Archive of SID

استفاده از باکتریهای اندوفیت گرم مثبت در کنترل بیولوژیک بیماری کپک سفید لوبیا ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum*

معصومه غلامی[۱]، رضا خاک‌ور[۲*] و غلامرضا نیکنام[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲*- **نویسنده مسوول**: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز (khakvar@tabrizu.ac.ir)

۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۹

چکیده

باکتری‌های اندوفیت یکی از مهمترین عوامل بالقوه در کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی و حفاظت گیاهان در برابر خسارات ناشی از آنها هستند. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی چند جدایه باکتری اندوفیت گرم مثبت جداشده از گیاهان خانواده بقولات (*Fabaceae*) علیه بیماری کپک سفید در لوبیا ناشی از قارچ *S. sclerotiorum* بود. در کل ۱۰۳ جدایه باکتریایی از ریشه، ساقه، برگ و غلاف گیاهان سالم تیره بقولات جدا شد و توان بازدارندگی آنها روی رشد میسلیومی قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاهی سنجیده شدند. براساس نتایج بدست آمده، هشت جدایه باکتری به طور معنی‌داری از رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* روی محیط PDA در روش کشت متقابل (Dual Culture) جلوگیری کردند. این هشت جدایه بر اساس آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و بررسی مولکولی ناحیه 16S rRNA به گونه‌های از جنس‌های *Bacillus* و *Streptomyces* بیشترین شباهت را داشتند. تیمار گیاهان در شرایط گلخانه‌ای با این باکتریها شدت بیماری کپک سفید را در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش دادند. این نتایج نشان داد که گونه های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق می‌توانند برای کنترل بیولوژیک بیماری کپک سفید به کار روند.

کلید واژه‌ها: آنتاگونیست، بقولات، درصد بازدارندگی، 16S rRNA، Bacillus، Streptomyces

مقدمه

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary از بیمارگرهای مهم گیاهی است که قادر به آلوده کردن بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی از جمله کلزا، خردل، یونجه، سویا، لوبیا، عدس، نخود، آفتابگردان، کاهو و گونه های گیاهی وحشی در تمام مراحل رشدی شامل گیاهچه های جوان، گیاهان بالغ و محصولات برداشت شده می‌باشد (آگریوس[۱]، ۲۰۰۵؛ بولند و هال[۲]، ۱۹۹۴؛ پوردی[۳]، ۱۹۷۹). این بیمارگر یک قارچ خاکزاد بوده که به صورت اسکلروت تا پنج سال در خاک دوام دارد (آدامز و آیرز[۴]، ۱۹۷۹). روش‌های معمول کنترل این بیماری به کاربرد قارچکش‌های شیمیایی محدود شده، اما کنترل بیولوژیکی یک روش دوستدار محیط زیست است. حضور باکتری‌های اندوفیت داخل بافت‌های گیاهان ممکن است نقش مهمی در توسعه و سلامت گیاهان داشته

1- Agrios

2- Boland & Hall

3- Purdy

4- Adams & Ayers

www.SID.ir

Archive of SID

باشند. چندین گزارش به نقش مهم باکتری‌های اندوفیت در حفاظت گیاهان علیه بیمارگرها و نیز تأثیر متابولیت های آنها روی بهبود رشد گیاهان اشاره داشته است (کولومیتس و همکاران[1]، ۱۹۹۷). اخیراً از میان باکتری های اندوفیت، باکتری‌های گرم مثبت به علت تولید ترکیبات ضد قارچی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند (الترابیلی و سیواسی‌تامپارام[2]، ۲۰۰۶). با توجه به نقش باکتری‌های اندوفیت در بهبود رشد و حفاظت گیاه علیه عوامل بیماریزا، هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت گرم مثبت با فعالیت آنتاگونیستی علیه بیماری کپک سفید لوبیا است.

مواد و روش‌ها

گیاهان میزبان استفاده شده در این آزمایش گیاهان سالم متعلق به خانواده بقولات (Fabaceae) شامل لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، یونجه (*Medicago sativa*)، نخود (*Cicer arietinum*) و عدس (*Lens esculenta*) بودند که از مزارع بقولات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در طول ماه‌های شهریور و مهر جمع‌آوری گردیدند.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت از بافت‌های گیاهان

ساقه‌ها و ریشه‌های گیاهان جمع‌آوری شده به قطعات با طول ۳-۲ سانتی‌متری تقسیم شدند و با فروبردن در اتانول ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۰/۳ درصد و اتانول ۹۶ درصد ضدعفونی گردیدند و به ظروف پتری حاوی محیط نشاسته کازئین آگار (نشاسته ۱۰ گرم، کازئین ۰/۳ گرم، نیترات پتاسیم (KNO_3) ۲ گرم،کلرید سدیم ۲ گرم، فسفات هیدروژن (H_2P0_4) ۲ گرم، سولفات منیزیم آبدار ۰/۰۵ گرم، $CaCo_3$ ۰/۰۲ گرم، سولفات آهن آبدار ۰/۰۱ گرم و آگار ۱۸ گرم در یک لیتر آب مقطر استریل) منتقل شدند (زین و همکاران[3] ۲۰۰۷؛ کوستر و ویلیامز[4]، ۱۹۵۶). تشتک ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۳ هفته نگهداری شدند و باکتری‌های اندوفیت پس از رشد جدا شده و روی محیط آگار مغذی (Nutrient agar) خالص شدند.

ارزیابی روش ضدعفونی سطح بافت‌های گیاهی

برای ارزیابی روش ضدعفونی سطح بافت‌های گیاهی، نمونه‌های ضدعفونی شده با فرو بردن در ۵ میلی لیتر آب استریل شسته شدند و به مدت یک دقیقه تکان داده شدند. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل روی محیط آگار مغذی قرار گرفت. تشتک‌ها تکان داده شده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شدند و برای رشد میکروبی بررسی شدند (شولز و همکاران[5]، ۱۹۹۳).

شناسایی جدایه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتریایی پس از خالص‌سازی به روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. بدین منظور، پس از استخراج DNA از جدایه‌های باکتریایی (سمبرو و راسل[6]، ۲۰۰۱)، واکنش PCR به روش اینترا و همکاران[7] (۲۰۱۱) انجام گردید. بدین منظور تکثیر ناحیه 16S rDNA ژنومی در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر و با استفاده از آغازگر پیشرو (Forward) (24f-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)، و آغازگر پس‌رو (Reverse) (1525rAAGGAGGTGATCCAGCCGC A)، و با برنامه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه با ۳۵ سیکل و سرانجام مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه

1- Kolomiets *et al.*
2- El-Tarabily & Sivasithamparam
3- Zin *et al.*
4- Kuster & Williams
5- Schulz *et al.*
6- Sambroo & Russell
7- Intra *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

انجام گردید. محصولات واکنش برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شدند. آنالیز توالی ناحیه 16S rDNA با برنامه BLAST انجام گرفت. برای اطمینان و تایید نتایج بدست آمده، هشت آزمایش استاندارد بیوشیمیایی شامل آزمون گرم (Gram)، آزمون OF، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، آزمون وی پی (Voges-Proskauer)، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تولید رنگدانه ملانین در محیط کشت انجام گردید.

بررسی‌های آزمایشگاهی فعالیت ضد قارچی

بازدارندگی از رشد قارچ *S. sclerotiorum* به وسیله جدایه‌های باکتریایی روی محیط PDA با استفاده از روش کشت متقابل انجام گرفت. یک برش پنج میلی متری از پرگنه‌ی هر کدام از باکتری‌ها در حاشیه تشتک-ها قرار گرفت و به مدت دو روز در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از دو روز یک برش پنج میلی‌متری از میسلیوم کشت تازه قارچ *S. sclerotiorum* در فاصله سه سانتی‌متری از برش باکتری‌ها قرار گرفت. رشد شعاعی بیمارگر در تشتک-های حاوی بیمارگر و باکتری و نیز در تشتک‌های شاهد (محتوی قارچ بیمارگر به تنهایی) پس از دو هفته نگهداری در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس با استفاده از فرمول $(R1 - R2)/R1 \times 100$ اندازه‌گیری شد. (R_1: رشد شعاعی بیمارگر در تشتک شاهد و R_2: رشد شعاعی بیمارگر در تشتک‌کشت متقابل بیمارگر و آنتاگونیست). (صدیقی و مون[1]، ۲۰۰۹). نتایج میانگین سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی بودند.

آزمایشات گلخانه‌ای

تهیه زادمایه قارچی

برای تهیه زادمایه قارچی ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به ۵۰ گرم بذر گندم در فلاسک ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شده و در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در دو روز متوالی ضدعفونی گردیدند. سپس در شرایط استریل ۳-۲ برش یک سانتیمتری از کشت تازه قارچ *S. sclerotiorum* به هر ارلن اضافه شد و در دمای ۲±۲۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ هفته نگهداری شدند. فلاسک‌ها مرتباً هر روز تکان داده شدند تا بذور گندم به طور یکنواخت توسط قارچ کلونیزه شود. بذور گندم استریل بدون تلقیح با قارچ به عنوان شاهد استفاده شد (الترابیلی و همکاران[2]، ۲۰۰۰).

تلقیح خاک با زاد مایه قارچی

زادمایه قارچی به نسبت ۵: ۵: ۹۰ درصد وزنی از گندمی که به وسیله قارچ کلونیزه شده بود، آرد ذرت استریل و ماسه استریل آماده گردید. در شاهد از گندم استریل بدون تلقیح با قارچ استفاده شد. سپس زادمایه تهیه شده به نسبت ۱۰ درصد وزنی با خاک گلدان‌ها مخلوط شد و گلدان‌ها قبل از کاشت بذور به مدت ۱۰ روز در شرایط گلخانه با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و هر دو روز یکبار آبیاری شدند تا خاک گلدان‌ها کاملاً توسط قارچ کلونیزه شود.

مایه‌زنی بذور با سوسپانسیون باکتری‌ها

باکتری‌ها در محیط مایع NB (Nutrient Broth) کشت داده شدند و داخل شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۲۰ دور قرار داده شدند تا غلظت اسپور به 10^8 CFU/ml برسد. غلظت اسپور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰nm اندازه‌گیری شد. بذور لوبیا با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد و سپس چها بار شستشو با آب مقطر استریل آلودگی‌زدایی شدند (شریفی و همکاران، ۱۳۸۷). به منظور افزایش چسبندگی باکتری‌ها به سطح بذور لوبیا، ابتدا بذور استریل در محلول ۱ درصد کربوکسی متیل سلولز استریل به مدت یک دقیقه فرو برده شدند و سپس به مدت پنج دقیقه در سوسپانسیون 10^8 CFU/ml هر کدام از جدایه‌های باکتریایی قرار گرفتند. بذور تیمار شده با باکتری‌ها روی کاغذ صافی استریل در زیرجریان

1- Siddiqui & Meon

2- El-Tarabily *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

هوای هود لامینار به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. بذور پس از خشک شدن، در گلدان‌هایی که قبلاً با قارچ *S. sclerotiorum* تلقیح شده بودند کشت شدند و در گلخانه با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. در کل ۱۸ تیمار به صورت زیر وجود داشت: یک شاهد منفی، یک شاهد مثبت به علاوه ۱۶ تیمار باکتریایی. اثر بیوکنترلی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ *S. sclerotiorum* بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار با نرم افزار SPSS آنالیز شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

ارزیابی اثر بیوکنترلی باکتری‌ها علیه *S. sclerotiorum* روی گیاهان لوبیا

به منظور تعیین حجم ریشه، وزن تر و نیز وزن خشک اندام‌های گیاهی، ۳۰ روز پس از مایه زنی بذور با سوسپانسیون باکتری‌ها، ابتدا گیاهان هر گلدان به آرامی از خاک گلدان‌ها برداشته شدند و خاک اطراف ریشه‌ها زیر جریان آرام آب شیر شسته شدند. ریشه‌ها پس از خشک شدن در حجم مشخصی از آب فرو برده شدند و سپس بیرون کشیده شدند. تفاوت حجم آب به عنوان حجم ریشه‌ها در نظر گرفته شد. گیاهان سپس از محل یقه بریده شدند و پس از اندازه‌گیری طول ریشه و اندام های هوایی، برگ‌ها از ساقه کنده شدند و ریشه‌ها، ساقه وبرگ‌های هر گیاه به صورت جداگانه به وسیله‌ی ترازو با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شدند. سپس برای تعیین وزن خشک، ریشه، ساقه و برگ‌های هر گیاه داخل کاغذ پوشیده شدند و داخل آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت سه روز قرار گرفتند. شدت بیماری برای آلودگی به وسیله *S. sclerotiorum* بر اساس مقیاس برادلی و همکاران[1]، ۲۰۰۶ به صورت زیر ارزیابی شد: (۰: بدون علائم، ۱: آلودگی شاخه‌های کوچک، ۲: آلودگی شاخه‌های اصلی، ۳: آلودگی ساقه تا حدود ۵۰ درصد از محیط آن، ۴: مرگ گیاه اما قسمتی از محصول قابل برداشت است، ۵: مرگ گیاه، محصول غیر قابل برداشت.

نتایج

موثر بودن روش سترون سازی سطح بافت‌های گیاهی

آزمایشات بررسی سترون سازی سطح بافت‌های گیاهی نشان داد که اغلب یا تمام میکروارگانیسم‌های اندوفیت در طول این تیمار حذف شدند. پس از سترون سازی سطح بافت‌ها هیچ گونه رشد میکروارگانیسمی روی محیط آگار مغذی پس از دو هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده نشد که نشان دهنده‌ی این است که باکتری‌های اپی‌فیت و ساپروفیت پس از ضدعفونی نمی‌توانند رشد کنند.

بازدارندگی از رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* به وسیله باکتری‌های اندوفیت

در جستجو برای باکتری‌های اندوفیت با فعالیت ضد قارچی، ۱۰۳ جدایه بررسی شد که از بین آنها هشت جدایه که فعالیت بازدارندگی بالاتری نشان دادند برای بررسی‌های بیشتر در گلخانه انتخاب شدند. براساس بررسی‌های آزمایشگاهی، بین جدایه‌ها برای بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ مذکور در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱).

شناسایی باکتری‌ها

آنالیز توالی ۱۶s rRNA نتایج حاصل از پی سی آر حاصل از جفت آغازگر 16s-1 /24f و /1525r 16s-2آشکار ساخت که از هشت جدایه باکتری مورد بررسی، چهار جدایه با ۹۹/۹ درصد شباهت به احتمال زیاد متعلق به جنس *Bacillus* و چهار جدایه دیگر احتمالاً متعلق به جنس *Streptomyces* هستند. آنالیز توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار MEGA5 و مقایسه آنها با توالی‌های جدایه‌های استاندارد در بانک جهانی ژن (NCBI) و بعد از رسم درخت فیلوژنیک نشان داد که جدایه‌های جداسازی شده

1- Bradley *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از گیاهان لوبیا و یونجه در برابر قارچ *S. sclrotiorum*

	میانگین مربعات	
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد بازدارندگی
تیمارها	۷	۶۷۱/۹۰*
خطا	۱۶	۲۴۴/۰۳
CV (%)	–	۲۳/۲۱

*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد.

از برگ یونجه و لوبیا و نیز غلاف لوبیا به احتمال زیاد مشابه گونه‌هایی از جنس باسیلوس (*Bacillus*) و استرپتومایسس (*Streptomyces*) می‌باشند. آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده صحت نتایج شناسایی مولکولی تا سطح جنس را تایید کردند (شکل ۱).

کنترل بیولوژیک بیماری کپک سفید در گیاهچه‌های لوبیا

در آزمایش‌های گلخانه‌ای، بالاترین درصد آلودگی در گیاهانی که فقط با قارچ *S. sclerotiorum* تیمار شده بودند رخ داد. بذور تیمار شده با *B. subtilis* subsp. *spizizenii*، *B. subtilis* subsp. *subtilis* و *B. tequilensis* با ۸۴/۷۵ درصد بازدارندگی از رشد بیماری، بهترین حفاظت را علیه *S. sclerotiorum* در گیاهان لوبیا نشان دادند. حداقل کاهش در شدت بیماری در تیمار بذور با *S. parvus* مشاهده گردید. هیچ اختلاف معنی‌داری بین دیگر جدایه ها شامل *Bacillus atrophaeus*، *S. acrimycini*، *S. flavofuscus* و *S. cyaneofuscatus* در کاهش شدت بیماری وجود نداشت (جدول ۲). تمامی جدایه‌ها به طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) باعث افزایش طول ریشه و شاخه، وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ در مقایسه با شاهد بیمار گردیدند (جدول ۳) (شکل ۲).

مقایسه تیمارهای باکتری‌های آنتاگونیست با شاهد سالم

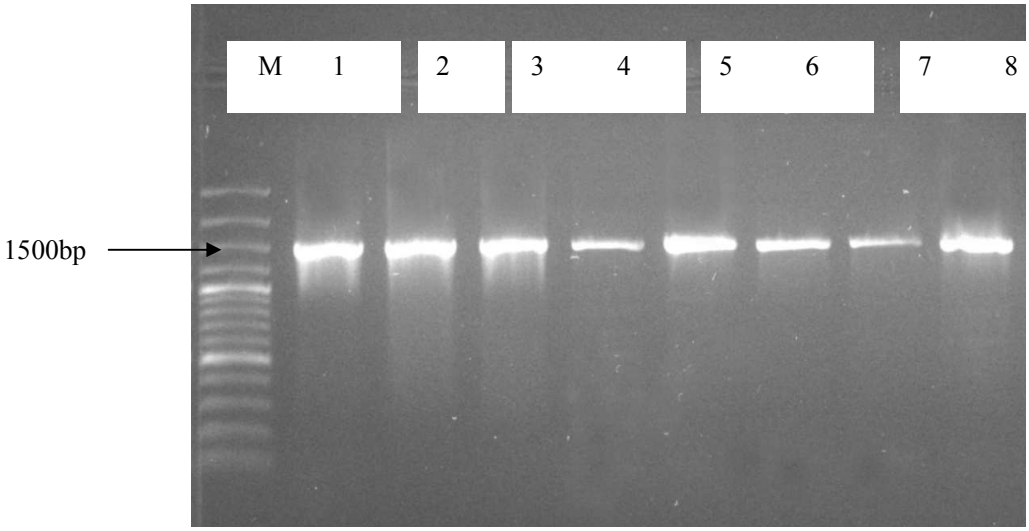
به منظور بررسی غیر بیماریزایی بودن باکتری‌های اندوفیت، بذور لوبیا با سوسپانسیون 10^8 جدایه‌های باکتریایی تیمار شدند و صفات رشدی گیاه در این گیاهان که فقط با باکتری‌های اندوفیت تیمار شده بودند با گیاهان سالم آنالیز شده و مقایسه گردیدند. هیچ علائم بیماریزایی روی گیاهان تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت مشاهده نشد. صفات رشدی گیاه پس از یک ماه نیز اندازه گیری گردید. جدول ۴ تجزیه واریانس صفات مختلف طول ریشه، طول شاخه، وزن تر و خشک ریشه، شاخه و برگ و نیز حجم ریشه را بین تیمارهای مختلف باکتری و شاهد سالم را نشان می‌دهند. نتایج به دست آمده در مورد فاکتورهای رشدی گیاهان لوبیا، تفاوت معنی‌داری در این صفات در سطح احتمال ۵ درصد نشان نداد که مؤید این مطلب است که این باکتری‌ها تأثیر سویی بر روی رشد گیاهان نداشته و فاقد اثرات بیماریزایی بوده‌اند (جدول ۴).

بحث

در این تحقیق سعی شد که باکتری‌های گرم مثبت اندوفیت مؤثر از گیاهان سالم تیره بقولات جداسازی شده و علیه قارچ *S. sclerotiorum* بکار گرفته شوند. مجموعاً ۱۰۳ جدایه باکتری اندوفیت از اندام‌های مختلف ریشه، ساقه، برگ و غلاف گیاهان سالم عدس، نخود، لوبیا و یونجه جداسازی گردید و برای بررسی اثر آنتاگونیستی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- الکتروفرز در ژل آگارز ۱٪ قطعات دی ان ای افزایش یافته در پی سی آر با آغازگرهای 16s- 1 /24f و 16s- 2 /1525r روی استرین‌های باکتریایی جدا شده از گیاهان لوبیا و یونجه، چاهک M- مقدار 2µg از 1Kb DNA Ladder. چاهک‌های یک، پنج، شش وهفت مربوط به جدایه های جنس *Bacillus* و چاهک دو، سه ، چهار و هشت مربوط جدایه های جنس *Streptomyces*.

شکل ۲- تیمار گیاهان لوبیا با قارچ *S. sclerotiorum* و باکتری‌های جنس *Streptomyces* (گلدان اول تا چهارم)، شاهد سالم و شاهد بیمار (از چپ به راست)

علیه قارچ *S. sclerotiorum* در سطح آزمایشگاه بررسی شدند که توانایی آنتاگونیستی هشت جدایه از این باکتری‌ها (چهار جدایه متعلق به جنس *Streptomyces* و چهار جدایه متعلق به جنس *Bacillus*) علیه این قارچ با استفاده از روش کشت متقابل به وسیله ایجاد هاله بازدارندگی به اثبات رسید (شکل ۳). سنجش فعالیت آنتاگونیستی این هشت جدایه در سطح آزمایشگاه آشکار کرد که این جدایه‌ها توانستند از رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* به طور قابل توجهی جلوگیری کنند و دامنه کنترلی بین ۸۸/۵۶- ۴۵/۶۰ درصد ارائه دادند. وجود هاله شفاف در آزمون های کشت متقابل جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگرها

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *S. sclrotiorum*، درصد کاهش شدت بیماری و شاخص شدت بیماری کپک سفید لوبیا در تیمار جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از گیاهان لوبیا و یونجه

جدایه باکتری	درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی	شاخص شدت بیماری	درصد کاهش شدت بیماری
Bacillus sp.1	۷۲/۳۷ ^{abc}	۰/۶۶ ^{a}	۸۴/۷۵
Bacillus sp.2	۷۰/۴۷ ^{abc}	۲/۳۳ ^{bc}	۴۶/۱۸
Bacillus sp.3	۸۴/۷۵ ^{ab}	۰/۶۶ ^{a}	۸۴/۷۵
Bacillus sp.4	۸۸/۵۶ ^{a}	۰/۶۶ ^{a}	۸۴/۷۵
Streptomyces sp.1	۶۵/۷۱ ^{abc}	۲ ^{b}	۵۳/۸۱
Streptomyces sp.2	۵۲/۳۷ ^{c}	۲/۳۳ ^{bc}	۴۶/۱۸
Streptomyces sp.3	۴۵/۶۰ ^{c}	۲/۳۳ ^{bc}	۴۶/۱۸
Streptomyces sp.4	۵۸/۴۰ ^{bc}	۳ ^{c}	۳۰/۷۱
شاهد بیمار	–	۴/۳۳ ^{d}	–

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی بین جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از گیاهان لوبیا و یونجه و قارچ *S. sclerotiorum*

	میانگین مربعات صفات							
منابع تغییرات	طول ریشه	طول شاخه	وزن تر ریشه	وزن تر شاخه	وزن تر برگ	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	وزن خشک برگ	حجم ریشه
تیمار	۴۷/۰۳**	۱۴۱/۴۴**	۱۱/۸۲**	۰/۵۵**	۲/۶۹**	۷/۰۳**	۰/۰۰۸**	۰/۰۵**	۲/۶۸**
خطا	۸/۰۲	۱۲/۷۱	۰/۴۵	۰/۱۳	۰/۶۰	۰/۹۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۷	۰/۴۴
CV (%)	۲۳/۹۴	۱۶/۵۲	۱۲/۵۱	۳۵/۶۹	۴۱/۶۴	۲۵/۹	۳۱/۹۴	۲۸/۸۵	۳۹/۹۵

** معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد

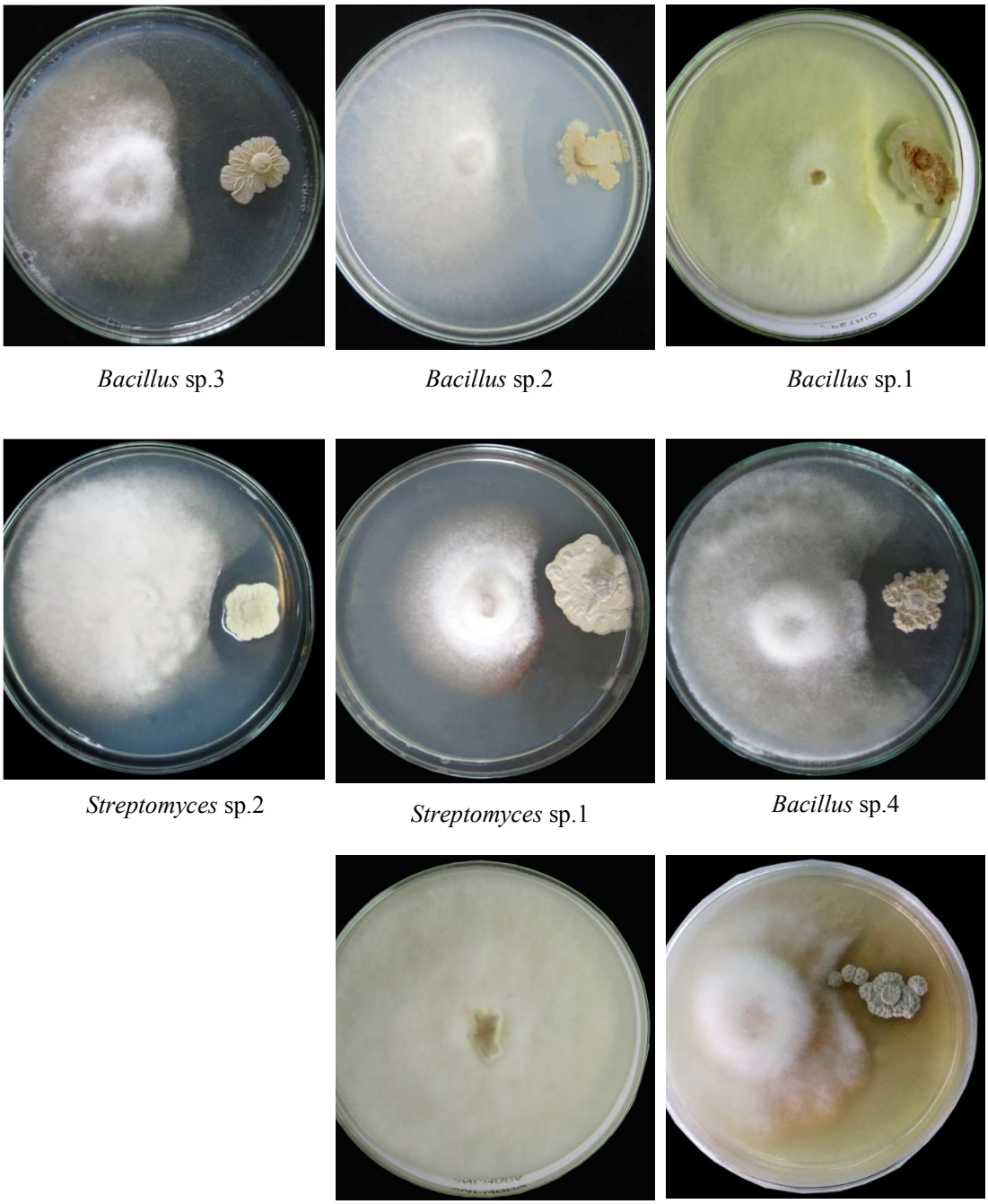
جدول٤- تجزیه واریانس صفات مورد اندازه گیری در گیاهان لوبیا با جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از گیاهان لوبیا و یونجه علیه قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه

	میانگین مربعات صفات							
منابع تغییرات	طول ریشه	طول شاخه	وزن تر ریشه	وزن تر شاخه	وزن تر برگ	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	وزن خشک برگ	حجم ریشه
تیمار	۴/۲۵^{ns}	۴۷/۰۵ ^{ns}	۰/۲۱^{ns}	۰/۱۱^{ns}	۱/۸۲^{ns}	۰/۰۰۸^{ns}	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۰۱^{ns}	۰/۷۱^{ns}
خطا	۸/۳۷	۲۰/۸۶	۰/۱۰	۰/۱۶	۱/۹۴	۰/۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۲	۱/۰۵
CV (%)	۱۸/۰۲	۱۷/۹۵	۳۰/۹	۲۶/۰۹	۳۷/۴۷	۳۹/۱۱	۳۱/۵۲	۳۴/۵۷	۳۷/۹۵

^{ns}: عدم معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID



Bacillus sp.1 *Bacillus* sp.2 *Bacillus* sp.3

Bacillus sp.4 *Streptomyces* sp.1 *Streptomyces* sp.2

Streptomyces sp.3 شاهد

شکل۳- کشت متقابل قارچ *S. sclerotiorum* با جدایه‌های مختلف باکتریایی جدا شده از گیاهان لوبیا و یونجه

www.SID.ir

Archive of SID

حاکی از بازدارندگی از رشد قارچ‌ها به وسیله باکتری های اندوفیت از طریق مکانیزم آنتی‌بیوز می‌باشد (اندریاتی و فرانکو[1]، ۲۰۰۸؛ عبداله و همکاران[2]، ۲۰۰۸) و از مهمترین ترکیبات دخیل در آنتی‌بیوز، آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها هستند (هاس و دفاگو[3]، ۲۰۰۵)که با اثر بر روی میسلیوم قارچی باعث تخریب دیواره سلولی قارچ می‌شوند.

توانایی ایجاد هاله بازدارندگی به علت نشت محتویات سلول قارچی و انهدام هیف‌ها در تشتک‌های حاوی جدایه های آنتاگونیست و بیمارگرها احتمالاً نشان دهنده این است که جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی ما توانایی تولید آنزیم‌هایی مانند کیتیناز یا گلوکاناز را داشته‌اند (وایدیاستوتی[4]، ۲۰۰۳). هی و همکاران[5] (۲۰۰۹) فعالیت‌های ضد قارچی گونه‌های *Bacillus subtilis* را با پپتیدهای با وزن مولکولی پایین که اغلب شامل لیپوپپتیدهای حلقوی فنجی‌سین *B* و *A* بود، در ارتباط دانستند. سه جدایه اندوفیت *S. fulvoviolaceus*، *S. caelestis* و *S. coelicolor* که از گیاهان تیره‌های مختلف توسط زین و همکاران (۲۰۰۷) جدا شده بودند در روش کشت متقابل روی محیط *SCA* که به مدت ۱۴-۱۰ روز به قطر ۲ سانتیمتر رشد کرده بودند، فعالیت کشندگی علیه قارچ *S. sclerotiorum* نشان دادند. فیلترای کشت این باکتری‌ها نیز باعث کنترل این قارچ به میزان ۸۵-۶۰ درصد شدند. در تحقیق حاضر جدایه *Streptomyces sp.1* به میزان ۶۵/۷۱ درصد و سایر جدایه های *Streptomyces* نیز بین ۵۸/۴۰-۴۵/۶۰ درصد توانستند از رشد میسلیومی قارچ جلوگیری نمایند. اما هیچ کدام از جدایه‌های *Streptomyces* ما اثر کشندگی کامل روی این قارچ نشان ندادند و از علت‌های این امر می‌توان به تفاوت در زمان تیمار جدایه‌ی قارچی روی محیط کشت پس از کشت جدایه‌های باکتری (در آزمایش ما ۴۸ ساعت پس از کشت باکتری‌ها) اشاره کرد.

اما کاهش شدت بیماری در جدایه‌های *Streptomyces* sp.1، *Streptomyces* sp.2، *Streptomyces* sp.3 و *Bacillus* sp.2 و نیز *Streptomyces* sp.4 نسبت به جدایه‌های *Bacillus* sp.1 و *Bacillus* sp.3 و *Bacillus* sp.4 کمتر بود. باکتری‌های اندوفیت با فعالیت تحریک مقاومت القایی (ISR) می‌توانند علیه دامنه وسیعی از بیمارگرها مؤثر باشند (روپاک و کلوپر[6]، ۱۹۹۸؛ هامراشمیت و کوک[7]، ۱۹۹۵). فایده اصلی این باکتریها القاء مقاومت سیستمیک در گیاهان است که یک مکانیسم دفاعی طبیعی گیاهان است که برای دوره‌های طولانی مدت حتی زمانیکه جمعیت باکتری‌های القاء کننده زوال می‌یابد، مؤثر و کار آمد است (وان لون و همکاران[8]، ۱۹۹۸).

نتایج آزمایشات انجام شده در این تحقیق برای بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها علیه قارچ *S. sclerotiorum* با نتایج محققین دیگر همخوانی داشت. البته قابل ذکر است که تاکنون هیچکدام از باکتری‌های اندوفیتی مورد استفاده در این آزمایش توسط محققین دیگر برای کنترل قارچ *S. Sclerotiorum* مورد استفاده قرار نگرفته‌اند و نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج حاصل از بکارگیری گونه های متفاوت خاکزی و اندوفیتی دو جنس *Bacillus* و *Streptomyces* مقایسه شد. عبداله و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر آنتاگونیستی *B. amyloliquefaciens* (جداسازی شده از خاک و گیاهان مرده بادمجان)، روی قارچ *S. sclerotiorum*، بیش از ۸۰ درصد کنترل بیماری در گیاهچه های گوجه‌فرنگی، کدو و بادمجان در آزمایشات گلخانه‌ای به دست آوردند. فرناندو و همکاران[9] (۲۰۰۷) نیز با استفاده از باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* که به صورت اندوفیت از برگ گیاهان کلزا جدا کرده بودند کاهش شدت بیماری برابر ۹۵-۹۲/۵ درصد به دست آوردند که نتایج حاصل از کاربرد جدایه‌های *Bacillus* در این

1- Inderiati & Franco
2- Abdullah *et al*.
3- Haas & Defago
4- Widyastuti
5- He *et al*

6- Raupach & Kloepper
7- Hammerschmidt & Kuc
8- Van Loon *et al.*
9- Fernando *et al.*

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیق با نتایج این محققین مطابقت داشت. الترابیلی و همکاران، ۲۰۱۰ اثر باکتری‌های *S. viridodiasticus* و *Micromonospora carbonacea* را بر روی بیماری از پا افتادگی کاهو ناشی از *Sclerotinia minor* بررسی کردند. *S. viridodiasticus* باعث کاهش بیماری به میزان ۴۶/۶۰ درصد و *M. carbonacea* باعث کاهش بیماری به میزان۵۳/۳ درصد در مقایسه با شاهد (با ۱۰۰ درصد بیماری) شدند. جدایه‌های *Streptomyces* در این آزمایش غیر از *Streptomyces* sp.4 با کاهش شدت بیماری برابر ۳۰/۷۱ درصد که قدرت آنتاگونیستی کمتری علیه این قارچ نشان داد نیز بازدارندگی مشابه با جدایه‌های مورد آزمایش الترابیلی و همکاران نشان دادند.

منابع

۱. شریفی، ر. احمدزاده، م. شریفی تهرانی، ع و فلاح زاده، و. ۱۳۸۷. نقش رقابت برای جذب آهن توسط سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل *Rhizoctonia solani* (Kuhn) عامل مرگ گیاهچه لوبیا. مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۲ (۲): ۱۹۵-۱۸۳.

2. Abdullah, M.T., Ali, N.Y., and Suleman, P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 27: 1354-1359.

3. Adams, P.B., and Ayers, W.A. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 896-899.

4. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology, 5th ed. Academic Press, 6,635pp.

5. Boland, G.J., and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal Plant Pathology, 16: 93-100.

6. Bradley, C. A., Henson, R. A., Porter, P. M., LeGare, D. G., Del Rio, L. E. and Khot, S. D. 2006. Response of canola cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled and field environments. Plant Disease, 90: 215–219.

7. El-Tarabily, K. A., Hardy, G. E. St. J., and Sivasithamparam. K. 2010. Performance of three endophytic *Actinomycetes* in relation to plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber under commercial field production conditions in the United Arab Emirates. European Journal of Plant Pathology, 128: 527–539.

8. El-Tarabily, K.A., and Sivasithamparam, K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biology Biochemistry, 38: 1505–1520.

9. El-Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasthamparam, K., McKenna, F., and Hardy, G.E.J. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and Actinomycetes. Plant Pathology, 49: 573-583.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Fernando, W. G. D., Nakkeeran. S., Zhang. Y., and Savchuk, S. 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* specieson canola petals. Crop protection, 26: 100-107.

11. Hammerschmidt, R., and Kuc, J. 1995. Induced resistance to disease in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordsecht, The Netherlands, p. 182.

12. Haas, D., and Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Review of Microbiology 3: 307-319.

13. He, R.L., Wang, G.P., Liu, X.H., Zhang, C.L., and Lin, F.C. 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. African Journal of Biotechnology, 8: 191-195.

14. Inderiati, S., and Franco, C.M.M. 2008. Isolation and identification of endophytic *Actinomycetes* and their antifungal activity. Journal of Biotechnology Research in Tropical Region, 1: 1-6.

15. Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y., and Panbangred, W. 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. Bio Med Central, 4: 98.

16. Kolomiets, E.I., Zdor, N.A., Romanovskaya, T.V., and Lobanok, A.G. 1997. Certain aspects of the phytoprotective activity of *Streptomyces flavescens* an antagonist of phytopathogenic fungi. Applied Biochemistry and Microbiology, 33: 451-454.

17. Kuster, E., and Williams, S.T. 1956. Selection of media for isolation of *streptomycetes*. Nature, 202: 928-929.

18. Purdy, L. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomology, host range, geographic distribution and impact. Phytopathology, 69: 875-880.

19. Raupach, G. S., and Kloepper, J. W. 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biocontrol of multiple cucumber pathogens. Phytopathology, 88, 1158–1164.

20. Sambroo, K.J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 502- 510.

21. Schulz, B., Wanke, U., and Draeger, S. 1993. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization method, Mycological Research 97: 1447–1450

22. Siddiqui, Y., and Meon, S. 2009. Effect of seed bacterization on plant growth response and induction of disease resistance in chili. Agricultural Sciences in China, 8: 963-971.

23. Van Loon, L. C., Baker, P. A. H. M., and Pieterse, M. J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36, 453–483.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Widyastuti, S. M. 2003. Biological control of *Sclerotium rolfsii* damping off of Tropical Pine (*Pinus merkusii*) with three isolates of *Trichoderma* spp. Journal Biological Science, 3: 95-102.

25. Zin, N. M., Sarmin, N. I. M., Ghadin, N., Basri, D. F., Sidik, N. M., Hess, W. M., and Strobel, G. A. 2007. Bioactive endophytic *streptomycetes* from the Malay Peninsula. FEMS Microbiology Letters, 247: 83-88.

www.SID.ir