشد میسلیم 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 ۲۵۴ جدایه، جدایه‌های شماره ۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰ بطور

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های باکتریایی بدست آمده از منابع و بسترهای مختلف جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی علیه *Pseudomonas tolaasi*

کد نمونه Code of specimens	منبع نمونه‌برداری Source of isolates	تعداد نمونه جمع‌آوری شده Number of samples	تعداد جدایه جداسازی شده No. of strains isolated	تعداد جدایه‌های با رنگ‌زایی No. of strains with diffusible pigment	تعداد جدایه‌های فاقد رنگ‌زایی No. of strains lacking diffusible pigment	تعداد جدایه‌های غیر مضرب به پیلری و کلاسیک‌های فانچ No. of strains without inhibitory effect on mushroom growth
PE	پیت (Peat moss)	10	40	14	26	31
CO	کپورست (Compost)	5	20	9	13	17
CU	سکس (Pilet of <i>Agaricus bisporus</i> )	5	20	12	8	9
MR	مریح 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	کار تیرآب (Stream bank)	12	48	11	37	45

کامل از ظهور علایم جلوگیری نمودند.

#### تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌ها

از بین هفت جدایه نامزد جهت بررسی خصوصیت بازداری از رشد با تولید سیدروفور یا آنتی‌بیوتیک، سه جدایه (۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰) توانستند در بخشی از سطح محیط KB که فاقد  $FeCl_3$  بود هاله بازدارندگی به قطر متوسط 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 جدایه مذکور، در اطراف خود هاله بازدارندگی به قطر متوسط ۱۴ میلی‌متر ایجاد کردند.

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

از هفت جدایه انتخابی بررسی شده، سه جدایه (شماره ۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰) با اختلاف جزئی از هم موجب بازداری از رشد باکتری *P. tolaasii* شدند و چهار جدایه دیگر (شماره ۱۰۲، ۱۱۵، ۲۱۵ و ۳۱۴) تأثیری در رشد باکتری پاتوژن نداشتند (جدول ۲). از بین هفت جدایه مقایسه شده جدایه‌های شماره ۱۱۴، 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 ۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰ همگی گرم منفی، میله‌ای شکل و فلورسنت بوده ولی قادر به رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد نبودند. هر سه جدایه لوان، کاتالاز، اکسیداز، ژلاتیناز و آرچی‌نین‌دی‌هیدرولاز تولید کرده و توانستند از آدونیتول، آرابینوز، دی‌آلانین، سوکروز و سوربیتول استفاده نمایند. هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به استفاده از اتانول نبودند. براساس مشخصات یاد شده، هر سه جدایه آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* تشخیص داده شدند (Bradbury 1986, Kreig & Holt 1984).

#### کنترل بیولوژیکی بیماری لکه قهوه‌ای

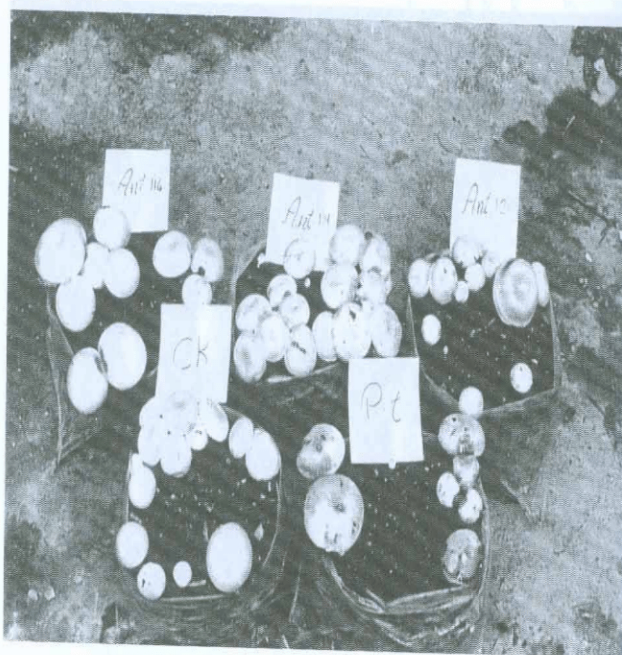
هر سه جدایه آنتاگونیست (شماره ۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰) در سطح قابل توجهی باعث کاهش

جدول ۲- خصوصیات باکتری‌های بالقوه آنکارینست علیه باکتری عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ‌های خوراکی (*P. tolaasi*)  
 Table 2. Characteristics of the potentially antagonistic bacterial strains isolated from various sources towards *Pseudomonas tolaasi*

پاکتری Strain	محل جداسازی Isolated from	میانگین قطر منطقه بازداری از رشد کلنی Inhibition of growth of <i>P. tolaasi</i> (mean diameter, in mm)	تولید آنتی بیوتیک Antibiotic production	آزمون بافت بریده Pathogenicity on mushroom blocks	آزمون خط سفید White line reaction
102	چمن (Lawn)	0	-	-	-
114	مزرعه (Field soil)	14.99	+	-	-
115	کنار جوی آب (Stream bank)	0	-	-	-
119	پیت (Peat moss)	18	+	-	-
120	مربع (Pasture soil)	14.77	+	-	-
215	چمن (Lawn)	0	-	-	-
215	باغ (Orchard soil)	0	-	-	-
<i>P. tolaasi</i> -2	پیت (Peat moss)	=	-	+	+

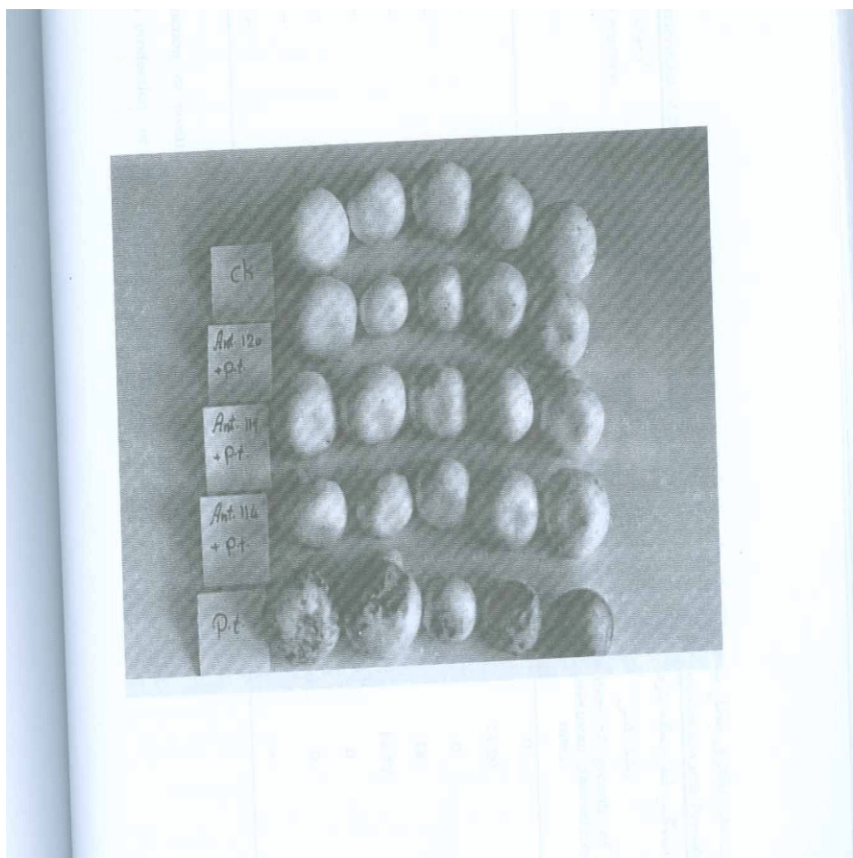
+, Production or positive reaction  
 -, Non production or negative reaction

+, تولید یا ایجاد راکش  
 -, عدم تولید یا ایجاد واکنش



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).



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 ۱۱۴ (Ant. 114)، با پاتوژن-آنتاگونیست شماره ۱۱۹ (Ant. 119) و با پاتوژن-آنتاگونیست شماره ۱۲۰ (Ant. 120).

Fig. 2. Comparison 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).

جدول ۳- تاثیر غلظت های مختلف سه باکتری آنتاگونیست در کنترل بیماری لکه قهوه ای قارچ خوراکی (*A. bisporus*) در روش پاشیدن آنتاگونیست در مخلوط با *P. tolosasi* روی خاک پرورش روی کلاهکها

Table 3. Effect of different proportions (population proportion) of antagonistic strains - *P. tolosasi* 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 pile

درصد باکتری آنتاگونیست (Control achieved %)	تیمارها			کنترل			بدون آنتاگونیست و پاتوژن ۱ 1: no pathogen no antagonist	چنانچه آنتاگونیست
	پاتوژن آنتاگونیست ۱:۱ ۱:۱ ratio	پاتوژن آنتاگونیست ۱:۱ 1:1 ratio	پاتوژن آنتاگونیست ۱:۱ 1:1 ratio	مقدار پاتوژن ۲ ۲: Pathogen, <i>P. tolosasi</i> only	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)		
	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)	تیمارهای سالم (No. of pilet)	Antagonist strains
۶۶.۰۶	۲۶	۷۹	۶۱.۰۸	۲۹	۸۱	۵۶.۹۴	۳۸	۹۱
۷۸.۲۱	۱۵	۷۰	۵۹.۵۷	۳۱	۷۸	۶۱.۷۱	۳۲	۸۵
۷۴.۶۲	۱۸	۷۳	۶۶.۴۹	۲۸	۸۶	۵۶.۳۷	۳۹	۵۰
								۶۶
								۵۹
								۰
								۷۹
								۱۱۴
								۱۱۹
								۱۲۰

\* تیمارهای آزمایش ها در سه ککر انجام شده است.  
 \*\* درصد کنترل آلودگی با رابطه  $100 - (T/C) \times 100$  محاسبه شده است.  
 T: تعداد کلاهک آلوده در تیمار  
 C: تعداد کلاهک آلوده در شاهد ۲

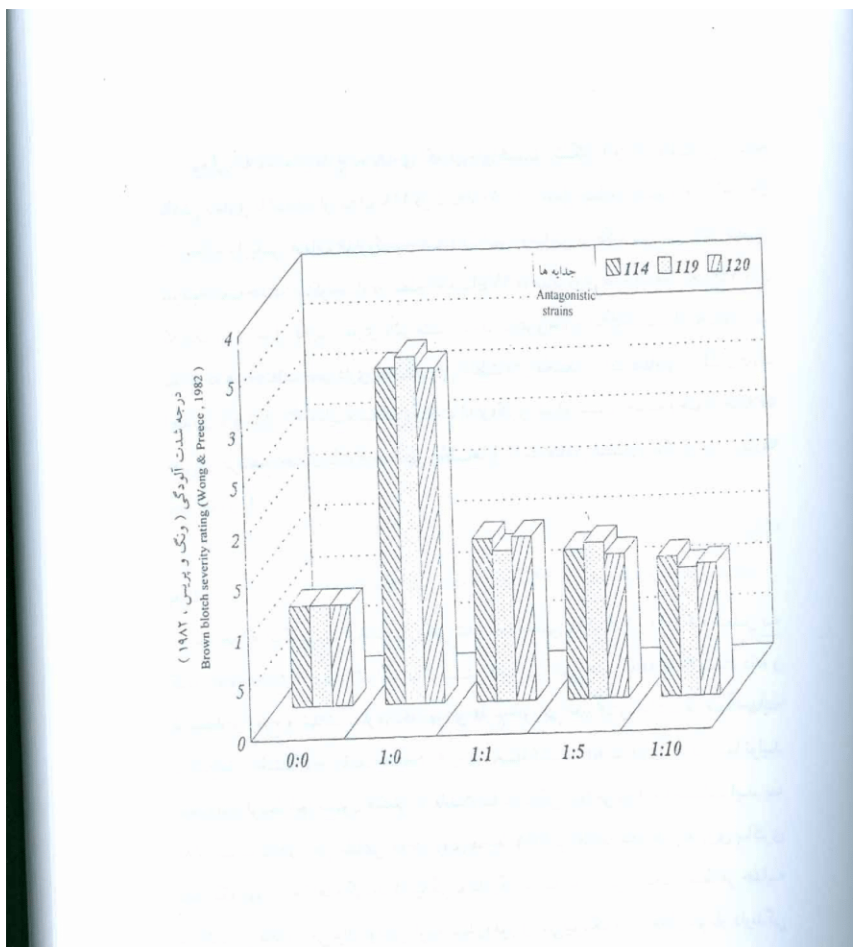
جدول 4- تجزیه واریانس پارامترهای اندازه‌گیری شده در آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف سه باکتری آنتاگونیست در تقلیل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی، در روش پاشیدن آنتاگونیست مخلوط با *Pseudomonas tolaasi* روی پوششی ورزی کلاهک‌ها در زمان ظهور کلاهک

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

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

M.S = Mean squares  
\*\* Significant at 1% level

M.S، متوسط مربع‌ها  
\*\* معنی‌دار در سطح یک درصد



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 talaasii*.

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 ۴ و شکل ۳). مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بین غلظت‌ها و اثرات متقابل غلظت و باکتری بین تیمارها بود (جدول ۴).

### بحث

سه جدایه آنتاگونیست انتخاب و ارزیابی شده (جدایه‌های ۱۱۴، ۱۱۹ و ۱۲۰) 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 به حساب 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 و همکاران (Khanna et al. 1990) نیز موید نقش تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک‌ها در قابلیت کنترل بیولوژیک بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی توسط جدایه‌های *P. fluorescens* biov. 1 است. سه جدایه دارای قابلیت‌های بازدارندگی و کنترل‌کنندگی بیماری لکه قهوه‌ای، هیچ‌یک روی

## Archive of SID

قارچ خوراکی بیماریزا نبوده و اثر سو یا منفی در رشد ریشه‌های *A. bisporus* و یا در کمیت و کیفیت کلاهک‌های تولیدی نداشتند. این جدایه‌ها از خاک مزرعه (شماره ۱۱۴)، 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 به علت نداشتن اثرات سو روی سرعت رشد ریشه‌ای *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 (229-232) متن انگلیسی مراجعه شود.

---

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