



Biocontrol potential of *Bacillus* strains in interaction with *Rhizoctonia solani* pathogen of potato

Hossein Norozi¹, Sareh Baghaee-Ravari², Shideh Mojerlou³

1. Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: hossein.norozi20@gmail.com
2. Corresponding author, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: s.baghaee@um.ac.ir
3. Department of Horticulture and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran. Email: shideh.mojerlou@shahroodut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 4 April 2023

Revised: 14 September 2023

Accepted: 18 September 2023

Published online: 18 September 2023

Keywords:

Bacillus sp.,

Biocontrol,

Potato,

Rhizoctonia Solani AG3,

Stem Canker.

ABSTRACT

During the growth period, the potato crop is exposed to a combination of biotic and abiotic stresses. *Rhizoctonia solani* Kuhn is the causal agent of potato stem canker disease and one of the most important soil-borne plant pathogens that reduce the yield and quality of potatoes worldwide. Antagonistic bacteria seem to be a good alternative to chemicals in controlling plant pathogens. This study evaluated the biocontrol properties (hydrolyzing enzymes, siderophore, surfactant, biofilm) of 20 *Bacillus* isolates against *R. solani* AG3. In total, 23 to 64.9 % of isolates in dual culture assay, 38.2 to 85.4% in volatile compound production, and 76.9 to 90% in antibiotic production showed inhibition against the tested fungus. The isolates were variable in terms of biocontrol properties. Based on the in vitro results, five isolates including Ba1, Ba5, Ba8, Ba11, and Ba12 were selected for identification and additional investigations under greenhouse experiments. The selected isolates inhibited the germination of fungal sclerotium and caused mycelial fragmentation and cytoplasmic coagulation. Strains Ba1, Ba5, Ba8, Ba11, and Ba12 belonged to *B. mojavensis*, *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *Bacillus* sp., and *B. velezensis*, respectively. In the greenhouse trials, the disease severity index was zero in treatments Ba5 (*Bacillus* sp.) and Ba8 (*B. pumilus*), similar to Rovral -TS fungicide and completely controlled stem canker disease. Therefore, they are suggested for additional investigations and preparation of optimal formulations.

Cite this article: Norozi, H., Baghaee-Ravari, S., & Mojerlou, Sh. (2023). Biocontrol potential of *Bacillus* strains in interaction with *Rhizoctonia solani* pathogen of potato. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (1), 187-205. DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.357079.1007026>



© The Author(s).

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.357079.1007026>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Stem canker disease caused by *Rhizoctonia solani* is one of the destructive diseases of potatoes that leads to the loss of the annual yield of the product all over the world. Disease control methods include planting disease-free seed tubers and using chemical compounds that inhibit the fungus. The continuous use of fungicides causes the emergence of resistant strains and environmental pollution. *Bacillus* species have a unique ability to multiply rapidly, compete for space and nutrients with the *Rhizoctonia* pathogen, and survive under adverse environmental conditions. They secrete different types of antimicrobial compounds such as lipopeptides, antibiotics, enzymes, and volatile organic substances. They also strengthen plant growth and induce systemic resistance. The current study was conducted to investigate the biocontrol and growth of *Bacillus* strains in reducing potato stem canker disease and improving the growth characteristics of the plant.

Materials and Methods

To evaluate the inhibitory mechanisms of *Bacillus* strains on *Rhizoctonia* pathogen, three methods including dual culture assay, production of antifungal volatile substances, and antibiotic production were used. All experiments were performed in two separate experiments based on a completely randomized design with 20 treatments and three repetitions. The biocontrol characteristics of the antagonists consisting of the production of hydrolyzing enzymes, siderophore, biosurfactant, and biofilm development were evaluated. Five selected strains were identified using 16S rRNA sequencing. Also, their effect on the germination of sclerotia of the pathogenic fungus and the morphology of its mycelium was checked. In pot experiments, in addition to candidate strains (Ba1, Ba5, Ba8, Ba11, Ba12, Ba5 + Ba11), other defined treatments including Carbendazim, Iprodione-Carbendazim, potassium phosphite, negative control (healthy plant), and positive control (fungus infected plant) were determined and disease scale calculated. The results of biological tests were analyzed by SPSS software version 24.

Results and Discussion

In dual culture screening, strains Ba12 and in the production tests of volatile and antibiotic compounds, strains Ba11 and Ba8 respectively showed the highest inhibition against the studied fungal pathogen. Apart from the 3 mentioned strains, Ba1 and Ba5 candidates are in the next degrees of inhibiting the growth of the fungus. In evaluating the production of extracellular enzymes, Ba8 had the highest amount of chitinase and Ba12 had the highest production of cellulase, protease, and pectinase. Also, strains Ba1 and Ba5 secreted all the examined enzymes except pectinase. Five candidate strains also belong to moderate and strong biofilm-producing groups. All of them led to mycelium swelling and fragmentation and cytoplasmic coagulation in *R. solani* AG3 mycelia. According to the sequencing data, selected isolates including Ba1, Ba5, Ba8, Ba11, and Ba12 belonged to *B. mojavensis*, *Bacillus* sp., *B. pumilus*, *Bacillus* sp., and *B. velezensis*, respectively. Among the selected *Bacillus* strains, Ba5 and Ba8 showed zero disease index and controlled the disease, just like the Iprodione-Carbendazim fungicide. Another strain (Ba8) which controlled the pathogen 100% in greenhouse experiments, also produced high chitinase, which is effective in destroying the fungal wall and also completely prevented the germination of *Rhizoctonia* sclerotia. The combined treatment did not show an additive effect compared to the single treatment.

Conclusion

Due to their genetic and metabolic diversity, *Bacillus* species are well-adapted to a wide range of environmental conditions. Based on the results of the present research, it seems that the usage of Ba8 (*B. pumilus*) and Ba5 (*Bacillus* sp.) strains in combination with other available control methods should be appropriate for stem canker reduction. However, achieving the optimal formulation and validating the results requires field experiments on a larger scale.



پتانسیل کنترل زیستی جدایه‌های باسیلوس در تعامل با بیمارگر *Rhizoctonia solani* سیبزمینی

حسین نوروزی^۱ | ساره بقایی راوری^۲ | شیده موجرلو^۳

۱. گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: hossein.norози20@gmail.com
۲. نویسنده مسوول، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: s.baghacee@um.ac.ir
۳. گروه باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران. رایانامه: shideh.mojerlou@shahroodut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۲۳</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷</p> <p>تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷</p>	<p>در طول دوره رشد، محصول سیبزمینی در معرض ترکیبی از تنش‌های زنده و غیر زنده قرار می‌گیرد. قارچ <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn عامل بیماری شانکر ساقه سیبزمینی و یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی خاک برد است که باعث کاهش عملکرد و کیفیت محصول سیبزمینی در سراسر جهان می‌شود. به نظر می‌رسد باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل بیمارگرهای گیاهی جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی هستند. در این مطالعه، ویژگی‌های بیوکنترلی (آنزیم‌های هیدرولیز کننده، سیدروفور، سورفاکتانت، بیوفیلیم) ۲۰ جدایه باسیلوس علیه <i>R. solani</i> AG3، در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در مجموع جدایه‌ها در کشت متقابل ۲۳ تا ۶۴/۹ درصد، در تولید ترکیبات فرار ۳۸/۲ تا ۸۵/۴ درصد و در تولید آنتی بیوتیک ۷۶/۹ تا ۹۰ درصد مهار رشد بیمارگر قارچی را نشان دادند. جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های بیوکنترلی متغیر بودند. براساس نتایج آزمایشگاهی، پنج جدایه Ba1، Ba5، Ba8، Ba11 و Ba12 برای شناسایی و بررسی‌های تکمیلی گلخانه‌ای انتخاب شدند. جدایه‌های منتخب سبب بازدارندگی جوانه‌زنی اسکروت قارچ و قطعه قطعه شدن و انعقاد سیتوپلاسمی در میسلیم قارچ بیمارگر شدند. جدایه‌های Ba1، Ba5، Ba8، Ba11 و Ba12 به ترتیب به گونه‌های <i>B. pumilus</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>B. pumilus</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>mojavensis</i> و <i>B. velezensis</i> تعلق دارند. در شرایط گلخانه، شاخص شدت بیماری در تیمارهای (<i>Bacillus sp.</i>) Ba5 و (<i>B. pumilus</i>) Ba8 همانند قارچ کش رورال تی اس صفر بود و بیماری شانکر ساقه را به طور کامل کنترل نمودند. از این رو برای بررسی‌های تکمیلی و تهیه فرمولاسیون پهنه پیشنهاد می‌شوند.</p>
<p>کلیدواژه‌ها:</p> <p>باسیلوس، بیوکنترل، سیبزمینی، شانکر ساقه، <i>Rhizoctonia solani</i> AG3</p>	

استناد: نوروزی، حسین؛ بقایی راوری، ساره؛ و موجرلو، شیده (۱۴۰۲). ب پتانسیل کنترل زیستی جدایه‌های باسیلوس در تعامل با بیمارگر *Rhizoctonia solani* سیبزمینی. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۴ (۱)، ۲۰۵-۱۸۷. DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.357079.1007026>



© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.357079.1007026>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

سیب‌زمینی چهارمین محصول مهم زراعی از نظر میزان تولید بعد از گندم، ذرت و برنج می‌باشد و نقش مهمی در امنیت غذایی آینده ایفا می‌کند (Bradshaw and Ramsay, 2009). گیاه سیب‌زمینی در معرض حمله دامنه وسیعی از آفات و بیمارگرها قرار دارد که وجود این عوامل در کنار صدمات مکانیکی در شرایط دمایی مساعد باعث افت شدید عملکرد در واحد سطح در مناطق آلوده می‌شود (Pinhero & Yada, 2016). بیماری شانکر ساقه و شوره سیاه سیب‌زمینی، ناشی از *Rhizoctonia solani* Kuhn (فرم جنسی *Thanatephorus cucumeris* Frank Donk) از بیماری‌های مخرب سیب‌زمینی می‌باشد که باعث از دست رفتن ۲۰ تا ۴۰ درصد عملکرد سالانه محصول در سراسر جهان می‌شود (Srivastava et al., 2016). خسارت کمی به آلودگی گیاهان در حال رشد (شانکر ساقه)، استولون‌ها و ریشه‌ها اشاره دارد که بر اندازه و تعداد غده تأثیر می‌گذارد. درحالی‌که خسارت کیفی عمدتاً از طریق آلودگی غده‌ها با تشکیل اسکروت‌ها در اواخر فصل رشد (شوره سیاه) صورت می‌گیرد که بازاری‌پسندی محصول را کاهش می‌دهد (Atkinson et al., 2010).

یکی از راه‌کارهای به حداقل رساندن بیماری، کاشت غده‌های بذری عاری از بیماری و یا غده‌های تیمار شده با آنتاگونیست‌ها و یا قارچ‌کش‌ها می‌تواند باشد (Wharton & Wood, 2013). پیش‌جوانه‌دار کردن غده‌های بذری نیز باعث فرار گیاه از بیماری شده و فرصت حمله بیمارگر به گیاه را محدود می‌کند (Wale et al., 2008). واکنش ارقام سیب‌زمینی در برابر بیمارگر ریزوکتونیا متفاوت است، تاکنون هیچ‌گونه‌ای از سیب‌زمینی کاملاً مقاوم به این بیماری گزارش نشده است (Woodhall et al., 2013). ترکیبات شیمیایی از جمله فلودیوکسونیل و پنسیکورون اثربخشی بالایی در مهار ریزوکتونیا دارند، اما باعث آلودگی قابل‌توجهی در مخازن آب زیرزمینی، خاک و به‌عنوان پسماندهای شیمیایی نامطلوب در زنجیره غذایی تجمع می‌یابند (Lamichhane et al., 2020). علاوه بر این، کاربردهای مداوم و بیش‌ازحد ترکیبات شیمیایی باعث ظهور جدایه‌های مقاوم شده است (Lee et al., 2017). بنابراین، اقدامات کنترلی نوآورانه شامل توسعه آفت‌کش‌های زیستی سازگار با محیط‌زیست برای به حداقل رساندن گسترش *R. solani* ضروری است (Rahman et al., 2018).

باکتری‌های مفید ریزوسفری با مکانیسم‌های کنترل زیستی شامل سنتز ترکیبات ضد میکروبی مختلف از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن، سیدروفور و آنزیم‌های هیدرولیتیک و نیز تولید هورمون‌های گیاهی و فعال‌سازی سیستم ایمنی می‌توانند در کاهش میزان بیماری و افزایش رشد گیاهان مؤثر باشند (Keswani et al., 2020). گونه‌های باکتری *باسیلوس* توانایی منحصربه‌فردی برای تکثیر سریع داشته، برای فضا و مواد مغذی با بیمارگر ریزوکتونیا رقابت می‌کنند و ساختارهای بسیار مقاومی به نام اندوسپور تولید می‌کند که آن را قادر می‌سازد تا تحت شرایط نامساعد محیطی زنده بماند، انواع مختلف ترکیبات ضد میکروبی مانند لیپوپپتیدها، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و ترکیبات آلی فرار ترشح می‌کنند و نیز رشد گیاه را تقویت کرده و مقاومت سیستمیک را القا می‌نمایند (Shafi et al., 2017).

در بررسی‌های انجام شده نشان داده است که، گونه‌های مختلف *Bacillus* در سرکوب میسلیوم *R. solani* و کاهش شدت شانکر ساقه موثر بوده اند (Brewer et al., 2005; Khedher et al., 2015; Hussain et al., 2020). در پژوهش‌های داخلی تحقیق مشخصی در ارتباط با کنترل زیستی *R. solani* سیب‌زمینی با استفاده از جدایه‌های *باسیلوس* انجام نگرفته است. مطالعه حاضر باهدف بررسی بیوکنترلی و رشدی جدایه‌های *باسیلوس* در کاهش بیماری شانکر ساقه سیب‌زمینی و ارتقا ویژگی‌های رشدی گیاه انجام گرفته است.

پیشینه پژوهش

بررسی و ارزیابی مکانیسم بیوکنترلی باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 مرتبط با ریشه گیاهان، یک مکانیسم محافظت از گیاه توسط باکتری‌های مفید را نشان داد. غلظت‌های زیر کشنده لیپوپپتیدهای حلقوی و مواد فرار تولیدشده توسط باکتری‌ها باعث ایجاد مسیرهای مقاومت سیستمیک القایی شدند (Chowdhury et al., 2015). فعالیت ضد قارچی

جدایه *B. subtilis* V26 در برابر رشد *R. solani* در سیب‌زمینی به صورت تغییر در ریخت‌شناسی هیف‌های قارچی مانند واکوئله شدن، نشت پروتوپلاست و ایجاد ترک مشاهده شد (Khedher et al., 2015). در بررسی اخیر، باکتری آنتاگونیست V26 باعث کاهش بروز شانکر ساقه و شوره سیاه در مقایسه با شاهد تیمار نشده به ترتیب به میزان ۶۳ و ۸۱ درصد گردید. در یک بررسی در محیط کشت PDA حاوی کیتیناز استخراج شده از *Bacillus subtilis* ATCC 11774، مهار رشد شعاعی *R. solani* به میزان ۴۲/۳ درصد مشاهده گردید. در شرایط گلخانه نیز کاهش بیماری شانکر ساقه به میزان ۲۲/۳ درصد و افزایش پارامترهای بیوشیمیایی، رشدی و عملکرد غده مشخص شد (Saber et al., 2015). مایع کشت سلولی فیلتر شده جدایه *B. subtilis* HussainT-AMU منجر به مهار قابل توجه رشد میسلیم بیمارگر *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی شد و ترشحات آنتاگونیستی ذکر شده، وقوع بیماری را تا ۵۰ درصد در مزرعه کاهش دادند (Hussain et al., 2020). باکتری *B. subtilis* PM32 با تولید اکسین و فعالیت ACC دامیناز در ارتقا رشد گیاه نقش داشته است و از طرفی با ممانعت از گسترش میسلیم قارچ *R. solani* بیماری‌زایی آن را (۴۹/۸۷ درصد) کاهش داده است (Mehmood et al., 2021). در داخل کشور فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های *Streptomyces* (Shahrokhi et al., 2005) *Pseudomonas fluorescens* (Entesari et al., 2018) و قارچ *Trichoderma harzianum* (Soltani et al., 2006) در برابر قارچ *R. solani* بیماری‌زای سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌شناسی پژوهش

آماده سازی قارچ بیمارگر و جدایه های باکتریایی

قارچ *R. solani* AG-3 از کلکسیون آزمایشگاه بیماری شناسی دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه گردید. کشت قارچ روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) انجام شد. جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس *باسیلوس* از کلکسیون آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی تهیه شد.

ویژگی های بیوکترلی جدایه های باسیلوس

کارایی جدایه های آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد *R. solani*

به منظور ارزیابی مکانیسم‌های بازدارندگی جدایه‌های *باسیلوس* روی بیمارگر *رایزوکتونیا* از سه آزمون کشت متقابل، تولید مواد فرار و آنتی‌بیوتیک استفاده گردید. کلیه آزمون‌ها در دو آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار و سه تکرار، انجام شد. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تا زمانی که پتری‌های شاهد توسط قارچ بیمارگر پر شدند، نگهداری شدند. در تیمارهای حاوی باکتری آنتاگونیست و شاهد میزان رشد شعاعی قارچ اندازه‌گیری و میزان درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر برای هر جدایه طبق معادله زیر محاسبه شد. در معادله، IG درصد بازدارندگی، C قطر پر گنه قارچ در پتری شاهد و T قطر پر گنه قارچ در حضور جدایه آنتاگونیست می‌باشد (Srilakshmi et al., 2011).

$$IG = [(C-T)/C] \times 100$$

آزمون کشت متقابل: ابتدا از هر جدایه باکتری در یک طرف پتری حاوی محیط کشت PDA به فاصله یک سانتی‌متر از

لبه پتری به صورت خطی کشت شد، سپس از حاشیه فعال پرگنه قارچی سه‌روزه یک دیسک ۵ میلی‌متری، به فاصله یک سانتی‌متری از لبه پتری در طرف مقابل باکتری قرار داده شد. در تیمار شاهد به جای جدایه باکتری، از آب مقطر سترون استفاده و پتری‌ها به مدت ۴ روز در دمای مذکور نگهداری شدند.

ترکیبات فرار ضد قارچی: از کشت‌های ۲۴ ساعته هر جدایه باکتری، سوسپانسیون با چگالی نوری یک در طول موج

۶۰۰ نانومتر تهیه گردید. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به‌طور چمنی در محیط نوترینت آگار پخش و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. به‌طور هم‌زمان پتری PDA حاوی یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه سه‌روزه

قارچ تهیه و با رعایت شرایط سترون، درپوش پتری‌های حاوی قارچ بیمارگر و باکتری برداشته و پتری حاوی قارچ به‌طور وارونه روی پتری حاوی باکتری قرار داده شد. محل اتصال دو تشتک با استفاده از نوار پارافیلیم کاملاً مسدود گردید و به مدت سه روز در دمای مذکور نگهداری شدند (Fernando *et al.*, 2005). در تیمار شاهد، پتری حاوی قارچ بیمارگر در مقابل پتری فاقد جدایه آنتاگونیست قرار داده شد.

تولید آنتی‌بیوتیک: سوسپانسیون هر جدایه باکتریایی به روش ذکرشده در بخش تولید مواد فرار تهیه و روی محیط کشت PDA کشت شدند. بعد از ۷۲ ساعت باکتری‌ها توسط پنبه سترون، کاملاً از سطح پتری پاک شد. پنبه آغشته به کلروفرم به مدت دو ساعت در درب پتری وارونه قرار داده‌شده تا سلول‌های باکتری از بین روند. هوادهی پتری‌ها زیر هود لامینار به‌منظور حذف بخارات کلروفرم انجام شد و یک دیسک به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه سه‌روزه قارچ، در مرکز هر پتری قرار گرفت و پتری‌ها در دمای مذکور به مدت ۳ روز نگهداری شدند (Kraus and Loper, 1991).

آنزیم‌های هیدرولیز کننده: تولید آنزیم کیتیناز در محیط کشت کیتیناز (۰/۷ گرم دی‌پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) ، ۰/۳ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم $(MgSO_4 \cdot 5H_2O)$ ، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ ، ۰/۰۰۱ گرم سولفات روی $(ZnSO_4)$ و ۰/۰۰۱ گرم کلرید منگنز $(MnCl_2)$ در یک لیتر آب مقطر) حاوی ۱/۵ درصد آگار و ۲/۰ درصد کیتین کلئیدی (Murthy & Bleakley, 2012) و با اضافه نمودن محلول کنگو رد یک درصد بررسی شد. تولید هاله شفاف اطراف کلنی باکتری در محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱٪ نشاسته (Schaad *et al.*, 2001) پس از اضافه نمودن محلول ۱٪ ید با ۲٪ یدید پتاسیم، نشان دهنده تولید آنزیم آمیلاز است. آنزیم پکتیناز در محیط کشت نوترینت آگار حاوی پلی‌گالاکتورونیک اسید (Jayasankar & Graham, 1970) و تیمار با محلول ۱٪ CTAB سنجیده شد. برای ارزیابی تولید آنزیم سلولاز از محیط کشت مربوطه (۱ گرم دی‌پتاسیم فسفات (K_2HPO_4) ، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم $(MgSO_4)$ ، ۱ گرم پتاسیم کلرید (KCl) ، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم نیترات سدیم $(NaNO_3)$ و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) حاوی ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز (Hankin & Anagnostakis, 1977) استفاده و مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی پس از تیمار با محلول کنگو رد یک درصد انجام شد. همچنین تولید آنزیم پروتئاز در محیط اسکیم میلک آگار (۱۵ گرم اسکیم میلک، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم آگار خونی و ۱۴ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) (Sacherer *et al.*, 1994) و با مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی، مثبت در نظر گرفته شد.

بیوسورفکتانت و سیدروفور: بررسی جدایه‌ها در تولید احتمالی بیوسورفکتانت طبق روش انتشار قطره روغن انجام گرفت (Morikawa *et al.*, 2000). یک قطره روغن معدنی در سطح پتری حاوی آب مقطر سترون چکانده و سپس ۵ میکرولیتر از مایع رویی سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری، در مرکز قطره روغن قرار گرفت. هاله تشکیل‌شده توسط جدایه، میان قطره‌ی روغن به‌عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد. توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور در محیط کشت CAS آگار (Schwyn & Neilands, 1987) و با بررسی تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی مورد ارزیابی قرار گرفت و قطر هاله رنگی اطراف کلنی هر جدایه اندازه‌گیری گردید.

تشکیل بیوفیلم: برای اندازه‌گیری تولید بیوفیلم از پلیت‌های پلی‌استایرن ۹۶ خانه به روش اوتول و کلتز (O'Toole & Kotler, 1998) استفاده گردید. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر محیط نوترینت براث به همراه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد آزمون (10^7 cfu.ml⁻¹) به چاهک‌های پلیت اضافه، و به‌صورت ساکن در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. بعد از شستشوی پلیت، به هریک از چاهک‌ها ۲۱۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۰/۱ درصد اضافه و با گذشت ۴۵ دقیقه، شستشوی مجدد انجام گرفت. در مرحله آخر و با افزودن ۲۱۰ میکرو لیتر اتانول ۹۵٪، خوانش جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (Stat Fax 2100, AWARENESS Tech. Inc. USA) انجام گرفت. از محیط نوترینت براث بدون باکتری به عنوان شاهد استفاده شد.

جدول ۱. گروه‌بندی جدایه‌های باسیلوس از نظر تولید بیوفیلیم بر اساس روش مقایسه میانگین جذب نوری (Nyenje et al., 2013)			
ODC < OD < 2ODC	چسبندگی ضعیف	OD < ODC	فاقد چسبندگی
4ODC < OD	چسبندگی قوی	2ODC < OD < 4ODC	چسبندگی متوسط

OD = میانگین جذب نوری باکتری
ODC = میانگین جذب نوری چاهک شاهد

جداسازی DNA و شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی بافت (یکتا تجهیز آزما) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. تکثیر ناحیه srRNA ۱۶ با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگر عمومی ۲۷F و ۱۴۹۲r (Bredow et al., 2015) در دستگاه ترمو سایکلر Biometra (آلمان) و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. محصولات PCR برای خالص‌سازی و تعیین ترادف به شرکت ماکروژن، کشور کره جنوبی ارسال شدند. ترادف نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی ژن srRNA ۱۶ از نظر میزان همولوژی در BLAST با سایر جدایه‌های ثبت‌شده در بانک ژن مقایسه گردیدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal X انجام گرفت. از توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن مربوط به جدایه‌های مرجع برای مقایسات فیلوژنتیک استفاده گردید. درخت حاصله با روش احتمال بیشینه (Maximum likelihood) به وسیله نرم‌افزار MEGA 6.0 همراه با ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap) ترسیم گردید.

اثر جدایه‌های باسیلوس بر جوانه زنی اسکروت قارچ

برای بررسی اثر جدایه‌های باسیلوس در این آزمایش، اسکروت‌های قارچ عامل بیماری در سوسپانسیون از کشت جدایه‌ها در محیط نوترینت برات با غلظت 10^7 cfu.ml⁻¹ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از شستشو با آب مقطر سترون و خشک نمودن، ۱۰ عدد اسکروت روی محیط کشت PDA قرار داده شد و درصد جوانه‌زنی آن‌ها پس از دو روز مورد ارزیابی قرار گرفت (Kazempour, 2004).

اثر جدایه‌های باسیلوس بر ریخت شناسی میسلیم قارچ

تغییرات ریخت‌شناسی میسلیم قارچ بیمارگر در کشت دوطرفه با جدایه‌های باکتری در محیط کشت PDA، زمانی که پتری شاهد توسط قارچ بیمارگر پر شد، بررسی گردید. بدین منظور یک قرص نازک آگار از حاشیه‌ی پرگنه قارچ بیمارگر در کشت دوطرفه با جدایه باکتری برداشته‌شده و با کاتن بلو رنگ‌آمیزی و سپس با میکروسکوپ الیمپوس BH2 (توکیو، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت.

اثر جدایه‌های باسیلوس بر کاهش بیماری شانگر ساقه سبب زمینی و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه در شرایط گلخانه

مایه تلقیح قارچ بیمارگر در فلاسک‌های حاوی گندم سترون تکثیر شد (Papavizas & Lewis, 1986). تلقیح قارچ بیمارگر (گندم آلوده) به میزان ۴ گرم به ازای هر کیلوگرم مخلوط خاک انجام شد. غده‌های بذری رقم آگریا (تهیه‌شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مشهد، طرق) با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و بعد از چند مرتبه شست‌وشو با آب، خشک شدند. مقدار ۲۰۰۰ گرم خاک آلوده به عامل بیماری به هر گلدان با قطر ۱۵ سانتی‌متری اضافه و یک غده در فاصله ۲ تا ۳ سانتی‌متری زیر سطح خاک کشت شد. مایه تلقیح باکتری‌های آنتاگونیست پس از سانتریفوژ و شست‌وشوی سوسپانسیون ۷۲ ساعته باکتری در محیط تریپتیک سوی برات با میزان جذب نوری یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر بدست آمد. به ازای ۱۲۰۰ گرم مخلوط خاک آلوده، ۳۰ میلی‌لیتر از مایه تلقیح باکتری‌های آنتاگونیست اضافه گردید.

تیمارهای تعریف شده (در ۴ تکرار) در آزمون گلخانه شامل؛ جدایه‌های منتخب Ba12, Ba11, Ba8, Ba5, Ba1، ترکیب جدایه Ba5+ Ba11، قارچ‌کش‌های ایپردیون-کاربندازیم (رورال تی اس) و کاربندازیم به ترتیب به میزان ۲ و ۲/۵ در هزار، فسفیت پتاسیم به میزان دو لیتر در هکتار (القاکننده مقاومت)، شاهد منفی (گیاه سالم) و شاهد مثبت (گیاه آلوده به قارچ) مشخص شدند. تیمارها در گلخانه در دمای ۳۰ تا ۳۵ درجه سلسیوس با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شده و با توجه به میزان خشکی خاک گلدان‌ها و همچنین دمای گلخانه، آبیاری تقریباً یک روز در میان انجام گرفت. گیاهان به مدت هفت هفته در گلخانه رشد کردند، سپس مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان به‌آرامی و بدون صدمه زدن از گلدان خارج شده و سپس شانکر ساقه در مقیاس ۰ تا ۵ بر اساس درجه‌بندی Brewer & Larkin (2005) ارزیابی شد. و شاخص شدت بیماری از معادله ارایه شده روبرو محاسبه شد (Taheri & Tarighi, 2010).

$$DI = \left(\frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5}{5N} \right) \times 100$$

n_0 : تعداد بوته با درجه ۰ آلودگی (بدون علائم)؛ n_1 تعداد بوته با درجه ۱ آلودگی (تغییر رنگ قهوه ای ساقه)؛ n_2 تعداد بوته با درجه ۲ آلودگی (شانکر کمتر از ۲۵ درصد از ساقه را پوشش می دهد)؛ n_3 تعداد بوته با درجه ۳ آلودگی (۲۵ تا ۷۵ درصد ساقه‌ها از شانکر پوشیده شده‌است)؛ n_4 تعداد بوته با درجه ۴ آلودگی (۷۵ درصد ساقه‌ها توسط شانکر پوشیده شده اند)؛ n_5 تعداد بوته با درجه ۵ آلودگی (ساقه به‌طور کامل قطع و یا گیاه از بین رفته است)؛ N تعداد کل بوته‌ها. فاکتورهای رشدی گیاه نیز از جمله وزن تر و طول ریشه و اندام‌های هوایی نیز به طور جداگانه یادداشت گردیدند (Brewer & Larkin, 2005).

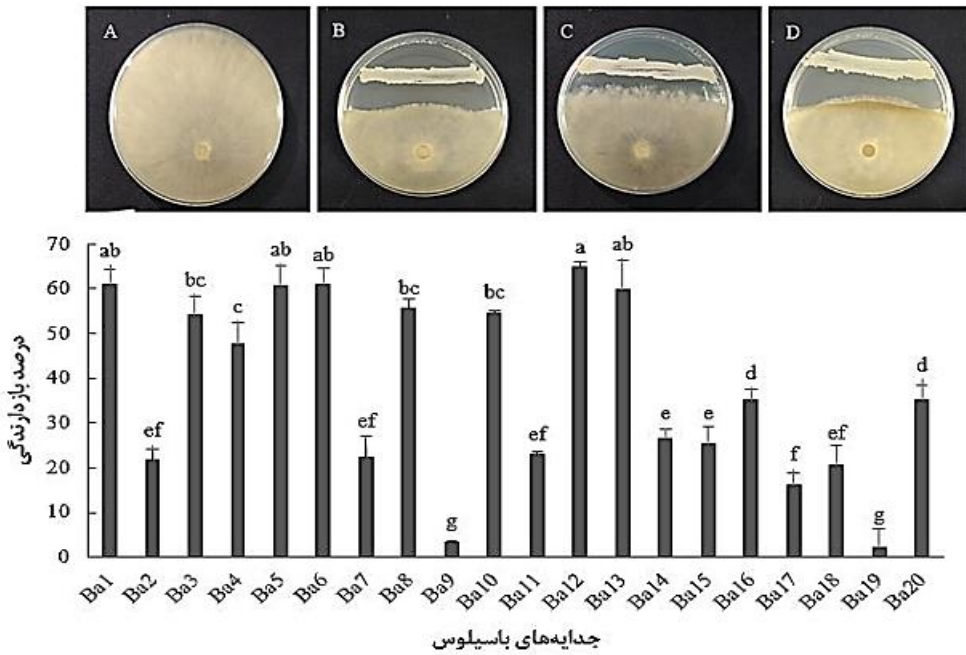
تجزیه و تحلیل آماری

نتایج آزمون‌های زیستی توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) بررسی شد. تفاوت گروه‌های آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس ارزیابی و مقایسات در سطح معنی‌داری کمتر و مساوی یک درصد (۰/۰۱) $P \leq$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تمامی آزمون‌ها حداقل دومرتبه و در سه تکرار به صورت مجزا انجام پذیرفت و نتایج یک آزمون نماینده گزارش گردید.

یافته‌های پژوهش و بحث

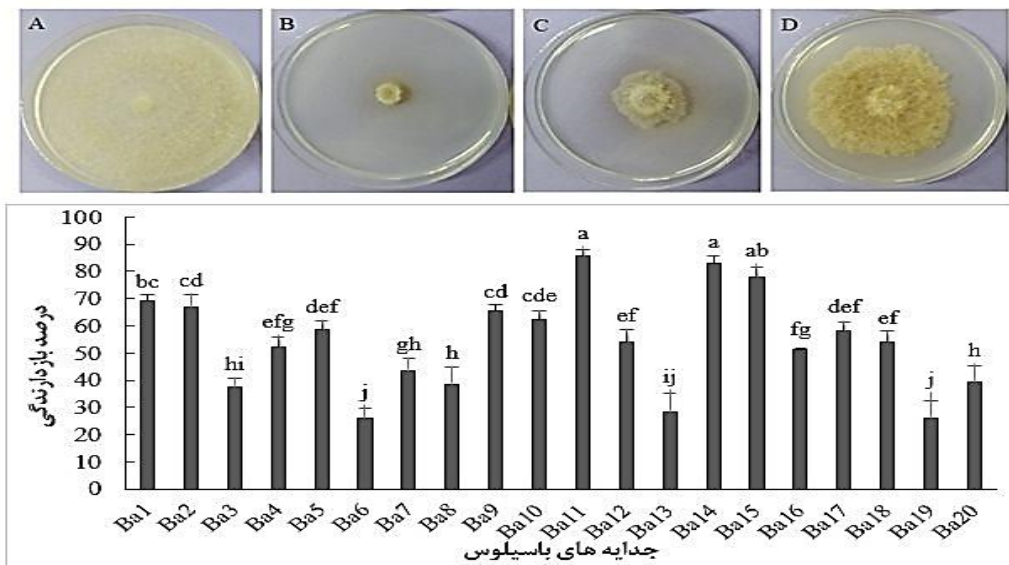
کارایی جدایه آنتاگونیست در بازدارندگی رشد قارچ بیمارگر

کشت متقابل: اثر جدایه‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد بیمارگر در این آزمون بعد از ۴ روز در سطح یک درصد معنی‌دار بوده است. بر این اساس ۸ جدایه از نظر بازدارندگی از رشد در گروه بازدارندگی قوی (بیش از ۵۰ درصد)، ۹ جدایه بازدارندگی متوسط (۲۰ تا ۵۰ درصد) و ۳ جدایه بازدارندگی ضعیف (زیر ۲۰ درصد) قرار گرفتند (شکل ۱). توانایی آنتاگونیستی گونه‌های مختلف باسیلوس در مهار رشد میسلیم *R. solani* در مطالعات پیشین مشخص شده است (Asaka & shoda, 1996; Khedher et al., 2015; Chowdhury et al., 2015).



شکل ۱. بررسی توانایی جدایه‌های باسیلوس در بازدارندگی از رشد *Rhizoctonia solani* AG3 روی محیط کشت PDA در آزمون کشت متقابل بعد از ۴ روز. (A) شاهد، (B) جدایه Ba1، (C) جدایه Ba5، (D) جدایه Ba12. و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح $P \leq 0.01$).

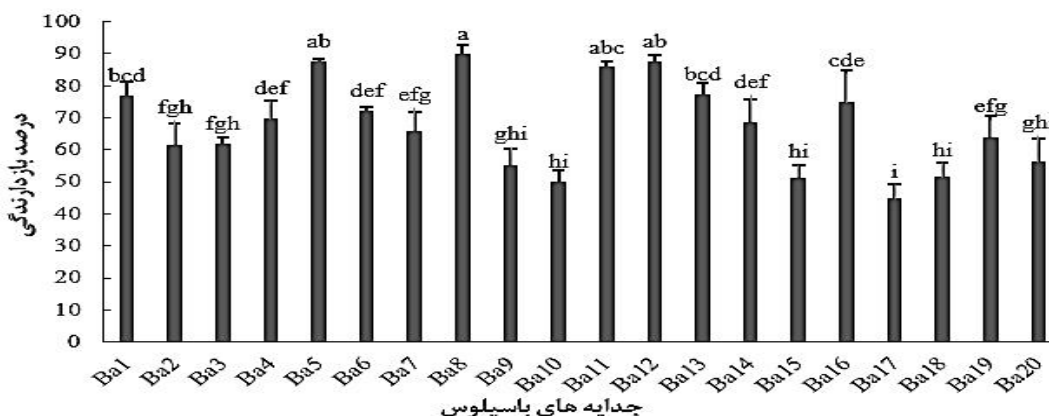
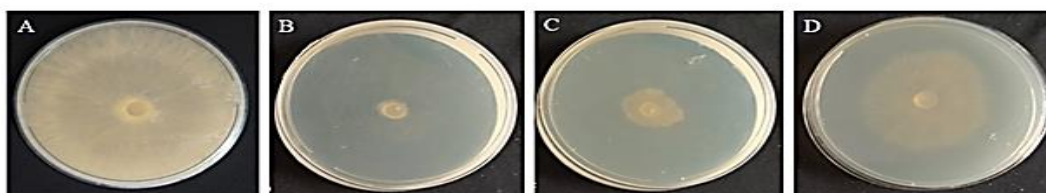
متابولیت‌های فرار: مقایسه میانگین اثر ترکیبات فرار تولیدشده توسط جدایه‌ها نشان داد، جدایه Ba11 با میانگین ۸۵/۴۸ درصد، جدایه Ba14 با ۸۲/۸۹ درصد بیشترین و جدایه Ba19 با ۲۵/۸۴ درصد کمترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر داشتند (شکل ۲). ترکیبات آلی فرار تولیدشده توسط گونه‌های باسیلوس، ترکیبات کوچکی با وزن مولکولی پایین می‌باشند که شامل نمایندگان آلدهید، کتون، الکل، اسید، پیرازین، پیریدین، استر و مشتقات بنزن هستند (Saxena et al., 2020).



شکل ۲. بررسی توانایی جدایه‌های باسیلوس در بازدارندگی از رشد *Rhizoctonia solani* AG3 روی محیط کشت PDA در آزمون تولید مواد فرار بعد از ۳ روز. (A) شاهد، (B) جدایه Ba11، (C) جدایه Ba10، (D) جدایه Ba6. و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح $P \leq 0.01$).

این ترکیبات قادر به اعمال اثر مهارکنندگی در تعامل از راه دور بین میکروارگانیزم‌های مفید و بیمارگرهای هدف هستند (Zhang *et al.*, 2020).

تولید آنتی بیوتیک: مقایسه میانگین اثر آنتی بیوتیک تولیدشده توسط جدایه‌ها نشان داد، جدایه Ba8 با ۹۰/۱۱ درصد بیشترین و Ba17 با ۴۴/۷۶ درصد کمترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر داشتند (شکل ۳). گونه‌های مختلف باسیلوس تولیدکنندگان بسیار کارآمد مولکول‌های آنتی بیوتیک هستند و فعالیت بازدارندگی آن‌ها در برابر بیمارگرهای گیاهی از طریق آنتی بیوز، بهترین مکانیسم شناخته شده است (Bacon *et al.*, 2015).



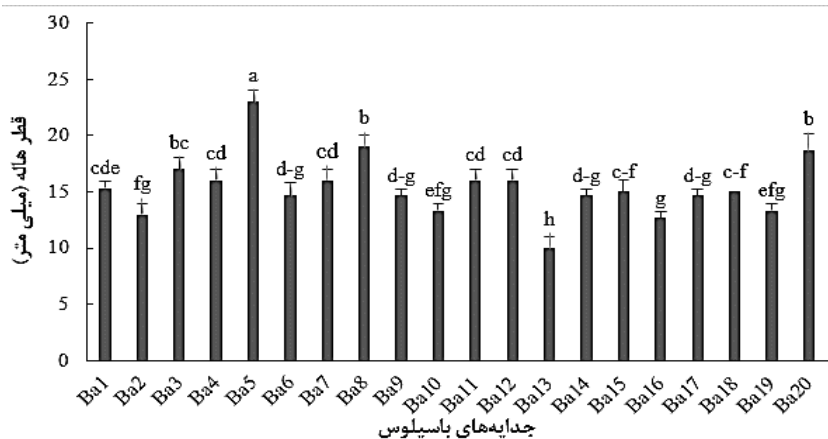
شکل ۳. بررسی توانایی جدایه‌های باسیلوس در بازدارندگی از رشد *Rhizoctonia solani* AG3 روی محیط کشت PDA در آزمون تولید آنتی بیوتیک بعد از ۳ روز. (A) شاهد، (B) جدایه Ba8، (C) جدایه Ba5، (D) جدایه Ba10. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح $P \leq 0.01$).

ویژگی‌های بیوکنترلی جدایه‌های آنتاگونیست

پتانسیل تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده مختلف و نیز بیوسورفکتانت در جدول ۱ خلاصه شده است. آنزیم‌های هیدرولیز کننده ظرفیت تخریب دیواره سلولی قارچی را دارند (Olanrewaju *et al.*, 2019). القای فعالیت تخریب‌کنندگی قارچی در باکتری آنتاگونیست در حضور *R. solani* رشد کردند، گزارش شده است (Solanki *et al.*, 2012). با توجه به نتایج، جدایه‌های Ba1، Ba5 و Ba8 بزرگ‌ترین منطقه باز شدن قطره روغن (بیش از ۲۰ میلی‌متر) را ایجاد نمودند. جدایه‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت به تخریب غشای سلولی بیمارگر کمک نموده و همچنین القاء مقاومت سیستمیک در گیاه را باعث می‌شوند (Tran *et al.*, 2007).

توان تولید سیدروفور جدایه‌های باکتری با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی ایجادشده در اطراف پرگنه باکتری پس از ۷۲ ساعت بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین جدایه‌ها وجود دارد و جدایه Ba5 با تولید هاله‌ای به قطر ۲۳ میلی‌متر از توانایی بالاتری در تولید سیدروفور برخوردار بود (شکل ۴). تولید سیدروفور باسیلی

باکترین به دلیل کمبود آهن در بستر ایجاد می‌شود. نقش اصلی آن در باسیلوس جذب آهن است، درحالی که به‌طور غیرمستقیم بیمارگرها را بدون Fe^{+3} می‌گذارد (Andric et al., 2020).



شکل ۴. میانگین قطر هاله ایجاد شده در آزمون تولید سیدروفور توسط جدا به‌های باسیلوس و گروه‌بندی جدا به‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح $P \leq 0.01$).

جدول ۱. بررسی توان تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده و بیوسورفکتانت توسط جدا به‌های باسیلوس

جدا به	بیوسورفکتانت ^a	پکتیناز ^b	آمیلاز ^c	پروتئاز ^d	سلولاز ^e	کیتیناز ^f
Ba 1	+	-	+	+	+	+
Ba 2	+	-	-	+	+	+
Ba 3	+	-	+	+	+	+
Ba 4	+	-	-	+	-	+
Ba 5	+	-	+	+	+	+
Ba 6	+	-	+	+	-	+
Ba 7	+	-	+	+	+	+
Ba 8	+	-	-	+	+	+
Ba 9	+	-	+	+	-	+
Ba10	+	-	+	+	+	-
Ba 11	+	-	-	+	-	+
Ba 12	+	+	-	+	+	+
Ba 13	+	-	+	+	-	+
Ba 14	+	-	+	+	+	+
Ba 15	+	-	+	+	+	+
Ba 16	+	-	+	+	+	+
Ba 17	+	-	-	+	-	+
Ba 18	+	-	+	+	+	+
Ba 19	+	-	-	+	-	+
Ba 20	+	-	+	+	-	+

^a تولید بیوسورفکتانت به‌صورت باز شدن قطره روغن با استفاده از تکنیک پخش روغن. +: قطر منطقه جابه‌جایی روغن در دامنه ۸-۲۵ میلی‌متر.

^b تولید آنزیم پکتیناز به‌صورت هاله شفاف روی محیط نوترینت آگار حاوی پلی گالاترونیک اسید و تیمار با 1% CTAB.

^c تولید آنزیم آمیلاز به‌صورت هاله شفاف روی محیط نوترینت آگار حاوی ۱ درصد نشاسته و تیمار با محلول لوگول. +: هاله شفاف در دامنه ۱۶-۲۷ میلی‌متر.

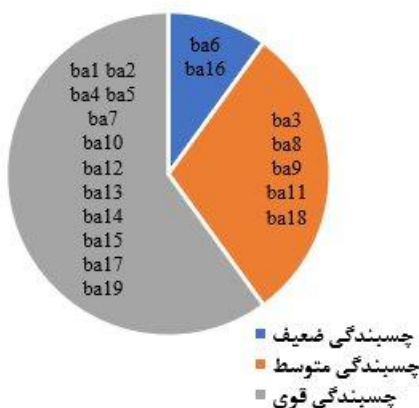
^d تولید آنزیم پروتئاز به‌صورت هاله شفاف روی محیط Skim milk agar. +: هاله بازدارندگی در دامنه ۱۲-۲۳ میلی‌متر.

^e تولید آنزیم سلولاز به‌صورت هاله شفاف روی محیط CMC agar و تیمار با کنگو رد ۱ درصد. +: هاله شفاف در دامنه ۲۲-۸ میلی‌متر.

^f تولید آنزیم کیتیناز به‌صورت هاله شفاف روی محیط حاوی کیتین و تیمار با کنگو رد ۱ درصد. +: هاله شفاف در دامنه ۱۸-۹ میلی‌متر (تشکیل هاله شفاف روی محیط حاوی کیتین).

توانایی تشکیل بیوفیلم

در بررسی تشکیل بیوفیلم، ۶۰ درصد جدایه‌ها دارای چسبندگی قوی (خاکستری رنگ)، ۳۰ درصد چسبندگی متوسط (نارنجی رنگ) و ۱۰ درصد دارای چسبندگی ضعیف (آبی رنگ) می‌باشند (شکل ۵). بیوفیلم نقش مهمی در بقای باکتری‌ها در برابر شرایط محیطی مختلف و آنتی‌بیوتیک‌ها ایفا می‌کند. کلونیزاسیون ریشه و تشکیل بیوفیلم به‌عنوان مکانیسم بیوکنترل در گونه‌های مختلف باسیلوس مانند *B. velezensis*، *B. atrophaeus* و *B. subtilis* گزارش شده است (Pandini et al., 2017).

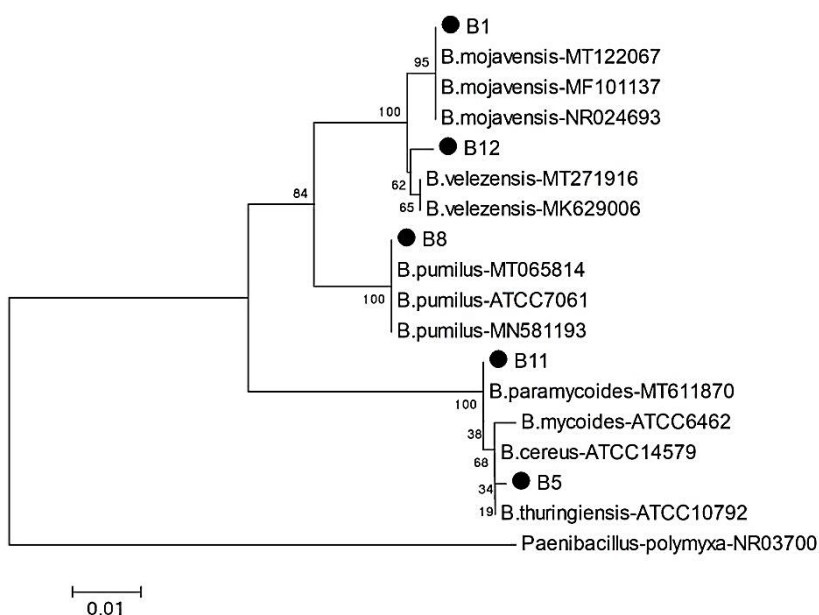


شکل ۵. گروه‌بندی جدایه‌های باسیلوس مورد مطالعه از نظر تولید بیوفیلم

در غربالگری اولیه در آزمون کشت متقابل، جدایه Ba12 و در آزمون‌های تولید ترکیبات فرار و آنتی‌بیوتیک به ترتیب جدایه‌های Ba8 و Ba11 بالاترین مهارکنندگی را در برابر بیمارگر قارچی مورد مطالعه نشان دادند. غیر از ۳ جدایه ذکر شده، جدایه‌های Ba1 و Ba5 در درجات بعدی بازدارندگی از رشد قارچ قرار دارند. در بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی، Ba8 بالاترین میزان کیتیناز و Ba12 بالاترین تولید سلولاز، پروتئاز و پکتیناز را داشتند. همچنین، جدایه‌های Ba1 و Ba5 تمام آنزیم‌ها بررسی شده به‌غیر از پکتیناز را ترشح نمودند. پنج جدایه کاندید از گروه‌های تولیدکننده بیوفیلم متوسط و قوی نیز انتخاب شدند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های باسیلوس منتخب

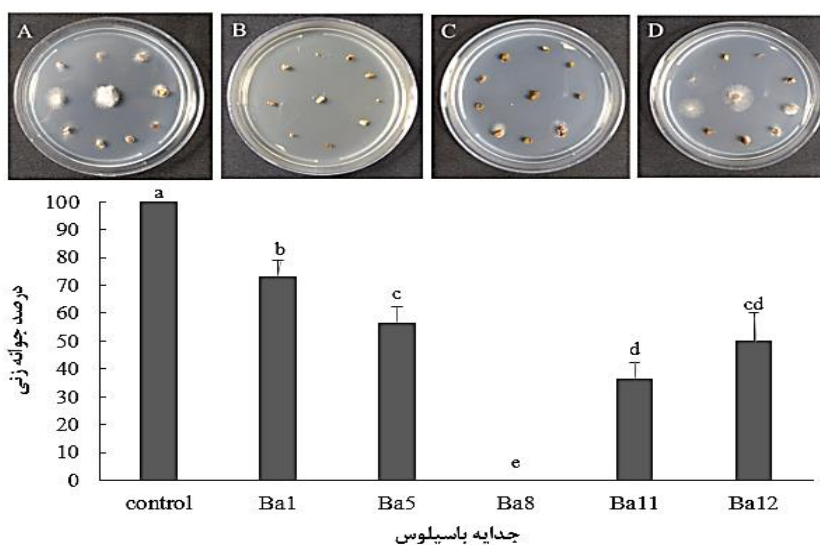
با توجه به نتایج قابلیت‌های بیوکنترلی جدایه‌های مورد آزمایش، پنج جدایه Ba1، Ba5، Ba8، Ba11 و Ba12 از نظر مولکولی شناسایی و برای مطالعات گلخانه‌ای استفاده شدند. بر اساس توالی یابی نسبی ژن 16srRNA (۹۰۰ جفت باز) جدایه‌های مورد مطالعه و با به‌کارگیری توالی‌های موجود در بانک ژن، درخت تبارزایی در نرم‌افزار Mega نسخه ۵ ترسیم شد (شکل ۶). با توجه به داده‌های به‌دست آمده، جدایه‌های انتخابی شامل Ba1، Ba5، Ba8، Ba11 و Ba12 به ترتیب به گونه‌های *Bacillus sp.*، *B. pumilus*، *Bacillus sp.*، *B. velezensis* و *B.* تعلق دارند.



شکل ۶ درخت تبارزایی حاصل از توالی یابی ژن 16SrRNA برای جدایه‌های باسیلوس منتخب با استفاده از روش احتمال بیشینه با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap. جدایه‌های مورد مطالعه با دایره توپر مشخص شده‌اند و سایر جدایه‌های مربوط به جدایه‌های رفرنس در بانک ژن NCBI می‌باشند.

اثر جدایه‌های باسیلوس بر جوانه زنی اسکروت

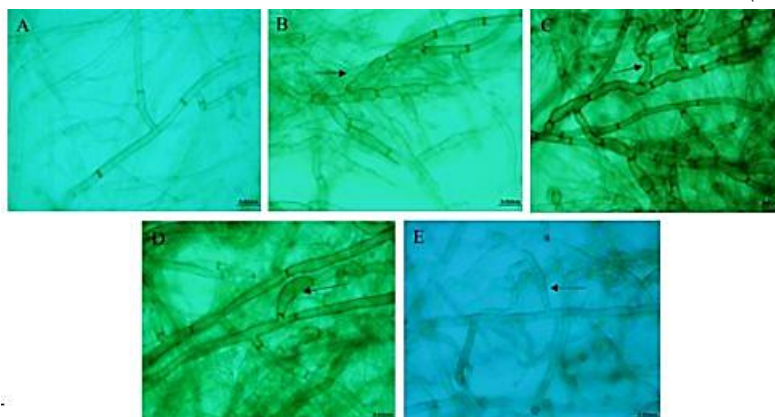
هر پنج جدایه‌ی منتخب قادر به جلوگیری از جوانه‌زنی اسکروت‌ها هستند (شکل ۷). در مقایسه با کنترل، جدایه Ba8 به میزان ۱۰۰ درصد از جوانه‌زنی اسکروت جلوگیری نمود.



شکل ۷. بررسی توانایی جدایه‌های باسیلوس منتخب در بازدارندگی از جوانه‌زنی اسکروت *Rhizoctonia solani* AG3 روی محیط کشت PDA بعد از ۲ روز. (A) کنترل، (B) جدایه Ba8، (C) جدایه Ba11، (D) جدایه Ba1. منتخب و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح $P \leq 0.01$).

اثر جدایه های باسیلوس منتخب بر ریخت شناسی میسلیم های قارچ

بررسی ها نشان داد که در نمونه های شاهد، میسلیم شکل طبیعی خود را دارد (شکل ۸، A)؛ اما شکل میسلیم های قارچ بیمارگر در کشت متقابل با جدایه باسیلوس تغییر یافته است، به طوری که تغییر شکل میسلیم ها، قطعه قطعه شدن میسلیم، کوتاه شدن انشعابات، تورم میسلیم ها و انعقاد سیتوپلاسمی در میسلیم های قارچ بیمارگر مشاهده شد (شکل ۸، B-E). یافته های تحقیق حاضر با نتایج پژوهشگران دیگر در مورد اثر گذاری جدایه *B. subtilis* V26 روی میسلیم قارچی مطابقت دارد (Khedher et al., 2015).



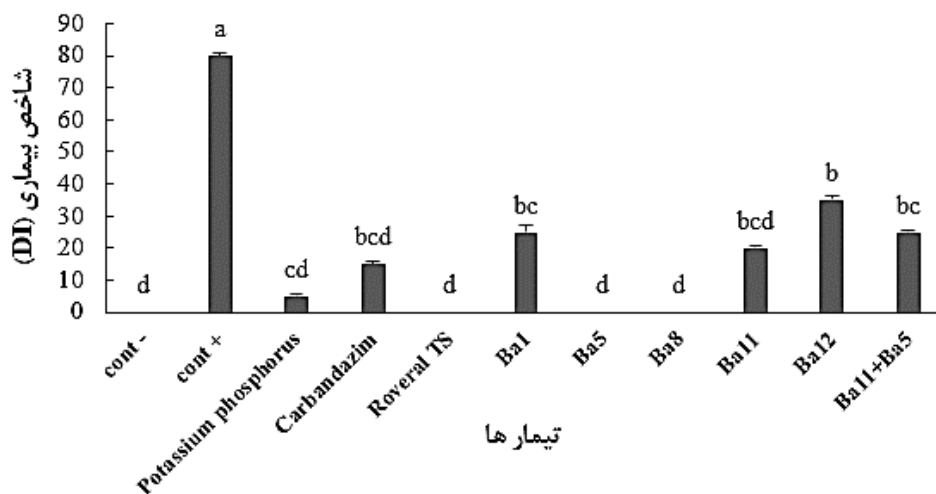
شکل ۸. تأثیر جدایه های منتخب روی ریخت شناسی میسلیم قارچ *Rhizoctonia solani* AG3 در کشت دوطرفه روی محیط کشت PDA. (A) کنترل، (B) جدایه Ba1، (C) جدایه Ba8، (D) جدایه Ba5، (E) جدایه Ba12.

بررسی جدایه های منتخب بر شدت بیماریزایی قارچ *R. solani*

در تیمارهای قارچ به همراه باکتری های منتخب، تغییر رنگ ساقه در مقایسه با گیاهان آلوده (قارچ تنها) به طور معنی داری کاهش یافت. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که جدایه Ba12 بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر درون پتری دارد، در حالی که در نتایج گلخانه ای جدایه های Ba5 و Ba8 در کنار تیمار قارچ کش رورال تی اس (مخلوط کاربندازیم و ایپرودیون) پایین ترین شاخص شدت بیماری (صفر = عدم ایجاد بیماری) را نشان دادند و ۱۰۰ درصد بیماری را کنترل کردند. اثر تیمارهای قارچ کش کاربندازیم و جدایه Ba11، همچنین جدایه Ba1 و ترکیب دو جدایه Ba5+Ba11 یکسان بوده و در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۹ و ۱۰). با وجود اینکه جدایه Ba12 در آزمایشات درون شیشه ای کارایی بالاتری را نشان داد ولی در آزمون گلخانه جدایه Ba5 از نظر بیوکنترلی و رشدی موفق تر عمل نمود. جدایه ی دیگر با شاخص شدت بیماری صفر (Ba8) نیز کیتیناز بالایی تولید نمود که در تخریب دیواره قارچی مؤثر است و نیز به طور کامل از جوانه زنی اسکلروت *رایزوکتونیا* جلوگیری نمود. فسفات پتاسیم به عنوان القاکننده مقاومت بعد از جدایه های Ba5 (*Bacillus* sp.) و Ba8 (*B.pumilus*) در رتبه دوم کنترل بیماری قرار دارد ولی کوتولگی در گیاهان تحت تیمار در مقایسه با شاهد سالم دیده شد. تیمار ترکیبی نیز اثر کنترلی مضاعفی نسبت به تیمار تکی نشان نداد.



شکل ۹. تأثیر تیمارهای مختلف روی شاخص بیماری شانکر ساقه سیب‌زمینی ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* AG3 بعد از هفت هفته. (A) شاهد آلوده، (B) شاهد سالم، (C) تیمار با قارچ‌کش رورال تی اس، (D) جدایه Ba8، (E) جدایه Ba5.



شکل ۱۰. شاخص شدت بیماری شانکر ساقه سیب‌زمینی با عامل *Rhizoctonia solani* AG3 در حضور جدایه‌های منتخب باسیلوس و ترکیبات شیمیایی و گروه‌بندی تیمارها بر اساس آزمون دانکن (سطح $P \leq 0.01$).

اثر جدایه‌های منتخب باسیلوس بر فاکتورهای رشدی گیاه سیب زمینی

نتایج مقایسه میانگین حاصل از داده‌های گلخانه‌ای نشان داد که گیاهان تیمار شده افزایش قابل‌توجهی را در فاکتورهای رشدی در مقایسه با گیاهان شاهد و به‌ویژه شاهد آلوده به بیمارگر نشان دادند (جدول ۲). بیشترین میزان رشد طولی ساقه مربوط به تیمار Ba5 (۷۹/۵ سانتی‌متر) است که نسبت به تیمار شاهد آلوده و سالم، به ترتیب ۲/۲۹ و ۱/۲ برابر افزایش طول ساقه را نشان داده است. از طرفی وزن تر اندام هوایی سیب‌زمینی در تیمار مذکور به میزان ۳/۸۷ برابر نسبت به شاهد آلوده بیشتر می‌باشد. دو تیمار Ba11 و قارچ‌کش رورال تی اس به ترتیب با ۲۷/۷۵ و ۲۶/۵ سانتی‌متر بیشترین میزان طول ریشه را داشتند. طول ریشه در تیمار جدایه Ba11 به میزان ۲/۱ و ۱/۵۷ برابر به ترتیب نسبت به شاهد آلوده و سالم افزایش نشان داد.

همچنین در تیمار Ba11 و ترکیب رورال تی اس بالاترین میزان وزن تر ریشه (به ترتیب ۸ و ۷/۸۷ گرم) در مقایسه با شاهد سالم (۴/۱۲ گرم) و آلوده (۳/۸ گرم) ثبت شد (جدول ۲).

جدول ۲. اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر برخی فاکتورهای رشدی سیب‌زمینی تیمار شده با *Rhizoctonia solani* AG3 و سایر ترکیبات شیمیایی در شرایط گلخانه.

تیمار	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)	وزن تر اندام هوایی (g)	وزن تر ریشه (g)
شاهد سالم	۶۶/۷۵ ± ۵/۳۷a	۱۷/۷۵ ± ۲/۲۱cd	۱۸/۳ ± ۱/۳۲f	۴/۱۲ ± ۰/۷۴e
شاهد آلوده	۳۴/۷۵ ± ۵/۴۳d	۱۳/۲۵ ± ۱/۲۵d	۱۰/۸۶۷ ± ۰/۳۲h	۳/۸ ± ۰/۲۴e
فسفیت پتاسیم	۴۱ ± ۸/۷۵abc	۱۸/۷۵ ± ۲/۲۱bcd	۱۳/۴۲ ± ۰/۵۱gh	۴/۶۲ ± ۰/۴۹de
کاربن‌دازیم	۷۰ ± ۵/۷۱a	۲۴ ± ۴/۵۴abc	۲۴/۶۲۵ ± ۰/۳۵d	۵/۹۶ ± ۰/۶۶bcd
رورال تی اس	۷۳ ± ۵/۷۱a	۲۶/۵ ± ۲/۶۴a	۲۸/۲۵ ± ۱/۳۴c	۷/۸۷ ± ۰/۳۵a
Ba1	۵۲ ± ۶/۲۷b	۱۲ ± ۲/۴۴d	۱۴/۸۵ ± ۱/۴۲g	۴/۰۵ ± ۰/۹۵e
Ba5	۷۹/۵ ± ۹/۷۱a	۲۴ ± ۴/۵۴abc	۴۲/۰۷ ± ۳/۰۶a	۶/۳۲ ± ۰/۶۷bc
Ba8	۷۷/۵ ± ۶/۴۵a	۲۳/۲۵ ± ۳/۵abc	۳۹/۵ ± ۱/۲۹a	۵/۶۲ ± ۰/۶۲cd
Ba11	۶۷/۵ ± ۶/۴۵a	۲۷/۷۵ ± ۵/۲۵a	۲۱/۱ ± ۱/۷۹ef	۸ ± ۰/۷۰a
Ba12	۷۴/۵ ± ۲/۶۴a	۲۴/۵ ± ۳/۱۰abc	۳۲ ± ۲/۵۸b	۶/۹۴ ± ۰/۹۸abc
Ba11+Ba12	۷۱/۵ ± ۹/۶۷a	۲۵/۷۵ ± ۳/۷۷ab	۲۳/۳۹ ± ۱/۷۵de	۷/۱۲ ± ۰/۷۶ab

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه باشند از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود ندارد، میانگین‌های که دارای حروف غیرمشابه باشند از نظر آماری بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای توانایی بیوکنترلی جدایه‌های باسیلوس را در برابر *R. solani* اثبات کرد. مشابه با نتایج ما، مطالعات زیادی روی بیوکنترل *R. solani* در سیب‌زمینی با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست انجام شده است. جدایه‌های باسیلوس به‌طور قابل توجهی رشد گیاه را افزایش داده و عامل بیماری‌زای خاک زاد را در هنگام استفاده از خاک تیمار شده با آنتاگونیست مهار کردند (Mehmood et al., 2021; Khedher et al., 2015; Idris et al., 2007). مسلماً جدایه‌های آنتاگونیست با سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم متفاوتی (Singh et al., 2019) در این امر مؤثر خواهند بود.

نتیجه‌گیری

حرکت در مسیر تحقیقاتی و اجرایی جهت دستیابی به جدایه‌های میکروبی کارا با تعدد مکانیسم‌های بیوکنترلی و رشدی و یا به‌کارگیری تلفیقی جدایه‌ها ضرورت دارد. گونه‌های باسیلوس به دلیل تنوع ژنتیکی و متابولیکی، به‌خوبی با طیف وسیعی از شرایط محیطی سازگار هستند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد استفاده از جدایه‌های Ba8 (*B. pumilus*) و Ba5 (*Bacillus* sp.) با کاهش توان رشد و تغییر در ریخت‌شناسی میسلیم، تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی، ممانعت از جوانه زنی اسکروت قارچ و دارا بودن شاخص بیماری‌شانکر ساقه صفر در برابر بیمارگر *ریزوکتونیا* در تلفیق با سایر روش‌های در دسترس، مناسب باشد. با این وجود دستیابی به فرمولاسیون بهینه و اعتبار سنجی نتایج، نیازمند آزمایشات مزرعه‌ای در مقیاس وسیع‌تر دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی این پروژه با کد ۳/۵۳۶۰۴/۴ قدردانی می نمایند.

منابع

- انتصاری، محمد، کامکار، بهنام، قادری فر، فرشید و احمدزاده، مسعود (۱۳۹۶). تأثیر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* بر شدت بیماری، صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در غده‌های بذری تولیدی ارقام سیب‌زمینی آلوده به *Rhizoctonia solani* در شرایط گلخانه. مہار زیستی در گیاه پزشکی، ۵ (۲)، ۴۳-۵۴.
- Andric, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). Bacillus responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1350.
- Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 397-404.
- Atkinson, D., Thornton, M.K., & Miller, J.S. (2010). Development of *Rhizoctonia solani* on stems, stolons and tubers of potatoes I. Effect of inoculum source. *American Journal of Potato Research*, 87(4), 374-381.
- Bacon, C.W., Palencia, E.R., & Hinton, D.M. (2015). Abiotic and biotic plant stress-tolerant and beneficial secondary metabolites produced by endophytic *Bacillus* species. In *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. Springer, New Delhi.
- Bradshaw, J.E., & Ramsay, G. (2009). Potato origin and production. In *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Academic Press.
- Bredow, C., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., Mangolin, C.A., & Rhoden, S.A. (2015). *In silico* analysis of the 16S rRNA gene of endophytic bacteria, isolated from the aerial parts and seeds of important agricultural crops. *Genetics and Molecular Research*, 14, 9703-9721.
- Brewer, M.T., & Larkin, R.P. (2005). Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*, 24(11), 939-950.
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 780.
- Entesari, M., Kamkar, B., Ghaderifar, F., & Ahmadzadeh, M. (2018). Effects of *Pseudomonas fluorescens* on the disease severity, physiological, and biochemical traits in the tubers of potato cultivars infected with *Rhizoctonia solani* under greenhouse condition. *Biocontrol in Plant Protection*, 5(2), 43-54. (In Persian)
- Fernando, W.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S., & Savchuk, S.C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 955-964.
- Hankin, L., & Anagnostakis, S.L. (1977). Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro-organisms. *Microbiology*, 98(1), 109-115.
- Hussain, T., & Khan, A.A. (2020). *Bacillus subtilis* hussaint-AMU and its Antifungal activity against Potato Black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101443.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 619-626.
- Jayasankar, N.P., & Graham, P.H. (1970). An agar plate method for screening and enumerating pectinolytic microorganisms. *Canadian journal of Microbiology*, 16(10), 1023-1023.
- Kazempour, M.N. (2004). Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology Journal*, 3, 88-96.
- Keswani C., Singh H.B., Garcia-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.W., & Mezaache-Aichour, S. (2020)

- Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 104,1013–1034.
- Khedher, S.B., Kilani-Feki, O., Dammak, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., & Tounsi, S. (2015). Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies*, 338(12), 784-792.
- Kraus, J., & Loper, J.E. (1991). Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* PF-5: mechanistic studies pyoluteorin, pyoverdine, siderophore. *Bulletin OILB SROP (France)*.
- Lamichhane, J.R., You, M.P., Laudinot, V., Barbetti, M.J., & Aubertot, J.N. (2020). Revisiting Sustainability of Fungicide Seed Treatments for Field Crops. *Plant Disease*, 104(3), 610–623.
- Lee, Y.S., Cho, J.Y., Moon, J.H., & Kim, K.Y. (2017). Isolation and identification of N-butyl-tetrahydro-5-oxofuran-2-carboxamide produced by *Bacillus* sp. L60 and its antifungal activity. *Journal of Basic Microbiology*, 57(3), 283-288.
- Mehmood, S., Muneer, M.A., Tahir, M., Javed, M.T., Mahmood, T., Afridi, M. S., Pakar, N.P., Abbasi, H.A., Munis, M., & Chaudhary, H.J. (2021). Deciphering distinct biological control and growth promoting potential of multi-stress tolerant *Bacillus subtilis* PM32 for potato stem canker. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 27(9), 2101–2114.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.
- Murthy, N., & Bleakley, B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *International Journal of Microbiology*, 10(2), e2bc3.
- Nyenje, M.E., Green, E., & Ndip, R.N. (2013). Evaluation of the effect of different growth media and temperature on the suitability of biofilm formation by *Enterobacter cloacae* strains isolated from food samples in South Africa. *Molecules*, 18(8), 9582-9593.
- Olanrewaju, O.S., Ayangbenro, A.S., Glick, B.R., & Babalola, O.O. (2019). Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1155-1166.
- O'Toole, G.A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.
- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., & Briandet, R. (2017). Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 719-734.
- Papavizas, G.C., & Lewis, J.A. (1986). Isolating, identifying, and producing inoculum of *Rhizoctonia solani*. In: Hickey, K.D. (Ed.), *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 50–53.
- Pinhero, G.P. & Yada, R.Y. (2016). Postharvest storage of potatoes. In: Singh, J., Kaur, L. (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Academic Press, London, pp. 283–314.
- Rahman, S.F.S., Singh, E., Pieterse, C.M., & Schenk, P.M. (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111.
- Saber, W.I., Ghoneem, K.M., Al-Askar, A.A., Rashad, Y.M., Ali, A.A., & Rashad, E.M. (2015). Chitinase production by *Bacillus subtilis* ATCC 11774 and its effect on biocontrol of *Rhizoctonia* diseases of potato. *Acta Biologica Hungarica*, 66(4), 436-448.
- Sacherer, P., Defago, G., & Haas, D. (1994). Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gaca* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*, 116(2), 155-160.
- Saxena, A.K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D.J. (2020). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1583-

1594.

- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.
- Shahrokhi, S., Bonjar, G.S., & Saadoun, I. (2005). Biological control of potato isolates of *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces olivaceus* strain 115. *Biotechnology*, 4(2), 132-138.
- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K.D., Singh, P.K., & Kumar, A. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. In: *PGPR Amelioration In Sustainable Agriculture* (pp. 41-66). Woodhead Publishing.
- Srilakshmi, P., Thakur, R. P., & Satyaprasad, K. (2011). Mechanism of biocontrol of *Aspergillus flavus* in groundnut by species of *Trichoderma*. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 41(2), 249-254.
- Solanki, M.K., Robert, A.S., Singh, R.K., Kumar, S., Pandey, A.K., Srivastava, A.K., & Arora, D.K. (2012). Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Current Microbiology*, 65(3), 330-336.
- Soltani, H., zafari, D., & rouhani, H. (2006). A study on biological control of the crown, root and tuber fungal diseases of potato by *Trichoderma harzianum* under in-vivo and field condition in Hamadan. *Agricultural Research*, 5 (3), 13-25
- Srivastava, S., Bist, V., Srivastava, S., Singh, P.C., Trivedi, P.K., Asif, M.H., & Nautiyal, C.S. (2016). Unraveling aspects of *Bacillus amyloliquefaciens* mediated enhanced production of rice under biotic stress of *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 587.
- Taheri, P., and Tarighi, S. 2010. Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology*, 167(3), 201-208.
- Tran, H., Ficke, A., Asiimwe, T., Höfte, M., & Raaijmakers, J.M. (2007). Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *The New Phytologist*, 175(4), 731-742.
- Wale, S.J., Platt, H.W., & Cattlin, N.D. (2008). *Diseases, pests and disorders of potatoes: a color handbook*. London Pub, Elsevier. 176p.
- Wharton, P.S. And Wood, E. (2013). *Rhizoctonia stem canker and black scurf of potato*. Idaho, USA: University of Idaho, Extension CIS 1198.
- Woodhall, A. L., Peters, J., Kiezebrink, D., Sparrow, L., & Ophelkeller, K. (2013). *Informing management of potato diseases through epidemiology and diagnostics Rhizoctonia solani Reviews*. Potato council agriculture & horticulture development board. 46 p.
- Zhang, D., Yu, S., Yang, Y., Zhang, J., Zhao, D., Pan, Y., & Zhu, J. (2020). Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1196.