

# بررسی تأثیر باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* در کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند

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

مائده شهیری طبرستانی<sup>۱</sup>، ماهرخ فلاحی رستگار<sup>۲</sup>، بهروز جعفرپور<sup>۲</sup> و حمید روحانی<sup>۳</sup>

م. شهیری طبرستانی<sup>۱</sup>، م. فلاحی رستگار<sup>۲</sup>، ب. جعفرپور و ح. روحانی . ۱۳۸۳. بررسی تأثیر باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* در کنترل بیولوژیکی بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند. چغندر قند ۲۰(۲): ۱۷۵-۱۶۱

### چکیده

با توجه به قدرت بالای آنتاگونیستی باکتری *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn، اثر سه جدایه B.s.Ham، 204 و 202 در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بر بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند ناشی از *Rhizoctonia solani* مورد مطالعه قرار گرفت. در کشت دو طرفه روی محیط کشت PDA، کلیه جدایه‌ها توانستند از رشد *R. solani* جلوگیری کنند. متابولیت‌های فرار جدایه‌های *B. subtilis* به خوبی رشد میسلیم *R. solani* را کنترل نمودند. قابلیت بازدارندگی متابولیت‌های فرار جدایه‌های *B. subtilis* تحت تأثیر چند محیط کشت مطالعه شد. در این آزمایش، جدایه B.s.Ham روی محیط کشت PDA با ۶۲/۲۲ درصد بازدارندگی، بهترین اثر را در جلوگیری از رشد میسلیم *R. solani* نشان داد. اثر بازدارندگی پنج غلظت (۲۵-۱۵-۱۰-۵-۲ درصد) ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های باکتری در جلوگیری از رشد *R. solani* بررسی شد و مشخص گردید که غلظت ۲۵ درصد ترشحات مایع خارج سلولی جدایه B.s.Ham با ۷۳/۷۰ درصد، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیم *R. solani* دارد. در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص شد که پوشش دادن بذر چغندر قند با عوامل آنتاگونیست (Seed coating) و یا اضافه نمودن آن‌ها به خاک (Soil drenching) در کاهش مرگ و میر گیاهچه‌ها در فاصله ۳۰ روز پس از کاشت، تأثیر خوبی دارد و از این نظر بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در بین جدایه‌ها، B.s.Ham با ۶۴/۵۹ درصد نسبت به شاهد آلوده، بهترین تأثیر را در کنترل این بیماری داشت. در مجموع، اضافه نمودن باکتری‌های آنتاگونیست به خاک نسبت به پوشش دادن بذر، در کاهش مرگ و میر گیاهچه مؤثرتر بوده است.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، مرگ گیاهچه چغندر قند، *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*

۱- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی از دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان

## مقدمه

بتوان به طور مؤثرتری این بیماری را مهار نمود. با توجه به آن که قارچ *R. solani* خاکزی است و برای بقای ساپروفیتی و گسترش خود در خاک، توده‌های متراکم و سخت میسلیومی تولید می‌کند، لذا علی‌رغم تأثیر نسبی پاره‌ای از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، به نظر می‌رسد کاربرد ترکیبات شیمیایی جهت مهار بیماری، از نظر اقتصادی و زیست محیطی قابل توجه نمی‌باشد. بدین جهت تصور میشود کنترل بیولوژیکی یکی از روش‌های مناسب مبارزه با این بیماری باشد.

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

قارچ *Rhizoctonia solani* از مهمترین عوامل مرگ گیاهچه چغندرقد می‌باشد. این بیمارگر موجب پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقد نیز می‌شود. قارچ‌های دیگری نظیر *Pytium ultimum*، *Phoma betae*، *P.aphanidermatum* و *Aphanomyces cochlioides* نیز مسبب مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندرقد می‌باشند (Whitney and Duffus 1986) که بجز *A. cochlioides* بقیه نیز از مناطق مختلف چغندرکاری ایران گزارش شده‌اند (ارشاد ۱۳۷۴؛ عباسی مقدم و همکاران ۱۳۷۷؛ کاشی و همکاران ۱۳۷۹). گری و گریک (Gray and Gerik 1998) طی تحقیقی اعلام نمودند استفاده از بذره‌های چغندرقد با کیفیت بالا که با قارچکش‌های تیرام و آپرون تیمار شده‌اند، تا حدی می‌تواند بیماری مرگ گیاهچه چغندرقد را مهار نمایند. هم چنین اظهار داشتند، افزودن مواد آلی به خاک موجب افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های بازدارنده رشد قارچ *R. solani* می‌شوند، لذا افزودن بقایای گیاهانی مانند جو، ذرت و یولاف به همراه کود شیمیایی نیتروژن‌دار (به منظور تسریع در تجزیه بقایای گیاهی) به خاک، کاهش میزان بیماری مرگ گیاهچه چغندرقد را در پی دارد. ایشان ابراز امیدواری نمودند، با توجه به تحقیقات اخیر در زمینه استفاده از عوامل بیولوژیک جهت کنترل این بیماری،

آنتاگونیست‌های مؤثر *R.solani* (عامل مرگ گیاهچه پنبه)، توانست ریشه پنبه را در طول ۱۰-۰ سانتی‌متری آن برای بیش از چهارماه کلنیزه کند. در بررسی کارایی *B.subtilis* در کنترل پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه نخودفرنگی مشخص شد ترشحات خارج سلولی این باکتری در شرایط آزمایشگاهی علیه *R.solani* اثر بازدارنده داشته و در شرایط گلخانه‌ای نیز توانسته میزان آلودگی به *R.solani* و در نتیجه علائم پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه نخود را به میزان چشمگیری کاهش دهد (Hwang and Chakravarty 1992). فیدامن و رسال (Fiddaman and Rossal 1993) طی گزارشی اعلام نمودند، استرین (*B.subtilis* (NCIMB 12376) ترکیبات فرار ضد قارچی علیه *R.solani* تولید می‌کند که رشد قارچ در حضور آن به شدت کاهش می‌یابد. باتوجه به قدرت بالای آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* و ماندگاری آن به دلیل تولید اندوسپور و استفاده مؤثر آن به صورت پودر وتابل (Turner et al. 1991)، اثر ۳ جدایه دریافتی از باکتری روی قارچ *Rhizoctonia solani* در آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### ۱- آزمون بیماریزایی *R. solani*

Loffler et al. 1986; Mckeen et al. 1986; Ferreira et al. 1991; Kajimora et al. 1995). باکتری *B.subtilis* از طریق رقابت با باکتری‌ها و قارچ‌های مضر موجب افزایش رشد گیاه می‌شود. وجود ترکیب اسید جیبرلیک در عصاره کشت باکتری، اثر مستقیم *B.subtilis* را بر رشد گیاه نشان داده است. به این ترتیب باکتری با تغییر فعالیت هورمونی و افزایش رشد بخصوص رشد ریشه، موجب افزایش سطح جذب، افزایش رشد گیاه، فرار گیاه از بیماری‌های مختلف و افزایش محصول خواهد شد (McKeen et al. 1986). استفاده از باکتری‌ها (از جمله باکتری *B.subtilis*) به منظور افزایش رشد گیاه و میزان محصول در سال ۱۹۵۰ در روسیه آغاز گردید و در سال ۱۹۷۰ اعتبار علمی آن به تأیید رسید (رجوع شود به امتی ۱۳۷۷). استرین *B.subtilis* A-13 به صورت تجاری با نام Quantum 4000 وارد بازار شده و به صورت آغشته کردن با بذر بادام زمینی، پنبه ولویبا استفاده شده و باعث افزایش عملکرد گردیده است (Turner et al. 1991). دان لیوی (Dunleavy 1955) باکتری *B.subtilis* را علیه *R.solani* (عامل مرگ گیاهچه چغندر قند) به کار برد و نتیجه گرفت که این باکتری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه کنترل خوبی علیه بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند داشته است. مک نایت و رسال (Mcnight and Rossal 1990) در تحقیقی نشان دادند، استرین *B.subtilis* MBI 600 یکی از

## ۲- بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه های

### *B. subtilis* در برابر قارچ *R. solani*

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

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

## ۳- بررسی مکانیسم تأثیر جدایه‌های

### *Bacillus subtilis*

جدایه‌ای از *R. solani* جدا شده از گیاهچه‌های بیمار جمع‌آوری شده از مزارع حومه مشهد، دریافتی از مهندس عباسی (عضو هیئت علمی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی خراسان) در آزمایشات بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون با استفاده از روش لایه مایه تلقیح (Inoculum Layer Technique) انجام شد. بدین ترتیب که درون هر گلدان پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتی‌متر، حدود ۲۵۰ سانتی‌مترمکعب خاک استریل ریخته شد. یک ظرف پتری نه سانتی‌متری از کلنی هفت روزه قارچ *R. solani* روی محیط کشت آب آگار دو درصد (پس از خرد نمودن) به خاک اضافه شد. سپس ۵۰ سانتی‌مترمکعب دیگر از خاک استریل روی آن افزوده شد. جهت تیمار شاهد از محیط آب آگار دو درصد خالص فاقد کشت قارچ استفاده گردید. سپس ۱۲ عدد بذر چغندر قند رقم ۷۲۳۳ که قبلاً توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و دو بار با آب مقطر استریل شستشو شده بودند، با فواصل مساوی درون گلدان کشت شدند. برای هر تیمار چهار تکرار (گلدان) در نظر گرفته شد. پس از ۱۸ روز نگهداری در شرایط گلخانه با دمای  $7 \pm 26$  درجه سانتی‌گراد، گیاهچه‌های دارای علائم باریک و سیاه شدن طوقه، به آزمایشگاه منتقل گردیدند. از محل آلودگی روی محیط غذایی PDA کشت شد. قارچ رشد یافته جداسازی و مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن مورد بررسی قرار گرفت.

الف- بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری این آزمایش مطابق روش سینگ و دورال (Singh and Deveral 1984) انجام شد و هدف از انجام آن، بررسی توانایی غلظت‌های مختلف ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ *R.solani* بود. بدین منظور یک لوپ از محیط کشت ۲۴ ساعته هر جدایه آنتاگونیست در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب زمینی، دکستروز (Potato dextrose broth) که قبلاً استریل شده بود، کشت داده شد. بعد از هفت روز که ارلن‌های حاوی جدایه آنتاگونیست در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر دورانی (orbital) با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد، محتویات هر ارلن پس از عبور از کاغذ صافی واتمن شماره یک با نیروی ۱۰۰۰۰ gr (گردان ۱۴، BECKMAN Model J2) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محتویات هر ارلن به طور جداگانه توسط دستگاه پمپ خلأ و صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۴۵ میکرومتری، فیلتر شدند. برای بررسی تاثیر عصاره حاصله، ابتدا محیط کشت PDA با حجم‌های ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۱۹/۶۰۰ میلی‌لیتر درون لوله ریخته شد و پس از استریل نمودن، به ترتیب ۵۰۰۰، ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست، به

لوله‌های حاوی PDA با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و مخلوط شد و سپس به ظروف پتری استریل انتقال یافت. برای هر غلظت از عصاره، سه تکرار تهیه شد. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع (PD) فاقد باکتری که از صافی ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شده بود، استفاده گردید. پس از انعقاد محیط کشت، یک حلقه ۵ میلی‌متری از حاشیه کلنی‌های فعال کشت سه روزه ریزوکتونیا، در وسط هر ظرف پتری قرار داده شد. ۹۶ ساعت پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای  $26 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی ریزوکتونیا در ظروف پتری حاوی عصاره و ظروف پتری شاهد فاقد عصاره، اندازه‌گیری شدند. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل دو عاملی با متن کاملاً تصادفی به اجرا درآمد، فاکتور اول جدایه‌ها (شاهد، B.s.Ham، 204 و 202) و فاکتور دوم، غلظت در ۵ سطح بوده است.

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

$$100 \times \left( \frac{\text{میانگین قطر رشد میسلیم در تیمار - میانگین قطر رشد میسلیم در شاهد}}{\text{میانگین قطر رشد میسلیم در تیمار}} \right) = \text{درصد ممانعت از رشد}$$

میانگین قطر رشد میسلیم در شاهد      میسلیم قارچ عامل بیماری

میسلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح یک درصد و پنج درصد انجام شد. برای تعیین درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری، از رابطه ذکر شده در بند الف-۳ استفاده گردید.

#### ۴- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست *B.subtilis* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقد در شرایط

##### گلخانه

باتوجه به اثرات مطلوب سه جدایه 202, B.s.Ham, 204 در شرایط آزمایشگاه، میزان تأثیر آن‌ها در کاهش مرگ گیاهچه چغندرقد در گلخانه به دو روش محلول‌پاشی خاک (Soil drenching) و آغشته سازی بذر (Seed coating) مورد مطالعه قرار گرفت. خاک گلدان‌ها به جز تیمار شاهد غیرآلوده، به نسبت ۱۰ درصد حجمی با اینوکولوم *R. solani* (قارچ تکثیرشده روی محیط آرد ذرت و ماسه استریل - به نسبت ۵ و ۹۵ درصد - به مدت یک ماه) جدا شده از مرحله گیاهچه چغندرقد، مخلوط شد. جهت تیمار شاهد غیرآلوده فقط آرد ذرت و ماسه استریل به همان مقدار بدون اینوکولوم *R. solani* استفاده شد. برای آلوده‌سازی خاک با جدایه‌های آنتاگونیست، از سوسپانسیون سلول باکتری‌های آنتاگونیست استفاده شد، بدین ترتیب که با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی یک قطره ماده خیس‌کننده (مایع ظرفشویی) در لیتر به هر

ب- بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری: این تحقیق مطابق روش فیدمان (Fiddaman 1993; Fiddaman 1994) انجام شد. در این آزمایش جهت کشت باکتری از سه نوع محیط کشت (Potato Dextrose Agar (PDA, Nutrient Agar حاوی دو درصد دی‌گلوکز (NAG) و Nutrient Agar (NA) به شرح زیر استفاده شد:

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کدوری از کشت ۷۲ ساعته جدایه‌های *B.subtilis* روی آگار غذایی حاوی دو درصد گلوکز، PDA و NA پخش شد. ۲۴ ساعت پس از قرار دادن ظروف پتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در بالای هر یک از ظروف پتری حاوی جدایه آنتاگونیست، ظرف پتری حاوی یک حلقه میسلیومی از کشت سه روزه ریزوکتونیا قرار داده شد و دور تا دور هر ظرف پتری با پارافیلیم و چسب مسدود شد. در تیمار شاهد حلقه‌های ۵ میلی‌متری از محیط PDA حاوی قارچ *R.solani* در مقابل ظروف پتری حاوی NAG.PDA و NA فاقد باکتری قرار داده شد. پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای  $26 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی ریزوکتونیا پس از چهار روز، اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، شامل چهار تیمار (202, B.s.Ham, 204 و شاهد) و سه تکرار (برای هر نوع محیط کشت) انجام شد و داده‌های به دست آمده از آزمایش (قطر رشد

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

## نتایج

### ۱- آزمون بیماری‌زایی *R.solani*

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

ظرف پتری حاوی کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها، باکتری‌های تولید شده شسته شدند و به نسبت ۱۰<sup>۱۰</sup> سلول باکتری در هر گرم خاک مرطوب گلدان‌ها مخلوط گردیدند. به همین ترتیب نیز برای آغشته‌سازی بذر به سلول باکتری‌های آنتاگونیست، سوسپانسیون با غلظت ۱۰<sup>۱۰</sup> سلول باکتری در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۲ گرم در لیتر صمغ عربی تهیه شد و بذرهاي چغندر قند (رقم ۷۲۳۳) به مدت ۳۰ دقیقه در آن غوطه‌ور گردیدند، سپس بذرها در زیر هود استریل خشک شدند. در هر گلدان ۱۲ عدد بذر چغندر قند کاشته شد. به منظور حذف هر گونه آلودگی احتمالی بذر مورد استفاده، قبل از کاشت، به مدت ۳ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضد عفونی شده و دو بار به وسیله آب مقطر استریل، شستشو و خشک گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. گلدان‌ها به مدت ۳۰ روز در شرایط گلخانه با حرارت  $26 \pm 7$  درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر سه روز، یک بار آبیاری شدند. تعداد گیاهچه‌های سالم در فاصله‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، شمارش و درصد گیاهچه‌های سالم محاسبه شد. درصد تلفات گیاهچه‌های چغندر قند در اثر قارچ عامل بیماری، از رابطه زیر بدست آمد.

۱۰۰ × (تعداد گیاهچه‌های سالم موجود در تیمار - تعداد گیاهچه‌های سالم موجود در شاهد غیر آلوده)

تعداد بوته‌های سالم موجود در شاهد غیر آلوده

جدول ۱ درصد مرگ و میر گیاهچه‌های چغندر قند تلقیح شده با قارچ *R. solani*  
**Table 1** Percent of mortality of sugar beet seedlings inoculated by *R. solani*

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

الف- نتایج بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) جدایه‌های *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری: براساس مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲)، هر سه جدایه *B. subtilis*، با تولید ترشحات مایع، موجب کاهش رشد میسلیم قارچ *R.solani* شدند که در این میان جدایه B.s.Ham بیشترین و جدایه 202 کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری داشتند. با افزایش غلظت ترشحات مایع خارج سلولی در محیط کشت، تأثیر آن‌ها در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ، افزایش یافت. به طوری که در این آزمایش تأثیر غلظت ۵۰۰۰ میکرو لیتر (۲۵ درصد) بیشتر از سایر غلظت‌ها بود (نمودار ۱).

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

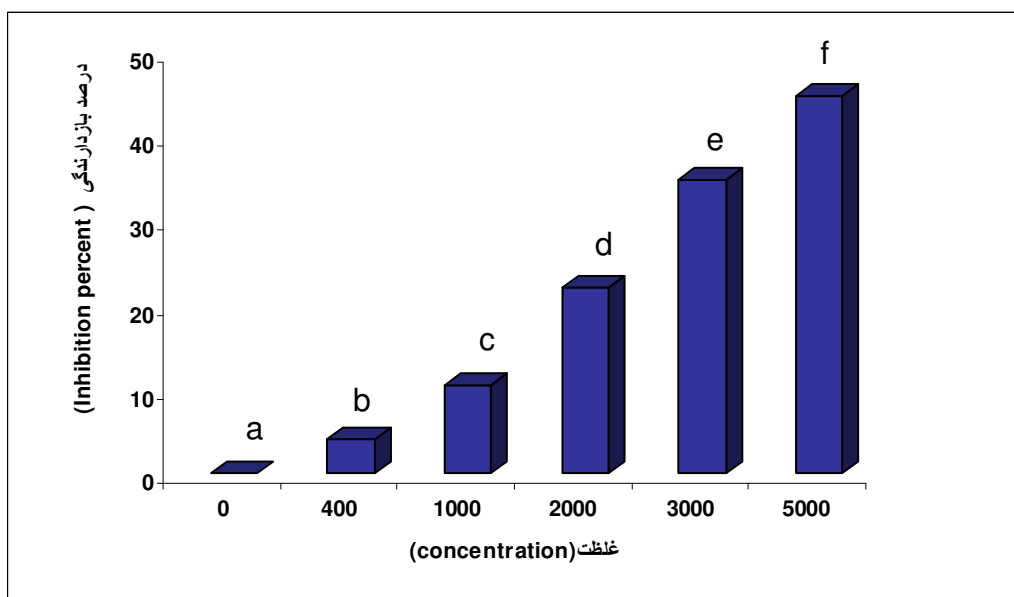
در این بررسی، میانگین قطر هاله بازدارنده هر یک از جدایه‌ها در سه تکرار اندازه گیری شد که بیشترین مقدار مربوط به جدایه B.s.Ham به اندازه ۲۳ میلی‌متر بوده است. این مقدار در جدایه‌های 204 و 202 به ترتیب ۱۲ و ۹ میلی‌متر تعیین گردید. باتوجه به این که میانگین قطر هاله بازدارنده هر سه جدایه فوق بیشتر از ۵ میلی‌متر بود، هر سه جدایه در بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

## ۳- مکانیسم تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtilis*



جدول ۲ تأثیر ترشحات مایع جدایه‌های باکتری *B.subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیموم قارچ *R.solani*  
**Table 2** Effect of culture filtrates of *B.subtilis* isolates on inhibition of mycelial growth of *R.solani*

گروه بندی تیمارها		درصد بازدارندگی Inhibition Percent	میانگین قطر کلنی (میلی متر) Average of Colony's Diameter (mm)	جدایه (Isolate)
Treatments	Classification			
5%	1%			
d	c	32.96	60.33	B.s.Ham
c	b	13.96	77.44	204
b	b	11.42	79.72	202
a	a	0	90	Control



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

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

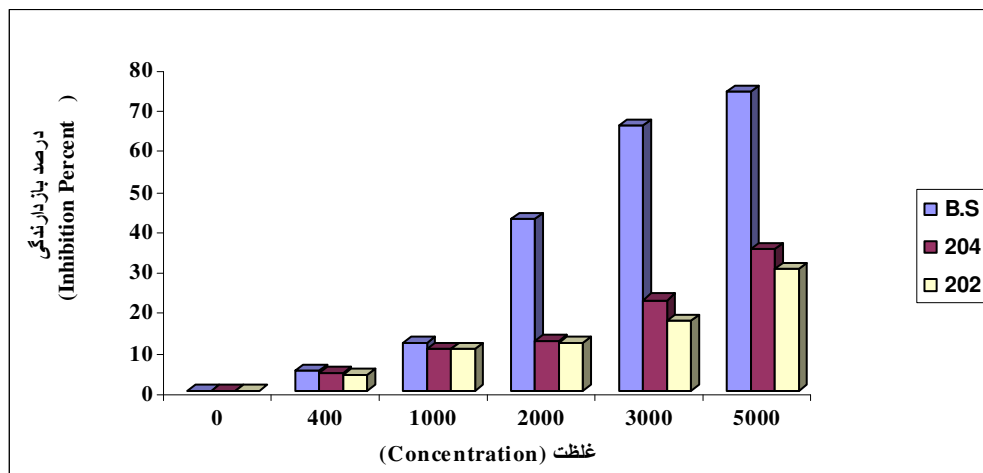
اثر دو جدایه 202 و 204 به ترتیب ۳۴/۸۱ و ۲۵/۹۲ درصد بوده است. در این غلظت بین تیمارها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد و پنج درصد وجود داشت. در غلظت ۳۰۰۰ میکرولیتر (۱۵ درصد) و ۲۰۰۰ میکرولیتر (۱۰ درصد)، بیشترین درصد بازدارندگی مربوط

بر اساس مقایسه میانگین اثرات متقابل، در غلظت ۵۰۰۰ میکرولیتر (۲۵ درصد) ترشحات مایع خارج سلولی جدایه B.s.Ham با ۷۳/۷۰ درصد، نسبت به شاهد، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیموم قارچ *R.solani* داشته است. در حالی که در این غلظت،

مشاهده نشد. کلیه جدایه‌ها در غلظت ۴۰۰ میکرولیتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند (نمودار ۲).

به جدایه B.s.Ham بود و دو جدایه 204 و 202 دارای تأثیر نسبتاً یکسانی بودند (دو جدایه اخیر در یک گروه آماری قرار گرفتند).

در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر (۵ درصد) و ۴۰۰ میکرولیتر (۲ درصد) بین تیمارها تفاوت معنی‌داری



نمودار ۲ تأثیر غلظت‌های مختلف ترشحات مایع جدایه‌های مختلف *B. subtilis* در جلوگیری از رشد میسلیم *R. solani*  
**Fig. 2** Effect of different concentrations of culture filtrates belonging to 3 isolates of *B. subtilis* on inhibition of mycelial growth of *R. solani*

درصد بازدارندگی ۳۰ (PDA)، ۴۰/۷۴ (NAG) و ۲۵/۵۵ (NA)، کمترین تأثیر را نسبت به شاهد، در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ *R. solani* داشتند. در هر محیط، بین تیمارها و هم چنین بین تیمارها و شاهد، تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح یک درصد و پنج درصد وجود داشت. براساس داده‌های به دست آمده از هر محیط، هریک از جدایه‌ها در یک گروه آماری مجزا قرار گرفتند.

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

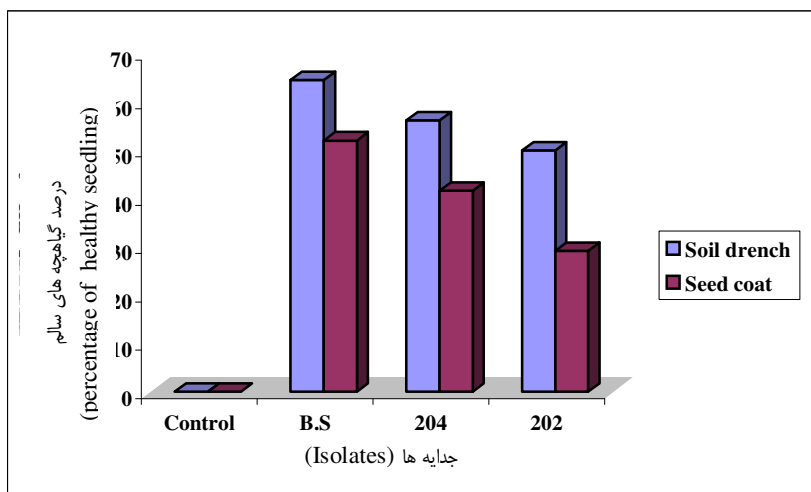
ترشحات فرار تمام جدایه‌ها در هر سه محیط کشت PDA، NAG و NA توانستند از رشد میسلیم قارچ *R. solani* جلوگیری کنند. که در این میان، ترشحات فرار جدایه B.s.Ham در هر سه محیط، با درصد بازدارندگی ۶۲/۲۲ (PDA)، ۶۰/۱۳ (NAG) و ۵۳/۳۳ (NA) بیشترین و جدایه 204 در سه محیط، با

#### ۴- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست *B.subtilis* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندر قند در شرایط گلخانه

نتایج حاصل از یادداشت‌برداری ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت نشان داد، درصد تلفات گیاهچه‌ها ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت به ترتیب ۵۲/۰۷، ۷۵ و ۱۰۰ درصد می‌باشد. این میزان در شاهد غیرآلوده در هر سه زمان یادداشت‌برداری صفر بود. البته عدم ظهور گیاهچه به دلیل پوسیدگی بذر نیز در تعدادی از گلدان‌های تیمار آلوده به *R.solani* مشاهده گردید که این موارد نیز به عنوان گیاهچه‌های تلف شده در نظر گرفته شد. بر اساس درصد گیاهچه‌های سالم ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، مشخص شد بین تیمارها و شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری وجود داشت. به طوری که ۳۰ روز پس از کشت بذر چغندر قند، درصد گیاهچه‌های سالم در شاهد آلوده صفر می‌باشد اما این میزان در تیمارهای حاوی جدایه‌های *B.s.Ham*، ۲۰۴ و ۲۰۲ در روش محلول‌پاشی خاک (Soil drenching) به ترتیب

۶۴/۵۹، ۵۶/۲۵ و ۵۰ درصد و در روش آغشته‌سازی بذر (Seed coating) به ترتیب ۵۲/۰۸، ۴۱/۶۶ و ۲۹/۱۶ درصد می‌باشد. این میزان در شاهد غیرآلوده ۱۰۰ درصد است. بررسی‌های آماری نتایج حاصل از درصد گیاهچه‌های سالم ۳۰ روز پس از کشت (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح ۱٪ و ۵٪)، سه گروه آماری مشخص را بین تیمارها نشان داد که این سه گروه به ترتیب قدرت قابلیت کنترل کنندگی مرگ میر گیاهچه چغندر قند عبارتند از:

- ۱- جدایه *B.s.Ham* در روش محلول‌پاشی خاک.
  - ۲- جدایه‌های ۲۰۴ و ۲۰۲ در روش محلول‌پاشی خاک و جدایه *B.s.Ham* در روش آغشته‌سازی بذر.
  - ۳- جدایه‌های ۲۰۴ و ۲۰۲ در روش آغشته‌سازی بذر.
- در این بررسی‌ها جدایه *B.s.Ham* در روش محلول‌پاشی خاک با ۶۴/۵۹ درصد، بهترین قابلیت کنترل کنندگی بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند را از خود نشان داد (نمودار ۳).



نمودار ۳ تأثیر جدایه‌های باکتری *B.subtilis* (B.s=*B.s.Ham*، ۲۰۴، ۲۰۲) در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندر قند ۳۰ روز پس از کشت  
**Fig. 3** Inhibitory effect of *B.subtilis* isolates (B.s=*B.s.Ham* , 204, 202) on sugar beet damping-off 30 days after sowing

## بحث

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

میسلیوم قارچ فوق) را در مقایسه با محیط کشت NA افزایش داده است. هاول (Howell) به این نتیجه رسید، با افزودن کربوهیدرات‌ها به محیط کشت باکتری، تولید آمونیاک توسط *Enterobacter cloacae* جهت جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P.ulimum* متوقف می‌گردد (به نقل از Fiddaman and Rossal 1993).

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

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص شد، بیشترین تلفات گیاهچه‌های چغندر قند در اثر *R.solani* در ۱۰ روز اول پس از کشت به صورت تدریجی ظاهر می‌گردد. ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، شدت مرگ و میر نسبت به میزان اولیه آن در ۱۰ روز اول پس از کشت، کاهش یافت. احمدی نژاد (۱۳۵۲) نیز نشان داد علی‌رغم این که گیاهچه‌های آلوده به این قارچ تا ۵۰ روز پس از ظهور هم پا برجا می‌مانند، اما حداکثر مرگ و میر در ۱۰ روز اول بعد از ظهور گیاهچه می‌باشد و ۲۰ روز بعد، تلفات بسیار کم می‌شود. برتری جدایه B.s.Ham در بررسی‌های گلخانه‌ای باتوجه به نتایج حاصل از

بهبتر از روش پوشش دادن بذر، مرگ گیاهچه چغندر قند را کاهش می‌دهند. بدیهی است در روش محلول‌پاشی خاک، جمعیت بالاتری از سلول‌های باکتری در تماس با خاک اطراف بوته قرار می‌گیرند، درحالی که در روش آغشته‌سازی بذر، سلول‌های باکتری کمتری به سطح بذر می‌چسبند. جی و همکاران (Jee et al. 1988) نیز در تحقیقی نشان دادند، کاربرد *B.subtilis* به صورت افزودن سوسپانسیون باکتری به خاک، مؤثرتر از غوطه‌ور کردن ریشه‌های فلفل در سوسپانسیون باکتری می‌باشد.

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

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

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت، تمام تیمارهای مورد مطالعه در این تحقیق در روش محلول‌پاشی خاک،

## References

## منابع مورد استفاده

- احمدی نژاد، ا. ۱۳۵۲. مرگ گیاهچه چغندر قند در ایران و کاربرد چند قارچ کش علیه عوامل مولد آن. مجله بیماری های گیاهی، جلد ۹ شماره های ۳ و ۴. صفحه های ۱۲۹ الی ۱۴۱
- ارشاد، ج. ۱۳۷۴. قارچهای ایران. نشر سازمان تحقیقات کشاورزی. ۸۷۴ صفحه
- امتی، ف. ۱۳۷۷. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Phytophthora capsici* عامل بوته میری فلفل. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۰۴ صفحه
- عباسی مقدم، ا. فلاحتی رستگار، م و جعفرپور، ب. ۱۳۷۷. اتیولوژی پوسیدگی های ریشه و طوقه چغندر قند در استان خراسان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۱۲۶
- کاشی، ل. سلیمانی، م. ج و کارگرییده، ا. ۱۳۷۹. پوسیدگی پیتیومی ریشه چغندر قند در مزارع استان همدان. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. صفحه ۲۵۳
- Baker CJ, Stavely JR, Mock N (1985) Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease, vol.69: 770-772
- Besson F, Michel G (1986) Isolation and characterization of new Iturins: Iturin D and Iturin E. The Journal of antibiotics, vol.4: 437-442
- Dunleavy J (1955) Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis* Phytopathology, Vol.45:252-258
- Ferreira JHS, Matthee FN, Thomas AC (1991) Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology, vol.81(3):283-287
- Fiddaman PJ, Rossal S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, vol.74:119-126
- Fiddaman PJ, Rossal S (1994) Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, vol.76:395-405
- Gray FA, Gerik JS (1998) Biology and management of sugar beer diseases in the Big Horn and wind River Basins of Wyoming. University of Wyoming, Cooperative Extension Service Bulletin. B-1063, 23pp

- Henis Y, Inbar M(1968) Effect of *Bacillus subtilis* on growth and sclerotium formation by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*,vol.58: 933-938
- Hwang SF, Chakravarty P(1992) Potential for the integrated control of *Rhizoctonia* root rot of *Pisum sativum* using *Bacillus subtilis* and a fungicide. *Journal of Plant Disease and Protection*,vol.99(6): 626-636
- Jee HJ,Nam CG, Kim CH(1988) Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red pepper.I.Isolation of antagonists and evaluation of antagonistic activity in vitro and green house.*Plant Pathology*, vol.4(4):305-312
- Kajimora Y, Svyiyama M, Kaneda M(1995) Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* FR-2.*The Journal of Antibiotics*,vol.48(10)1095-103
- Loeffler W, Tschen JSM, Vanittanakom N, Kugler M, Knorpp E, Hsieh TF, Wu TG(1986) Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3.A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*, vol.115:204-213
- Mckeen CD, Reilly CC, Pusey PL(1986) Production and partial characterization antifungal substances antagonistic to *Monilinia fracticola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, vol.76(2): 136-139
- Mcknight SE, Rossal S(1990) Root colonization of cotton seedlings by *Bacillus subtilis* (MBI 600). In: plant growth promoting rhizobacteria. Keel C, Koller B, Defago G. The second international workshop on plant growth promoting rhizobacteria. Interlaken, Switzerland.
- Singh J, Deveral BJ(1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transaction of British Mycological Society*,vol.83(3): 484-490
- Turner JT, Backman PA(1991) Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, vol.75: 347-353
- Whitney ED, Duffus JE(1986) *Compendium of beet diseases and insects*. APS