Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 47, No 2, Autumn & Winter 2016-2017 (325-340)
DOI: 10.22059/ijpps.2017.215928.1006738

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵ (ص ۳۴۰-۳۲۵)

بررسی برخی ویژگی‌های بیوکنترلی باکتری‌های آنتاگونیست جداشده از ریزوسفر خیار علیهٔ *Sclerotinia sclerotiorum* و *Pythium aphanidermatum*

سامان باقری[۱]، حمیدرضا علیزاده[۲*]، مهدی آزادوار[۳] و امیررضا امیرمیجانی[۲]
۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه جیرفت
۳. استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱۵)

چکیده

در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیک بیمارگرهای خاک زاد موردتوجه جدی محققان قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به کاربرد باکتری‌های آنتاگونیست به‌ویژه باکتری‌های گروه سودوموناد‌های فلورسنت در کنترل بیماری‌های خاکزی گیاهان اشاره کرد. بیمارگرهای *Sclerotinia sclerotiorum*، *Pythium aphanidermatum* از عامل‌های بیماری‌زای مهم گیاهان مختلف ازجمله خیار هستند. در این پژوهش ۸۱ جدایه از ریزوسفر خیار جداسازی، خالص‌سازی و بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی)، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. بررسی تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌ها به روش کشت متقابل نشان داد که جدایه‌های 19C، 21B، 24A، 33B، 33C، 38A، 42D و 43C اثر بازدارندگی مؤثری علیه این بیمارگرها داشتند و ترکیب‌های فرار این جدایه‌ها به‌طور معنی‌داری از رشد پرگنهٔ این بیمارگرها نسبت به شاهد بازدارندگی کردند. در آزمون گلخانه‌ای نیز جدایه‌های 19C و 24A میزان شاخص بیماری ناشی از *Pythium aphanidermatum* را بیش از ۷۰درصد و میزان شاخص بیماری ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* را بیش از ۶۰درصد در مقایسه با شاهد کاهش دادند. تولید سورفکتین، آنزیم پروتئاز و سیانید هیدروژن به‌عنوان سازوکارهای بازدارندگی در جدایه‌های برتر بررسی شدند. جدایه‌های، 19C، 24A، 33B، 33C، 38A، 42D و 43C قادر به تولید آنزیم پروتئاز، جدایهٔ 19C قادر به تولید سورفکتین و جدایه‌های 33B، 33C، 38A، 42D و 43C قادر به تولید سیانید هیدروژن بودند. نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌یابی ناحیهٔ ژنی 16S-rDNA جدایه‌های مؤثر در کنترل بیمارگرها نشان داد که این جدایه‌ها با درجهٔ اعتبارسنجی زیاد (۱۰۰ درصد) در کنار جدایه‌های متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Stenotrophomonas* و *Flavobacterium* قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پروتئاز، ترکیب‌های فرار، شناسایی مولکولی، کنترل بیولوژیک.

Evaluation of biocontrol characteristics of antagonistic bacteria isolated from cucumber rhizosphere against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pythium aphanidermatum*

Saman Bagheri[1], Hamidreza Alizadeh[2*], Mehdi Azadvar[3] and Amirreza Amirmijani[2]
1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Iran
(Received: Sep. 27, 2016 - Accepted: Dec. 5, 2016)

ABSTRACT

Biological control of soil-borne diseases of plants has received serious attention among plant pathologists in recent years. In this regard, Rhizobacteria, more specifically fluorescent pseudomonads are known as an effective biocontrol of plant diseases. *Pseudomonas* spp. are promising agents to manage the disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pythium aphanidermatum*. In this study, we screened 81 bacterial isolates from cucumber rhizosphere for their antagonistic effects against the pathogens using dual culture method and investigated their ability to produce inhibiting volatile metabolites. Results indicated that isolates 19C, 21B, 24A, 33B, 33C, 38A, 42D, and 43C had significant inhibitory effects on the pathogens and their volatile metabolites significantly reduced the mycelial growth of the pathogens in comparison with controls. In greenhouse trials, isolates 19C and 24A reduced disease index of *Pythium aphanidermatum* more than 70% and that of *Sclerotinia sclerotiorum* more than 60% compared with controls. The isolates 19C, 24A, 33B, and 33C were able to produce protease. Isolate 19C was able to produce surfactin and isolates 33B and 33C were able to produce hydrogen cyanide. Molecular identification of isolates was conducted based on partial sequence of 16srDNA amplified by specific primers fD1 and rD1 thereby the isolates showed significant homology with *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. and *Flavobacterium* spp.

Keywords: Biological control, molecular methods, protease enzyme, volatile compounds.

* Corresponding author E-mail: hamid6948@gmail.com; hamidalizadeh@ujiroft.ac.ir Tel: +98 912 566 5972

مقدمه

تأثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل بیمارگرهای خاکزی و هزینه‌های اقتصادی آن از یک‌سو و نگرانی‌های زیست‌محیطی از سوی دیگر، دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به‌عنوان یک چالش جدی فرا روی محققان قرار داده است (Sarani *et al*., 2007; Ahmadzadeh *et al*., 2003). کاربرد عامل‌های آنتاگونیستی در خاک و سطح گیاه می‌تواند جایگزین مناسب و بی‌خطری در جهت کنترل بیماری‌های خاک‌زاد باشد. عامل‌های آنتاگونیستی افزون بر اینکه اثر نامطلوب روی گیاه و محیط ندارند باعث افزایش عملکرد محصول نیز می‌شوند (Weller, 1988).

ریزجاندارانی (میکروارگانیسم‌هایی) که در ناحیهٔ ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند، گزینهٔ مناسبی برای استفاده در کنترل بیولوژیک هستند زیرا این ناحیه خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی است (Weller, 1988). سودوموناداهای فلورسنت بخش شایان‌توجهی از جمعیت میکروبی بومی را هم در خاک‌هایی که به‌طور طبیعی بازدارنده بوده و نیز خاک‌هایی که به‌طور مستمر زیر کشت یک محصول[1] قرار گرفته‌اند و یا با استفاده از تشعشع خورشیدی پاستوریزه شده‌اند، تشکیل می‌دهند (Ahmadzadeh *et al*., 2003). بررسی منابع منتشرشده نشان می‌دهد که نخستین گزارش در مورد نقش سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل بیماری‌های گیاهی مربوط به هاول و استیپانویک (۱۹۸۰) است (Omati *et al*., 2004). سودوموناس‌های فلورسنت ناحیهٔ ریزوسفر به‌طور مستقیم با تولید برخی هورمون‌های گیاهی و تحریک رشد گیاه و نیز به‌صورت غیرمستقیم از راه کنترل بیولوژیک بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آن‌ها می‌شوند (Weller, 1988). تولید پادزی (آنتی‌بیوتیک)ها (Fravel, 1988; Jamali *et al*., 2004)، سیدروفور[2] (Leong, 1986)، سیانید هیدروژن (Zdor & Anderson, 1992) و آنزیم پروتئاز (Keel *et al*., 1997) به‌عنوان مهم‌ترین سازوکارهای مؤثر در کنترل بیولوژیک عامل‌های بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتری‌ها به‌شمار می‌روند.

قارچ اسکلروتینیا به علت توزیع و دامنهٔ میزبانی گسترده و مشکلاتی که در کنترل بیماری ناشی از آن وجود دارد به‌عنوان یکی از بیمارگرهای مهم گیاهان در سراسر جهان شناخته شده است (Lumsden, 1979; Purdy, 1979; Steadman, 1979; Boland & Hall, 1994; Basak *et al*., 2002; Fernando *et al*., 2007; Mehata & Saharan, 2008). گونهٔ *S. sclerotiorum* از گونه‌های بسیار معروف این جنس است که سبب پوسیدگی سفید در گیاهان پرشماری می‌شود (Khodaparast, 2010).

استفاده از عامل‌های کنترل بیولوژیک به‌ویژه باکتری‌ها گزینهٔ مناسبی برای مبارزه با قارچ *S. sclerotiorum* است. تأثیر آنتاگونیستی باکتری‌های *Bacillus polymixa*، *B. subtilis* و *P. fluorescens* WB1 روی *S. sclerotiorum* به اثبات رسیده است (Akbari-kiaroudi *et al*., 2005). نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که جدایهٔ *P. fluorescens* بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد قارچ *S. sclerotiorum* و توسعهٔ بیماری در گلخانه داشته است (Mansuori-poor *et al*., 2009). Hui Li *et al*. (2011) با جدایهٔ *P. fluorescens* P13 که از ریزوسفر گیاه کلزا جداسازی شده بود، رشد پرگنهٔ *S. sclerotiorum* را ۸۴/۴ درصد و تشکیل اسکلروت را ۱۰۰-۹۵ درصد کاهش دادند و سازوکار اصلی کنترل را تولید سیانید هیدروژن توسط این جدایه، معرفی کردند. در بررسی انجام گرفته توسط Behboudi *et al*. (2005) همهٔ جدایه‌های مؤثر در کنترل بیماری *S. sclerotiorum*، باکتری‌های سودوموناس فلورسنت تشخیص داده شدند. ایشان بیان کردند توانایی جدایه‌ها در بازداری از رشد قارچ در تشتک پتری و تولید سیانید هیدروژن در ارتباط مستقیم هستند.

یکی دیگر از عامل‌های اصلی پوسیدگی طوقه و ریشهٔ خیار در ایران *Pythium aphanidermatum* است، که در مناطق گرم آسیب و زیان بیشتری وارد می‌کند. این گونه افزون بر مرگ سریع گیاهچه، باعث پوسیدگی ریشه و طوقه نیز می‌شود (Safari-Asl *et*

1. Monoculture
2. Sidrophorer

al., 2011). اگرچه قارچ *Rhizoctonia solani* و گونه‌های مختلف جنس *Fusarium* با مرگ گیاهچه در ارتباط هستند ولی گونه‌های *Pythium* شایع‌ترین علت مرگ گیاهچهٔ خیار است (Al-Sa'di *et al*., 2007). Naseby *et al*. (2001) نشان دادند که جدایه‌های سودوموناس با تولید متابولیت‌های ثانویه و نیز پرگنه شدن (کلونیزاسیون) ریشه باعث کنترل بیولوژیک پیتیوم روی ریشهٔ نخودفرنگی شدند. پژوهش‌های Khabbaz *et al*. (2014) نشان دادند که تولید سیدروفور، متابولیت‌های ثانویه (همچون آنزیم‌های لیتیک، ایندول استیک اسید، سالسیلیک اسید و سیانید هیدروژن) و هورمون‌های بهبوددهندهٔ رشد توسط سودوموناس‌ها سازوکار زیست‌کنترلی بیماری‌های پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچهٔ خیار است.

Zhou & Paulitz (1994) بیان کردند جدایه‌های سودوموناس فلورسنت با ایجاد مقاومت سیستمیک (ISR) باعث کنترل *P. aphanidermatum* در گیاه خیار شدند. Maheshwari (2013) پرگنه شدن ریشه و تولید ترکیب‌های فرار را عامل اصلی کنترل بیولوژیک علیه *Pythium* sp. و *Fusarium* sp. بیان کردند. هدف از انجام این پژوهش، بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری‌های مهم خیار (ناشی از *S. sclerotiorum* و *P. aphanidermatum*) با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی‌شده از ناحیهٔ ریزوسفر گیاه خیار در منطقهٔ جیرفت، بررسی توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضد قارچی و معرفی مؤثرترین جدایه‌های باکتری به‌منظور دستیابی به روش‌های سالم، ارزان‌تر و غیرشیمیایی مبارزه با این بیمارگرهای گیاهی است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ جدایه‌های آنتاگونیست و جدایه‌های بیمارگر

قارچ *S. sclerotiorum* از مجموعهٔ کشت‌های زندهٔ آزمایشگاه بخش بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران و بیمارگر *P. aphanidermatum* از مجموعهٔ کشت‌های زندهٔ آزمایشگاه بخش بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز تهیه شدند.

جداسازی باکتری‌ها و شناسایی اولیهٔ آن‌ها

برای جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از کشتزارها و گلخانه‌های منطقهٔ جیرفت نمونه‌هایی از خاک اطراف ریشهٔ بوته‌های خیار تهیه شد. ۱۰ گرم از خاک هر کشتزار در ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون سوسپانسیون شد. پس از تهیهٔ سری رقت، از سوسپانسیون‌های تهیه‌شده ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط کشت انتخابی S1 (حاوی ترکیب‌های: ۱۸ گرم آگار، ۱۰ گرم ساکارز، ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۵ گرم کازامینواسید، ۱ گرم بیکربنات سدیم، ۱ گرم سولفات منیزیم، ۱/۲ گرم سدیم لوریل سارکوزین، ۲/۳ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، و ۲۰ میلی‌گرم پادزی تری متوپریم در ۱ لیتر آب مقطر (Gould *et al*., 1985) کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد (Oedjijono *et al*., 1993). پس از ۲۴ ساعت پرگنه (کلونی)هایی به‌دست‌آمده برای خالص‌سازی روی محیط کشت کینگ ب آگار[1] تک کلونی شدند.

بررسی توان بازدارندگی جدایه‌های باکتری از رشد *S. sclerotiorum* و *P. aphanidermatum* در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی توان بازدارندگی از رشد بیمارگرها در شرایط آزمایشگاه، جدایه‌های باکتری به‌صورت نقطه‌ای و به فاصلهٔ ۱ سانتی‌متر از لبهٔ تشتک‌های پتری و در سه طرف تشتک‌های پتری حاوی مخلوط یکسان از محیط کشت KB و PDA مایه‌زنی و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. در تشتک پتری شاهد، از آب مقطر سترون استفاده شد. سپس قرص میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت جوان بیمارگرها در مرکز تشتک پتری قرار داده شد. این تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس تا پر شدن تشتک پتری شاهد به‌وسیلهٔ بیمارگر نگهداری شدند. فاصلهٔ موجود بین کلنی باکتری و بیمارگر (شعاع هالهٔ بازدارندگی[2]) برحسب میلی‌متر به‌عنوان معیاری برای ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها

1. King`s B medium
2. Inhibition zone

اندازه‌گیری شد. (Weller ; Hagedorn *et al*., 1989 & Cook, 1983; Keel *et al*., 1996).

تأثیر ترکیب‌های فرار جدایه‌های باکتریایی روی *S. sclerotiorum* و *P. aphanidermatum*

این آزمون بر پایهٔ روش Fiddaman & Rossall (1993) انجام گرفت. به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هریک از جدایه‌ها به‌صورت چمنی روی محیط KB آگار کشت داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. سپس به‌جای سرپوش تشتک‌ها یک تشتک دیگر حاوی محیط کشت PDA همراه یک دیسک به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت تازهٔ بیمارگر قرار داده شد. تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلم پوشانده و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۷-۳ روز نگهداری شدند. در تشتک پتری شاهد دیسک بیمارگر در مقابل پتری حاوی محیط KB بدون باکتری قرار داده شد. درصد بازدارندگی از رشد، از نسبت قطر پرگنه توسط هر تیمار، به قطر پرگنه در تشتک پتری شاهد محاسبه شد.

شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی جدایه‌های مؤثر

شناسایی ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و بیوشیمیایی جدایه‌ها با آزمون‌های گرم، کاتالاز، تولید لوان، لهانیدن سیب‌زمینی، رشد در نمک ۷ درصد به روش Schaad (1988)، لیستیناز به روش Lelliott *et al*. (1966)، هیدرولیز نشاسته به روش Graham & Hodgkiss (1977)، هیدرولیز کازوئین به روش Fahy & Hayward (1983) و واکنش بالا حساسیت به روش Lozano & Sequeira (1970) انجام گرفت.

شناسایی جدایه‌های مؤثر

شناسایی جدایه‌های که در دو آزمون کشت متقابل و ترکیب‌های فرار به‌عنوان مؤثرترین جدایه‌ها انتخاب شدند، به روش مولکولی و تعیین توالی بخشی از ناحیهٔ ژنی 16S rDNA و به‌صورت زیر انجام گرفت.

پس از استخراج DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن (Dashti *et al*., 2009) از آغازگرهای عمومی پروکاریوت‌ها (جدول۱) به‌منظور تکثیر قطعه‌ای به طول 1500bp از ناحیهٔ 16S rDNA استفاده شد (Weisburg *et al*., 1991).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای افزایش قطعه‌ای از ژن 16S rDNA جدایه‌های منتخب.

Table 1. Sequences of primers used for amplification of partial 16S rDNA of the isolates

Primer Name	Nucleotide sequence (5'--3')	Length (nt)
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	17

شرایط دمایی واکنش به‌صورت: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل: واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای ۴۸ درجهٔ سلسیوس و تکثیر رشته‌ها در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت دو دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ده دقیقه انجام گرفت. تعیین ترادف نوکلئوتیدی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط شرکت Bioneer (Seoul, South Korea) انجام گرفت. ویرایش توالی‌ها با نرم‌افزارهای GeneDoc و BioEdit انجام شد. توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی (GenBank) در پایگاه NCBI و با جستجوی بلاست (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مقایسه شدند. پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با نرم‌افزار BioEdit، تجزیهٔ توالی‌ها و ترسیم درخت تبارزایی (فیلوژنتیکی) به روش Neighbor-Joining توسط نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al*., 2011) انجام گرفت. ترسیم این درخت با حذف همهٔ فاصله‌ها و جایگاه‌های دارای خطا انجام شد. درجهٔ اعتبارسنجی (bootstrap) با هزار تکرار انجام شد.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های باکتریایی مؤثر در ویژگی آنتاگونیستی

بررسی تولید پادزی سورفکتین

به محیط آگار خونی (Blood Agar) که در دمای ۱۲۱C سترون شده بود، ۷ درصد خون گوسفند افزوده

شد. جدایه‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی این محیط کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس رشد داده شدند. به وجود آمدن هالهٔ روشن در اطراف پرگنه بیانگر فعالیت بیوسورفکانت یا سورفکتین تولیدشده توسط باکترهای مورد بررسی است (Nakano *et al*., 1988; Feignier *et al*., 1995).

بررسی تولید آنزیم پروتئاز

این آزمون بر پایهٔ روش Maurhofer *et al*. (1992) روی محیط کشت Skim Milk Agar (SMA) صورت گرفت. پس از کشت جدایه‌ها روی تشتک‌های حاوی SMA، آن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. تشکیل هالهٔ بی‌رنگ در اطراف پرگنهٔ باکتری نشانهٔ فعالیت آنزیم پروتئاز بود.

بررسی تولید سیانید هیدروژن

برای این منظور روی محیط KB، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری پخش شد. آنگاه کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲ درصد کربنات سدیم و ۵ درصد اسید پیکریک) درون در تشتک پتری قرار داده شد و در تشتک پتری با نوار پارافیلم بسته شد. پس از آن تشتک پتری‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و آجری، نشانهٔ تولید مقادیر مختلف HCN توسط باکتری بود (Alström, 1987).

بررسی‌های گلخانه‌ای

تهیهٔ زادمایهٔ جدایه‌های باکتری

زادمایهٔ جدایه‌های باکتری از کشت ۲۴ ساعته روی محیط کشت KB تهیه شد. سوسپانسیون باکتری در سولفات منیزیوم ۰/۰۱ مولار تهیه و پس از دوبار شستشوی یاخته‌ها با سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه) با روش طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتری) تعیین غلظت و درنهایت به میزان $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهندهٔ پرگنه در میلی‌لیتر (cfu/ml) باکتری به ازای هر گرم به خاک اضافه شد (Kim *et al*., 1997).

تهیهٔ زادمایه بیمارگرها و آزمون بیماری‌زایی

برای مایه‌زنی گیاهان از کشت سه روزهٔ قارچ *S. sclerotiorum* روی محیط کشت PDA استفاده شد. ساقهٔ خیارهای سه هفته‌ای در نزدیکی طوقه با یک چاقوی کوچک جراحی سترون‌شده زخم شد و قرص میسلیومی از حاشیهٔ پرگنهٔ فعال قارچ *S. sclerotiorum* به قطر ۵ میلی‌متر جداشده و روی محل زخم قرار داده شد آنگاه گیاهان با کیسه‌های پلاستیکی به مدت ۴۸ ساعت برای حفظ رطوبت بالا پوشیده شد. سپس کیسه‌ها برداشته شد و گیاهان در دمای ۲۵-۲۳ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵درصد در گلخانه تا بروز نشانه‌های نگه‌داری شدند (Baharlouei *et al*., 2011).

برای تهیهٔ زادمایهٔ *P. aphanidermatum* در آغاز بیمارگر روی محیط کشت PDA به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس رشد داده شد، پس از آن یک قطعهٔ ۵ میلی‌متری از پرگنهٔ بیمارگر در یک ارلن ۳۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ گرم بذر ارزن و ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار داده شد. فلاسک ارلن به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد. به ازای ۱ کیلوگرم خاک، ۴ گرم زادمایهٔ *Pythium* تولیدشده روی ارزن اضافه و در هر گلدان سه عدد نشاء دو برگی خیار کشت شد. به تیمار شاهد بذر ارزن سترون اضافه شد (Maurhofer *et al*., 1995).

بررسی تأثیر جدایه‌های باکتری روی بیمارگرهای خیار در شرایط گلخانه

خاک (ماسه، کمپوست و کود دامی به ترتیب به نسبت ۶:۱:۱) دو بار سترون با سوسپانسیون باکتری (CFU/g $۱۰^{۸}$) مخلوط و درون جعبهٔ نشاء ریخته شد. بذرهای خیار (رقم سوپر دومینوس) که با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی شده و با آب مقطر سترون دوبار شستشو داده شده بودند، درون جعبهٔ نشاها کشت و در گلخانه با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. برای تیمار شاهد از سولفات منیزیوم ۰/۰۱ مولار استفاده شد، سپس نشاهای خیار در مرحلهٔ دو برگی به خاک آلوده به بیمارگر (میزان ۴ گرم از زادمایهٔ تهیه‌شدهٔ پیتیوم روی ارزن به ازای هر

کیلوگرم خاک) انتقال داده شدند. در مورد اسکلروتینیا به گلدان‌های حاوی خاک سترون منتقل و آنگاه در محل طوقه مایه‌زنی انجام گرفت. در هر گلدان سه عدد نشاء کشت و تا ظهور نشانه‌های در گلخانه نگه‌داری شدند. این آزمایش برای هر دو بیمارگر در قالب طرح کامل تصادفی با هشت تیمار و سه تکرار انجام شد و هر تکرار شامل سه گیاه خیار بود. شاخص بیماری بر پایهٔ رابطهٔ زیر برای هر تکرار محاسبه شد (Cao *et al*., 2012).

$$\text{شاخص بیماری} = \frac{\Sigma\ \text{رتبه گیاه} \times \text{تعداد گیاه در رتبه}}{\text{بالاترین رتبه} \times \text{تعداد کل گیاه}} \times ۱۰۰$$

بیماری ناشی از *P. aphanidermatum* بر پایهٔ نمره‌دهی گیاهان، به‌این‌ترتیب که نمرهٔ ۰ = برای گیاه به‌کلی سالم، ۱= پوسیدگی خفیف ریشه (بین ۱۰-۱ درصد)، ۲= پوسیدگی متوسط ریشه (بین ۵۰-۱۰ درصد)، و ۳= پوسیدگی شدید ریشه به اضافهٔ ناحیهٔ طوقه و پوسیدگی بذر (بیش از ۵۰ درصد) در نظر گرفته شد (Abdelzaher, 2003)، ارزیابی شد.

گیاهچه‌های مایه‌زنی‌شده توسط *S. sclerotiorum* به‌طور مداوم برای ظهور نشانه‌های آلودگی بررسی قرار شدند. ارزیابی بیماری در ۶ نمره: ۰= نبود نشانه‌ها در محل مایه‌زنی، اما هنوز هم رشد کمی قارچ مشاهده می‌شود، ۱= گسترش لکه به پایهٔ دم برگ، ۲= گسترش لکه به ۱/۳ قطر ساقه، ۳= گسترش لکه به ۱/۲ از قطر ساقه، ۴= گسترش لکه به‌کل ساقه بدون شکستگی، ۵= شکستن ساقه در محل آلودگی (Christov *et al*., 2004)، انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده با روش تجزیهٔ واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایهٔ آماری احتمال ۵ درصد صورت گرفت. نمودارهای مربوطه با کمک نرم‌افزار اکسل (Excel ver. 2013) ترسیم شدند.

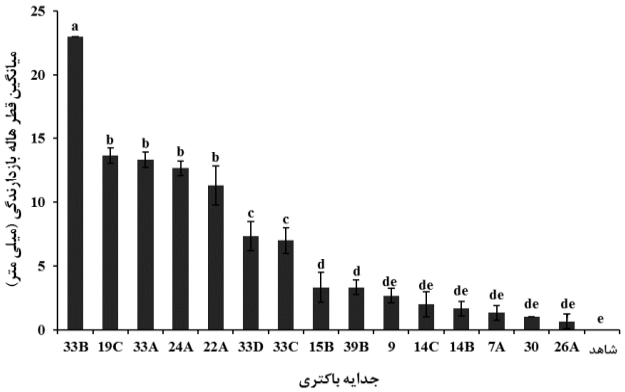
نتایج

جدایه‌های باکتری جداشده از ناحیهٔ ریزوسفر خیار

از نمونه‌های مورد بررسی، ۸۱ جدایهٔ باکتری بر پایهٔ محیط کشت انتخابی و ویژگی‌های ریخت‌شناختی جداسازی و خالص‌سازی شدند.

توان آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی

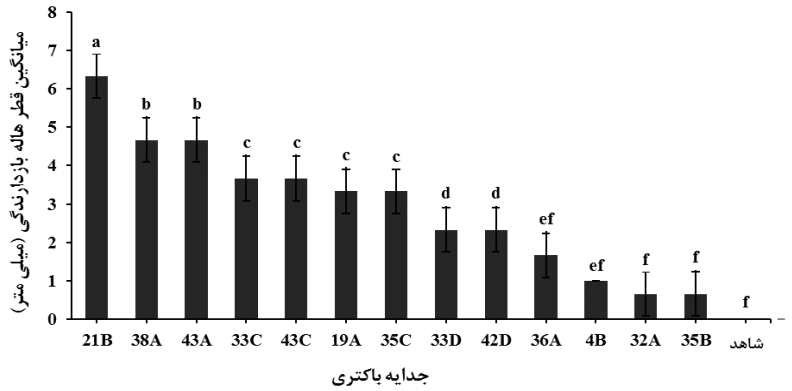
در برابر قارچ *S. sclerotiorum*، جدایهٔ 33B بیشترین میزان هالهٔ بازدارندگی (۲۳mm) را داشت و به‌تنهایی در یک گروه آماری قرار گرفت. افزون بر جدایهٔ 33B، جدایه‌های 19C، 33A، 24A، 22A، 33D و 33C به ترتیب با ۱۳/۶۶، ۱۳/۳۳، ۱۲/۶۶، ۱۱/۳۳، ۷/۳۳ و ۷ میلی‌متر، هالهٔ بازدارندهٔ بیش از ۵ میلی‌متر داشتند. (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار مقایسهٔ میانگین‌های قطر هالهٔ بازدارندهٔ جدایه‌های باکتری از *Sclerotinia sclerotiorum* در کشت متقابل. ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 1. Comparison between the average diameters of inhibition zone created by bacterial isolates in dual culture assays against *S. Sclerotiorum*. The mean diameter of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter are not statistically different.

نتایج کشت متقابل جدایه‌ها با *P. aphanidermatum* نشان داد که جدایهٔ 21B با هالهٔ بازدارندگی به قطر ۶/۳۳ میلی‌متر مؤثرترین جدایه بود و به‌تنهایی در یک گروه آماری قرار گرفت. در این آزمون نیز افزون بر جدایهٔ برتر (21B) جدایه‌های 38A، 43A، 33C، 43C، 19A، 35C، 33D و 42D توانستند به ترتیب هالهٔ بازدارنده با قطر ۴/۶۶، ۴/۶۶، ۳/۶۶، ۳/۶۶، ۳/۳۳، ۳/۳۳، ۲/۳۳ و ۲/۳۳ میلی‌متر ایجاد کنند (شکل۲).

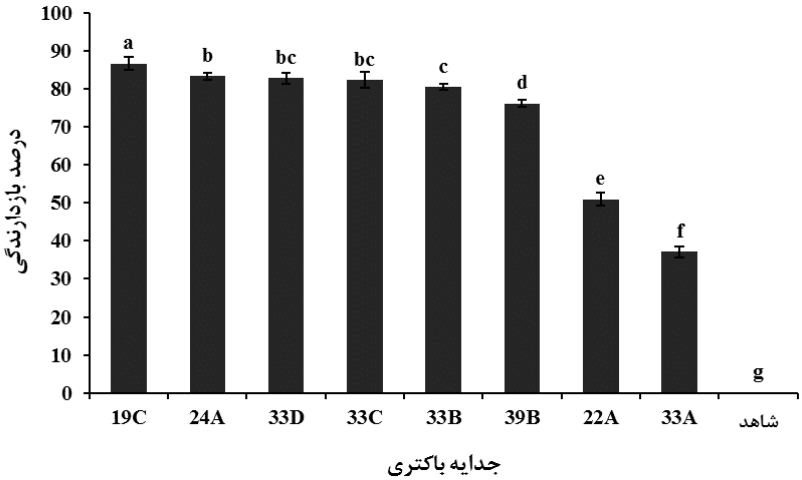


شکل ۲. نمودار مقایسهٔ میانگین‌های قطر هالهٔ بازدارندهٔ جدایه‌های باکتری از *P. aphanidermatum* در کشت متقابل.
ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 2. Comparison between the average diameters of inhibition zone created by bacterial isolates in dual culture assays against *Pythium aphanidermatum* compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter are not statistically different.

تأثیر ترکیب‌های فرار جدایه‌های باکتریایی روی رشد پرگنهٔ *P. aphanidermatum* و *S. sclerotiorum*

آزمون تأثیر ترکیب‌های فرار جدایه‌های باکتری بر رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum* نشان داد، ترکیب‌های فرار جدایه‌های 19C، 24A، 33D، 33C، 33B و 39B به‌ترتیب ۸۶/۷، ۸۳/۴، ۸۲/۸، ۸۲/۴، ۸۰/۵ و ۷۶/۲ درصد بیشترین توانایی بازداری از رشد بیمارگر را داشتند. جدایهٔ 19C با بیشترین میزان بازدارندگی به‌تنهایی در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل۳).

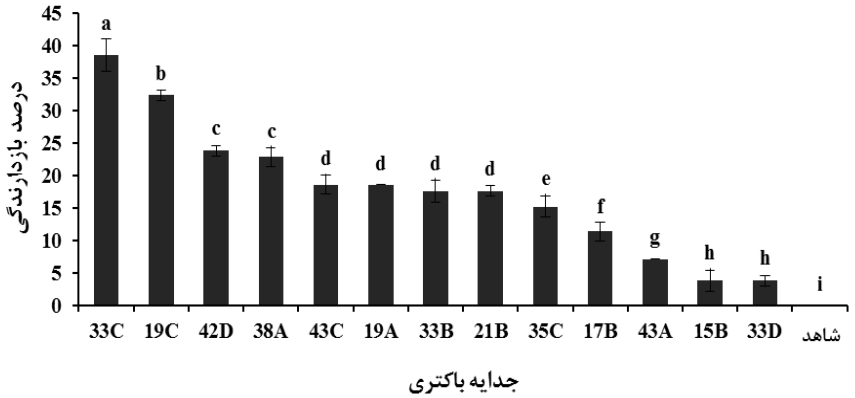


شکل ۳. نمودار مقایسهٔ میانگین تأثیر ترکیب‌های فرار جدایه‌های باکتری بر رشد پرگنهٔ *S. Sclerotiorum*.
ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 3. Comparison between the inhibiting effects of volatile compounds released by bacterial isolates on growth of *S. Sclerotiorum*. The mean diameters of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter are not statistically different.

تأثیر ترکیب‌های فرار ناشی از جدایه‌ها بر رشد میسلیوم *P. aphanidermatum* نشان داد که ترشح‌های فرار جدایهٔ 33C از رشد پرگنهٔ *P. aphanidermatum* به میزان ۳۸/۵ درصد جلوگیری کرد. این جدایه در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل۴). جدایه‌های 19C، 42D، 38A، 43C، 19A،33B، 21B و 35C به‌ترتیب میزان ۳۲/۳۷، ۲۳/۸، ۲۲/۸، ۱۸/۵، ۱۸/۵، ۱۷/۶ و ۱۵/۲۳ درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر را نشان دادند. جدایه‌های 33C، 19C، 38A، 42D و 43C که میزان بازدارندگی بیشتری را نسبت به دیگر جدایه‌ها سبب شدند برای ادامهٔ بررسی‌ها انتخاب شدند.

بر پایهٔ نتایج آزمون تولید متابولیت‌های مایع و ترکیب‌های فرار علیه *P. aphanidermatum* و *S. sclerotiorum* هشت جدایهٔ 19C، 21B، 24A، 33B، 33C، 38A، 42D و 43C به‌عنوان جدایه‌های برتر در کنترل بیولوژیک این بیمارگرها انتخاب شدند. دلیل انتخاب جدایه‌های 19C، 24A، 33B و 33C بیشترین قطر هالهٔ بازدارنده و تولید ترکیب‌های فرار علیه *S. sclerotiorum* بود. جدایهٔ 21B به دلیل ایجاد بیشترین قطر هالهٔ بازدارنده و جدایه‌های 33C، 38A، 42D و 43C به خاطر تولید بیشترین ترکیب‌های فرار مؤثر علیه *P. aphanidermatum* انتخاب شدند.



شکل ۴. نمودار مقایسهٔ میانگین تأثیر ترکیب‌های فرار جدایه‌های باکتری بر رشد پرگنهٔ *P. aphanidermatum*. ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 4. Comparison between the effects of volatile compounds released by bacterial isolates on growth of *P. aphanidermatum*. The mean diameters of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter are not statistically different.

ویژگی‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی جدایه‌های انتخابی

نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی مورد استفاده برای تشخیص گونه‌های باکتری نشان داد همگی گرم منفی و کاتالاز مثبت هستند، همهٔ جدایه‌ها به‌جز جدایهٔ 43C قادر به هیدرولیز نشاسته بودند. دیگر ویژگی‌های افتراقی جدایه‌های باکتری در جدول ۲ منعکس شده است.

جدول ۲. مشخصات ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری جداشده از ریزوسفر خیار

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the bacterial isolates of cucumber rhizosphere

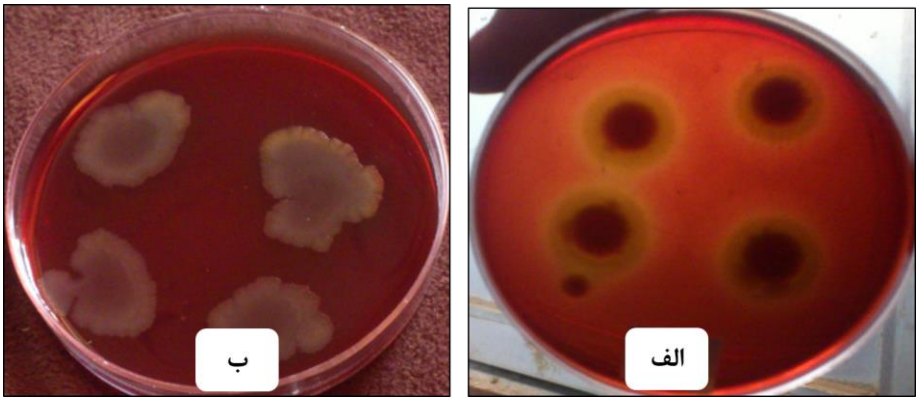
Characteristics	19C	21B	24A	33B	33C	38A	42D	43C
Gram reaction	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	-
Casein hydrolysis	+	-	-	-	+	+	+	-
Levan production	+	-	-	-	+	-	-	-
Potato rot	+	-	-	+	-	-	-	+
Lecithinase	+	-	-	+	+	+	+	+
Growth in 7% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	+
Tobacco hypersensitive test	+	-	+	+	+	+	+	+

Reaction, growth or production (+); No reaction, growth or production (-)

واکنش، تولید و یا رشد (+)، نداشتن واکنش، تولید و یا رشد (-)

ارزیابی تولید پادزی سورفکتین

ظهور هالۀ روشن در تشتک پتری حاوی آگار خونی (به رنگ قرمز) بیانگر تجزیۀ گلبول قرمز در اطراف پرگنۀ جدایۀ مربوطه است (شکل۵). اندازه‌گیری شعاع هالۀ روشن ایجادشده در اطراف پرگنۀ جدایه‌ها نشان داد که جدایۀ 19C با ایجاد هاله به شعاع ۵ میلی‌متر نسبت به شاهد بیشترین فعالیت را از نظر تولید سورفکتین نشان داد.

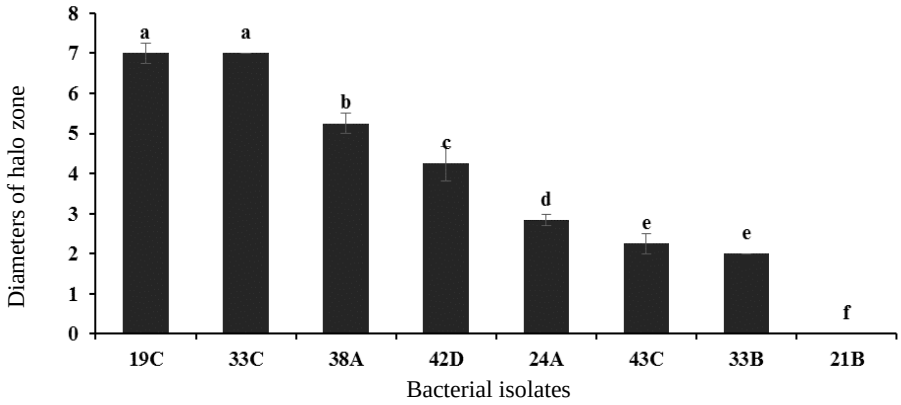


شکل ۵. نتایج آزمون تولید سورفکتین توسط جدایه‌های باکتری روی محیط کشت آگار خونی. ایجاد هالۀ روشن در محیط ناشی از تجزیۀ گلبول قرمز پیرامون پرگنۀ جدایه‌های تولیدکنندۀ سورفکتین است، الف: تولید سورفکتین توسط جدایۀ 19C، ب: تولید نکردن سورفکتین توسط دیگر جدایه‌های باکتری.

Figure 5. Result of Surfactin production by bacterial isolates on blood agar. Appearance of clear zones around the colonies indicates hemolytic activity and Surfactin production. right: Surfactin production by isolate 19C; left: lack of Surfactin production ability

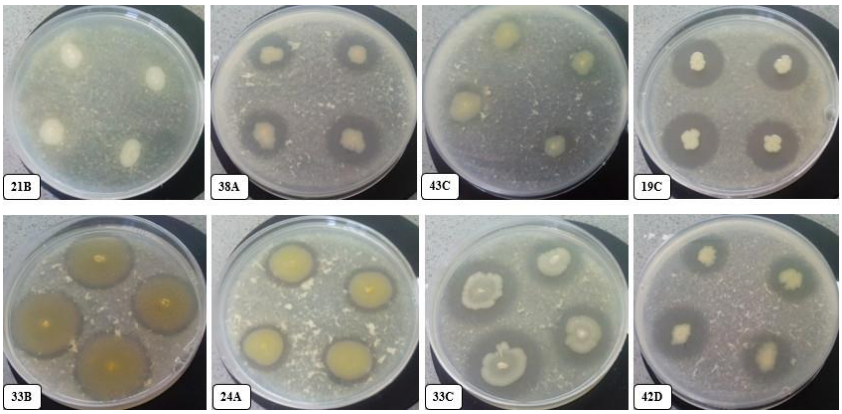
ارزیابی تولید آنزیم پروتئاز

جدایه‌های 19C، 33C، 38A، 42D، 24A، 43C و 33B با تولید آنزیم پروتئاز روی محیط Skim milk agar تولید هالۀ بی‌رنگ به ترتیب به قطر ۷، ۷، ۵/۲۵، ۴/۲۵، ۲/۸، ۲/۲۵ و ۲ میلی‌متر کردند که از نظر قطر هاله با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند (جدایۀ 21B قادر به تولید پروتئاز نبود). جدایه‌های 19C و 33C بیشترین میزان تولید پروتئاز را نشان دادند و با هم در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل‌های ۶ و ۷).



شکل ۶. نمودار مقایسۀ میانگین قطر هالۀ تولیدشده توسط جدایه‌های باکتریایی در آزمون تولید پروتئاز پس از گذشت ۴۸ ساعت. ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن (P≤۰/۰۵) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Figure 6. Comparison between the diameters of halo zone created around bacterial colonies resulting from prteolytic activities after 48h compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter are not statistically different.



شکل ۷. ایجاد هالهٔ شفاف درنتیجهٔ فعالیت پروتئازی در اطراف پرگنهٔ جدایه‌های باکتری 19C، 43C، 38A، 21B، 42D، 33C، 24A و 33B روی محیط کشت اسکیم میلک آگار

Figure 7. Appearance of clear zone around the bacterial colonies grown on skim milk agar culture medium shows production of proteases by 19C, 43C, 38A, 21B, 42D, 33C, 24A and 33B isolates

ارزیابی تولید سیانید هیدروژن

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تولید سیانید هیدروژن جدایه‌های باکتری نشان داد که جدایه‌های 33C و 38A بیشترین تولید سیانید هیدروژن را دارند و باعث تغییر رنگ کاغذ صافی به رنگ آجری شدند. جدایه‌های 42D، 33B و 43C تولید سیاند کمتری کرده و تغییر رنگ به کرم و قهوه‌ای روشن مشاهده شدند و جدایه‌های 19C، 21B و 24A قادر به تولید سیاید هیدروژن نبودند (جدول ۳ و شکل ۸).

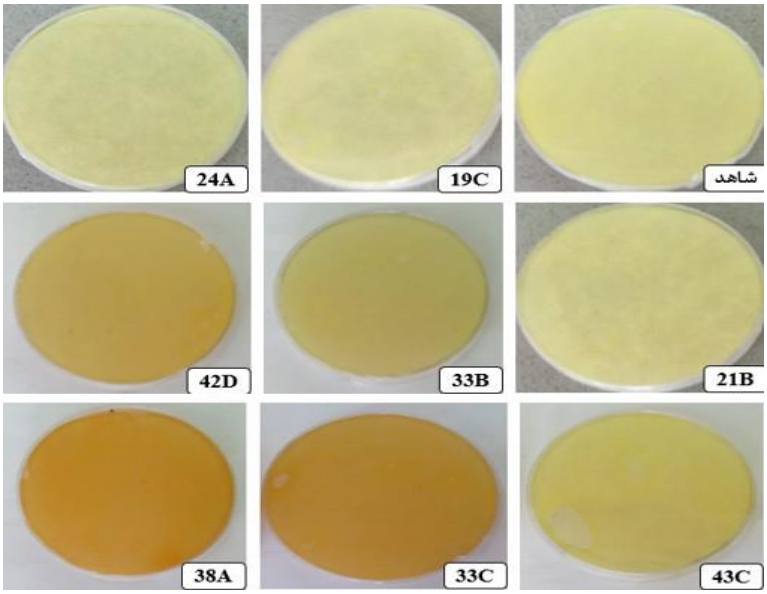
جدول ۳. نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی توان تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه‌های آنتاگونیست

Table 3. The results of production of HCN by bacterial isolates

Bacterial isolates	Production of HCN
19C	0
21B	0
24A	0
33B	1
33C	4
38A	4
42D	2
43C	1

۰ (بدون تغییر)، ۱ (تولید سیانید کم)، ۲ (تولید سیانید متوسط)، ۳ (تولید سیانید زیاد)، ۴ (تولید سیانید خیلی زیاد)

0 (No change), 1 (Low), 2 (Moderate), 3 (high), 4 (Very high)

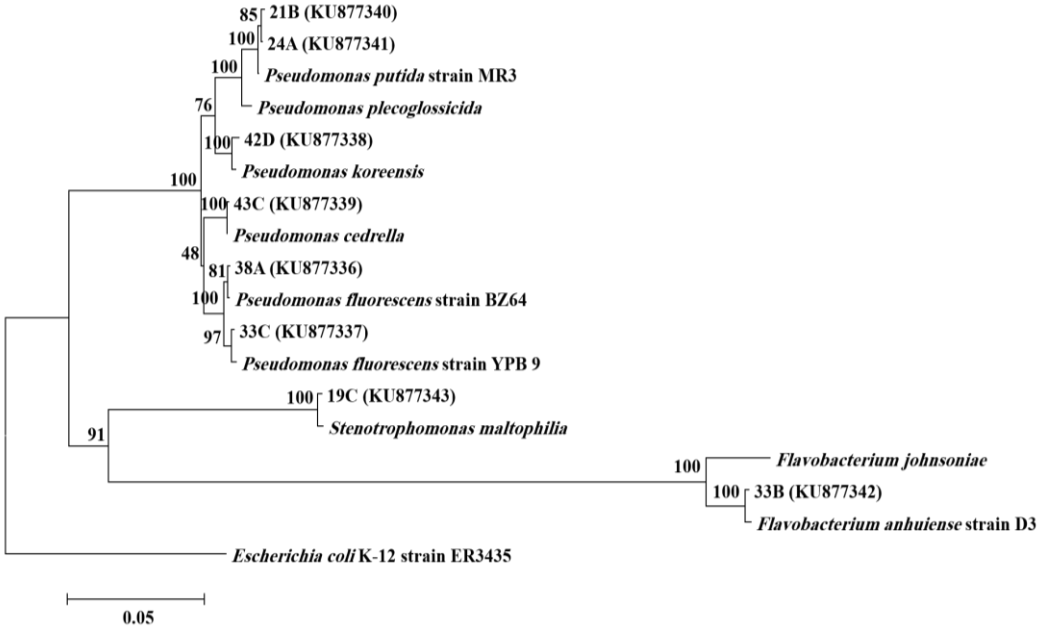


شکل ۸. تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌های مورد بررسی (ارزیابی بر پایهٔ تغییر رنگ است به‌طوری‌که؛ ۰ (بدون تغییر)، ۱ (تغییر رنگ به کرم)، ۲ (تغییر رنگ به قهوه‌ای روشن)، ۳ (تغییر رنگ به قهوه‌ای تیره)، ۴ (تغییر رنگ به آجری))

Figure 8. Production of HCN by bacterial isolates, based on color change in filter paper soaked in picric acid solution as followed: 0 (no change); 1 (turn to cream); 2 (turn to light brown); 3 (turn to dark brown) and 4 (turn to Indian red).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

درنتیجهٔ انجام واکنش PCR قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز، از ناحیهٔ ژنی 16S rDNA در جدایه‌های مختلف تکثیر شد. آزمون همسان‌یابی (BLAST) نشان داد جدایه‌ها با توالی‌های موجود ۹۹ درصد همولوژی دارند. توپولوژی درخت‌های به‌دست‌آمده از روش NJ نشان داد در هر درخت دو گروه اصلی با اعتبار بسیار بالا وجود دارد. تبارنمای به‌دست‌آمده از روش NJ در شکل ۹ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است جدایه‌های 21B، 24A، 33C، 38A، 42D و 43C که متعلق به جنس *Pseudomonas* و در یک گروه و با اعتبار ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. همچنین جدایهٔ 33B با اعتبار ۱۰۰ درصد در کنار جدایهٔ *Flavobacterium* و جدایهٔ 19C با اعتبار ۱۰۰ درصد در کنار جدایه‌های جنس *Stenotrophomonas* قرار گرفتند.



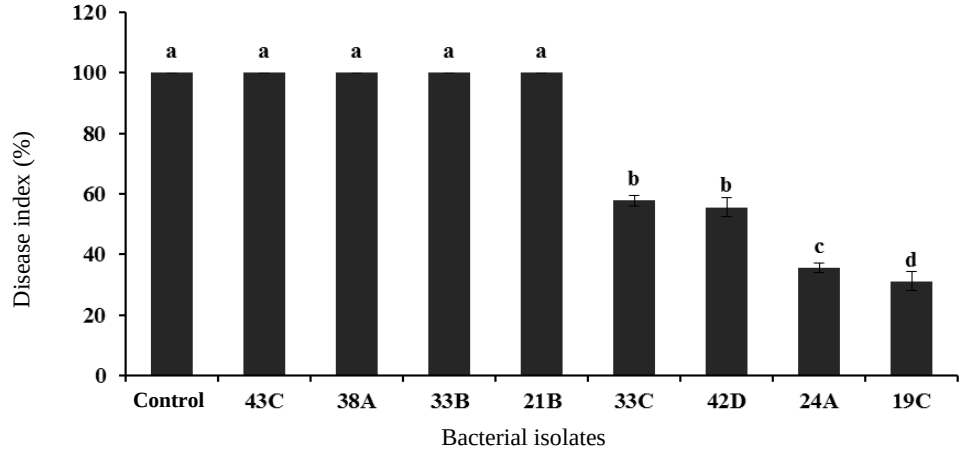
شکل ۹. درخت تبارزایی ترسیم‌شده با روش Neighbor-Joining و بر پایهٔ توالی ناحیهٔ ژنی 16S-rDNA.
اعداد بالای شاخه‌ها نشان‌دهندهٔ نتایج درجهٔ اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰تکرار است.
از باکتری *Escherichia coli* K-12 strain ER3435 به‌عنوان Outgroup استفاده شد.

Figure 6. Phylogenetic tree obtained from Neighbor-Joining method and based on partial sequence of 16S rDNA of the bacterial isolates. Numbers above the clades represent Bootstrap with 1000 replications. *Escherichia coli* K-12 strain ER3435 used as outgroup.

بررسی‌های گلخانه‌ای

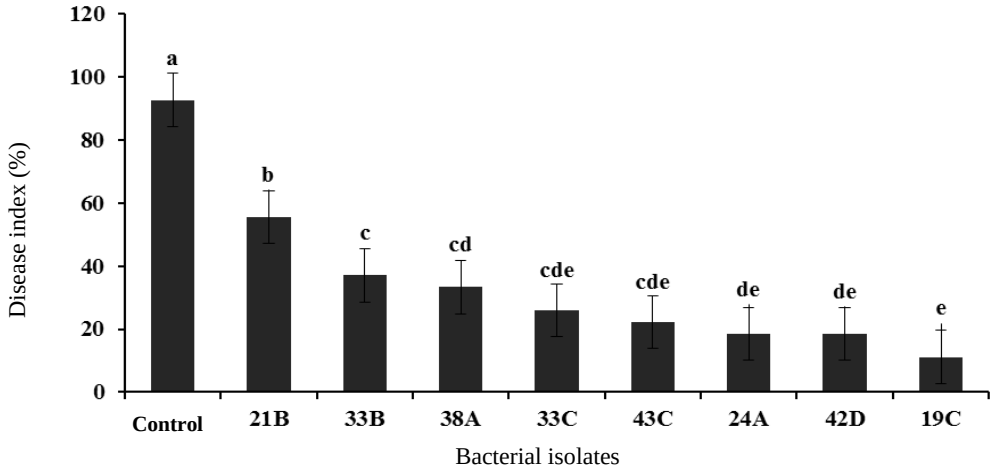
میزان شاخص بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* در تیمار با جدایه‌های باکتری 43C، 38A، 33B و 21B با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. میزان شاخص بیماری برای تیمار جدایه‌های 19C، 24A، 42D و 33C به ترتیب ۳۱/۱، ۳۵/۵۳، ۵۵/۵۳ و ۵۷/۷۳ درصد بود و با شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. جدایهٔ 19C با بیشترین کاهش میزان آلودگی، عملکرد مناسب‌تری در جلوگیری از گسترش بیمارگر داشته و به‌تنهایی در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۱۰).

میزان شاخص بیماری ناشی از *P. aphanidermatum* در تیمار خاک با جدایه‌های 19C، 21B، 24A، 33B، 33C، 38A، 42D، 43C و شاهد به ترتیب ۱۱/۱، ۵۵/۵، ۱۸/۵، ۳۷، ۲۵/۹، ۳۳/۳، ۱۸/۵، ۲۲/۲ و ۹۲/۵۶ درصد محاسبه شد. میزان شاخص بیماری در تیمار با جدایهٔ 19C کمترین میزان بود و با تیمارهای 24A، 33C، 42D و 43C اختلاف معنی‌داری نداشت درحالی‌که همهٔ تیمارهای مورد بررسی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل۱۱).



شکل ۱۰. مقایسهٔ میانگین تأثیر جدایه‌های باکتری 19C بر شاخص بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵). ستون‌های دارای دست‌کم یک حرف همسان از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند.

Figure 10. Effect of bacterial isolates on disease index of *S. sclerotiorum*. The means of disease index in different treatments were compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter, were not statistically different.



شکل ۱۱. مقایسهٔ میانگین تأثیر جدایه‌های باکتری بر شاخص بیماری ناشی از *P. aphanidermatum* با استفاده از آزمون دانکن (P≤۰/۰۵). ستون‌های دارای دست‌کم یک حرف همسان از نظر آماری اختلاف معناداری ندارند.

Figure 11. Effect of bacterial isolates on disease index of *P. aphanidermatum*. The means of disease index in different treatments were compared using Duncan's multiple range test (P≤0.05). Columns with at least one common letter, were not statistically different.

بحث

انتخابی بودن محیط کشت S1 به دلیل وجود دو مادهٔ سدیم لائورویل سارکوزین (SLS)[1] و پادزی تریمتوپریم[2] است که به ترتیب، از رشد ریزجانداران گرم مثبت و سودوموناس‌های غیرفلورسنت جلوگیری می‌کند. بر این پایه درمجموع ۸۱ جدایهٔ باکتری در این تحقیق به دست آمد که هشت جدایه از آن‌ها با استفاده از روش‌های کشت متقابل و تولید ترکیب‌های فرار به‌عنوان جدایه‌های برتر و مؤثر علیه بیمارگرهای مورد بررسی در خیار برگزیده شدند. جدایه‌های انتخابی در آزمون‌های افتراقی از نظر هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازوئین، تولید لوان، لهانیدن سیب‌زمینی، لیستیناز، رشد در نمک خوراکی ۷ درصد و آزمون بالا حساسیت تفاوت‌هایی را با یکدیگر نشان دادند. از جدایه‌های انتخابی جدایهٔ 19C و 33B بر پایهٔ شناسایی مولکولی به ترتیب همانندی زیاد به

1. Sodium Lauroyl Sarcosine
2. Trimethoprim

جنس‌های *Stenotrophomonas* و *Flavobacterium* و دیگر جدایه‌ها همانند با جنس *Pseudomonas* نشان دادند، این نتایج با یافته‌های Gould *et al.* (1986) و Ahmadzadeh *et al.* (2003) مبنی بر اینکه کارایی محیط کشت S1 برای جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت دست‌کم ۸۰ درصد است، قابل توضیح است. بررسی‌های انجام‌شده در این پژوهش نشان داد ترکیب‌های فرار تولیدشده توسط جدایهٔ 19C باعث کاهش معنی‌داری در رشد میسلیوم *S. sclerotiorum* و*P. aphanidermatum* شد. این جدایه تنها قادر به ایجاد هالهٔ بازدارندگی علیه *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاهی بود. از نظر تولید پروتئاز و سورفکتین نیز قابلیت بالایی دارد و در گلخانه بهترین عملکرد را در مقابل دو بیمارگر داشت. درنتیجه می‌توان تولید ترکیب‌های فرار، ترشحات مایع خارج یاخته‌ای (ازجمله پروتئاز و سورفکتین) را عامل اصلی کنترل بیولوژیک این جدایه در شرایط گلخانه معرفی کرد. تولید سورفکتین و ایتورین توسط *B. subtilis* و تولید زانتوباکسینآ در *Stenotrophomona* sp. SB-K88 در ناحیهٔ ریزوسفر چغندر در کشت به‌روش هیدروپونیک ردیابی شده‌اند (Washio *et al.*, 2011). پروتئاز به‌عنوان عامل مؤثر *Stenotrophomonas maltophilia* W81 علیه *P. ultimum* روی چغندرقند گزارش شده است (Dunne *et al.*, 1997).

جدایهٔ 21B در شرایط آزمایشگاهی تأثیری روی *S. sclerotiorum* نداشت و با نتایج گلخانه‌ای همخوانی دارد. این جدایه قادر به تولید سورفکتین، پروتئاز و سیانید هیدروژن نیست اما در کنترل *P. aphanidermatum* در شرایط گلخانه موفق بود. رقابت و یا ایجاد دیگر ترشحات خارج یاخته‌ای می‌تواند عامل احتمالی موفقیت این جدایه در خاک باشد همچنین ترکیب‌های احتمالی بهبوددهندهٔ رشد گیاه تولیدشده توسط این جدایه می‌توانند نقش مهمی در متحمل کردن گیاه به این بیماری ایفا کنند. زیرا باعث می‌شوند ریشه‌های آسیب‌دیده به‌سرعت توسط ریشه‌های جدید جایگزین شده و آسیب ناشی از کاهش حجم ریشه‌های فعال، کاهش یابد. Naseby *et al.* (2001) گزارش کردند که ۸۰ درصد توانایی کنترل بیولوژیک پیتیوم توسط سودوموناس‌ها به توان پرگنه کردن ریشه‌ها بر می‌گردد. پرگنه شدن ریشه عامل مهم کنترل بیولوژیک *Pythium* sp. و *Fusarium* sp. توسط سودوموناس‌ها گزارش شده است (Maheshwari, 2013). پیتیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در چرخهٔ فسفر، کربن و نیتروژن شده و همچنین از راه ایجاد آسیب در ریشه‌ها سبب نشت مواد به بیرون از گیاه می‌شود. سودوموناس‌های فلورسنت با پرگنه کردن ریشه‌ها باعث کاهش فعالیت‌های آنزیمی و افزایش ریشه‌های فرعی می‌شوند (Naseby *et al.*, 2001).

جدایهٔ 24A در شرایط آزمایشگاهی تنها علیه قارچ *S. sclerotiorum* عملکرد شایان‌پذیرشی داشت، درحالی‌که در شرایط گلخانه توانست *S. sclerotiorum* و *P. aphanidermatum* را به ترتیب به میزان ۶۴/۵ و ۷۴ درصد کنترل کند. با بررسی نتایج به‌احتمال تولید آنزیم پروتئاز به‌عنوان عامل اصلی کنترل بیولوژیک علیه *S. sclerotiorum* باشد. آنزیم‌های لیتیک ازجمله پروتئازها باعث تجزیهٔ یاخته‌های بیمارگر می‌شوند و الیگوساکاریدهای ناشی از این تجزیهٔ یاخته‌ای همچنین می‌توانند باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان شود (Maheshwari, 2013).

بیشترین بازدارندگی از رشد *S. sclerotiorum* در آزمون‌های آزمایشگاهی مربوط به جدایهٔ 33B بود، درحالی‌که این جدایه در آزمون‌های گلخانه‌ای در کاهش شاخص بیماری علیه *P. aphanidermatum* نیز موفق بود. اگرچه جدایهٔ 33B از نظر تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن ضعیف بود ولی توانایی تولید ترکیب‌های فرار مناسبی داشت. می‌توان نتیجه گرفت که تولید ترکیب‌های فرار و دیگر متابولیت‌های مایع عامل اصلی کنترل بیولوژیک این جدایه است. دلیل اختلاف ویژگی زیست‌کنترلی جدایه‌ها مربوط به نوع ترکیب‌های فراری که تولید می‌کنند گزارش شده است (Khabbaz *et al.*, 2014).

جدایهٔ 33C از نظر آزمون‌های آزمایشگاهی بسیار موفق بود و در شرایط گلخانه توانست *S. sclerotiorum* و *P. aphanidermatum* را به ترتیب به میزان ۴۲/۲۷ و ۶۶/۶۶ درصد کنترل کند. نتایج آزمایشگاهی و

گلخانه‌ای جدایهٔ 33C با هم همخوانی دارند. سیانید هیدروژن بازدارندهٔ قوی آنزیم سیتوکروم اکسیداز (جزء نهایی چرخهٔ تنفس هوازی) در بسیاری از موجودهای زنده است و در غلظت پیکومولار بسیار سمی است (Maheshwari, 2013).

جدایهٔ 42D در شرایط آزمایشگاهی علیه *S. sclerotiorum* موفق نبود درحالی‌که در آزمون گلخانه‌ای توانست این بیمارگر را ۴۴/۴۷ درصد کنترل کند. این جدایه قادر به تولید به نسبت مناسب پروتئاز و متوسط سیانید هیدروژن بود. بنابراین، توان زیست‌کنترلی این جدایه را می‌توان به‌احتمال به تولید پروتئاز، سیانید هیدروژن و ترکیب‌های فرار نسبت داد.

جدایهٔ 43C در بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای علیه *S. sclerotiorum* موفق نبود. این جدایه از لحاظ تولید سیانید هیدروژن و پروتئاز به نسبت ضعیف بود ولی در گلخانه توانست *P. aphanidermatum* را ۷۰ درصد کنترل کند. با بررسی نتایج به‌دست‌آمده، تولید ترکیب‌های فرار به‌عنوان سازوکار زیست‌کنترلی این جدایه در گلخانه می‌تواند باشد.

جدایهٔ 38A نیز در بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای علیه *S. sclerotiorum* موفق نبود. این جدایه از لحاظ تولید هالهٔ بازدارنده و تولید ترکیب‌های فرار در گروه متوسط قرار داشت و در گلخانه نیز توانست *P. aphanidermatum* را ۵۹ درصد کنترل کند. این جدایه قادر به تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن در سطح بالاتری در مقایسه با دیگر جدایه‌ها بود. بنابراین، تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن به‌عنوان عامل‌های احتمالی کنترل بیولوژیک معرفی می‌شوند.

به‌طورکلی جدایه‌های 19C، 24A، 33C و 42D علیه هر دو بیمارگر در گلخانه باعث کاهش شاخص بیماری شدند. نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان داد سازوکار اصلی زیست‌کنترلی جدایه‌ها علیه هر دو بیمارگر تولید ترکیب‌های فرار و آنزیم پروتئاز است. هرچند علیه *S. sclerotiorum* ترشح‌های خارج یاخته‌ای و علیه *P. aphanidermatum* رقابت نیز از می‌تواند از سازوکارهای احتمالی باشد. با بررسی نتایج ترکیب‌های فرار جدایه‌ها علیه هر دو بیمارگر مشخص شد جدایه‌هایی که قادر به تولید ترکیب‌های فرار علیه بیمارگرها بودند در گلخانه نیز توانستند شاخص بیماری را کاهش دهند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت میزان بازدارندگی می‌تواند با تولید ترکیب‌های فرار رابطهٔ مستقیم داشته باشد.

REFERENCES

1. Abdelzaher, H. M. (2003). Biological control of root rot of cauliflower (caused by *Pythium ultimum* var. *ultimum*) using selected antagonistic rhizospheric strains of *Bacillus subtilis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(3), 209-220.
2. Ahmadzadeh, A., Sharifi-Tehrani, A., Hejaroud, GH., Zad, J., Okhovvat, M. & Mohammadi, M. (2003). Effects of fluorescent pseudomonas on *Pythium ultimum* causal agent of seed rot of common bean. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 34(4), 793-807. (in Farsi)
3. Akbari-kiaroudi, S. L., Niknezhad-kazempour, M., Elahineia, S. A. & Khodaparast, S. A. (2005). Effect of antagonistic bacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white mold in oilseed rape. *Plant Pathology*, 41(3) 307-328. (in Farsi)
4. Al-Sa'di, A., Drenth, A., Deadman, M., De Cock, A. & Aitken E. (2007). Molecular characterization and pathogenicity of *Pythium* species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology*, 56(1), 140-149.
5. Alström, S. (1987). Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil*, 102(1), 3-9.
6. Baharlouei, A., Sharifi-Sirchi, G. & Shahidi Bonjar, G. (2011). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist Streptomyces. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5785-5794.
7. Basak, A., Lee, M. W. & Lee, T. S. (2002). Inhibitive activity of cow urine and cow dung against *Sclerotinia sclerotiorum* of cucumber. *Mycobiology*, 30(3), 175-179.
8. Behboudi, K., Sharifi-Tehrani, A., Hejaroud, GH. Zad, J., Mohammadi, M. & Rahimian, H. A. (2005). Investigating effects *Pseudomonas fluorescents* on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causal agent of sunflower root rot. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 36(4), 791-803. (in Farsi)
9. Boland, G. & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 93-108.

10. Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., Shen, B. & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR9 for suppressing fusarium wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae*, 135, 32-39.
11. Christov, M., Kiryakov, I., Shindrova, P., Encheva, V. & Christova, M. (2004). Evaluation of new interspecific and intergeneric sunflower hybrids for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Proceedings of 16th international sunflower conference, Fargo, North Dakota, USA, International Sunflower Assoiciation, Paris, France, Aug. 29 - Sep. 2, II (pp. 693-698)
12. Dashti, A., Jadaonl, M. M., Abdulsamad, A. M. & Dashti, H. M. (2009). Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41(2), 117-122.
13. Dunne, C., Crowley, J. J., Moënne-Loccoz, Y., Dowling, D. N., Bruijn, S. & Gara, F. (1997). Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. *Microbiology*, 143(12), 3921-3931.
14. Fahy, P. C. & Hayward, A. C. (1983). *Media and methods for isolation and diiagnostic tests*. In: Fahy, P. C.and Persley, G. J. (eds.). Plant Bacterial Disease, A Diagnostic Guide, pp. 337-378. Academic Press, Sydeny, Australia.
15. Feignier, C., Besson, F. & Michel, G. (1995). Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of iturin−, surfactin+ mutants. *FEMS Microbiology Letters*, 127(1-2), 11-15.
16. Fernando, W., Nakkeeran, S., Zhang, Y. & Savchuk, S. (2007). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. *Crop Protection*, 26(2), 100-107.
17. Fiddaman, P. & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2), 119-126.
18. Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 75-91.
19. Graham, D. C. & Hodgkiss, W. (1977). Identify of gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteriaisolated from plants and animales. *Journal of Applied Bacteriology*, 30, 175-189.
20. Gould, W., Hagedorn, C., Bardinelli, T. & Zablotowicz, R. (1985). New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 28-32.
21. Hagedorn, C., Gould, W. and Bardinelli, T. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2793-2797.
22. Jamali, F., Sharifi-Tehrani, A., Okhovvat, M. & Zakeri, Z. (2004). Effect of antagonistic bacteria on the control of fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* under greenhouse conditions. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 36(3), 793-807. (in Farsi)
23. Keel, C., & Défago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: GangeAC, Brown VK, eds. *Multitrophic interactions in terrestrial system*. Oxford: Blackwell Science, 27-47.
24. Keel, C., Weller, D., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. & Thomashow, L. (1996). Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent Pseudomonas strains from diverse geographic locations. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 552-563.
25. Khabbaz, S. E., Zhang, L., Cáceres, L. A., Sumarah, M., Wang, A. & Abbasi, P. A. (2015). Characterization of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. *Annals of Applied Biology*, 166(3), 456-471.
26. Kim, D. S., Weller, D. M. & Cook, R. J. (1997). Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 87(5), 559-564.
27. Khodaparast, S. A. (2010). *Kingdom fungi*. University of Guilan, Rasht. p 811. (in Farsi)
28. Lelliott, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, *29*(3), 470-489.
29. Leong, J. (1986). Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 187-209.
30. Li, H., Li, H., Bai. Y., Wang. J., Nie. M., Li, B. & Xiao, M. (2011). The use of *Pseudomonas fluorescens* P13 to control sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of oilseed rape.*The Journal of Microbiology*, 49(6), 884-889.
31. Lozano, J. C. & Sequeira, L. (1970). Differentiation of races of *Pseudomonas solanasearum* by a leaf infilteration techniques. *Phytopathology*, 60, 833-838.
32. Lumsden, R. (1979). Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69(8), 890-895.
33. Maheshwari, D. K. (Ed.). (2013). *Bacteria in agrobiology: disease management*. Springer Science & Business Media.

34. Mansouripour, S. M., Alizadeh, A. & Safaei, N. (2009). Biocontrol ability and population dynamics of bacterial antagonists against *Sclerotinia sclerotiorum* in canola. *Plant Pathology*, 44(3), 232. (in Farsi)
35. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology*, 44(1), 40-50.
36. Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. & Défago, G. (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82(2), 190-195.
37. Mehta, N. & Saharan, G. (2008). *Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management*, Springer. 486 pages.
38. Nakano, M. M., Marahiel, M. & Zuber, P. (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 170(12), 5662-5668.
39. Naseby, D. C., Way, J. A., Bainton, N. J. & Lynch J. M. (2001). Biocontrol of *Pythium* in the pea rhizosphere by antifungal metabolite producing and non-producing *Pseudomonas* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 421-429.
40. Oedjijono, M., Linet, A. & Dragar, C. (1993). Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 247-250.
41. Omati, F., Sharifi-Tehrani, A., Mohammadi, M., Hejaroud, G. A. & Zad, J. (2004). Antagonistic effects of *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates on *Phytophthora capsici* the causal agent of pepper damping-off. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 10(4), 45-54. (in Farsi)
42. Purdy, L. H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*, 69(8), 875-880.
43. Safari-Asl, F., Rouhani, H., Falahati-Rastegar, M. & Jahanbakhsh, V. (2011). Investigating mechanisms of action of *Bacillus* spp. in control of cucumber root rot caused by *Pythium ultimum* and *P. aphanidermatum*. *Journal of Plant Protection*. 24(4), 445-456. (in Farsi)
44. Sarani, Sh. A., Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M. & Javan-Nikkhah, M. (2007). Efficiency of fluorescent pseudomonads in biological control of *Rhizoctonia solani* causal agent of oilseed damping off. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 42, 261-270. (in Farsi)
45. Schaad, N. W. (1988). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *APS Press*. St. Paul, Minnesota, USA.
46. Steadman, J. (1979). Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*, 69, 904-907.
47. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
48. Washio, K., Lim, S. P., Roongsawang, N. & Morikawa, M. (2011). A truncated form of spoT, Including the ACT domain, inhibits the production of cyclic lipopeptide arthrofactin, and is associated with moderate elevation of guanosine 3′, 5′-Bispyrophosphate level in *Pseudomonas* sp. MIS38. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 1880-1888.
49. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. A. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* ,173(2), 697-703
50. Weller, D. & Cook, R. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73(3), 463-469.
51. Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 379-407.
52. Zdor, R. E. & Anderson, A. (1992). Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. *Plant and Soil*, 140(1), 99-107.
53. Zhou, T. & Paulitz, T. C. (1994). Induced resistance in the biocontrol of *Pythium aphanidermatum* by *Pseudomonas* spp. on cucumber. *Journal of Phytopathology*, 142(1), 51-63.