ارزیابی جدایه های *Bacillus subtilis* در کنترل بیولوژیکی پوسیدگی ریشه آفتابگردان ناشی از *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

میرمعصوم عراقی*[1] و کامران رهنما[2]

*۱- **نویسنده مسؤول:** دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(Iraqi602@yahoo.com)

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۴

چکیده

باسیلوس ها از مهم ترین عوامل باکتریایی با توان آنتاگونیستی علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری زای گیاهی محسوب می شوند. در این راستا، این تحقیق با هدف بررسی اثرات آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* علیه قارچ عامل پوسیدگی ذغالی ریشه آفتابگردان انجام شد. در این تحقیق اثرات آنتاگونیستی ۲٤ جدایه باکتری *Bacillus subtilis* جداسازی شده از مزرعه آفتابگردان علیه قارچ عامل پوسیدگی ذغالی ریشه (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) تحت شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از بین جدایه ها، اثر آنتاگونیستی شش جدایه تحت شرایط گلخانه ای با سوسپانسیونی به غلظت 10^9 (سلول در میلی لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. تعامل بین جدایه های باکتری، بیمارگر و میزبان با اندازه گیری شدت بیماری و فاکتورهای رشدی شامل ارتفاع، وزن تر و خشک گیاه نشان داده شد. نتایج نشان داد که جدایه های باکتری اثرات آنتاگونیستی متفاوتی را در شرایط آزمایشگاهی علیه قارچ عامل بیماری دارند. جدایه Bs15 با ٦٦/٥ درصد و جدایه Bs19 با ٧٠/٤ و ٦٩/٥ درصد به ترتیب بیشترین بازدارندگی را در آزمون تاثیر مواد فرار، غیرفرار و کشت متقابل داشتند. بر خلاف شرایط آزمایشگاهی، در آزمون گلخانه ای جدایه Bs4 بهتر از بقیه جدایه ها عمل کرد و باعث کاهش معنی دار در بیماری و افزایش معنی دار در فاکتورهای رشدی گردید.

کلید واژه ها: آفتابگردان، آنتاگونیست، Bacillus subtilis، Macrophomina phaseolina

مقدمه

امروزه در راستای رسیدن به کشاورزی پایدار و تأمین بهداشت و سلامت محیط زیست، استفاده از روش های نوین بیولوژیک علیه آفات و بیماری های گیاهی در جهت مدیریت تلفیقی و کاهش کاربرد سموم شیمیایی الزامی به نظر می رسد (۸ و ۹). قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. یکی از مهمترین عوامل بیماری زای خاکزی است که باعث ایجاد پوسیدگی ذغالی در بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی همچون آفتابگردان، سویا، سیب زمینی، ذرت، کنجد، پنبه، خربزه، گلرنگ، هندوانه، زیتون، سورگوم، کاج سیاه، لوبیا چشم بلبلی و بادام زمینی به ویژه در مناطق گرم می شود (۵، ۷، ۱۱، ۲۷، ۳۴ و ۳۵). دامنه میزبانی وسیع و توان تولید اسکلرت مقاوم در این قارچ باعث گردیده تا مبارزه شیمیایی و زراعی (تناوب و آیش) به تنهایی مفید نباشد (۲۷ و ۳۰).

استفاده از روش های بیولوژیکی جهت کنترل عوامل بیماری زای خاکزی بیش از یک قرن است

که مورد توجه قرار گرفته است (۶). استفاده از گونه های مختلفی از جنس *Trichoderma* علیه *Macrophomina phaseolina* در میزبان های مختلف موفقیت آمیز بوده است (۲۷ و ۲۹). از عوامل باکتریایی با خاصیت آنتاگونیستی مناسب علیه عوامل بیماری زای خاکزی می توان به *Bacillus* ها اشاره کرد (۴، ۱۰، ۱۲، ۱۸ و ۳۳). به طور کلی باکتری ها بیشترین میکروفلور خاک را به خود اختصاص داده اند و نزدیک به ۵ درصد وزن خشک مواد آلی خاک را شامل می شوند (۱۳). در این بین باسیلوس‌ها به دلیل حضور گسترده در خاک، تحمل تغییرات دمایی، pH، شوری محیط و تولید فرم مقاوم به صورت اندوسپور به عنوان عوامل مناسبی در کنترل بیولوژیکی مطرح هستند (۶). یکی از مهمترین گونه های باسیلوس، *B. subtilis* می باشد و تاکنون به روش های مختلف نظیر آغشته کردن بذر (۶)، فرو بردن ریشه گیاه در سوسپانسیون باکتری (۲۸) و مخلوط کردن با خاک (۱۲) علیه بسیاری از بیمارگرهای خاکزی همچون *Phytophthora capsici* (۴)، *Rhizoctonia solani* (۱۲)، *Verticillium dahliae* (۱ و ۲)، *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (۳)، *Pythium ultimum* (۶)، *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (۱۴) و *Macrophomina phaseolina* (۱۸، ۲۷ و ۳۳) به کار رفته است. این باکتری با تولید ترکیبات بیوشیمیایی فرار و غیرفرار اعم از انواع آنزیم ها (۲۱، ۲۵ و ۲۸) و آنتی بیوتیک ها (۲۰ و ۲۶) باعث کاهش جمعیت بیمارگرها می شود. از طرفی اثرات افزایش رشدی و القاء مقاومت به گیاه در بسیاری از استرین های این باکتری بر روی بسیاری از گیاهان به اثبات رسیده است (۳۱، ۳۳ و ۳۶). با توجه به ویژگی های منحصر به فرد این گونه باکتری و نیز اثرات آنتاگونیستی مناسب آن علیه عوامل بیماری زای گیاهی یاد شده، در این تحقیق سعی شده است تا به بررسی اثرات آنتاگونیستی جدایه های مختلف باکتری *B. subtilis* علیه قارچ عامل پوسیدگی ریشه آفتابگردان (*Macrophomina phaseolina*) در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای و مقایسه عملکرد آنتاگونیستی جدایه های باکتری مزبور در دو محیط آزمایشگاهی و گلخانه ای پرداخته شود.

مواد و روش ها

۱) جداسازی باکتری:

برای این منظور به طور تصادفی از خاک مزارع آفتابگردان اطراف شهرستان گرگان (خاک اطراف ریشه) نمونه هایی تهیه و یک گرم از هر نمونه به طور جداگانه در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ریخته و غلظت های مختلف به صورت سریال تهیه شد. از آنجایی که گونه های باسیلوس تولید اندوسپور مقاوم می کنند، رقت های تهیه شده ۱۰ دقیقه در داخل بنماری (حمّام بخار) در دمای ۵ ±۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس از هر رقت مقدار یک میلی لیتر به محیط آگار غذایی منتقل و در دمای ۲ ± ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از ظهور کلونی های باکتریایی اقدام به خالص سازی گردید (۳۲).

۲) انتخاب جدایه های آنتاگونیست جهت بررسی مکانیسم آنتاگونیستی و آزمایش های گلخانه‌ای:

بر اساس روش های موجود در منابع، باکتری‌ها به صورت خطی روی محیط کشت مالت آگار به فاصله تقریبی ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک پتری کشت داده شد. ۱۲ ساعت بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ عامل بیماری در وسط تشتک پتری قرار داده شد. برای هر جدایه باکتریایی چهار تکرار به کار گرفته شد. تشتک های پتری به مدت ۵-۷ روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. وجود هاله بازدارندگی به عنوان واکنش مثبت

بازدارندگی محسوب شد. شش جدایه که در این آزمون نسبت به بقیه جدایه ها بیشترین بازدارندگی را داشتند مورد بررسی بیشتر به شرح زیر قرار گرفتند (۲۲).

۳) آزمون های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌های باسیلوس:

جدایه های باکتریایی از نظر قطر سلول باکتری، تولید اسپور و واکنش های کاتالاز، تولید اندول، احیای نیترات، لسیتیناز، استفاده از سیترات، رشد در نمک طعام ۷ درصد، رشد در دمای ۵ و ۴۵ درجه سلسیوس و اسیدیته ۵/۷ مورد بررسی قرار گرفتند. برای تفکیک گونه‌ها از یکدیگر از ویژگی هایی نظیر موقعیت اندوسپور، تولید اسید از آرابینوز، دی‌زایلوز، دی‌مانیتول، هیدرولیز کازئین، ژلاتین و نشاسته استفاده شد (۳۲).

٤) بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی:

در این آزمون از آگار غذایی[1] جهت کشت باکتری به صورت خطی استفاده گردید. پس از کشت حلقه ای از قارچ عامل بیماری در مرکز تشتک پتری حاوی PDA، درب تشتک های پتری در شرایط سترون در زیر هود برداشته شده و تشتک های پتری حاوی قارچ و باکتری در همان روزِ کشت شده، روی هم قرار گرفته و توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود و به مدت شش روز در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کاهش رشد قارچ بیمارگر در مقایسه با تیمارهای شاهد فاقد باکتری، نشانگر تاثیر ترکیبات فرار جدایه های باکتری روی پرگنه قارچ بیمارگر محسوب شده و جدایه های باکتری از این نظر مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند (۱۹).

۵) بررسی قابلیت تولید مواد بازدارنده رشدی:

برای اثبات تولید مواد بازدارنده رشدی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی و آب مقطر سترون به عنوان شاهد به محیط PDA اضافه و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط پخش شد. سپس برای مدت سه روز در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. پس از سه روز، با استفاده از میله شیشه‌ای و آب مقطر سترون، باکتری‌ها از سطح محیط کشت شسته شده و تشتک های پتری به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود در معرض بخار کلروفرم (برای از بین بردن کلنی های باکتری) قرار گرفتند. آنگاه یک قرص قارچی به قطر پنج میلی متری از حاشیه کشت شش روزه *M. phaseolina* با رعایت شرایط سترون در وسط تشتک پتری کشت داده شد. تشتک های پتری در دمای ۱ ± ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (۲۴).

٦) آزمون گلخانه ای:

ابتدا مخلوطی از ماسه و آرد ذرت به نسبت وزنی ۱:۹ به مقدار کافی تهیه کرده و پس از اضافه کردن مقداری آب مقطر سترون به نسبت وزنی ۱:۱۰ در فاصله زمانی یک روزه دو بار سترون گردید. در داخل هر ارلن چهار قطعه پنج میلی متر مربعی از کشت هفت روزه قارچ *M. phaseolina* اضافه شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت چهار هفته نگهداری گردید. مایه تلقیح به دست آمده از روش فوق، قبل از کاشت بذرها به نسبت وزنی ۱:۱۰ (۱۰ گرم مایه به ازاء ۱۰۰ گرم خاک) به خاک گلدان های دو بار سترون شده (حاوی نسبت مساوی از خاک مزرعه، خاکبرگ و ماسه) اضافه گردید (۷ و ۲۷). بلافاصله پس از کاشت بذرها، سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^9 (اسپور/ میلی لیتر) و به میزان ۱۰۰ میلی لیتر (برای هر گلدان) به خاک گلدان ها اضافه شد. در تیمار شاهد منفی (آلوده) تنها از قارچ بیمارگر، در شاهد مثبت تنها از باکتری باسیلوس استفاده شد و در شاهد سالم از هیچکدام استفاده نگردید. برای ارزیابی شدت بیماری از شاخص شش درجه ای (۵-۰) موجود در

1- Nutrient Agar

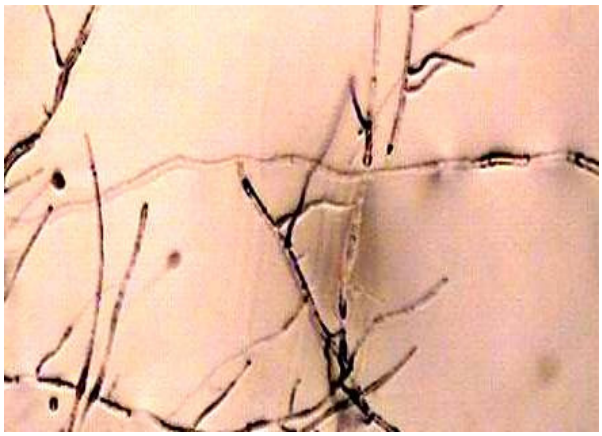
منابع استفاده شد (۰= گیاه بدون علائم، ۱= یک الی ۳ درصد آلودگی ریشه، ۲= ۱۰ درصد آلودگی، ۳= ۲۵ درصد آلودگی، ۴= ۵۰ درصد آلودگی و ۵= بیش از ۷۵ درصد آلودگی) (۵ و ۲۹). همچنین به منظور بررسی اثرات متقابل بیمارگر و جدایه های باکتری در فاکتورهای رشدی گیاه اقدام به اندازه گیری ارتفاع و وزن تر و خشک گیاه و مقایسه با تیمارهای شاهد گردید. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SAS و برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه ای دانکن (۵ درصد) استفاده گردید.

نتایج و بحث

از میان ۲۴ جدایه باکتری جداسازی شده، ۶ جدایه که در آزمون کشت متقابل با قارچ عامل بیماری بیشترین بازدارندگی را از خود نشان دادند، مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که این جدایه ها متعلق به گونه *Bacillus subtilis* هستند. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی مورد استفاده برای تشخیص گونه‌های باسیلوس در جدول ۱ ذکر شده است. تمام جدایه‌ها میله‌ای شکل، دارای اندوسپور مرکزی، کاتالاز مثبت، قابلیت تولید اسید از آرابینوز، مانیتول، هیدرولیز کازئین و ژلاتین بودند. با توجه به نتایج آزمون های بیوشیمیایی خصوصیات همه جدایه ها با گونه *B. subtilis* مطابقت داشت (۶ و ۳۲). بررسی های میکروسکوپی نشان داد که جدایه های مختلف باسیلوس از طریق ترشح مواد بازدارنده رشدی باعث ایجاد تغییر شکل، لیز شدگی، تورم و واکئوله شدن هیف قارچ عامل بیماری می شوند (شکل ۱). تجزیه و تحلیل نتایج آماری نشان داد که جدایه های باکتری از نظر اثرات آنتاگونیستی علیه عامل بیماری دارای اختلاف معنی دار آماری هستند. همچنین جدایه ها در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای نیز در مقایسه با یکدیگر متفاوت عمل نمودند. در آزمون کشت دو طرفه جدایه Bs19 و Bs21 به ترتیب با ۶۹/۵ و ۵۰/۱ درصد بیشترین و کمترین درصد بازدارندگی را داشتند. در آزمون اثر ترکیبات غیر فرار جدایه Bs19 با ۷۰/۴ درصد بهتر از بقیه جدایه ها عمل نمود ولی در آزمون بررسی تأثیر مواد فرار این جدایه Bs15 بود که با ۶۶/۵ درصد بیشترین درصد بازدارندگی را باعث شد و این در حالی است که جدایه های Bs19 و Bs21 به ترتیب در آزمون تاثیر مواد فرار و غیرفرار با ۴۲/۷ و ۶۰/۴ درصد کمترین درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری را در این آزمون ها داشتند (جدول ۲). بر خلاف نتایج آزمایشگاهی در شرایط گلخانه ای جدایه Bs4 در مقایسه با ۵ جدایه دیگر بهترین عملکرد را از خود نشان داد. (جدول ۳). بررسی های آزمایشگاهی و گلخانه ای در این تحقیق نشان داد که جدایه های باکتری *Bacillus* اثرات بازدارندگی متفاوتی را علیه عامل بیماری دارند. در شرایط آزمایشگاهی جدایه های باکتری از نظر تأثیر مواد فرار و غیرفرار تفاوت معنی داری داشتند. به طور کلی جدایه های *B. subtilis* روی بسیاری از عوامل بیماری زای گیاهی اثرات آنتاگونیستی مطلوبی داشته اند. در تحقیقی اثر آنتاگونیستی جدایه های *Bacillus* روی عامل پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه (*Verticillium dahliae*) بررسی و ثابت شد که این جدایه ها با تولید متابولیت های فرار و آنتی بیوتیک قادرند از رشد میسلیوم های قارچ عامل بیماری جلوگیری کنند (۱). در تحقیق دیگری ثابت شد که در بین جدایه های گونه *B. subtilis* جدایه B_4 با ۸۴/۵۴ درصد بیشترین ممانعت رشدی را در آزمون تاثیر ترکیبات فرار روی *Verticillium dahliae* جداسازی شده از خیار داشت (۲). در تحقیقی میزان بازدارندگی رشد قارچ *Phytophthora capsici* (عامل بوته میری فلفل) توسط ترشحات مایع ۴ جدایه ۲۰۰۱، Bs، ۷۰۳ و ۱۰۶۱ باکتری *B. subtilis* (در غلظت ۱۵ درصد)

جدول ۱- مشخصات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه های گونه *Bacillus subtilis*

مشخصات	Bs4	Bs6	Bs7	Bs15	Bs19	Bs21	استاندارد (منبع ٦)
قطر سلول > ۱ میکرون	-	-	-	-	-	-	-
تحرّک	+	+	+	+	+	+	+
موقعیت مرکزی اسپور	+	+	+	+	+	+	+
تولید اسید از دی ـ مانیتول	+	+	+	+	+	+	+
تولید اسید از زایلوز	+	+	+	+	+	+	+
تولید اسید از آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز کازئین	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+	+
تولید ایندول	-	-	-	-	-	-	-
لسیتیناز	-	-	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+
احیاء نیترات	+	+	+	+	+	+	+
رشد در ۵ درجه سلسیوس	-	-	-	-	-	-	-
رشد در ۴۵ درجه سلسیوس	+	+	+	+	+	+	+
رشد در اسیدیته ۵/۷	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک طعام ۷٪	+	+	+	+	+	+	+
استفاده از سیترات	+	+	+	+	+	+	+
رشد غیر هوازی در محیط مایع گلوکز	-	-	-	-	-	-	-



شکل ۱- تاثیر متابولیت های جدایه های باکتری *B. subtilis* روی ریسه های *M. phaseolina* (دفورمه شدن، لیز، تورم و واکئوله شدن ریسه ها)

شکل ۲- مقایسه علائم پوسیدگی ریشه و طوقه در تیمارهای مختلف: شاهد فاقد قارچ (سمت راست)، آلوده تنها با قارچ (وسط) و تیمار قارچ + باکتری (سمت چپ)

جدول ۲- بررسی اثرات مختلف آنتاگونیستی جدایه های باکتری *Bacillus subtilis* علیه عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی (* اعداد دارای حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۵٪ با آزمون چند دامنه ای دانکن هستند)

تیمار		درصد بازدارندگی*		
بیمارگر	جدایه باکتری	کشت متقابل	ترکیبات فرار	ترکیبات غیرفرار
MP-S2	Bs4	۶۰/۱ c	۶۲/۸ b	۶۸/۲ ab
MP-S2	Bs6	۶۲/۴ c	۵۹/۲ c	۶۱/۷ c
MP-S2	Bs7	۶۶/۸ b	۵۹/۵ c	۶۲/۵ c
MP-S2	Bs15	۵۴/۷ d	۶۶/۵ a	۶۷/۴ b
MP-S2	Bs19	۶۹/۵ a	۴۲/۷ d	۷۰/۴ a
MP-S2	Bs21	۵۰/۱ e	۶۴/۵ ab	۶۰/۴ c

جدول ۳- بررسی اثرات مختلف جدایه های *Bacillus subtilis* بر فاکتورهای رشدی گیاه و شدت بیماری در گلخانه

تیمار قارچ	تیمار باکتری	ارتفاع گیاه (سانتی متر)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	شدت بیماری
MP-S2	-	*۱۴/۲ f	۱۵/۴ f	۱/۶۱ f	۵/۵۲ a
MP-S2	Bs4	۲۵/۵ c	۲۶/۴ c	۲/۸۷ c	۳/۳۶ e
MP-S2	Bs6	۲۲/۸ d	۲۳/۵ d	۲/۴۱ d	۳/۸۰ c
MP-S2	Bs7	۲۴/۳ c	۲۶/۴ c	۲/۷۱ cd	۳/۶۰ c
MP-S2	Bs15	۱۸/۴ e	۱۹/۴ e	۲/۱۸ e	۴/۱۶ b
MP-S2	Bs19	۲۴/۴ c	۲۶/۵ c	۲/۷۸ c	۳/۵۲ d
MP-S2	Bs21	۲۱/۸ d	۲۲/۹ d	۲/۳۴ d	۳/۹۲ bc
-	-	۲۸/۴ b	۳۱/۲ b	۳/۳۰ b	۰/۰۰ f
-	مخلوط ۶ جدایه	۳۴/۸ a	۳۸/۶ a	۴/۲۱ a	۰/۰۰ f

(* اعداد دارای حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۵٪ با آزمون چند دامنه ای دانکن هستند)

به ترتیب ۵۶/۱۴، ۵۴/۱۹، ۴۴/۵۱ و ۴۱/۳۰ محاسبه شد (۴). در تحقیق دیگری ۳ جدایه B12، B80 و B83 گونه *B. subtilis* به ترتیب باعث کاهش ۱۷، ۳۷ و ۲۱ درصدی بیماری ناشی از پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا ناشی از *F. solani* f. sp. *phaseoli* در شرایط گلخانه ای شدند (۳). در تحقیقی دیگر، جدایه های *B. subtilis* با میانگین ۷۴/۱۱ درصد ممانعت خوبی را از رشد قارچ *Macrophomina phaseolina* در گیاه Pigeon pea داشتند (۲۷). آنزیم هایی همچون پروتئاز و متابولیت هایی همچون سیانید هیدروژن از مهم ترین ترکیبات با خاصیت آنتاگونیستی باکتری *Bacillus* به شمار می آیند (۱۷). همچنین ترکیباتی موسوم به لیپوپپتیدهای حلقوی را به عنوان متابولیت های با خاصیت آنتاگونیستی معرفی شده اند (۲۱). محققین توانستند باسیلوپپتین ها را از گونه *B. subtilis* (که متعلق به لیپوپپتیدهای حلقوی هستند) جداسازی کنند (۲۱). از مهم ترین متابولیت ها و آنتی بیوتیک های باکتری *B. subtilis* می توان به باسیلیسین، توکسی مایسین، سابتیلین، ایتورین، مایکوسابتیلین، فنجی مایسین، سورفکتین، ائومایسین، سابسپورین و باسیلومایسین اشاره کرد (۱۶، ۲۰ و ۲۶).

در تحقیق حاضر در شرایط گلخانه ای جدایه Bs4 نه تنها باعث کاهش معنی دار بیماری شد بلکه افزایش معنی داری را در فاکتورهای رشدی اندازه گیری شده داشت. در تحقیقی ثابت شد که جدایه های باکتری *B. subtilis* تنها با ترکیبات بیوشیمیایی باعث کاهش بیماری بوته میری گوجه فرنگی ناشی از *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای نمی شوند بلکه ظاهراً با تولید مواد محرک رشدی باعث افزایش فاکتورهای رشدی اعم از وزن اندام هوایی و ریشه نیز می گردند (۱۶). محققین توان القاء مقاومت توسط باکتری های آنتاگونیست به گیاه نخود را یکی از دلایل اصلی کنترل بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از *Macrophomina phaseolina* در این گیاه می دانند (۳۴). در تحقیقی اخیراً ثابت شد که جدایه هایی از *B. subtilis* نه تنها باعث کاهش معنی دار در پوسیدگی ریشه دانهال های نوعی کاج[1] شدند، بلکه باعث افزایش معنی دار در طول ریشه و اندام

1- *Pinus roxburghii* Sarg.

هـوایی و نیـز ارتفـاع گیاهچـه هـا پـس از ۹۰ روز گردیدند (۳۳). کاربرد جدایه های باکتری *Bacillus subtilis* باعث افزایش جذب نیتروژن و فسفر شده و در نهایت افزایش معنی دار در رشد گیاهچه هـای پسته داشته است (۱۵). اعتقاد بر این است کـه ایـن باکتری ها علاوه بر اثرات ضد میکروبی در خاک بـا تولید مواد تحریک کننده رشد و هورمون هـا و نیـز تحریک گیاه به جذب مـواد غـذایی و یـا از طریـق تبدیل مواد غذایی موجود در مواد آلی به مواد قابـل جذب (بـه ویـژه عنـصر فـسفر) بـرای گیـاه نقـش بیولوژیکی خود را ایفا می کنند (۱۸، ۲۳ و ۳۱).

با توجه به نتایج به دست آمـده از ایـن تحقیـق چنین به نظر می رسد که در تحقیقـات بیولوژیـک، تنهـا نتـایج آزمایـشگاهی کـه فقـط شـامل اثـرات آنتاگونیستی باکتری- بیمارگر است نمی تواند معیـار واقعی برای گزینش یا عدم گزینش یک جدایه برای انجام کارهای گلخانه ای و نهایتاً مزرعـه ای باشـد. نتایج برخی تحقیقات نـشان داده اسـت کـه اثـرات آنتاگونیستی جدایـه هـای بـاکتری *B. subtilis* بـا تغییر pH، میزان شوری و حتـی دمـای خـاک نیـز تغییر پیدا می کند (۲۸). با توجـه بـه اینکـه چنـین تفاوت هایی در شرایط آزمایشگاهی نیز مشاهده می شود بنابراین لزوم انجام آزمایشات بیشتر و تکمیلـی با در نظر گرفتن فاکتورهای مهم محیطی ذکر شده برای تمامی جدایه ها پیشنهاد مـی شـود. چـه بـسا جدایه هایی باشند که در شرایط آزمایشگاهی اثرات ضد قارچی کمی از خود نشان دهند ولی در شـرایط گلخانه ای با تحمل بیشتر به شرایط دمایی، شـوری و pH خـاک و بـه صـورت مکانیـسم هـای دیگـر همچون القاء مقاومت و افزایش رشد گیاه باعث فرار گیاه از بیماری گردند.

منابع

۱. آزاد دیسفانی، ف.، شریفی تهرانی، ع.، حجارود، ق.، محمدی، م.، و روحانی، ح. ۱۳۷۹. بررسی آنتاگونیستی جدایه های *Bacillus* و *Pseudomonas* روی قارچ *Verticillium dahliae* عامل پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان. ص ۵۷.

۲. احمدی فر، ف.، روستایی، ع.، شهریاری، د.، و خداکرمیان، غ. ۱۳۸۴. کنترل بیولوژیک پژمردگی خیار *Verticillium dahliae* به وسیله جدایه باکتری های باسیلوس و سودوموناس. مجله پژوهش کشاورزی آب، خاک و گیاه در کشاورزی. جلد ۵، شماره ۳، صص ۶۵-۷۸.

۳. اکبری، ا.، ظفری، د.، روحانی، ح.، و خداکرمیان، غ. ۱۳۸۴. بررسی فعالیت آنتاگونیستی باسیلوس های جدا شده از فراریشه علیه *Fusarium solani* عامل پوسیدگی فوزاریومی ریشه لوبیا. مجله پژوهش کشاورزی آب، خاک و گیاه در کشاورزی. جلد ۵، شماره ۳، صص ۵۴ -۷۰.

۴. اُمتی، ف.، شریفی تهرانی، ع.، محمدی، م.، حجارود، ق.، و زاد، ج. ۱۳۸۲. تأثیر آنتاگونیستی جدایه های *Bacillus* و *Pseudomonas* روی قارچ *Phytophthora capsici* عامل بوته میری فلفل. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۰، شماره ۴، صص ۴۵- ۵۴.

۵. پهلوانی، م. ه.، و رضوی، س. ا. ۱۳۸۶. تعیین نحوه واکنش سه ژنوتیپ گلرنگ در مقابل عامل بیماری پوسیدگی ذغالی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۴، شماره ۲، صص ۱۵۷-۱۶۴.

۶. تقی نسب، م.، روحانی، ح.، و کریمی، ا. ۱۳۸۶. بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه های *Bacillus subtilis* علیه بوته میری ناشی از *Pythium ultimum* Trow. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۴، شماره ۱، صص ۸۳ -۹۲.

۷. رعیت پناه، س.، و علوی، س. و. ۱۳۸۵. بررسی بیماری پوسیدگی ذغالی سویا در مازندران. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۳، شماره ۳، صص ۱۰۷- ۱۱۴.

۸. رهنما، ک. ۱۳۸۰. اهمیت مایکوپارازیت ها در کنترل بیماری های گیاهی خاکزی و معرفی ترکیبات نوین بیولوژیکی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۸، شماره ۲، صص ۱۱۱- ۱۲۱.

۹. رهنما، ک. ۱۳۷۵. بیوتکنولوژی و اهمیت آن در کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی در کشاورزی مدرن. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۳، شماره ۳، صص ۲۰- ۲۸.

۱۰. شاه حسینی، ع.، صانعی، س. ج.، و رضوی، س. ا. ۱۳۷۷. تأثیر آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* بر جداشده های *Verticillium dahliae* و *Macrophomina phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی. خلاصه مقالات دومین سمینار ورتیسیلیوم در ایران. ص ۱۱.

۱۱. طلیعی، ف.، صانعی، س. ج.، و رضوی، س. ا. ۱۳۸۶. بررسی تنوع جدایه های مختلف قارچ *Macrophomina phaseolina* در واکنش به کلرات. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۴، شماره ۳، صص ۱۴۰- ۱۴۷.

۱۲. عراقی، م. م.، رهنما، ک.، و تقی نسب، م. ۱۳۸۸. بررسی بیوکنترل عامل بوته میری گوجه فرنگی (*Rhizoctonia solani* Kühn) توسط *Bacillus subtilis*. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۶، شماره ۳، صص ۲۰۰- ۲۰۴.

۱۳. کاظم زاده، م.، پاداشت، ف.، خداکرمیان، غ.، و روستایی، ع. ۱۳۸۴. اثرات آنتی بیوزیس باکتری های آنتاگونیست سواسازی شده از مزارع برنج استان گیلان روی قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۲، شماره ۶، صص ۱۴۶- ۱۵۳.

۱۴. کریمی، ا. ۱۳۸۴. بررسی فعالیت آنتاگونیستی استرین های *Bacillus* و *Pseudomonas* جدا شده از فراریشه میخک روی پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی ارائه شده به دانشگاه بو علی سینای همدان، ۹۵ ص.

۱۵. محمودی زرندی، م.، فلاحیان، ف.، و فهیمی، ح. ۱۳۸۱. تأثیر مایه زنی توأم باکتری *Bacillus subtilis* و قارچ های اندومایکوریز بر رشد و عملکرد نهال پسته (*Pistacia vera* L.). مجله پژوهش و سازندگی. جلد ۱۵، شماره ۱، صص ۶۲ – ۶۸.

16. Asaka, O., and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* Rb14. Applied Environmental Microbiology, 62(11): 4081-4085.

17. Castric, K.F., and Castric, P.A. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Applied Environmental Microbiology, 42(2): 701-702.

18. El-Barougy, E., Awad, N.M., Turky, A.Sh., and Hamed, H.A. 2009. Antagonistic activity of selected strains of Rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of Soybean plants. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 5(3): 337-347.

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

20. Hiraoka, H., Asaka, O., Ano, T., and Shoda, M. 1992. Characteristics of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics itrun A and surfactin. Journal of Gene Applied Microbiology, 38: 635-640.

21. Kajimora, Y. Srgiyama, M., and Kaneda, M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. Journal of Antibiotics, 48(10): 1095-1103.

22. Keel, C., and Defago, G. 1997. Interaction between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanism and ecological impact. pp: 27-46. In: Gange, A.C. and Brown, V. (eds). Multitrophic interaction in terrestrial systems, Black Well Scientific Publishers, London, UK., 286 p.

23. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature, 286: 885-886.

24. Kraus, J., and Loper, J. 1990. Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumbers by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies. Pp. 172-175. In: Keel, C., Koller, B., and Defago, G. (eds). Plant Growth Promoting Rhizobacter. The 2nd International Workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria- Interlaken, Switzerland, 325 p.

25. Liu, H., Pan, X., and Wang, J. 1995. Experiments on *Bacillus* strain producing antagonistic protein. China Journal of Biological Control, 11: 160-164.

26. Loeffler, W., Tschen, J.S.M., Vanittankom, N., Kugler, M., Khorpp, E., Hsich, T., and Wu, T.G. 1985. Antifungal effects of Bacilysin and Fengimycin from *Bacillus subtilis* F 29-3, a comparison with activity of other *Bacillus* antibiotics. Phytopathology, 115: 204-213.

27. Lokesha, N.M., and Benagi, V.I. 2007. Biological Management of Pigeon-pea dry root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 20(1): 54-56.

28. Montealegre, J.R., Reyes, R., Perez, L.M., Herrera, R., Silva, P., and Besoain, X. 2003. Selection of bio-antagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Electronic Journal of Biotechnology, 6(2): 115-127.

29. Ramezani, H. 2008. Biological control of root-rot of eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences, 4(2): 218-220.

30. Ravf, B.A., and Ahmad, I. 1998. Studies on correlation of seed infection to field incidence of *Alternaria alternata* and *Macrophomina phaseolina* in Sunflower. In Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, p 113.

31. Rodriguez, H., and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17: 319-339.

32. Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chum, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, 379 p.

33. Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C., and Maheshwari, D.K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 24: 1669-1679.

34. Srivastava, A.K., Singh, T., Jana, T.K., and Arora, D.K. 2001. Induced resistance and control of charcoal rot in *Cicer arietinus* (Chickpea) by *Pseudomonas fluorescens*. Canadian Journal of Botany, 79: 787-795.

35. Su, G., Suh, S.O., Schneider, R.W., and Russin, J.S. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology, 91: 120-126.

36. Trivedi, P., Pandey, A., and Palni, L.M.S. 2005. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21: 941-945.