مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، شماره اول، ۱۳۸۸
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

ارزیابی امکان کنترل بیولوژیکی قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (عامل بیماری مرگ هلندی نارون) توسط *Bacillus subtilis* در شرایط آزمایشگاهی

***میرمعصوم عراقی[۱]، کامران رهنما[۲] و میثم تقی‌نسب[۳]**

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]مربی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۲

چکیده

باکتری‌ها در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زا جایگاه ویژه‌ای را به‌خود اختصاص داده‌اند. در این میان استفاده از گونه‌های مختلف باسیلوس به‌دلیل ویژگی حضور گسترده در محیط، تحمل دمای بالا و فرم مقاوم به‌صورت اسپور داخلی به‌عنوان عوامل مهم و مناسبی در کنترل بیولوژیکی مطرح هستند. از سویی یافته‌های اخیر مبنی بر وجود این باکتری‌ها به‌صورت اندوفیت در داخل آوندهای گیاهانی نظیر افرا، افق جدیدی را در راستای استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل بیماری‌های آوندی گشوده است. در این پژوهش اثر آنتاگونیستی ۳ جدایه باکتری ***Bacillus subtilis*** جدا شده از خاک بر روی ۵ جدایه قارچ ***Ophiostoma novo-ulmi*** (عامل بیماری مرگ هلندی نارون) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور مکانیسم‌های آنتاگونیستی آنتی‌بیوز شامل تأثیر متابولیت‌های ترشحی خارج سلولی فرار (Volatile metabolites) و غیرفرار (Culture filtrate) جدایه‌های مزبور روی جدایه‌های قارچ ***Ophiostoma novo-ulmi*** مورد آزمایش قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپی نشان داد که تمامی جدایه‌های فوق از طریق مکانیسم آنتی‌بیوزیس و تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار سبب توقف رشد و بدشکلی میسلیوم قارچ عامل بیماری می‌شوند. همه جدایه‌ها در محیط PDA قادر به تولید ترکیبات فرار ضدقارچی و مواد بازدارنده رشدی بود و باعث بازدارندگی معنی‌داری در رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپورهای قارچ عامل بیماری شدند و با توجه به نتایج به‌دست آمده جدایه B7 نسبت به دو جدایه دیگر خاصیت آنتاگونیستی بیشتری از خود نشان داد. امکان به‌کارگیری این جدایه‌ها برای کنترل بیولوژیکی قارچ عامل بیماری مرگ نارون وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیماری مرگ نارون، باسیلوس سابتیلیس، کنترل بیولوژیکی

مقدمه

درخت نارون با دارا بودن قامتی بلند دارای زیبایی قابل ملاحظه‌ای بوده و به‌دلیل خصوصیات مفید از دیرباز در زمینه‌های مختلف صنعتی و زینتی مورد استفاده قرار گرفته است (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۲). بیماری مرگ هلندی نارون[۲] یکی از مهم‌ترین، زیان‌بارترین و مخرب‌ترین بیماری‌های آوندی این درختان در نیم‌کره

*- مسئول مکاتبه: iraqi602@yahoo.com

1- Duth Elm Disease

Archive of SID
www.SID.ir

شمالی محسوب می‌شود. این بیماری تاکنون با از بین بردن میلیون‌ها درخت نارون در اروپا و آمریکای شمالی سبب وارد آمدن بیلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی شده است (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱). امکان انتشار عامل بیماری به‌وسیله سوسک‌های پوست‌خوار خانواده *Scolytidae* این بیماری را از بسیاری از بیماری‌های مشابه متمایز می‌کند (سولا و گیل، ۲۰۰۳). در یک قرن گذشته، انتشار سریع عامل بیماری به مناطق دوردست از یک سو و حساسیت ارقام مختلف نارون از سوی دیگر، به‌ترتیب در یک قرن گذشته باعث بروز دو اپیدمی با درجات شدت مختلف شده است (بریزیر، ۱۹۹۱). اپیدمی اول مربوط به نژاد غیرمهاجم (گونه *Ophiostoma ulmi*) با شدت بیماری‌زایی کمتر و اپیدمی بعدی مربوط به نژادهای مهاجم (گونه *O. novo-ulmi*) با شدت بیماری‌زایی بیشتر می‌باشد (برنیر و همکاران، ۱۹۹۶). عامل اپیدمی اخیر دارای منشأ دوگانه‌ای بوده و گفته می‌شود اولین بار از نواحی مولداوی- اکراین در اروپا و دریاچه‌های وسیع در آمریکای شمالی، شروع و به سایر نقاط گسترش پیدا کرده است (بریزیر، ۱۹۹۱). بریزیر جدایه‌های با منشأ اروپایی را به‌نام نژاد اروپا-آسیایی (اوراسیایی) و جدایه‌های با منشأ آمریکای شمالی را به‌نام نژادهای آمریکای شمالی نامید. امروزه این دو نژاد با وجود تفاوت‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی در حد دو زیرگونه به‌نام‌های *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* Brasier & Kirk (نژاد اوراسیایی) و *O. novo-ulmi* ssp. *americana* Brasier & Kirk از هم تفکیک می‌شوند (بریزیر و کیرک، ۲۰۰۱). گونه جدید عامل بیماری نه تنها باعث زوال شدید درختان نارون شده است بلکه به درخت آزاد با نام علمی *Zelkova carpinifolia* نیز حمله می‌کند (رهنما و طاهری، ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت بسیار زیاد بیماری تاکنون روش‌های متعددی برای کنترل بیماری به‌کار گرفته شده است که از آن جمله می‌توان به تیمار خاک با سموم تدخینی برای جلوگیری از انتقال عامل بیماری از طریق پیوند ریشه‌ای (نیلی و هیملیک، ۱۹۶۵)، استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک بر علیه عامل بیماری در گیاه (لانیر، ۱۹۸۷)، ریشه‌کنی درختان آلوده یا هرس اندام‌ها و شاخ و برگ آلوده درختان (برنیر و همکاران، ۱۹۹۶)، استفاده از ارقام مقاوم (عراقی و رهنما، ۲۰۰۷)، ایجاد مقاومت القائی (الگرسما و همکاران، ۱۹۹۳) و روش‌های بیولوژیکی (وتن، ۲۰۰۳) اشاره کرد. از یک طرف، افزایش بی‌رویه مصرف آفت‌کش‌ها و مشکلات زیست محیطی تیمارهای شیمیایی بر علیه قارچ و حشرات ناقل و از سوی دیگر هزینه‌های بسیار بالای تهیه ارقام مقاوم درختان نارون در مقایسه با نهال‌های مشابه و یا محصولات زراعی، زمان‌بر بودن روش‌های اصلاح مقاومت و از همه مهم‌تر خطر شکستن مقاومت در برابر نژادهای مختلف عامل بیماری، سبب گردیده تا محققان اهمیت کنترل بیولوژیکی را بیشتر مورد توجه قرار دهند (بورگ، ۱۹۸۸؛ رهنما، ۱۹۹۶؛ رچیگل و رچیگل، ۱۹۹۷).

گونه‌های بسیار زیادی از باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌ها خاصیت آنتاگونیستی نسبت به عامل بیماری مرگ نارون تحت شرایط *in vitro* یا *in vivo* نشان داده‌اند که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: استرین‌هایی از *Streptomyces albovinaceus* و *S. griseus* (ابرین و همکاران، ۱۹۸۴)، استرین‌هایی از *Pseudomonas syringae* (مایرز و استروبل، ۱۹۸۳)، *P. fluorescens* (موردچ و همکاران، ۱۹۸۴)، *P. maltophilia* (شای و بریزیر، ۱۹۸۶)، *B. subtilis* (شریبر و همکاران، ۱۹۸۸)، *Verticillium dahliae* (وتن، ۲۰۰۳؛ سولا و گیل، ۲۰۰۳)، *Phaeotheca dimorphospora* (برنیر و مکاران، ۱۹۹۶)، *Trichoderma viridae* (ریکارد، ۱۹۸۱؛ ریکارد، ۱۹۸۳). استفاده از باکتری‌ها در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد بیش از یک قرن است که مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات آزمایشگاهی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست علیه بیماری مرگ نارون ابتدا در سال ۱۹۳۷ توسط هندریکس و لدوکس انجام گرفت (شفر و

Archive of SID

www.SID.ir

استروبل، ۱۹۸۸). با این حال اثر بازدارندگی این باکتری‌ها در داخل درختان زنده توسط مایرز و استروبل (۱۹۸۳) تشریح شد. باسیلوس‌ها به‌دلیل ویژگی حضور گسترده در خاک و تحمل دمای بالا و فرم مقاوم به‌صورت اسپور داخلی به‌عنوان عوامل مطمئنی در کنترل بیولوژیکی مطرح هستند. علاوه‌بر این یافته‌های اخیر مبنی بر وجود این باکتری‌ها به‌صورت اندوفیت در داخل آوندهای گیاهانی نظیر افرا، افق جدیدی را در راستای استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل بیماری‌های آوندی گشوده است (توآر، ۲۰۰۳) به‌طوری‌که از این باکتری در کنترل بیماری‌های آوندی مهم نظیر ورتیسیلیوز استفاده شده و نتایج مطلوبی به‌دست آمده است (شاه‌حسینی و همکاران، ۱۹۹۸؛ آزاد و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین در نادر تحقیقات انجام گرفته در امر کنترل بیولوژیک بیماری مرگ نارون در کشور استفاده از گونه‌های مختلفی از جنس *Pseudomonas* را در مدیریت تلفیقی بیماری پیشنهاد کرده‌اند (آزاد و همکاران، ۲۰۰۱؛ شریبر و همکاران، ۱۹۸۸). با توجه به اهمیت بیماری مرگ نارون در چند سال اخیر در کشور و تحقیقات بسیار کم بر روی این بیماری و به‌ویژه در امر کنترل آن، در این آزمایش سعی شده است تا به بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus subtilis* علیه عامل بیماری مرگ نارون *Ophiostoma novo-ulmi* در شرایط آزمایشگاهی و گزینش جدایه مناسب از این گونه باکتری (برای انجام کارهای گلخانه‌ای) پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

قارچ بیمارگر و آنتاگونیست: برای انجام این طرح از ۵ جدایه *Ophiostoma novo-ulmi* ssp. *Novo-ulmi* که قبلاً از روی اوجا جداسازی شده بودند و بیشترین سرعت رشد شعاعی را در بین جدایه‌ها داشتند (۴- ۳/۶ میلی‌متر در روز، در محیط کشت MEA ۲ درصد) و ۳ جدایه مربوط به گونه *Bacillus subtilis* جداسازی شده از خاک که با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و منابع معتبرشناسایی شدند، استفاده شد. برای این منظور نمونه‌هایی به‌طور تصادفی از خاک جنگلی تهیه و یک گرم از هر نمونه به‌طور جداگانه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و غلظت‌های مختلف به‌صورت سریال تهیه شد. از آنجایی‌که گونه‌های باسیلوس تولید اندوسپور مقاوم می‌کنند رقت‌های تهیه شده ۱۰ دقیقه در داخل بن ماری (حمام بخار) در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس از هر رقت مقدار یک میلی‌لیتر به محیط غذایی آگاردار منتقل و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از ظهور پرگنه‌های باکتریایی اقدام به خالص‌سازی و در نهایت انجام آزمایش‌های مختلف تشخیصی گردید.

آزمون‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌های باسیلوس: جدایه‌های باکتریایی براساس روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) از نظر قطر سلول باکتری، تولید اسپور و واکنش‌های کاتالاز، تولید اندول، احیای نیترات، لسیتیناز، استفاده از سیترات، رشد در نمک طعام ۷ درصد، رشد در دمای ۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۵/۷ مورد بررسی قرار گرفتند. برای تفکیک گونه‌ها از یکدیگر از ویژگی‌هایی نظیر موقعیت اندوسپور، تولید اسید از آرابینوز، دی‌زایلوز، دی‌مانیتول، هیدرولیز کازئین، ژلاتین و نشاسته استفاده شد. (جدول ۱).

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها بر علیه عامل بیماری: در این آزمون باکتری‌ها به‌صورت خطی یا نقطه‌ای روی محیط کشت مالت آگار به فاصله ۱- ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ عامل بیماری در وسط تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌ها به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی به‌عنوان واکنش مثبت بازدارندگی محسوب شد (کیل و دفاگو، ۱۹۹۷). این آزمایش از نوع فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های عامل بیماری نیز با اندازه‌گیری فاصله بازدارندگی (هاله

Archive of SID

www.SID.ir

بازدارندگی) و نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (عراقی و همکاران، ۲۰۰۷).

$$X = \frac{A-B}{A} \times 100 \qquad (۱)$$

در این رابطه X= درصد بازدارندگی، A= قطر رشد پرگنه + فاصله بازدارندگی (یا قطر پرگنه در پتری شاهد) و B= قطر رشد پرگنه در هر یک از تیمارها می‌باشد. (شکل ۱ و ۲)، (جدول ۲).

بررسی اثر مواد بازدارنده رشدی بر رشد میسلیوم: برای اثبات تولید مواد بازدارنده رشدی مطابق روش کرائوس و لوپر (۱۹۹۵) عمل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی و آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد به محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار[1] اضافه و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط پخش شد. سپس برای مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از سه روز، با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شدند و تشتک‌های مزبور به‌همراه تشتک‌های شاهد به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. آنگاه یک قرص به قطر ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت چهار روزه قارچ افیوستوما با رعایت شرایط سترون در وسط تشتک مذکور کشت داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های عامل بیماری با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید (جدول ۲).

بررسی اثر مواد بازدارنده رشدی جدایه‌ها بر روی جوانه‌زنی اسپورها: برای انجام این آزمایش نیز مطابق روش کرائوس و لوپر (۱۹۹۵) عمل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی و آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد به محیط PDA اضافه و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط پخش شد. سپس برای مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از سه روز، با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شدند و تشتک‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از رقت مناسبی از سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ (۳۰۰-۲۰۰ اسپور در هر میلی‌لیتر) بیمارگر که قبلاً تهیه شده بود بر روی هر کدام از تشتک‌های حاوی عصاره باکتریایی و نیز آب مقطر سترون اضافه و توسط یک میله شیشه‌ای در سطح محیط پخش گردید. پس از گذشت ۵ روز که اسپورها به‌طور کامل جوانه زدند اقدام به شمارش اسپورهای جوانه‌زده در تیمارهای دارای عصاره باکتری و مقایسه با تیمارهای شاهد گردید. درصد بازداری از جوانه‌زنی از اسپور جدایه‌های باکتری با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد (جدول ۲).

بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضدقارچی: این آزمون مطابق روش فدامین و روزال (۱۹۹۴) انجام گرفت. ابتدا جدایه‌های باکتری جداگانه در محیط کشت PDA و حلقه‌ای از جدایه‌های قارچ *O. novo-ulmi* نیز جداگانه در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت گردیدند. سپس تشتک‌های حاوی قارچ (بالا) و باکتری (پایین) روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملا مسدود و به‌مدت ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد بازدارندگی جدایه‌های باکتری با استفاده از رابطهٔ (۱) محاسبه گردید (جدول ۲).

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمون‌های مربوطه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر کدام از تیمارها انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۱) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون LSD استفاده شد.

نتایج و بحث

در مرحله جداسازی باکتری ۱۱ جدایه به‌دست آمد که از میان این ۱۱ جدایه باسیلوس جداسازی شده پس از انجام آزمون‌های گرم، ۳ جدایه گرم مثبت مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد

1- Potato Dextrose Agar (PDA)

Archive of SID

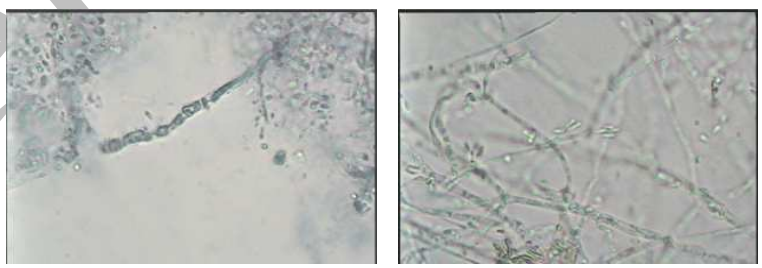
www.SID.ir

استفاده برای تشخیص گونه‌های باسیلوس در جدول ۱ ذکر شده است. تمام جدایه‌ها میله‌ای شکل، دارای اندوسپور مرکزی، کاتالاز مثبت، قابلیت تولید اسیداز آرابینوز، مانیتول، هیدرولیز کازئین و ژلاتین بودند. با توجه به نتایج آزمون بیوشیمیایی خصوصیات همه جدایه‌ها با گونه *B. subtilis* مطابقت داشت (جدول ۱).

نتایج بررسی‌های میکروسکوپی اثرات جدایه‌های باکتری باسیلوس علیه جدایه‌های قارچ عامل بیماری نشان داد که جدایه‌های مختلف باسیلوس از طریق ترشح مواد بازدارنده رشدی، با ایجاد تغییر شکل (دفورمه کردن)، تورم و خمیدگی انتهای هیف و واکئوله کردن باعث کنترل قارچ بیمارگر می‌شوند (شکل ۱).

جدول ۱- خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌های گونه *Bacillus subtilis*

مشخصات	B1	B7	B9	جدایه استاندارد
قطر سلول <۱ میکرون	-	-	-	-
تحرک	+	+	+	+
موقعیت مرکزی اسپور	+	+	+	+
تولید اسیداز دی- ماتیتول	+	+	+	+
تولید اسیداز زایلوز	+	+	+	+
تولید اسیداز آرابینوز	+	+	+	+
هیدرولیز کازئین	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+
تولید ایندول	-	-	-	-
لسیتیناز	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+
احیاء نیترات	+	+	+	+
رشد در ۵ درجه سانتی‌گراد	-	-	-	-
رشد در۴۵ درجه سانتی‌گراد	+	+	+	+
رشد در pH ۵/۷	+	+	+	+
رشد در نمک طعام ۷ درصد	+	+	+	+
استفاده از سیترات	-	-	-	-
رشد غیرهوازی در محیط مایع گلوکز	+	+	+	+



شکل۱- تأثیر متابولیت‌های مایع جدایه B7باکتری *B. subtilis* بر مورفولوژی میسلیوم و اسپورهای قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (چپ) در مقایسه با تیمار شاهد (راست).

هر ۳ جدایه با ترشح ترکیبات فرار و غیرفرار از رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپورهای عامل بیماری جلوگیری کردند (جدول ۲). تجزیه و تحلیل نتایج آماری نیز نشان داد که هر ۳ جدایه باکتری از نظر توان آنتاگونیستی دارای

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت معنی‌دار آماری هستند. در بین جدایه‌ها نیز B_7 موثرتر از بقیه جدایه‌ها عمل کرد. باکتری باسیلوس یکی از عوامل بیوکنترل قارچ *Ophiostoma novo_ulmi* می‌باشد که مکانیسم کنترلی آن به‌صورت اثر ترشحات مایع خارج سلولی[1] و ترکیبات فرار[2] ظاهر می‌شود. این مکانیسم‌ها در کار خیلی از محققان دیگر از جمله شریبر و همکاران (۱۹۸۸) مورد بررسی و تائید قرار گرفته است. نکته قابل توجهی که خیلی از محققان به آن اشاره کرده‌اند اختلافی است که بین گونه‌ها و به‌خصوص جدایه‌های مختلف یک گونه از نظرمکانیسم‌های کنترلی ذکر شده و شدت و ضعف این مکانیسم‌ها وجود دارد که نتایج این تحقیق نیز تا حدودی این مطلب را تایید می‌کند (وجود اختلاف معنی‌دار در هر گروه آزمایشی، جدول ۲). رشد سریع در محیط مایع، توان سازگاری بالا، تولید آنتی‌بیوتیک‌های فراوان، طیف وسیع میزبانی و از همه مهم‌تر توان اسپورزایی بالادر مقایسه با سایر باکتری‌های آنتاگونیست، از ویژگی‌هایی است که این باکتری را به‌عنوان یک عامل بیوکنترلی مناسب، مطرح کرده است (سینگ و دورال، ۱۹۸۴؛ شریبر و همکاران، ۱۹۸۸؛ کاجیمورا و همکاران، ۱۹۹۵). در بررسی تأثیر متابولیت‌های فرار ضدقارچی جدایه‌های *B. subtilis* بر علیه عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی همه جدایه‌ها بر روی محیط سیب‌زمینی آگار قادر به تولید ترکیبات فرار ضدقارچی بودند (فیدمن و راسل، ۱۹۹۴). از طرفی نتایج آزمایش‌های تأثیر متابولیت‌های خارج سلولی غیرفرار در ممانعت از رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپورهای عامل بیماری نشان داد که جدایه‌های باکتری *Bacillus subtilis* به‌طور معنی‌داری باعث کاهش رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپورهای عامل بیماری می‌شوند. این نتایج در کار برخی از محققان نظیر شاه‌حسینی و همکاران (۱۹۹۸) نیز به اثبات رسیده است. البته باید به این نکته توجه کرد که به‌دلیل این که در شرایط طبیعی مجموعه پیچیده‌ای ازعوامل مختلف بر روی روابط پاتوژن، آنتاگونیست و میزبان اثر می‌گذارند، ارتباط دادن توانایی‌های آزمایشگاهی جدایه‌ها با توان کنترل‌کنندگی آنها در شرایط طبیعی بسیار سخت و مشکل است. با توجه به این که آنتی‌بیوزیک واکنش آنزیمی است و واکنش‌های آنزیمی و تولید مواد بیوشیمیایی فرار و غیرفرار در شرایط آزمایشگاهی به عوامل بسیار متعددی نظیر: pH، دما، رطوبت، میزان قند و اسیدآمینه محیط و حتی عمر محیط آگاردار بستگی دارد چنین امری بدیهی به نظر می‌رسد (فیدمن و راسل، ۱۹۹۴). بنابراین لزوم انجام تحقیقات گلخانه‌ای بیش از پیش احساس می‌شود. همچنین با توجه به اهمیت و جایگاه کنترل بیولوژیک در مبارزه با این بیماری و عدم وجود موفقیت‌های نه چندان زیاد در گذشته در امر بیوکنترل این بیماری در مقایسه با بسیاری دیگر از بیماری‌های آوندی، انجام آزمایش‌های تأثیر مخلوط چند آنتاگونیست تحت شرایط آزمایشگاهی و طبیعی و در نهایت استفاده از مدیریت تلفیقی بیولوژیک در مبارزه با این بیماری پیشنهاد می‌گردد.

1- Culture Filtrate
2- Volatile Antibiotics

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۲- تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر علیه عامل بیماری مرگ نارون در کشت چهار نقطه‌ای (خطی) همراه با تغییر رنگ میسلیوم عامل بیماری در مقایسه با تیمار شاهد (راست): به‌ترتیب از سمت چپ تأثیر جدایه B1 و B7 بر روی جدایه Onu5 عامل بیماری پس از گذشت ۱۰ روز از کشت متقابل در محیط کشت مالت آگار.

جدول ۲- بررسی اثرات مختلف آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری *Bacillus subtilis* بر علیه عامل بیماری مرگ نارون (*Ophiostoma novo-ulmi*).

تیمار		درصد بازدارندگی*			
جدایه باکتری	جدایه بیمارگر	مواد غیرفرار در کشت چهار نقطه‌ای	سوسپانسیون باکتریایی بر میسلیوم	سوسپانسیون باکتریایی در جوانه‌زنی اسپور	مواد فرار
B1	Onu1	۶۱/۲^{ab}**	۹۶/۴^{c}	۹۰/۳^{bc}	۸۵/۷^{c}
B1	Onu2	۶۲/۲^{b}	۹۶/۵^{c}	۹۱/۲^{d}	۸۶/۷^{d}
B1	Onu3	۶۱/۷^{ab}	۹۸/۱^{e}	۹۲/۳^{f}	۸۷/۳^{e}
B1	Onu4	۶۴/۲^{c}	۹۴/۹^{a}	۹۵/۶^{i}	۸۵/۳^{b}
B1	Onu5	۶۴/۲^{c}	۹۵/۱^{a}	۹۱/۸^{e}	۸۷/۷^{f}
B7	Onu1	۶۵/۱^{c}	۱۰۰^{f}	۹۴/۱^{h}	۸۹/۲^{g}
B7	Onu2	۶۷/۲^{d}	۱۰۰^{f}	۹۶/۳^{j}	۸۶/۴^{d}
B7	Onu3	۶۶/۴^{d}	۹۸/۱^{e}	۹۸/۱^{l}	۸۵/۷^{c}
B7	Onu4	۶۹/۱^{e}	۱۰۰^{f}	۹۷/۵^{k}	۸۷/۸^{f}
B7	Onu5	۷۰/۸^{f}	۹۸/۱^{e}	۹۶/۱^{j}	۸۵/۱^{b}
B9	Onu1	۶۱/۹^{ab}	۹۶/۰^{b}	۹۳/۲^{g}	۸۹/۱^{g}
B9	Onu2	۶۱/۲^{ab}	۹۷/۱^{d}	۹۰/۵^{c}	۸۴/۱^{a}
B9	Onu3	۶۰/۹^{a}	۹۷/۱^{d}	۹۰/۱^{b}	۸۴/۲^{a}
B9	Onu4	۶۴/۹^{c}	۹۶/۱^{b}	۸۹/۲^{a}	۸۵/۲^{b}
B9	Onu5	۶۲/۴^{b}	۹۸/۲^{e}	۹۲/۳^{f}	۸۷/۲^{e}
***LSD=(P=٪۵)		۱/۰۴۴۴	۰/۲۶۵۴	۰/۲۱۳۸	۰/۳۰۰۸

*درصد بازدارندگی برای تیمار شاهد برای تمام آزمایش‌ها صفر درصد می‌باشد. **اعداد مربوطه میانگین چهار تکرار می‌باشند. ***حروف غیرمشابه در هر آزمایش نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

منابع

1.Azad, F., Sharifi Tehrani, A., Hajarood, G., Mohammadi, M., and Roohani, H. 2000. Evaluation of antagonistic effects *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates on *Verticillium dahliae*, casual agent of cotton wilt. 57 P. (In Persian). 14th Congress of Plant Protection in Iran.

2.Bernier, L., Yang, D., Ouellette, G.B., and Dessureault, M. 1996. Assessment of *Phaeotheca dimorphospora* for biological control of Dutch elm disease pathogens , *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi*. Plant Pathology, 45: 609-617, 39: 5-16.

www.SID.ir

3.Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., Causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia, 115: 151-161.
4.Brasier, C.M., and Kirk, S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. Mycol. Res. 105: 5. 547-554.
5.Burge, M.N. 1988. Fungi in biological control systems. Manchester University Press. 286p.
6.Elgersma, D.M., Roosier, T., and Scheffer, R.J. 1993. Bioilogical control of Dutch elm disease by exploiting resistance in host. In; M. B. Sticklen and J. L. Sherald.(eds.), Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches. New York: Springer-Verlag. Pp: 188-192.
7.Fiddaman, P.J., and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Appl. Bacteriol, J. 76: 395-405.
8.Iraqi, M.M., and Rahnama, K. 2007. Investigating the disease severity of *Ophiostom ulmi* and *O. novo-ulmi* isolates of the causal disease of Dutch elm disease on *Ulmus parvifolia* Jacq. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan Univ. 14: 3. 164-173. (In Persian)
9.Iraqi, M.M., Rahnama, K., Zafari, D., and Taghinasab, M. 2007b. Investigating biological control of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of Dutch Elm Disease by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro. Journal of Agri. Sci. & Natur. Resour. 14: 5. 178-191. (In Persian)
10.Kajimora, Y., Srgiyama, M., and Kaneda, M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. J. Antibiotics 48: 10. 10951103.
11.Keel, C., and Defago, G. 1997. Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanism and ecological impact, P 27-46, In: A. C. Gange and V. Brown (eds.). Multitrophic interaction in terrestrial systems. Black well scientific publishers. London, UK.
12.Kraus, J., and Loper, J.E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotics pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* pf-5. Appl. Environ. Microbiol, 61: 849-854.
13.Lanier, G.N. 1987. Fungicides for Dutch elm disease; comparative evaluation of commercial products. Journal of Arboriculture, 13: 189-195.
14.Murdoch, C.W., Campana, R.J., and Hoch, J. 1984. On the biological control of *Ceratocystis ulmi* with *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology. 74: 805-811.
15.Myers, D.F., and Strobel, G.A. 1983. *Pseudomonas syringae* as a microbial antagonist of *Ceratocystis ulmi* in the apoplast of American elm. Transactions of the British Mycological Society, 80: 389-394.
16.Neely, D., and Himelick, E.B. 1965. Effectiveness of vapan in preventing root graft transmission of the Dutch elm disease fungus. Plant Disease Reporter, 49: 106-108.
17.Ó Brien, J.G., Blanchette, R.A., and Stherland, J.B. 1984. Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of Dutch elm disease. Plant Disease, 65: 104-106.
18.Rahnama, K. 1996. Biotechnology and its importance on biological control of Pests and diseases of plants in modern agriculture. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan Univ. 3: 3. 20-28. (In Persian)
19.Rahnama, K., and Taheri, A.H. 2004. Distribution of Dutch elm disease pathogens, aggressive and non-aggressive isolates in Iran. Canadian Journal of Plant Pathology, 26: 121-126.
20.Rechigl, N.A., and Rechigl, J.E. 1997. Environmentally safe approaches to crop disease control. Lewis Publishers. 495p.
21.Ricard, J.L. 1981. Commercialization of a *Trichoderma* based mycofungicide some problems and solutions. *Biocontrol News* and *Information*, 2: 95-98.
22.Ricard, J.L. 1983. Field observations on the biocontrol of Dutch elm disease with *Trichoderma viride* pellets. *European Journal* of *Forest Pathology*, 13: 60-62.
23.Santini, A., Fagnani, A., Ferrini, F., and Mittempergher, L. 2002. "San Zanobi" and "Plinio" Elm Trees. *Hortscience*. 37: 7. 1139-1141.
24.SAS Institute. 2001. SAS system. Inc, Cary, NC, USA.
25.Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chum, W. 2001. Laboratory guide for Identification of plant pathogenic bacteria. APS. 379p.
26.Scheffer, R.J., and Strobel, G.A. 1988. Dutch Elm Disease, a model tree disease for biological control, In; K. G. Mukeri, and K. l. Garg (eds.). Biocontrol of Plant Disease. CRC. Press. Inc., B. ca. Raton, FL., Pp: 103-119.

Archive of SID

www.SID.ir

27.Schreiber, L., Gregory, G.F., Krause, C.R., and Ichida, J.M. 1988. Production partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*. *Canadian Journal* of *Botany*, 66: 2338-2346.
28.Shah Hoseini, A., Sanei, S.J., and Razavi, S.I. 1998. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* on *Verticillium dahliae* and *Macrophomina phaseolina* in vitro. The Second Symposium of *Verticillium* in Iran. 11p.
29.Shi, J.L., and Brasier, C.M. 1986. Experiments on the control of Dutch elm disease by injection of *Pseudomonas* species. Eur. J. of For. Pathol. 16: 280-292.
30.Sing, V., and Deverall, B.J. 1984. *Bacillus subtilis*, as a control agent against of fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc., 83: 3. 487-490.
31.Solla, A., and Gil, L. 2003. Evaluating *Verticillium dahliae* for biological control of *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*. Pl. Path. 52:579-585.
32.Stipes, R.J., and Campana, R.J. 1981. Compendium of elm disease. APS. Press, 96p.
33.Toar, K. 2003. The genus *Bacillus*. Todar`S Online Textbook of Bacteriology. Univ. Wisconsin-Madison. 285p.
34.Voetten, J. 2003. Dutch Trig®: A decade of successful biological control Dutch elm disease in Europe and the USA, In Proceeding: second International Elm Conference Valsain, Segovia, Spain. 35p.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 16(1), 2009
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

The Evaluation of biological control potential of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of "Dutch Elm Disease" by *Bacillus subtilis in vitro*

[*]M.M. Iraqi[1], K. Rahnama[2] and M. Taghinasab[3]
[1]M.Sc. Student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resourses,
[2]Associate Prof., Dept. of Plant Protection Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resourses,
[3]Instructor Dept. of Plant Protection Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resourses, Iran

Abstract

Bacteria play important role for biological control of plant disease. *Bacillus* spp. as; extensive existence in environment, tolerance of high temperature and formation of resistant spores, are important and safe for biological control. Recent findings about the existence of this bacterium as endophyte trough plant vessel such as maple have opened a new horizon in order using of this bacteria for biological control of vascular diseases. Antagonistic effect of three isolates of *Bacillus subtilis* on *Ophiostoma novo-ulmi*, the causal agent of Dutch elm disease, was studied *in vitro.* Antibiosis of antagonistic mechanism as: volatile metabolites and culture filtrate was evaluated. Microscopic studies indicated that all of Bacillus isolates by production of antifungal metabolites caused growth inhibition and deformation of mycelium of causal agent. All isolates could produce antifungal volatile metabolites and growth inhibitors in PDA which decreased mycelial growth and spores germination of the fungus significantly. In most experiments, isolate B7 was better than other isolates in antagonistic activity. Potential of using *Bacillus subtilis* isolates for biological control against causal agent of Dutch elm disease is discussed.

Keywords: Antagonist; Dutch elm disease; *Bacillus subtilis*; Biological control

Archive of SID

[*]- Corresponding Author; Email: iraqi602@yahoo.com

www.SID.ir