

ویژگی‌های بیوکنترلی باسیلوس‌های جداشده از فرا ریشه‌ی خیار علیه *Sclerotinia sclerotiorum*رقیه رضائی<sup>۱</sup>، حمیدرضا علیزاده<sup>۱</sup>، مهدی آزادوار<sup>۲</sup>، خدیجه سالاری<sup>۱</sup>

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

۲- بخش گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی جنوب استان کرمان، جیرفت، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران

مسئول مکاتبات: حمیدرضا علیزاده، پست الکترونیک: hamidalizadeh@ujiroft.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۷

۹۸-۸۵ (۲) ۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۱۳

## چکیده

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* از عوامل بیمارگر مهم گیاهان مختلف از جمله خیار می‌باشد. استفاده از عوامل بیوکنترل مانند باکتری‌های جنس باسیلوس یکی از راه کارهای امید بخش در مبارزه با این بیماری است. در این پژوهش ۶۳ جدایه باسیلوس از فرا ریشه‌ی خیار جداسازی، خالص سازی و بر مبنای خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها به روش کشت متقابل نشان داد که جدایه‌های Ba14، Ba29b، Ba17 و Ba24 به ترتیب اثر بازدارندگی مؤثری علیه این بیمارگر داشتند و ترکیبات فرار جدایه‌های Ba21، Ba29c، Ba10b، Ba17، Ba12a و Ba9c، Ba29b، به طور معنی داری از رشد پرگنه قارچ نسبت به شاهد ممانعت کردند. در آزمون گلخانه‌ای، جدایه‌های Ba17، Ba21، Ba10b و Ba29c و Ba14 میزان شاخص بیماری ناشی از قارچ *S. sclerotiorum* را به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش دادند. تولید سورفکتین و آنزیم پروتئاز به عنوان سازوکارهای بازدارندگی از بیمارگر مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های Ba29c، Ba10b، Ba17، Ba29b و Ba24 قادر به تولید آنزیم پروتئاز و جدایه‌های Ba29c، Ba10b و Ba21 قادر به تولید سورفکتین بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که ارتباط مستقیم بین ایجاد هاله‌ی بازدارنده، تولید سورفکتین، ترکیبات فرار و آنزیم پروتئاز با خواص بیوکنترلی علیه این بیمارگر وجود دارد. شناسایی مولکولی جدایه‌های مؤثر در کنترل بیماری بر پایه ژن 16S rDNA نشان داد که این جدایه‌ها به گونه‌های *Bacillus cereus*، *B. subtilis*، *B. licheniformis* و *B. endophyticus* و جنس *Lysinibacillus* spp. اختصاص دارند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پروتئاز، ترکیبات فرار، کنترل بیولوژیک، شناسایی مولکولی

## مقدمه

کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، اگرچه فرآیندی کند است، اما در مقایسه با سایر روش‌ها، به ویژه روش‌های شیمیایی، مقرون به صرفه بوده و اثرات آن پایدار است. همچنین، روشی ایمن و بی خطر برای محیط زیست و سلامت انسان است. سیستم‌های بیوکنترل بیمارگر بیماری را ریشه کن نمی‌کنند، بلکه آن‌ها را به حد تعادل طبیعی می‌رسانند (Dhingra & Sinclair, 1995). در میان عوامل بیوکنترل، گونه‌های *Bacillus* spp. به دلیل تولید اسپور مقاوم و ترشح آنتی‌بیوتیک‌های متعددی نظیر ایتورین، باسیلین، مایکوسابتلین، سورفکتین، فنجی مایسین، ائومایسین و سابسپورین و همچنین توانایی القای مقاومت در

باوجود استفاده از تمامی یافته‌های علم گیاه‌پزشکی، یک سوم محصولات کشاورزی توسط آفات و بیماری‌ها از بین می‌روند. کشف مواد شیمیایی کنترل کننده‌ی آفات و بیماری‌ها کمک بسیار زیادی به افزایش تولید این محصولات کرده است. اما استفاده از این مواد شیمیایی در طول سه دهه‌ی اخیر مشکلات اکولوژیک زیادی به وجود آورده است (Papavizas & Lewis, 1981). در نتیجه کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش جایگزین برای کنترل بیمارگرهای گیاهی خاک‌زاد توجه‌ی جهانی جلب کرده است (Gullino et al., 2003; Minuto et al., 2006).

گل‌خانه‌های منطقه‌ی جیرفت جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند (حاشیه هلیل رود شامل پشت لره، ده شیخ، ده پیش، دریاچه، رومرز، سید آباد و کنار صندل، جاده‌ی بلوک شامل باغ بابوئیه، ابوذریه، قاسم آباد، رضی آباد، خاتون آباد، کریم آباد و تل شیراز می‌باشد) (جدول ۱). نمونه خاک‌های جمع‌آوری شده از هر مزرعه به‌طور جداگانه با یکدیگر مخلوط شدند. جداسازی باکتری‌های *Bacillus spp.* براساس روش شودا (Shoda, 2000) انجام شد. پرگنه‌های مربوط به جنس باسیلوس براساس شکل، انتخاب و خالص‌سازی شدند. تعیین برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جداها از جمله آزمون گرم، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازوئین، تولید لوان و لسیتریناز براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام شد (Vos *et al.*, 2011). قارچ *S. sclerotiorum* که از کلکسیون قارچ‌های پردیس کرج دانشگاه تهران تهیه شد.

جدول ۱- مشخصات مناطق مختلف نمونه‌برداری شده به‌منظور جداسازی باکتری جنس باسیلوس فرا ریشه‌ی خیار.  
Table 1. Details of sample collection sites to isolate *Bacillus spp.* from cucumber rhizosphere.

Bacterial isolate	Sample collection sites
Ba10b- Ba9c	Bagher Abad
Ba5b	Senus Company
Ba22- Ba23- Ba29b- Ba29c- Ba17- Ba15- Ba21- Ba16- Ba27	Halil-roud River farms <sup>1</sup>
Ba20- Ba24- Ba28b- Ba4- Ba25- Ba26	Blouk Road farms <sup>2</sup>
Ba14- Ba6a	Dosari
Ba8a- Ba7	Gol Dasht
Ba3a	Dalfard
Ba12a	Jahad Abad
Ba11	Kheir Abad
Ba13	Tal Shiraz
Ba30	Airport Road
Ba31	Dam Road
Ba34	Band Saraji

### آزمون کشت متقابل

طبق روش پارک (Park, 1989) یک قرص ۰/۵ سانتی متری از حاشیه‌ی کلنی قارچ تازه رشد یافته در مرکز پتری حاوی محیط کشت (PDA+NA Potato Dextrose)

گیاه و تولید هورمون‌های گیاهی رشدی دارای موقعیت مناسبی جهت کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد می‌باشند (Lewis & Shea-Wilbur, 1995; Kilian *et al.*, 2000; Mahadatanapuk *et al.*, 2007). عوامل کنترل بیولوژیک از طریق ترشح آنزیم‌های خارج سلولی مختلف، موجب لیز شدن دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها می‌شوند. کیتینازها، گلوکانازها، لیپازها و پروتئازها، از جمله این آنزیم‌ها هستند که در اکثر موارد، خاصیت هم‌افزایی دارند (Haran *et al.*, 1996). سورفکتین با کاهش کشش سطحی سلول باکتری، امکان چسبیدن آن به سطح میسلایوم را فراهم می‌نماید (Czaczyk *et al.*, 2002) و با تثبیت باکتری و ایجاد بیوفیلم در سطح هیف‌های قارچ و همچنین ریشه‌ی گیاه، ترکیبات ضد قارچی باکتری بدون واسطه و قبل از این که جذب کلونیدهای خاک گردند و یا این که تحت تأثیر شرایط خاک تجزیه شوند روی قارچ تأثیر می‌گذارند و در افزایش قابلیت بیوکنترلی باسیلوس‌ها نقش دارد (Asaka & Shoda, 1996). تحقیقات اثر بیوکنترلی باسیلوس‌ها را بر کنترل بیمارگرهای گیاهی نشان داده است. گزارش شده است که *B. amyloliquefaciens* می‌تواند *S. sclerotiorum* را در گیاهچه خیار کنترل کند (Rostami *et al.*, 2013). همچنین دو جدایه‌ی باسیلوس، TU-100 *B. subtilis* و *B. megaterium* A6، به‌عنوان عامل بیوکنترل *S. sclerotiorum* در کلزا گزارش شده‌اند (Hu *et al.*, 2014). باتوجه به اهمیت اقتصادی محصول خیار در منطقه‌ی جیرفت و خسارت قابل توجه بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* در این منطقه این پژوهش به‌منظور امکان استفاده از باکتری‌های جنس باسیلوس جدا شده از خاک‌های منطقه علیه این بیمارگر و شناخت مکانیسم‌های بیوکنترل توسط این عوامل انجام شد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های جنس باسیلوس

جهت جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست، ۳۶ نمونه خاک از اطراف ریشه‌ی بوته‌های خیار از مزارع و

این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار (جدایه باکتری) و در سه تکرار انجام شد.

### آزمون تولید پروتئاز

محیط کشت SMA (Skim milk agar) شامل ۱۵ گرم پودر شیر، ۵ گرم عصاره‌ی مخمر، ۴ گرم آگار خونی، ۱۳/۵ گرم آگار باکتریولوژیک و یک لیتر آب مقطر تهیه و پس از سترون‌سازی در تشتک‌های پتری پخش و جدایه‌ها به صورت نقطه‌ای روی این محیط کشت داده شد و در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس بمدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف پرگنه باکتری که نشانه‌ی فعالیت آنزیم پروتئاز است مورد ارزیابی قرار گرفت (Maurhofer *et al.*, 1992). این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار (جدایه باکتری) و در سه تکرار انجام شد.

### شناسایی جدایه‌های مؤثر

جدایه‌های برتر در دو آزمون کشت متقابل و ترکیبات فرار شامل Ba17, Ba10b, Ba21, Ba14, Ba24, Ba29b و Ba29c برای آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بعدی انتخاب شدند. شناسایی دقیق جدایه‌های منتخب، به روش مولکولی مبتنی بر PCR و تعیین توالی ژن rDNA 16S به روش زیر انجام گرفت.

### استخراج DNA

استخراج DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن (Dashti *et al.*, 2009) با تغییراتی انجام گرفت. سوسپانسیونی از کشت جوان هر باکتری تهیه و به مدت دو دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و پس از حذف روئشین، ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب اضافه و به خوبی حل شد. این عمل دو بار تکرار شد. رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. به سوسپانسیون حاصل ۲۵۰ میکرولیتر هیدروکسید پتاسیم (KOH) پنج درصد اضافه و بلافاصله به مدت دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. سپس به مدت سه دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام و روئشین برداشته شد. هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به آرامی مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد.

Agar و Nutrient Agar (۵۰/۵۰) قرار داده شد و جدایه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای به فاصله‌ی چهار سانتی‌متر از یکدیگر در چهار طرف تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۷-۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج روز نگهداری شدند. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها بر اساس فاصله‌ای که بین حاشیه‌ی پرگنه قارچ و جدایه‌ها (هاله بازدارندگی) ایجاد شده بود اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶۳ تیمار (جدایه‌ی باکتری) و در سه تکرار صورت گرفت.

### آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری بر سطح تشتک پتری حاوی محیط کشت NA پخش شد و تشتک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. سپس، قطعه‌ای به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی کشت چهار روزه قارچ بیمارگر در مرکز تشتک حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. با رعایت شرایط سترون‌سازی تشتک‌های حاوی عامل بیماری به‌طور وارونه روی تشتک حاوی باکتری قرار داده شد و فاصله‌ی بین دو تشتک توسط نوار پارافیل کاملاً مسدود شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج روز نگهداری شدند (Kraus & Loper, 1990). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۴ تیمار و سه تکرار انجام گرفت. درصد بازداری از رشد میسلیم پس از پنج روز با اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ محاسبه شد.

### آزمون تولید آنتی‌بیوتیک سورفکتین

به محیط کشت آگار خونی (Blood Agar) که با دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس سترون شده بود، ۷ درصد خون گوسفند افزوده شد. محیط فوق در تشتک‌های پتری ریخته شد. جدایه‌ها به صورت نقطه‌ای روی این محیط کشت داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. هاله روشن اطراف کلنی بیان‌گر فعالیت سورفکتین تولید شده توسط باکتری بوده و میانگین شعاع هاله ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (Feignier *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 2007).

موجود در (NCBI National Center for Biotechnology Information) و با جستجوی بلاست (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) مقایسه شدند. آنالیز توالی‌ها و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining و عدد bootstrap محاسبه شده با هزار تکرار، توسط نرم افزار MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) با حذف تمامی جایگاه‌های دارای خطا و فواصل ترسیم شد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای از ژن rDNA 16S جدایه‌های باکتری جنس باسیلوس.

Table 2 The primers were used to amplify a segment of 16S rDNA of *Bacillus* isolates.

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

### بررسی‌های گلخانه‌ای

با توجه به اثرات مطلوب جدایه‌های Ba10b, Ba17, Ba21, Ba14, Ba24, Ba29b, Ba29c و Ba29c در شرایط آزمایشگاه، میزان تأثیر آن‌ها در کاهش بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* در گلخانه به‌روشن تلقیح ساقه در محل طوقه مورد مطالعه قرار گرفت. مراحل بررسی‌های گلخانه‌ای به شرح ذیل می‌باشد.

### تهیه‌ی مایه تلقیح جدایه‌های باکتری

مایه‌ی تلقیح جدایه‌های باکتری از کشت ۲۴ ساعته روی محیط کشت NA تهیه شد. سوسپانسیون باکتری در سولفات منیزوم ۱۰ میلی مولار تهیه و پس از دو بار شستشوی سلول‌ها با روش اسپکتروفتومتری تعیین غلظت و نهایتاً به میزان  $10^7$  CFU باکتری به ازای هر گرم به خاک اضافه شد (Kim *et al.*, 1997).

### بررسی اثر جدایه‌های باسیلوس بر بیماری ناشی از *S. sclerotiorum*

جعبه نشا با خاک (ماسه، کمپوست و کود دامی به ترتیب به نسبت ۶:۱:۱) دو بار سترون شده به فاصله‌ی ۲۴ ساعت و با جدایه‌های باکتری تلقیح شده ( $10^7$  CFU) باکتری به ازای هر گرم خاک) پر شدند. بذور خیار (رقم

پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، فاز رویی حذف شد. رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد سرد به آرامی حل و به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و مجدداً فاز رویی حذف شد. تیوپ‌ها به صورت وارونه روی دستمال کاغذی در دمای اتاق قرار گرفتند تا الکل آن‌ها بخار و به خوبی خشک شوند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر تیوپ اضافه و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شد.

### ب- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به منظور تکثیر قطعه‌ای از ناحیه‌ی rDNA 16S از آغازگرهای عمومی پروکاریوت‌ها (fD1/rD1) (جدول ۲) استفاده شد (Weisburg *et al.*, 1991).

آزمون PCR با استفاده از کیت AccuPower PCR PreMix Kit (Bioneer-South Korea) در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل یک میکرولیتر cDNA به غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها به غلظت ۱۰ پیکومول، ۱/۲ میکرولیتر از بافر  $MgCl_2$  (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدتری فسفات‌ها (dNTPs) (۱۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase به غلظت ۵ واحد در میکرولیتر، ۴/۳ میکرولیتر بافر PCR و ۱۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. شرایط دمایی ترموسایکلر به صورت واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل: واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای ۴۸ درجه‌ی سلسیوس و بسط در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. تعیین ترادف نوکلئوتیدی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط شرکت Bioneer کره‌ی جنوبی انجام گرفت. از نرم افزارهای GeneDoc و BioEdit برای ویرایش توالی‌ها استفاده شد. پس از به دست آوردن میزان همولوژی قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی مربوط به ناحیه 16S rDNA توسط نرم افزار Bio Edit هم ردیف‌سازی شدند. سپس فایل‌ها با فرمت FASTA.text آماده و با توالی‌های

## نتایج

### جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

از نمونه‌های مورد بررسی، ۶۳ جدایه باسیلوس براساس خصوصیات مورفولوژیکی انتخاب شدند. جدایه‌های انتخابی بر مبنای خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (مطابق با جدول ۳) از نظر باسیلوس بودن مورد تأیید قرار گرفتند.

جدول ۳- مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری جنس باسیلوس جدا شده از فرا ریشه‌ی خیار.

Table 2- Physiological and biochemical characteristics of the isolates of *Bacillus* isolated from the rhizosphere of cucumber.

Characteristics	Ba 14	Ba 10b	Ba 21	Ba 24	Ba 17	Ba 29c	Ba 29b	<i>Bacillus</i> spp.
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein hydrolysis	-	+	-	+	+	+	+	+
Levan production	+	-	-	-	-	-	-	-
Lecithinase	-	+	+	+	+	+	+	+
Growth on 7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): واکنش، تولید یا رشد، (-): عدم واکنش، تولید یا رشد.

(+): Reaction, production or growth; (-): Lack of reaction, production or growth.

### ارزیابی توان آنتاگونیستی جدایه‌های باسیلوس

#### علیه *S. sclerotiorum*

در آزمون کشت متقابل از ۶۳ جدایه، ۱۴ جدایه بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر را نشان دادند. جدایه‌های Ba14, Ba29b, Ba17 و Ba24 به ترتیب با ۱۰، ۹/۳، ۶/۷ و ۶/۷ میلی متر قطر هاله بازدارنده، مؤثرترین جدایه‌ها بودند و با شاهد در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (شکل ۱).

### ارزیابی اثر ترکیبات فراز جدایه‌های مورد بررسی

#### بر رشد پرگنه *S. sclerotiorum*

در این آزمون جدایه‌های Ba21, Ba29c, Ba10b, Ba17, Ba9c, Ba29b و Ba12a به ترتیب به میزان ۸۷/۱۴، ۸۴/۸۵، ۸۳/۴۲، ۸۲/۴۲، ۷۹/۱۴ و ۷۹/۱۴ درصد بازدارندگی از رشد *S. sclerotiorum* به‌شاهد نشان دادند و با شاهد در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (شکل ۲).

سوپردومینوس) با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت دو دقیقه ضد عفونی سطحی و با آب مقطر دو بار شستشو و در جعبه نشاء کشت شدند. بعد از این که نشاهای خیار دو برگی شدند به گلدان‌های اصلی که با خاک دوبار سترون شده پر شده بود منتقل شد. پس از سه هفته یک زخم روی ساقه در محل طوقه با یک چاقوی کوچک جراحی سترون ایجاد و یک قرص از کشت جوان قارچ *S. sclerotiorum* به قطر پنج میلی متر روی زخم قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت با پارافیلیم پوشانده شد و تا مرحله‌ی ارزیابی، قرص قارچ روی زخم باقی ماند. گیاهان تلقیح شده برای حفظ رطوبت با کیسه‌های پلاستیکی به مدت ۴۸ ساعت پوشانده شد. پس از برداشت کیسه‌ها گیاهان در دمای ۲۵-۳۲ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ نگه‌داری شدند (Baharlouei et al., 2011). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد، هر تکرار شامل سه بوته بود. ارزیابی بیماری با رتبه دهی بیماری انجام شد. رتبه صفر برای گیاهان فاقد علائم در محل تلقیح، رتبه یک برای گیاهان با لکه‌های گسترش یافته به پایه دم‌برگ، رتبه دو برای گیاهان با لکه‌های توسعه یافته به ۱/۳ قطر ساقه، رتبه سه برای گیاهان با لکه‌های توسعه یافته به ۱/۲ از قطر ساقه، رتبه چهار برای گیاهان با لکه‌های توسعه یافته به کل ساقه بدون شکستگی ساقه، و رتبه پنج برای گیاهان با لکه‌های توسعه یافته همراه با شکستگی ساقه اختصاص یافت (Christov et al., 2004). پس از ظهور علائم بیماری، شاخص بیماری براساس فرمول زیر برای هر تکرار محاسبه و تیمارها به لحاظ آماری مقایسه شدند (Cao et al., 2012).

$$\text{شاخص بیماری} = \frac{\text{تعداد گیاه رتبه } \times \text{رتبه}}{\text{بالاترین رتبه} \times \text{تعداد کل گیاه}} \times 100$$

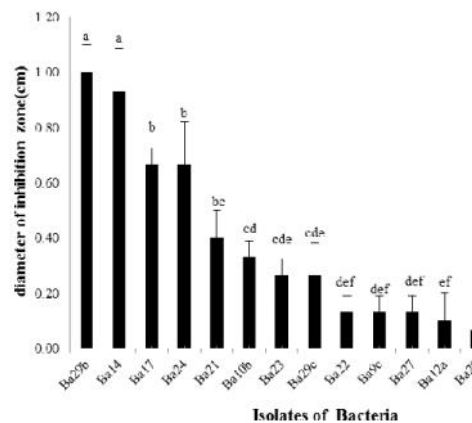
### تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار اکسل (۲۰۱۳) مرتب و نمودارها رسم گردید. داده‌ها به روش آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه‌ی میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه‌ی آماری احتمال پنج درصد انجام شد.

(شکل ۳). جدایه‌ی Ba10b با ایجاد هاله به شعاع ۲/۳۳ میلی‌متر بیشترین آنزیم پروتئاز را تولید نمود اما جدایه‌های Ba14 و Ba21a قادر به تولید آنزیم پروتئاز نبودند. در این روش اساس کار بر مبنای تجزیه پروتئین موجود در پودر شیر با آنزیم موجود در جدایه‌ی باکتری است. با هیدرولیز پروتئین شیر در محیط کشت تحت این آزمون، محیط کشت کدورت خود را از دست داده و رنگ محیط کشت به صورت شفاف درمی‌آید و بسته به فعالیت آنزیمی پروتئاز، آنزیم در محیط انتشار یافته و بر اساس درجه‌ی انتشار آنزیم می‌توان به فعالیت آنزیمی آن محلول پی‌برد.

### شناسایی مولکولی جدایه‌های با توان آنتاگونیستی

جدایه‌های Ba17، Ba10b، Ba14، Ba24، Ba29b و Ba29c که در آزمون‌های آزمایشگاهی توان آنتاگونیستی خوبی داشتند به منظور تعیین جایگاه تکاملی مورد شناسایی قرار گرفتند. در نتیجه انجام واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر fD1 و rD1، قطعه‌ای از DNA مربوط به توالی کدکننده DNA ریبوزومی ۱۶S با طول تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز (شکل ۴)، در جدایه‌های مختلف تکثیر شد. نتایج رسم درخت فیلوژنتیکی نشان‌دهنده‌ی ارتباط فیلوژنی جدایه‌های مذکور و باکتری‌های مرجع موجود در بانک ژن می‌باشد (شکل ۵). در درخت فیلوژنی رسم شده، چهار گروه تشکیل شد. گروه اول (I)، شامل چهار جدایه Ba10b، Ba24، Ba29c و Ba29b مربوط به این مطالعه و جدایه‌های باسیلوس مربوط به بانک ژن می‌باشد. جدایه‌های Ba10b و Ba24 با *Bacillus cereus* 6 به شماره‌ی دسترسی FJ435214، *Bacillus cereus* HYM85 به شماره‌ی دسترسی KT982242، *Bacillus subtilis* 22 به شماره‌ی دسترسی FJ435215 و *Bacillus cereus* FPA3 به شماره‌ی دسترسی JQ308550 از بانک ژن در یک زیر گروه اول (IA) و جدایه‌های Ba29b و Ba29c با *Bacillus cereus* MCCC 1A02143 به شماره‌ی دسترسی KJ812439 و *Bacillus cereus* ML267 به شماره‌ی دسترسی KC692161 در زیر گروه دوم (IB) قرار گرفتند و همگی با هم گروه I را تشکیل دادند. جدایه‌ی Ba14 با *Bacillus endophyticus* BAB-2834 به شماره دسترسی



شکل ۱- بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی در آزمون کشت متقابل در مقابل قارچ *S. sclerotiorum*، میانگین قطر هاله بازدارندگی در تیمارهای مختلف پس از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن مقایسه شدند (P 0.05). ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 1. Inhibition zone formation of bacterial isolates in dual culture tests against *S. sclerotiorum*. The mean diameter of inhibition zone in different treatments after analysis of variance were compared using Duncan's multiple range test (P 0.05). The columns with one common letter are not statistically different.

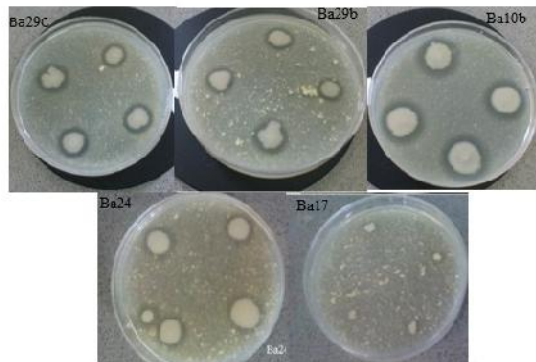
### ارزیابی تولید آنتی بیوتیک سورفکتین

ایجاد هاله‌ی روشن در تشتک پتری حاوی آگار خونی بیان‌گر تجزیه‌ی گلبول قرمز در اطراف پرگنه جدایه‌های باکتری مربوط به تولید سورفکتین می‌باشد. جدایه‌های مورد بررسی در سطح پنج درصد از نظر تولید سورفکتین با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. اندازه‌گیری شعاع هاله‌ی روشن ایجاد شده اطراف پرگنه جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌ی Ba29c یا ایجاد هاله به شعاع شش، Ba21a به شعاع چهار و Ba10b به شعاع ۳/۳۳ میلی‌متر به ترتیب بیشترین فعالیت را از نظر تولید سورفکتین نشان دادند. بقیه‌ی جدایه‌ها در این محیط ایجاد هاله نکردند.

### ارزیابی تولید آنزیم پروتئاز

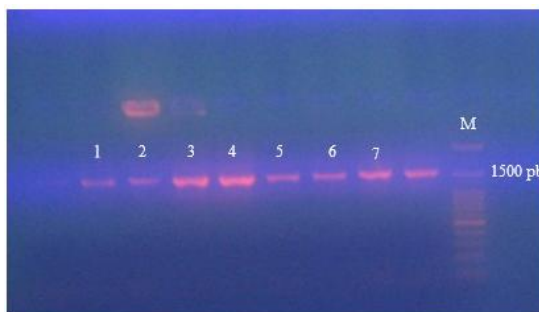
جدایه‌های Ba17، Ba29b، Ba29c، Ba24، Ba10b و Ba29b با تولید پروتئاز، ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی‌ها کردند

به لحاظ آماری نداشتند. تمامی جدایه‌ها در کنترل بیماری با شاهد در سطح پنج درصد اختلاف معنی دار داشتند. جدایه Ba29b در گلخانه علیه این بیمارگر نسبت به سایر جدایه‌ها نتیجه ضعیفی نشان داد.



شکل ۳- هاله شفاف اطراف کلنی باکتری‌های رشد داده شده روی محیط کشت skim milk agar ناشی از تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه‌های Ba29c, Ba24, b10Ba, Ba29c, Ba29b و Ba17 پس از ۴۸ ساعت می‌باشد.

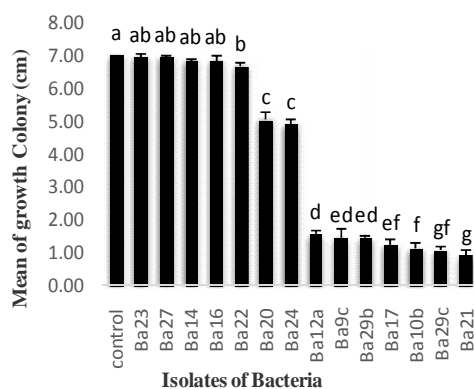
Fig. 4 Clear zone around the bacterial colonies grown on skim milk agar culture medium shown production of protease enzyme by Ba10b, Ba24, Ba29c, Ba29b and Ba17 isolates.



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول PCR مربوط به تکثیر بخشی از ژن rDNA ۱۶S جدایه‌های باسیلوس به اندازه تقریبی ۱۵۰۰ نوکلئوتید در ژل آگاروز ۱/۵ درصد. (M نشان‌گر اندازه دی ان ا، Gen Ruler™ Fermentase, DNA 1Kb Ladder lithuania) جدایه‌ی Ba 21 (۱)، جدایه‌ی Ba 17 (۲)، جدایه‌ی Ba 29c (۳)، جدایه‌ی Ba 10b (۴)، جدایه‌ی Ba 29b (۵)، جدایه‌ی Ba 9c (۶)، جدایه‌ی Ba 12a (۷).

Fig. 4. Electrophoresis of the PCR product of 16S rDNA gen of bacterial isolates on 1.5% agarose gel. M) DNA size marker, 1) Ba21, 2) Ba29c, 3) Ba10b, 4) Ba17, 5) Ba29b, 6) Ba9c, and 7) Ba12a.

Bacillus endophyticus S2-F14 و KF535129 به‌شماره‌ی دسترسی KC851835 در گروه دوم (II)، گروه‌بندی شدند و جدایه‌ی Ba17 با MS5-14 *Bacillus licheniformis* به‌شماره‌ی دسترسی EU718490 و *Bacillus sonorensis* و CMMMB987 به‌شماره‌ی دسترسی KF879301 در گروه سوم (III) قرار گرفتند. جدایه‌ی Ba21 با *Lysinibacillus spp.* به‌شماره‌ی دسترسی KM497505 در گروه چهارم (IV) قرار گرفت. توالی‌ها در پایگاه داده‌ای ثبت شدند (شکل ۵).

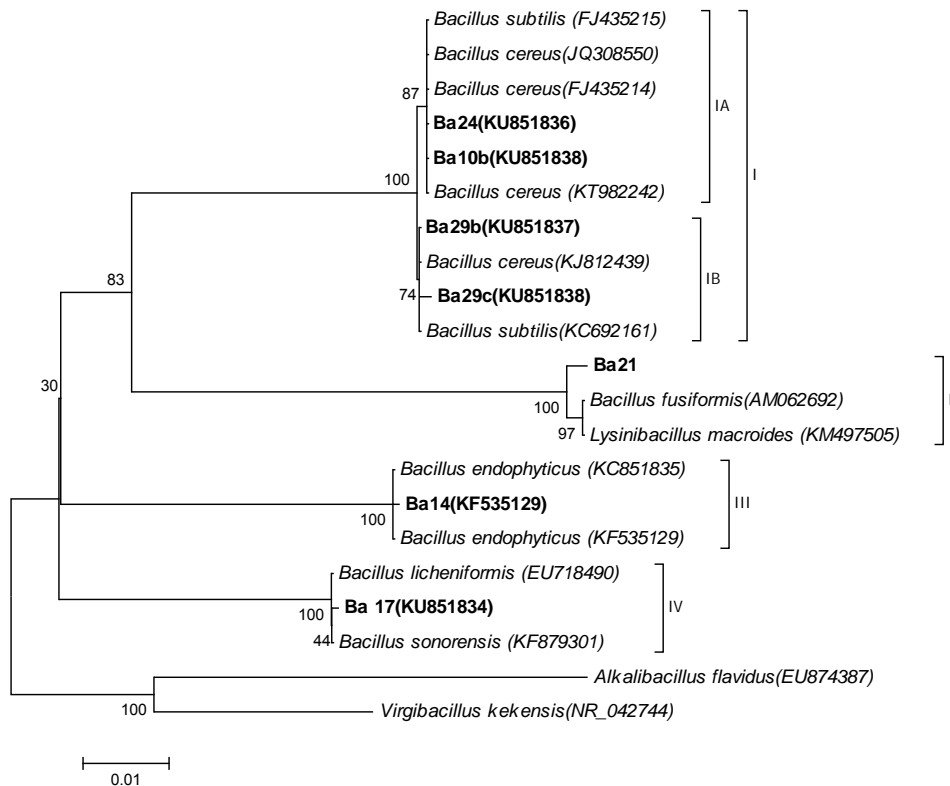


شکل ۲- تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های باسیلوس در جلوگیری از رشد کلنی *S. sclerotiorum*. میانگین رشد کلنی در تیمارهای مختلف پس از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند ( $P < 0.05$ ). ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری با هم اختلاف معنی دار ندارند.

Fig. 2. Effect of volatile compounds of Bacillus isolates to prevent of *S. sclerotiorum* growth. The mean diameter of colony in different treatments after analysis of variance were compared using Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ). The columns with one common letter are not statistically different.

### بررسی‌های گلخانه‌ای

در این آزمون گیاهان تیمار شده با جدایه‌های Ba17، Ba21، Ba29c، Ba10b، Ba14، Ba24، Ba29b و شاهد میزان شاخص بیماری به ترتیب ۰، ۰، ۲، ۰، ۸، ۶۴/۴، ۹۸ و ۸۴/۴۴ درصد ثبت شد (شکل ۵). در تیمار با جدایه‌های Ba17 و Ba21 علایم بیماری را دیده نشد و با تیمارهای جدایه‌های Ba10b و Ba29c اختلاف معنی داری



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش Neighbor-Joining و براساس توالی ناحیه‌ی ژنی 16S-rDNA. اعداد بالای شاخه‌ها نشان دهنده‌ی نتایج آنالیز اعتبار سنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار است. از باکتری‌های *Virgibacillus* (NR\_042744.1) و *Alkalibacillus* (EU874387.1) به‌عنوان Outgroup استفاده شد. جدایه‌های تعیین ترادف شده این تحقیق به‌صورت پر رنگ نشان داده شده است.

Fig. 5. Phylogenetic tree was obtained by Neighbor-Joining method and based on partial sequence of 16S rDNA. Numbers in above the clade is represents Bootstrap with 1000 replication. *Virgibacillus* (NR\_042744.1) and *Alkalibacillus* (EU874387.1) bacteria was used as Outgroup.

شکل ۶- تأثیر جدایه‌های باکتریایی جنس باسیلوس بر میزان شاخص بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* در گیاهچه‌های خیار. میانگین شاخص بیماری در تیمارهای مختلف پس از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن مقایسه شدند (P 0.05). ستون‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری با هم اختلاف معنی دار ندارند.

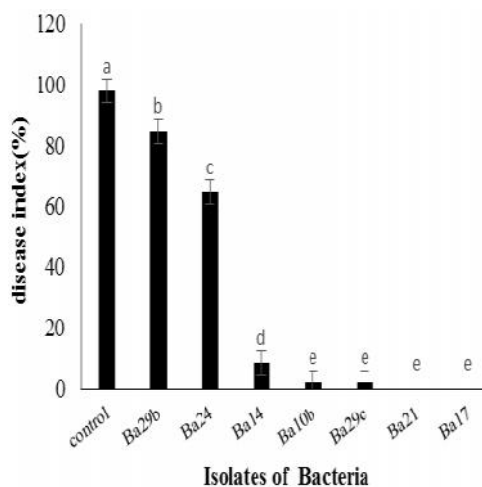


Fig. 6. Effect of *Bacillus* isolates on the disease index of *S. sclerotiorum* on cucumber seedlings. The means of the disease index in different treatments after analysis of variance were compared using Duncan's multiple range test (P 0.05). The columns with one common letter are not statistically different.



## بحث

در آزمون ترکیبات فرار جدایه‌های Ba29c, Ba21, Ba17, Ba10b, Ba29b, Ba9c, و Ba12a به ترتیب به میزان ۸۷/۱۴، ۸۴/۸۵، ۸۳/۴۲، ۸۲/۴۲، ۷۹/۱۴، ۷۹/۱۴ و ۷۷/۷۱ درصد بازدارندگی از رشد *S. sclerotiorum* نشان دادند و به‌عنوان مؤثرترین جدایه‌ها بودند. فیدامن و روزال در مورد نحوه‌ی بازدارندگی از رشد میسلومی قارچ‌های رده اوومیسیت و بازیدیومیست توسط جدایه‌های *B. subtilis* علاوه بر تولید آنتی‌بیوتیک، مکانیسم دیگری را تحت عنوان متابولیت‌های فرار ضد قارچی مطرح ساختند و اعلام کردند که توانایی تولید ترکیبات فرار ضد قارچی در جدایه‌های باکتری توسط گلوکز اداره می‌شود و چنین قندهایی بیان ژنی را که دارای خواص ضد قارچی است را افزایش می‌دهند (Fiddaman & Rossall, 1993). گزارش‌هایی هم مبنی بر نقش ترکیبات فرار در ایجاد بد شکلی، ضخیم شدن دیواره، کاهش اسپورزائی و گرانه شدن سلول‌های قارچ‌ها منتشر شده است (Moore-Landecker & Stotzky, 1973). محققین نشان دادند سویه‌های باسیلوس و سودوموناس با تولید متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های مایع خارج سلولی از رشد میسلومی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* عامل پژمردگی آوندی میخک جلوگیری می‌کنند (Karimi et al., 2007). نتایج به‌دست آمده از آزمون تولید پروتاز نشان دهنده‌ی این موضوع بود که جدایه‌های فعال باسیلوس، از حیث تولید آنزیم‌های برون سلولی نیز بسیار توانمند بوده و قادر به تولید پروتازهای خارج سلولی هستند. چهار جدایه‌ی Ba29b, Ba29c, Ba24, و Ba10b که قادر به تولید آنزیم پروتاز بودند در شناسایی مولکولی به *B. cereus* مشابهت زیادی داشتند که نشان می‌دهد این گونه توانایی بالقوه‌ای در تولید این آنزیم را دارا می‌باشد. جدایه‌ی *B. amyloliquefaciens* NJZJSB3 با تولید بیوفیلیم، سیدروفور و آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی (پروتاز و -۱، ۳- گلوکاناز) به‌عنوان یک عامل بالقوه برای کنترل بیولوژیک پوسیدگی ساقه ناشی از *S. sclerotiorum* معرفی شده است (Wu et al., 2014). اختلاف در بین جدایه‌های مختلف یک گونه از نظر تولید

باتوجه به آن که استفاده بیش از حد از مواد شیمیایی در کشاورزی، سبب آلودگی محیط زیست شده است و همچنین عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز به سرعت نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی مقاومت حاصل می‌نمایند، کنترل بیولوژیک روشی است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی باشد (Paulitz & Bélanger, 2001). در روش کنترل بیولوژیک می‌توان از خواص ضد میکروبی میکروارگانیسم‌های مختلف مخصوصاً باکتری‌ها علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی مانند انواع قارچ‌های بیماری‌زا استفاده کرد که این خاصیت باکتری‌ها بیشتر به دلیل توانایی آن‌ها در تولید ترکیباتی با خواص ضد میکروبی مانند پپتیدهای ضد قارچی و حتی انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Leeman et al., 1995). از میان ۶۳ جدایه‌ی بررسی شده چهار جدایه هاله بازدارندگی بیش از ۵ میلی‌متر ایجاد کردند که شامل جدایه‌های Ba17, Ba29b, Ba24, و Ba14 بودند. این چهار جدایه برای آزمون‌های آزمایشگاهی بعدی و گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به این که هاله بازدارندگی بین پرگنه آنتاگونیست و قارچ، منعکس کننده فعالیت کلی ترشحات خارج سلولی آنتاگونیست علیه بیمارگر است، در اکثر موارد از قطر هاله بازدارندگی، به‌عنوان شاخص کمی، برای انتخاب مقدماتی جدایه‌ها استفاده می‌شود (Fravel, 1988). در بین جدایه‌های برتر، سه جدایه‌ی Ba21, Ba10b, و Ba29c توانستند در محیط کشت آگار خونی سورفکتین تولید کنند. جدایه‌های مختلف *B. cereus* طیف وسیعی از ترکیبات ضد قارچی مانند زوایترمایسین آ، کانوزامین و همچنین لیپوپپتیدهای خانواده‌ی ایتورین مانند ایتورین و سورفکتین را تولید می‌کنند که به خوبی می‌توانند سبب ممانعت از رشد و تکثیر قارچ‌ها و گاهی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی شوند (He et al., 1994; Yu et al., 2002). محققان نشان دادند جدایه‌های *Lysinibacillus* sp. و *B. fusiformis* ATT2 و ATS3L دارای توانایی بالایی در تولید سورفکتین هستند (Ajibade, 2014).

آزمون ترکیبات فرار بهترین جدایه‌ها بودند و به نظر می‌رسد که ترکیبات فرار نقش زیادی در بیوکنترل *S. sclerotiorum* در گلخانه داشته است. در آزمون گلخانه‌ای جدایه‌ی Ba24 برعکس نتایج خوب آزمایشگاهی، در گلخانه علیه بیمارگر نتیجه ضعیف‌تری از خود نشان داد. نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری *Bacillus subtilis* با تغییر pH، میزان شوری و حتی دمای خاک نیز تغییر پیدا می‌کند (Montealegre et al., 2003). جدایه‌ی Ba21 تولید سورفکتین نمود و در آزمون ترکیبات فرار بهترین جدایه بود و به نظر می‌رسد که ترکیبات فرار و تولید سورفکتین نقش زیادی در بیوکنترل *S. sclerotiorum* در گلخانه داشته است. جدایه‌های Ba29c و Ba10b علاوه بر تولید ترکیبات فرار خوب، در آزمون سورفکتین و پروتئاز جدایه‌های مؤثری بودند بنابراین می‌توان بیوکنترلی آن‌ها را در گلخانه به تولید سورفکتین و آنزیم پروتئاز نسبت داد. نتایج به دست آمده در این تحقیق، توانایی جدایه‌هایی بومی از باسیلوس و متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها را به منظور ممانعت از رشد این بیمارگر گیاهی نشان می‌دهند و می‌توان از این مطالعه در تولید تجاری این عوامل و از آن‌ها در کنترل *S. sclerotiorum* استفاده نمود. همچنین با توجه به برخی تفاوت‌ها در نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌توان توصیه کرد غربال جدایه‌های آنتاگونیست از گلخانه و علیه بیماری در صورت امکان انجام شود. با توجه به آن که آنتاگونیست‌ها در زیستگاه‌ها و خاک‌ها با اکولوژیکی مختلف سازگاری یافته‌اند، با شناخت این شرایط می‌توان اثر کنترل کنندگی آن‌ها را افزایش داد و از این مطالعه در تولید تجاری Ba17، Ba21، Ba10b، Ba29c و Ba14 علیه *S. sclerotiorum* استفاده نمود.

مواد ممانعت کننده از رشد قارچ‌ها توسط سینگ و دورال گزارش شده است (Singh & Deverl, 1984).

تحلیل توالی 16S rDNA امروزه به عنوان روشی قابل قبول برای شناسایی و تاکسونومی باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، پس از تکثیر قطعه‌ای تقریباً به طول ۱۵۰۰ جفت باز از توالی کد کننده 16s rDNA و توالی یابی آن‌ها، از اطلاعات حاصل برای شناسایی جدایه‌های برتر در سطح گونه استفاده شد. تعیین توالی قطعه مورد نظر و مقایسه آن با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ای جهانی ژن، نشان داد که جدایه‌های Ba24، b10Ba، Ba29c، به گونه‌ی *B. cereus*، جدایه‌ی Ba29b به گونه‌های *B. subtilis* و *B. cereus* به گونه‌ی Ba17، *B. licheniformis* و *B. licheniformis* به گونه‌ی Ba14، *B. endophyticus* بیشترین مشابهت را دارا بودند. جدایه‌ی Ba21 به جنس *Lysinibacillus* spp. و گونه‌ی *B. fusiformis* مشابهت نشان داد.

مقایسه‌ی شکل‌های ۱ و ۲ با شکل ۳ نشان می‌دهند که این جدایه‌ها از نظر شاخص‌های آزمایشگاهی مورد بررسی و همچنین قابلیت بیوکنترلی در شرایط گلخانه اندکی با یکدیگر متفاوتند. تغییر محیطی و اثر آن روی قابلیت رقابت، دوام و پایداری آنتاگونیست می‌تواند یکی از دلایل مهم در کاهش توان آنتاگونیستی به شمار رود. بسیاری از ویژگی‌های باکتری در رقابت اکولوژیکی فرا ریشه دخیل‌اند و فقدان هر یک می‌تواند توانایی باکتری را در استقرار یا انجام وظیفه‌اش در مجاورت با سطح ریشه کاهش دهد (Weller, 1988).

در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های Ba21، Ba17، Ba29c، Ba14، Ba10b، Ba29c و Ba29b میزان شاخص بیماری به ترتیب ۰، ۲، ۲، ۸، ۶۴/۴ و ۸۴/۴۴ درصد دیده شد. جدایه‌های Ba29c، Ba21، Ba17، Ba10b و Ba14 در

## References

- Ajibade, O.A. 2014. Isolation of Bioemulsifier Producing Marine Bacteria a Quarterly Publication of the Faculty of Science, Adeleke University, Ede, State of Osun, Nigeria. 141-144.
- Asaka, O. & Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology, 62 (11): 4081-4085.

- Baharlouei, A., Sharifi-Sirchi, G.R. & Shahidi Bonjar, G.H. 2011. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces*. African Journal of Biotechnology, 10 (30), 5785-5794
- Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L. & Shen, Q. 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. Scientia Horticulturae, 135: 32-39.
- 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 Proc. 16<sup>th</sup> Int. Sunfl. Conf., Fargo, North Dakota, USA, Int. Sunfl. Assoc., Paris, France, 693-698.
- Czaczyk, K., Trojanowska, K. & Stachowiak, B. 2002. Inhibition of ergosterol biosynthesis in fungal plant pathogens by *Bacillus* sp. Polish Journal of Environmental Studies, 11 (5): 593-597.
- Dashti A., Jadaon 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.
- Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. 1995. 'Basic Plant Pathology Methods'. CRC Press: USA, pp: 287-296, 390-391.
- 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.
- Fernandes, P.A.V., Arruda, I.R.d. Santos, A.F.A.B.D., Araújo, A.A. d., Maior, A.M.S. & Ximenes, E.A. 2007. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 38(4): 704-709.
- Fiddaman, P.J. & Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, 74: 119-126.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology, 26(1): 75-91.
- Gullino, M.L., Camponogara, A., Gasparini, G., Rizzo, V., Clini, C. & Garibaldi, A. 2003. Replacing methyl bromide for soil disinfestations the Italian experience and implications for other countries. Plant Disease, 87: 1012-1021.
- Haran, S., Schickler, H., & Chet, I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142: 2321-2331.
- He, H., Silo-Suh, L.A., Handelsman, J. & Clardy, J. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. Tetrahedron Letters, 35(16): 2499-2502.
- Hu, X., D.P., Roberts, L., Xie, J.E., Maul, C., Yu, Y., Li, M., Jiang, X., Liao, Z., Che & X. Liao. 2014. Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field. Biological Control, 70: 54-64 .
- Karimi, A., Rohani, H., Zafari, D., & Taghinasab, M. 2007. Biological control carnation vascular wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* with *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of Carnation. Journal of Water and Soil Science, 11 (41): 309-320. (Persian)
- Kilian, M., Steiner U., Krebs, B., Junge, H., Schmiedeknecht, G. & Hain, R. 2000. FZB24® *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 100 (1): 72-93.

- 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.
- Kraus, J. & Loper, J.E. 1990. Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: mechanistic studies. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The Second International Work Shop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Interlaken, Switzerland*, 172-175.
- Leeman, M., Van Pelt, J.A., Hendrickx, M.J., Scheffer, R.J., Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B. 1995. Biocontrol of Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology*, 85(10): 1301-1305.
- Lewis, J.A. 1991. Formulation and delivery systems of biocontrol agent with emphasis on fungi. In: Keister D.L., Cregan, P.B. (eds.). *The Rhizosphere and Plant Growth*. Kluwer. Rotterdam, 279-287.
- Mahadatanapuk, S., Sanguanserm Sri, M., Cutler, R.W., Sardud V. & Anuntalabhochai, S. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep using antagonistic *Bacillus* spp. *Journal Articles of Biological Science*, 2 (2): 54-61.
- Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C., Haas, D. & Defago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82: 190-195.
- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, 25 (5): 468-475.
- Montealegre, J.R., Reyes, R., Perez, L.M., Herrera, R., Silva, P. & Besoain, X. 2003. Selection of bio-antagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2): 115-127.
- Moore-Landecker, E. & Stotzky, G. 1973. Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites. *Mycologia*, 65: 519-530.
- Park, C.S. 1989. Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. *Phytopathology*, 138(3): 189-208.
- Papavizas, G.C. & Lewis, J.A. 1981. Induction and augmentation of microbial antagonists for the control of soil-borne plant pathogens. In: Papavizas G.C. (ed.). *Biological control in crop production*. Totowa, NJ: Allanheld and Osmum, 305 - 322.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1): 103-133.
- Rostami, S., Maleki, M., & Shahriari, D. 2013. The use of *Bacillus amyloliquefaciens* to control of Sclerotinia Stem Rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of cucumber. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2 (22): 965-970.
- Singh, J. & Deveral, B.J. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transaction of British Mycological Society*, 83(3): 484-490.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6): 515-521.
- 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.

- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A. & Whitman, W. (Eds.). 2011. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media, 22-92.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-born plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.
- Wu, Y.C., Raza, W. & Huang, Q.W. 2014. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10): 1327-13.



---

## Biocontrol traits of *Bacillus* spp. isolated from cucumber rhizosphere against *Sclerotinia sclerotiorum*

Roghayeh Rezaei<sup>1</sup>, Hamid Reza Alizadeh<sup>1</sup>, Mehdi Azadvar<sup>2</sup>, Khadijah Salari<sup>1</sup>

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran

2. Department of Plant Protection, Agriculture Research Center of South of Kerman, Jiroft, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran

Corresponding author: Hamid Reza Alizadeh, email: hamidalizadeh@ujiroft.ac.ir

---

Received: Jun., 02, 2016

4 (2) 85-98

Accepted: Jan., 16, 2017

---

### Abstract

*Sclerotinia sclerotiorum* is an important plant pathogenic fungus. Biocontrol agents such as *Bacillus* spp. are promising candidates to manage the disease caused by this fungus. In this study, we identified 63 isolates of *Bacillus* spp. obtained from cucumber rhizosphere based on morphological, physiological and biochemical characteristics. The antagonistic activity of the isolates against the fungal pathogen was evaluated using dual culture method and the production of volatile metabolites. According to the obtained results, the isolates Ba17, Ba24, Ba14 and Ba29b showed the most inhibitory effects against the pathogen in dual culture method. Volatile metabolites of isolates Ba21, Ba29c, Ba10b, Ba17, Ba29b, Ba9c and Ba12a, reduced the mycelial growth of the pathogen by 87.14, 84.85, 83.42, 82.42, 79.14, 79.14 and 77.71%, respectively and had a significant difference compared with the control. In the greenhouse trails, isolates Ba17, Ba21, Ba10b, Ba29c and Ba14 decreased the disease index of *Sclerotinia* stem rot, significantly. The isolates Ba29c, Ba10b, Ba17, Ba29b, Ba24 were capable to show protease enzyme activity. Results also showed that isolates Ba29c, Ba10b and Ba21 were capable of producing surfactin. Molecular identification of isolates with antagonistic activities against the fungal pathogen by partial sequencing of 16S rDNA gene which amplified with specific primers fD1 and rD1 was performed. Based on this procedure, isolates showed high homology with *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. endophyticus* and *Lysinibacillus* spp..

**Keywords:** biological control, molecular identification, protease enzyme, volatile compounds

---