Archive of SID

در
منابع طبیعی شماره ۸۱ زمستان ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه های *Bacillus subtilis* علیه عامل بیماری مرگ نارون *Ophiostoma novo-ulmi* در شرایط آزمایشگاهی

• **میرمعصوم عراقی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
• **کامران رهنماو** • **میثم تقی نسب**
اعضای هیأت علمی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ‌دریافت: بهمن ۱۳۸۵ تاریخ‌پذیرش: اسفند ۱۳۸۶
Email: Iraqi602@yahoo.com

چکیده

رای انجام این طرح از ۵ جدایه *Ophiostoma novo-ulmi* و تعدادی جدایه مربوط به گونه *Bacillus subtilis* که با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی و منابع معتبرشناسایی شدند (۷) استفاده شد. به منظور بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه ها بر علیه عامل بیماری باکتری‌ها به صورت 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. پتری‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی به عنوان واکنش مثبت بازدارندگی محسوب شد (جدول ۱). به منظور بررسی اثر مواد بازدارنده رشدی بر رشد میسلیوم و جوانه زنی اسپورهای عامل بیماری مطابق روش Loper و Kvaus (۳) عمل شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی و آب مقطر سترون به عنوان 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 پتری‌های مزبور به همراه پتری های شاهد به مدت ۳۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. آنگاه یک قرص به قطر ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه قارچ *O. novo-ulmi* و یا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ به داخل پتری ها انتقال داده شد. پس از ۵ روز درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم و یا جوانه‌زنی اسپور در ظروف تیمار در مقایسه با ظروف شاهد محاسبه گردید. بررسی تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی مطابق روش Rossall و Fiddaman (۲) انجام گرفت. ابتدا جدایه های باکتری جداگانه در محیط کشت PDA و حلقه ای از جدایه های قارچ *O. novo-ulmi* نیز جداگانه در مرکز پتری PDA کشت گردیدند. درصد بازدارندگی جدایه های باکتری پس از ۴ روز محاسبه گردید. نتایج بررسی های میکروسکوپی اثرات جدایه های باکتری باسیلوس علیه جدایه های قارچ عامل بیماری نشان داد که جدایه های مختلف باسیلوس از طریق ترشح مواد بازدارنده رشدی، با ایجاد تغییر شکل (دفورمه کردن)، تورم و خمیدگی انتهای هیف و واکوله کردن باعث کنترل قارچ بیمارگر می شوند (شکل ۱). هر ۳ جدایه با ترشح ترکیبات فرار و غیرفرار از رشد میسلیوم و جوانه زنی اسپورهای عامل بیماری جلوگیری کردند (جدول ۱). رشد سریع در محیط مایع، توان سازگاری بالا، تولید آنتی بیوتیک‌های فراوان، طیف وسیع میزبانی و از همه مهم‌تر توان اسپورزایی بالادر مقایسه با سایرباکتری‌های آنتاگونیست، از وبژگی هایی است که این باکتری را به عنوان یک عامل بیوکنترلی مناسب، مطرح کرده است (۱، ۶).

کلمات کلیدی: *Bacillus Subtilis*، مرگ نارون، شرایط آزمایشگاه

www.SID.ir

Archive of SID

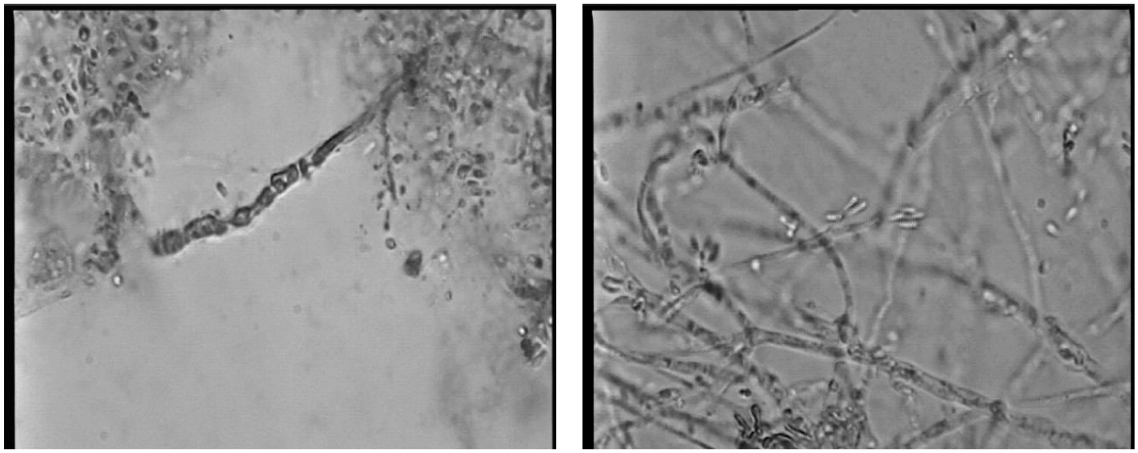
جدول ۱: بررسی اثرات مختلف آنتاگونیستی جدایه های باکتری *Bacillus subtilis* بر علیه عامل بیماری مرگ نارون (*Ophiostoma novo-ulmi*)

تیمار			درصد بازدارندگی*		
جدایه باکتری	جدایه بیمارگر	مواد غیر فرار در کشت چهار نقطه ای	سوسپانسیون باکتریایی بر میسلیوم	سوسپانسیون باکتریایی در جوانه زنی اسپور	مواد فرار
B۱	Onu۱	۶۱/۲ ab	۹۶/۴ c	۹۰/۳ bc	۸۵/۷ c
B۱	Onu۲	۶۲/۲ b	۹۶/۵ c	۹۱/۲ d	۸۶/۷ d
B۱	Onu۳	۶۱/۷ ab	۹۸/۱ e	۹۲/۳ f	۸۷/۳ e
B۱	Onu۴	۶۴/۲ c	۹۴/۹ a	۹۵/۶ i	۸۵/۳ b
B۱	Onu۵	۶۴/۲ c	۹۵/۱ a	۹۱/۸ e	۸۷/۷ f
B۷	Onu۱	۶۵/۱ c	۱۰۰ f	۹۴/۱ h	۸۹/۲ g
B۷	Onu۲	۶۷/۲ d	۱۰۰ f	۹۶/۲ j	۸۶/۴ d
B۷	Onu۳	۶۶/۴ d	۹۸/۱ e	۹۸/۱ l	۸۵/۷ c
B۷	Onu۴	۶۹/۱ e	۱۰۰ f	۹۷/۵ k	۸۷/۸ f
B۷	Onu۵	۷۰/۸ f	۹۸/۱ e	۹۶/۱ j	۸۵/۱ b
B۹	Onu۱	۶۱/۹ ab	۹۶/۰ b	۹۳/۲ g	۸۹/۱ g
B۹	Onu۲	۶۱/۲ ab	۹۷/۱ d	۹۰/۵ c	۸۴/۱ a
B۹	Onu۳	۶۰/۹ a	۹۷/۱ d	۹۰/۱ b	۸۴/۲ a
B۹	Onu۴	۶۴/۹ c	۹۶/۱ b	۸۹/۲ a	۸۵/۲ b
B۹	Onu۵	۶۲/۴ b	۹۸/۲ e	۹۲/۳ f	۸۷/۲ e
***LSD		۰۴۴۴/۱	۲۶۵۴/۰	۲۱۳۸/۰	۳۰۰۸/۰

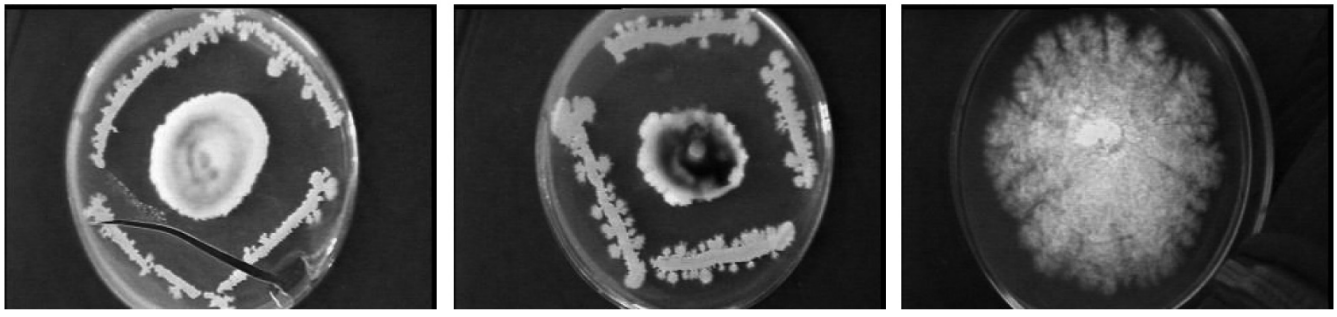
* درصد بازدارندگی برای تیمار شـاهد برای تمام آزمایشـات صفر درصد می باشـد.** اعداد مربوطه میانگین چهار تکرار می باشند.*** حروف غیرمشابه در هر آزمایش نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: تأثیر متابولیت‌های مایع جدایه B۷ باکتری *B. subtilis* بر مورفولوژی
میسلیوم و اسپورهای قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (چپ) در مقایسه با تیمار شاهد



شکل ۲: تأثیر آنتاگونیستی جدایه های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر علیه عامل بیماری مرگ نارون در کشت چهار نقطه ای (خطی) همراه با تغییر رنگ میسلیوم عامل بیماری در مقایسه با تیمار شاهد (راست) : به ترتیب از سمت چپ تأثیر جدایه B۱ و B۷ بر روی جدایه Onu۵عامل بیماری پس از گذشت ۷ روز از کشت متقابل در محیط کشت مالت آگار

منابع مورد استفاده

۱ - شاه حسینی، ع.، س. ج. صانعی و س. ا. رضوی ، ۱۳۷۷. تأثیر آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* بر جداشده های *Verticillium dahliae* و *Macrophomina phaseolina*. دومین سمینار ورتیسلیوم در ایران. صفحه ۱۱.

2- Fiddaman, P. J. and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 76: 395-405.

3- Kraus, J. and Loper, J. E. 1990. 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.

4- 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.

5- 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., 103-119.

6- 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.

www.SID.ir