مهار زیستی بیماری پاخورهٔ گندم با استفاده از سویه‌های تولیدکنندهٔ بیوفیلم باکتری *Bacillus subtilis*

مریم خضری

دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مسئول مکاتبات: مریم خضری، پست الکترونیک: m.khezri@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۸/۱۷ ۳۰-۱۵ (۱) ۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۱۱

چکیده

بیماری پاخورهٔ گندم از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی خاک‌زاد است که هر ساله خسارت‌های قابل توجهی به این محصول راهبردی در دنیا و ایران وارد می‌نماید. در این پژوهش، پتانسیل ۲۷ سویه باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* در مهار زیستی قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*، عامل بیماری پاخورهٔ گندم در آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرارگرفت. همه سویه‌های مورد مطالعه در آزمون کشت متقابل در برابر قارچ بیمارگر ضمن ایجاد هاله بازدارنده، بین ۳۹/۴۸ تا ۹۶/۲۹ درصد از رشد میسلیوم قارچ جلوگیری نمودند. در آزمون تولید متابولیت‌های فرار ضدقارچی، برخی سویه‌ها رشد قارچ بیمارگر را به‌میزان ۸۷/۶۲٪ کاهش دادند که البته این مقدار برای تعدادی از سویه‌ها کمتر از ۲۰٪ بود. از بین سه غلظت ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد ترشحات مایع خارج سلولی، بیشتر سویه‌ها در غلظت ۲۵٪ بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ را نشان دادند. همهٔ سویه‌ها قادر به‌تولید بیوسورفکتانت و بیوفیلم بودند، با این حال تنوع زیادی در بین سویه‌های مورد مطالعه دیده شد. میزان همبستگی بین تولید بیوسورفکتانت و بیوفیلم در آزمایشگاه، ۰/۸۳ بود. تعداد ۱۱ سویه باکتری با توان مختلف آنتاگونیستی و تولید بیوفیلم، برای بررسی امکان مهار زیستی بیماری در گلخانه انتخاب شد که همهٔ سویه‌ها توانستند بین ۲۰-۱۰۰ درصد بیماری را کاهش دهند. ۷۲ درصد از سویه‌ها، بیماری را بیش از ۵۰ درصد نسبت به‌شاهد کاهش دادند. بین میزان مهار زیستی بیماری در گلخانه با تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت در آزمایشگاه به‌ترتیب ۰/۷۱ و ۰/۸۵ همبستگی وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: توان آنتاگونیستی، بیوفیلم، بیوسورفکتانت، باسیلوس، *Gaeumannomyces graminis*

مقدمه

قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Sacc.) Arx & Olivier از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد است که باعث بروز بیماری خطرناک پاخوره در گندم، جو، چاودار و تریتیکاله می‌شود. بیماری پاخوره اولین‌بار روی گندم در سال‌های ۱۸۵۲ و ۱۸۶۸ از استرالیا گزارش شد (Garrett, 1981). در سال ۱۹۸۱ این بیماری پس از زنگ سیاه دومین بیماری مخرب گندم در جهان بوده است (Hornby *et al.*, 1998). این بیماری از مناطق گرم دنیا مانند استرالیا، ژاپن، بخش‌هایی از اروپا، آمریکای شمالی و جنوبی، هم‌چنین از مناطق معتدل، خاورمیانه و ارتفاعات گرم استوایی گزارش شده (Singleton, 1992) و از آن به‌عنوان بیماری جهانی گندم یاد می‌شود (Kwak & Weller, 2013). در ایران بیماری زوال گندم، اولین‌بار در بهار سال ۱۳۶۸ از مزارع گندم دشت‌ناز ساری و سایر مناطق استان مازندران و گرگان توسط فروتن و همکاران گزارش شد. پس از آن، بیماری پاخورهٔ گندم از بیشتر استان‌های کشور گزارش شده است (Rajabi & Behrozin, 2003).

قارچ *Gaeumannomyces* دارای هفت گونه بوده که مهم‌ترین گونهٔ آن *G. graminis* است. این گونه دارای چهار واریته *G. graminis* var. *avenae*، *G. graminis* var. *tritici*، *G. graminis* var. *graminis* و *G. graminis* var. *maydis* است که میزبان‌های متفاوتی را مورد حمله قرار می‌دهند (Fouly *et al.*, 1996). قارچ عامل بیماری در اغلب خاک‌های دنیا به وفور یافت شده و خسارت وارد می‌کند اما در خاک‌های قلیایی و تا حدی خنثی و به‌ویژه

Archive of SID

www.SID.ir

غیرحاصل‌خیز و فاقد زه‌کشی مناسب شدت دارد. رشد گیاهانی که شدت بیماری در آن‌ها بیشتر است، متوقف شده و قبل از بلوغ کامل وارد مرحلهٔ زایشی می‌شوند. در اثر آلودگی شدید، بوته‌ها کوتاه و زودرس شده و خوشه‌ها سفید و عقیم می‌شوند. در آلودگی زودهنگام، بوته‌ها کوتاه و کمی زردرنگ و دانه‌های درون سنبله چروکیده خواهند شد. بوته‌های آلوده به‌آسانی از خاک بیرون آمده یا از محل طوقه می‌شکنند و ریشهٔ چنین بوته‌هایی سیاه، کوتاه و ضخیم می‌شود (Wiese, 1987).

در سراسر دنیا آفت‌کش‌های زیادی برای کنترل قارچ‌های خاک‌زی که آسیب‌های عمده‌ای به گیاهان وارد می‌کنند، مصرف می‌شود که سهم زیادی در بروز مشکلات زیست محیطی موجود دارند. کاربرد عوامل مهار زیستی به‌عنوان یکی از راه‌کارهای مفید در مدیریت تلفیقی بسیاری از بیماری‌های گیاهی از جمله بیماری پاخورهٔ گندم پیشنهاد شده است. گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از باکتری‌های مؤثر در مهار زیستی مانند گونه‌های *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis*، قارچ *Trichoderma harzianum* و اکتینوباکتری‌ها مانند *Streptomyces* spp. علیه این بیماری وجود دارد. برخی از این عوامل به‌ویژه سویه‌هایی از باسیلوس، استرپتومایسس و تریکودرما به‌صورت تجاری تولید شده‌اند (Quecine *et al.*, 2008; Ghahfarokhi & Goltapeh, 2010; Babaeipoor *et al.*, 2011; Junaid *et al.*, 2013; Kwak & Weller, 2013; Lagzian *et al.*, 2013). استرین‌های تجاری *B. subtilis* کنترل‌کننده‌های قوی بیماری‌های گیاهی می‌باشند. قارچ‌کش بیولوژیک تجاری سرنید (Serenade Bayer, Germany) روی باکتری‌های بیمارگر نیز مؤثر شناخته شده است (Morikawa, 2006).

از بین باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های جنس *Bacillus* از جنبه‌های مختلف مورد بررسی واقع شده‌اند. باکتری‌های آنتاگونیست جنس *Bacillus* مزیت‌های فراوانی نسبت به‌سودوموناده‌ای فلورسنت و سایر آنتاگونیست‌های گرم منفی در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی دارند. از جمله این امتیازها می‌توان به ماندگاری طولانی مدت در اکوسیستم‌های کشاورزی، توانایی تولید اسپور داخلی و قابلیت بالا در تولید انواع مختلف متابولیت‌های ضدمیکروبی اشاره نمود (Kim *et al.*, 1997). باکتری *B. subtilis* نسبت به‌دیگر گونه‌های این جنس مانند *B. megaterium*، *B. cereus* و *B. polymyxa* بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته است. برخی ویژگی‌ها مانند تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها، تحمل بالا نسبت به‌تغییرات دمایی محیط زیست، رشد سریع در محیط‌های کشت آزمایشگاهی و از همه مهم‌تر تولید اسپور داخلی مقاوم در خاک، باکتری‌های جنس باسیلوس را به گزینه‌های مناسبی در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی تبدیل نموده است. لذا این باکتری‌ها به‌عنوان عواملی بی‌خطر و دارای پتانسیل بالا در کنترل بیماری‌های گیاهی متعدد شناخته شده‌اند (Kim *et al.*, 2003; García-Gutiérrez *et al.*, 2013).

باکتری *B. subtilis* از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل، تولیدکننده اندوسپور و خاکزی است. این گونه باکتری در ریزوسفر اغلب گیاهان یافت می‌شود و قادر است رشد گیاه را افزایش داده و بسیاری از بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها را کنترل نماید. باکتری *B. subtilis* به‌راحتی از محیط‌های طبیعی جداسازی می‌شود و به‌عنوان یک ارگانیسم مدل، تحقیقات علمی و آزمایش‌های گوناگونی روی آن انجام شده است (Kovács *et al.*, 2009). این باکتری آنتاگونیست به‌عنوان یکی از مؤثرترین عوامل مهار زیستی شناخته شده است. جدایه‌های مختلف این باکتری به‌دلیل دارا بودن قابلیت‌های بالا در افزایش رشد گیاهان، القاء مقاومت و مهار زیستی بیمارگرها با استفاده از متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های متنوع، متابولیت‌های فرار ضدبیمارگرها، آنزیم‌هایی مانند آمیلاز، پروتئاز، کیتیناز، زایلاناز و لیپاز هم‌چنین تولید بیوفیلم همواره مورد توجه محققان مهار زیستی بیماری‌های گیاهی بوده‌اند (Fiddaman & Rossall, 1994; Bais *et al.*, 2004; Kloepper *et al.*, 2004; Leclere *et al.*, 2005; Ongena *et al.*, 2005; Morikawa, 2006; Khezri *et al.*, 2011).

Archive of SID

www.SID.ir

تولید آنتی‌بیوتیک یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مهار زیستی توسط *B. subtilis* است. تعداد ۱۶۷ آنتی‌بیوتیک مختلف توسط گونه‌های *Bacillus* spp. تولید می‌شود. این آنتی‌بیوتیک‌ها اساساً پلی‌پپتیدی بوده و بیشتر علیه باکتری‌های گرم مثبت مؤثر می‌باشند. البته ترکیباتی مانند پلی‌میکسین، کولی‌ستین و سیرکولین فعالیت قابل توجهی علیه باکتری‌های گرم منفی نشان داده‌اند. همچنین آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند باسیلومایسین، مایکوباسیلین و فانجی‌استاتین علیه مخمرها و کپک‌ها مؤثر می‌باشند. گزارش‌های متعدد تولید ترشحات مایع خارج سلولی و ترکیبات فرار ضد قارچی توسط سویه‌های *B. subtilis* را در کاهش بیماری‌های گیاهی مؤثر دانسته‌اند (Henis & Inbar, 1986; Fiddaman & Rossall, 1993). براساس یافته‌های محققین باکتری *B. subtilis* علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه، قادر به القاء مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد. همچنین نقش این گونه باکتری در تحریک رشد گیاهان به اثبات رسیده است (Kloepper *et al*., 2004; Mohammadi *et al*., 2005; Ongena *et al*., 2007).

با توجه به‌خسارتی که هر ساله بیماری پاخوره به‌محصول استراتژیک گندم در مزارع مناطق مختلف کشور وارد می‌نماید و به‌دلیل کمبود ارقام متحمل یا مقاوم در برابر بیماری، عدم وجود مبارزهٔ شیمیایی کارآمد برای کنترل بیماری، همچنین مشکلات زیست محیطی عدیده‌ای که در اثر افزایش بی‌رویه مصرف قارچ‌کش‌ها ایجاد شده است، انگیزه تحقیق در زمینه یافتن راه مناسب‌تری برای مدیریت خسارت این بیماری با استفاده از روش‌های زیستی بوجود آمد. بر این اساس، در این پژوهش پتانسیل احتمالی سویه‌های بومی باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* در مهار زیستی قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، همچنین ارزیابی مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی و تولید بیوفیلم در تقابل با قارچ بیمارگر پاخورهٔ گندم توسط سویه‌های مختلف باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و شرایط رشد در آزمایشگاه

تعداد ۲۷ سویه باکتری *B. subtilis* جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان مختلف و مناطق جغرافیایی متفاوت ایران برای انجام آزمایش‌های این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (Khezri *et al.*, 2011). برای نگهداری طولانی مدت، براساس روش ولر و کوک از محلول سترون گلیسرول ۲۵ درصد در آب مقطر استفاده شد (Weller & Cook, 1983). برای تهیهٔ کشت جوان از سویه‌های کشت شده روی محیط نوترینت آگار (NA) در تشتک پتری یا درون محیط مایع لوریا برتانی (LB) در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس استفاده شد.

قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم (جدایهٔ T6)، جداسازی شده از ریشهٔ گندم در شهرستان شازند استان مرکزی، از مرکز تحقیقات استان مرکزی دریافت شد (Sadeghi *et al.*, 2009). این قارچ یک جدایهٔ مهاجم با قدرت بیماری‌زایی روی گندم رقم فلات می‌باشد. از سویه قارچ رشد کرده در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) درون لولهٔ آزمایش به‌صورت مورب یا تشتک پتری برای انجام آزمایش‌ها استفاده شد.

ارزیابی اثرات آنتاگونیستی سویه‌های باکتری *B. subtilis* در تقابل با قارچ بیمارگر در آزمایشگاه

کشت متقابل قارچ *G. graminis* var. *tritici* با سویه‌های باکتری آنتاگونیست

برای انجام این آزمایش در چهار طرف تشتک پتری حاوی محیط PDA سویه‌های باکتری به‌صورت نقطه‌ای با فاصله یکسان از مرکز کشت شدند. تشتک‌های پتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری و سپس در مرکز هر تشتک پتری حلقه‌ای به‌قطر پنج میلی‌متر از حاشیهٔ کشت تازه قارچ قرار داده شد. در تشتک پتری شاهد فقط سویه قارچ کشت شد. تشتک‌های پتری تا زمان پر شدن تشتک پتری شاهد در انکوباتور ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. درصد بازدارندگی هر یک از سویه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری براساس اختلاف بین قطر پرگنه قارچ در تشتک‌های پتری شاهد و تیمار شده با باکتری با استفاده از فرمول I=[(C-F)/C]×100 محاسبه شد که در آن I: درصد بازدارندگی از رشد قارچ، C: قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد و F: قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری تیمار می‌باشد (Kumar *et al*., 2009).

بررسی متابولیت‌های فرار ضدقارچی

این آزمایش مطابق روش فیدامن و روزال انجام شد. بدین منظور سوسپانسیون کدری از کشت سویه‌های باکتری در چند میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر آن روی محیط NA حاوی ۲٪ گلوگز (NAG) پخش شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. سپس حلقه‌های پنج میلی‌متری از کشت تازه قارچ در وسط تشتک‌های پتری حاوی PDA قرار داده شدند و با رعایت شرایط سترون تشتک‌های پتری حاوی قارچ و باکتری آنتاگونیست روی هم قرار داده شدند و دور آن‌ها با نوار پارافیلم کاملاً مسدود و مجموعه به‌مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. در تشتک پتری شاهد به‌جای باکتری، آب مقطر سترون پخش شد. میزان بازدارندگی از رشد قارچ توسط متابولیت‌های فرار ضدقارچی با مقایسه قطر پرگنه قارچ در تشتک‌های پتری شاهد و تیمار انجام و با استفاده از فرمول ذکر شده محاسبه شد (Fiddaman & Rossal, 1993).

بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی

برای انجام این آزمایش، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز براث (PDB) با یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری مایه‌زنی شد. فلاسک‌ها به‌مدت ۴ روز روی دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. پس از عبور محیط کشت حاوی باکتری از کاغذ واتمن شمارهٔ یک و سانتریفوژ ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه، عصاره توسط صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی فیلتر شد. برای بررسی تأثیر عصارهٔ حاصل روی رشد قارچ عامل بیماری، محیط کشت PDA حاوی سه غلظت ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد عصارهٔ ترشحات مایع خارج سلولی سویه‌های باکتری آنتاگونیست تهیه شد. در تیمار شاهد از محیط کشت PDA که به‌آن به‌نسبت هر تیمار، عصارهٔ حاصل از فیلتراسیون محیط کشت مایع مایه‌زنی نشده اضافه شده بود، استفاده شد (Onkar & James, 1995). پس از آماده‌سازی تشتک‌های پتری، در مرکز هر تشتک پتری حلقه‌ای به‌قطر پنج میلی‌متر از حاشیهٔ کشت تازه قارچ قرار داده شد. در تشتک پتری شاهد فقط سویه قارچ کشت شد. تشتک‌های پتری تا زمان پر شدن تشتک پتری شاهد در انکوباتور ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. درصد بازدارندگی هر یک از سویه‌های باکتری با استفاده از رابطه ذکر شده محاسبه شد.

بررسی تولید بیوفیلم در پلیت پلی‌استیرن

به‌منظور بررسی میزان تولید بیوفیلم در سویه‌های باکتری، هر سویه در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB به‌مدت ۱۵ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس و ۲۰۰ rpm قرار داده شد. سپس کشت باکتری با محیط کشت تازه، رقیق و مجدداً در همان شرایط رشد نگهداری شدند. هنگامی که دانسیته نوری سویه‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر به‌عدد یک رسید، محیط حاوی سویه‌ها به‌نسبت ۱:۳۵۰ با محیط کشت حداقل MSgg رقیق شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری به‌چاهک پلیت ۹۶ چاهکی پلی‌استیرن منتقل شد. سپس پلیت به‌مدت ۷۰ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس در شرایط ساکن قرار داده شد. پس از گذشت این زمان پلیت تخلیه و سه بار، هربار به‌مدت یک دقیقه با آب مقطر شستشو داده شد. پلیت به‌مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سلسیوس برای خشک شدن قرار داده شد. برای ثابت نمودن سویه‌های متصل شده به‌دیواره چاهک‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول به‌هر چاهک افزوده و ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از شستشو به‌روش فوق، به‌چاهک‌ها کریستال ویوله ۱٪ اضافه و پس از حداکثر ۱۵ دقیقه، شستشو انجام شد. در پایان محلول ۱:۴ اتانول- استون اضافه و برای خواندن میزان جذب از دستگاه ELIZA reader در طول موج ۵۰۰ نانومتر استفاده شد (Nagórska *et al*., 2008).

Archive of SID

www.SID.ir

آزمون تولید بیوسورفکتانت

به‌منظور شناسایی سویه‌های تولیدکنندهٔ ترکیبات بیوسورفکتانت، سویه‌ها روی محیط کشت خون آگار (حاوی محیط کشت اولیه و ۷-۵ درصد خون دیفیبرین شده گوسفند) به‌صورت نقطه‌ای کشت شدند. باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس در اطراف خود هاله شفاف ایجاد کرده و محیط اطراف خود را بی‌رنگ نمودند (Hsieh *et al*,. 2004).

بررسی‌های گلخانه‌ای

پس از انجام بررسی‌های آزمایشگاهی، سویه‌هایی با توانایی متفاوت (کم، متوسط و زیاد) در تولید بیوفیلم و مهار زیستی قارچ *G. graminis* var. *tritici* در آزمایشگاه، برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

تعیین قوهٔ نامیه بذر

برای تعیین قوهٔ نامیه بذر از روش استاندارد ISTA استفاده شد. برای این منظور تعداد ۲۰۰ عدد بذر گندم رقم فلات به‌طور تصادفی انتخاب و به‌مدت سه دقیقه با محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم و ۳۰ ثانیه با الکل ۹۶ درصد ضدعفونی شدند. سپس چهار بار با آب مقطر سترون به‌طور کامل شستشو شدند. درون هر تشتک پتری هشت سانتی‌متری تعداد ۲۵ بذر روی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. شمارش بذرهای جوانه‌زده از روز دوم تا دهم انجام شد (ISTA, 2003).

تهیهٔ بذر آغشته به‌باکتری آنتاگونیست

در آزمایش‌های گلخانه‌ای از روش آغشته‌سازی بذر به‌باکتری آنتاگونیست استفاده شد. بدین‌منظور سویه‌های انتخاب شده برای آزمایش‌های گلخانه‌ای، به‌مدت ۲۴ ساعت در ارلن‌های حاوی محیط کشت LB در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) رشد داده شدند. سپس باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری شد. سلول‌های باکتری در محلول ۱٪ متیل‌سلولز غوطه‌ور و سپس بذرهای گندم رقم فلات ضدعفونی سطحی شده (محلول هیپوکلریت سدیم ۱درصد به‌مدت ۳ دقیقه)، به‌مدت دو ساعت در سوسپانسیون 1×10^{9} CFU/ml سویه‌های باکتری قرار داده و پس از خشک شدن در جریان هوای سترون زیر هود به‌مدت یک ساعت، برای آزمایش‌های گلخانه‌ای استفاده شدند. در تیمار شاهد، گندم درون محلول ۱٪ متیل‌سلولز غوطه‌ور شد (Kempf & Wolf, 1989).

بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در مهار زیستی بیماری پاخورهٔ گندم

برای تهیهٔ زاد مایهٔ بیمارگر، بذرهای گندم در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه در دو روز متوالی اتوکلاو شد. سپس ۱۰ حلقه پنج میلی‌متری از کشت تازهٔ قارچ در مجاورت ۳۰ گرم بذرهای سترون قرارگرفت و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. سپس در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک اتوکلاو شده، پنج بذر تیمار شده با باکتری‌های منتخب در تماس با ۱۰ عدد بذر گندم پوشیده شده توسط قارچ، کاشته شد (Weller & Cook, 1983). در تیمار شاهد آلوده به‌جای گندم آغشته به‌باکتری، گندم ضدعفونی شده استفاده شد. همچنین در تیمار شاهد سالم، گندم آلوده به‌قارچ استفاده نشد. گلدان‌ها هر ۲-۳ روز یک‌بار آبیاری شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار شد. پس از گذشت چهار هفته، گیاهچه‌ها به آرامی از بستر خاک خارج و ریشه‌ها توسط آب روان شستشو داده شدند. علایم بیماری از اندام هوایی و علائم سیاه‌شدگی روی ریشه‌های بذری و طوقه بررسی و یادداشت‌برداری شد. جداسازی قارچ عامل بیماری مجدداً از ریشه‌های آلوده صورت گرفت. برای تعیین شدت بیماری ایجاد شده توسط سویه قارچ، از سیستم درجه‌بندی صفر تا پنج استفاده شد (Schoeny *et al*., 1998). درجهٔ صفر: ریشه کاملاً سالم، بدون زخم و لکه، درجهٔ یک: آلودگی ریشه کمتر از ۱۰ درصد، درجهٔ دو: آلودگی ریشه بین ۲۵-۱۱ درصد، درجهٔ سه: آلودگی ریشه بین ۵۰-۲۶ درصد، درجهٔ چهار: آلودگی ریشه بین ۷۵-۵۱ درصد، درجهٔ پنج: آلودگی شدید. با توجه به کاهش بیماری ایجاد شده در گیاهان در مقایسه با شاهد آلوده توان مهار زیستی بیماری توسط سویه‌های باکتری مورد ارزیابی قرارگرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. گروه بندی تیمارها، تجزیهٔ واریانس و مقایسهٔ میانگین داده‌ها به‌روش دانکن با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.1) انجام شد. همبستگی بین صفات مطالعه شده در آزمایشگاه و گلخانه با استفاده از ضریب هم‌بستگی پیرسون (نرم‌افزار SAS) مورد بررسی قرارگرفت. در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آن‌ها وجود داشت، از تبدیل عددی $x=\sqrt{x+0.05}$ استفاده شد.

نتایج

بررسی‌های آزمایشگاهی با هدف ارزیابی اولیه توانایی مهار زیستی قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم، با استفاده از ۲۷ سویه باکتری *B. subtilis* مورد مطالعه انجام شد. نتایج این بررسی‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- تولید متابولیت‌های ثانویه، بیوسورفکتانت و بیوفیلم سویه‌های باکتری *B. subtilis* در تقابل با قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم در آزمایشگاه.

Table 1. Production of secondary metabolites, biosurfactant and biofilm in *B. subtilis* strains against wheat take-all agent in *in vitro*.

Strains	Antagonistic abilities in dual culture (%)*	Antifungal volatile (%)*	Extracellular liquid secretion 5% *	Extracellular liquid secretion 15%*	Extracellular liquid secretion 25%*	Biofilm formation (OD_{500})**	Biosurfactant production (mm)*
B1	95.03 a	70.37 b	79.41 a	88.23 a	94.11 a	1.771 a	6.33 a
B2	66.66 d	11.11 j-l	14.75 k	24.50 l	37.23 k	1.256 bc	4.66 a-d
B3	43.18 jk	52.92 e-g	54.88 e-h	60.76 h	78.41 c-e	1.784 a	5.66 ab
B4	96.29 a	72.81 b	53.91 f-h	74.50 c-f	81.35 fg	1.605 ab	6.33 a
B5	60.48 ef	17.25 g-k	56.85 d-g	69.58 fg	94.11 a	0.250 f	2.66 e-h
B6	46.88 ij	16.03 h-k	46.08 i	59.79 hi	64.07 i	0.209 f	1.00 h-j
B7	38.25 k	19.47 g-i	2.94 l	2.94 no	3.91 m	0.169 f	0 j
B8	54.29 gh	37.03 d	73.52 ab	90.17 a	94.11 a	0.586 d-f	2.00 f-i
B9	59.25 e-g	29.62 d-f	2.94 l	9.79 m	10.76 i	1.258 bc	5.00 a-c
B10	93.81 a	23.44 f-h	60.76 c-e	78.41 bc	88.25 c-e	0.239 f	2.00 f-i
B11	91.33 ab	72.81 b	61.76 cd	11.58 d-g	90.17 a-d	0.262 f	1.66 g-j
B12	87.62 b	16.03 h-k	33.32 i	40.17 j	49.00 j	0.851 c-e	3.00 d-f
B13	92.59 ab	8.62 k-m	63.07 c	78.41 bc	92.14 ab	0.261 f	0.66 ij
B14	96.29 a	8.62 k-m	61.76 cd	80.38 b	88.23 b-e	0.281 f	2.66 e-h
B15	53.07 h	20.96 f-i	52.94 g	71.55 d-g	84.29 ef	0.403 ef	2.33 e-i
B16	55.55 f-h	12.33 i-l	55.88 d-h	74.50 c-f	90.17 a-d	0.378 f	3.33 c-g
B17	81.48 c	70.37 b	50.00 i	60.76 h	70.58 h	0.887 cd	2.66 e-h
B18	92.59 ab	37.03 d	63.07 c	75.47 b-e	78.41 c-e	0.396 ef	2.66 e-h
B19	93.81 a	51.85 c	59.79 c-f	77.44 bc	86.26 de	0.334 f	2.33 e-i
B20	43.18 jk	33.33 de	46.05 i	54.88 i	67.64 hi	0.538 d-f	3.00 d-f
B21	45.66 j	29.62 d-f	72.52 b	76.47 b-d	81.35 fg	0.541 d-f	0 j
B22	51.58 hi	87.62 a	2.94 l	3.91 no	3.91 m	0.165 f	2.00 f-i
B23	91.33 ab	6.55 l-m	19.58 k	34.29 k	49.00 i	0.221 f	2.66 e-h
B24	95.03 a	49.37 c	57.79 c-f	78.41 bc	91.17 a-c	0.223 f	4.00 b-e
B25	61.70 de	53.07 c	2.94 l	5.88 mn	10.76 i	0.257 f	3.66 c-f
B26	61.70 de	16.03 h-k	56.85 d-g	66.64 g	87.41 g	0.224 f	2.00 f-i
B27	39.48 k	53.07 c	53.91 f-h	71.55 d-g	91.17 a-c	0.262 f	2.66 e-h
Control	0 l	0 m	0 l	0 o	0 m	0.121 f	0 j

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪** یا ۵٪* تفاوت معنی‌داری ندارند.

Numbers with similar letter in each column are not statistical difference at 1%** or 5%* levels according to Duncan's multiple range test.

Archive of SID

www.SID.ir

الف) بررسی‌های آزمایشگاهی

ارزیابی اولیه توان مهار زیستی سویه‌های باکتری علیه قارچ *G. graminis* var. *tritici*

براساس نتایج این پژوهش، تمامی سویه‌ها در برابر قارچ بیمارگر ایجاد هاله بازدارنده نموده و نسبت به شاهد در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار نشان دادند. بیشترین بازدارندگی رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر به‌میزان ۹۶/۲۹ درصد مربوط به سویه‌های B4 و B14 و پس از آن ۹۵/۰۳ درصد مربوط به سویه‌های B1 و B24 بود. ۱۲ سویه دیگر نیز بیش از ۶۰ درصد از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کردند (جدول ۱). در بررسی تولید متابولیت‌های فرار ضدقارچی، سویه B22 با ۸۷/۶۲ درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ، دارای بیشترین میزان متابولیت فرار ضدقارچی بود. ۷ سویه دیگر از جمله B4، B11، B17 و B1 نیز ممانعت بالای ۵۰ درصد نشان داده و نسبت به شاهد در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار داشتند، در حالی که ۱۰ سویه، تأثیری کمتر از ۲۰ درصد روی رشد پرگنه قارچ نشان دادند (جدول ۱). نتیجه بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی روی رشد قارچ بیمارگر مورد مطالعه نشان داد، همه سویه‌ها قادر به تولید ترشحات مایع خارج سلولی بودند. بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر مربوط به محیط کشت‌های حاوی غلظت ۲۵ دصد ترشحات مایع خارج سلولی بود. مقایسه میانگین داده‌ها و گروه‌بندی آماری نشان داد، سویه‌های باکتری به همراه تیمار شاهد در این غلظت از ترشحات مایع خارج سلولی در ۱۷ گروه آماری قرار گرفتند که نشان‌دهندهٔ تنوع بالای سویه‌ها در تولید ترشحات مایع خارج سلولی است (جدول ۱). بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به سویه‌های B1، B5 و B8 با ۹۴/۱۱ درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر بود، در حالی‌که هشت سویه ممانعتی کمتر از ۵۰ درصد نشان دادند و دو سویه B7 و B22 در کمترین گروه از نظر بازدارنگی و با تیمار شاهد در یک گروه آماری قرارگرفتند.

میزان تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت

در این آزمایش تولید بیوفیلم براساس میزان جذب نور توسط ELIZA reader در سویه‌های آنتاگونیست بررسی شد. براساس نتیجهٔ این آزمایش، تولید بیوفیلم در برخی سویه‌ها مانند B3، B1 و B4 به‌طور چشم‌گیری بیش از سایر سویه‌ها بود. سویه‌های B9 و B2 نیز میزان بیشتری بیوفیلم نسبت به شاهد تولید کرده و در گروه‌های آماری مجزا از شاهد قرارگرفتند. تعداد ۱۵ سویه تولید بیوفیلم ناچیزی داشتند و با شاهد در یک گروه آماری قرارگرفتند. نتایج آزمون تولید بیوسورفکتانت توسط سویه‌های باکتری نشان داد، بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت مربوط به سویهٔ B1 و B4 با هالهٔ روشن ۶/۳۳ میلی‌متری و پس از آن مربوط به سویهٔ B3 با ایجاد هالهٔ ۵/۶۶ میلی‌متری بود. ۱۹ سویهٔ دیگر نیز هاله‌ای بیش از ۲ میلی‌متر در اطراف پرگنه باکتری ایجاد کردند. سویه‌های B7 و B21 ترکیبات بیوسورفکتانت تولید ننموده و با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند(جدول ۱).

ب) بررسی‌های گلخانه‌ای

تعیین قوه نامیه بذر

این آزمایش به‌منظور اطمینان از بالا بودن قوهٔ نامیه بذرهای گندم مورد استفاده انجام شد. شمارش بذرهای جوانه‌زده طی ۱۰ روز انجام شد و قوهٔ نامیه بذرها ۹۹ درصد تعیین شد.

اثر باکتری‌های آنتاگونیست در جلوگیری از بیماری در گلخانه

میزان مهار زیستی بیماری توسط سویه‌های باکتری منتخب در گلخانه براساس کاهش علایم ایجاد شده روی ریشهٔ گندم ارزیابی شد (شکل ۱). نتایج حاصل از بررسی تأثیر ۱۱ باکتری انتخاب شده روی بیماری پاخورهٔ گندم در گلخانه نشان داد، ۷۰ درصد از سویه‌ها موجب کاهش بیماری به‌میزان بالای ۵۰ درصد شدند. سویه‌های مورد مطالعه به‌همراه تیمارهای کنترل سالم (تیمار فاقد باکتری آنتاگونیست و قارچ بیمارگر) و کنترل آلوده (تیمار فقط قارچ بیمارگر) در ۹ گروه آماری قرار گرفتند و در سطح احتمال ۱٪ تفاوت آماری نشان دادند (شکل ۲). سویهٔ B1 با کاهش ۱۰۰ درصد بیماری با شاهد سالم در یک گروه آماری قرار گرفت. سویه‌های B3 و B9 نیز با کاهش ۸۶/۶ درصدی بیماری نسبت به شاهد سالم، در گروه آماری بعدی قرارگرفتند. کمترین میزان کاهش بیماری مربوط به سویه‌های B22 و B26 با حدود ۲۰ درصد کاهش بیماری بود.

Archive of SID

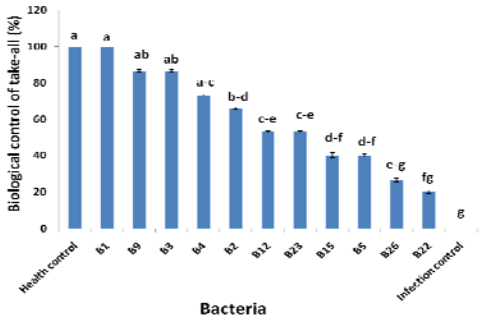
www.SID.ir

شکل ۱- علایم بیماری پاخوره روی ریشهٔ گیاه گندم (بر اساس شاخص شدت بیماری صفر تا پنج).

Fig. 1. Disease symptom on wheat root (according to disease severity index in 0 to 5 scale).

ج) همبستگی صفات مورد مطالعه در آزمایشگاه و گلخانه

پس از بررسی ضریب‌های همبستگی داده‌های به‌دست آمده از صفات مورد بررسی در آزمایشگاه و گلخانه مشخص شد بین تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت در آزمایشگاه با میزان مهار زیستی بیماری در گلخانه همبستگی مثبت وجود دارد (جدول ۲).



شکل ۲- تأثیر سویه‌های باکتری *B. subtilis* در کاهش بیماری پاخورهٔ گندم در گلخانه (حروف متفاوت نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد).

Fig. 2. Effect of *B. subtilis* strains on wheat take-all reduction in the greenhouse. Different letters indicate a significant difference at 1% probability level among treatments.

جدول ۲- همبستگی صفات مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه.

Table 2. Correlation between studied characters in laboratory and greenhouse conditions.

Laboratory / Greenhouse	Antagonistic effects in dual culture	Antifungal volatile metabolites effects	Extracellular liquid secretion effects at 5%	Extracellular liquid secretion effects at 15%	Extracellular liquid secretion effects at 25%	Biofilm formation	Biosurfactant production
Disease biological control	0.38	0.18	0.12	0.08	0.11	0.71*	0.85*

* تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بین ضریب‌های همبستگی براساس آزمون دانکن.

* Significant difference at 1% level between correlation coefficients, according to Duncan's multiple range tests.

بحث

در تحقیق حاضر پتانسیل ۲۷ سویه باکتری *B. subtilis* بومی ایران در مهار زیستی بیماری پاخورهٔ گندم در آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. با هدف غربال‌گری اولیه سویه‌ها، ابتدا در آزمایشگاه تأثیر سویه‌های باکتری بر رشد میسلیومی قارچ بیمارگر با استفاده از روش‌های کشت متقابل، تأثیر ترکیبات فرار ضدقارچی و ترشحات مایع خارج سلولی ارزیابی شد. در آزمون کشت متقابل، کلیه سویه‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه بین ۳۹ تا ۹۵ درصد نسبت به‌شاهد، از رشد قارچ ممانعت نمودند. حدود نیمی از سویه‌ها بیش از ۶۰ درصد از رشد پرگنه قارچ جلوگیری کردند. این نتیجه با یافته‌های آزمایشگاهی سایر دانشمندان مطابقت دارد (Kumar *et al*., 2009; Orio *et al*., 2016). بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد میسلیوم‌های قارچ به‌تولید آنتی‌بیوتیک در این گونه باکتریایی برمی‌گردد. سویه‌های مختلف باکتری *B. subtilis* قادر به‌تولید بیش از ۲۴ نوع آنتی‌بیوتیک با ساختار متنوع و جالب هستند. از آنتی‌بیوتیک‌های مهم تولید شده توسط این باکتری می‌توان به ائومایسین، ایتورین‌های A ، B و E، سوبتیلین، باسیلومایسین، فنجایسین، میکوسوبتیلین،

Archive of SID

www.SID.ir

باسیلی‌سین و مایکوباسیلین اشاره نمود. البته هیچ سویه‌ای نمی‌تواند همه این آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید نماید. به‌طور متوسط ۵-۴ درصد ژنوم این گونه باکتریایی که حدود ۳۵۰ کیلو جفت‌باز است، به ژن‌های تولیدکنندهٔ آنتی‌بیوتیک اختصاص دارد (Stein, 2005; Sumi *et al.*, 2015). بررسی تأثیر متابولیت‌های فرار ضدقارچی روی رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر در آزمایشگاه، نشان‌دهندهٔ تنوع تولید این متابولیت‌ها در سویه‌های باکتری بود، به‌طوری که طیف بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بین ۷۲-۶/۵ درصد بود. نتایج حاصل از آزمایش‌های سایر محققان نیز بیان‌گر مؤثر بودن این گونه ترکیبات در کاهش رشد بیمارگرهای قارچی می‌باشد (Fiddaman & Rossal, 1994; Derakhshan *et al.*, 2008). تحقیقات زیادی روی تأثیر متابولیت‌های فرار مانند زنجیره‌های کوتاه الکل، استون و ۲ و ۳- بوتاندیول که توسط برخی از ریزوباکتری‌ها تولید می‌شود، انجام شده است. نتایج این بررسی‌ها نشان می‌دهد متابولیت‌های فرار تولید شده توسط باکتری‌های آنتاگونیست در القا مقاومت به‌گیاه و کاهش رشد قارچ‌های بیمارگر گیاهی مؤثر هستند (Yi *et al.*, 2016). نتایج تحقیقی روی متابولیت‌های فرار تولید شده توسط سویه‌های *B. subtilis* نشان داد این ترکیبات موجب کاهش رشد، بدشکلی میسلیوم، کنیدیوفور و کنیدی‌های قارچ *Fusarium oxysporum* و چند قارچ دیگر می‌شوند. همچنین این متابولیت‌ها موجب بدشکلی میسلیوم‌های قارچ به‌صورت واکوئله‌شدن و ایجاد تورم نوک هیف می‌شوند (Chaurasia *et al.*, 2005). در تحقیقی که توسط فروتن و همکاران روی امکان مهار زیستی بلایت سنبله گندم ناشی از قارچ *F. graminearum* توسط تعدادی سویه باکتری آنتاگونیست در جنس‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* انجام شد، تمامی سویه‌ها با تولید متابولیت‌های فرار از رشد قارچ در آزمایشگاه جلوگیری کردند (Foroutan *et al.*, 2005). مقایسهٔ میانگین و تجزیهٔ واریانس داده‌های حاصل از این تحقیق نشان داد، هر سه غلظت ترشحات مایع خارج سلولی قادر به کاهش رشد میسلیوم قارچ بیمارگر در آزمایشگاه بودند و از بین غلظت‌های مختلف، غلظت ۲۵ درصد بیشترین تأثیر را در کاهش رشد قارچ نشان داد. یکی از مشکلات ترشحات مایع خارج سلولی، جذب این مواد توسط کلوئیدهای خاک و مواد محلول در محیط‌های آبی است که موجب کاهش کارایی این متابولیت‌ها می‌شود، بنابراین اثربخشی آن‌ها در مقایسه با متابولیت‌های فرار کمتر می‌باشد (Farrokhi *et al.*, 2015). در بررسی میزان بیوفیلم تولید شده توسط سویه‌های *B. subtilis* تفاوت زیادی بین سویه‌ها مشاهده شد (جدول ۱). سه سویه B3، B1 و B4 به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به‌سایر سویه‌ها، بیوفیلم بیشتری تولید نمودند اما غالب سویه‌ها میزان اندکی بیوفیلم تولید نموده و با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های باکتری یکی از راه‌کارهای مهم بقاء می‌باشد. براساس بررسی‌های آزمایشگاهی، باکتری‌های موجود در بیوفیلم می‌توانند از حمله و دفاع میزبان اجتناب نمایند، هم‌چنین مقاومت بیشتری نسبت به سلول‌های منفرد در برابر عوامل ضدمیکروبی مانند سموم و آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. تحصیل ویژگی‌های جدید ژنتیکی و کلنیزاسیون بهتر سطوح، از دیگر امتیازات استقرار در بیوفیلم می‌باشد (Davey & O'Toole, 2000; Morris & Monier, 2003; Branda *et al.*, 2005). عوامل و شرایط مختلف محیطی و تغذیه‌ای بر تولید بیوفیلم باکتری تأثیرگذار است. نتایج بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد ترکیب مواد معدنی و اسیدیته خاک، همچنین محتوای مواد مترشحه از ریشهٔ گیاه میزبان به‌ویژه قندها و اسیدهای آمینه می‌تواند الگو و میزان تولید بیوفیلم باکتری را تحت تأثیر قرار دهد (Khezri, 2016). براساس نتایج بررسی‌های محققان، باکتری‌های موجود در بخش‌های درونی بستره بیوفیلم نسبت به سلول‌های آزاد توان مقابله بیشتری با شرایط اسمزی بالاتر، محدودیت اکسیژن بیشتر و تراکم سلولی بالاتر دارند (Prigent *et al.*, 1999). بیوسورفکتانت‌ها، ترکیبات آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که موجب کاهش کشش سطحی می‌شوند. سورفکتین از لیپوپپتیدهای حلقوی آمفی‌فیلیک است که به‌صورت غیرریبوزومی سنتز می‌شود. این آنتی‌بیوتیک از مهم‌ترین بیوسورفکتانت‌هایی است که فعالیت ضدمایکوپلاسمایی، ضدباکتریایی و ضدویروسی آن اثبات شده است

Archive of SID

www.SID.ir

(Ongena & Jacques, 2007). سورفکتین خود برای بیمارگرهای قارچی سمی نیست اما می‌تواند اثر سینرژیستی روی فعالیت ایتورین A داشته باشد (Pyoung *et al.*, 2010). در این مطالعه، کلیهٔ سویه‌ها با تولید بیوسورفکتانت، در اطراف پرگنه ایجاد هاله روشن نمودند. براساس نتایج آماری این پژوهش، میزان تولید بیوسورفکتانت با مقدار تولید بیوفیلم در سویه‌های مورد مطالعه ۸۳٪ همبستگی نشان داد. نتایج آزمایش‌های سایر محققان نیز نشان می‌دهد میزان تولید سورفکتین با تشکیل بیوفیلم در باکتری *B. subtilis* رابطهٔ مستقیم دارد (Bais *et al.*, 2004; Zeriouh *et al.*, 2014). در مطالعه‌ای ارتباط مهار بیمارگر باکتریایی *P. syringae* pv. *tomato* توسط باکتری *B. subtilis* با تشکیل بیوفیلم و سورفکتین در اطراف ریشهٔ گیاه اثبات شده است (Bais *et al.*, 2004).

پس از بررسی‌های اولیهٔ سویه‌های مورد مطالعه، تعداد ۱۱ سویه با توان متفاوت در کاهش رشد میسلیوم قارچ بیمارگر و تولید بیوفیلم در آزمایشگاه، برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شد. نتایج مهار زیستی بیماری در گلخانه نشان داد، کلیه سویه‌های مورد مطالعه موجب کاهش بیماری بین ۱۰۰-۲۰ درصد شدند. ۷۲ درصد از سویه‌ها، بیماری را بیش از ۵۰ درصد نسبت به شاهد کاهش دادند که این تفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار بود. لگزیان و همکاران برای مهار زیستی بیماری پاخورهٔ گندم در آزمایشگاه و گلخانه، از تعدادی جدایه باکتری که از ریزوسفر گیاهان در مناطق مختلف ایران جداسازی شده بود، استفاده نمودند. سویه منتخب *P. fluorescens* VUPF5، توانست بیماری را تا ۸۵ درصد در گلخانه کنترل نماید. این سویه دارای توانایی بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله سیدروفور، سیانید هیدروژن، پروتئاز، فنازین و متابولیت‌های فرار ضدقارچی بود (Lagzian *et al.*, 2013). در پژوهش دیگری که از جنس‌های مختلف باکتری آنتاگونیست برای کنترل قارچ عامل پاخورهٔ گندم استفاده شد، باکتری‌های مربوط به‌جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Erwinia* به‌عنوان مؤثرترین عوامل مهار زیستی بیماری معرفی شدند، هم‌چنین باکتری‌های نماینده تأثیر زیادی در کاهش بیماری پاخوره و افزایش شاخص‌های رشدی گیاه در گلخانه داشتند (Jolideh *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای توان آنتاگونیستی ۲۳ باکتری آنتاگونیست، در مزارعی با تاریخچه متفاوت در زوال بیماری پاخوره مورد ارزیابی قرارگرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، نیمی از جدایه‌ها توانستند روی محیط کشت و ریشهٔ گندم از فعالیت قارچ بیمارگر جلوگیری نمایند (Nasraoui *et al.*, 2007). در تحقیقات مختلف کارایی جدایه‌های آنتاگونیست سودوموناده‌ای فلورسنت، گونه‌های مختلف جنس *Bacillus*، هم‌چنین جدایه‌هایی از جنس‌های *Serratia*، *Paenibacillus*، *Klebsiella* و *Acinetobacter* را در کاهش خسارت بیماری پاخوره اثبات شده است (Nasraoui *et al.*, 2007; Sakalauskas *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

برخی از محققان اعتقاد دارند تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط باکتری‌های آنتاگونیست با مهار بیماری در گلخانه رابطه دارد و می‌تواند به‌عنوان ابزاری در انتخاب اولیه سویه‌های برتر در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرد (Cavaglieri *et al.*, 2004). در این مطالعه نیز تولید متابولیت‌های ثانویه باکتری در ارزیابی‌های اولیه مورد توجه قرارگرفت اما همبستگی معنی‌داری بین تولید متابولیت‌های ثانویه در آزمون‌های انجام شده در آزمایشگاه با مهار زیستی بیماری در گلخانه مشاهده نشد. این نتیجه می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. یکی از این موارد، تفاوت در سازگاری سویه‌های باکتری با محیط گلخانه است. حقیقت این است که فقط برخی از ریزوباکتری‌هایی که در آزمایشگاه از رشد قارچ‌های بیمارگر جلوگیری می‌نمایند، قادرند در گلخانه نیز موجب کاهش بیماری شوند که این توانایی به‌نوع جدایه و شرایط محیطی بستگی دارد. به‌عقیده دانشمندان، جدایه‌های باکتری *B. subtilis* با استفاده از روش‌های مختلف موجب کاهش بیماری در گیاهان می‌شوند. این مکانیسم‌ها شامل برتری در رقابت مکانی و تغذیه‌ای که نتیجه آن کلنیزاسیون سریع ریشه است، تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع به‌ویژه

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، تولید ترکیبات مشابه هورمون‌های افزایش دهندهٔ رشد گیاه، افزایش جذب مواد غذایی توسط ریشه و القاء مقاومت به‌گیاه می‌باشد (Johansson *et al*., 2003). در این تحقیق، تعداد زیادی از سویه‌های با توانایی تولید بیوفیلم بالا، بیماری را در گلخانه به‌میزان زیادی مهار نمودند. کاهش بیماری توسط سویه‌های B1، B3، B4 و B9 بین ۱۰۰-۷۳ درصد بود. این سویه‌ها در آزمایشگاه نیز میزان بیوفیلم زیادی را تولید نموده و در گروه‌های آماری a، ab و bc قرار گرفتند. هم‌چنین سویه‌های B5، B22 و B26 که بیماری را ۴۰-۲۰ درصد کاهش دادند، در آزمایشگاه نیز بیوفیلم بسیار ناچیزی تولید کرده و از نظر آماری با شاهد در یک گروه قرار گرفتند. بررسی میزان همبستگی بین صفات آزمایشگاه و گلخانه نشان داد، بین تولید بیوفیلم در آزمایشگاه و مهار زیستی بیماری در گلخانه، ۰/۷۱ همبستگی وجود داشت. محققان مختلف در مقالات خود به‌این موضوع که مکانیسم‌های بیوکنترل می‌بایست با تولید بیوفیلم میکروارگانیسم رابطه داشته باشد، اشاره نموده‌اند (Davey & O'Toole, 2000; Molina *et al*., 2003; Morikawa, 2006). توان بالای آنتاگونیستی سویه‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم، ممکن است با استقرار موفق و بادوام سویه‌ها روی ریشه گیاه که نتیجه تشکیل سریع بیوفیلم است، مرتبط باشد. Bais و همکاران (۲۰۰۴) اعتقاد دارند توانایی تولید بیوفیلم در باکتری *B. subtilis* رابطه مستقیم با توان مهار زیستی بیماری دارد. در مطالعه‌ای که از سویه *B. subtilis* 6051 در مهار زیستی باکتری بیمارگر *P. syringae* pv. *tomato* روی گیاه *Arabidopsis* استفاده شد، این سویه در شرایط آزمایشگاه و خاک قادر به حفاظت گیاه در برابر باکتری بیمارگر بود. این باکتری آنتاگونیست به‌محض اینکه روی ریشه گیاه مستقر می‌شود، مقادیر زیادی بیوفیلم و سورفکتین تولید نموده و سطح ریشه را می‌پوشاند. در این سویه ترشح سورفکتین و بیوفیلم در ارتباط با هم قرار دارد. سورفکتین که از آنتی‌بیوتیک‌های مهم این باکتری است در غلظت‌های بالا قادر به از بین بردن بیمارگرهاست. تاثیر سورفکتین بر تولید بیوفیلم در باکتری‌های *Salmonella enterica*، *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* برعکس باکتری *B. subtilis* بوده و تولید بیوفیلم در حضور سورفکتین کاهش می‌یابد. از طرفی گفته می‌شود وجود سورفکتین زیاد تولید شده توسط سویه *B. subtilis* 6051، از کلنیزاسیون سایر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری *P. syringae* pv. *tomato* روی ریشهٔ گیاه آرابیدوپسیس ممانعت می‌نماید (Bais *et al*., 2004). در مطالعه حاضر نیز همبستگی بین تولید بیوسورفکتانت‌ها در آزمایشگاه و مهار زیستی بیماری پاخورهٔ گندم در گلخانه ۰/۸۵ ارزیابی شد. یافته‌های سایر محققان نشان می‌دهد آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی باسیلومایسین، فنجایسین و سورفکتین بیشترین تاثیر را در توان مهار زیستی سویه *B. subtilis* UMAF6614 داشته‌اند، به‌طوری که کاهش تولید سورفکتین در این سویه آنتاگونیست، موجب کاهش تولید بیوفیلم، کلنیزاسیون سطوح اندام هوایی گیاه خربزه و سرکوب بیماری سفیدک سطحی کدوئیان شد. در واقع کاهش تولید سورفکتین روی تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و پروتئین TasA که مهم‌ترین پروتئین موجود در بیوفیلم باکتری *B. subtilis* است، تاثیر منفی داشته است (García-Gutiérrez *et al*., 2013; Zeriouh *et al*., 2014).

یافته‌های ما در این پژوهش نشان داد برخی سویه‌های بررسی شده دارای پتانسیل بالا در مهار زیستی قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم در آزمایشگاه و گلخانه می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهد کاهش یا مهار بیماری‌های گیاهی نتیجهٔ مکانیسم‌های متنوع و تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف توسط میکروارگانیسم‌های مؤثر مهار زیستی بوده، به‌نحوی که نمی‌توان کاهش یا مهار بیماری را به یک یا چند مکانیسم مربوط دانست. کنترل مؤثر بیشتر بیماری‌های گیاهی با روش‌های شیمیایی انجام می‌شود اما در مورد بیماری پاخورهٔ گندم قارچ‌کش‌های موجود بی‌تأثیر بوده و به‌جز چند مورد که برای ضدعفونی بذر استفاده می‌شوند، کارایی لازم را ندارند. کمبود ارقام متحمل و مقاوم به‌بیماری نیز از مشکلات دیگر در مهار این بیماری می‌باشد، بنابراین استفاده از عوامل مهار زیستی قارچی و باکتریایی به‌عنوان روش‌های جایگزین یا در کنار سایر روش‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

می‌تواند در کاهش بیماری مؤثر واقع شود. در این مطالعه سه سویه B1، B3 و B4 همبستگی بالایی در تولید بیوفیلم و بیوسورفکتانت در آزمایشگاه با کاهش بیماری پاخورهٔ گندم در گلخانه نشان دادند. این سویه‌ها به‌عنوان سویه‌های برتر این مطالعه انتخاب شدند و در بررسی‌های تکمیلی مورد استفاده قرار خواهند گرفت. بر اساس یافته‌های حاصل از این تحقیق، توانایی تولید بیوفیلم توسط باکتری‌های مفید می‌تواند به‌عنوان یکی از ویژگی‌های مهم در انتخاب سویه‌های آنتاگونیست در کاربردهای عملی در نظر گرفته شود.

سپاس‌گزاری

نویسنده مقاله از خانم مهندس لیلا صادقی و آقای مهندس مجتبی قلندر، به‌ترتیب محققان موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان مرکزی، به جهت اهدا جدایه‌های قارچ بیمارگر تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

Babaeipoor, E., Mirzaei, S., Rezaee Danesh, Y., Arjmandian, A. & Chaichi, M. 2011. Evaluation of some antagonistic bacteria in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* causal agent of wheat take-all disease in Iran. African Journal of Microbiology Research, 5: 5165-5173.

Bais, H.P., Fall, R. & Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, 134: 307-319.

Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. & Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiology, 13: 20-26.

Cavaglieri, L., Passone, A. & Etcheverry, M. 2004. Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. Research in Microbiology, 55: 747-754.

Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L.M.S., Trivedi, P., Kumar, B. & Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. Microbiological Research, 160: 75-81.

Davey, M.E. & O'Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Review, 64: 847-867.

Derakhshan, A., Safaei, N. & Alizadeh, A. 2008. Evaluation of epiphytotic bacteria for biocontrol of head blight and monitoring stability of antagonist population on wheat in greenhouse. Iranian Journal of Plant Pathology, 44: 267-288.

Farrokhi, F., Hajian Shahri, M., Salari, M. & Rouhani, H. 2015. The efficacy of *Pythium oligandrum* in the biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of sugar beet damping-off under greenhouse conditions. Biocontrol in Plant Protection, 3: 57-71.

Fiddaman, P.J. & Rossal, S. 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis.* Journal of Applied Bacteriology, 74: 119-126.

Fiddaman, P.J. & Rossal, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis.* Journal of Applied Bacteriology, 76: 395-405.

Foroutan, A., Rahimian, H. & Alizadeh, A. 2005. Effect of antagonistic bacteria on Fusarium head blight. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 455- 473. (In Persian with English summary).

Fouly, H.M., Wilkinson, H.T. & Chen, W. 1997. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. Mycologia, 89: 590-597.

García-Gutiérrez, L., Zeriouh, H., Romero, D., Cubero, J., De Vicente, A. & Pérez-García, A. 2013. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against

Archive of SID

www.SID.ir

cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defense responses. Microbial Biotechnology, 6: 264-274.

Garrett, S.D. 1981. Introduction, pp. 1-14. In: Asher, M.J.C. & Shipton, P.J. (eds.), Biology and Control of take-all. Academic Press, London.

Ghahfarokhi, R.M. & Goltapeh, M.E. 2010. Potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica; Sebacina vermifera* and *Trichoderma* species in biocontrol of take-all disease of wheat *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici in vitro*, in Iran. Journal of Agriculture Science and Technology, 6: 11-18.

Henis, Y. & Inbar, M. 1968. Effect of *Bacillus subtilis* on growth and sclerotium formation by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 58: 933-938.

Hornby, D., Bateman, G.L., Gutteridge, R.J., Lucas, P., Osbourn, A.E., Ward, E. & Yarham, D.J. 1998. Take-all Disease of Cereals: A Regional Perspective. CAB International, London, 384 pp.

Hsieh, F., Li, M., Lin, T. & Kao, S. 2004. Rapid detection and characterization of surfactin producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. Current Microbiology, 49: 186-191.

ISTA. 2003. ISTA Handbook on Seedling Evaluation. Bassersdorf: ISTA.

Johansson, P.M., Johnsson, L., & Gerhardson B. 2003. Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. Plant Pathology, 52: 219-227.

Jolideh, F., Marefat, A.R. & Nareri, B. 2012. Occurrence of wheat take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in Zanjan province and evaluation of inhibitory effect of wheat rhizosphere bacteria on the causal agent of the disease. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 35: 19-30. (In Persian with English summary).

Junaid, J.M., Dar, N.A., Bhat, T.A., Bhat, A.H. & Bhat, M.A. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. International Journal of Modern Plant and Animal Sciences, 1: 39-57.

Kempf, H.J. & Wolf, G. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* on wheat. Phytopathology, 79: 990-994.

Khezri, M., Ahmadzadeh, M., Salehi-Jouzani, Gh., Behboudi, K., Ahangaran, A., Mousivand, M. & Rahimian, H. 2011. Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum*. Journal of Plant Pathology, 93: 373-382.

Khezri, M. 2016. Influence of some environmental and nutritional conditions on biofilm formation of probiotic *Bacillus subtilis* strains. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 4: 157-165. (In Persian with English summary).

Kim, D.S., Cook, R.J. & Weller, D.M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology, 87: 551-558.

Kim, H.S., Park, J., Choi, S.W., Choi, K.H., Lee, G.P., Ban, S.J., Lee, C.H. & Chung, S.K. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus* strain for biological control. Journal of Microbiology, 41: 196- 201.

Kloepper, J.W., Ryu, C.M. & Zhang, S.A. 2004. Induced system resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94: 1259-1266.

Kovács, A.T., Smits, W.K., Miron´czuk, A.M. & Kuipers, O.P. 2009. Ubiquitous late competence genes in *Bacillus* species indicate the presence of functional DNA uptake machineries. Environmental Microbiology, 11: 1911-1922.

Kumar, A., Saini, P. & Shrivastava, J.N. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian Journal of Experimental Biology, 47: 57-62.

Kwak, Y.S. & Weller, D.M. 2013. Take-all of Wheat and Natural Disease Suppression: A Review. The Plant Pathology Journal, 29: 125-135.

Archive of SID

www.SID.ir

Lagzian, A., Saberi Riseh, R., Khodaygan, P., Sedaghati, E. & Dashti, D. 2013. Introduced *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 as an important biocontrol agent for controlling *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* the causal agent of take-all disease in wheat. Archive of Phytopathology and Plant Protection, 46: 2104-2116.

Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B. & Ongena, M. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Applied and Environmental Microbiology, 71: 4577-4584.

Mohammadi, K., Rahimian, H., Etebarian, H.R. & Ghalandar, M. 2005. Biological control of common root rot of wheat by antagonistic bacteria isolated from wheat rhizosphere. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 173-177.

Molina, M.A., Ramos, J.L. & Urgel, M.E. 2003. Plant-associated biofilms. Review in Environmental Science and Biotechnology, 2: 99-108.

Morikawa, M. 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 1-8.

Morris, C. & Monier, J.M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Phytopathology, 41: 429-453.

Nagórska, K., Hinc, K., Stauch, M.A. & Obuchowski, M. 2008. Influence of the sigma B stress factor and *yxaB*, the gene for a putative exopolysaccharide syntheses under sigmaB control, on biofilm formation. Journal of Bacteriology, 190: 3546-3556.

Nasraoui, B., Hajlaoui, M.R., Aïssa, A.D. & Kremer, R.J. 2007. Biological control of wheat take-all disease: I-Characterization of antagonistic bacteria from diverse soils toward *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Tunisian Journal of Plant Protection, 2: 23-34.

Ongena, M., Duby, F., Jourdan, E., Beaudry, T., Jadin, V., Dommes, J. & Thonart, P. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. Applied Microbiology and Biotechnology, 67: 692-698.

Ongena, M. & Jacques, P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease control. Trends Microbiology, 16:115-125.

Onkar, D. & James, B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. London, Lewis publisher. 448pp.

Orio, A.G.A., Brücher, E. & Ducasse, D.A. 2016. A strain of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris.* European Journal of Plant Pathology, 144: 217-223.

Pyoung, K., Ryu, J., Kim, Y.H. & Chi, W. T. 2010. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20: 138-145.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and Lejeune, P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 181: 5993-6002.

Quecine, M.C., Araujo, W.L., Marcon, J., Gai1, C.S. Azevedo, J.L. & Pizzirani-Kleiner, A.A. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Letters in Applied Microbiology, 47: 486-491.

Rajabi, G. H., & Behrozin, M. 2003. Pests and Diseases of Wheat in Iran. Agricultural Education Publications, 186 pp. (In Persian).

Sadeghi, L., Alizadeh, A., Safaei, N. & Ghalandar, M. 2009. Identification of Iranian populations of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* using morphological, molecular and pathological studies. Iranian Journal of Plant Pathology, 45: 99-114. (In Persian with English summary).

Sakalauskas, S., Kacergius, A., Janusauskaite, D. & Citavicius, D. 2014. Bacteria with a broad-spectrum of antagonistic activity against pathogenic fungi of cereals. Zemdirbyste-Agriculture, 101:185-192.

Archive of SID

www.SID.ir

Schoeny, A., Lucas, P. & Jeuffroy, M.H. 1998. Influence of the incidence and severity of take-all of winter wheat on yield losses and responses to different nitrogen fertilizations, pp. 83-88. In: Proceedings of the British Crop Protection Conference-Pests and Diseases, 1998. Farnham, UK.

Singleton, L.L. 1992. Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press, St. Paul, MN, 266 pp.

Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, 56: 845-857.

Sumi, C.D., Yang, B.W., Yeo, I. & Hahm, Y.T. 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. Canadian Journal of Microbiology, 61: 93-103.

Wang, X., Mavrodi, D.V., Ke, L., Mavrodi, O.V., Yang, M., Thomashow, L.S., Zheng, N., Weller, D.M. & Zhang, J. 2015. Biocontrol and plant growth-promoting activity of rhizobacteria from Chinese fields with contaminated soils. Microbial Biotechnology, 8: 404-418.

Weller, D.M. & Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonades. Phytopathology, 73: 463-469.

Wiese, M.V. 1987. Compendium of wheat. Second Edition. APS Press, St. Paul, MN, 112 pp.

Yi, H.S., Ahn ,Y.R., Song, G.C., Ghim, S.Y., Lee, S., Lee, G. & Ryu, C.M. 2016. Impact of a bacterial volatile 2, 3-butanediol on *Bacillus subtilis* rhizosphere robustness. Frontiers in Microbiology, 7: 1-11.

Zeriouh, H., De Vicente, A., Pérez-García, A. & Romero, D. 2014. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. Environmental Microbiology, 16: 2196-2211.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Biological control of wheat take-all disease using some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains

Maryam Khezri
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
Corresponding author: Maryam Khezri, email: m.khezri@urmia.ac.ir

Received: Nov., 07, 2016 5 (1) 15-30 Accepted: Dec., 02, 2017

Abstract

Wheat take-all is one of the most important soil-borne fungal diseases that causes significant annual damage to this strategic crop in the world including Iran. In this study, potential of 27 antagonistic bacterial strains of *Bacillus subtilis* was evaluated in the biocontrol of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the causal agent of wheat take-all in the laboratory and greenhouse conditions. In dual culture experiment, all studied strains had inhibition zone against growth of the pathogenic fungus and they prevented fungal growth between 39.48-96.29%. In antifungal volatile metabolites production, some strains reduced fungal growth up to 87.62%, while this for some others was less than 20%. In extracellular liquids secretion at three concentrations of 5, 15 and 25%, the most effective concentration was 25%. Results of biosurfactant production and biofilm formation showed that all the studied strains produced biosurfactant and biofilm with high variation. Correlation between production of biosurfactant and biofilm in *in vitro* was 0.83. Eleven strains with different potential in antagonistic effects and biofilm formation were selected for the possibility of disease biocontrol in the greenhouse conditions. All strains decreased the disease between 20-100%. About 72% of the trains reduced disease more than 50% comparing to the control. Correlation of 0.71 and 0.85 was obtained between biofilm formations and biosurfactant production in the laboratory and the greenhouse in the biological control of the disease.

Keywords: antagonistic ability, biofilm, biosurfactant, *Bacillus*, *Gaeumannomyces graminis*

Archive of SID

www.SID.ir