Archive of SID

بررسی فعالیت آنتاگونیستی باسیلوس‌های جدا شده از فراریشه علیه *Fusarium solani* عامل پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا

امیر اکبری[۱]، دوستمراد ظفری[۲]، حمید روحانی[۳] و غلام خداکرمیان[۴]

چکیده

پوسیدگی فوزاریومی لوبیا ناشی از *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* یکی از بیماری‌های مهم این گیاه محسوب می‌شود. در این تحقیق مبارزه بیولوژیک با این بیماری به عنوان روشی برای کنترل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. اثر آنتاگونیستی ۱۲۲ نمونه باکتری جدا شده از ناحیهٔ فراریشه لوبیا به روش کشت متقابل روی محیط کشت PDA بررسی شد، که از این میان پنج جدایه با بیشترین اثر بازدارندگی علیه *F. solani* انتخاب گردیدند. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مشاهدات مورفولوژیکی از بین پنج جدایه انتخاب شده، جدایه‌های B۹۹ و B۲۳ به عنوان *Bacillus cereus* و جدایه‌های B۱۲، B۸۰ وB۸۳ به عنوان *Bacillus subtilis* شناسایی شدند. تاثیر ترکیبات خارج سلولی، ترکیبات فرار و آنزیم‌هایی از قبیل سلولاز و مواد سمی مانند سیانید هیدروژن به عنوان سازوکارهای بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد ترکیبات فرار و متابولیت‌های مایع خارج سلولی تمام جدایه‌ها نسبت به شاهد روی بیمارگر موثر بوده و باعث کاهش رشد پرگنه بیمارگر شدند. در آزمون تولید سلولاز، به جز جدایه‌های B۱۲، B۹۹ وB۸۳ تمامی جدایه‌ها قادر به تولید سلولاز بودند. در بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن، هیچ کدام از جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند. در آزمایش‌های گلخانه‌ای با استفاده از خاک سترون و غیرسترون تأثیر جدایه‌های باکتریایی با دو روش مخلوط کردن با خاک و پوشش دادن بذور لوبیا روی شدت بیماری، درصد وقوع بیماری و وزن خشک کل گیاه بررسی شدند. جدایه‌های B۸۳ و B۱۲ شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۱/۷ و ۲/۱ درصد کاهش دادند و جدایه‌های B۱۲، B۸۰ و B۸۳ به ترتیب ۱۷، ۳۷ و ۲۱ درصد، باعث کاهش درصد وقوع بیماری شدند. جدایه‌های B۱۲، B۸۳ و B۲۳ در خاک سترون در روش پوشش دادن بذور به ترتیب تا ۵/۹، ۵/۵ و ۴/۵ گرم نسبت به شاهد به طور معنی‌داری وزن خشک گیاه را افزایش دادند.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی فوزاریومی لوبیا، مبارزهٔ بیولوژیک، *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus*

---

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا
۲. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا
۳. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا
۳. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پوسیدگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* هنگامی که خاک برای رشد لوبیا، خیلی خشک یا خیلی گرم باشد بیمارگر به ریشه‌های لوبیا حمله می‌کند. این قارچ سبب خسارات عمده‌ای در بیشتر نقاط لوبیاکاری جهان از قبیل انگلستان، استرالیا، اروپا، و بیشتر کشورهای آمریکای لاتین شده است (اعتباریان، ۱۳۷۶). در ایران کایزر و همکاران (۱۹۶۸) قارچ *Fusarium* sp. را از مزارع لوبیا قرمز و لوبیا چشم بلبلی گزارش کرده‌اند. در این بیماری به علت انهدام ریشه‌ها تعداد نیام در هر گیاه و عملکرد کاهش می‌یابد.

اولین نشانه‌های بیماری وجود لکه های قرمز روی ریشه اصلی است که حدود یک هفته بعد از اینکه گیاهچه‌ها از خاک خارج می‌گردند، اتفاق می‌افتد. رنگ قرمز به تدریج تیره‌تر شده و تقریباً تمام ریشه اصلی را می‌پوشاند. بعداً رنگ قرمز جای خود را به رنگ قهوه‌ای می‌دهد و غالباً با شکاف‌های طولی همراه است. موقعی که پیشرفت بیماری کندتر شد شاخه‌ها رشد کمی را نشان می‌دهند و کوتوله می‌مانند و رنگ غیرعادی به خود می‌گیرند تعداد نیام‌ها کم می‌شود و غالب برگ‌ها زرد شده و می‌ریزند. قارچ عامل بیماری می‌تواند به صورت کلامیدوسپور بر روی مواد آلی خاک زنده بماند و شرایط نامساعد را بگذراند (اعتباریان، ۱۳۷۶). در مطالعاتی که تاکنون در زمینه کنترل بیولوژیک انجام شده است استفاده از باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر از باکتری‌های گرم منفی مورد توجه قرار گرفته است (شودا، ۲۰۰۰). در مورد جنس *Bacillus* مطالعات آنتاگونیستی بیشتر روی *B. subtilis* (Nester, *et al.*,) و گاهی روی *B. pumilus* (Meyer & Gottheil, 1901)، *B. cereus* (Frankland & Frankland, 1887) و *B. polymyxa* (Prazmowski) انجام شده است (سیلوسا و همکاران، ۱۹۹۴). استفاده از *B. subtilis* به عنوان آنتاگونیست عوامل بیماری‌زای گیاهی در خاک با روش‌هایی چون فرو بردن ریشه‌های گیاه در محلول باکتری (سلیا و گری، ۱۹۷۴) پوشش‌بذور (سینگ و دورال، ۱۹۵۶) و مخلوط کردن مستقیم با خاک (آلدریچ و بیکر، ۱۹۷۰) مورد بررسی قرار گرفته است. شریبر و همکاران (۱۹۸۸) نشان دادند که تولید آنتی بیوتیک‌هایی نظیر مایکوباسیلین، اتیورین‌آ، باسیلومایسین، فنجی مایسین، باسیلین، سابسپورین، توسط گونه *B. subtilis* عامل اصلی و تعیین کننده در کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی توسط این باکتری می‌باشند. سانگیتا و شا (۲۰۰۰) بیماری پژمردگی فوزاریومی زوال عدس ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *udum* را با باکتری *Bacillus brevis* در شرایط گلخانه و مزرعه کنترل نمودند و مکانیسم بیوکنترل را به تولید آنتی بیوتیک توسط این باکتری نسبت دادند. یوان و همکاران (۲۰۰۲) گزارش نمودند که استرین B۹۴ باکتری *B. amyloquefaciens* ۳ ایزومر از آنتی‌بیوتیک ایتورین‌آ تولید می‌کند که این ایزومرها اثر بازدارندگی بر قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *F. solani* و سایر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی دارند. عقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که استرین‌های اکتینومیستی به خصوص *Streptomyces* sp. و باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas* spp. دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه تعداد زیادی از پاتوژن‌های خاکزی از جمله *Fusarium solani* می‌باشند.

روش طولانی مدت تک کشتی در اکثر مزارع و زیان‌های ناشی از ورود ترکیبات سمی به چرخه‌های حیاتی طبیعت و پیدایش نژادهای مقاوم این قارچ در

www.SID.ir

Archive of SID

برابر سموم و بعضی اثرات نامطلوب دیگر، ضرورت تحقیق برای کنترل بیولوژیکی این بیماری را ایجاب می نماید. در این مطالعه نظر به اهمیت لوبیا و مشکلاتی که پوسیدگی فوزاریومی ریشه برای این گیاه ایجاد می‌کند، تأثیر آنتاگونیستی باکتری‌هایی از جنس *Bacillus* جدا شده از فرایشه لوبیا از استان‌های همدان، زنجان و مرکزی روی قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی ریشه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های قارچ

جهت جداسازی قارچ بیمارگر، طی نمونه‌برداری‌هایی که از استان‌های همدان، زنجان و مرکزی در خرداد ماه و تیر ماه سال ۱۳۸۳به عمل آمد، ۲۵۸ نمونه گیاهی مشکوک به پوسیدگی فوزاریومی ریشه به آزمایشگاه آورده شدند و قطعات آلوده روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت داده و تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جدایه‌های قارچ بعد از رشد از قطعات ریشه از حاشیه پرگنه به تشتک‌های جدید منتقل شدند و به روش تک اسپور خالص گردیدند.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از مزارع لوبیا

جهت جداسازی باکتری‌های آنتاگونیستی ۴۳ نمونه، خاک فراریشه گیاهان سالم از مزارع استان‌های همدان(۳۰ نمونه)، زنجان و مرکزی (هر کدام ۴۶ نمونه خاک) جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس از خاک هر منطقه یک گرم در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و غلظت‌های مختلف بطور سریال در محلول یک درصد پپتون تهیه گردید. از رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} به روش مخطط کردن روی محیط آگار غذایی (Nutrient Agar) ۲۰ گرم در لیترکشت گردید. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تک پرگنه‌های رشد یافته، بر اساس تفاوت در رنگ، شکل، اندازه و حاشیه پرگنه انتخاب و روی محیط NA به روش مخطط کردن خالص‌سازی شدند.

آزمون کشت متقابل

در این مرحله، ابتدا کشت چهار نقطه‌ای هر یک از نمونه‌های باکتریایی آنتاگونیست به دست آمده از مرحله غربال‌سازی، در چهار طرف تشتک انجام شد، سپس یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت ۵ روزه بیمارگر در وسط تشتک به قطر ۱ سانتی‌متر گذاشته شد، در تشتک‌های شاهد نیز به جای باکتری، چهار قطره آب مقطر سترون قرار گرفت. کشت‌های فوق به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار تشتک مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازدارندگی نمونه‌های باکتری از رشد پرگنه بیمارگر، با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (هاگدرون و همکاران، ۱۹۸۹).

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر رشد پرگنه بیمارگر در تشتک شاهد} - \text{قطر رشد پرگنه بیمارگر در هر تیمار}}{\text{قطر رشد پرگنه بیمارگر در تشتک شاهد}} \times ۱۰۰$$

آزمون تولید سلولاز

محیط لازم برای آزمایش سلولاز حاوی ۱ گرم دی فسفات پتاسیم، ۰/۵ گرم نیترات سدیم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۵ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن، در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. درون هر لوله آزمایش ۹ میلی‌لیتر از این محیط را ریخته، و در هرکدام یک کاغذ صافی به ابعاد ۹×۱ سانتی‌متر گذاشته شد به نحوی که نیمی از کاغذ بیرون از سطح مایع قرار گرفت، سپس این مجموعه را اتوکلاو نموده و پس از سرد شدن آن، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^{7} سلول در هر میلی‌لیتر وارد لوله

www.SID.ir

Archive of SID

کرده و در دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند. به مدت ۳ هفته پس از انجام آزمایش هر روز کاغذهای صافی از نظر هرگونه تغییر رنگ مورد بررسی قرار گرفتند. در نمونه شاهد ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم ریخته شد.

آزمون تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن، ابتدا سوسپانسیون هر یک از باکتری‌ها از کشت ۲۴ ساعته بطور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط کشت NA پخش شد. قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر در محلول معرف سیانید هیدروژن شامل ۵ میلی‌لیتر اتیل استو استات مس، ۵ میلی‌گرم ۴َ و ۴ متیلن بیس-N-N- دی متیل آنیلین و ۲ میلی‌لیتر کلروفرم، غوطه‌ور گردید. آنگاه قطعات کاغذ صافی آغشته به این معرف درون درب تشتک حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار داده شده و به صورت وارونه در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ آبی، پس از ۱۸-۳ ساعت نشانه تولید سیانیدهیدروژن می‌باشد (کاستریک و آستریک، ۱۹۸۳).

آزمون تولید ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار

این آزمون بر اساس روش کراس و لوپر (۱۹۹۰) انجام شد. ابتدا سوسپانسیون کدری از کشت جوان جدایه‌های باکتریایی در آب مقطر سترون تهیه و سپس سوسپانسیونی با غلظت ۱×۱۰^{۷} سلول باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه شد. با استفاده از میکروپیپت ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون، روی محیط کشت PDA مایه‌زنی گردید و بوسیله پیپت پاستور سترون پخش شده و سپس ظروف پتری به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در تیمار شاهد نیز آب مقطر سترون گذاشته شد. پس از این مدت به وسیله میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، پرگنه باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شد. سپس پنبه سترون آغشته به کلروفرم، روی درب تشتک گذاشته شد و تشتک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. و پس از این مدت، پنبه برداشته شده و حلقه‌ای به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت جوان قارچ بیمارگر در وسط محیط کشت هر تشتک کشت داده شد. سپس تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت درصد بازداری از رشد بیمارگر محاسبه شد. این آزمون نیز در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح یک درصد استفاده شد.

آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

این آزمون بر اساس روش فیدامن و روزال (۱۹۹۳) انجام شد. ابتدا سوسپانسیونی با غلظت ۱×۱۰^{۷} Cfu از کشت جوان جدایه‌های باکتریایی در آب مقطر سترون تهیه و با استفاده از میکروپیپت ۲۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت آگار غذایی حاوی دو درصد گلوکز (NGA) اضافه و به وسیله پیپت پاستور سترون پخش شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. در تیمار شاهد آب مقطر سترون مایه‌زنی شد. سپس یک قطعه ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت ۷ روزه جدایه‌های قارچ بیمارگر در وسط تشتک حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی شد. در شرایط سترون، درب تشتک‌های کشت باکتری و قارچ بیمارگر برداشته شد و دو تشتک قارچ و باکتری را بر روی یکدیگر قرار داده و با استفاده از نوار پارافیلم، فاصله میان تشتک‌ها مسدود شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. سپس تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد بازداری از رشد پرگنه بیمارگر، برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح یک درصد استفاده شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

تهیه مایه قارچ بیمارگر

در این روش برای تهیه مایه آلوده کننده، در ارلن‌های یک لیتری مقدار ۱۰۰ گرم گندم نیم پخته (جوشانیدن گندم به مدت نیم ساعت در آب) ریخته شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت نیم ساعت در دو روز متوالی سترون شدند. پس از خنک شدن محیط، در روز دوم به هر ارلن سه حلقه یک سانتی‌متر مربعی از کشت هفت روزه گونه فوزاریوم اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پوشش کامل دانه‌های گندم به وسیله قارچ، از گندم‌های قارچ زده به نسبت سه درصد وزنی با خاک سترون مخلوط گردید. مایه تلقیح ۱۴ جدایه قارچ بیماری‌زا به روش فوق تهیه شدند. خاک سترون به صورت مخلوطی از خاک زراعی، ماسه و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۲ به کار رفت و تعداد یک عدد بذر لوبیا نیز در هر گلدان کاشته شد. در مورد تیمار شاهد از گندم سترون مایه‌زنی نشده استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی شامل شش تکرار انجام گرفت. گلدان‌ها در گلخانه قرار داده شد و هر هفت روز یک بار آبیاری شدند. بعد از ظهور علائم از بوته‌های بیمار نمونه‌برداری شد و روی محیط کشت PDA منتقل گردید و پس از رشد قارچ خصوصیات آن مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل از این آزمایش پس از شش هفته مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد استفاده شد.

تهیه مایه جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

برای تهیه مایه جدایه‌های باکتریایی از روش کیم و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. برای این کار ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته نمونه‌ها، روی محیط NBY (۸ گرم Nutrient broth، ۲ گرم عصاره مخمر، ۲/۵ گرم گلوکز، ۲ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲۰ گرم آگار؛ پس از اتوکلاو نیز یک میلی‌لیتر محلول سترون $MgSO_4 ,7H_2O$ یک مولار به آن اضافه شد) به کمک پیپت پاستور پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از این مدت ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۲ مولار به هر تشتک اضافه شد و باکتری‌ها به صورت سوسپانسیون در آورده شدند.

بررسی تأثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

در این بررسی، تأثیر جدایه‌ها روی شدت بیماری، درصد وقوع بیماری و فاکتورهای رشدی به دو روش آلوده‌سازی خاک و آغشته‌کردن بذور لوبیا به باکتری به کمک صمغ عربی، در دو حالت خاک سترون (خاک اتوکلاو شده) و غیرسترون (خاک غیر اتوکلاو شده) مورد ارزیابی قرار گرفت. گلدان‌ها در گلخانه و در گستره دمایی ۲۸-۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین تأثیر نمونه‌ها روی شدت بیماری مطابق با جدول شاخص اندازه‌گیری شدت بیماری عمل شد برای ارزیابی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی، از شاخص بیماری‌زایی (پورکایاتا، ۱۹۸۱) استفاده شد، بدین منظور درصد پوسیدگی فوزاریومی ریشه‌ها به عنوان شاخص سطوح شدت بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت و رتبه صفر تا ۵ بر اساس درصد آلودگی به آن‌ها اختصاص یافت و برای تعیین درصد تأثیر نمونه‌ها روی وقوع بیماری نیز از رابطه زیر استفاده شد (هینکنز، ۱۹۸۷):

$$\text{درصد وقوع بیماری} = \frac{\text{تعداد گیاهان آلوده در هر تیمار}}{\text{تعداد کل گیاهان در هر تیمار}} \times ۱۰۰$$

www.SID.ir

Archive of SID

روش آلوده‌سازی خاک به باکتری

با توجه به اینکه برای هر گرم خاک تعداد 1×10^{9} cfu باکتری استفاده می‌گردد. بنابراین ابتدا بر اساس وزن خاک، جمعیت باکتریایی مورد نیاز را به دست آورده و بر اساس حجم و وضعیت رطوبتی گلدان‌ها، مقدار آب متناسب برای آن‌ها مشخص شد به نحوی که پس از افزودن این مقدار، آب از زیر گلدان بیش از چند قطره خارج نشود. برای تهیه غلظت باکتری از سری‌های رقت استفاده شد (کراس و لوپر، ۱۹۹۰).

روش آغشته‌کردن بذور به باکتری

برای آغشته‌کردن بذور به باکتری، غلظت 1×10^{9} cfu تهیه شده و سپس سوسپانسیون یک درصد این نمونه‌ها در صمغ عربی جهت افزایش قابلیت چسبندگی آن‌ها به بذور، تهیه گردید. پیش از اینکه بذور لوبیا در گلدان‌ها کاشته شوند آن‌ها به مدت ۳۰ ثانیه جهت آغشته شدن به باکتری‌ها در این محلول تیمار شدند. جهت تعیین جمعیت باکتریایی روی بذور، سه بذر از هر تیمار باکتریایی انتخاب شد و آن‌ها را در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار سترون قرار داده و مجموعه را در دستگاه تکان دهنده تحت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۷۰ دور در دقیقه گذاشته شدند. پس از آن رقت‌های 10^{-4} و 10^{-5} تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت NA پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد از این زمان اقدام به شمارش تعداد پرگنه‌ها گردید (بائودوین و همکاران، ۱۹۸۸).

اندازه‌گیری وزن خشک بوته‌ها

وزن خشک کل بوته‌های هر گلدان پس از قرار دادن درون ظرف‌های آلومینیومی در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت محاسبه گردید.

نتایج

۱. شناسایی قارچ بیمارگر

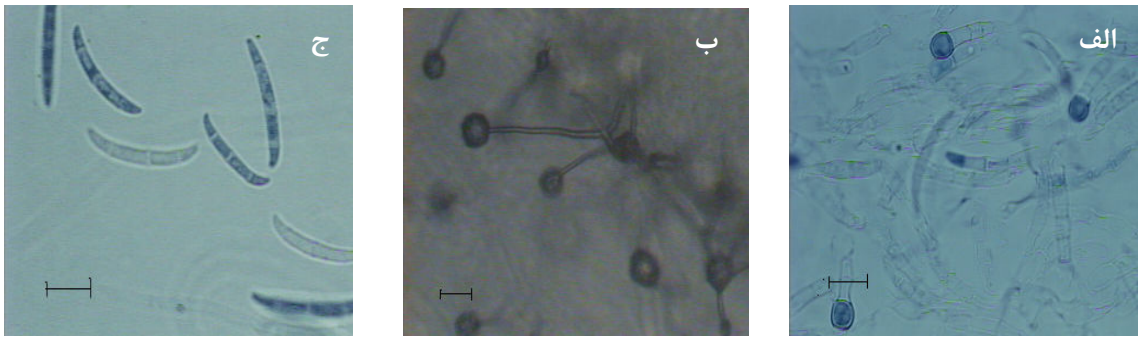
از ۲۵۸ نمونه گیاهی مشکوک ۹۷ جدایه قارچی بدست آمد که پس از شناسایی جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های زیر از آزمون بیماری‌زایی جهت غربال کردن جدایه‌ها استفاده شد. میانگین رشد قارچ‌ها پس از چهار روز روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۲۹-۲۱ میلی‌متر تعیین گردید. رنگ پرگنه قارچ بر روی محیط PDA سفید تا کرم رنگ بود. فیالیدها منفرد و طویل، ماکروکنیدیوم‌ها دارای سه تا پنج دیواره عرضی، و میکروکنیدیوم‌ها به تعداد فراوان و عمدتاً مجتمع (False-head) روی فیالیدهای منفرد و طویل تشکیل شدند. میکروکنیدیوم‌ها یک یا دو سلولی، تخم‌مرغی و بیضوی یا قلوه‌ای شکل بودند. کلامیدوسپورها به صورت منفرد، جفتی و یا چندتایی مشاهده گردید و به صورت میانی و یا انتهایی تشکیل شدند. ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی قارچ بیماری‌گر بر اساس کلید باوس (۱۹۷۷) با گونه *Fusarium solani* مطابقت داشت.

۲. شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی (مطابق با جدول ۱)، مشخصات جدایه‌های B۲۳ و B۹۹ با *Bacillus cereus*، جدایه‌های B۸۰، B۱۲ و **B۸۳** با *Bacillus subtilis* مطابقت داشتند (شاد، ۲۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: ویژگی‌های میکروسکوپی *F. solani* f.sp. *phaseoli* الف- کلامیدوسپور ب- فیالید ج- ماکروکنیدیوم (مقیاس برابر ۱۰میکرومتر می‌باشد)

۳. آزمون کشت متقابل

۱۲۲ جدایه باکتریایی از فراریشه لوبیا جدا شدند در میان آن‌ها بر اساس آزمون کشت متقابل و مشاهده هاله بازدارندگی، تعداد ۱۳ نمونه نسبت به جدایه HV۱۱ از *Fusarium solani* دارای خاصیت بازدارندگی بودند. نمونه‌های B۹۹ و B۸۳ به ترتیب با ۶۱/۲۳ و ۵۸/۹۰ درصد کاهش در رشد پرگنه قارچ بیمارگر، دارای بیشترین بازدارندگی بودند (جدول ۲ و شکل ۲ و ۳). پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین درصد بازدارندگی، نمونه‌های B۱۲،B۲۳ B۸۰، B۸۳ و B۹۹ جهت بررسی اثرات آنتاگونیستی بر روی *Fusarium solani* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انتخاب شدند.

۴. اثر آنتاگونیستی متابولیت‌های تولید شده به وسیله جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی

در آزمون‌های تولید سلولاز و تولید سیانید هیدروژن به جز جدایه‌های B۱۲، B۹۹ و B۸۳ تمامی نمونه‌ها تولید سلولاز نمودند. ولی هیچ کدام از آن‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند. متابولیت‌های فرار تمام جدایه‌ها نسبت به شاهد، بر بیمارگر تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد پرگنه بیمارگر شدند. در این میان جدایه B۸۳ با ۷۵/۱۸ درصد بازدارندگی و جدایه B۹۹ با ۶۳/۵۰ درصد بازدارندگی دارای بیشترین میزان بازدارندگی بودند. کمترین میزان بازدارندگی نیز با ۵۱/۸۶ درصد مربوط به جدایه B۸۰ بود. در مورد متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار نیز تمام جدایه‌ها نسبت به شاهد بر روی بیمارگر تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد پرگنه بیمارگر شدند. متابولیت‌های جدایه B۹۹ با ۵۹/۶۸ درصد بازدارندگی، نسبت به سایر جدایه ها بیشترین تأثیر را روی نرخ رشد پرگنه بیمارگر گذاشت. کمترین میزان بازدارندگی نیز با ۴۵/۳۴ درصد مربوط به جدایه **B۸۰** بود (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های جنس *Bacillus* جدا شده از فراریشه لوبیا

ویژگی		جدایه				
		B12	B23	B80	B83	B99
فوق حساسیت	HR reaction	−	−	−	−	−
واکنش گرم	Gram reaction	+	+	+	+	+
رشد هوازی	Aerobic growth	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی	Aerobic growth	−	−	−	−	−
محل اسپور	Spore position	c	c	c	c	c
کاتالاز	Catalase	+	+	+	+	+
اکسیداز	Oxidase	−	−	−	−	−
رشد در ۴۰ درجه سانتی‌گراد	Growth at $40^{\circ}C$	+	+	+	+	+
تولید لوان	Levan production	−	−	−	−	−
رشد درنمک طعام	Growth at 7% NaCl	+	+	+	+	+
هیدرولیز کازیین	Casein hydrolysis	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	Starch hydrolysis	+	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
لسیتیناز	Lecithinase	−	−	−	−	+
احیای نیترات	Nitrate reduction	+	+	+	+	+
تولید گاز از گلوکز	Gas from glucose	−	−	−	−	−
تولید اندول	Indole production	−	−	−	−	−
تولید سولفید هیدروژن از سیستئین	H_2S from cyctein	−	−	−	−	−
تولید مواد احیاء کننده از سوکروز	Reduction substance from sucrose	+	−	+	+	+
تولید اسید از	Acid from					
گلوکز	Glucose	+	+	+	+	+
آرابینوز	Arabinose	+	+	+	+	−
زایلوز	Xylose	+	+	+	+	−
مانیتول	Mannitol	+	−	+	+	−
فروکتوز	Fructose	+	+	+	+	+
گالاکتوز	Galactose	+	+	+	+	+
سلوبیوز	Cellobiose	+	+	+	+	+
لاکتوز	Lactose	−	−	−	−	−
مالتوز	Maltose	+	+	+	+	+

+: انجام واکنش، تولید و یا رشد

−: عدم انجام واکنش، تولید و یا رشد

c: مرکزی

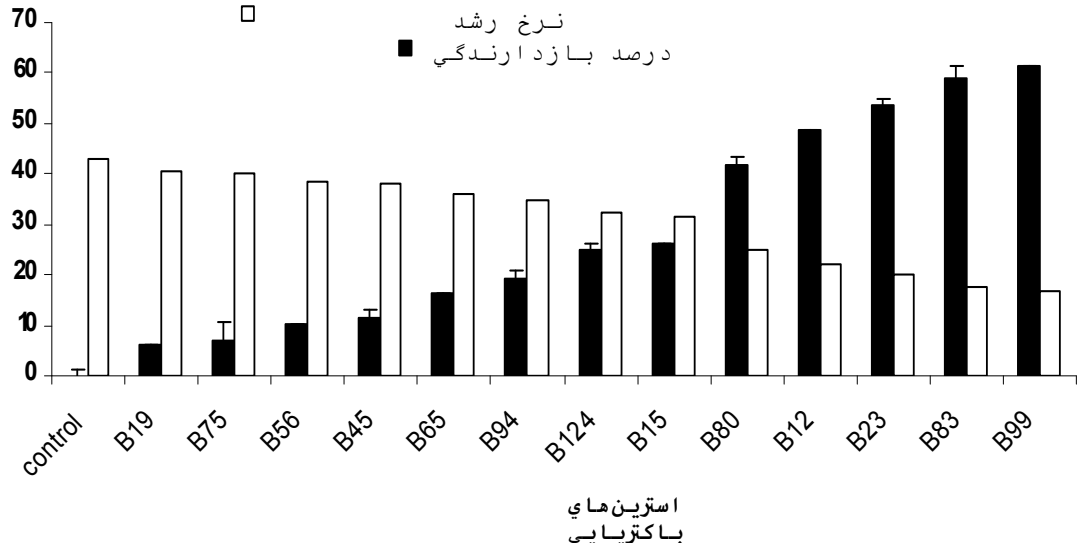
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: میانگین کاهش رشد پرگنه قارچ *F. solani* در تیمار با باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاهی (آزمون کشت متقابل، تولید مواد فرار و آزمون تولید متابولیت‌های مایع خارج سلولی)

تیمارها	درصد کاهش رشد پرگنه قارچ *F .solani*		
	آزمون کشت متقابل	آزمون تولید مواد فرار	آزمون تولید متابولیت‌های مایع خارج سلولی
شاهد	۰±۰e	۰±۰d	۰±۰d
B. subtilis B12	۴۸/۸۳±۰c	۵۸/۵۶±۱/۳d	۴۸/۰۵±۱/۳۳b
B. cereus B23	۵۳/۴۸±۰b	۶۱/۶۶±۱/۳۲c	۵۱/۶۰±۰/۷۷b
B. subtilis B80	۴۱/۸۶±۰d	۵۱/۸۶±۱/۳۲e	۴۵/۳۴±۱/۳۴c
B. subtilis B83	۵۸/۹۰±۱/۳۴a	۷۵/۱۸±۱/۶۴a	۵۵/۵۸±۱/۳۳a
B. cereus B99	۶۱/۲۳±۱/۳۴a	۶۳/۵±۱/۳۸b	۵۹/۶۸±۲/۶a

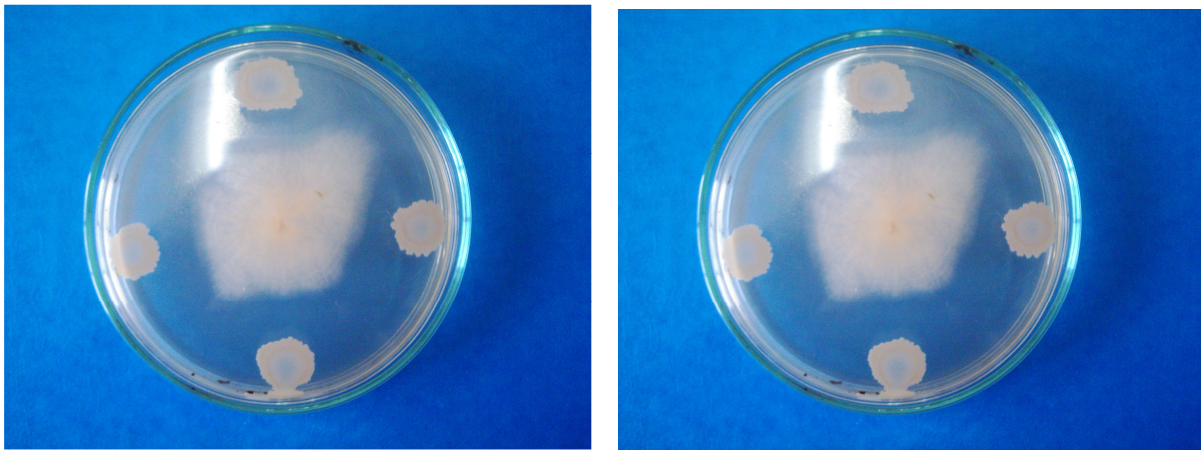
- اعداد داخل جدول درصد کاهش رشد پرگنه *F. solani* را نسبت به شاهد نشان می‌دهند.
- ± میانگین SE و یا خطای استاندارد بین تکرارهای یک تیمار می‌باشد.
- در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد ($p<۰/۰۱$) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار، ندارند.



شکل ۲: تأثیر استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست روی رشد پرگنه *F. solani* در آزمون کشت متقابل

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: آزمون کشت متقابل استرین‌های باکتریایی با *F. solani* و تشکیل هاله بازدارندگی

۵. بررسی‌های گلخانه‌ای

تأثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست بر شدت بیماری در خاک سترون و غیرسترون

در بررسی تأثیر جدایه‌ها در حالت خاک سترون در روش اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک، جدایه‌های B۸۳، B۱۲، B۲۳ و B۸۰ شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۱/۷، ۲/۱، ۳/۳ و ۳/۷ کاهش دادند ولی جدایه B۹۹ در کاهش شدت بیماری تاثیری نداشت و شدت بیماری در این تیمار، مانند شاهد مثبت آلوده به قارچ بیمارگر بود. در روش آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های باکتریایی، چهار جدایه B۸۳، B۱۲، B۲۳ و B۸۰ توانستند شدت بیماری را به ترتیب تا سطح ۱، ۱، ۲ و ۲/۳ کاهش دهند ولی جدایه B۹۹ در کاهش شدت بیماری تاثیری نداشت و شدت بیماری در این تیمار، مانند شاهد مثبت آلوده به قارچ بیمارگر بود. در بررسی تأثیر جدایه‌ها در حالت خاک غیرسترون بر روی شدت بیماری، هم در روش اضافه نمودن سوسپانسیون جدایه‌ها در خاک آلوده به قارچ بیمارگر و هم در روش آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های باکتریایی میزان کاهش شدت بیماری صفر بود به استثنای جدایه B۱۲ و B۸۳ که شدت بیماری را در روش آغشته‌سازی بذور به ترتیب ۲/۶۶ و۳/۳ کاهش دادند و در روش اضافه نمودن سوسپانسیون جدایه‌ها به خاک، تنها جدایه B۱۲ شدت بیماری را به ۳/۷ کاهش داد (جدول ۳).

تأثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست بر روی درصد وقوع بیماری در خاک سترون و غیرسترون

در بررسی تأثیر جدایه‌ها در حالت خاک سترون روی درصد وقوع بیماری، در روش اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری‌ها به خاک آلوده به قارچ بیمارگر، فقط جدایه‌های B۸۳، B۸۰، B۱۲ و B۲۳ به ترتیب با ۱۷، ۳۷،۲۱ و ۳۳ درصد وقوع بیماری، توانستند نسبت به شاهد آلوده در تقابل با بیمارگر، موثر باشند ولی جدایه B۹۹ در کاهش درصد شیوع بیماری اثری نداشت و درصد گیاهان آلوده در این تیمار، مانند شاهد مثبت آلوده به بیمارگر بود. در روش آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های باکتریایی، پنج جدایه B۸۳، B۸۰، B۱۲ و B۲۳ و B۹۹ به ترتیب با ۱۰، ۲۳، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد وقوع بیماری، توانستند نسبت به شاهد آلوده در تقابل با بیمارگر، موثر باشند. در بررسی تأثیر جدایه‌ها در حالت خاک غیرسترون بر روی درصد وقوع بیماری، چه در روش اضافه نمودن سوسپانسیون جدایه‌ها به خاک آلوده به قارچ بیمارگر و چه در روش آغشته‌سازی بذور به

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های باکتریایی، در مقایسه با شاهد در پایین آوردن درصد وقوع بیماری تنها جدایه‌های B۱۲ و B۸۳ که به میزان ۲۷ و ۳۳ درصد توانستند نسبت به شاهد آلوده در تقابل با بیمارگر، روی درصد وقوع بیماری موثر باشند و سایر جدایه‌ها ناموفق بودند (جدول ۴).

تأثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست بر روی وزن خشک لوبیا در خاک سترون و غیرسترون

در بررسی تأثیر جدایه‌ها در خاک سترون بر روی وزن خشک لوبیا در روش اضافه نمودن سوسپانسیون باکتری‌ها به خاک، جدایه‌های B۱۲، B۲۳ و B۸۳ نسبت به شاهد به طور معنی‌داری میزان وزن خشک گیاه را افزایش دادند که در این میان بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار جدایه B۱۲ بود. در روش آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های باکتریایی، جدایه‌های B۱۲ و B۸۳ نسبت به شاهد به طور معنی‌داری مقدار وزن خشک گیاه میزبان را افزایش دادند و بیشترین وزن خشک مربوط به جدایه B۱۲ بود. در بررسی اثر جدایه‌ها روی وزن خشک لوبیا، جدایه B۱۲ بهترین جدایه بوده و جدایه‌های B۸۳ و B۲۳ در مرتبه بعد قرار گرفتند. در بررسی تأثیر جدایه‌ها در حالت خاک غیرسترون بر روی وزن خشک لوبیا، جدایه B۱۲ موفق بود (جدول ۵).

جدول ۳: اثرمتقابل جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست جنس *Bacillus* و روش بکارگیری آنها در تیمارهای آلوده به *F. solani* در شرایط خاک سترون و غیرسترون روی شدت بیماری

جدایه‌ها	اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک		آغشته‌سازی بذور	
	خاک سترون	خاک غیرسترون	خاک سترون	خاک غیرسترون
B. subtilis B83	۱/۷f ± ۰/۱	۵a ±۰	۱e ±۰/۲	۳/۳c ±۰
B.subtilis B80	۳/۷b ± ۰/۱	۵a ±۰	۲/۳d ±۰/۳	۵a ±۰
B. subtilis B12	۲/۱d ±۰	۳/۷b ±۰	۱f ±۰/۱۷	۲/۶۶d ±۰
B. cereus B99	۵a ±۰/۱	۵a ±۰/۳۳	۴b ±۰	۵a ±۰
B. cereus B23	۳/۳c ±۰/۱۷	۵a ±۰/۲۶	۲de ±۰	۵a ±۰/۲
شاهد سالم	۰ ±۰	۰ ±۰	۰ ±۰	۰ ±۰
شاهد آلوده	۵a ±۰	۵a ± ۰	۵a ±۰	۵a ±۰

- اعداد جدول میانگین سه تکرار شدت بیماری بوته‌ها است.
- در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد ($p<۰/۰۱$) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.
- ± میانگین *SE* و یا خطای استاندارد بین تکرارهای یک تیمار می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴: اثرجدایه‌های باکتری *Bacillus* بر درصد وقوع بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا

جدایه‌ها	اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک		آغشته‌سازی بذور	
	خاک سترون	خاک غیرسترون	خاک سترون	خاک غیرسترون
B. subtilis B83	۱۷f ±۲/۰۸	۱۰۰a ± ۰	۱۰g ± ۱	۳۳c ± ۰
B. subtilis B80	۳۷b ± ۱	۱۰۰a ± ۰	۲۳d ± ۱	۱۰۰a ± ۰
B. subtilis B12	۲۱ed ± ۰	۳۷b ± ۰	۱۰g ± ۰	۲۷d ± ۰
B. cereus B99	۱۰۰a ± ۱	۱۰۰a ± ۰	۴۰b ± ۱	۱۰۰a ± ۱
B. cereus B23	۳۳c ± ۲	۱۰۰a ± ۰	۲۰e ± ۱/۵۲	۱۰۰a ± ۲/۰۸
شاهد سالم	۲۲c ± ۱۹	۱۰۰a ± ۰	۶۷b ± ۰	۱۰۰a ± ۰
شاهد آلوده	۱۰۰a ± ۰	۱۰۰a ± ۰	۱۰۰a ± ۰	۱۰۰a ± ۰

- اعداد جدول میانگین سه تکرار درصد وقوع بیماری در بوته‌ها است.
- در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد ($p<۰/۰۱$) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.
- ± میانگین *SE* و یا خطای استاندارد بین تکرارهای یک تیمار می‌باشد.

جدول ۵: اثر جدایه‌های باکتری *Bacillus* روی وزن خشک لوبیا در خاک آلوده به *F. solani*

استرین باکتریایی	اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک		آغشته‌سازی بذور	
	خاک سترون	خاک غیرسترون	خاک سترون	خاک غیرسترون
B. subtilis B83	۴/۱e ± ۰/۱	۳/۷cb ± ۰/۱	۵/۵b ±۰/۰۸	۴ab ± ۰/۱۵
B. subtilis B80	۳/۵۲f ± ۰	۳/۵c ± ۰	۳/۵۸f ± ۰/۲	۳/۴۸c ± ۰/۲
B. subtilis B12	۴/۸c ± ۰/۱۷	۴/۱a ± ۰/۱۷	۵/۹a ± ۰/۱۷	۴/۳a ± ۰/۱۷
B. cereus B99	۳/۶f ± ۰	۳/۴c ± ۰/۱۷	۳/۸f ± ۰/۱	۳/۵c ± ۰
B. cereus B23	۴/۲e ±۰/۱	۳/۷cb ± ۰	۴/۵d ± ۰/۱۷	۴ab ± ۰/۱۷
شاهدسالم	۳/۴۴g ± ۰	۳/۴۸c ± ۰	۳/۵g ± ۰	۳/۴c ± ۰/۱

- اعداد جدول میانگین سه تکرار وزن خشک بوته‌ها است.
- در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد ($p<۰/۰۱$) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.
- ± میانگین *SE* و یا خطای استاندارد بین تکرارهای یک تیمار می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تمام جدایه‌ها با تولید مواد فرار رشد پرگنه بیمارگر را در شرایط آزمایشگاه کاهش دادند و جدایه B۸۳ بالاترین تأثیر را دارا بود. فیدامن و روزال (۱۹۹۳) در مورد نحوهٔ بازداری از رشد پرگنه قارچ‌های رده *Basidiomycetes* و *Oomycetes* توسط جدایه‌های *B. subtilis* علاوه بر تولید آنتی‌بیوتیک مکانیسم دیگری را تحت عنوان ترکیبات فرار ضد قارچی مطرح ساختند و اعلام کردند که قدرت ساختن ترکیبات فرار ضد قارچی در جدایه‌های باکتریایی توسط گلوکز اداره می‌شود و چنین قندهایی بیان ژنی را که دارای خواص ضد قارچی است افزایش می‌دهند. با استفاده از روش کاستریک و آستریک (۱۹۸۳) مشخص گردید که هیچ یک از جدایه‌های B۱۲، B۲۳، B۸۰، B۸۳ و B۹۹ قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند، اگر چه آندرا و همکاران (۲۰۰۳)، توانستند از *Bacillus* spp. تولید سیانید هیدروژن کنند. سیدروفورها کلاته کننده‌های قوی آهن با وزن مولکولی کم بوده که تحت شرایط کمبود آهن تولید شده و تولید آن‌ها به عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی گزارش گردیده است. کلوپر و همکاران (۱۹۹۰) نشان دادند که باکتری *B. subtilis* سیدروفور ۲، ۳- دی هیدروکسی بنزوئیل گلایسین تولید می‌کند. در مورد متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار نیز تمام جدایه‌ها نسبت به شاهد روی بیمارگر تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر شدند. شریبر و همکاران (۱۹۸۸) بیان داشتند که بیشتر مواد ضد قارچی تولیدی توسط *B. subtilis* از قبیل مایکووسابتیلین، باسیلومایسین، ایتورین‌آ، مایکوباسیلین، فنجی‌مایسین، سابسپورین و فونجستاتین دارای ساختمان پلی‌پپتیدی می‌باشند. در مطالعهٔ تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست روی فاکتورهای رشدی، نتایج نشان داد که در شرایط خاک سترون جدایه‌های B۱۲، B۸۳ و B۲۳ قادر به افزایش وزن خشک کل لوبیا بودند. و جدایه B۲۳ نسبت به سایر جدایه‌ها و در حالت بکارگیری آن به روش محلول پاشی در خاک بیشترین افزایش را در وزن خشک نشان داد. لوپر و شروت (۱۹۸۶) نشان دادند که برخی جدایه‌های باکتریایی فراریشه با تولید هورمون‌های گیاهی از قبیل ایندول ۳- استیک اسید باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. کیلیان و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که *B. subtilis* با مکانیسم‌های گوناگونی چون رقابت بر سر غذا و مکان، کلنیزاسیون ریشه، تولید آنتی‌بیوتیک، ایجاد مقاومت القایی درگیاه میزبان و تولید ترکیباتی مشابه اکسین و سیتوکنین سبب افزایش جذب آب و مواد غذایی و تحمل به تنش‌های محیطی و در نهایت، باعث افزایش رشد گیاه می‌گردد.

در بررسی تأثیر جدایه‌های در حالت خاک غیرسترون بر روی درصد وقوع بیماری، چه در روش اضافه نمودن سوسپانسیون جدایه‌ها به خاک آلوده به قارچ بیمارگر و چه در روش آغشته‌سازی ریشه‌ها به جدایه‌های باکتریایی، در مقایسه با شاهد در پایین آوردن درصد وقوع بیماری موفق نبودند، جز استرین B۱۲ و B۸۳ که به میزان ۲۷ و ۳۳ درصد توانستند نسبت به شاهد آلوده در تقابل با بیمارگر، روی درصد وقوع بیماری موثر باشند. در بررسی تأثیر جدایه‌ها در حالت خاک غیرسترون بر روی شدت بیماری، هم در روش اضافه نمودن سوسپانسیون جدایه‌ها در خاک آلوده به قارچ بیمارگر و هم در روش آغشته‌سازی بذور به جدایه‌های باکتریایی میزان کاهش شدت بیماری صفر بوده به استثنای جدایه B۱۲ و B۸۳ که شدت بیماری را در روش آغشته‌سازی بذور به ترتیب ۲/۶۶ و ۳/۳ کاهش دهند و در روش اضافه نمودن سوسپانسیون جدایه‌ها تنها جدایه B۱۲ به نسبت ۳/۷ شدت بیماری را کاهش داد. کریمی در سال ۱۳۸۴ بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus* و

www.SID.ir

Archive of SID

Pseudomonas جدا شده از فریشه میخک روی پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarinm oxysporum* f.sp. *dianthi* بررسی کرد و توانست استرین‌هایی با توان آنتاگونیستی بالا و نتایج مشابه را بدست آورد. عقیقی و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که استرین‌های اکتینومیستی به خصوص *Streptomyces* sp. و باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas* spp. دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه تعداد زیادی از پاتوژن‌های خاکزی از جمله *Fusarium solani* می‌باشند. و نتایج مشابهی را بدست آوردند.

بررسی برای هر دو حالت خاک سترون و غیرسترون در شرایط کنترل شده نشان داد که توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی در شرایط خاک غیرسترون بر خلاف شرایط خاک سترون حفظ نشد و یا به مقدار کمی حفظ شد. بسیاری از ویژگی‌های باکتریایی در رقابت اکولوژیکی در فریشه دخیل‌اند و فقدان هر یک می‌تواند توانایی باکتری را در استقرار یا انجام وظیفه‌اش در مجاورت یا سطح ریشه، کاهش دهد. کاهش توانایی یک باکتری در رقابت، کاهش دوام و پایداری آن در طبیعت یکی از دلایل مهم در کاهش توان آنتاگونیستی به شمار می‌رود (ولر، ۱۹۸۸). بنابراین کلنیزاسیون ناقص ریشه و یا کلنیزاسیون با جمعیت اندک جدایه آنتاگونیست به خاطر عدم پیروزی در عرصه رقابت با سایر موجودات زنده معمول در فریشه نیز می‌تواند از دیگر دلایل کاهش توان آنتاگونیستی به حساب آید. نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف نیز حاکی از عدم یکنواختی و بی ثباتی در نتایج به دست آمده از اثرات آنتاگونیستی رایزوباکترها به ویژه در آزمون‌های گلخانه‌ای و صحرایی می‌باشد (ولر، ۱۹۸۸).

نتایج نشان داد که جدایه B۱۲ *B. subtilis* در تمامی شاخص‌های مورد مطالعه شامل کاهش شدت بیماری، کاهش درصد وقوع بیماری و افزایش وزن خشک کل در آزمون تیمار خاک و بذر بیشترین تاثیر را چه در حضور قارچ بیمارگر و چه هنگام عدم حضور آن داشته است. با توجه به تمامی نتایج و مطالب به نظر می‌رسد که دستکاری‌های ژنیتکی دقیق و کاملا بررسی شده از نظر عدم تولید عوامل خطرناک می‌تواند روشی باشد در راستای اصلاح کاستی‌ها و بهبود توانایی‌های عوامل بیوکنترلی جهت استفاده از آنها در شرایط طبیعی و همچنین بررسی و تهیه فرمولاسیون‌های مختلف سازگار با محیط، چشم انداز روشنی از کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی را در پیش روی ما قرار دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

اعتباریان، ح. ۱۳۷۶. بیمارهای سبزی و صیفی و روش‌های مبارزه با آنها. مرکز نشر دانشگاه تهران، ص ۳۹۷-۳۹۴.

کریمی، ا. ۱۳۸۴. بررسی فعالیت آنتاگونیستی استرین‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* جدا شده از فرا ریشه میخک روی پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarinm oxysporum* f.sp**.** *dianthi* پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا.

Aldrich, J. and Baker, R. 1970. Biological control of *Fusarium roseum* f.sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis.* Plant Disease Report, 54: 446-448.

Aghighi, S. G. H., Shahidi Bonjar, R., Rawashadeh, S., Batayneh, K. and Saadoun, I. 2004. First report of antifungal spectra of activity of Iranian *Actinomycetes* strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. Asian journal of plant sciences, 3: 463-471.

Andrea, M. A., Rosa L. R., Elineide B. S. and Julio C. P. M. 2003. Isolation, selection, and effect of *Bacillus* spp. in the protection of organism lettuce seedling. Horticultura Brasileria, 21: 699-703.

Baudoin, A. B. A. M., Hooper, G. K., Mather, B. E. and Carrol, R. B. 1988. Laboratory exercise in plant pathology and instructional. A. P. S. Press, 221 pp.

Booth, C. 1977. *Fusarium*, laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mcological Institute, Kew, Surrey, England, pp. 46-53.

Casteric, K. F. and Asteric, P. A. 1983. Method for rapid detection of cyanogonic of bacteria. Applied Environmental Microbiology, 54: 701-702.

Fiddaman, P. J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, 74: 119-126.

Hagedron, C., Gould, W. D. and Bardinelli, T. R. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied Environmental Microbiology, 55: 2743-2797.

Hennekens, A.1987. Epidemiology Medicine. Annual Review Phytopathology, pp. 54-98

Kaiser, W. J., Danesh, D., Okhavat, M. and Mossahebi, G. H. 1968. Disease of pules crops (edible lengumes) in Iran. Plant Disease Report, 52: 681-691.

Kilian, M. V., Steiner, B., Krebs, H., Junge, G., Schmiedeknecht, L. and Hain, R. 2002. FzB24 *Bacillus subtilis*. Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenchuts Nachrichten Bayer, pp. 72-79.

Kim, D. S., Weller, D. M. and Cook, R. J. 1997. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92 R_{12} and *Pseudomonas fluorescens* 2-70RN_{10} in the rhizosphere of wheat. Phytopathology, 87: 559-567.

Kloepper, J. W., Schippers, B. and Baker, P. A. H. M. 1990. Proposed elimination of the term endorhizosphere. Phytopathology, 82: 726-27.

Kraus, J. and Loper, J. E. 1990. Biocontrol of *pythium* Damping off of cucumber by *pseudomonas fluorenscens* pf-5: Mechanistic studies. In Keel, C., Kadler, B. and Defago, G. (Eds) plant growth promoting rizobacter. The second workshop on plant growth-promoting rhizobacteria .inter laken, Switzerland, pp. 172-175.

Loper, J. E. and Schroth, M. N. 1986. Influence of bacterial sources of indole 3- acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathology, 76: 386-389.

Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. and Defago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phytopathology, 82: 190-195.

www.SID.ir

Archive of SID

Purkayasta, R. P., Menon, U. and Chakraborty, B. N. 1981. *Rhizobium-Macrophomina* interaction affecting phytoalexin production and disease resistance of bean. Indian Journal of Experimental Biology, 19: 462-465.

Sangita, B. and Shah, A. K. 2000. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. Canadian Journal of Microbiology, 46: 125-132.

Schrieber, L. R., Gregry, G. F., Krause, C. R. and Jchida, J. M. 1988. Production, partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolates from *Ulmus americana*. Canadian Journal of Botany, 60: 2338-2346.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chum, W. 2001. Labratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3 Eds. A. P. S. Press, 373 pp.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. J. Biosci. and Bioengin, 89: 515-521.

Silia, A. and Gray, T. R. 1974. Growth of *Bacillus subtilis* and spore germination in soil observed by afluoresent-antibody technique. Journal of Genetics and Microbiology, 81: 191-98.

Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J. and Handeslman, J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Applied Environment of Microbiology, 60: 2023-2030.

Singh, V. and Deverall, B. J. 1956. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Transaction Britsh Mycology Sociaty, 83: 487-490.

Weller, D. M., 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407.

Yuen, G. Y., Sinclair, J. B ., Hartman, G. L. and Bertagnolli, B. L. 2002. Production of Iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia*. Soil biology and Biochemistry, 34: 955-963.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of antagonistic activity of *Bacillus* from bean rhizosphere against root rot caused by *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*

Akbari[1], A., Zafari[2], D., Rouhani, H.[3] and Khodakaramyan[4], Gh.

Abstract

Fusarium root rot of bean caused by *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* is an important disease of this crop worldwide. In this study, biological control of the disease was examined using rhizosphere bacteria. One hundered and twenty two bacterial isolates from bean rhizophere were evaluated by dual culture on PDA media on antagonistic activity against *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* five isolates showing higher antifungal activity were selected for further investigation. Based on the biochemical, physiological and morphological characteristics, isolates B99 and B23 were identified as *Bacillus cereus*, and isolates B12, B80 and B83 as *Bacillus subtilis*.The ability of bacteria to produce liquid and volatile antifungal compounds, siderophores, cellulase and poisonous compounds such as hydrogen cyanide were studied *in vitro*. Volatile compounds and extracellular liquid metabolits of all tested isolates affected the pathogen and decreased its colony growth rate compared to the control. In cellulase test all of the isolates but B12, B99 and B83 were able to produce cellulase. None of the isolates produced hydrogen cyanide. The effects of selected bacteria isolates on disease severity, percentage of disease incidence and plant growth indexes using sterilized and nonsterilized soils by two methods comprising soil treatment and seed dressing treatment with bacteria were studied *in vivo*. In this study the isolates B83 and B12 decreased the disease severity to the levels of 1.7 and 2.1 respectively. The isolates B12, B80 and B83 decreased the disease incidence percentage to 17, 37 and 21 percent respectively. The isolates B12, B83 and B23 increased bean dry weight in seed dressing treatment method in sterile soil to 5.9, 5.5 and 4.5 gram respectively.

Keywords: Biological control*, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Fusarium* root rot of bean

1. M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
3 . Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University
4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tehran University

www.SID.ir