

بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی *Bacillus spp.* در کنترل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در اثر *P. aphanidermatum* و *Pythium ultimum*

فاطمه صفری اصل^{۱*} - حمید روحانی^۲ - ماهرخ فلاحتی رستگار^۳ - وحید جهانبخش^۴

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۹

چکیده

تعداد ۲۷۰ استرین باکتری از خاک ریزوسفر خیار در مزارع شهرستان تنکابن (استان مازندران) خالص‌سازی گردید. قابلیت آنتاگونیستی استرین‌های باکتری در مقابل دو گونه *Pythium ultimum* و *P. aphanidermatum* به روش کشت متقابل مورد ارزیابی قرار گرفت. ۱۳ جدایه که هاله بازدارندگی بیش از ۱۰ میلی‌متر ایجاد کردند به عنوان استرین برتر برای مطالعات بیشتر انتخاب شد. بررسی‌های مرفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و نقوش پروتئینی استرین‌های برتر نشان داد که این استرین‌ها متعلق به ۴ گونه *B. subtilis* (B2, B3, B4, B5, B6, B7) و *B. marinus* (B1) و *B. circulans* (B10, B12)، *B. licheniformis* (B8 و B9) بوده و استرین B11 به عنوان *Bacillus sp.* شناسائی گردید. مکانیسم آنتاگونیستی استرین‌ها از نظر تاثیر ترشحات مایع، ترکیبات فرار، آنزیم‌های سلول‌لاز، پروتئاز و آنتی‌بیوتیک سورفکتین روی رشد پیتئوم‌های ذکر شده در شرایط in-vitro مورد بررسی قرار گرفت. از این نظر استرین‌ها رفتاری بسیار متفاوت نشان دادند. فعال‌ترین آنها از نظر ترشحات مایع و ترکیبات فرار به ترتیب استرین‌های B12, B11, B7, B3 و B9, B8, B6, B5 بودند که ۱۰۰ درصد از رشد کلنی *P. ultimum* جلوگیری کردند. در حالیکه استرین‌های B14 (ترشحات مایع) و B11 (ترکیبات فرار) تنها توانستند ۱۳/۷ و ۴/۴۴ درصد رشد کلنی *P. ultimum* را کاهش دهند. بررسی‌های گلخانه‌ای روی قابلیت بیوکنترلی استرین‌ها نشان داد که تمامی آنها قادر به کاهش پوسیدگی‌های ناشی از دو گونه پیتئوم روی گیاهچه خیار می‌باشند. موثرترین آنها استرین‌های B7, B8, B13 و B14 بودند که توانستند بیماری ناشی از هر دو گونه پیتئوم را بطور توأم بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد کنترل کنند. از نظر اثر رشدی استرین‌ها روی گیاه مشخص شد که استرین B7 روی رقم سوپر دومینوس و استرین B13 روی رقم نتوت‌فرانسه به ترتیب با ایجاد ۸۵/۶ و ۴۴/۴ درصد افزایش وزن تر گیاهچه‌ها نسبت به شاهد بهتر از دیگر استرین‌ها می‌باشند. بررسی همبستگی بدست آمده بین شاخص‌های مربوط به مکانیسم‌های آنتاگونیستی استرین‌ها در شرایط آزمایشگاه و قابلیت بیوکنترلی آنها در شرایط گلخانه نشان داد که همبستگی قابل قبولی بین شاخص مربوط به اثر ترشحات مایع استرین‌ها روی بازدارندگی از رشد میسلیمی دو گونه پیتئوم در شرایط in-vitro و قابلیت بیوکنترلی آنها در شرایط گلخانه وجود دارد. این همبستگی برای *P. ultimum* و *P. aphanidermatum* به ترتیب $r^{ns} = -0.45$ و $r^{**} = -0.67$ تعیین گردید. در حالیکه همبستگی بالا و معنی‌داری به ترتیب $r^{**} = -0.93$ و $r^{**} = -0.79$ (در مورد دو گونه ذکر شده) بین اثر رشدی استرین‌ها روی گیاهچه و شاخص پوسیدگی ریشه آنها در شرایط گلخانه مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ریشه و طوقه خیار، *Bacillus*، *P. ultimum*، *Pythium aphanidermatum*، آنتاگونیست

مقدمه

می‌باشد، که به ترتیب در مناطق نسبتاً خنک و گرم خسارت بیشتری وارد می‌کنند (۲۲). این دو گونه علاوه بر مرگ سریع گیاهچه، باعث پوسیدگی ریشه و طوقه نیز می‌گردند. در سال‌های اخیر توجه محققان به استفاده از روش‌های غیرشیمیایی، به ویژه روش‌های بیولوژیکی، معطوف شده است. مکانیسم‌های متعددی در قابلیت بیوکنترلی آنتاگونیست‌ها از جمله باکتری‌ها دخالت دارند، از جمله می‌توان به تولید ترکیبات ضد قارچی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، سیدروفورها، سیانیدیدروژن، اتیلن و همچنین ترکیبات رشدی (فیتوهورمون‌ها)

پوسیدگی ریشه و طوقه از بیماری‌های رایج جالیز است که دارای گسترش جهانی است. عوامل اصلی این بیماری در ایران گونه‌های *Pythium ultimum* و *P. aphanidermatum*

۳، ۲، ۱ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*)- نویسنده مسئول: (Email: f.safaria1@gmail.com)

۸). قسمت قابل توجهی از این مطالعات نیز به کنترل عوامل پیتومی اختصاص داشته است (۲۷).

هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی باسیلوس‌های ریزوسفر خیار و همچنین مطالعه مکانیسم‌های آنتاگونیستی آنها به منظور انتخاب استرین مناسب برای کنترل بیولوژیکی پوسیدگی پیتیومی ریشه و طوقه خیار و همچنین بررسی همبستگی بین شاخص‌های آنتاگونیستی استرین‌ها در آزمایشگاه و قابلیت بیوکنترلی آنها در شرایط گلخانه بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ‌های بیماریزا

قارچ‌های بیماریزای عامل مرگ گیاهچه خیار (*ultimum* (Pu) *Pythium* و *P. aphanidermatum* (Pa) از بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت، و بیماریزایی آن‌ها روی گیاهچه خیار اثبات شد.

جداسازی باسیلوس‌ها از خاک

نمونه‌هایی از گیاه و خاک اطراف ریشه آن از مزارع خیار شهرستان تنکابن واقع در استان مازندران گردآوری شد، به منظور خالص سازی جنس باسیلوس به روش شاد و همکاران (۲۶) ۱ گرم خاک ریزوسفر در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون درآورده شد و پس از عبور از کاغذ صافی، ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دما °C ۸۰ قرار داده شد، پس از تهیه سری رقت‌ها، به صورت جاری روی محیط NA در دمای °C ۲۸-۳۰ کشت و پس از تک کلنی کردن، در آب مقطر استریل در دما °C ۴ نگهداری گردید.

انتخاب استرین‌های برتر باکتری‌های آنتاگونیست وابسته

به جنس *Bacillus*

قابلیت آنتاگونیستی تمامی ۲۷۰ استرین به دست آمده به روش تست نقطه‌ای روی مخلوط ۵۰/۵۰ محیط کشت PDA و NA در مقابل دو گونه Pa و Pu مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳). برای این منظور هر استرین به صورت ۴ نقطه در مقابل یکدیگر و به فاصله ۱ سانتیمتر از حاشیه لبه تشتک‌پتری کشت داده شد، سپس ۵ روز در دما °C ۳۰-۲۸ قرار داده شدند تا فرصت کافی جهت رشد باکتری و تولید و نفوذ متابولیت‌های آن در محیط فراهم گردد. سپس دیسکی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت سه روزه دو گونه پیتوم (به صورت جداگانه) در مرکز هر تشتک‌پتری قرار داده شد و تا پرشدن تشتک شاهد (تلقیح با آب مقطر استریل بجای باکتری) بوسيله قارچ پیتوم، در °C ۲۵ نگهداری شد. فاصله موجود بین کلنی باکتری و قارچ (شعاع هاله

اشاره کرد. این ترکیبات در حقیقت متابولیت‌هایی به شمار می‌روند که به صورت ترشحات مایع خارج سلولی و یا ترکیبات فرار وارد محیط اطرف باکتری می‌شوند (۱۲ و ۲۱). تحقیقات زیادی در مورد ماهیت این متابولیت‌ها در استرین‌های *Bacillus* صورت گرفته است از جمله مهمترین آنها به آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل توکسی‌مایسین، مایکوسوبتیلین، ایتورین آ، دی و ای (۱۴ و ۱۵)، فونجیستاتین، سابسپورین، باسیلوپتین آ، ب و ث، باسیتراسین (۷)، کلروتائین، رایزوکتیسین، باسیلیسین، فنجی‌مایسین، مایکوباسیلین و سرکولین (۸) اشاره کرد که توسط محققین شناسایی و خالص‌سازی شده‌اند. تولید لیپوپپتیدهای حلقوی آنتی‌بیوتیکی وابسته به خانواده ایتورین، فنجی-مایسین و سورفکتین از دیگر ترکیباتی می‌باشند که نقش مهمی در قابلیت بیوکنترلی باسیلوس‌ها ایفا می‌کنند (۷، ۱۴ و ۱۵). آنتی‌بیوتیک سورفکتین (سورفکتانت) کشش سطحی سلول باکتری را کاهش داده و امکان چسبیدن آن به سطح میسلوم را فراهم می‌نماید (۶) از اینرو نقش کلیدی در افزایش قابلیت بیوکنترلی باسیلوس‌ها دارد زیرا باعث تثبیت باکتری و ایجاد بیوفیلم در سطح هیف‌های قارچ و همچنین ریشه می‌شود، در نتیجه ترکیبات ضد قارچی بدون واسطه و قبل از اینکه جذب کلونیدهای خاک گردند و یا اینکه تحت تاثیر شرایط خاک تجزیه شوند روی قارچ تاثیر می‌گذارند (۴).

تولید آنزیم‌های متعدد بخصوص بتا ۱-۶ گلوکاناز، کیتیناز، سلولاز و پروتاز که در متابولیت‌های باسیلوس‌ها ردیابی شده‌اند نقش مهمی در تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها بعهده دارند (۸) و جزء مکانیسم‌های مهم بیوکنترلی آنها به شمار می‌رود (۱۲). ترکیبات فرار متعددی نیز مثل الکل‌ها (ایزوامیل الکل)، آلدئیدها، کتون‌ها و استرها در گونه‌های مختلف باسیلوس گزارش شده‌اند و اثرات آنتی‌بیوتیکی و ضد قارچی آنها به اثبات رسیده است (۱۲).

باکتری‌های وابسته به جنس *Bacillus* جزء گروه باکتری‌های تحریک کننده رشد گیاهی (PGPR) محسوب می‌شوند و قادرند از طریق ترشح بعضی فیتوهورمون‌ها مانند اسیداندول‌استیک، اسید ژیریلیک، اکسین و سیتوکینین رشد گیاه را افزایش دهند این ترکیبات باعث می‌شوند که ریشه‌های آسیب دیده توسط عوامل بیماریزا هر چه سریعتر توسط ریشه‌های جدید جایگزین شوند و به این ترتیب از خسارت بیماری کاسته شود (۱۴، ۱۵ و ۲۵)، همچنین قادرند سیستم دفاعی گیاه را از طریق القاء و یا تحریک مقاومت افزایش داده و باعث شوند گیاه بطور طبیعی در مقابل عوامل بیماریزا مقاومت نماید (۸). در این گونه موارد غلظت بعضی آنزیم‌ها مانند بتا ۱-۳ گلوکاناز، پراکسیداز، ترکیبات فنلی و فراورده‌های اکسیده شده آنها در گیاه افزایش یافته و باعث جلوگیری از پیشرفت بیماری در گیاه می‌شوند (۱۴). غالب مطالعات آنتاگونیستی در مورد باسیلوس‌ها در ارتباط با *B. subtilis* و چند گونه دیگر مثل *B. cereus*، *B. pumilus*، *B. circulans* و *B. licheniformis polymyxa* بوده است

تیمار) -۱ = درصد کاهش رشد کلنی نسبت به شاهد

اثر ضد قارچی ترکیبات فرار

این آزمون مطابق روش فیدامن و روزال (۱۱) انجام شد. هریک از ۱۴ استرین به صورت جاروئی روی محیط کشت NA کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت در دمای 30°C -۲۸ سرپوش تشتک‌پتری‌ها حذف و بجای هر کدام قسمت پائینی یک تشتک‌پتری دیگر حاوی PDA که به وسیله هر یک از گونه‌های پیتئوم در همان موقع کشت شده بود قرار داده شد. شکاف بین دو قسمت تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلیم کاملاً پوشانیده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای 25°C طوری قرار داده شدند که باکتری در زیر و قارچ در بالا قرار گیرد. درصد کاهش رشد کلنی قارچ‌ها نسبت به شاهد که فاقد باکتری بود به عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضد قارچی ترکیبات فرار استرین‌های باکتری مورد استفاده قرار گرفت. تعیین درصد همانند آزمایش قبلی عمل شد.

تولید پروتئاز

با توجه به نقش پروتئاز به عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی، تولید این آنزیم براساس روش مورهورفر و همکاران (۱۷) در ۱۴ استرین باکتری مورد ارزیابی کمی قرار گرفت. به این ترتیب که پس از تهیه محیط SMA (Skim milk agar) که حاوی ۵ گرم پودرشیر، ۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی و $13/5$ گرم آگار میکروبیولوژیک در یک لیتر بود، باکتری‌ها در سطح محیط به صورت نقطه‌ای کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دما 30°C -۲۸ نگهداری شدند. تشکیل هاله بیرنگ در اطراف کلنی نشانه فعالیت پروتئاز می‌باشد. میانگین شعاع این هاله بر حسب میلی‌متر در استرین‌های مختلف اندازه‌گیری و به عنوان معیاری جهت ارزیابی قابلیت تولید سلولاز در استرین‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت.

تولید سلولاز

سلولاز یکی از آنزیم‌هایی است که نقش مهمی در تخریب غشاء سلولزی گونه‌های پیتئوم دارد. به همین جهت تولید یا عدم تولید این آنزیم توسط استرین‌های باکتری به وسیله روش سدفی و همکاران (۲۵) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور محیط کشتی شامل ۱ گرم فسفات‌دی‌پتاسیک (K_2HPO_4)، ۰/۵ گرم نترات سدیم (NaNO_3)، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم (MgSO_4)، ۰/۵ گرم کلروپتاسیم (KCl) و ۰/۱ گرم سولفات آهن (Fe_2SO_4) در یک لیتر آب مقطر تهیه گردید. درون هر لوله آزمایش ۹ میلی‌لیتر از این محیط ریخته و سپس در هر کدام یک تکه کاغذ صافی به ابعاد 9×1 سانتیمتر گذاشته شد، به نحوی که نیمی از کاغذ بیرون از سطح

بازدارنگی) بر حسب میلی متر به عنوان معیاری جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی استرین‌ها اندازه‌گیری شد. استرین‌هایی که هاله بازدارنگی بیش از ۱۰ میلی‌متر بوجود آورده بودند (۱۳ استرین) به عنوان استرین برتر انتخاب و در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

شناسایی استرین‌های برتر

۱۳ استرین برتر با استفاده از مشخصات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی (جدول ۱) توصیه شده توسط شاد و همکاران (۲۶) و همچنین مقایسه نقوش الکتروفورزی پروتئین کل سلول باکتری (۲۳) با سوس مرجع *B. subtilis* BS. (دکتر روحانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد) شناسایی گردیدند. برای این منظور از نرم‌افزار NTYSIS، براساس کدهای صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) روی ژل پلی‌اکریل‌امید، نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

مکانیسم‌های بیوکنترلی استرین‌های برتر روی گونه‌های پیتئوم

در این خصوص اثرات ضد قارچی ترشحات مایع خارج سلولی، ترکیبات فرار، تولید پروتئاز، سلولاز و آنتی‌بیوتیک سورفکتین استرین‌ها روی دو گونه پیتئوم Pu و Pa مورد بررسی قرار گرفت.

اثر ضد قارچی ترشحات مایع خارج سلولی

برای این بررسی از روش کرائوس و لوپر (۱۶) و ولر (۲۸) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۴ استرین مورد بررسی (۱۳ استرین برتر + استرین BS به عنوان استرین مرجع) بصورت جاروئی روی مخلوط محیط‌های PDA+NA ($50/50$) کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دما 30°C -۲۸ نگهداری گردید. سپس با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر استریل کلنی باکتری از سطح محیط کشت شسته و حذف شد. برای از بین بردن بقایای باکتری، تشتک‌پتری مربوطه به مدت ۴۵ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار داده شد. پس از این مدت برای تخلیه بخار کلروفرم، تشتک‌پتری به مدت ۳۰ دقیقه زیر هود استریل قرار داده شد. سپس یک دیسک ۵ میلی‌متری از هر یک از گونه‌های پیتئوم در مرکز تشتک‌پتری قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت (تا پر شدن تشتک شاهد توسط قارچ) در 25°C نگهداری گردید. درصد کاهش رشد کلنی قارچ‌ها نسبت به شاهد، که فاقد باکتری بود، به عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضدقارچی متابولیت‌های مایع خارج سلولی استرین‌های باکتری مورد استفاده قرار گرفت. این درصد بر اساس رابطه زیر تعیین گردید (۲۰).

$100 \times \left[\frac{\text{قطر کلنی در پتری شاهد}}{\text{قطر کلنی در پتری}} \right]$

سپس ۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی و بعد از آن چندین بار با آب مقطر استریل شستشو شده و خشک گردید (۱۵). برای تهیه مایه تلقیح استرین‌های باکتری از ۱۴ استرین کشت شده روی NA، ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون (10^8 cfu/ml) OD_{۵۴۶} در آب مقطر استریل تهیه گردید. جهت چسبیدن کامل باکتری به بذور خیار، به نسبت ۰/۵ درصد کربوکسی‌متیل سلولوز به سوسپانسیون‌ها افزوده شد. پس از تعیین قوه‌نامه، بذور به مدت ۱۰ دقیقه در مایه تلقیح باکتری قرار داده شد و پس از خشک شدن به تعداد ۵ عدد در گلدان‌های ۳۰۰ گرمی کشت گردید (۱). گلدان‌ها تا نیمه از خاک پر شده و مایه تلقیح قارچ به میزان ۱۰ درصد به خاک سطحی گلدان‌ها افزوده و با آنها مخلوط گردید. بذور تیمار شاهد منفی بدون قارچ و بدون باکتری (C3)، شاهد مثبت با قارچ و بدون باکتری (C2) و تیمار قارچ‌کش متلاکسیل و قارچ (C1) نیز با محلول ۰/۵ درصد کربوکسی‌متیل سلولوز پوشش داده شد. قابلیت کنترل کنندگی استرین‌ها، پس از ۲۵ روز از زمان کاشت، بر اساس شاخص‌های درصد گیاهچه‌های باقیمانده در پایان آزمایش، وزن تر گیاهچه‌های کامل و ریشه آنها و میزان پوسیدگی ریشه براساس شاخص‌های زیر تعیین گردید، به این ترتیب که نمره ۱ برای گیاه کاملاً سالم، ۲ پوسیدگی خفیف ریشه (بین ۱۰-۱ درصد)، ۳ پوسیدگی متوسط ریشه باضافه ناحیه طوقه (بین ۵۰-۱۰ درصد)، و ۴ پوسیدگی شدید ریشه باضافه پوسیدگی بذر (بیش از ۵۰ درصد) در نظر گرفته شد (۱). آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۱۷ تیمار شامل ۱۴ استرین باکتری، شاهد منفی، شاهد مثبت، و تیمار قارچ‌کش در ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۵ گیاهچه اجرا گردید.

آنالیز آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح ۱ درصد با استفاده از نرم افزار MINITAB و MSTATC صورت پذیرفت.

بررسی میکروسکوپی اثر بازدارندگی استرین‌های آنتاگونیست روی عوامل بیماری‌زا

مطابق روش اکسپرت و دیگات (۹) با اندکی تغییر، نوک هیف‌های حاشیه کلنی قارچ که تحت تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی استرین‌های آنتاگونیست قرار گرفته بودند در زیر میکروسکوپ از نظر شکل، رنگ و وضعیت رشدی با تیمار شاهد مقایسه گردید.

نتایج

جداسازی و شناسایی استرین‌های برتر

۲۷۰ استرین باکتری از خاک ریزوسفر خیار در شهرستان تنکابن جداسازی شد، از بین آنها ۱۳ جدایه (B1 تا B13) که هاله بازدارندگی بیش از ۱۰ میلی‌متر (۲۵-۱۰) بین کلنی قارچ و باکتری

محیط قرار گیرد. پس از استریل و سرد شدن این مجموعه، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کدر استرین‌ها به هر لوله اضافه و به مدت سه هفته در دمای ۲۵°C نگهداری شد. در تیمار شاهد ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم افزوده شد. تغییر رنگ کاغذ صافی به عنوان معیاری برای تولید آنزیم سلولاز توسط استرین‌های باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

تولید آنتی‌بیوتیک سورفکتین (بیوسورفکتانت)

برای این منظور از روش آگارخونی (Blood Agar) طبق دستور العمل ناکانو و همکاران (۱۹) و فینیر و همکاران (۱۰) با تغییراتی جزئی استفاده گردید. برای این منظور به محیط آگار خونی با دما ۴۰°C پس از اتوکلاو، به میزان ۷ درصد خون افزوده شد، پس از افزودن خون، محیط به رنگ قرمز در می‌آید. استرین‌ها به صورت نقطه‌ای روی این محیط، کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دما ۲۸-۳۰°C نگهداری شدند. بوجود آمدن هاله روشن (ناحیه همولیز شده) در اطراف کلنی بیانگر فعالیت بیوسورفکتانت تولید شده توسط باکتری می‌باشد (۱۸). میانگین شعاع هاله به وجود آمده در اطراف کلنی باکتری اندازه‌گیری و به عنوان معیاری برای ارزیابی میزان سورفکتین تولید شده در استرین‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آزمایش‌های فوق در قالب طرح کامل تصادفی با ۱۵ تیمار شامل ۱۳ استرین آنتاگونیست و استرین مرجع BS باضافه تیمار شاهد در ۴ تکرار صورت پذیرفت.

بررسی قابلیت بیوکنترلی استرین‌های برتر روی پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در شرایط گلخانه

برای تهیه اینوکولوم جامد از روش رامامورتی و همکاران (۲۴) با اندکی تغییر استفاده شد. برای این منظور به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰ گرم خاک لوم شنی، ماسه و آرد ذرت به خوبی در یک ارلن‌مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری همراه با ۴۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و سه مرتبه به فاصله ۲۴ ساعت در دما ۱۲۱°C به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو گردید. سپس چهار قطعه از کشت سه روزه Pa و Pu روی محیط کشت ذرت آگار (CMA) به قطر ۲ سانتیمتر تهیه و به محتویات ارلن‌مایر اضافه گردید. ارلن‌ها در دما ۲۵°C به مدت ۳-۴ هفته قرار داده شدند. پس از رشد کامل قارچ‌ها، محتویات هر ارلن به نسبت ۱۰ درصد وزنی با خاک گلدان‌های آزمایشی که مرکب از خاک لوم‌شنی، پیت ماوس، پرلیت و ماسه به نسبت حجمی ۱/۱/۲/۲ بودند مخلوط و مورد استفاده قرار گرفتند.

در این آزمایش از رقم‌های هیبرید سوپردومینوس (حساس به Pa) و نتوتفرانسه (حساس به Pu) استفاده شد. به منظور حذف پوشش سمی، بذور خیار به ترتیب به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و

B. licheniformis گونه B9 و B8 استرین‌های *marinus* استرین‌های B10، B12، گونه *B. circulance*، و استرین B11 به عنوان *Bacillus sp.* شناسائی شد. بررسی نقوش پروتئینی کل سلولی (شکل ۱ و جدول ۱) و مقایسه نتایج کلاستر در یک دندروگرام نیز موید شناسایی‌های انجام شده بوده است.

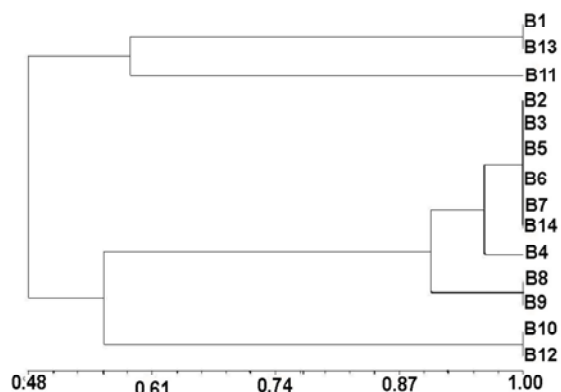
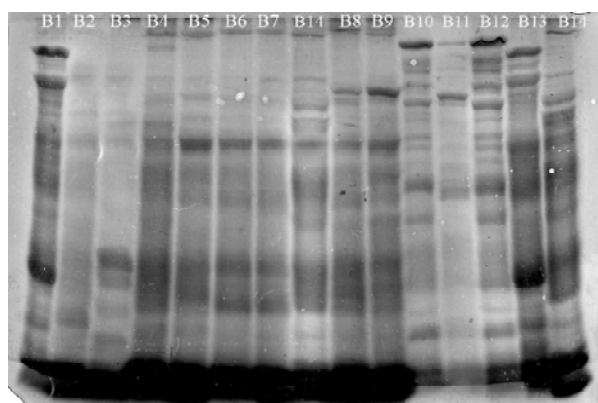
بوجود آورده بودند به عنوان استرین‌های آنتاگونیست برتر جهت بررسی‌های بعدی انتخاب شد. شناسایی این ۱۳ استرین مشخص کرد که استرین‌های B2، B3، B4، B5، B6 و B7 متعلق به گونه *B. subtilis* و قابل مقایسه با استرین B14 (*B. subtilis*) به عنوان استرین مرجع) می‌باشند. استرین‌های B1 و B13 به عنوان گونه *B.*

جدول ۱- شناسایی استرین‌های باکتری براساس آزمون مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی

استرین‌های باکتری	B1= <i>B. marinus</i>	B2= <i>B. subtilis</i>	B3= <i>B. subtilis</i>	B4= <i>B. subtilis</i>	B5= <i>B. subtilis</i>	B6= <i>B. subtilis</i>	B7= <i>B. subtilis</i>	B8= <i>B. subtilis</i>	B9= <i>B. licheniformis</i>	B10= <i>B. circulance</i>	B11= <i>B. spp.</i>	B12= <i>B. circulance</i>	B13= <i>B. marinus</i>	B14= <i>B. Subtilis</i>	تست
قطر سلول < ۱ Mm	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
اسپورها مدور	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اسپورانجیوم بادکرده	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	±	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd ^۱	+	nd	nd	+	+
رشد بی هوازی	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد هوازی	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تست VP	ng ^۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ng	+	+
تولید اسید از دی گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
زایلوز	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
مانیتول	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
رشد در محیط گلوکز مایع	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نشاسته	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	+	+
استفاده از سیترات	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
تست لستیناز	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-
احیای نیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید ایندول	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در pH ۶/۸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در pH ۵/۷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در NaCl ۵٪	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در NaCl ۷٪	nd	nd	+	+	+	+	nd	+	+	nd	+	nd	+	+	+
رشد در دمای ۴۰ °C	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در دمای ۵۰ °C	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

۱- هیچ داده‌ای حاصل نشد (not data).

۲- عدم رشد باکتری در محیط کشت (no growth)



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی پروتئین کل سلولی و دندروگرام ۱۳ استرین باکتری برتر و استرین مرجع *B. subtilis* BS (B14)

۴/۴۴ درصد بازدارندگی از رشد Pu نسبت به شاهد به ترتیب در گروه‌های a و g قرار گرفتند. بقیه استرین‌ها حالت حد واسطی را نشان دادند (جدول ۳ و ۲).

قابلیت تولید پروتئاز و سلولاز استرین‌های *Bacillus*

در بررسی‌های به عمل آمده تنها استرین B1 قادر به تولید پروتئاز بود و سایر استرین‌ها توانایی تولید پروتئاز و سلولاز را از خود نشان ندادند (جدول ۳ و ۲).

تولید سورفکتانت

در آزمایش انجام شده به روش آگارخونی، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد در میان استرین‌های باکتری از نظر تولید سورفکتانت مشاهده گردید. ظهور هاله روشن در تشتک‌پتری حاوی آگار خونی (به رنگ قرمز) بیانگر تجزیه گلوبول قرمز در اطراف کلونی استرین‌های مربوطه می‌باشد (شکل ۲). اندازه‌گیری شعاع هاله روشن ایجاد شده در اطراف کلنی استرین‌ها نشان داد که استرین‌های B12، B7 و B5 با ایجاد هاله به شعاع ۱۰ (گروه a)، استرین B6 به شعاع ۸ (گروه b) و استرین B14 به شعاع ۵ میلی‌متر (گروه c) نسبت به شاهد آب مقطر به ترتیب بیشترین فعالیت را از نظر تولید سورفکتانت نشان دادند (جدول ۳ و ۲).

اثر آنتاگونیستی استرین‌های برتر روی گونه‌های *P. ultimum* و *P. aphanidermatum* اثر ترشحات مایع

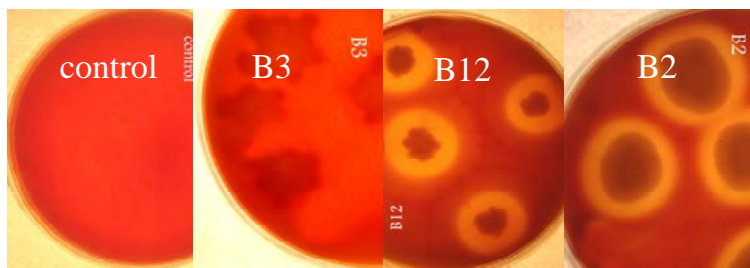
خارج سلولی استرین‌ها روی رشد کلنی پیتئوم

از این نظر در تمامی استرین‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد مشاهده گردید. استرین‌های B1 و B9، B4 به ترتیب با ۹۵/۱۸، ۹۱/۶۶ و ۸۷/۷۸ درصد و استرین B14 با ۱/۱۱ درصد بازدارندگی از رشد کلنی Pa نسبت به شاهد به ترتیب در گروه‌های a و ij قرار گرفتند. از این نظر استرین‌های B3، B7، B11 و B12 با صد درصد، و استرین B14 با ۱۳/۷ درصد بازدارندگی از رشد Pu نسبت به شاهد به ترتیب در گروه‌های a و f قرار گرفتند. بقیه استرین‌ها حالت حد واسطی را نشان دادند (جدول ۲ و ۳).

اثر ترکیبات فرار استرین‌ها روی رشد کلنی

P. ultimum و *P. aphanidermatum*

در این خصوص نیز اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد بین استرین‌ها دیده شد. در بین آنها استرین B6 با ۵۰ و استرین F14 با ۱۹/۲۶ درصد بازدارندگی از رشد Pa نسبت به شاهد به ترتیب در گروه‌های a و efg قرار گرفتند. از این نظر استرین‌های B6، B5، B8 و B9 با صد درصد و استرین‌های B10 و B11 با ۴/۸۱ و



شکل ۲- تست تولید سورفکتین روی محیط آگارخونی: هاله روشن و شفاف اطراف کلونی بیانگر تجزیه هموگلوبین خون توسط سورفکتین می‌باشد. استرین B2 و B12 تولیدکننده سورفکتین، B3، Control عدم تولید سورفکتین

استرین‌ها با شاخص پوسیدگی ریشه در گلخانه مشاهده شد، ضریب همبستگی برای Pu و Pa به ترتیب 0.45^{ns} و 0.67^{**} - تعیین گردید، در مورد سایر شاخص‌های آزمایشگاهی و شاخص پوسیدگی ریشه، به عنوان معیاری برای ارزیابی قابلیت بیوکنترلی استرین‌ها، همبستگی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد (جدول ۴). همبستگی بالا و معنی‌داری بین اثرات رشدی استرین‌ها و شاخص پوسیدگی ریشه دیده شد. مقایسه وزن تر گیاهچه‌های کامل بیمار نسبت به شاهد منفی (فاقد آلودگی) نشان داد که استرین‌های B7، B8، B14 و B13 بترتیب با $85/61$ ، $69/7$ ، $42/4$ و $27/3$ درصد افزایش در تیمارهای مربوط به Pa (رقم سوپردومینوس)، و استرین‌های B13، B7، B14 و B8 به ترتیب با $44/4$ ، $17/3$ ، $12/5$ و $11/1$ درصد افزایش در تیمارهای آلوده به Pu (رقم‌نت‌فرانسه) بیشترین اثر رشدی از خود نشان دادند. از این نظر نوعی همبستگی منفی و معنی‌دار بین وزن گیاهچه‌های بیمار نسبت به شاهد (فاقد آلودگی) و شاخص پوسیدگی ریشه آنها دیده شد. ضریب همبستگی در مورد Pu و Pa به ترتیب 0.93^{**} و 0.79^{**} - تعیین گردید (جدول ۵). همین وضعیت در مورد همبستگی منفی و معنی‌دار بین وزن تر ریشه گیاهچه‌های بیمار نسبت به شاهد منفی و شاخص پوسیدگی ریشه مشاهده شد، این همبستگی در مورد Pu و Pa به ترتیب 0.67^{**} و 0.44^{ns} - تعیین گردید (جدول ۵). این به آن معنی است که هر چه اثر رشدی استرین‌ها بیشتر شده، شاخص پوسیدگی ریشه در آنها کاهش داشته است.

بحث

از میان ۲۷۰ استرین بررسی شده ۱۳ استرین که هاله بازدارندگی بیش از ۱۰ میلی‌متر ایجاد کردند به عنوان استرین برتر و از میان آنها ۴ استرین شامل: دو استرین *B. subtilis* (B7 و B14)، یک استرین *B. licheniformis* (B8) و یک استرین *B. marinus* (B13) به عنوان موثرترین استرین‌ها در کنترل پوسیدگی پیتیومی ریشه و طوقه خیار در شرایط گلخانه تعیین گردیدند. جداول ۲ و ۳ نشان می‌دهند که این استرین‌ها از نظر شاخص‌های آزمایشگاهی مورد بررسی و همچنین قابلیت بیوکنترلی در شرایط گلخانه بسیار با یکدیگر متفاوتند. استرین‌های B7، B8، B13 و B14، براساس شاخص "درصد گیاهچه‌های باقیمانده" و "درصد پوسیدگی ریشه" در پایان آزمایش، بیشترین قابلیت بیوکنترلی را در مورد هر دو گونه پیتیوم بطور توأم نشان دادند.

قابلیت بیوکنترلی استرین‌های برتر جنس *Bacillus* روی

پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در شرایط گلخانه

از این نظر استرین‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان دادند. در ارتباط با کنترل *P. aphanidermatum* استرین B7 با حفظ ۱۰۰ درصد گیاهچه‌ها تا پایان آزمایش، استرین‌های B8 و B7 با بیشترین کنترل پوسیدگی ریشه (به ترتیب با ۲/۵ و ۲/۰۸ درصد پوسیدگی)، استرین‌های B7 و B8 با بهترین اثر روی وزن تر کل گیاهچه (به ترتیب ۲/۵۸ و ۲/۳۶ گرم) و استرین B7 با بهترین اثر روی وزن ریشه گیاهچه (۰/۹۱ گرم) بهترین استرین‌ها در مقایسه با شاهد تعیین شدند (جدول ۳ و نمودار ۱). در ارتباط با کنترل *P. ultimum* استرین‌های B6 و B13 با حفظ ۱۰۰ درصد گیاهچه تا پایان آزمایش، B7، B14، B8 و B13 به ترتیب با ۳/۷۵، ۴/۰۹، ۴/۵۸ و ۴/۵۸ درصد پوسیدگی ریشه، B7، B14 و B8 به ترتیب با ۲/۰۸، ۱/۶۹، ۱/۶۲ و ۱/۶۰ گرم وزن تر هر بوته و B7 و B4 با ۰/۸۵ و ۰/۸۰ گرم وزن تر ریشه به عنوان بهترین استرین‌ها در مقایسه با شاهد تعیین شدند (جدول ۳ و نمودار ۱).

از نظر قابلیت بیوکنترلی توأم استرین‌ها روی بیماری ناشی از هر دو گونه *P. aphanidermatum* و *P. ultimum*، استرین‌های B7، B8، B13 و B14 بهترین قابلیت را از خود نشان دادند (جدول ۳ و نمودار ۱).

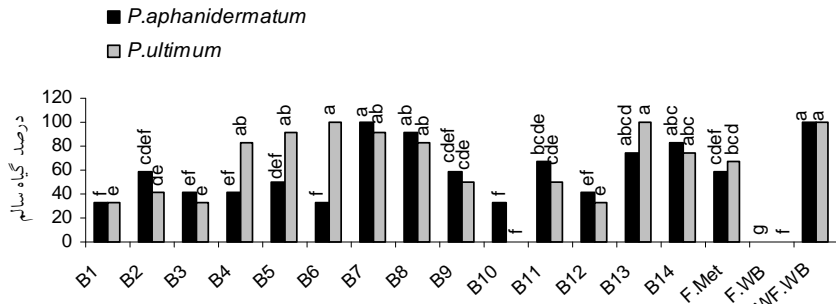
بررسی میکروسکوپی

مشاهدات میکروسکوپی در خصوص نحوه تاثیر استرین‌های آنتاگونیست روی قارچ‌های فوق نشان داد که در مورد همه استرین‌ها در ناحیه بازدارنده، رشد هیف‌ها متوقف شده و محتویات سیتوپلاسم از نوک آنها به خارج تراوش کرده، اینگونه هیف‌ها تغییر رنگ داده، حالت پیچش و چند شاخه شدن به خود گرفته و غیر فعال به نظر می‌رسیدند.

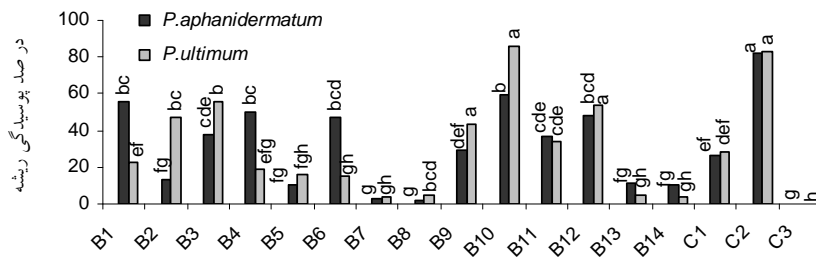
همبستگی بین شاخص‌های آنتاگونیستی استرین‌ها در

آزمایشگاه و قابلیت بیوکنترلی آنها در گلخانه

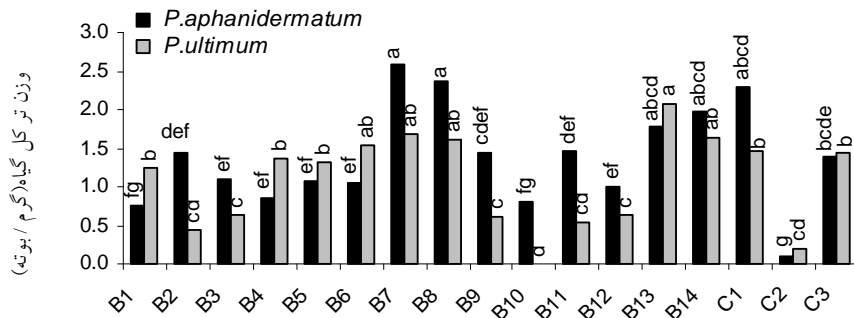
تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به همبستگی شاخص‌های مربوط به مکانیسم‌های آنتاگونیستی استرین‌ها شامل: اثر ترشحات مایع و فرار استرین‌ها روی رشد رویشی Pu و Pa، قابلیت تولید آنتی‌بیوتیک سورفکتانت و همچنین آنزیم‌های پروتئاز و سلولاز با قابلیت بیوکنترلی استرین‌ها در شرایط گلخانه نشان داد در غالب موارد همبستگی مناسبی بین آنها وجود ندارد (جدول ۴ و ۵). بیشترین همبستگی بین شاخص آنتاگونیستی مربوط به ترشحات مایع



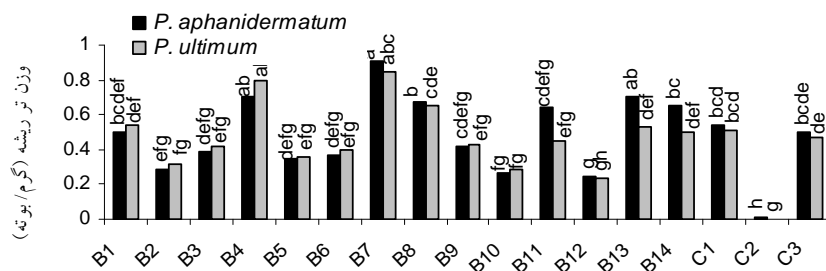
بakteri های آنتاگونیست



بakteri آنتاگونیست



بakteri آنتاگونیست



بakteri های آنتاگونیست

نمودار ۱- قابلیت بیوکنترلی استرین های باکتری در گلخانه. B1-B14 استرین های باکتری، C۱- تیمار سم (قارچ و متلاکسیل)، C۲- شاهد مثبت (قارچ و بدون باکتری)، C۳- شاهد منفی (بدون قارچ و بدون باکتری)، تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون LSD با احتمال ۰/۰۱ دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند.

جدول ۲- میانگین شاخص‌های آنتاگونیستی ۱۴ استرین باسیلوس در شرایط *in-vitro* و شاخص‌های بیوکنترلی آنها علیه پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در اثر *P. aphanidermatum* در شرایط گلخانه

تیمار	% گیاهچه باقی مانده ^۱	شاخص پوسیدگی ریشه ^۲	وزن تر گیاهچه کامل (گرم/بوته)	وزن تر ریشه (گرم/بوته)	شاخص آنتاگونیستی*	
					اثر ترشحات مایع ^۳	اثر ترکیبات فرار ^۴
C1	۵۸/۳۳ ^{cdef}	۲۶/۶۶ ^{ef}	۱/۲۹ ^{bcd}	۰/۵۴ ^{bcd}	—	—
C2	۰/۰۰ ^g	۸۲/۵۰ ^a	۰/۱۰ ^g	۰/۰۰ ^h	—	—
C3	۱۰۰/۰۰ ^a	۰/۰۰ ^g	۱/۳۹ ^{bcd}	۰/۵۰ ^{bcd}	۰/۰۰ ^e	۰/۰۰ ^K
B1	۳۳/۳۳ ^f	۵۵/۸۳ ^{bc}	۰/۷۵ ^{fg}	۰/۵۰ ^{bcd}	۰/۱ ^{de}	۳۱/۱۱ ^{efg}
B2	۵۸/۳۳ ^{cdef}	۱۳/۲۵ ^{fg}	۱/۴۳ ^{def}	۰/۲۹ ^{efg}	۰/۵ ^c	۳۳/۷۰ ^{def}
B3	۴۱/۶۶ ^{ef}	۳۸/۰۸ ^{cde}	۱/۱۰ ^{ef}	۰/۳۹ ^{defg}	۰/۰۰ ^e	۳۷/۷۸ ^{cd}
B4	۴۱/۶۶ ^{ef}	۴۹/۵۸ ^{bc}	۰/۱۸ ^{ef}	۰/۷۰ ^{ab}	۰/۲ ^d	۲۶/۲۹ ^{de}
B5	۵۰/۰۰ ^{def}	۱۰/۵۰ ^{fg}	۱/۰۶ ^{ef}	۰/۳۵ ^{defg}	۱/۰۰ ^a	۴۳/۷۰ ^b
B6	۳۳/۳۳ ^f	۴۷/۰۰ ^{bcd}	۱/۰۵ ^{ef}	۰/۳۷ ^{defg}	۰/۸ ^b	۵۰/۰۰ ^a
B7	۱۰۰/۰۰ ^a	۲/۵۰ ^g	۲/۵۸ ^a	۰/۹۱ ^a	۱/۰۰ ^a	۲۵/۹۲ ^{de}
B8	۹۱/۶۶ ^{ab}	۲/۰۸ ^g	۲/۳۶ ^a	۰/۶۷ ^b	۰/۱ ^{de}	۴۲/۵۹ ^j
B9	۵۸/۳۳ ^{cdef}	۲۹/۵۰ ^{def}	۱/۴۳ ^{cdef}	۰/۴۳ ^{cdefg}	۰/۴ ^c	۲۳/۳۳ ^{ij}
B10	۳۳/۳۳ ^f	۵۹/۱۶ ^b	۰/۸۰ ^{fg}	۰/۲۷ ^{fg}	۰/۲ ^d	۲۷/۰۴ ^{ghi}
B11	۶۶/۶۶ ^{bcde}	۳۶/۶۶ ^{cde}	۱/۴۵ ^{def}	۰/۴۴ ^{cdefg}	۰/۱ ^{de}	۳۰/۳۷ ^{fgh}
B12	۴۱/۶۶ ^{ef}	۴۸/۳۳ ^{bcd}	۱/۰۰ ^{ef}	۰/۳۴ ^g	۱/۰۰ ^a	۲۵/۱۸ ^{hi}
B13	۷۵/۰ ^{abcd}	۱۱/۴۱ ^{fg}	۱/۷۷ ^{abcd}	۰/۷۰ ^{ab}	۰/۰۰ ^e	۳۱/۸۵ ^{bc}
B14	۸۳/۳۳ ^{abc}	۱۱/۸۱ ^{fg}	۱/۹۸ ^{abcd}	۰/۶۵ ^{bc}	۰/۵ ^c	۱۹/۲۶ ^{efg}

C1- تیمار سم (قارچ و متالاکسیل)، C2- شاهد مثبت (قارچ و بدون باکتری)، C3- شاهد منفی (بدون قارچ و بدون باکتری)، B1 تا B13 استرین‌های برتر انتخاب شده، B14 استرین مرجع BS. ۱- درصد گیاهچه‌های باقیمانده در پایان آزمایش، ۲- بر اساس نمره بین (گیاه کاملاً سالم)، ۳- (۱-۲۰ درصد پوسیدگی)، ۴- (بیش از ۵۰ درصد پوسیدگی)، ۵- (پوشیدگی) و ۶- (بیش از ۵۰ درصد پوسیدگی)، ۳- و ۴- در صد کاهش رشد کلنی قارچ نسبت به شاهد (mm)، ۵- ارزیابی تولید سورفکتین به روش آگار خونی، بر حسب شعاع هاله بیرنگ در اطراف کلنی باکتری (mm). * آنزیم پروتئاز فقط در استرین B1 و آنزیم سلولاز در هیچیک از استرین‌ها شناسایی نشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون LSD با احتمال ۰/۰۱ دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

۱۲). در این مطالعه نیز در بین ۴ استرین ذکر شده که بهترین قابلیت بیوکنترلی را از خود نشان دادند، استرین B14، که یک استرین تجارتي است و اثر کنترل‌کنندگی خوبی در شرایط مزرعه نشان داده است، از نظر تولید ترکیبات ضدقارچی اعم از ترشحات مایع و ترکیبات فرار در زمره ضعیف‌ترین استرین‌ها قرار گرفته است، حالت عکس آن نیز مشاهده گردید، به این ترتیب که ترشحات مایع استرین‌های B11 و B12 که توانستند کاملاً (۱۰۰ درصد) از رشد *Pu* در تشک‌پتری جلوگیری کنند، در شرایط گلخانه قابلیت بیوکنترلی ضعیفی از خود نشان دادند (جدول ۲ و ۳ و نمودار ۱). همین وضعیت در مورد استرین‌هایی که قادر به تولید آنتی‌بیوتیک سورفکتین و آنزیم پروتئاز بودند نیز دیده شد. در بین استرین‌های B7 و B8 که قابلیت بیوکنترلی خوبی از خود نشان دادند تنها استرین B7 از نظر تولید سورفکتین در گروه a قرار گرفت، در حالیکه استرین B8 از این نظر عملکرد ضعیفی نشان داد و در گروه de قرار گرفت. B1 که تنها استرین تولیدکننده پروتئاز بود نیز اثر کنترل‌کنندگی ضعیفی از خود نشان داد. برای آنزیم سلولاز نیز نمی‌توان نقش قائل شد زیرا هیچ یک از استرین‌ها قادر به تولید آنزیم سلولاز نبودند. به این ترتیب نمی‌توان

با توجه به اینکه هاله بازدارندگی بین کلنی آنتاگونیست و قارچ، منعکس‌کننده فعالیت کلی ترشحات خارج سلولی آنتاگونیست علیه بیمارگر است، در اکثر موارد از قطر هاله بازدارندگی، به عنوان شاخص کمی، برای انتخاب مقدماتی استرین‌ها استفاده می‌شود (۱۲). در این بررسی نیز همبستگی قابل قبولی بین قطر هاله بازدارندگی ایجاد شده توسط استرین‌ها در اثر ترشحات مایع و شاخص پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهچه‌ها در اثر پیپتوم‌ها بدست آمد. ضریب همبستگی برای *Pu* و *Pa* به ترتیب ۰/۴۵- و ۰/۶۷- تعیین گردید (جدول ۴). به این ترتیب نمی‌توان برای دیگر مکانیسم‌های آنتاگونیستی استرین‌ها شامل: ترکیبات فرار، آنتی‌بیوتیک سورفکتانت و آنزیم‌های پروتئاز و سلولاز به تنهایی نقش مهمی قائل شد. با توجه به تغییرات زیاد بین داده‌ای به دست آمده از استرین‌های مختلف و همچنین تفاوت فاحش بین شرایط *in-vitro* و خاک، شعاع هاله بازدارندگی نیز برای یک و یا چند استرین محدود معیار مطمئنی جهت ارزیابی قابلیت بیوکنترلی آنها در شرایط خاک به شمار نمی‌رود. بررسی‌های دیگر نیز نشان می‌دهند که بین نتایج آزمایشگاهی و کنترل بیماری در شرایط خاک ممکن است همبستگی منفی و یا مثبت وجود داشته باشد (۳، ۵ و

ارتباط آماری جامع و کاملی بین مکانیسم‌های مطالعه شده در آزمایشگاه و قابلیت بیوکنترلی استرین‌ها در گلخانه برقرار کرد. بررسی اثرات رشدی استرین‌ها روی گیاهچه و سیستم ریشه‌ای آنها نشان می‌دهد که همبستگی بالا و معنی‌داری بین وزن گیاهچه کامل و شاخص پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهچه در اثر هر دو گونه پیتیوم وجود دارد. ضریب همبستگی در مورد Pu و Pa به ترتیب ۰/۹۳- و ۰/۷۹- تعیین گردید این وضعیت در مورد وزن ریشه این گیاهچه‌ها نیز صادق است (به ترتیب ۰/۶۲- و ۰/۴۴-) (جدول ۵)، به این معنی که وزن گیاهچه و وزن ریشه آنها با وجود آلودگی، بیشتر از تیمار شاهد منفی است. این پدیده را می‌توان به اثر رشدی این استرین‌ها نسبت داد. ترکیبات رشدی می‌توانند نقش مهمی در متحمل کردن گیاه به بیماری‌های ریشه داشته باشند، زیرا باعث می‌شوند ریشه‌های آسیب دیده بسرعت توسط ریشه‌های جدید جایگزین شوند و خسارت بیماری را، که ناشی از کاهش حجم ریشه‌های فعال است، کاهش دهند و گیاهچه را حداقل تا مرحله عبور از مراحل اولیه رشد که بیشترین حساسیت را نسبت به پیتیوم دارد حفظ نمایند. تعداد زیادی از

فیتوهورمون‌های تولید شده توسط باکتری‌ها باعث تحریک ریشه‌زائی گیاه و در نتیجه جذب بیشتر آب و عناصر غذایی بوسیله گیاه می‌شوند (۱۴ و ۱۵) جداول ۲ و ۳ نشان می‌دهند که علائم بیماری (پوسیدگی ریشه) در تمام تیمارها به استثنای تیمار شاهد منفی (C3) بوجود آمده است، منتهی شاخص پوسیدگی در تیمارهایی که بیماری بخوبی کنترل شده است بسیار پایین است. از مشخصه این تیمارها بالا بودن وزن تر گیاهچه کامل و وزن ریشه آنها است. وزن گیاهچه کامل و ریشه (رقم سوپر دومینوس) در تیمار مربوط به استرین B7 علیه Pa که شاخص پوسیدگی ریشه آن ۲/۵ بوده است به ترتیب ۸۵/۶ و ۸۲/۰ درصد بیشتر از تیمار شاهد منفی است که فاقد باکتری و قارچ بوده است (جدول ۲ و نمودار ۱)، این نسبت (رقم‌نتوت‌فرانسه) در مورد استرین B7 علیه Pu با شاخص پوسیدگی ۳/۷۵ به ترتیب ۱۷/۳۶ و ۸۰/۸۵ درصد تعیین گردید (جدول ۳ و نمودار ۱). در مورد دیگر استرین‌هایی که بیماری را به نحو خوبی کنترل کردند همین وضعیت به چشم می‌خورد.

جدول ۳- میانگین شاخص‌های آنتاگونیستی ۱۴ استرین باسیلوس در شرایط *in-vitro* و شاخص‌های بیوکنترلی آنها علیه پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در اثر *P. ultimum* در شرایط گلخانه

تیمار	% گیاهچه باقی مانده ^۱	شاخص پوسیدگی ریشه ^۲	وزن تر گیاهچه کامل (گرم/بوته)	وزن تر ریشه (گرم/بوته)	شاخص آنتاگونیستی ^۳		
					اثر ترشحات مایع ^۳	اثر ترکیبات فرار ^۴	سورفکتین ^۵
C1	۶۶/۶۷ ^{bcd}	۲۷/۹۱ ^{def}	۱/۴۶ ^b	۰/۵۱ ^{bcd}	-	-	-
C2	۰۰/۰۰ ^f	۸۲/۹۱ ^a	۰/۱۸ ^{cd}	۰۰/۰۰ ^g	-	-	-
C3	۱۰۰/۰۰ ^a	۰۰/۰۰ ^h	۱/۴۴ ^b	۰/۴۷ ^{de}	۰۰/۰۰ ^g	۰۰/۰۰ ^e	-
B1	۳۳/۳۳ ^e	۲۲/۵۰ ^{ef}	۱/۲۵ ^b	۰/۵۴ ^{def}	۷۸/۱۵ ^e	۶۴/۸۱ ^c	۰/۱ ^{de}
B2	۴۱/۶۶ ^{de}	۴۷/۵۰ ^{bc}	۰/۴۳ ^{cd}	۰/۳۲ ^{fg}	۹۱/۸۵ ^c	۷۷/۷۸ ^b	۰/۵ ^c
B3	۳۳/۳۳ ^e	۵۵/۴۱ ^b	۰/۶۴ ^c	۰/۴۲ ^{efg}	۱۰۰/۰ ^a	۸۳/۷۰ ^b	۰۰/۰۰ ^e
B4	۸۳/۳۳ ^{ab}	۱۹/۱۶ ^{efg}	۱/۳۵ ^b	۰/۸۰ ^{abc}	۹۴/۴۴ ^{bc}	۸۰/۰ ^b	۰/۲ ^d
B5	۹۱/۶۶ ^{ab}	۱۶/۲۵ ^{fgh}	۱/۲۰ ^b	۰/۳۶ ^{efg}	۷۷/۰۳ ^e	۱۰۰/۰ ^a	۱/۰۰ ^a
B6	۱۰۰/۰۰ ^a	۱۵/۰۰ ^{fgh}	۱/۵۳ ^{ab}	۰/۴۰ ^{efg}	۹۶/۳۹ ^b	۱۰۰/۰ ^a	۰/۸ ^b
B7	۹۱/۶۶ ^{ab}	۳/۷۵ ^{gh}	۱/۶۹ ^{ab}	۰/۸۵ ^{abc}	۱۰۰/۰ ^a	۳۰/۷۴ ^d	۱/۰۰ ^a
B8	۸۳/۳۳ ^{ab}	۴/۵۸ ^{gh}	۱/۶۰ ^{ab}	۰/۶۵ ^{cde}	۷۸/۵۲ ^e	۱۰۰/۰ ^a	۰/۱ ^{de}
B9	۴۹/۹۹ ^{cde}	۴۳/۳۳ ^{bcd}	۰/۶۱ ^c	۰/۴۳ ^{efg}	۸۲/۵۹ ^d	۱۰۰/۰ ^a	۰/۴ ^c
10	۰۰/۰۰ ^f	۸۵/۸۳ ^a	۰۰/۰۰ ^d	۰/۲۹ ^{fg}	۹۲/۲۲ ^c	۴/۸۱ ^g	۰/۲ ^d
B11	۵۰/۰۰ ^{cde}	۳۳/۷۵ ^{cde}	۰/۵۳ ^{cd}	۰/۴۵ ^{efg}	۱۰۰/۰ ^a	۴/۴۴ ^g	۰/۱ ^{de}
B12	۳۳/۳۳ ^e	۵۲/۷۵ ^b	۰/۶۳ ^c	۰/۲۳ ^{gh}	۱۰۰/۰ ^a	۱۶/۶۶ ^{ef}	۱/۰۰ ^a
B13	۱۰۰/۰۰ ^a	۴/۵۸ ^{gh}	۲/۰۸ ^a	۰/۵۳ ^{def}	۹۴/۰۷ ^{bc}	۲۹/۲۶ ^{de}	۰۰/۰۰ ^e
B14	۷۵/۰۰ ^{abc}	۴/۰۹ ^{gh}	۱/۶۲ ^{ab}	۰/۵۰ ^{def}	۱۳/۷۰ ^f	۵/۵۵ ^{fg}	۰/۵ ^c

C1- تیمار سم قارچ و متالاکسیل، C2- شاهد مثبت (قارچ و بدون باکتری)، C3- شاهد منفی (بدون قارچ و بدون باکتری)، B1 تا B13 استرین‌های برتر انتخاب شده، B14 استرین مرجع BS. ۱- درصد گیاهچه‌های باقیمانده در پایان آزمایش، ۲- بر اساس نمره بین (گیاه کاملاً سالم)، ۱۰-۱ (درصد پوسیدگی)، ۳ (بین ۵۰-۱۰ درصد پوسیدگی) و ۴ (بیش از ۵۰ درصد پوسیدگی)، ۳- و ۴- در صد کاهش رشد کلنی قارچ نسبت به شاهد (mm)، ۵- ارزیابی تولید سورفکتین به روش آگار خونی، بر حسب قطر هاله بیرنگ در اطراف کلنی باکتری (mm). * آنزیم پروتاز فقط در استرین B1 و آنزیم سلولاز در هیچیک از استرین‌ها شناسایی نشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون LSD با احتمال ۰/۰۱ دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

است کارآئی هر استرین در شرایط مزرعه و حتی در شرایط مزارع مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری نسبت به کاربرد آنها اقدام نمود. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی شاید بتوان نقش مهمتری برای ترکیبات رشدی استرین‌ها در زمینه کنترل بیماری‌ها قائل شد، زیرا این مکانیسم بطور غیر مستقیم و با افزایش تحمل گیاه نسبت به بیماری باعث می‌شود که خسارت ناشی از بیمارگرهای ریشه از جمله گونه‌های پیتیوم به نحو موثری کاهش یابد.

علیرغم اینکه در مواردی شاخص‌های آزمایشگاهی بخصوص شاخص "هاله باز دارنگی" در انتخاب استرین‌های با قابلیت بیوکنترلی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی باید پذیرفت که رفتار استرین‌ها روی محیط‌های کشت در شرایط in-vitro با نحوه عمل آنها در حضور گیاه متفاوت است. این شاخص‌ها تنها می‌توانند اطلاعاتی کلی در مورد توان بالقوه آنتاگونیست‌ها در شرایط تعریف شده‌ای به ما بدهند (۱۲) و نمی‌توانند معیار مطمئنی برای ارزیابی قابلیت بیوکنترلی آنها در شرایط طبیعی باشند. در اینگونه موارد بهتر

جدول ۴- ضریب همبستگی مکانیسم‌های آنتاگونیستی ۱۴ استرین باسیلوس در شرایط in-vitro با شاخص پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در اثر *P. aphanidermatum* و *P. ultimum* در شرایط گلخانه

سورفکتانت	پروتئاز	سلولاز	ترکیبات فرار	ترشحات مایع	مکانیسم آنتاگونیستی بیمارگر
-۰/۰۷ ^{NS}	.	.	۰/۱۸ ^{NS}	-۰/۶۷ ^{**}	<i>P. aphanidermatum</i>
-۰/۰۳ ^{NS}	.	.	-۰/۰۳ ^{NS}	-۰/۴۵ ^{NS}	<i>P. ultimum</i>

*- معنی‌دار در سطح ۵ درصد، **- معنی‌دار در سطح ۱ درصد، NS معنی‌دار نیست.

جدول ۵- ضریب همبستگی اثرات رشدی ۱۴ استرین باسیلوس روی وزن تر گیاهچه و ریشه آن با شاخص پوسیدگی ریشه خیار در اثر *P. aphanidermatum* و *P. ultimum* در شرایط گلخانه

شاخص پوسیدگی ریشه و طوقه		
<i>P. aphanidermatum</i>	<i>P. ultimum</i>	
-۰/۷۹ ^{**}	-۰/۹۳ ^{**}	وزن تر گیاهچه
-۰/۴۴ ^{NS}	-۰/۶۲ ^{**}	وزن تر ریشه

*- معنی‌دار در سطح ۵ درصد، **- معنی‌دار در سطح ۱ درصد، NS معنی‌دار نیست. شاخص پوسیدگی بر اساس نمره بین ۱ (صفر درصد پوسیدگی)، ۲ (۱۰-۱ درصد پوسیدگی)، ۳ (بین ۵۰-۱۰ درصد پوسیدگی) و ۴ (بیش از ۵۰ درصد پوسیدگی)

منابع

- 1- Abdelzاهر H.M.A. 2003. Biological control of root rot of cauliflower (caused by *Pythium ultimum* var. *ultimum*) using selected antagonistic rhizospheric strain of *Bacillus subtilis*. New Zealand Journal of Crop & Horticulture Sci. 31: 209-220.
- 2- Abdolghafar N.Y., and Abolsayed W.M. 1997. Biological control of soft rot of potato using flurescent pseudomonads. Arab Uni. J. Agri. Sci. 22: 419-431. Can. J. Microbiol. 41(8): 685-691.
- 3- Alestrom S., and Burns R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biol. Fertil. Soils. 7: 232-238.
- 4- Asaka O., and Makoto S. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Appl. Envir Microbiol. 62(11): 4081-4085.
- 5- Berg G., and Ballin G. 1995. Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. Phytopathol. 141: 99-110.
- 6- Czaczyk K., Trojanowska K., and Stachowiak B. 2002. Inhibition of ergosterol biosynthesis in fungal plant pathogens by *Bacillus* sp. Polish Journal of Environmental studies. 11. (5): 593-597.
- 7- Das P., Mukherjee S., and Sen R. 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. J. Appl. Microbiol. 104: 1675-1684.
- 8- Dworkin M., (Editor-in-Chief), Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., and Stackebrandt E. 2006. The Prokaryotes (A Handbook on the Biology of Bacteria). 3 ed. Vol. 1 © Springer Science+Business Media, Inc. 1073p.

- 9- Expert J.M., and Digat B. 1995. Biocontrol of Sclerotinia wilt of sunflower by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* strains. *Can. J. Microbiol.* 41:685–691.
- 10-Feignier C., Besson F., and Michel G. 1995. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin-, surfactin- mutants. *FEMS Microbiol Lett.* 127: 11–15.
- 11-Fiddaman P.J., and Rossal S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtili*. *J. Appl. Bact.* 74: 119-126.
- 12-Fravel D.R. 1988. Rol of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 75-91.
- 13-Keel C., and Defago G. (eds.). Interaction between beneficial soil bacteria & root pathogen: mechanism & ecological impact In: Gange, A. C. & Brown, V. (eds) *Multitrophic interaction in terrestrial systems*. Black well scientific Publishers London, UK. 27-46.
- 14-Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmiedeknecht G., and Hain R. 2000. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 1/00, 1: 72-93.
- 15-Kita N., Ohya T. Uekusa H., Nomura K., Manago M., and Shoda M. 2005. Biological control of damping-off of tomato seedlings & cucumber *Phomopsis* Root rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. *JARQ.* 39(2): 109-114.
- 16-Kraus J., and Loper J.E. 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies pp. 175-177. In Keel, C., Koller, B. and Defago, G. (Eds.). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria*, Interlacen, switzerland.
- 17-Maurhofer M., Keel C., Schemider U., Vuisard C., Haas D., and Defago G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* 82: 190-195.
- 18-Ximenes M.E.A. 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug –resistant bacteria. *Brazil. J. Microbiol.* 38: 704-709.
- 19-Nakano M.M., Marahiel M.A., and Zuber P. 1988. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 170: 5662–5668.
- 20-Niknejad K.M. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathol. J.* 3(2): 88-96.
- 21-Pal Bais H., Fall R., and Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134. Pp. 307–319.
- 22-Plaats_Niterink A.J. Van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycol.* 21: 1-244.
- 23-Rahimian H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Iran. J. Phytopathol.* 143: 321–324.
- 24-Ramamoorthy V., Raghuchander T., and Samiyappan. 2002. Enhancing resistance of tomato & hot pepper to *Pythium* disease by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Europ. J. Plant Pathol.* 108: 429-441.
- 25-Sadfi N., Cherif M., Hajlaout M.R., Boudabbous A., and Belanger R. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.* 52: 323-337.
- 26-Schaad N.W., and Jones. J.B. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. The American Phytopathology Society. St. Paul. MN. USA.: 373.
- 27-Silo-Suh L.A., Lethbridge B.J., Raffel S.J., He H., Clardy J., and Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Envir. Microbiol.*, 60: 2023-2030.
- 28-Weller D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.