Archive of SID

نشریه دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۲ (ص۲۶۲-۲۵۳)

ارزیابی جدایه‌های *Bacillus* در کنترل بیولوژیکی پوسیدگی سفید ریشهٔ سیر ناشی از قارچ *Sclerotium cepivorum* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

جهانشیر امینی[1*]، نسرین بابایی[2]، محمدجواد سلیمانی[3] و بهروز حریقی[4]
۱، ۲، ۴، دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، ۳، دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۱۹ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۰/۳)

چکیده

بیماری پوسیدگی سفید ریشهٔ سیر با عامل *Sclerotium cepivorum* یکی از بیماری‌های مهم سیر در استان همدان است. در این تحقیق، بعد از جداسازی بیمارگر از گیاهان آلوده، با آزمون اثبات بیماری‌زایی مناسب‌ترین جدایه برای مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب گردید. ۱۷۵ جدایه باکتری از خاک و منطقهٔ ریزوسفر گیاه سیر در مزارع شهرستان همدان جداسازی و خالص‌سازی شد. توانایی جدایه‌ها در مقابل بیمارگر بر اساس تشکیل هالهٔ بازدارندگی در آزمون چهارنقطه‌ای و کشت متقابل ارزیابی شد. ده جدایه که هالهٔ بازدارندگی بیشتری ایجاد کردند، به عنوان جدایهٔ برتر برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند. مطالعات روی جدایه‌های انتخاب‌شده نشان داد که همهٔ آنها متعلق به جنس باسیلوس هستند. مکانیسم تأثیر جدایه‌های باکتری از نظر تولید پروتئاز، ترکیبات فرار ضدقارچی، ترکیبات خارج سلولی و سیانید هیدروژن روی رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. تمامی جدایه‌ها، ترکیبات فرار و ترکیبات خارج سلولی تولید و باعث کاهش رشد بیمارگر با تأثیر متفاوت شدند. جدایه‌های B9، B21 و B12 تولید پروتئاز کردند، اما هیچ‌کدام از جدایه‌ها تولید سیانید هیدروژن نکردند. تأثیر جدایه‌ها بر بیمارگر در شرایط گلخانه با دو روش آغشته‌سازی خاک و آغشته‌سازی سیرچه‌ها ارزیابی شد. نتایج گلخانه‌ای نشان داد که تمام جدایه‌ها موجب کاهش بیماری شدند. جدایه‌های B12, B21, B3, B20 و B93 در مقایسه با شاهد در هر دو روش بیشتر از بقیه (بیش از ۷۳ درصد) به‌طور معناداری باعث کاهش بیماری شدند. جدایه‌های B3 و B21 بیشترین تأثیر را بر کاهش بیماری داشتند (۸۳/۳-۷۳ درصد). همچنین تأثیر جدایه‌های باکتری بر رشد اندام‌های گیاه سیر متفاوت بود و بین آنها در سطح یک درصد ($P \leq 0.01$) تفاوت معنادار وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، باکتری‌های آنتاگونیست، بیماری پوسیدگی سفید سیر، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

سیر (*Allium sativum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زیر کشت در استان همدان محسوب می‌شود (Mehdizadeh *et al.*, 2008). عوامل بیماری‌زای قارچی زیادی کشت گیاه سیر را تهدید می‌کند. بیماری پوسیدگی سفید سیر با عامل *Sclerotium cepivorum* Berk. یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های سیر است (Sumner, 1999). در استان همدان، این بیماری هر ساله خسارت قابل‌توجهی

* نویسنده مسئول: جهانشیر امینی تلفن: ۰۹۱۸۸۷۲۳۵۶۳ E-mail: Aminij2002@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

به این محصول وارد می‌کند (Mehdizadeh, 2008). بیماری اولین بار در سال ۱۸۴۱ توسط Berk در کشور مصر از روی پیاز شناسایی شد (Berk, 1841). علاوه بر این، بیماری از کشورهای ایتالیا، آمریکا و اسپانیا از روی پیاز، ترەفرنگی، سیر و موسیر گزارش شده است (Asthana, 1947). در ایران حجاورد و همکاران (۱۳۷۰) بیماری پوسیدگی سفید سیر را در آذربایجان شرقی گزارش و عامل بیماری را *S. cepivorum* معرفی کردند (Hejarud *et al*., 1993). در استان همدان نیز مهدی‌زاده (۱۳۸۶) این بیمارگر را از روی سیر شناسایی و گزارش کرد (Mehdizadeh *et al*., 2008).

عامل انتشار، دوام و بقای بیماری سختینه‌های قارچ است. سختینه‌های عامل بیماری بعد از تشکیل روی گیاه میزبان چندین سال در خاک به حالت کمون به سر می‌برند و بقای سختینه‌ها تا ۲۰ سال نیز گزارش شده است. در اثر ترشحات ریشهٔ گیاه سیر، سختینه‌ها فعال می‌شوند و شروع به فعالیت می‌کنند (Coley-Smith & Holt, 1966). روش‌های مختلفی از جمله روش‌های شیمیایی و فیزیکی (آفتاب‌دهی) برای کنترل بیماری پوسیدگی سفید سیر گزارش شده است (Adams, 1987; Tyson *et al*., 2000). استفاده از روش کنترل بیولوژیکی یکی از روش‌های کنترل این بیماری است (Barding & Huang, 2001). اولین گزارش از کنترل بیولوژیک عامل بیماری با استفاده از جدایه‌های باسیلوس و قارچ تریکودرما توسط غفار انجام گرفته است (Ghafar, 1968). بسیاری از گونه‌های باکتری باسیلوس از جمله *B. subtilis* به عنوان عامل کنترل بیولوژیک علیه بسیاری از بیمارگرهای گیاهی به‌کار می‌روند (Hou *et al*., 2006). گونه‌های جنس باسیلوس، به‌ویژه *B. subtilis* و *B. lichiformis* با تولید آنتی‌بیوتیک مانع از رشد قارچ *S. cepivorum* شدند (Wong & Hughes, 1986). جدایه‌های باکتری باسیلوس موجب کاهش رشد قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiurum* می‌شوند (Mc night & Rossal, 1990). نتایج تحقیقات کریمی و همکاران (۱۳۸۶) نشان داد که جدایه‌هایی باسیلوس و سودوموناس جداسازی‌شده از منطقهٔ ریزوسفر ریشهٔ میخک روی بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک تأثیر مناسبی دارند (Mehdizadeh *et al*., 2008). باکتری‌های باسیلوس با کلونیزه کردن ریشهٔ گیاهان تأثیرات زیادی بر رشد گیاه دارند (Sharma & Johri, 2003). همچنین تحقیقات نشان داده است که گونه‌های باسیلوس علاوه بر رشد گیاه، سبب تحریک مقاومت سیستمیک در گیاه در مقابل بیماری‌ها می‌شوند (Yousefi *et al*., 2010).

هدف از اجرای این تحقیق، تعیین قدرت بازدارندگی از رشد قارچ *S. cepivorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر توسط جدایه‌های باکتری باسیلوس در شرایط آزمایشگاه و گلخانه است.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ بیمارگر

نمونه‌برداری از مزارع آلودهٔ همدان طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۸۸ در فصل بهار انجام گرفت. قطعات آلودهٔ گیاه سیر از قبیل ریشه و طوقه پس از شست‌وشو با آب مقطر سترون و ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد روی محیط Potato Dextrose Agar (PDA) کشت و با روش نوک هیف خالص‌سازی صورت گرفت. نمونه‌ها در یخچال روی محیط کشت PDA در دمای ۴ ^{o}C نگهداری گردیدند.

تهیهٔ مایه تلقیح بیمارگر

مایهٔ تلقیح بیمارگر روی گندم‌های سترون شده در داخل ارلن‌ها به روش Sansford و Coley (1992) تهیه و تکثیر شد.

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های بیمارگر

جهت ارزیابی توانایی بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری از روشGhafar (1968) به‌صورت تلقیح مایه بیمارگر با خاک در زمان کشت استفاده شد و مناسب‌ترین جدایه از نظر بیماری‌زایی انتخاب گردید.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

نمونه‌های باکتری‌های آنتاگونیست از منطقهٔ فراریشهٔ سیر و خاک اطراف ریشهٔ گیاهان سالم مزارع سیر در مناطق برفجین، توئجین، مریانج، سولان، شورین و بهار استان همدان جمع‌آوری شد. جداسازی جدایه‌های باسیلوس از خاک و خالص‌سازی آنها به روش Schaad (2001) در محیط کشت NA انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی تأثیر عوامل آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

جهت بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری به روش میکائیل و نلسون (Michael & Nelson, 1972) با استفاده از دو روش کشت متقابل و کشت چهارنقطه‌ای در محیط کشت PDA در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. نتایج داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه و تحلیل آماری شد و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد انجام گرفت.

آزمون‌های افتراقی برای شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست در حد جنس

در ابتدا جدایه‌های انتخاب‌شده بر اساس دستورالعمل شاد (Shaad., 2001) و منبع پروکاریوت‌ها (Dworkin *et al*., 2007) از طریق مشاهدهٔ شکل کلونی، رنگ‌آمیزی گرم، واکنش در پتاس سه درصد، رشد هوازی و غیرهوازی و رنگ‌آمیزی اسپور برای تشخیص جنس ارزیابی شدند. سپس برای تشخیص گونه نیز از تست‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی (شکل کلونی، واکنش گرم، تولید اسپور، موقعیت مرکزی اسپور، موقعیت اسپور انتهایی، موقعیت اسپور زیرانتهایی، اکسیداز، کاتالاز، استفاده از سیترات، هیدرولیز نشاسته، رشد در نمک طعام هفت درصد، رشد در اسیدیته ۵/۷، رشد بی‌هوازی در گلوکز مایع، مصرف آرابینوز، مانیتول و زایلوز، رشد در ۴۵°C، آزمون متیل رد استاندارد استفاده شد (Shaad., 2001; Dworkin *et al*., 2007).

بررسی روش‌های بیوکنترلی جدایه‌های باکتری روی قارچ بیمارگر

در این بررسی تأثیرات ضدقارچی ترکیبات خارج سلولی، متابولیت‌های فرار، تولید سیانید هیدروژن و تولید پروتئاز بر قارچ بیمارگر بررسی شد.

آزمون تولید پروتئاز

این آزمون بر اساس روش چانتاکول و همکاران (Chantawnnakul *et al*., 2002) روی محیط کشت (Skim Milk Agar)(SMA) در داخل تشتک پتری انجام گرفت. تشتک حاوی (SMA) به‌صورت لکه‌ای با جدایه‌های باکتری تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. میانگین شعاع هالهٔ بازدارندهٔ بی‌رنگ در اطراف کلونی جدایه‌های مختلف باکتری بر حسب میلی‌لیتر اندازه‌گیری و به عنوان یک شاخص برای ارزیابی قابلیت تولید پروتئاز استفاده شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت.

آزمون تولید ترکیبات فرار ضدقارچی

این آزمون بر اساس روش فیدامن وروزال (Fiddaman & Rossall, 1993) انجام گرفت. در ابتدا سوسپانسیونی به غلظت 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر از کشت جوان هر یک از استرین‌های باکتری تهیه و به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از هر کدام آنها روی محیط کشت آگار غذایی (NA) حاوی ۲ درصد گلوکز کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سلسیوس در داخل انکوباتور نگهداری شد. سپس به جای سرپوش تشتک‌ها یک تشتک دیگر دارای محیط کشت PDA حاوی قارچ بیمارگر قرار داده شد و فاصلهٔ بین آنها با پارافیلم کاملاً مسدود شد، به‌طوری که تشتک حاوی باکتری در قسمت پایین و تشتک حاوی قارچ بیمارگر در قسمت بالا قرار گرفت. در تیمار شاهد به جای باکتری، آب مقطر سترون قرار داده شد. پس از نگهداری تشتک‌ها در داخل انکوباتور به مدت سه شبانه‌روز در دمای ۲۸-۲۵ درجهٔ سلسیوس، درصد کاهش رشد کلونی قارچ بیمارگر نسبت به شاهد که فاقد باکتری بود اندازه‌گیری شد و از طریق فرمول زیر تعیین گردید (Niknejad, 2004).

= درصد کاهش رشد کلونی نسبت به شاهد

۱۰۰ × [(قطر کلونی در پتری دیش شاهد)/ (قطر کلونی در پتری تیمار)] -۱

آزمون تولید ترکیبات مایع خارج سلولی

این آزمون بر اساس روش کرائوس و لوپر (Kraus & Loper, 1990) انجام گرفت. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری توسط میله‌ای روی سطح محیط کشت PDA پخش گردید. در تیمار شاهد آب مقطر سترون روی این محیط اضافه شد. سپس همهٔ تشتک‌ها به مدت ۳ شبانه‌روز در دمای ۲۸-۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. پس از این مدت، کلونی باکتری‌ها از سطح محیط کشت با استفاده از میله‌ای شیشه‌ای و آب مقطر سترون شسته شد. به

www.SID.ir

Archive of SID

منظور حذف کامل باکتری‌ها، تشتک‌های مربوط به مدت ۴۵ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار داده شد و سپس در زیر هود سترون قرار داده شد. آنگاه یک قرص ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ قارچ بیمارگر در وسط تشتک پتری‌ها قرارداده شد و به مدت چهار شبانه‌روز در دمای ۲۸-۲۵ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار بررسی شد. درصد کاهش رشد کلونی قارچ بیمارگر مانند روش قبل محاسبه و اندازه‌گیری شد (Niknejad, 2004).

آزمون تولید سیانید هیدروژن

به منظور بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم و همکاران (Alstrom, 1987) استفاده گردید. در این روش روی محیط حاوی آگار غذایی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و ۵٪ اسید پیکریک) در قسمت داخل درب پتری قرار داده شد و درِ پتری با نوار پارافیلم مسدود گردید. بعد از آن پتری‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ هفته نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی رنگ زرد به کرم نارنجی ، نشانهٔ تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری بود.

مطالعهٔ میکروسکوپی تأثیر بازدارندگی جدایه‌های باکتری بر میسلیوم‌های قارچ بیمارگر

برای این کار از حاشیهٔ پرگنهٔ قارچ متأثر از متابولیت‌های جدایه‌های باکتریایی اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. سپس در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مشاهده شد. در این بررسی وضعیت رشد میسلیومی قارچ نسبت به شاهد مقایسه شد.

بررسی تأثیر بازدارندگی جدایه‌های باکتری برعامل بیماری‌زا در شرایط گلخانه

ارزیابی تأثیر بازدارندگی استراین‌ها در گلخانه به دو روش تیمار غده (سیرچه‌ها) و تیمار خاک بر اساس طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت.

تیمار خاک با جدایه‌های باکتری

در این روش در ابتدا به گلدان‌های یک لیتری مخلوطی از خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی سترون به نسبت ۱:۲:۲ اضافه گردید.

سپس به هر گلدان ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به غلظت cfu 1×10^8 و شش گرم از گندم آغشته به قارچ بیمارگر اضافه و با خاک گلدان تا عمق ده سانتی‌متری مخلوط گردید و گلدان‌ها به مقدار کمی آبیاری شدند. در تیمار شاهد به جای جدایه‌های باکتری از ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون استفاده گردید. سپس سیرچه‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۵ ثانیه و در هیپوکلریت سدیم به مدت ۱/۵ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از ضدعفونی سیرچه‌ها سه بار با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند و در گلدان‌ها در عمق پنج سانتی‌متری کشت و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. دمای گلخانه در شب ۱۸-۱۵ و در طول روز ^{o}C ۳۰-۲۷ و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر جدایه باکتری انجام گرفت (Wong & Hughes, 1986).

تیمار غده‌های سیر با جدایه‌های باکتری

برای آغشته کردن غده‌های سیر به جدایه‌های باکتری، ابتدا سوسپانسیونی از هر یک از جدایه‌ها با غلظت cfu 1×10^8 تهیه گردید. سپس غده‌های سالم و ضدعفونی‌شدهٔ سیر به مدت ۱۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور گردیدند. برای جذب بهتر باکتری به سیرچه‌ها از کربوکسی متیل سلولز ۱درصد (CMC) استفاده گردید. سرانجام غده‌های تیمارشده با باکتری در خاک آلوده به بیمارگر (حاوی ۶ گرم گندم حاوی بیمارگر در گلدان یک لیتری)کشت گردیدند (Melero- Vara *et al.*, 2000). در این آزمایش دو تیمار شاهد (تیماری که صرفاً با مایهٔ قارچ و دیگری تیماری که با آب مقطر سترون) در نظر گرفته شد.

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر فاکتورهای رشدی گیاه

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر فاکتورهای رشدی گیاه ۵۵ روز بعد از کاشت سیر نسبت به شاهد سالم بررسی شد. در این بررسی، ارتفاع بوته از سطح خاک تا نوک ساقهٔ جانبی، وزن تر و خشک بوته، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک غده اندازه‌گیری شد. در محاسبهٔ

www.SID.ir

Archive of SID

وزن خشک اندام‌های گیاهی از آون با دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۸ ساعت استفاده شد.

ارزیابی بیماری

ارزیابی بیماری بعد از ۵۵ روز انجام گرفت. به این منظور تأثیر جدایه‌های باکتری بر شدت بیماری (Diseaseseverity) به روش زیر اندازه‌گیری شد.

سالم و بدون علائم بیماری؛ ۱: تشکیل میسلیوم قارچ روی غدهٔ بدون پوسیدگی؛ ۲: ۲۵-۱ درصد پوسیدگی غده؛ ۳: ۵۰-۲۵ درصد پوسیدگی غده؛ ۴: ۷۵-۵۰ درصد پوسیدگی غده؛ ۵: ۱۰۰-۷۵ درصد پوسیدگی غده (Tian & Bertolini, 1995). همچنین درصد وقوع بیماری (Disease incidence) به روش زیر به‌دست آمد:

درصد وقوع بیماری =
۱۰۰ × [(تعداد کل گیاهان در هر تیمار) / (تعداد گیاهان آلوده در هر تیمار)]

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده از نرم‌افزار SAS و SPSS، و برای مقایسهٔ میانگین از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (۵ درصد) استفاده شد. جهت نرمال کردن داده‌ها از تبدیل جذری Y= Sqrt(y1+0/5) استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار SPSS ver 16 و برای ترسیم دندروگرام از نرم‌افزار SYS V.2.2 NT با روش تجزیهٔ خوشه‌ای UPGMA استفاده گردید.

نتایج و بحث

جداسازی و آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *S. cepivorum*

در مجموع هفت جدایهٔ قارچ بیمارگر از مزارع مختلف استان با عنوان‌های S16، S2، S1، S7، S14، S6، S4، جداسازی گردید. بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی، جدایهٔ S7 بیشترین میزان پوسیدگی را در قیاس با دیگر جدایه‌های بیمارگر ایجاد کرد (در سطح یک درصد) و به عنوان مناسب‌ترین جدایه برای کارهای بعدی انتخاب شد.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست

مشخصات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، و مورفولوژیکی جدایه‌های جنس باسیلوس به شرح جدول یک است. از میان ۱۷۵ جدایه باکتری جنس باسیلوس ۱۰ جدایه که در آزمون چهارنقطه‌ای و کشت متقابل با قارچ بیمارگر بیشترین بازدارندگی را از خود نشان دادند، به منظور بررسی بیشتر انتخاب شدند.

جدول۱. مشخصات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی جدایه‌های *Bacillus*

جدایه‌های باکتری	B9	B12	B21	B40	B3	B99	B93	B15	B5	B20
واکنش گرم	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید اسپور	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
موقعیت مرکزی اسپور	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
موقعیت اسپور انتهایی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
موقعیت اسپور زیر انتهایی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اکسیداز	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
استفاده از سیترات	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک طعام ٪۷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی در گلوکز مایع	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در اسیدیته ۵/۷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مصرف آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
زایلوز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
رشد در $45^{o}C$	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
آزمون متیل رد	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

جدایه‌های B40، B21، B12، B9، B99، B93، B5، B15، B20 و B3 در آزمون چهارنقطه‌ای روی محیط کشت PDA هالهٔ بازدارندگی بیشتری در قیاس با بقیهٔ جدایه‌ها در برابر قارچ بیمارگر ایجاد کردند. در آزمون کشت متقابل دو جدایهٔ B12 و B21 بیشترین میزان بازدارندگی (بیش از ۵۰ درصد) و جدایهٔ B40 کمترین

www.SID.ir

Archive of SID

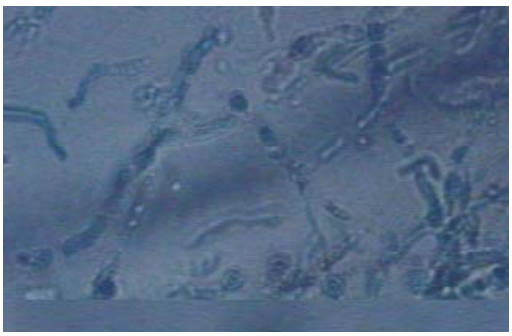
بازدارندگی از رشد بیمارگر داشتند (۲۸,۴ درصد). در آزمون اثر ترکیبات غیرفرار تمامی جدایه‌ها قادر به تولید ترکیبات خارج سلولی بودند. جدایهٔ B93 با ۵۷/۷ درصد بیشترین میزان بازدارندگی و جدایهٔ B20 با ۳۱/۱ درصد کمترین اثر بازدارندگی را از خود نشان دادند. نتایج بررسی کاهش رشد میسلیوم در اثر تولید ترکیبات فرار توسط باکتری‌ها نشان داد که جدایه‌های B99 وB15 با میانگین ۵۵/۵ درصد بیشترین بازدارندگی و جدایهٔ B5 با میانگین ۱۳/۸ درصد کمترین بازدارندگی را داشتند. تفاوت جدایه‌های آنتاگونیست در سطح یک درصد ($P<0.01$) معنادار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که جدایه‌های B12، B21، B9 پروتئاز تولید کردند، ولی هیچ‌کدام از جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند. باکتری‌های باسیلوس پروتئین‌های ضدقارچی، متابولیت‌ها و آنزیم‌های زیادی مانند فنجی مایسبن، سورفکتین، پروتئاز، سیانید هیدروژن، باسیلیسین، توکسی مایسین با توان آنتاگونیستی علیه عوامل بیماری‌زا تولید می‌کنند که بر رشد بیمارگرها در شرایط آزمایشگاه و مزرعه تأثیر دارند (Li *et al*., 2009; Panjehkeh *et al*., 2011; Asaka & Shoda, 1996). هچنین تحقیقات نشان داده است که جدایه‌های باکتری باسیلوس از طریق تولید آنتی‌بیوتیک باعث کنترل بیماری می‌شوند (Liu *et al*., 2006).

جدول ۲. اثرهای جدایه‌های باکتری بر قارچ *Sclerotium cepivorum* در شرایط آزمایشگاه

جدایهٔ باکتری	درصد بازدارندگی از رشد قارچ		
	کشت متقابل	ترکیبات فرار ضدقارچی	ترکیبات مایع خارج سلولی
B20	۳۳,۸^{ed}	۱۶,۹^{d}	۳۱,۱^{c}
B12	۵۱,۱^{a}	۱۶,۴^{d}	۵۴,۲^{a}
B3	۴۰,۳^{cb}	۱۵,۱^{d}	۵۴,۲^{a}
B40	۲۸,۴^{f}	۳۲,۰^{c}	۴۲,۷^{b}
B15	۴۰,۴^{cb}	۵۵,۵^{a}	۴۱,۳^{b}
B99	۴۰,۹^{cb}	۵۵,۵^{a}	۵۲,۰^{a}
B5	۴۴,۰^{b}	۱۳,۸^{d}	۴۴,۰^{b}
B93	۴۳,۱^{b}	۲۹,۳^{c}	۵۷,۸^{a}
B21	۵۰,۲^{a}	۱۵,۱^{d}	۴۰,۹^{b}
B9	۳۷,۸^{cd}	۱۶,۴^{d}	۴۴,۹^{b}

تیمارهای دارای حروف غیرمشابه در هر ستون اختلاف معنادار در سطح ۱ درصد ($P<0.01$) با آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارند. هر تیمار شامل چهار تکرار بود.

بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که جدایه‌های باکتری با ترشح مواد بازدارنده موجب کاهش رشد، تخریب دیواره، پیچ‌خوردگی، بدشکلی و تورم هیف‌های قارچ می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱. تأثیر مواد بازدارندهٔ تولیدشده توسط جدایه‌های باکتری بر هیف قارچ *Sclerotium cepivorum*.

تأثیر جدایه‌های باکتری باسیلوس بر *S. cepivorum* در شرایط گلخانه

ارزیابی بررسی‌های گلخانه‌ای به دو روش تیمار غده (سیرچه‌ها) و تیمار خاک با باکتری‌ها صورت گرفت. ارزیابی آزمایش در شرایط گلخانه بعد از ۵۵ روز انجام گرفت. نتایج نشان داد که همهٔ جدایه‌ها در روش تیمار غده باعث کاهش شدت بیماری نسبت به تیمار شاهد آلوده شدند. بیشترین میزان کاهش شدت بیماری

www.SID.ir

Archive of SID

مربوط به جدایه‌های B3، B21، B12، B40، B5, B20 ، B15،B93 (بیش از ۷۰ درصد) و دو جدایهٔ B9, B99 با ۴۶ درصد کمترین تأثیر را داشتند (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج تأثیر جدایه‌های باکتری بر شدت بیماری ناشی از قارچ *Sclerotium cepivorum* در شرایط گلخانه در دو روش تیمار غده و تیمار خاک بعد از ۵۵ روز.

تیمارها	روش تیمار غده		روش تیمار خاک	
	شدت بیماری	درصد کاهش بیماری	شدت بیماری	درصد کاهش بیماری
B40	۱[a]	۷۳/۰	۱[a]	۶۶/۷
B9	۲[b]	۴۶/۰	۱[a]	۶۶/۷
B12	۱[a]	۷۳/۰	۰/۷۵[a]	۷۵/۰
B21	۱[a]	۷۳/۰	۰/۵۰[ab]	۸۳/۳
B99	۲[b]	۴۶/۰	۱[a]	۶۶/۷
B3	۱[a]	۷۳/۰	۰/۵۰[ab]	۸۳/۳
B20	۱[a]	۷۳/۰	۰/۶۲[ab]	۷۹/۲
B93	۱[a]	۷۳/۰	۰/۶۲[ab]	۷۹/۲
B15	۱[a]	۷۳/۰	۲[b]	۳۳/۳
B5	۱[a]	۷۳/۰	۱/۷[b]	۴۱/۷
شاهد آلوده	۳,۷[c]	۰	۳[c]	۰

گروه‌های با حروف یکسان در سطح ۱ درصد ($P \leq 0.01$) در آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معناداری ندارند. هر تیمار شامل چهار تکرار بود.

نتایج تیمار خاک نشان داد که تمامی جدایه‌ها باعث کاهش شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده شدند. بیشترین درصد بازدارندگی متعلق به جدایهٔ B21 ، B3 ، B20، B93 به میزان ۸۳/۳ – ۷۹/۲ درصد و کمترین میزان بازدارندگی متعلق به جدایهٔ B15 وB5 به‌ترتیب به میزان ۳۳/۳ و ۴۱/۷ درصد بود. تفاوت بین تیمارها در سطح یک درصد ($P<0.01$) معنادار بود. از نظر وقوع بیماری اختلاف معنادار بین تیمارها دیده نشد و بیماری به‌طور تقریبی در همهٔ تیمارها دیده شد (جدول ۳). تحقیقات نشان داده است که گونه‌های باسیلوس به‌طور چشمگیر موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و پوسیدگی ریشهٔ لوبیا ناشی از قارچ *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* و کاهش خسارت قارچ *Macrophomina phaseolina* در شرایط گلخانه و مزرعه می‌شوند (kamal *et al*., 2009; Lokesha & Benagi, 2007; Iraqi & Rahnama, 2011). باکتری‌های آنتاگونیست از قبیل پسودوموناس و باسیلوس از طریق کلونیزه کردن ریشه موجب کاهش خسارت بیماری می‌شوند (Manikanda *et al*., 2010; Shouan Zhang *et al*., 2010). تحقیقات نشان داده است که مؤثرترین جدایه‌های باکتری آنتاگونیست روی کاهش بیماری‌های گیاهان آنهایی‌اند که از ریزوسفر گیاه اصلی استخراج می‌گردند (Weller 1988).

تأثیر جدایه‌های باکتری باسیلوس بر رشد اندام‌های مختلف گیاه سیر

تأثیرات جدایه‌های باکتری بر وزن خشک بوته، ریشه و غدهٔ گیاه سیر بررسی شد. در این بررسی بیشترین میانگین مربوط به وزن خشک بوتهٔ مربوط به جدایهٔ B40 ، B5 و B12 به‌ترتیب به میزان ۰/۹۳، ۱و ۰/۹۷ گرم و کمترین میانگین مربوط به جدایهٔ B21 به میزان ۰/۳ گرم نسبت به شاهد آلوده بود.

بیشترین میانگین وزن خشک ریشه مربوط به جدایهٔ B5 به میزان ۰/۵ گرم و کمترین مربوط به جدایهٔ B20 به میزان ۰/۱۷ گرم بود.

بیشترین میانگین وزن خشک غده مربوط به جدایه‌های B5، B40، B21، B12، B99، B9، B15 به میزان ۰/۱ گرم بود و کمترین آن مربوط به جدایهٔ B20، B93 وB3 به میزان ۰/۰۹ گرم بود (جدول ۴). تحقیقات نشان داده است که جدایه‌های باسیلوس علاوه بر کاهش بیماری موجب افزایش فاکتورهای رشدی گیاهان می‌شوند (Haidar Moradi *et al*., 2012).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴. تأثیر جدایه‌های باکتری بر رشد اندام‌های مختلف گیاه سیر در شرایط گلخانه ۵۵ روز بعد از کشت.

تیمارها	وزن خشک بوته	وزن خشک ریشه	وزن خشک غده
B40	۰/۹۳^{a}	۰/۴۰^{b}	۰/۱۰^{a}
B9	۰/۵۵^{c}	۰/۳۰^{cd}	۰/۱۰^{a}
B12	۰/۹۷^{a}	۰/۳۰^{cd}	۰/۱۰^{a}
B21	۰/۳۰^{d}	۰/۲۲^{de}	۰/۱۰^{a}
B99	۰/۶۷^{b}	۰/۳۰^{cd}	۰/۱۰^{a}
B3	۰/۵۲^{c}	۰/۳۲^{cd}	۰/۰۹^{ba}
B20	۰/۶۷^{b}	۰/۱۷^{e}	۰/۰۹^{ba}
B93	۰/۷۵^{b}	۰/۳۰^{cd}	۰/۰۹^{ba}
B15	۰/۶۷^{b}	۰/۳۰^{cd}	۰/۱۰^{a}
B5	۱/۰۰^{a}	۰/۵۰^{a}	۰/۱۰^{a}
شاهد	۰/۴۷^{c}	۰/۲۵^{cde}	۰/۰۸^{b}

گروه‌های با حروف یکسان در سطح یک درصد اختلاف معناداری ندارند. هر تیمار شامل چهار تکرار است.

افزایش فاکتورهای رشدی در گیاه سیر توسط گونه‌های باسیلوس با نتایج کمال و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. افزایش فاکتورهای رشدی در گیاه ممکن است در نتیجهٔ تولید فیتوهورمون‌ها از جمله هورمون سیتوکینین و اکسین توسط جدایه‌های باکتری باسیلوس باشد (Arkhipiva *et al*., 2005; Felici *et al*., 2008;).

ترکیبات فیتوهورمون باعث ترمیم اندام‌های آسیب‌دیده توسط عوامل بیماری‌زا از جمله ریشه و طوقه می‌شود و در نتیجه، خسارت بیماری کاهش می‌یابد (Safari *et al*., 2011). نتایج تحقیقات نشان داده است که باکتری‌های جنس باسیلوس علاوه بر خاصیت ضدقارچی علیه عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد با ترشح فیتوهورمون و تحریک گیاه موجب افزایش جذب مواد غذایی توسط ریشهٔ گیاه و باعث تبدیل مواد قابل‌جذب برای گیاهان می‌شوند (El-Barougy *et al*., 2009).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی نشان داد که باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به دو روش تیمار خاک و تیمار بذر توانستند بیماری پوسیدگی سفید گیاه سیر ناشی از قارچ *S. cepivorum* را به‌صورت قابل‌توجه کنترل کنند. دو جدایهٔ باکتری B3 و B21 بیشترین تأثیر را بر بیماری داشتند و به میزان ۸۳-۷۳ درصد بیماری را در مقایسه با شاهد کاهش دادند. باکتری‌های آنتاگونیست همچنین تأثیر چشمگیری بر رشد گیاه، به‌خصوص توسعهٔ ریشه، افزایش وزن ریشه، بوته و غده‌ها داشتند. بنابراین می‌توان از باکتری‌های باسیلوس در مدیریت بیماری پوسیدگی سفید سیر استفاده کرد، اما برای مطالعات تکمیلی لازم است تحقیقات مزرعه‌ای و به‌خصوص مطالعهٔ اکولوژیک به منظور بررسی میزان دوام و بقای این عوامل در خاک مزرعه انجام گیرد.

سپاسگزاری

هزینه و امکانات مورد استفاده در این طرح از اعتبارات پژوهشی دانشکدهٔ کشاورزی و معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تأمین شده است. نگارندگان بدین وسیله مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Adams, P. B. (1987). Effects of soil temperature, moisture and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotiorum*. *Plant Disease,* 71, 170-174.
2. Alstrom, S. (1987). Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil*, 102, 3-9.
3. Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martyneko, E. V. & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtillis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272, 201-209.
4. Asaka, O. & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* Rb14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4081-4085.
5. Asthana, M.Sc., D. I. C., PH.D (London), F. A. Sc. (1947). Study on Sclerotium forming Fungi. *Mycologist of Government*, 26(3), 108-116.
6. Barding, S. D., Huang, H. C. (2001). Research on biology and control of Sclerotinia disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 88-98.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Berke, M. J. (1841). *Scleritium cepivorum*. *Annals and Magazine of Natural History*, 1(6), 359.
8. Chantawnnakul, P., Oncharoem, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. & Lumyoung, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28, 241-245.
9. Coley-Smith, J. R. & Holt, R. W. (1966). The effect of species of *Allium* on germination in soil of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Annals of Applied Biology*, 58, 273-278.
10. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. & Stackebrandt, E. (2007). *The Prokaryotes*, 3rd ed. Springer-Verlag, New York.
11. El-Barougy, E., Awad, N. M., Turky, A. Sh. & Hamed, H. A. (2009). Antagonistic activity of selected strains of Rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of soybean plants. American-Eurasian. *Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 5(3), 337-347.
12. Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L. M. C., Toffanin, A., Tagliasacchi, A. M. & Nuti, M. (2008). Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40, 260-270.
13. Fiddaman, P. J. & Rossal, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal *of* Applied Bacteriology, 74, 119-126.
14. Ghafar, A. (1968). Biological control of white rot of onion. *Mycophatological*, 38, 113-127.
15. Haidar, M., Bahramnejad, B., Amimi, J., Siosemardeh, A. & Haji-Allahverdipoor, K. (2012). Supprression of chicpea (*Cicer arietinum* L.) Fusarium wilt by *Bacillius subtillis* and *Trichoderma harzianum*. *Plant Omics Journal,* 5(4), 68-74.
16. Hejarud, G. h., Asadi, P., Behruzin, M. (1993). Survey of white rot of *Allium cepa* caused by *Sclerotium cepivorum* in Azarbijan Province. In: Proceedings of *the 10th Iranian Plant protection Congress,* Isfahan, Iran, p.116.
17. Hou, X., Boyetchko, M., Brick, M., Olson, D., Ross, A. & Hegedus, D. (2006). Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with scleroria from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 72, 644-653.
18. Iraqi, M. M. & Rahnama, K. (2011). Survey on *Bacillus subtilis* isolates for Biological control of sunflower root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Plant protection*, 34(1), 1-13.
19. Kamal, A. M. Abo-Elyousr. & Hashem, M. Mohamed. (2009). Biological control of Fusarium wilt in tomato by Plant growth promoting yeasts and rhizobacteria. *Plant Pathology Journal,* 25(2), 199-204.
20. Kraus, J. & Loper, J. E. (1990). Biological of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5 Mechanistic studies pp. 175-177. In Keel, C., Koller, B. & Defago, G. (Eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *The Second International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, Interlacen, Switzerlan.
21. Li, J., Yang, Q., Zhao, L., Zhang, S., Wang, Y. & Zhao, X. (2009). Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal Zhejiang University Science*, 10, 264-272.
22. 22- Liu, Y. F., Chen, Z. Y., Zhang, J., Zhou, M. G., Song, F. P. & Liu, Y. Z. (2006). Bacisubin and antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtillis* strain B-916. *Peptides*, 28, 553-559.
23. Lokesha, N, M. & Benagi, V. I. (2007). Biological management of Pigeon-pea dry root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20(1), 54-56.
24. Manikanda, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas flouresceans* Pf1 for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. *Biological Control*, 54, 83-89.
25. Mc night, S. E. & Rossal, S. (1990). Root colonization of cotton seeding by *Bacillus subtilis*. (MBI 600). In leek, C., B. Koller. & G. defago. Plant growth Promoting Rhizobacteria. *The Second International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, Interlacen, Switzerlan.
26. Mehdizadeh, R., Zafari, D. & Zamanizadeh, H. (2008). Identification of fungus disease of garlic in Hamadan province. *Agricultural Research*, 7(35), 1-28.
27. Melero-Vara, J. M., Parados-Ligero, A. M. & Basallote, U. M. S. (2000). Comparison of physical and chemical and biological methods of controlling garlic white rot. *Journal Plant Pathology*, 166, 581-588.
28. Michael, A. & Nelson, P. E. 1972. Antagonistic effect of bacteria on *Fusarium roseum* from carnation. *Phytopathology*, 62, 1052-1056.
29. Niknejad, K. M. (2004). Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Journal of Plant Pathology*, 3(2), 88-96.

www.SID.ir

Archive of SID

30. Panjehkeh, N., Saberyan, A., Afshari Azad, H. & Salari, M. (2011). Biological control of *Phoma lingam*, the causal agent of rapeseed blackleg by *Trichoderma* and *Bacillus subtillis* isolates. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 47(1), 19-30.
31. Romanenko, V. M. & Alimov, M. (2000). Ability of representatives of *pantoea agglomerams* as well as *Bacillus subtillis* and some species of *Pseudomonas* genus to inhibit growth of phytopathogenic bacteria and micromycetes and regulate the plant growth. *Microbiology Journal*, 62, 29-37.
32. Safari As1, F., Rouhani, H., Falahati Rastegar, M. & Jahanbakhsh, V. (2011). Study of antagonistic mechanisms of *Bacillus* spp. in biocontrol of cucumber root and foot rotcaused by *Pythium ultimum* and *P. aphanidermatum*. *Journal of Plant Protection*, 437-444.
33. Sansford, C. L. & Coley, J. R. (1992). Production and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiuorum*. *Plant Pathology Journal*, 41, 154-156.
34. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chum, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. *APS Press*, 379 pp.
35. Sharma, A. & Johri, B. N. (2003). Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting *Pseudomonas fluorescent* strain GRP3A inmungbean. *Microbiol Research Journal*, 158, 77-81.
36. Shouan Zhang., Thomas, L. W., Miriam, G. M., John, A. M., Joseph, W. K. & Waldemar, K. (2010). Evaluation of plant growth promoting rhizobacteria for control of phytophthora blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control Journal*, 53, 129-135.
37. Sumner, D. R. (1999). *White rot*. Compendium of Onion and Garlic Disease. APS, 14-16.
38. Tian, S. P. & Bertolini, P. (1995). Effects of temperature on mycelia growth and spore germination of *Botrytis allii* in culture and on its pathogencity to stored garlic bulbs. *Plant Patholology Journal*, 44, 1008-1015.
39. Tyson, J. L., Folerton, R. A., Sellit, G. & Reynolds, P. J. (2000). Use of Diallyl sulfide for the commrical control of *Sclerotium cepivorum*. *New Zealan Plant Protection*, 53, 393-397.
40. Weller, C. M. & Cook, J. (1988). Biological control of soilborn plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 73, 379-407.
41. Wong, W. C. & Hughes, I. K. (1986). *Sclerotium cepivorum* Berk. in onion (*Allium cepa* L.) crops: isolation and characterization of bacteria antagonistic to the fungus in Queensland. *Journal of Applied Bacteriology*, 60, 57-60.
42. Yousefi, H., Sahebani, N. & Mirabolfathi, M. (2010). The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis* cucumerinum. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46(4), 283-292.

www.SID.ir