Archive of SID

بررسی تأثیر باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* در کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند

Investigation of antagonistic effect of *Bacillus subtilis* on biological control of sugar beet damping-off disease

مائده شهیری طبرستانی[۱]، ماهرخ فلاحتی رستگار[۲] ، بهروزجعفرپور[۲] و حمید روحانی[۳]

م. شهیری طبرستانی, م. فلاحتی رستگار, ب. جعفرپور و ح. روحانی . ۱۳۸۳. بررسی تأثیر باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* در کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند. **چغندرقند ۲۰(۲): ۱۷٤-۱٦۱**

چکیده

با توجه به قدرت بالای آنتاگونیستی باکتری *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn، اثر سه جدایه B.s.Ham، 204 و202 در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بر بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *Rhizoctonia solani* مورد مطالعه قرار گرفت. در کشت دو طرفه روی محیط کشت PDA، کلیه جدایه‌ها توانستند از رشد *R.solani* جلوگیری کنند. متابولیت‌های فرار جدایه‌های *B.subtilis* به خوبی رشد میسلیوم *R.solani* را کنترل نمودند. قابلیت بازدارندگی متابولیت‌های فرار جدایه‌های *B.subtilis* تحت تأثیرچند محیط کشت مطالعه شد. در این آزمایش، جدایه B.s.Ham روی محیط کشت PDA با ٦۲/۲۲ درصد بازدارندگی، بهترین اثر را در جلوگیری از رشد میسلیوم *R.solani* نشان داد. اثر بازدارندگی پنج غلظت (۲۵-۱۵-۱۰-۵-۲ درصد) ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های باکتری در جلوگیری از رشد *R.solani* بررسی شد و مشخص گردید که غلظت ۲۵ درصد ترشحات مایع خارج سلولی جدایه B.s.Ham با ۷۳/۷۰ درصد، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم*R.solani* دارد. در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص شد که پوشش دادن بذر چغندرقند با عوامل آنتاگونیست (Seed coating) و یا اضافه نمودن آن‌ها به خاک (Soil drenching) درکاهش مرگ و میر گیاهچه‌ها در فاصله ۳۰ روز پس از کاشت، مؤثر بوده دارد و از این نظر بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در بین جدایه‌ها، B.s.Ham با ٦٤/۵۹ درصد نسبت به شاهد آلوده، بهترین تأثیر را در کنترل این بیماری نشان داد. در مجموع، اضافه نمودن باکتری‌های آنتاگونیست به خاک نسبت به پوشش دادن بذر، درکاهش مرگ و میرگیاهچه مؤثرتر بوده است.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی, مرگ گیاهچه چغندرقند, *Rhizoctonia solani*, *Bacillus subtilis*

---

۱ – کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی از دانشگاه فردوسی مشهد

۲ – عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳ – عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

قارچ *Rhizoctonia solani* از مهمترین عوامل مرگ گیاهچه چغندرقند می‌باشد. این بیمارگر موجب پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند نیز می‌شود. قارچ‌های دیگری نظیر *Pytium ultimum*، *P.aphanidermatum*، *Phoma betae* و *Aphanomyces cochlioides* نیز مسبب مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقند می‌باشند(Whitney and Duffus 1986) که بجز *A.cochlioides* بقیه نیز از مناطق مختلف چغندرکاری ایران گزارش شده‌اند (ارشاد ۱۳۷۴؛ عباسی مقدم و همکاران ۱۳۷۷؛ کاشی و همکاران ۱۳۷۹).

گری و گریک (Gray and Gerik 1998) طی تحقیقی اعلام نمودند استفاده از بذرهای چغندرقند با کیفیت بالا که با قارچکش‌های تیرام و آپرون تیمار شده‌اند، تا حدی می‌تواند بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند را مهار نمایند. هم چنین اظهار داشتند، افزودن مواد آلی به خاک موجب افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های بازدارنده رشد قارچ *R. solani* می‌شوند، لذا افزودن بقایای گیاهانی مانند جو، ذرت و یولاف به همراه کود شیمیایی نیتروژن‌دار (به منظور تسریع در تجزیه بقایای گیاهی) به خاک، کاهش میزان بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند را در پی دارد. ایشان ابراز امیدواری نمودند، با توجه به تحقیقات اخیر در زمینه استفاده از عوامل بیولوژیک جهت کنترل این بیماری، بتوان به طور مؤثرتری این بیماری را مهار نمود. با توجه به آن که قارچ *R. solani* خاکزی است و برای بقای ساپروفیتی و گسترش خود در خاک، توده‌های متراکم و سخت میسلیومی تولید می‌کند، لذا علی‌رغم تأثیر نسبی پاره‌ای از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، به نظر میرسد کاربرد ترکیبات شیمیایی جهت مهار بیماری، ازنظر اقتصادی و زیست محیطی قابل توجیه نمی‌باشد. بدین جهت تصور میشود کنترل بیولوژیکی یکی از روش‌های مناسب مبارزه با این بیماری باشد.

گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* جداشده از خاک یا سطح برگ به دلیل تولید دامنه وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Baker et al.1985). در مورد نوع ترکیبات ضدمیکروبی موجود در ترشحات مایع جدایه‌های *B.subtilis*، تحقیقات زیادی صورت گرفته و مشخص شده است که استرین‌های *B.subtilis* طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله مایکوسوبتیلین(Mycosubtilin)، ائومایسین(Eumycin)، سوبتیلین(Subtilin) ، باسیلومایسین (Bacillomycin) ، باسیلیسین (Bacilicin) ، باسیلوپپتین آ، بی، سی (Bacillopeptin A,B,C) ، توکسی‌مایسین(Toximycin) ، ایتورین آ، دی، ای (Iturin A,B,E) و فنجی‌مایسین(Fengimycin) را تولید می‌نمایند که نقش عمده‌ای در خاصیت آنتاگونیستی این باکتری علیه قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها دارد(Besson and Michel 1986;

www.SID.ir

Archive of SID

Loffler et al.1986; Mckeen et al. 1986 ;Ferreira et al. 1991; Kajimora et al. 1995). باکتری *B.subtilis* از طریق رقابت با باکتری‌ها و قارچ‌های مضر موجب افزایش رشد گیاه می‌شود. وجود ترکیب اسید جیبرلیک در عصاره کشت باکتری، اثر مستقیم *B.subtilis* را بر رشد گیاه نشان داده است. به این ترتیب باکتری با تغییر فعالیت هورمونی و افزایش رشد بخصوص رشد ریشه، موجب افزایش سطح جذب، افزایش رشد گیاه، فرار گیاه از بیماری‌های مختلف و افزایش محصول خواهد شد(Mckeen et al. 1986). استفاده از باکتری‌ها (از جمله باکتری *B.subtilis*) به منظور افزایش رشد گیاه و میزان محصول در سال ۱۹۵۰ در روسیه آغاز گردید و در سال ۱۹۷۰ اعتبار علمی آن به تأیید رسید (رجوع شود به امتی ۱۳۷۷). استرین *B.subtilis A-13* به صورت تجاری با نام Quantum 4000 وارد بازار شده و به صورت آغشته کردن با بذر بادام زمینی، پنبه ولوبیا استفاده شده و باعث افزایش عملکرد گردیده است(Turner et al.1991). دان لیوی (Dunleavy 1955) باکتری *B.subtilis* را علیه *R.solani* (عامل مرگ گیاهچه چغندرقند) به کار برد و نتیجه گرفت که این باکتری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه کنترل خوبی علیه بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند داشته است. مک نایت و رسال(Mcnight and Rossal 1990) در تحقیقی نشان دادند، استرین *B.subtilis MBI 600* یکی از آنتاگونیست‌های مؤثر *R.solani* (عامل مرگ گیاهچه پنبه)، توانست ریشه پنبه را در طول ۱۰-۰ سانتی‌متری آن برای بیش از چهارماه کلنیزه کند. در بررسی کارآیی *B.subtilis* درکنترل پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه نخودفرنگی مشخص شد ترشحات خارج سلولی این باکتری درشرایط آزمایشگاهی علیه *R.solani* اثر بازدارنده داشته و در شرایط گلخانه‌ای نیز توانسته میزان آلودگی به *R.solani* و در نتیجه علائم پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه نخود را به میزان چشمگیری کاهش دهد (Hwang and Chakravarty 1992). فیدامن و رسال(Fiddaman and Rossal 1993) طی گزارشی اعلام نمودند، استرین *B.subtilis (NCIMB 12376)* ترکیبات فرار ضد قارچی علیه *R.solani* تولید می‌کند که رشد قارچ درحضور آن به شدت کاهش می‌یابد.

باتوجه به قدرت بالای آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* و ماندگاری آن به دلیل تولید اندوسپور و استفاده مؤثر آن به صورت پودر وتابل(Turner et al. 1991) ، اثر ۳ جدایه دریافتی از باکتری روی قارچ *Rhizoctonia solani* در آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

۱- آزمون بیماریزایی *R .solani*

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌ای از *R.solani* جدا شده از گیاهچه‌های بیمار جمع‌آوری شده از مزارع حومه مشهد، دریافتی از مهندس عباسی (عضو هیئت علمی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی خراسان) در آزمایشات بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون با استفاده از روش لایه مایه تلقیح (Inoculum Layer Technique) انجام شد. بدین ترتیب که درون هر گلدان پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتی‌متر، حدود ۲۵۰ سانتی‌مترمکعب خاک استریل ریخته شد. یک ظرف پتری نه سانتی‌متری از کلنی هفت روزه قارچ *R.solani* روی محیط کشت آب آگار دو درصد (پس از خرد نمودن) به خاک اضافه شد. سپس۵۰ سانتی‌مترمکعب دیگر از خاک استریل روی آن افزوده شد. جهت تیمار شاهد از محیط آب آگار دو درصد خالص فاقد کشت قارچ استفاده گردید. سپس ۱۲ عدد بذر چغندرقند رقم ۷۲۳۳ که قبلاً توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و دو بار با آب مقطر استریل شستشو شده بودند، با فواصل مساوی درون گلدان کشت شدند. برای هر تیمار چهار تکرار (گلدان) در نظر گرفته شد. پس از ۱۸ روز نگهداری در شرایط گلخانه با دمای۷ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد، گیاهچه‌های دارای علائم باریک و سیاه شدن طوقه، به آزمایشگاه منتقل گردیدند. از محل آلودگی روی محیط غذایی PDA کشت شد. قارچ رشد یافته جداسازی و مشخصات ماکروسکپی و میکروسکپی آن مورد بررسی قرارگرفت.

۲- بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه های *B. subtilis* در برابر قارچ *R.solani*

سه جدایه از باکتری *B.subtilis* دریافتی از دکتر روحانی (عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان) پس از کشت مجدد، خالص سازی شدند. این جدایه‌ها با مشخصات B.s.Ham ، 202 و 204 از خاک مزارع اطراف همدان جمع آوری شده‌اند.

به منظور بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *B.subtilis* در برابرقارچ *R.solani*، از روش کشت دو طرفه استفاده شد. به این ترتیب که باکتری آنتاگونیست (جدایه موردنظر) در یک طرف ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA به صورت لکه‌ای کشت گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری شد. پس از ۴۸ ساعت در مقابل هر جدایه باکتری، یک دیسک ۵ میلی‌متری از قارچ *R.solani* قرار داده شد. برای هرجدایه آنتاگونیست سه ظرف پتری (تکرار) در نظر گرفته شد. ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از شش روز قطر هاله بازدارنده جدایه‌های باکتری، اندازه‌گیری شدند.

۳- بررسی مکانیسم تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtilis*

www.SID.ir

Archive of SID

الف- بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری این آزمایش مطابق روش سینگ و دورال (Singh and Deveral 1984) انجام شد و هدف از انجام آن، بررسی توانایی غلظت‌های مختلف ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *B.subtilis*، در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R.solani* بود. بدین منظور یک لوپ ازمحیط کشت ۲۴ ساعته هر جدایه آنتاگونیست در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب زمینی، دکستروز(Potato dextrose broth) که قبلا استریل شده بود، کشت داده شد. بعداز هفت روز که ارلن‌های حاوی جدایه آنتاگونیست در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر دورانی(orbital) با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد، محتویات هر ارلن پس از عبور از کاغذ صافی واتمن شماره یک با نیروی ۱۰۰۰۰ gr (گردان BECKMAN Model J2-،۱۴ 21M) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محتویات هر ارلن به طور جداگانه توسط دستگاه پمپ خلأ و صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۴۵ میکرومتری، فیلتر شدند. برای بررسی تاثیر عصاره حاصله، ابتدا محیط کشت PDA با حجم‌های ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۱۹/۶۰۰میلی‌لیتر درون لوله ریخته شد و پس از استریل نمودن، به ترتیب ۵۰۰۰، ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰و ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست، به لوله‌های حاوی PDA با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و مخلوط شد و سپس به ظروف پتری استریل انتقال یافت. برای هر غلظت از عصاره، سه تکرار تهیه شد. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع (PD) فاقد باکتری که از صافی ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شده بود، استفاده گردید. پس از انعقاد محیط کشت، یک حلقه ۵ میلی‌متری از حاشیه کلنی‌های فعال کشت سه روزه ریزوکتونیا، در وسط هر ظرف پتری قرار داده شد. ۹۶ ساعت پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی ریزوکتونیا در ظروف پتری حاوی عصاره و ظروف پتری شاهد فاقد عصاره، اندازه‌گیری شدند. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل دو عاملی با متن کاملا" تصادفی به اجرا درآمد، فاکتور اول جدایه‌ها (شاهد، B.s.Ham ، 204 و202) و فاکتور دوم، غلظت در ۵ سطح بوده است.

داده‌های به دست آمده از آزمایش(قطر رشد میسلیوم در هر غلظت) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروه‌بندی دو عامل جدایه و غلظت با استفاده از آزمون دانکن در سطوح یک درصد و پنج درصد انجام گردید. برای تعیین درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری از رابطه ذیل استفاده شد:

$$\text{درصد ممانعت از رشد} = \frac{\text{(میانگین قطررشدمیسلیوم‌درهرتیمار - میانگین قطررشدمیسلیوم‌درشاهد)} \times 100}{\text{میانگین قطررشد میسلیوم‌در شاهد}}$$

میسلیوم قارچ عامل بیماری

www.SID.ir

Archive of SID

ب- بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری: این تحقیق مطابق روش فیدامن(Fiddaman 1993; Fiddaman1994) انجام شد. در این آزمایش جهت کشت باکتری از سه نوع محیط کشت Potato Dextrose Agar(PDA) ، Nutrient Agar حاوی دو درصد دی‌گلوکز(NAG) و Nutrient Agar(NA) به شرح زیر استفاده شد:

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کدری از کشت ۷۲ ساعته جدایه‌های *B.subtilis* روی آگار غذایی حاوی دو درصد گلوکز، PDA و NA پخش شد. ۲۴ ساعت پس از قرار دادن ظروف پتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در بالای هر یک از ظروف پتری حاوی جدایه آنتاگونیست، ظرف پتری حاوی یک حلقه میسلیومی از کشت سه روزه ریزوکتونیا قرار داده شد و دور تا دور هر ظرف پتری با پارافیلم و چسب مسدود شد. در تیمار شاهد حلقه‌های ۵ میلی‌متری از محیط PDA حاوی قارچ *R.solani* در مقابل ظروف پتری حاوی NAG،PDA وNA فاقد باکتری قرار داده شد. پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی ریزوکتونیا پس از چهار روز، اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی، شامل چهار تیمار(B.s.Ham, 204, 202 و شاهد) و سه تکرار (برای هر نوع محیط کشت) انجام شد و داده‌های به دست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح یک درصد و پنج درصد انجام شد. برای تعیین درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری، از رابطه ذکر شده در بند الف-۳ استفاده گردید.

٤- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست *B.subtilis* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه

باتوجه به اثرات مطلوب سه جدایه 202, 204, B.s.Ham در شرایط آزمایشگاه، میزان تأثیر آن‌ها در کاهش مرگ گیاهچه چغندرقند در گلخانه به دو روش محلول‌پاشی خاک(Soil drenching) و آغشته سازی بذر(Seed coating) مورد مطالعه قرار گرفت. خاک گلدان‌ها به جز تیمار شاهد غیرآلوده، به نسبت ۱۰ درصد حجمی با اینوکلوم *R. solani* (قارچ تکثیرشده روی محیط آرد ذرت و ماسه استریل - به نسبت ۵ و۹۵ درصد - به مدت یک ماه) جدا شده از مرحله گیاهچه چغندرقند، مخلوط شد. جهت تیمار شاهد غیرآلوده فقط آرد ذرت و ماسه استریل به همان مقدار بدون‌اینوکلوم *R. solani* استفاده شد. برای آلوده‌سازی خاک با جدایه‌های آنتاگونیست، از سوسپانسیون سلول باکتری‌های آنتاگونیست استفاده شد، بدین ترتیب که با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی یک قطره ماده خیس‌کننده (مایع ظرفشویی) در لیتر به هر ظرف پتری حاوی کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها،

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌های تولید شده شسته شدند و به نسبت 10^{10} سلول باکتری در هر گرم خاک مرطوب گلدان‌ها مخلوط گردیدند. به همین ترتیب نیز برای آغشته‌سازی بذر به سلول باکتری‌های آنتاگونیست، سوسپانسیونی با غلظت 10^{10} سلول باکتری در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۲ گرم در لیتر صمغ عربی تهیه شد و بذرهای چغندرقند (رقم ۷۲۳۳) به مدت ۳۰ دقیقه در آن غوطه‌ور گردیدند، سپس بذرها در زیر هود استریل خشک شدند. در هر گلدان ۱۲ عدد بذر چغندرقند کاشته شد. به منظور حذف هر گونه آلودگی احتمالی بذر مورد استفاده، قبل از کاشت، به مدت ۳ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شده و دو بار به وسیله آب مقطر استریل، شستشو و خشک گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا" تصادفی در چهار تکرار انجام شد. گلدان‌ها به مدت ۳۰ روز در شرایط گلخانه با حرارت۷±۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و هر سه روز، یک بار آبیاری شدند. تعداد گیاهچه‌های سالم در فاصله‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، شمارش و درصد گیاهچه‌های سالم محاسبه شد. درصد تلفات گیاهچه‌های چغندرقند در اثر قارچ عامل بیماری، از رابطه زیر بدست آمد.

$$\frac{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم موجود در تیمار} - \text{تعداد گیاهچه‌های سالم موجود در شاهد غیرآلوده}}{\text{تعداد بوته‌های سالم موجود در شاهد غیرآلوده}} \times 100$$

داده‌های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح یک درصد و پنج درصد انجام شد.

نتایج

۱- آزمون بیماریزایی *R.solani*

اولین علائم بیماری پس از ۷-۵ روز، به صورت باریک و سیاه‌شدن طوقه ظاهر شد. درطی ۱۸ روز از زمان مایه‌زنی قارچ به گیاه میزبان، گیاهچه‌های دارای علائم بیماری از درون گلدان‌ها خارج شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل بر روی محیط PDA کشت شدند. کلنی قارچ ابتدا به رنگ سفید مایل به کرم به صورت دوایر متحدالمرکز رشد نموده و پس از دو هفته رنگ آن تیره و متمایل به قهوه‌ای گردید. پس از تهیه اسلاید میکروسکپی از قارچ رشد یافته روی محیط کشت PDA، زاویه ۹۰ درجه انشعابات هیف با هیف اصلی، تشکیل دیواره عرضی بعد از آن، فشردگی هیف بعد از انشعاب، وجود دیواره عرضی از نوع دولیپور (Dolipore) و رنگ مایل به قهوه‌ای هیف، مشاهده شد لذا قارچ مورد نظر *R.solani* تشخیص داده شد. پس از ۱۸ روز گیاهچه‌های سالم و از بین رفته به شرح جدول ۱ شمارش و درصد آلودگی تعیین گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ درصد مرگ و میر گیاهچه‌های چغندرقند تلقیح شده با قارچ *R. solani*
Table1 Percent of mortality of sugar beet seedlings inoculated by *R. solani*

تیمار Treatment	تعداد گیاهچه‌های آلوده No. of infected seedlings	تعداد گیاهچه‌های غیرآلوده No. of non- infected seedlings	درصد آلودگی Infection percent
شاهد آلوده به *R. solani* (Infected control by *R. solani*)	36	12	75
شاهد غیرآلوده به *R. solani* (Non-infected control by *R. solani*)	0	48	0

۲- قدرت آنتاگونیستی، جدایه‌های *B.subtilis* در برابر قارچ عامل بیماری

دراین بررسی، میانگین قطر هاله بازدارنده هریک از جدایه‌ها در سه تکرار اندازه گیری شد که بیشترین مقدار مربوط به جدایه B.s.Ham به اندازه ۲۳ میلی‌متر بوده است. این مقدار در جدایه‌های 204 و 202 به ترتیب ۱۲و۹ میلی‌متر تعیین گردید. باتوجه به این که میانگین قطر هاله بازدارنده هر سه جدایه فوق بیشتر از ۵ میلی‌متر بود، هر سه جدایه در بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

۳- مکانیسم تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtilis*

الف- نتایج بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری: براساس مقایسه میانگین‌ها (جدول-۲)، هر سه جدایه *B. subtilis*، با تولید ترشحات مایع، موجب کاهش رشد میسلیوم قارچ *R.solani* شدند که در این میان جدایه B.s.Ham بیشترین و جدایه 202 کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری داشتند. با افزایش غلظت ترشحات مایع خارج سلولی در محیط کشت، تأثیر آن‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ، افزایش یافت. به طوری که در این آزمایش تأثیر غلظت ۵۰۰۰ میکرو لیتر (۲۵ درصد) بیشتر از سایر غلظت‌ها بود (نمودار۱).

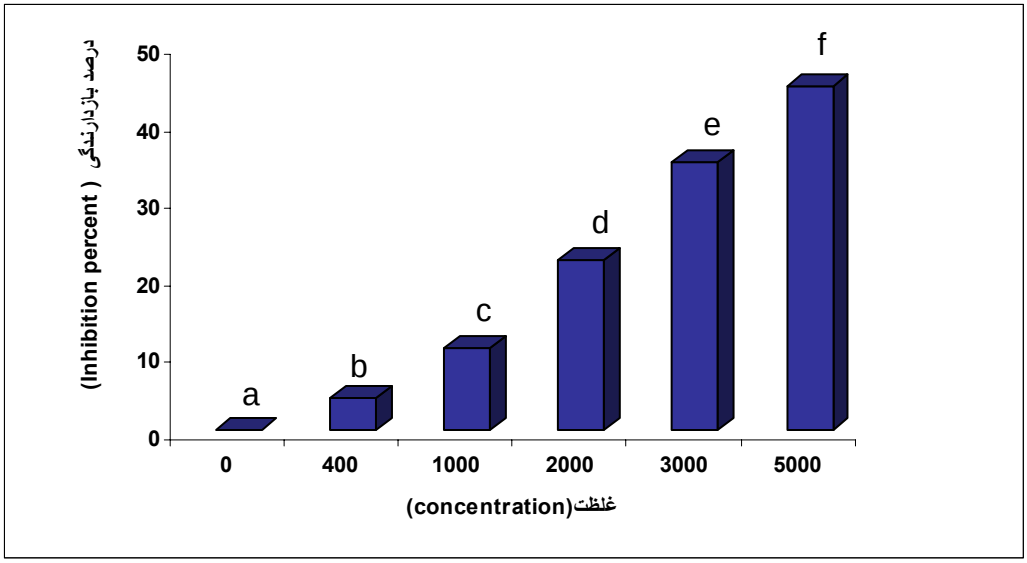
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲ تأثیر ترشحات مایع جدایه‌های باکتری *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R.solani*

Table 2 Effect of culture filtrates of *B.subtilis* isolates on inhibition of mycelial growth of *R.solani*

گروه بندی تیمارها Treatments Classification 5%	1%	درصد بازدارندگی Inhibition Percent	میانگین قطر کلنی(میلی متر) Average of Colony's Diameter (mm)	جدایه (Isolate)
d	c	32.96	60.33	B.s.Ham
c	b	13.96	77.44	20 4
b	b	11.42	79.72	202
a	a	0	90	Control



نمودار ۱ تأثیر غلظت‌های مختلف ترشحات مایع جدایه‌های باکتری *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم *R.solani*

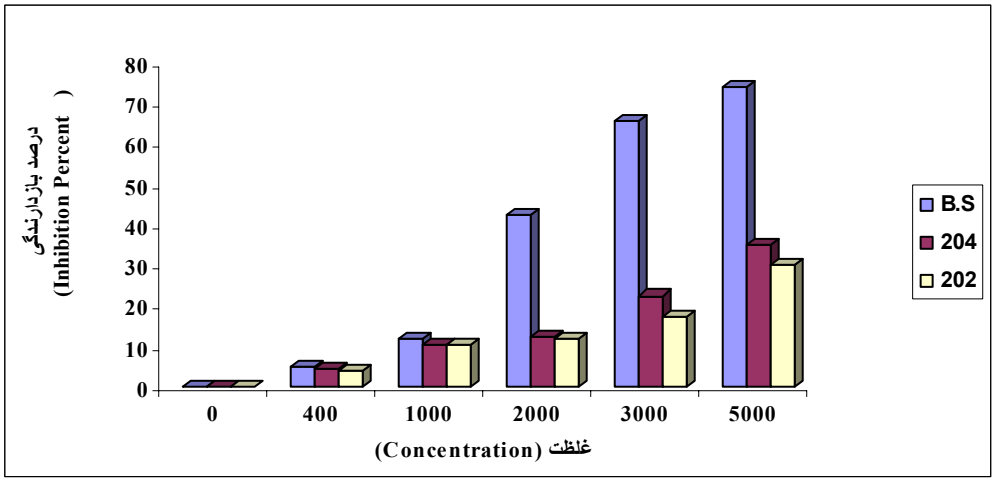
Fig. 1 Effect of different concentrations of *B.subtilis* culture filtrates on inhibition of mycelial growth of *R.solani*

بر اساس مقایسه میانگین اثرات متقابل، در غلظت۵۰۰۰ میکرولیتر(۲۵ درصد) ترشحات مایع خارج سلولی جدایه B.s.Ham با ۷۳/۷۰ درصد، نسبت به شاهد، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R.solani* داشته است. در حالی که در این غلظت، اثر دو جدایه 204 و 202 به ترتیب ۳۴/۸۱ و ۲۵/۹۲ درصد بوده است. در این غلظت بین تیمارها ازنظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد و پنج درصد وجود داشت. در غلظت ۳۰۰۰ میکرولیتر (۱۵درصد) و ۲۰۰۰ میکرولیتر (۱۰درصد)، بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه B.s.Ham بود و دو جدایه 204 و202 دارای تأثیر نسبتا" یکسانی بودند (دو جدایه اخیر در یک گروه آماری قرار گرفتند).

www.SID.ir

Archive of SID

در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر (۵ درصد) و ۴۰۰ میکرولیتر (۲درصد) بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کلیه جدایه‌ها در غلظت ۴۰۰ میکرولیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند (نمودار۲).



نمودار۲ تأثیر غلظت‌های مختلف ترشحات مایع جدایه‌های مختلف *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم *R.solani*

Fig. 2 Effect of different concentrations of culture filtrates belonging to 3 isolates of *B.subtilis* on inhibition of mycelial growth of *R.solani*

ب- نتایج بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری

ترشحات فرار تمام جدایه‌ها در هر سه محیط کشت PDA، NAG و NA توانستند از رشد میسلیوم قارچ *R.solani* جلوگیری کنند. که در این میان، ترشحات فرار جدایه B.s.Ham در هر سه محیط، با درصد بازدارندگی ۶۲/۲۲(PDA)، ۶۰/۱۳(NAG) و ۵۳/۳۳(NA) بیشترین و جدایه 204 در سه محیط، با درصد بازدارندگی ۳۰(PDA) ، ۴۰/۷۴(NAG) و۲۵/۵۵(NA) ، کمترین تأثیر را نسبت به شاهد، در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R.solani* داشتند. در هر محیط، بین تیمارها و هم چنین بین تیمارها و شاهد، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح یک درصد و پنج درصد وجود داشت. براساس داده‌های به دست آمده از هر محیط، هریک از جدایه‌ها در یک گروه آماری مجزا قرار گرفتند.

٤- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست *B.subtilis* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه

نتایج حاصل از یادداشت‌برداری ۱۰، ۲۰ و۳۰ روز پس از کشت نشان داد، درصد تلفات گیاهچه‌ها ۱۰، ۲۰ و

www.SID.ir

Archive of SID

۳۰ روز پس از کشت به ترتیب ۵۲/۰۷، ۷۵ و۱۰۰ درصد می‌باشد. این میزان در شاهد غیرآلوده در هر سه زمان یادداشت‌برداری صفر بود. البته عدم ظهور گیاهچه به دلیل پوسیدگی بذر نیز در تعدادی از گلدان‌های تیمارآلوده به *R.solani* مشاهده گردید که این موارد نیز به عنوان گیاهچه‌های تلف شده در نظر گرفته شد. بر اساس درصد گیاهچه‌های سالم ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، مشخص شد بین تیمارها و شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری وجود داشت. به طوری که ۳۰ روز پس از کشت بذر چغندرقند، درصد گیاهچه‌های سالم در شاهد آلوده صفر می‌باشد اما این میزان در تیمارهای حاوی جدایه‌های B.s.Ham، 204 و 202 در روش محلول‌پاشی خاک(Soil drenching) به ترتیب ۶۴/۵۹، ۵۶/۲۵ و ۵۰ درصد و در روش آغشته‌سازی بذر (Seed coating) به ترتیب ۵۲/۰۸، ۴۱/۶۶ و ۲۹/۱۶ درصد می‌باشد. این میزان در شاهد غیرآلوده ۱۰۰ درصد است.

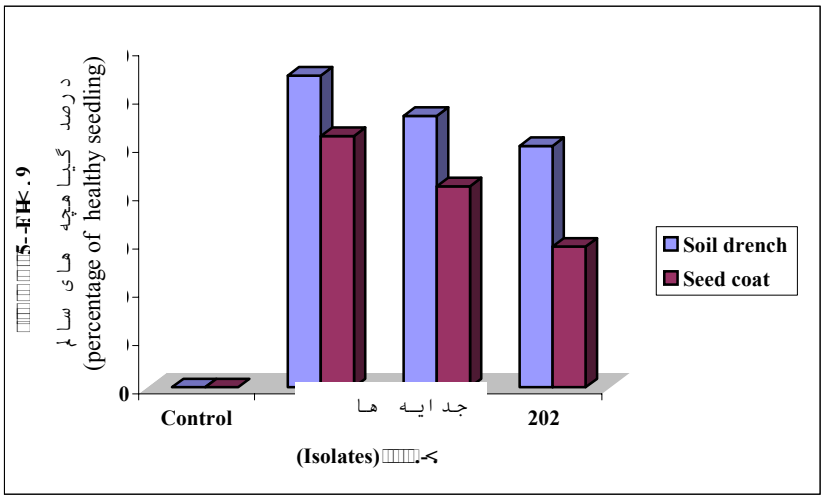
بررسی‌های آماری نتایج حاصل از درصد گیاهچه‌های سالم ۳۰ روز پس از کشت (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح ۱٪ و ۵٪)، سه گروه آماری مشخص را بین تیمارها نشان داد که این سه گروه به ترتیب قدرت قابلیت کنترل کنندگی مرگ و میر گیاهچه چغندرقند عبارتند از:

۱- جدایه B.s.Ham در روش محلول‌پاشی خاک.

۲- جدایه‌های204 و 202 در روش محلول‌پاشی خاک و جدایه B.s.Ham در روش آغشته‌سازی بذر.

۳- جدایه‌های204 و 202 در روش آغشته‌سازی بذر.

در این بررسی‌ها جدایه B.s.Ham در روش محلول‌پاشی خاک با ۶۴/۵۹ درصد، بهترین قابلیت کنترل‌کنندگی بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند را از خود نشان داد (نمودار۳).



نمودار۳ تأثیر جدایه‌های باکتری *B.subtilis*(B.s =B.s.Ham، 204، 202)در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند ۳۰ روز پس از کشت

Fig. 3 Inhibitory effect of *B.subtilis* isolates*(*B.s=B.s.Ham , 204, 202*)* on sugar beet damping-off 30 days after sowing

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

سه جدایه از باکتری *B.subtilis* که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، توانستند با مکانیسم‌های مختلف از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری(*R.solani*) جلوگیری کنند. بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) مشخص نمود که ترشحات مایع جدایه‌ها، اثرات متفاوتی روی قارچ فوق دارند. این اختلافات در بین جدایه‌های مختلف یک گونه، از نظر تولید مواد قابل انتشار و ممانعت‌کننده از رشد قارچ‌ها، توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Dunleavy 1955; Henis and Inbar 1968; Sing and Deveral 1984). تأثیر متابولیت‌های فرار ضدقارچی (Antifungal volatiles) روی رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری نشان داد، جدایه‌های *B.subtilis* می‌توانند در سه محیط غذایی NAG,PDA و NA ترکیبات فرار علیه *R.solani* تولید نمایند. فیدامن (Fiddaman 1993) نیز گزارش کرد، استرین‌های *B.subtilis* از طریق تولید آنتی بیوتیک و ترکیبات فرار ضدقارچی توانستند از رشد میسلیوم قارچ‌های رده اوومیست و بازیدیومیست جلوگیری می‌نمایند. در بررسی‌های انجام شده هم چنین مشخص گردید که جدایه‌های *B.subtilis*، در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R.solani*، در محیط‌های غذایی مختلف رفتارهای متفاوتی دارند. وجود دی‌گلوکز در محیط کشتNAG و PDA، بازدارندگی جدایه‌ها (در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ فوق) را در مقایسه با محیط کشتNA افزایش داده است. هاول(Howell) به این نتیجه رسید، با افزودن کربوهیدرات‌ها به محیط کشت باکتری، تولید آمونیاک توسط *Enterobacter cloacae* جهت جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P.ulimum*، متوقف می‌گردد (به نقل از Fiddaman and Rossal 1993).

در حالی که نتایج تحقیقات فیدامن و رسال (Fiddaman and Rossal 1993)، بیانگر این موضوع است که وجود دی‌گلوکز در محیط آگار غذایی، موجب افزایش فعالیت‌های ضدقارچی ترکیبات فرار *B.subtilis* علیه قارچ *R.solani* می‌شود، این ترکیبات در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *p.ultimum* تأثیری نداشت. براساس نتایج فوق، فیدامن وجود آمونیاک را در متابولیت‌های فرار *B.subtilis* غیر محتمل دانست.

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص شد، بیشترین تلفات گیاهچه‌های چغندرقند در اثر *R.solani* در ۱۰ روز اول پس از کشت به صورت تدریجی ظاهر می‌گردد. ۲۰ و۳۰ روز پس از کشت، شدت مرگ و میر نسبت به میزان اولیه آن در ۱۰ روز اول پس از کشت، کاهش یافت. احمدی نژاد (۱۳۵۲) نیز نشان داد علی‌رغم این که گیاهچه‌های آلوده به این قارچ تا ۵۰ روز پس از ظهور هم پا برجا می‌مانند، اما حداکثر مرگ و میر در ۱۰ روز اول بعد از ظهور گیاهچه می‌باشد و ۲۰ روز بعد، تلفات بسیار کم

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. برتری جدایه B.s.Ham در بررسی‌های گلخانه‌ای باتوجه به نتایج حاصل از آزمایشگاه قابل توجیه است. چرا که این جدایه در مطالعات آزمایشگاهی نیز بهترین اثر را نسبت به سایر جدایه‌ها در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *R.solani* نشان داده بود. به نظر می‌رسد قدرت آنتاگونیستی، ترشحات فرار و مایع این جدایه در این امر دخیل هستنند. قابلیت کنترل‌کنندگی پایین‌تر تیمارهای حاوی جدایه‌های 202 و 204 در روش آغشته‌سازی بذر نسبت به سایر تیمارها می‌تواند به دلیل قابلیت چسبندگی پایین‌تر سلول‌های این باکتری‌ها به بذر چغندرقند باشد. اکثر تیمارهای به کار رفته در این تحقیق در شرایط گلخانه‌ای کنترل نسبتاً خوبی روی مرگ گیاهچه چغندرقند داشتند، لذا به نظر می‌رسد در صورت ادامه این تحقیق در شرایط مزرعه‌ای با در نظر گرفتن وجود موادآلی و میکروفلور خاک طبیعی، کنترل این بیماری بهتر خواهد بود. مک نایت و روسال (Mcknight and Rossal 1990) نیز در تحقیقی نشان دادند که استرین *B.subtilis R* توانست ریشه‌های پنبه را در شرایط مزرعه برای بیش از چهار ماه کلنیزه کند و گیاهچه‌های پنبه را در مقابل قارچ *R.solani* محافظت نماید.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت، تمام تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق در روش محلول‌پاشی خاک، بهتر از روش پوشش دادن بذر، مرگ گیاهچه چغندرقند را کاهش می‌دهند. بدیهی است در روش محلول‌پاشی خاک، جمعیت بالاتری از سلول‌های باکتری در تماس با خاک اطراف بوته قرار می‌گیرند، درحالی که در روش آغشته‌سازی بذر، سلول‌های باکتری کمتری به سطح بذر می‌چسبند. جی و همکاران (Jee et al. 1988) نیز در تحقیقی نشان دادند، کاربرد *B.subtilis* به صورت افزودن سوسپانسیون باکتری به خاک، مؤثرتر از غوطه‌ورکردن ریشه‌های فلفل در سوسپانسیون باکتری می‌باشد.

باتوجه به آن که آنتاگونیست‌ها در زیستگاه‌های مختلف و خاک‌هایی با شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژیکی مختلف سازگاری یافته‌اند، با شناخت این شرایط می‌توان اثر کنترل‌کنندگی آن‌ها را افزایش داد و از این مطالعه در تولید تجاری این عوامل و استفاده از آن‌ها در کنترل چند جانبه بیماری‌های گیاهی خاکزاد، استفاده نمود. هم چنین مطالعه تأثیر این عوامل در بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی چغندرقند پیشنهاد می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده References

احمدی نژاد، ۱. ۱۳۵۲ . مرگ گیاهچه چغندرقند در ایران و کاربرد چند قارچ‌کش علیه عوامل مولد آن. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد ۹ شماره‌های ۳و۴. صفحه‌های ۱۲۹ الی۱۴۱

ارشاد، ج. ۱۳۷۴ . قارچهای ایران. نشر سازمان تحقیقات کشاورزی. ۸۷۴ صفحه

امتی، ف. ۱۳۷۷ . بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Phytophthora capsici* عامل بوته میری فلفل. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.۱۰۴ صفحه

عباسی مقدم، ا. فلاحتی رستگار، م و جعفرپور، ب .۱۳۷۷. اتیولوژی پوسیدگی‌های ریشه و طوقه چغندرقند در استان خراسان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۱۲۶

کاشی، ل. سلیمانی، م. ج و کارگربیده، ا. ۱۳۷۹. پوسیدگی پیتیومی ریشه چغندرقند در مزارع استان همدان. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲۵۳

Baker CJ, Stavely JR, Mock N (1985) Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease,vol.69: 770-772

Besson F, Michel G (1986) Isolation and characterization of new Iturins:Iturin D and Iturin E. The Journal of antibiotics,vol.4: 437-442

Dunleavy J(1955) Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis* Phytopathology, Vol.45:252-258

Ferreira JHS, Matthee FN, Thomas AC (1991) Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology,vol.81(3):283-287

Fiddaman PJ, Rossal S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis* .Journal of Applied Bacteriology, vol.*74:119-126*

Fiddaman PJ, Rossal S(1994) Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*.Journal of Applied Bacteriology, vol.76:395-405

Gray FA, Gerik JS (1998) Biology and management of sugar beer diseases in the Big Horn and wind River Basins of Wyoming. Universitynof Wyoming,Cooperative Extension Service Bulletin.B-1063, 23pp

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

www.SID.ir

Archive of SID

Hwang SF, Chakravarty P(1992) Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and a fungicide. Journal of Plant Disease and Protection,vol.99(6): 626-636

Jee HJ,Nam CG, Kim CH(1988) Studies on biological control of *Phytophtora* blight of red pepper.I.Isolation of antagonists and evaluation of antagonistic activity in vitro and green house.Plant Pathology, vol.4(4):305-312

Kajimora Y, Svgiyama M, Kaneda M(1995) Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* FR-2.The Journal of Antibiotics,vol.48(10)1095-103

Loeffler W, Tschen JSM, Vanittanakom N, Kugler M, Knorpp E, Hsieh TF, Wu TG(1986) Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis F-29-3.*A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. Journal of Phytopathology, vol.115:204-213

Mckeen CD, Reilly CC, Pusey PL(1986) Production and partial characterization antifungal substances antagonistic to*Monilinia fracticola* from *Bacillus subtilis.* Phytopathology, vol.76(2): 136-139

Mcknight SE, Rossal S(1990) Root colonization of cotton seedlings by *Bacillus subtilis (MBI 600).* In: plant growth promoting rhizobacteria. Keel C, Koller B, Defago G. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlaken, Switzerland.

Singh J, Deveral BJ(1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Transaction of British Mycological Society,vol.83(3): 484-490

Turner JT, Backman PA(1991) Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis.* Plant Disease, vol.75: 347-353

Whitney ED, Duffus JE(1986) Compendium of beet diseases and insects. APS Press

www.SID.ir