

مقایسه جدایه‌های *Bacillus subtilis* تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنجاسین و جدایه‌های فاقد آن در کنترل قارچ *Rhizoctonia solani* AG2-2 عامل پوسیدگی طوقه و ریشه چغندرقد

مسعود احمدزاده^۱ و احمدرضا شاهرخی^{۲*}

۱. استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲. استادیار، گروه گیاهپزشکی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱)

چکیده

باکتری *Bacillus subtilis* به دلیل تشکیل اندوسپور، تحمل شرایط متغیر pH، دامنه وسیع حرارتی و تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، پتانسیل خوبی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی دارد. در این تحقیق پتانسیل بیوکنترلی باسیلوس‌های بومی در مقابل *Rhizoctonia solani* AG2-2، ارزیابی شد. آنتی‌بیوتیک فنجاسین استخراج شد و رابطه بین جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک با کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقد در گلخانه بررسی گردید. در آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از ۸۲ جدایه منتخب *Bacillus subtilis*، با ۲ جدایه استاندارد باکتری آنتاگونیست استفاده شد. از میان ۸۴ جدایه، در آزمون کشت دوطرفه درون تشک پتری، جدایه UTB1 با ۵۵/۳ درصد، بیشترین تأثیر بازدارندگی را داشت. در آزمون‌های گلخانه، جدایه‌های UTB27، UTB65 و UTB71 بیماری را ۶۰/۰۹ درصد کاهش دادند (بیشترین بازدارندگی از بیماری). از میان ۸۴ جدایه باکتریایی، تعداد ۵۲ جدایه روی افزایش وزن تر و خشک گیاه تأثیر معنی‌داری داشتند. در آزمون HPTLC برای استخراج آنتی‌بیوتیک، از بین ۸۴ جدایه باکتری، تعداد ۱۹ جدایه، فنجاسین تولید کردند و ۶۵ جدایه قادر به تولید نبودند. در آزمون گلخانه، تعداد ۷۵ جدایه باکتری، بیماری را کاهش دادند که در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود و ۱۹ جدایه از آنها تولیدکننده فنجاسین بودند. شاخص تولید آنتی‌بیوتیک به تنهایی تأییدکننده میزان کنترل در گلخانه و مزرعه نیست. جدایه باکتری بومی UTB1 نامزد خوبی برای یک عامل بیوکنترل موفق است.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، فنجاسین، *Bacillus subtilis*، *Rhizoctonia solani*.

Comparison of *Bacillus subtilis* isolates, the fengycin antibiotic producer and non-producer isolates in *Rhizoctonia solani* AG2-2 control, causing crown and root rot of sugar beet

Masoud Ahmadzadeh¹ and Ahmadreza Shahrokhi^{2*}

1. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Higher Educational Complex of Saravan, Iran

(Received: Aug. 26, 2019 - Accepted: Dec. 22, 2019)

ABSTRACT

Bacillus subtilis has a good potential for plant pathogens control due to the formation of endospores, tolerance to variable pH conditions, wide thermal range and because of antibiotics production. In this study, the biocontrol potential of native *Bacillus* against *Rhizoctonia solani* AG2-2 was evaluated. Fengycin many antibiotic extracted and the relationship between antibiotic-producing isolates with sugar beet root and crown rot control, investigated in the greenhouse. In laboratory and greenhouse tests, 82 selected *Bacillus subtilis* isolates with 2 standard antagonist isolates were used. Of the 84 isolates, in double culture test in petri dish, isolate UTB1 with 55.3% had the most inhibitory effect. In greenhouse tests, bacterial isolates UTB27, UTB65 and UTB71, reduced disease by 60.09% (the most inhibitory on disease). Of the 84 bacterial isolates, 52 isolates had a significant effect on wet and dry weight of plant. Of the 84 bacterial isolates in the HPTLC assay, for antibiotic extraction, 19 isolates produced fengycin and 65 isolates were unable to produce. In the greenhouse test, 75 bacterial isolates reduced disease, which was significant at 5% level, and 19 isolates of them were producing fengycin. The native bacterial isolate UTB1 is a good candidate for a successful biocontrol agent.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biological control, fengycin, *Rhizoctonia solani*.

* Corresponding author E-mail: hafezreza@yahoo.com

مقدمه

خطر آفت‌کش‌های شیمیایی برای انسان و محیط زیست، باعث شده که روش کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی به‌عنوان یک گزینه جانسین، مورد توجه گیرد (Ghorab & Khalil, 2016). اثر بازدارندگی ریزوباکترها در مقابل بیمارگرهای گیاهی، با تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی، رقابت در کلنیزاسیون برای تهیه مکان و غذا و فعال‌سازی سیستم دفاعی با القای مقاومت سیستمیک امکان‌پذیر شده است.

باسیلوس‌ها به‌دلیل تشکیل اندوسپور، تحمل شرایط متغیر pH و تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها خصوصاً پلی‌پپتیدها نسبت به بسیاری از باکتری‌های دیگر برای کنترل بیمارگرهای گیاهی ارجحیت دارند (Zerrouh et al., 2011). گزارش‌های متعددی از نقش باسیلوس‌ها در کنترل بیمارگرهای گیاهی وجود دارد. از جمله کنترل قارچ *Verticillium dahliae* عامل لکه سیاه تربچه ژاپنی که جدایه *Bacillus subtilis* KB3 توانست در شرایط گلخانه تا ۳۰ درصد از شدت بیماری بکاهد (Kawai et al., 2006). دو جدایه AP-3 و PRBS-1 از باکتری *B. subtilis* ضمن ممانعت از بیمارگر *Rhizoctonia solani* باعث افزایش رشد ریشه‌های موئین هم شده‌اند (Araujo et al., 2005). تیمار بذری ذرت توسط فرمولاسیون جدایه *B. subtilis* BR-23 علیه قارچ *R. solani* باعث کاهش ۴۳/۵ درصد مرگ گیاهچه در گلخانه گردید (Muis & Quimio, 2006). از جدایه *B. subtilis* برای کنترل بیمارگر عامل بیماری پژمردگی آوندی گوجه فرنگی استفاده گردید (Chen et al., 2013). قارچ *R. solani* AG2-2 باعث بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی طوقه و ریشه چغندرقد می‌گردد و بسیار مقاوم بوده و تا مدت‌ها می‌تواند در خاک زندگی کند. این بیماری ناشی از *Rhizoctonia solani* AG2-2 از بیماری‌های مهم این محصول در ایران می‌باشد (Kamali et al., 2008). مبارزه شیمیایی با *R. solani* عامل مرگ گیاهچه چغندرقد، عملاً امکان‌پذیر نیست.

گونه *B. subtilis* قادر به ترشح تعداد بسیار زیادی آنتی‌بیوتیک به خارج سلول می‌باشد. فنجاسین یک آنتی‌بیوتیک ضد قارچی است که توسط جدایه‌های *B. subtilis* تولید می‌گردد و خاصیت همولایتیکی آن

۴۰ برابر سورفکتین است. این آنتی‌بیوتیک یک لیپوپپتید حلقوی است که ترکیبی از یک اسید چرب بتاهیدروکسی است که به یک زنجیر جانبی ۱۹-۱۶ کربنه متصل می‌گردد (Roy et al., 2013).

در این تحقیق فرض بر این است که جدایه‌هایی از *B. subtilis* که می‌توانند آنتی‌بیوتیک فنجاسین را تولید کنند از قدرت کنترلی بیشتری برخوردار هستند. از آنجایی‌که در بحث کنترل بیولوژیک عوامل بیماریز، مکانیزم تولید آنتی‌بیوتیک از اهمیت خاصی برخوردار است؛ لذا در این پژوهش هدف این بود که جدایه‌هایی از باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* که تولید آنتی‌بیوتیک می‌کنند را از نظر میزان کنترل قارچ AG2-2 *R. solani* عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه چغندرقد، با جدایه‌هایی که فنجاسین ندارند مقایسه شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری

گیاه چغندرقد در مزارع مناطق مختلف کشور، نمونه‌هایی از خاک و محیط اطراف ریشه انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های موجود، از روش رقیق‌سازی سریالی و کشت روی محیط NA استفاده گردید (Roy et al., 2013).

تهیه قارچ بیمارگر

جدایه قارچ *R. solani* گروه آناستموزی AG2-2 در آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر چغندرقد، دریافت شد.

تهیه مایه تلقیح بیمارگر و آزمون بیماریزایی

برای آزمون بیماریزایی قارچ بیمارگر روی چغندرقد در شرایط گلخانه، بر اساس روش Cai et al. (2011) عمل شد.

بررسی‌های آزمایشگاهی

شناسایی باکتری‌های جدا شده

تعداد ۱۷۳ جدایه، خالص‌سازی شد. با انجام آزمون گرم، ۱۰۱ جدایه گرم مثبت و با انجام چند آزمون کلیدی از جمله استفاده از قندهای مانیتول، ترهالوز و

آزمون جداسازی و تشخیص کمی و کیفی آنتی‌بیوتیک فنجایسین با روش HPTLC

جدایه‌ها از نظر تولید فنجایسین با ترکیب روش‌های (Xiang *et al.* 2006) و (Ramarathnam *et al.* 2007) و (Mandal *et al.* 2013) با مقداری تغییرات بررسی شدند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها جهت استخراج لیپوپپتید، باکتری‌ها روی NA کشت شدند و پس از تهیه سوسپانسیون، نمونه‌ها در دستگاه شیکر انکوباتور به مدت ۳۰ ساعت در ۳۳ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه نگهداری شد. پس از رشد مناسب، سوسپانسیون نمونه‌ها ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به دست آمده با فیلتر سترون ۰/۴ میکرومتر مدل ژلمن (Gelman) صاف شد. رسوب به دست آمده، در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حل و برای رسوب دهی پپتیدهای موجود در سوپرناتانت آنها، به مدت یک شب در ۴ درجه سلسیوس با آمونیوم سولفات ۸۰ درصد اشباع نگهداری شدند و سپس در سود یک مولار دوباره حل شدند تا pH به عدد ۷ رسید. سوسپانسیون به دست آمده، دوباره سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور) و رسوب آن در متانول حل گردید و سپس تحت پمپ خلأ خشک گردید. رسوب به دست آمده دوباره در یک حداقل حجم از حلال کلرفرم-متانول (حجم مساوی ۱:۱) حل شده و محلول پایه آن آماده شد و تا فاز بعدی در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Mandal *et al.*, 2013).

آزمون HPTLC

برای انتخاب فاز متحرک (حلال) و فاز ثابت از دو حلال متانول و متانول-کلرفرم (حجم مساوی ۱:۱) استفاده شد. برای جداسازی و تشخیص ترکیبات از کاغذ TLC با مشخصات ذیل به عنوان فاز ثابت استفاده گردید:

(60F254, 0.12 mm thick, 5*20 cm, Merck, Germany).

جهت به دست آوردن بهترین طول موج (λ_{max}) برای آنتی‌بیوتیک خالص، از غلظت‌های ۳، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ آنتی‌بیوتیک خالص روی کاغذ لکه‌گذاری شد و پس از قرار دادن در محلول فاز متحرک، میزان جذب از ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر و از ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر

آرایی‌نوز، هفتاد جدایه *B. subtilis* انتخاب گردید (Baindara *et al.*, 2013) و همراه با دوازده جدایه دریافتی از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران و دو جدایه *B. subtilis* دریافتی از چین (دکتر Shih Tung Lio) نهایتاً ۸۴ جدایه برای انجام این تحقیق برگزیده شد.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* درون تشک پتری

این آزمون براساس روش (Samanta *et al.* 2013) روی محیط کشت PDA استاندارد انجام شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

همه آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۸۴ تیمار باکتری و دو شاهد سالم و شاهد آلوده با چهار تکرار در هر تیمار (هر گلدان حاوی ۶ بذر) انجام گرفت. داده‌ها، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

بررسی اثر بازدارندگی باکتری‌های آنتاگونیست بر کاهش بیماری در شرایط گلخانه

برای انجام این آزمون و تهیه سوسپانسیون جدایه‌های باکتری، تهیه مایه تلقیح *R. solani* و آغشته سازی خاک با جدایه‌های آنتاگونیست، از روش (Cai *et al.* 2011) استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر آب حاوی سوسپانسیون باکتری (جهت ایجاد غلظت 1×10^9) سلول باکتری در هر گرم خاک) به هر گلدان اضافه شد. در هر گلدان شش بذر رقم گدوک کشت و طی گذشت ۳۰ روز، درصد گیاهان بیمار محاسبه شد. داده‌های به دست آمده از آزمون مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

بررسی اثر باکتری‌ها روی فاکتورهای رشدی چغندر قند در شرایط عاری از بیمارگر

طی گذشت ۴۵ روز، وزن تر و خشک بوته اندازه‌گیری شد.

ارزیابی کمی نمونه‌ها

این آزمون با دستگاه HPTLC مدل Gamac موجود در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام گرفت میزان مساحت زیر منحنی جذب حاصل از نمونه آنتی‌بیوتیک خالص استاندارد در طول موج ۲۲۰ نانومتر محاسبه شد. برای نمونه‌های مورد تیمار که دارای پیک در ناحیه ایجاد پیک فنجاسین بودند (FEN+) نیز انجام شد. سپس بر اساس مقایسه میزان و غلظت به کاررفته آنتی‌بیوتیک خالص با میزان و غلظت‌های بکار رفته تیمارها میزان کمیت تولیدی آنتی‌بیوتیک در هر کدام از تیمارها به دست آمد. برای محاسبه سطح و غلظت آنتی‌بیوتیک از فرمول ذیل استفاده گردید:

$$y = 1392x + 95.11 \quad R^2 = 0.996$$

که در آن y نشان‌دهنده سطح زیر منحنی و x بیانگر میزان غلظت آنتی‌بیوتیک خالص می‌باشد.

نتایج

اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه

در گلدان‌های شاهد، تمام بذرها کاشته شده، جوانه زدند و رشد کردند و هیچگونه علائم بیماری دیده نشد. اما در گلدان‌های تیمار شده با قارچ بیمارگر، ۹۶ درصد بوته‌ها دچار علائم سیاه شدن طوقه و پوسیدگی آن و مرگ گیاهچه شدند.

شناسایی باکتری‌های جداسازی شده

بر اساس آزمون‌های تعیین خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، ۸۲ جدایه باکتری مورد بررسی در کنار دو استرین دریافتی *B. subtilis* F1 و *B. subtilis* F2 همگی تشخیص داده شدند. البته برای تأیید نهایی، آزمون‌های مولکولی لازم است.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani*

توسط باکتری

این آزمون درون تشتک پتری انجام شد. تعداد ۸۴ تیمار در کنار شاهد در ۱۱ گروه آماری قرار گرفتند که به علت تعداد زیاد ستون‌ها (۸۵ ستون) از هر گروه آماری یک نماینده انتخاب گردید و جهت مقایسه در شکل ۱ آورده

محاسبه و پیک‌های مربوطه به دست آمد. طول موجی که دارای بیشترین درصد جذب بود تعیین گردید. برای انتخاب غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک جهت به دست آوردن منحنی استاندارد، از محلول پایه آنتی‌بیوتیک خالص ۵ غلظت ۳، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ تهیه شد و روی کاغذ لکه‌گذاری شد و پس از قرار دادن در محلول فاز متحرک و طی مراحل ران‌شدن و خشک شدن، در نهایت پیک غلظت‌های مختلف در ۲۲۰ نانومتر به دست آمد و بر اساس مقایسه غلظت در مقابل سطح زیر منحنی و فرمول ارتباط این دو فاکتور، نمودار استاندارد به دست آمد.

ارزیابی کیفی نمونه‌ها

از روش‌های Roy et al. (2003) و Meyanathan et al. (2013) استفاده شد. ابتدا از غلظت‌های تعیین شده لیپوپپتیدی نمونه‌ها هر کدام به میزان ۱۲ میکرولیتر توسط دستگاه لکه‌گذار در پایین صفحه TLC (حدود دو سانتی‌متری لبه) گذاشته شد. سپس کاغذ لکه‌گذاری شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق درون محلول فاز متحرک قرار داده شدند. پس از حدود ۲۰ دقیقه، نمونه‌ها ران شدند. پس از خشک شدن، برای مشاهده و ثبت میزان جذب و پیک‌های حاصل، در دستگاه تشخیص دهنده متصل به سیستم رایانه قرار گرفت و پس از خوانده شدن، منحنی‌های مربوطه و پیک‌های جذبی هر کدام در طول موج ۲۲۰ نانومتر و میزان جذب به دست آمد و گراف‌های هر کدام رسم شد.

در هر بار لکه‌گذاری روی کاغذ یک نمونه آنتی‌بیوتیک خالص به میزان دو میکرولیتر از غلظت سه به عنوان نمونه استاندارد مارکر گذاشته شد. دریک لکه نیز فقط از حلال به عنوان شاهد منفی استفاده شد. در اولین سری لکه‌گذاری از سوسپانسیون لیپوپپتیدی جدایه‌های F1 و F2 به عنوان جدایه‌های استاندارد فنجاسین مثبت و منفی استفاده شد. منحنی‌ها و پیک‌هایی که در منطقه جذبی و زمانبندی نمونه خالص قرار داشتند به عنوان پیک تولید فنجاسین و نمونه مثبت در نظر گرفته شدند و عدم وجود پیک در این منطقه معادل استاندارد، به منزله عدم تولید فنجاسین بود.

تأثیر متعلق به جدایه‌های ۶۵، ۷۱ و ۲۷ بود (عضو گروه آماری b) که توانستند ۶۰/۰۹ درصد شدت بیماری را کاهش دهند. کمترین تأثیر نیز مربوط به ۷ جدایه از گروه آماری ef به نمایندگی جدایه ۶۸ بود که تنها ۸/۷۷ درصد در کاهش بیماری نقش داشتند.

بررسی اثر جدایه‌های *B. subtilis* روی فاکتورهای رشدی چغندر قند در شرایط عاری از بیمارگر میزان وزن تر بوته

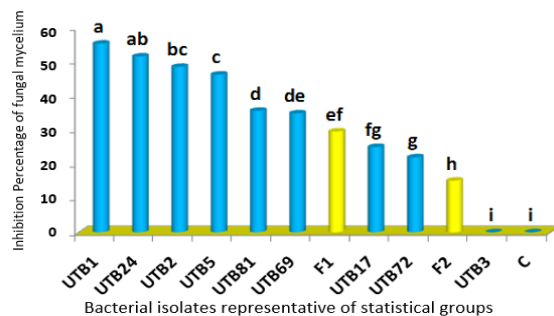
تعداد ۸۴ جدایه در کنار دو تیمار شاهد آلوده و شاهد سالم، در هشت گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۱). از ۸۴ تیمار، نسبت به شاهد سالم، ۵۲ جدایه که در پنج گروه قرار گرفته بودند باعث افزایش معنی‌دار وزن تر در سطح ۵ درصد شدند. بیشترین تأثیر مربوط به تیمارهای ۹، ۱۳، ۱۹، ۴۱ و ۵۸ بود (عضو گروه آماری a) که وزن تر را به ۳/۸ گرم رساندند که نسبت به تیمار شاهد بدون قارچ و باکتری (۳/۴ گرم)، به میزان ۱۱/۷۶ درصد بیشتر بود.

شد. تعداد ۷۴ جدایه با ایجاد هاله بازدارنده و جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ، نسبت به شاهد در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند. جدایه ۱ با ۵۵/۳ درصد بازدارندگی بیشترین اثر را در کنترل رشد میسلیومی قارچ از خود نشان داد (عضو گروه آماری a) و جدایه‌های ۱۲، ۴۶، F2 (جدایه استاندارد *B. subtilis* 29-3) و ۲۸ و ۱۰ هرکدام با ۱۵/۱۵ درصد بازدارندگی، کمترین اثر را داشتند (عضو گروه آماری h).

بررسی‌های گلخانه‌ای

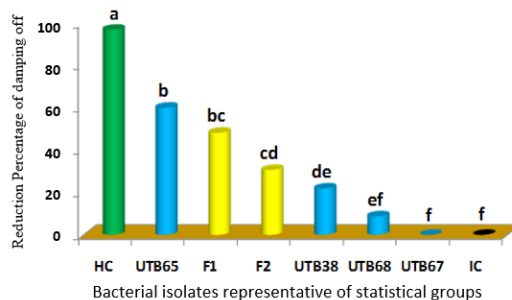
بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست *B. subtilis* بر کاهش بیماری در شرایط گلخانه

تعداد ۸۴ تیمار در کنار دو شاهد آلوده (فقط قارچ) و شاهد سالم (بدون قارچ و باکتری) در هفت گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۱ و شکل ۲). از ۸۴ تیمار، تأثیر ۶۷ تیمار در کاهش بیماری نسبت به شاهد آلوده در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). شاهد سالم در یک گروه آماری مجزا قرار گرفت (a). بیشترین



شکل ۱. میزان بازدارندگی رشد میسلیوم قارچ *Rhizoctonia solani* AG2-2 در برابر جدایه‌های *Bacillus subtilis* در کشت متقابل در تشتک پتری

Figure 1. Inhibitory mycelium growth rate of *Rhizoctonia solani* against *Bacillus subtilis* isolates under double culture in petri



شکل ۲. تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtilis* در کاهش مرگ گیاهچه چغندر قند ناشی از *Rhizoctonia solani* AG2-2 در شرایط گلخانه

Figure 2. Effect of *B. subtilis* isolates on reduction of sugar beet damping off disease caused by *R. solani* under greenhouse conditions

میزان وزن خشک بوته

بیشترین تأثیر در افزایش وزن خشک بوته مربوط به تیمارهای ۵۵ و ۴۱ (عضو گروه آماری a) بود که وزن خشک بوته را به ۰/۷۶ گرم رساندند که نسبت به تیمار شاهد بدون قارچ و باکتری (۰/۶۸۵ گرم)، به میزان ۱۰/۹۵ درصد باعث افزایش وزن خشک بوته شدند.

تعداد ۸۴ جدایه درکنار دو تیمار شاهد آلوده و شاهد سالم، در ۱۰ گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۱) آورده شده است. از ۸۴ تیمار نسبت به شاهد سالم، فقط ۵۲ جدایه که در هفت گروه قرار گرفته بودند باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک در سطح ۵ درصد شدند.

جدول ۱. تأثیر جدایه‌های *Bacillus subtilis* در کاهش بیماری ناشی از *Rhizoctonia solani* AG2-2 و وزن تر و خشک چغندر قند در شرایط گلخانه

Table 1. Effect of *B. subtilis* isolates on *R. solani* disease reduction and fresh and dry weight of sugar beet in greenhouse

Treatment	Disease reduction (greenhouse)	Plant fresh weight (g)	Plant dry weight (g)	Treatment	Disease reduction (greenhouse)	Plant fresh weight (g)	Plant dry weight (g)
UTB1	57.02 b	3.75ab	0.710de	UTB44	48.25bc	3.55cd	0.710de
UTB2	48.25bc	3.48de	0.702ef	UTB45	35.09cd	3.75ab	0.747abc
UTB3	8.77ef	3.48de	0.700ef	UTB46	21.93 de	3.55cd	0.710de
UTB4	21.93de	3.65bc	0.700ef	UTB47	48.25bc	3.43e	0.685f
UTB5	35.09cd	3.68b	0.735bc	UTB48	13.16ef	3.55cd	0.710de
UTB6	21.93de	3.48de	0.707def	UTB49	8.77ef	3.43e	0.685f
UTB7	48.25bc	3.68b	0.725bc	UTB50	35.09cd	3.75ab	0.750abc
UTB8	48.25bc	3.45de	0.690ef	UTB51	57.02 b	3.55cd	0.707def
UTB9	21.93de	3.80a	0.757ab	UTB52	35.09cd	3.75ab	0.750abc
UTB10	48.25bc	3.55cd	0.710de	UTB53	30.70cd	3.43e	0.702ef
UTB11	8.77ef	3.43e	0.700ef	UTB54	57.02 b	3.65bc	0.710de
UTB12	8.77ef	3.55cd	0.710de	UTB55	30.70cd	3.43e	0.760a
UTB13	57.02b	3.80a	0.757ab	UTB56	57.02 b	3.75ab	0.750abc
UTB14	13.16ef	3.55cd	0.707def	UTB57	30.70cd	3.55cd	0.735bc
UTB15	57.02b	3.55cd	0.710de	UTB58	48.25bc	3.80a	0.700ef
UTB16	48.25bc	3.75ab	0.745abc	UTB59	30.70cd	3.75ab	0.745abc
UTB17	0.0f	3.68b	0.735bc	UTB60	0.0f	3.43e	0.685f
UTB18	35.09cd	3.43e	0.687ef	UTB61	30.70cd	3.75ab	0.750abc
UTB19	48.25bc	3.80a	0.757abc	UTB62	57.02 b	3.65bc	0.730cd
UTB20	35.09cd	3.65bc	0.730cd	UTB63	21.93de	3.50de	0.700ef
UTB21	57.02b	3.75ab	0.750abc	UTB64	48.25bc	3.75ab	0.747abc
UTB22	35.09cd	3.75ab	0.750abc	UTB65	60.09b	3.43e	0.685f
UTB23	0.0f	3.48de	0.745abc	UTB66	35.09cd	3.55cd	0.710de
UTB24	48.25bc	3.43e	0.685f	UTB67	0.0f	3.75ab	0.750abc
UTB25	57.0b	3.75ab	0.747abc	UTB68	8.77ef	3.43e	0.685f
UTB26	13.16ef	3.68b	0.735bc	UTB69	21.93de	3.50de	0.700ef
UTB27	60.09b	3.75ab	0.710de	UTB70	35.09cd	3.43e	0.685f
UTB28	0.0f	3.75ab	0.750abc	UTB71	60.09b	3.75ab	0.750abc
UTB29	35.09cd	3.65bc	0.730cd	UTB72	57.02b	3.43e	0.685f
UTB30	21.93de	3.75ab	0.747abc	UTB73	17.54de	3.50de	ef 0.702
UTB31	57.02 b	3.50de	0.687ef	UTB74	57.02b	3.65bc	0.730cd
UTB32	21.93de	3.43e	0.685f	UTB75	35.09cd	3.55cd	0.710de
UTB33	35.09cd	3.43e	0.687ef	UTB76	21.93de	3.43e	0.700ef
UTB34	48.25bc	3.75ab	0.750abc	UTB77	8.77ef	3.75ab	0.750abc
UTB35	30.70cd	3.43e	0.685f	UTB78	8.77ef	3.65bc	0.730cd
UTB36	0.0f	3.50de	ef 0.702	UTB79	13.16ef	3.43e	ef 0.685
UTB37	35.09cd	3.43e	ef 0.690	UTB80	48.25bc	3.50de	0.700ef
UTB38	21.93de	3.75ab	Abc0.750	UTB81	30.70cd	3.75ab	0.750abc
UTB39	48.25bc	3.55cd	0.710de	UTB82	57.02 b	3.43e	ef 0.690
UTB40	35.09cd	3.43e	0.685f	F1	48.25bc	3.68b	0.745abc
UTB41	17.45de	3.80e	0.760a	F2	30.70cd	3.65bc	0.735cd
UTB42	48.25bc	3.43e	ef 0.687	HC	0.0f	f 0.48	0.685f
UTB43	21.93de	3.75ab	0.750abc	IC	96.93 a	3.43e	0.095g

اعداد جدول میانگین چهار تکرار است. اعدادی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن در سطح کمتر از ۱ درصد (آزمایشگاهی) و کمتر از ۵ درصد (گلخانه‌ای) با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. اعداد جدول اعداد اصلی هستند، اما به علت وجود صفر در نتایج، برای تجزیه و تحلیل آماری با فرمول $Y=X+1/x+0.5$ تبدیل داده شده‌اند. F1 و F2 جدایه‌های دریافتی از خارج می‌باشند و HC: شاهد سالم و IC: شاهد آلوده هستند.

Plant dry weight (g)	Plant fresh weight (g)	Disease reduction (%)	Test
17.9	16.7	18	(CV)
0.97	0.98	0.93	R2

سایر نمونه‌های تحت تیمار نیز، در همین گستره RF= 60-70 ردیابی شدند که بر این اساس مشخص شد ۱۹ نمونه از جمله جدایه ۳۸ (شکل ۳) در این منطقه، دارای پیک تولید فنجایسین بودند. ۶۵ نمونه نیز از جمله نمونه جدایه ۸۱ (شکل ۴) در این ناحیه هیچگونه پیکی ایجاد نکردند. سویه استاندارد F1 نیز توانست در این منطقه پیک تولید فنجایسین را نشان دهد (شکل ۵) اما جدایه F2 در این ناحیه هیچگونه پیکی ایجاد نکرد.

وضعیت جدایه‌های *Bacillus subtilis* از نظر ارزیابی کیفی (تولید یا عدم تولید) آنتی‌بیوتیک فنجایسین (FEN)

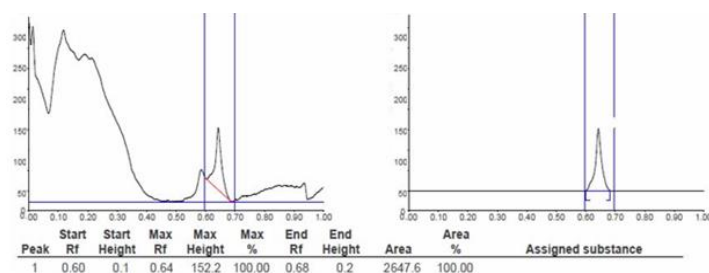
بر اساس نتایج آزمون HPTLC نشان داد که از ۸۴ جدایه مورد آزمون تشخیص تولید آنتی‌بیوتیک فنجایسین، تعداد ۱۹ جدایه از جمله جدایه استاندارد F1 توانستند این آنتی‌بیوتیک را تولید کنند (FEN+) و در مقابل آن، ۶۵ جدایه از جمله جدایه F2 قادر به تولید آنتی‌بیوتیک فنجایسین نبودند (FEN-). وضعیت جدایه‌ها از نظر ارزیابی کیفی (تولید یا عدم تولید) آنتی‌بیوتیک فنجایسین، در جدول ۲ آمده است.

آزمون HPTLC

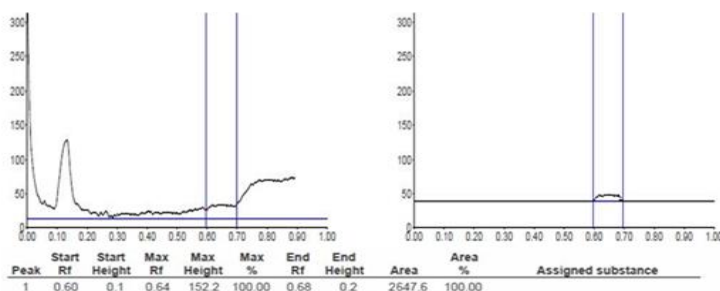
نتایج جداسازی و تشخیص آنتی‌بیوتیک فنجایسین با HPTLC بهترین طول موج (λ_{max}) برای آنتی‌بیوتیک خالص و بیشترین جذب برای تمام غلظت‌های به کاررفته، طول موج ۲۲۰ نانومتر بود. برای به دست آوردن منحنی استاندارد آنتی‌بیوتیک خالص، بعد از ران کردن پنج غلظت ۳، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ از محلول پایه آنتی‌بیوتیک خالص (با غلظت اولیه ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پیک‌هایی به دست آمد که مساحت زیر منحنی در آنها به ترتیب ۴۲۶۴، ۱۲۳۸۶، ۳۸۹۸۵ و ۸۴۸۸۱ بود که پس از رسم نمودار حاصله، سطح و غلظت آنتی‌بیوتیک به دست آمد.

نتایج تشخیص کیفی (تولید یا عدم تولید) آنتی‌بیوتیک فنجایسین

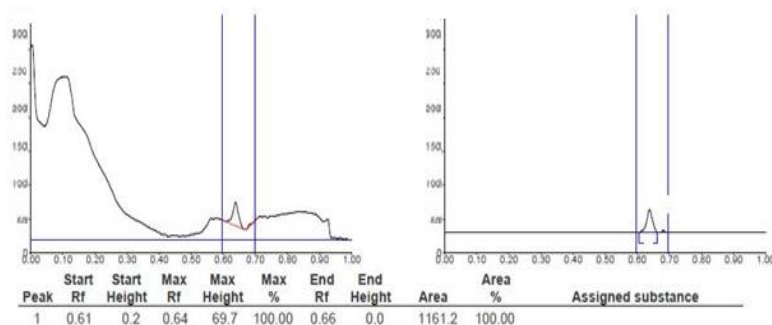
در تشخیص کیفی (تولید یا عدم تولید) آنتی‌بیوتیک فنجایسین، مشاهده و ثبت میزان جذب و پیک‌های حاصل نشان داد که نمونه خالص استاندارد در طول موج ۲۲۰ نانومتر فقط ایجاد یک پیک نمود که RF (Retention Factor) شروع آن ۰/۶۱، حداکثر آن برابر با ۰/۶۴ و RF پایانی نیز ۰/۶۷ بود.



شکل ۳. تشکیل پیک فنجایسین (FEN+) توسط جدایه ۳۸ باکتری *Bacillus subtilis*
Figure 3. Formation of fengycin peak (FEN+) by *Bacillus subtilis* isolate 38



شکل ۴. عدم تشکیل پیک تولید فنجایسین (FEN-) توسط جدایه ۸۱ باکتری *Bacillus subtilis*
Figure 4. Non-production of fengycin peak (FEN-) by *Bacillus subtilis* isolate 81



شکل ۵. تشکیل پیک تولید فنجاسین (FEN+) توسط جدایه F1 (*Bacillus subtilis* استاندارد فنجاسین مثبت)
Figure 5. Formation of fengycin peak (FEN +) by isolate F1 (*Bacillus subtilis* standard FEN+)

جدول ۲. ارزیابی کیفی جدایه‌های *Bacillus subtilis* از نظر تولید یا عدم تولید آنتی‌بیوتیک فنجاسین

Table 2. Qualitative evaluation of *Bacillus subtilis* isolates (production or non-production of fengycin antibiotic)

Fengycin production	Isolates	Number	Control standard isolate
Isolates with the ability to fengycin production (FEN+)	UTB 1, UTB 2, UTB 7, UTB 15, UTB 19, UTB 29, UTB 30, UTB 34, UTB 38, UTB 42, UTB 50, UTB 51, UTB 56, UTB 64, UTB 65, UTB 68, UTB 71, UTB 80, F1	19	F1
Isolates without the ability to fengycin Production (FEN-)	Other isolates	65	F2

مقایسه جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنجاسین در آزمون HPTLC در بین جدایه‌های دارای سطح کنترلی معنی‌دار در آزمون گلخانه‌ای آنتاگونیست‌ها

از ۷۵ جدایه با سطح کنترلی معنی‌دار، ۱۹ جدایه (FEN+) تولیدکننده فنجاسین بودند و ۵۶ جدایه نیز فنجاسین تولید نکرده بودند (FEN-). تمامی ۱۹ جدایه تولیدکننده فنجاسین (FEN+) در گروه‌های دارای سطح کنترلی معنی‌دار قرار گرفتند (۱۰۰ درصد) که پنج جدایه ۱، ۱۵، ۵۱، ۵۶ و ۶۵ تولیدکننده فنجاسین و دارای بالاترین سطح کنترل بودند (شکل ۶).

بحث

نتایج بازدارندگی از رشد قارچ در تشک پتری، با نتایج (2013) Samanta *et al.* و (2007) Sarani *et al.* مطابقت داشت. در تحقیق (2007) Sarani *et al.*، یازده جدایه نتوانستند هیچ‌گونه بازدارندگی داشته باشند. جدایه UTB 1 با ۵۳/۳ درصد بالاترین بازدارندگی را داشت. گزارش (2007) Sarani *et al.* و تحقیقات (2006) Kawai *et al.* نیز تأثیر جدایه‌های *B. subtilis* را در کاهش بیماری در سطح گلخانه تأیید می‌کند.

نتایج تشخیص کمی (میزان تولید آنتی‌بیوتیک فنجاسین توسط جدایه‌ها)

نتایج تشخیص کمی میزان تولید فنجاسین توسط جدایه‌ها که از محاسبه میزان مساحت زیر منحنی جذب حاصل از نمونه آنتی‌بیوتیک خالص استاندارد و مقایسه با نمونه‌های مورد تیمار که دارای پیک در ناحیه ایجاد پیک فنجاسین (FEN+) در طول موج ۲۲۰ نانومتر بودند، نشان داد که از بین ۱۹ جدایه تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنجاسین، بیشترین تولید مربوط به جدایه ۷۱ با ۷۸۸/۱ نانوگرم در میکرولیتر بود و کمترین آن هم به جدایه ۳۸ با تولید ۶۱/۹ نانوگرم در میکرولیتر اختصاص داشت. جدایه استاندارد هم توانست به میزان ۲۷۲/۳ نانوگرم در میکرولیتر آنتی‌بیوتیک تولید کند (جدول ۳).

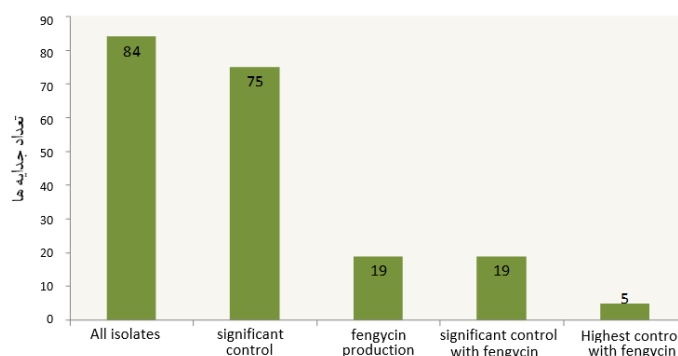
بر اساس نتایج بررسی‌های کمی و اندازه‌گیری میزان آنتی‌بیوتیک تولیدی توسط جدایه‌های مورد تیمار، مشخص شد که بیشترین تولید مربوط به جدایه UTB71 با ۷۸۸/۱ نانوگرم در میکرولیتر بود و کمترین آن هم به جدایه UTB38 با تولید ۶۱/۹ نانوگرم در میکرولیتر اختصاص داشت. جدایه استاندارد هم توانست به میزان ۲۷۲/۳ نانوگرم در میکرولیتر آنتی‌بیوتیک تولید کند (جدول ۳).

جدول ۳. مساحت زیر منحنی جذب حاصل از تولید آنتی‌بیوتیک و میزان کمیت تولید (نانوگرم در میکرولیتر) آنتی‌بیوتیک توسط

جدایه‌های *Bacillus subtilis*

Table 3. Area under the absorption curve of antibiotic production and amount of antibiotic production (Ng / l) by *Bacillus subtilis* isolates

Antibiotic-producing isolates	Area under the curve	Amount of antibiotic (Ng / l)	Antibiotic-producing isolates	Area under the curve	Amount of antibiotic (Ng / l)
UTB 1	399.9	93.8	UTB 50	917.9	215.3
UTB 2	591.0	138.6	UTB 51	2395.2	561.7
UTB 7	842.0	197.5	UTB 56	334.5	78.5
UTB 15	281.9	66.1	UTB 64	609.2	142.9
UTB 19	2647.6	620.6	UTB 65	1174.6	275.5
UTB 29	768.1	180.1	UTB 68	3007.6	705.3
UTB 30	371.0	87.0	UTB 71	3360.3	788.1
UTB 34	1138.0	266.9	UTB 80	348.8	79.0
UTB 38	264.0	61.9	Standard isolate F1	1161.2	272.3
UTB 42	529.9	124.3			



شکل ۶. مقایسه جدایه‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک فنجاسین در آزمون HPTLC در بین جدایه‌های *Bacillus subtilis* دارای

سطح کنترلی معنی‌دار در آزمون گلخانه‌ای

Figure 6. Comparison of the producing fengycin antibiotic isolates in HPTLC test among the isolates with a control significant level in the greenhouse

بین آزمون‌های وزن تر با خشک ۸۶ درصد همبستگی وجود داشت. به عبارتی این دو آزمون به میزان زیادی همدیگر را تأیید می‌کنند و می‌توان با انجام یکی از آنها نتایج بعدی را هم انتظار داشت. سه جدایه ۵۱، ۶۵ و ۷۱ میزان بیشتری آنتی‌بیوتیک نسبت به جدایه استاندارد تولید کردند درحالی‌که سه جدایه دیگر با وجود تولید کمتر آنتی‌بیوتیک نسبت به جدایه استاندارد، باز هم میزان کنترل بهتری علیه قارچ نشان می‌دهد مجموعه عوامل مختلفی در کنترل بیمارگر در سطح گلخانه و مزرعه دخیل هستند و با وجود تولید کمتر آنتی‌بیوتیک سایر عوامل در این جدایه‌ها بهتر عمل کرده‌اند. دو جدایه ۵۰ و ۶۸ نیز، همسطح جدایه استاندارد F1 بودند (گروه cd). جالب توجه این‌که دو جدایه با داشتن میزان تولید بیشتر نسبت به استاندارد از نظر سطح کنترلی در رده کمتر

در این تحقیق از ۸۴ جدایه باکتری، تنها ۳۲ جدایه سطح کنترلی بیش از ۵۰ درصد داشتند که آنها را می‌توان برای تحقیق در سطح مزرعه در نظر گرفت. ۵۲ جدایه باعث افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک بوته‌ها نسبت به شاهد سالم شدند که این نشانه تأثیر مثبت این باکتری است. در تحقیقات قبلی Muis & Quimio (2006) نشان دادند که تیمار بذری ذرت با *B. subtilis* BR23 توانست وزن تر بوته را در مقابل شاهد سالم، به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. Fan et al. (2017) برای اولین بار پتانسیل بیوکنترلی جدایه *B. subtilis* با قدرت تولید فنجاسین را در کنترل قارچ *Botryosphaeria dothidea* عامل پوسیدگی حلقوی سیب اثبات کردند. این نتایج با یافته‌های Gao et al. (2014) مطابقت دارد. Sarani et al. (2007) نیز روی گیاه کلزا به همین نتایج در مورد تأثیر جدایه‌های آنتاگونیستی *B. subtilis* در مقابل بیمارگر *R. solani* رسیده بودند.

2013). *al.*, در پژوهش Cai *et al.* (2011) به کمک لیپوپپتیدهای تولیدشده توسط *Bacillus subtilis* EBS05 که به صورت اپی‌فیت روی گیاهان دارویی زندگی می‌کرد، قارچ بیمارگر *Rhizoctonia cerealis* تا ۸۸٪ درصد کنترل گردید.

هرچند تأثیر کنترلی به مجموعه‌ای از شرایط پیچیده زنده و غیرزنده و همچنین به توانایی باکتری در تولید و استفاده از مکانیزم‌های مختلف از جمله نوع و میزان تولید متابولیت‌های آن بستگی دارد اما در هر حال بعضی از جدایه‌های *Bacillus subtilis* امروزه به صورت کاربردی در کنترل بیمارگرها کاربرد دارند و جنبه تجاری یافته‌اند. یک نمونه از ترکیبات تجاری بیولوژیک بر پایه این باکتری، ترکیب سرنید (serenade) است. این قارچکش بیولوژیک با استفاده از جدایه *B. subtilis* QST-713 تولید گردید و از سال ۲۰۰۰ به عنوان یک محصول تجاری معرفی شد. این ترکیب به صورت پودر و تابل، گرانول و تابل و سوسپانسیون مایع ارائه شده است که می‌تواند به تنهایی یا با سایر سموم شیمیایی تجاری شود و روی موجودات زنده غیر هدف نظیر ماهی قزل‌آلا، زنبور عسل، سوسک‌های مفید، زنبورهای پارازیت و کرم‌های خاکی اثر سمیت ندارد (Souto *et al.*, 2004).

نتیجه‌گیری

تولید آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی مثل فنجاسین توسط گونه *B. subtilis* در افزایش سطح کنترل بیمارگرهای گیاهی مؤثر است و به نظر می‌رسد جدایه‌های ایرانی از جمله جدایه UTB 1 پتانسیل خوبی برای تحقیقات کاربردی در مزرعه و جهت تبدیل شدن به یک محصول تجاری را دارند.

یا هم‌تراز قرار گرفتند. این نشان‌دهنده این است که شاخص تولید آنتی‌بیوتیک به تنهایی تأییدکننده وضعیت کنترلی در گلخانه و مزرعه نیست و سایر عوامل در این جدایه‌ها نسبت به جدایه استاندارد ضعیف‌تر عمل کرده‌اند.

قبلاً در گزارش‌های متعددی تأثیر آنتی‌بیوتیک فنجاسین به اثبات رسیده است. Zhang & Sun (2018) توانستند با استخراج لیپوپپتیدهای باسیلوس سوبتیلیس‌های جداشده از اقیانوس، قارچ بیمارگر *Magnaporthe grisea* عامل بلاست برج را کنترل کنند. در تحقیق دیگری نیز، نقش لیپوپپتیدهای ایتورین و فنجاسین و سورفکتین تولیدشده توسط *Bacillus subtilis* CMB32 در کنترل قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* بیمارگر عامل آنتراکنوز را به اثبات رسیده بود (Pyoung *et al.*, 2010).

لیپوپپتیدهایی مانند فنجاسین در کاهش بیماری یک نقش تقاطعی (crucial role) دارند که استفاده از موتانت‌های فاقد قدرت تولید فنجاسین این نظریه را اثبات می‌کند. فنجاسین درصد زیادی از پتانسیل القایی مواد فنولیک را در عصاره خام لیپوپپتیدی حفظ می‌کند. تیمار غده سیب‌زمینی با عصاره حاوی فنجاسین توانسته دو تا سه برابر باعث افزایش غلظت مواد فنولیک از جمله تیروزین، اسیدکلروژنیک، اسید فرولیک و اسید سینامیک در غده‌ها گردد. به علاوه تیمار غده سیب‌زمینی با فنجاسین خالص که منجر به تجمع تعدادی از مواد فنولیک شد نشان‌دهنده دخالت این ترکیب در متابولیسم یا خروج فنیل پروپانویید می‌باشد (Araujo *et al.*, 2005). این آنتی‌بیوتیک از گونه *Bacillus thuringiensis* نیز استخراج شده و فعالیت ضدقارچی آن علیه قارچ *Candida albicans* نیز بررسی گردیده است (Roy *et*

REFERENCES

1. Araujo, F. F., Henning, A. A. & Hungria, M. (2005). Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 1639-1645.
2. Baidara, P., Mandal, S. M., Chawla, N., Singh, P. K., Pinnaka, A. K. & Korpole, S. (2013). Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halo tolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU. 4 isolated from a rhizosphere soil sample; *AMB Express* 5, 32. doi:10.1186/2191-0855-3-2.
3. Wen, C. Y., Yin, Z. G., Wang, K. X., Chen, J. G., & Shen, S. S. (2011). Purification and structural analysis of surfactin produced by endophytic *Bacillus subtilis* EBS05 and its antagonistic activity against *Rhizoctonia cerealis*. *The Plant Pathology Journal*, 27(4), 342-348.
4. Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R. & Losick, R. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.*, 15, 848-864.

5. Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q. & Li, Y. (2017). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199, 89-97.
6. Ghorab, M. A. & Khalil, M. S. (2016). The effect of pesticides pollution on our life and environment. *Journal of Pollution Effects & Control*, 4(2). DOI: 10.4172/2375-4397.1000159.1000159.
7. Guo, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X., Wang, Y. & Ma, P. (2014). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*; 169(7-8), 533-540.
8. Kamali, A., Aminian, H., Mahmoudi, S. B. & Amiri, R. (2008). *In vitro* evaluation of resistance of sugar beet genotypes to *Rhizoctonia solani* AG2-2. In: Proceedings of the 18th Iranian plant protection congress, 24-27 August, p: 111. (in Farsi)
9. Kawai, A., Kusunoki, K., Aiuchi, D., Koike, M., Tani, M. & Kuramochi, K. (2006). Biological control of Verticillium black spot of Japanese radish using *Bacillus* spp. and genotypic differentiation of selected antifungal *Bacillus* strains with antibiotic marker. *Research Bulletin Obihiro*, 7, 109-119.
10. Mandal, S. M., Sharma, S., Pinnaka, A. K., Kumari, A. & Suresh, K. (2013). Isolation and characterization of diverse antimicrobial lipopeptides produced by *Citrobacter* and *Enterobacter*. *BMC Microbiology*, 13:152. Doi:10.1186/1471-2180-13-152.
11. Meyanathan, S. N. (2003). *HPTLC- high performance thin layer chromatography is a sophisticated and automated form of TLC*. Department of Pharmaceutical Analysis, J.S.S. College of Pharmacy, HPTLC\Basic Principles of HPTLC Pharmainfo_net.mht
12. Muis, A. & Quimio, A. (2006). Biological control of banded leaf and sheath blight disease (*Rhizoctonia solani* Kuhn) in corn with formulated *Bacillus subtilis* BR23. *Indonesian journal of Agricultural Science*, 7(1), 1-7.
13. Pyoung, K., Jaewon, R., Young, H. K. & Youn-Tae, Ch. (2010). Production of bio surfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 20(1), 138-145.
14. Ramarathnam, R., Shen, B., Yu, C. & de Kieveit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 901-911.
15. Roy, A., Mahata, D., Paul, D., Korpole, S., Franco, O. L. & Mandal, S. M. (2013) Purification, biochemical characterization and self-assembled structure of a fengycin-like an fungal peptide from *Bacillus thuringiensis* strain SM1. *Frontiers in Microbiology*; 4 Article 332. doi: 10.3389/fmicb.2013.00332.
16. Samanta, T., Roymahapatra, G., Porto, W. F., Seth, S., Ghorai, S. & Saha, S. (2013). N, N-olefin functionalized bis-imidazolium gold (I) salt is an efficient candidate to control keratitis-associated infection. *PLoS ONE*, 8; e58346. doi:10.1371/journal.pone.0058346
17. Sarani, Sh. A., Sharifi- Tehrani, A., Ahmadzade, M. & Javan-nikkhah, M. (2007). Biological control of canola *Rhizoctonia* damping off with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces* sp. *Agricultural Sciences & Technology Journal* (Special Issue in Plant Protection), 21(1), 25-38. (in Farsi)
18. Souto, G. I., Correa, O. S., Montecchia, M. S., Kerber, N. L., Pucheu, N. L., Bachur, M. & Garcia, A. F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1247-1256.
19. Xiang, Y., Liu, Y. & Lee, M. L. (2006). Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature. *Journal of Chromatography A*; 104 (1-2), 198-202.
20. Zeriuoh, H., Romero, D., Garcia-Gutierrez, L., Cazorla, F. M., de Vicente, A. & Perez-Garcia, A. (2011). The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Mol. Plant Microbe Interact*, 24, 1540-1552.
21. Zhang, L. & Sun, Ch. (2018). Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18) e00445-18.