

مقاله تحقیقی

بررسی کارایی چهار سویه *Bacillus spp.* در مه‌ار زیستی بیماری آنتراکنوز توت‌فرنگیزهرا علی‌جانی^۱، جهانشیر امینی^۲

۱- پژوهشگر پسا دکتری، استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

مسئول مکاتبات: جهانشیر امینی، ایمیل: jamini@uok.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

۱۸۰-۱۶۵ (۲) ۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۶

چکیده

سویه‌های باکتریایی از گیاهچه‌های توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa*) از مزارع استان کردستان جداسازی و تاثیر ضد قارچی آن‌ها بر قارچ عامل آنتراکنوز *Colletotrichum nymphaeae* در شرایط آزمایشگاه، درون شیشه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های باکتریایی اندوفیت با استفاده از مشخصات بیوشیمیایی و مولکولی ژن *16S rDNA* تشخیص داده شد و در جنس *Bacillus spp.* قرار گرفتند. در آزمون کشت متقابل درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در سویه *MarG19* ۶۴/۰۴٪، در سویه *SN3* ۶۰/۵۹٪، در سویه *DM6* ۶۱/۵۷٪ و در سویه *LN11* ۵۴/۱۸٪ محاسبه شد. ترکیبات خارج سلولی هر چهار سویه باعث کاهش معنی‌دار رشد پرگنه و جوانه‌زنی قارچ بیمارگر شدند. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر توسط سویه *MarG19* ۷۹/۰۲٪، سویه *SN3* ۴۱/۹۵٪، سویه *DM6* ۳۲/۸۶٪ و سویه *LN11* ۳۴/۹۶٪ برآورد شد و درصد بازدارندگی بر جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر در سویه *MarG19* ۸۶/۳۱٪، در سویه *SN3* ۷۵/۳۳٪، در سویه *DM6* ۴۱/۱۰٪ و در سویه *LN11* ۷۶/۷۳٪ محاسبه گردید. ترکیبات فرار هر چهار سویه به صورت جزئی باعث کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر به میزان ۷/۷۳٪ تا ۱۹/۶۴٪ شدند. در شرایط درون شیشه درصد بازدارندگی از شدت بیماری در سویه *MarG19* ۷۱/۱۹٪، در سویه *SN3* ۷۶/۱۵٪، در سویه *DM6* ۸۸/۰۷٪ و در سویه *LN11* ۸۵/۴۳٪ ارزیابی شد. علاوه بر این، تاثیر هر دو سویه در شرایط گلخانه به دو روش خیساندن خاک و اسپری مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین درصد بازدارندگی در سویه‌های *MarG19* و *DM6* در روش خیساندن خاک (۷۷/۷۷٪) و در سویه *SN3* در روش اسپری (۱۰۰٪) محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اندوفیت، ترکیبات ضدقارچی، ژن *16S rDNA*، لیپوپتید

مقدمه

ایران، استان کردستان به عنوان یکی از مطرح‌ترین پرورش‌دهندگان توت‌فرنگی است. آفات و بیماری‌های زیادی کشت این محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهند که بیماری آنتراکنوز یکی از اصلی‌ترین آن‌ها می‌باشد. در این بیماری بیشتر بخش‌های گیاه مانند طوقه، میوه، برگ‌ها، دم‌برگ و استولون یا ساقه خزننده به قارچ عامل بیماری حساس می‌باشند. در اثر آلودگی با قارچ عامل بیماری روی میوه نارس و رسیده، لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه و آب‌سوخته به وجود می‌آید که این لکه‌ها در شرایط مرطوب گسترش پیدا می‌کنند. لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه همچنین بر روی برگ‌ها و

توت‌فرنگی (*Fragaria*) گیاه علفی و دولپه، از خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) است که گونه تجاری آن با نام *Fragaria × ananassa* Duch می‌گردد. میوه توت‌فرنگی به دلیل دارا بودن ویتامین‌ها، قندها، مواد معدنی و طعم و عطر مطلوب، در سراسر جهان از توجه زیادی برخوردار است. همچنین دارای آهن، فیبر، ویتامین ث، کلسیم، پتاسیم، فسفر و ترکیبات فلاونوئیدی بوده که در سلامت انسان نقش دارند (Konczak & Zhang, 2004). بر اساس آمار نامه سازمان جهاد کشاورزی در سال ۱۴۰۰، در

باکتری‌های اندوفیت و بررسی ویژگی‌های ضد قارچی آنها علیه عامل بیماری آنتراکنوز توت‌فرنگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

قارچ بیمارگر

سویه قارچ بیمارگر به شماره دسترسی MK372221 از کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان تهیه گردید.

نمونه برداری

بوته‌های سالم، از مزارع توت‌فرنگی منطقه مریوان در استان کردستان جمع‌آوری و در بسته‌های کاغذی به آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی منتقل گردید.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

پس از شستشوی بوته‌های سالم توت‌فرنگی با آب معمولی، بخش‌های مختلف گیاهی از هر نمونه شامل ریشه، طوقه، برگ، دمبرگ، گلبرگ، دم میوه، ساقه، استولون، میوه نارس و میوه رسیده به قسمت‌های کوچک تقسیم شد. جهت ضدعفونی سطحی، نمونه‌ها یک دقیقه در اتانول ۷۰٪، ۲-۴ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شدند و سه بار شستشو با آب مقطر سترون هر کدام به مدت یک دقیقه انجام گردید. به هر نمونه در هاون سترون، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و کوبیده شد و به مدت ۳۰ دقیقه رها گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون، روی محیط‌های (NA) Nutrient agar، King's B و Tryptic soy agar (TSA) کشت چمنی انجام داده شد (Costa et al., 2012). سپس نمونه‌ها خالص و پس از رشد جدایه‌ها در محیط NB، گلیسرول سترون به نسبت ۲۰٪ حجمی اضافه و در فریزر ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. کارایی روش ضدعفونی سطحی، با کشت ۵۰ میکرولیتر از آب شستشوی سوم بر روی محیط کشت NA ارزیابی گردید (Costa et al., 2012).

دمبرگ ایجاد شده و پژمردگی و مرگ گیاه به سبب پوسیدگی طوقه ایجاد می‌گردد (Curry et al., 2002). این بیماری در اثر چند گونه *Colletotrichum spp.* ایجاد شده و گیاه در همه مراحل رشدی نسبت به آلودگی با قارچ بیمارگر حساسیت نشان می‌دهد (Cai et al., 2009). جنس *Colletotrichum* متعلق به شاخه Ascomycota، زیرشاخه Pezizomycotina، رده Sordariomycetes، راسته Glomerellales و خانواده Glomerellaceae می‌باشد. به منظور شناسایی گونه‌های مختلف *Colletotrichum*، خصوصیات ریخت‌شناسی مانند اندازه و شکل کبندی، وجود خار و چنگک، اسکروت، آسروول، فرم جنسی و همچنین رنگ پرگنه و میزان رشد آن استفاده می‌شود (Sutton, 1992). روش‌های مختلفی برای مدیریت بیماری آنتراکنوز در مزرعه و گلخانه انجام شده که می‌توان به روش‌های زراعی، کاربرد سموم شیمیایی و ارقام مقاوم اشاره کرد (Karimi et al., 2017). از آنجا که کاربرد بیش از حد قارچ‌کش‌های شیمیایی سبب بروز آلودگی‌های زیست‌محیطی و بروز مقاومت در عوامل بیمارگر می‌گردد، کاربرد روش‌های جایگزین بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند که یکی از این روش‌ها، کنترل زیستی می‌باشد. کاربرد میکروارگانسیم‌هایی که باعث سرکوب عوامل بیمارگر می‌شوند به صورت مستقیم (پارازیتسم، آنتی‌بیوز، تولید متابولیت‌های سلولی) و غیر مستقیم (رقابت بر سر مکان و مواد غذایی) از فعالیت عوامل بیمارگر گیاهی جلوگیری می‌کنند (Pal & Gardener, 2006). اندوفیت‌ها به دلیل اینکه بافت‌های داخلی گیاه را کلونیزه کرده و کمتر تحت تاثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند در مقایسه با سایر عوامل بیوکنترول دارای مزایای بیشتری می‌باشند (Collinge et al., 2019). اندوفیت‌ها می‌توانند از طریق بذر، ریشه و زخم‌های ایجاد شده به گیاه وارد و به صورت مستقیم یا غیرمستقیم از پیشرفت بیمارگرهای گیاهی جلوگیری کنند. همچنین این میکروارگانسیم‌ها با افزایش حلالیت فسفر، تولید اسید ایندول استیک و سیدروفور باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند (Ryan et al., 2008; Chebotar et al., 2015). هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و شناسایی

تشخیص مولکولی باکتری‌های اندوفیت

استخراج DNA

پس از کشت جدایه‌های باکتری در محیط (NB) Nutrient broth، سانتریفوژ به مدت پنج دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام و به رسوب یک میلی‌لیتر بافر استخراج (100mM Tris-HCL pH 8, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA pH 8, CTAB 3% و ۱۰ میکرولیتر آنزیم لایزوزیم اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس سه میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر نمونه اضافه و به حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس منتقل گردید. به هر نمونه کلروفرم/ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام و مرحله قبل تکرار شد. سپس به هر نمونه ایزوپروپانول سرد اضافه و در فریزر -۲۰- نگهداری شد. پس از آن با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و پس از حذف اتانول، با آب مقطر دیونیزه سترون رقیق و در فریزر -۲۰- قرار داده شد (Murray & Thompson, 1980).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های اندوفیت از آغازگرهای عمومی ژن *rDNA* *J6S*، (۳'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG FD2 (۵'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT RP1 (۵'-ATCGTCATGTGCTTGAG-۳') و *ItuD1r* (۵'-ATCGTCATGTGCTTGAG-۳') با طول قطعه تکثیری ۶۴۷ جفت بازی استفاده گردید. واسرشت سازی اولیه پنج دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال یک دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گردید (Gond et al., 2015). ژن *srfAA* با آغازگرهای (۳'-CCACTCAAACGGATAATCCTGA SRFAR (۵'-TCGGGACAGGAAGACATCAT و SRFAR با طول قطعه تکثیری ۲۰۱ جفت بازی تکثیر و چرخه حرارتی به صورت واسرشت سازی اولیه چهار دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ چرخه شامل واسرشت سازی یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال یک دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس، بسط در ۷۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس

PCR در روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد (Bereswill et al., 1995).

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیکی

محصول واکنش PCR برای هر جدایه توسط ABI3730xl DNA sequencer شرکت ماکروژن کره جنوبی توالی‌یابی شد و هر توالی توسط نرم‌افزار BioEdit ورژن 7.0.5.3 ویرایش و با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی بلاست مقایسه گردید و آنالیزهای فیلوژنتیکی به روش Neighbor Joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 انجام شد (Hall, 1999).

تکثیر ژن‌های اختصاصی لیپوپتید

به منظور بررسی بیان سه ژن *FenD*، *ItuD* و *srfAA* از آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید. آغازگرهای (۳'-TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT FenD1f (۵'-GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC-۳') FenD1r (۵'-GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC-۳') برای ژن *FenD* با طول قطعه تکثیری ۹۶۴ جفت بازی و (۳'-GATGCGATCTCCTTGGATGT-۳') *ItuD1f* (۵'-ATCGTCATGTGCTTGAG-۳') و *ItuD1r* (۵'-ATCGTCATGTGCTTGAG-۳') با طول قطعه تکثیری ۶۴۷ جفت بازی استفاده گردید. واسرشت سازی اولیه پنج دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال یک دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گردید (Gond et al., 2015). ژن *srfAA* با آغازگرهای (۳'-CCACTCAAACGGATAATCCTGA SRFAR (۵'-TCGGGACAGGAAGACATCAT و SRFAR با طول قطعه تکثیری ۲۰۱ جفت بازی تکثیر و چرخه حرارتی به صورت واسرشت سازی اولیه چهار دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ چرخه شامل واسرشت سازی یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال یک دقیقه در ۵۵ درجه سلسیوس، بسط در ۷۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس

در ۲۵۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام و مقدار جیبرلین با در نظر گرفتن منحنی استاندارد محاسبه گردید (Holbrook *et al.*, 1961).

ارزیابی تولید آنزیم حل کننده فسفات

توانایی تولید آنزیم حل کننده فسفات، توسط محیط کشت Pikovskaya حاوی $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ارزیابی و پس از گذشت هفت روز، تشکیل هاله شفاف اطراف کلونی‌های باکتری بررسی شد (Dias *et al.*, 2009).

ارزیابی توانایی تولید سیدروفور

محیط کشت CAS-agar با اضافه کردن CAS به ۱۰ میلی‌لیتر محلول $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ یک میلی‌مولار اسیدی تهیه و به آن ۴۰ میلی‌لیتر محلول HDTMA اضافه شد و اتوکلاو گردید. همچنین محیط کشت LB با اسیدیته ۶/۸ تهیه و اتوکلاو شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول CAS-HDTMA با ۹۰۰ میلی‌لیتر محیط LB در زیر هود مخلوط و در پتری‌ها، نیمی محیط کشت باکتری و نیمی محیط آماده شده CAS-HDTMA مخلوط شده با محیط LB ریخته شد و سویه‌های اندوفیت به صورت خطی در مرز بین دو محیط، کشت گردید. سپس تشکیل هاله‌ی رنگی در محیط کشت بررسی گردید (Schwyn & Neilands, 1987; Loudon *et al.*, 2011; Arora and Verma, 2017).

ارزیابی توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها

تولید سیانید هیدروژن

سویه‌های اندوفیت بر روی محیط NA کشت و در درب پتری‌ها کاغذ صافی سترون آغشته با محلول ۲٪ Na_2CO_3 و ۵٪ Picric acid قرار داده شد و محکم با پارافیلیم پوشانده گردید. پس از گذشت هفت روز تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی شد (Alstrom & Burns, 1989).

تولید آنزیم پروتاز

محیط کشت اسکیم میلک ۳٪ سترون شده به روش تندیازسیون تهیه و سویه‌های اندوفیت به صورت نقطه‌ای

در نظر گرفته شد (Mora *et al.*, 2011). کیفیت محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد.

ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های اندوفیت

به منظور بررسی خصوصیات بیوشیمیایی هر جدایه، آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرام، کاتالاز، فسفاتاز، اکسیداز، لپاز، اوره‌آز، مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته، ذوب ژلاتین، تولید سولفید هیدروژن، تولید گاز از گلوکز، احیای نیترات و آزمایش اکسیداسیون و احیاء انجام شد (Schaad *et al.*, 2001).

ارزیابی توانایی تولید ترکیبات محرک رشد گیاه

توسط سویه‌های اندوفیت

ارزیابی تولید اسید اندول استیک

سویه‌های اندوفیت در محیط (Luria-Bertani) LB با ۰/۲ حجمی ال-تریپتوفان کشت و به مدت ده روز بر روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی قرار داده شدند. سپس در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ و به دو میلی‌لیتر از فاز رویی، چهار میلی‌لیتر معرف Salkowski اضافه شد و ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری گردید. پس از بررسی تغییر رنگ ایجاد شده در هر سویه، ضریب جذب در ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری مدل (Analytik jena, Germany) اندازه‌گیری و پس از مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت هورمون در هر نمونه محاسبه گردید (Ben Abdallah *et al.*, 2016).

ارزیابی تولید جیبرلین

سویه‌های اندوفیت در محیط (Sucrose) Jensen broth ۲۰ گرم، K_2HPO_4 ۱ گرم، MgSO_4 ۰/۵ گرم، NaCl ۰/۵ گرم، FeSO_4 ۰/۱ گرم، Na_2MoO_4 ۰/۰۰۵ گرم و CaCO_3 ۲ گرم) کشت و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه بر روی شیکر به مدت هفت روز قرار داده شد. سپس سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام و پس از حذف رسوب، اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار اضافه گردید. سپس با اتیل استات شستشو و با بافر فسفات مخلوط شد. ارزیابی ضریب جذب

برای هر سویه، یک دیسک پنج میلی متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در یک طرف پتری حاوی محیط Potato dextrose agar (PDA) قرار داده شد و در طرف دیگر سویه اندوفیت به صورت خطی کشت شد. در پتری شاهد دیسک قارچ به تنهایی کشت گردید. پتری‌ها در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز، شعاع پرگنه قارچ در تیمار و شاهد اندازه‌گیری و مقایسه شد. درصد بازدارندگی هر سویه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moreira et al., 2014).

$$IP = (A - B/A) \times 100$$

IP: درصد بازدارندگی

A: میانگین شعاع پرگنه قارچ در شاهد

B: میانگین شعاع پرگنه قارچ در تیمار

ارزیابی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های فرار تولید شده توسط سویه‌های اندوفیت بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر

به این منظور، یک دیسک پنج میلی متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز پتری‌های حاوی محیط PDA کشت و در شرایط سترون به صورت وارونه روی پتری‌های باکتریایی کشت شده روی محیط NA قرار داده شد و با پارافیلیم پوشانده گردید. در تیمار شاهد از محیط کشت بدون تلقیح باکتری استفاده شد. پتری‌ها در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز، شعاع پرگنه قارچ در تیمار و شاهد اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی طبق فرمول ذکر شده در بخش ارزیابی اثرات ضد قارچی سویه‌های بیمارگر با روش کشت متقابل، محاسبه گردید (Gao et al., 2017).

ارزیابی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های خارج سلولی تولید شده توسط سویه‌های اندوفیت بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر

سویه‌های اندوفیت در ۴۵ میلی لیتر محیط مایع سترون کشت و بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام و مایع رویی از فیلتر

کشت و به مدت هفت روز در دمای 26 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از آن ایجاد هاله شفاف در اطراف کلونی-های باکتریایی ارزیابی گردید (Tiru et al., 2013).

تولید آنزیم کیتیناز

به این منظور، سویه‌های باکتریایی بر روی محیط حاوی کلوییدال کیتین ۵ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۲ گرم، NaCl ۰/۱ گرم، آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطر به صورت نقطه‌ای کشت شد و پس از چهار روز، ایجاد هاله شفاف اطراف کلونی با محلول لوگول ارزیابی شد (Shanmugaiah et al., 2008).

تولید آنزیم پکتیناز

پودر پکتین از میوه سیب استحصال گردید (Giovanetti Canteri et al., 2005). سویه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای روی محیط Vincent agar حاوی Sucrose ۱ گرم، KNO_3 ۰/۶ گرم، KH_2PO_4 ۱ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۲۵ گرم، $CaCl_2$ ۰/۱ گرم، $NaNO_3$ ۲ گرم، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، KCl ۰/۵ گرم، عصاره مخمر یک گرم، پکتین ۱۰ گرم و آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطر کشت شدند. پس از گذشت چهار روز ایجاد هاله شفاف توسط محلول لوگول ارزیابی گردید (Aaisha & Barate, 2016).

واکنش فوق حساسیت

به این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه با غلظت 10^8 سلول در هر میلی لیتر آب مقطر سترون تهیه و با سرنگ به برگ‌های گیاهچه‌های سه ماهه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) تلقیح و نتایج بعد از گذشت ۹۶ ساعت مشاهده گردید (Ben Abdallah et al., 2016).

بررسی توانایی کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاه ارزیابی اثرات ضد قارچی سویه‌های اندوفیت با روش کشت متقابل

سترون خشک گردید و برای هر تیمار، جداگانه در سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت پنج دقیقه غوطه‌ور شد. سپس میوه‌ها در بسته‌های سترون قرار داده شد و در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب بر روی هر میوه که با سوزن سترون خراش داده شد، تلقیح و مجدداً در بسته‌های خود قرار داده شدند. سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر به تنهایی در تیمار شاهد مثبت به کار برده شد و در تیمار شاهد منفی آب مقطر سترون به میوه‌ها تلقیح گردید (Huang et al., 2011). پس از گذشت پنج روز، با احتساب شعاع و ارتفاع هر میوه، مساحت سطح آلوده نسبت به سطح سالم توسط نرم‌فزار اتوکد ارزیابی و شدت بیماری توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$DS = A/H \times 2\pi r$$

DS: شدت بیماری

A: سطح آلوده

H: ارتفاع میوه

r: شعاع میوه

ارزیابی توانایی کنترل زیستی در شرایط گلخانه

در این آزمون از دو روش خیساندن خاک (Soil drenching) و اسپری کردن استفاده شد. گیاهچه‌های پنج هفته‌ای توت‌فرنگی رقم پاروس در کیسه‌های پلاستیکی کشت شدند. در روش خیساندن خاک 25 میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر سویه اندوفیت با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب در پای ریشه تلقیح شد. در روش اسپری، پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون هر سویه اندوفیت با غلظت ذکر شده بر روی اندام‌های هوایی اسپری شد و گلدان‌ها در شرایط گلخانه در شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب بر روی اندام‌های هوایی گیاهچه‌ها اسپری شد. در تیمار شاهد مثبت سوسپانسیون قارچ بیمارگر به تنهایی و

سرنگی قطر 0.22 میکرون ساخت شرکت Millipore تحت شرایط سترون عبور داده شد. سپس یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز پتری‌های سه بخشی قرار داده شد. سپس یک چاهک پنج میلی‌متری در فاصله 25 میلی‌متری از دیسک قارچ، ایجاد و 150 میکرولیتر از عصاره‌ی فیلتر شده هر سویه در هر چاهک ریخته شد. در تیمار شاهد از محیط کشت تلقیح نشده در چاهک استفاده شد. پتری‌ها در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز شعاع پرگنه در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی طبق فرمول ذکر شده در بخش ارزیابی اثرات ضد قارچی سویه‌های بیمارگر با روش کشت متقابل محاسبه گردید (Jangir et al., 2018).

ارزیابی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های خارج سلولی تولید شده توسط سویه‌های باکتریایی بر جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر

یک میلی‌لیتر از متابولیت‌های خارج سلولی فیلتر شده با 200 میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب در محیط (PDB) Potato dextrose broth مخلوط و روی شیکر با سرعت 120 دور در دقیقه قرار داده شد. در تیمار شاهد از سوسپانسیون اسپور بدون متابولیت استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان جوانه‌زنی، توسط میکروسکوپ نوری بررسی و درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه شد (Mohammadi et al., 2017; Saechow et al., 2018).

$$IP = (A - B/A) \times 100$$

IP: درصد بازدارندگی

A: تعداد اسپور جوانه‌زده در شاهد

B: تعداد اسپور جوانه‌زده در تیمار

بررسی توانایی کنترل زیستی در شرایط درون شیشه‌ای

به این منظور ابتدا میوه‌های توت‌فرنگی سالم و هم‌اندازه انتخاب و جهت ضدعفونی سطحی به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ قرار داده شد و پس از آن سه بار با آب مقطر سترون شستشو انجام شد. میوه‌ها بر روی کاغذ صافی

دسترسی MH161591 و سویه LN11 با شماره دسترسی MH161584 در بانک ژن ثبت شدند. نتایج ارزیابی توانایی تولید لیپوپتیدهای فنجاسین، ایتورین و سورفکتین نشان داد که لیپوپتید فنجاسین فقط در سویه DM6 تولید شده، ایتورین در هیچ یک از سویه‌ها و سورفکتین در همه سویه‌ها تولید می‌شود (شکل ۱).

ارزیابی تولید ترکیبات محرک رشد گیاه توسط سویه‌های باکتریایی

توانایی تولید هورمون‌های گیاهی اسید ایندول استیک و جیبرلین در هر چهار سویه مشاهده گردید ولی توانایی تولید هر دو هورمون در سویه LN11 بیشتر بود. هر چهار سویه اندوفیت قادر به حلالیت فسفات بودند. همچنین توانایی تولید سیدروفور در هر چهار سویه مشاهده گردید و این توانایی در سویه SN3 بیشتر بود. نتایج نشان داد که هر چهار سویه باکتریایی قادر به تثبیت ازت می‌باشند (جدول ۱).

ارزیابی تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها

نتایج نشان داد که هیچ یک از سویه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نمی‌باشند ولیکن، توانایی تولید آنزیم‌های پروتاز، کیتیناز و پکتیناز در هر چهار سویه مشاهده شد (جدول ۱).

آزمون فوق حساسیت

آزمون فوق حساسیت بر روی گیاهچه‌های توتون پس از ۹۶ ساعت، حاکی از آن بود که هیچ یک از چهار سویه باکتریایی هیچ علائم نکروزی را ایجاد نکردند در صورتی که در شاهد مثبت پس از گذشت ۲۴ ساعت علائم نکروز مثبت و مشاهده گردید (جدول ۱).

ارزیابی کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاه

ارزیابی توانایی سویه‌های اندوفیت در آزمون کشت متقابل نشان داد که هر چهار سویه قادر به ممانعت از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت آن‌ها با شاهد معنی‌دار می‌باشد. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در سویه MarG19 ۶۴/۰۴٪، در سویه SN3 ۶۰/۵۹٪، در سویه DM6 ۶۱/۵۷٪ و در سویه LN11 ۵۴/۱۸٪ محاسبه شد. بررسی توانایی سویه‌های اندوفیت در تولید ترکیبات خارج

در تیمار شاهد منفی آب مقطر سترون استفاده گردید (Freeman et al., 2001; Rakotoniriana et al., 2013).

ارزیابی شاخص‌های بیماری روی دمبرگ به روش (1980) Delp & Milholand بعد از گذشت ۶۰ روز به صورت زیر انجام شد.

الف) دمبرگ سالم بدون زخم = ۰

ب) علائم روی دمبرگ با اندازه کمتر از سه میلیمتر = ۱

ج) علائم روی دمبرگ با اندازه ۱۰-۳ میلی‌متر = ۲

د) علائم روی دمبرگ با اندازه ۲۰-۱۰/۱ میلی‌متر = ۳

ن) علائم روی دمبرگ با اندازه بیشتر از ۲۰ میلی‌متر = ۴

ه) دمبرگ به طور کامل نکروزه شده و گیاه از بین می‌رود = ۵

درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$IP = (A - B/A) \times 100$$

IP: درصد بازدارندگی

A: شاخص بیماری در شاهد

B: شاخص بیماری در تیمار

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت

در این تحقیق سویه‌های MarG19 از دمبرگ، SN3 از برگ، DM6 و LN11 از استولون گیاهچه‌های سالم مزارع توت‌فرنگی شهرستان‌های مریوان و کامیاران استان کردستان جداسازی شد. شناسایی سویه‌های اندوفیت توسط آغازگرهای FD2 و RP1 انجام و قطعه ژنومی به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر گردید. پس از انجام توالی-یابی، مقایسه‌ی توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن توسط نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI، نشان داد که سویه‌های اندوفیت با جنس *Bacillus* مشابه دارند. این جنس به شاخه *Firmicutes*، رده *Bacilli*، راسته *Bacillales*، خانواده *Bacillaceae* متعلق بوده که اعضای این خانواده گرام مثبت، میله‌ای شکل با اشکال مختلف کلونی در بین گونه‌ها می‌باشند. این باکتری‌ها، کاتالاز مثبت بوده و قادر به تولید اسپور هستند (جدول ۱). سویه MarG19 با شماره دسترسی MH161583، سویه SN3 با شماره دسترسی MK392030، سویه DM6 با شماره

ارزیابی کنترل زیستی در شرایط درون شیشه و گلخانه

بررسی توانایی سویه‌های اندوفیت در ممانعت از شدت بیماری‌زایی قارچ عامل آنتراکنوز روی میوه نشان داد که هر چهار سویه سبب جلوگیری از شدت بروز علائم بیماری شده که این کاهش در هر چهار سویه نسبت به شاهد معنی‌دار بود. درصد بازدارندگی از شدت بیماری در سویه MarG19 ۷۱/۱۹٪، در سویه SN3 ۷۶/۱۵٪، در سویه DM6 ۸۸/۰۷٪ و در سویه LN11 ۸۵/۴۳٪ ارزیابی گردید (جدول ۳). همچنین ارزیابی تاثیر سویه‌های باکتریایی بر کاهش شدت علائم بیماری در شرایط گلخانه نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی در سویه‌های MarG19 و DM6 در روش خیساندن خاک (۷۷/۷۷٪) و در سویه SN3 در روش اسپری (۱۰۰٪) محاسبه شد (جدول ۴).

سلولی ضدقارچی نشان داد که این ترکیبات باعث کاهش معنی‌دار رشد پرگنه قارچ بیمارگر شده و درصد بازدارندگی در سویه MarG19 ۷۹/۰۲٪، در سویه SN3 ۴۱/۹۵٪، در سویه DM6 ۳۲/۸۶٪ و در سویه LN11 ۳۴/۹۶٪ ارزیابی شد. ترکیبات فرار هر چهار سویه به صورت جزئی باعث کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر شد که این بازدارندگی برای سویه MarG19 ۷/۷۳٪، در سویه SN3 ۱۶/۶۶٪، در سویه DM6 ۱۹/۶۴٪ و در سویه LN11 ۱۱/۹٪ ارزیابی گردید (جدول ۲). ترکیبات خارج سلولی ضدقارچی هر چهار سویه با درصد بازدارندگی در سویه MarG19 ۸۶/۳۱٪، در سویه SN3 ۷۵/۳۳٪، در سویه DM6 ۴۱/۱۰٪ و در سویه LN11 ۷۶/۷۳٪ اثر معنی‌داری را بر روی جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر داشتند (جدول ۳).

جدول ۱- ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه‌های باکتریایی

Table 1. Biochemical characteristics of bacterial strains

Taxonomic/Functional traits	MarG19	SN3	DM6	LN11
Secondary metabolites and enzymes				
Protease	+++	++	+++	++
Chitinase	++	+++	+++	+++
Pectinase	+++	++	++	++
HCN	-	-	-	-
Lipase	+	+	+	+
Plant growth promoting characters				
Indole-3-acetic acid (IAA)	+	++	+	+++
Gibberellin	++	++	+	+++
Phosphate solubilization	++	++	+	+
Siderophore production	+++	++		
Nitrogen fixation	+	+	+	+
General features				
Gram test	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
Simon citrate	+	-	+	-
Starch hydrolysis	+++	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+
Phosphatase	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-
Gas from glucose agar	-	-	-	-
Urease	+	++	-	-
Oxidative fermentative (OF)	+	+	+	+
Hypersensitive Response Test	-	-	-	-

+ نشان‌دهنده انجام فعالیت و - نشان‌دهنده عدم فعالیت. +، ++ و +++ به ترتیب نشان‌دهنده فعالیت کم، زیاد و خیلی زیاد

+ represent production, - represent no production; +, ++ and +++: isolates showing low, high and very high activity respectively.

جدول ۲- تاثیر بازدارندگی سویه‌های باکتریایی بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر پس از هفت روز در شرایط آزمایشگاه.

Table 2. Inhibitory effect of bacterial strains on mycelia growth of *C. nymphaeae* under *in vitro* tests after 7 days

Treatments	Dual culture		Volatile metabolites		Non-volatile metabolites	
	Colony radius (mm)	Biocontrol efficacy (%)	Colony radius (mm)	Biocontrol efficacy (%)	Colony radius (mm)	Biocontrol efficacy (%)
MarG19	1.46± 0.15c	64.04	3.1 ± 0.60 ab	7.73	0.3 ± 0.30 c	79.02
SN3	1.6± 0.10bc	60.59	2.8 ± 0.26 ab	16.66	0.83 ± 0.05 b	41.95
DM6	1.56 ± 0.11bc	61.57	2.7 ± 0.00 b	19.64	0.96 ± 0.05 b	32.86
LN11	1.86 ± 0.05 b	54.18	2.96 ± 0.41ab	11.90	0.93 ± 0.05 b	34.96
Control	4.06 ± 0.30a	–	3.36 ± 0.15 a	–	1.43 ± 0.20 a	–

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

Mean followed by different letters within the column represents significant differences according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Data are mean of four replicates with ± standard deviation (SD).

جدول ۳- تاثیر سویه‌های باکتریایی بر کاهش شدت بیماری آنتراکنوز پس از پنج روز، در شرایط درون شیشه و تاثیر ترکیبات خارج سلولی سویه‌های باکتریایی بر جوانه زنی اسپور قارچ بیمارگر.

Table 3. Effect of bacterial strains on fruit decay development *in vivo* after 5 days and Efficacy of the cell-free-culture filtrates of bacterial strains on conidial germination of *C. nymphaeae*.

Treatments	Living cell		Conidial germination	
	Disease severity	Biocontrol efficacy (%)	Germinated conidia	Biocontrol efficacy (%)
MarG19	0.087± 0.01 b	71.19	3.33± 1.52 c	86.31
SN3	0.072± 0.02bc	76.15	6.00± 1.00 c	75.33
DM6	0.036± 0.01 c	88.07	14.33± 1.15 b	41.10
LN11	0.044± 0.003bc	85.43	5.66± 1.15 c	76.73
Control	0.302± 0.06a	–	24.33± 7.50a	–

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

Mean followed by different letters within the column represents significant differences according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Data are mean of four replicates with ± standard deviation (SD).

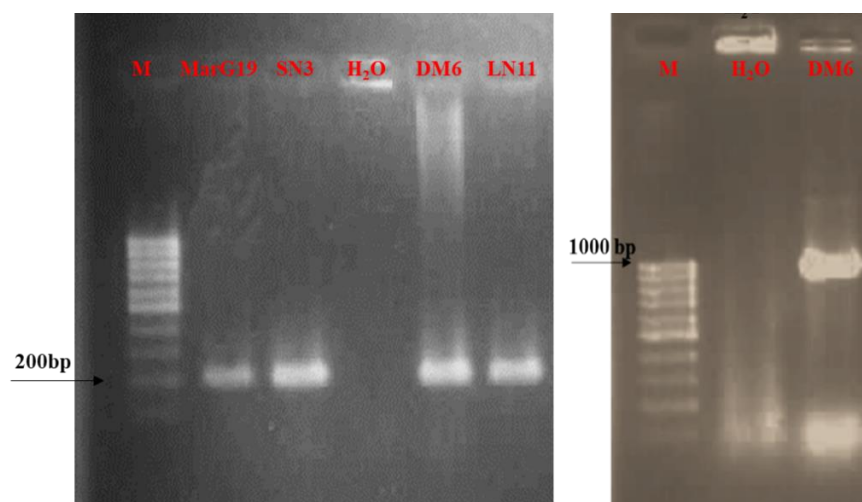
جدول ۴- تاثیر سویه‌های باکتریایی بر شدت بیماری آنتراکنوز پس از ۶۰ روز در شرایط گلخانه

Table 4. Effect of bacterial strains on disease severity of strawberry anthracnose in greenhouse condition, 60 days after inoculation

Treatments	Soil drench		Plant inoculation	
	Disease severity	Biocontrol efficacy (%)	Disease severity	Biocontrol efficacy (%)
MarG19	1.0± 0.81 b	77.77	2.0± 0.81 b	55.55
SN3	1.25 ± 0.5 b	72.22	0.00± 0.00 c	100.00
DM6	1.0± 0.81 b	77.77	1.5± 0.57 b	66.66
LN11	1.25± 0.95 b	72.22	0.25± 0.50 c	94.44
Control	4.50 ± 0.57 a	–	4.50 ± 0.57 a	–

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دار می‌باشند ($P \leq 0.05$).

Mean followed by different letters within the column represents significant differences according to the LSD test ($P \leq 0.05$). Data are mean of four replicates with ± standard deviation (SD).



شکل ۱- لیپوپتیدهای سورفکتین و فنجایسین. قطعه ۲۰۱ و ۹۶۴ جفت بازی در هر سویه به ترتیب نشان‌دهنده وجود ژن اختصاصی لیپوپتید سورفکتین و فنجایسین می‌باشند.

(M) 1 Kb DNA ladder

Fig 1. Surfactin and fenjycine lipopeptides. The 201 and 964 bp fragments in each strains indicates the presence of a surfactin and fenjycine-specific lipopeptide genes, respectively. 1 Kb DNA ladder (M).

بحث

سبب کاهش خسارات ناشی از عوامل بیمارگر گیاهی شوند (Duffy & Défago, 1999; Whipps, 2001; Bhattacharyya & Jha, 2012). در این پژوهش توانایی چهار سویه باکتری *Bacillus spp.* جداسازی شده از گیاهان سالم توت‌فرنگی در ممانعت از رشد و ایجاد علائم قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه، درون شیشه و گلخانه بررسی گردید.

نتایج ارزیابی‌ها در آزمون‌های کشت متقابل، تاثیر ترکیبات فرار و خارج سلولی بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر و همچنین اثرات متابولیت‌های خارج سلولی بر جوانه‌زنی اسپور قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه موید آن است که هر چهار سویه اندوفیت تاثیر بازدارنده بر رشد قارچ بیمارگر داشته و سبب کاهش قطر پرگنه در مقایسه با شاهد می‌شوند. همچنین ترکیبات خارج سلولی هر چهار سویه سبب کاهش جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر می‌گردند. مطالعات نشان داد که ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، تولید سیدروفور و ترکیبات فرار و خارج سلولی ضد قارچی می‌توانند سبب کاهش رشد قارچ‌های بیمارگر شوند (Ben Abdallah *et al.*, 2016).

بیماری آنتراکنوز توت‌فرنگی توسط گونه‌های مختلف قارچ *Colletotrichum spp.* ایجاد شده و به عنوان یکی از رایج‌ترین بیماری‌های این محصول مطرح می‌باشد. گونه مرکب *C. acutatum* عامل اصلی پراکنش بیماری در سراسر جهان بوده و همین گونه نیز در مزارع توت‌فرنگی استان کردستان گزارش شده است (Karimi *et al.*, 2017). این گونه مرکب شامل ۳۱ گونه است که شش گونه، بیماری آنتراکنوز را روی توت‌فرنگی ایجاد می‌کنند. در این تحقیق گونه *C. nymphaeae* از کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انتخاب شد که طبق تحقیقات قبلی این گونه دارای بالاترین میزان خسارت اقتصادی روی میوه در استان می‌باشد (Karimi *et al.*, 2017). کاربرد باکتری‌های مفید در حفاظت محصول به دلیل کاهش اثرات مخرب ناشی از مصرف سموم مورد توجه بوده که این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از طریق رقابت بر سر غذا و مکان، کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی، تولید هورمون‌های گیاهی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و سیدروفورها، ترشح متابولیت‌های ضد قارچی و تحریک مقاومت سیستمیک

می‌تواند سیستم دفاعی گیاه را تحریک کنند (Ongena *et al.*, 2007; Ongena & Jacques, 2008). نتایج این تحقیق نشان داد که فقط سویه DM6 لیپوپتید فنجاسین تولید و همه‌ی سویه‌ها قادر به تولید لیپوپتید سورفکتین بودند. ایتورین ترشح شده توسط *B. subtilis* باعث کاهش بیماری‌زایی *Rhizoctonia solani* روی گوجه‌فرنگی می‌گردد (Asaka & Shoda, 1996). تحقیقات نشان داد که *B. subtilis* با تولید سورفکتین، ایتورین و فنجاسین باعث جلوگیری از ایجاد بیماری روی میوه سبب در اثر *Botrytis cinerea* می‌گردد (Ongena *et al.*, 2007).

هورمون‌های گیاهی با منشاء میکروبی سبب افزایش رشد و تحمل تنش‌های محیطی در گیاه میزبان شده و همچنین در ایجاد مقاومت به عوامل بیمارگر نقش دارند (Yasmin *et al.*, 2017). هورمون اسید ایندول استیک با افزایش تکثیر سلولی و رشد طولی و توسعه ریشه، سبب افزایش مقاومت میزبان به آلودگی‌های ناشی از عوامل بیمارگر می‌شود (Yu *et al.*, 2009; González-Lamothe *et al.*, 2012). همچنین هورمون جیبرلین نیز باعث افزایش سطح و تعداد ریشه می‌گردد (Bhattacharyya & Jha, 2012). عوامل کنترل زیستی با تثبیت ازت و حلالیت فسفات، میزان دسترسی گیاه به مواد غذایی را افزایش می‌دهند (Alori *et al.*, 2017). توانایی تولید هورمون‌های اسید ایندول استیک و جیبرلین، تثبیت ازت و حلالیت فسفات در هر چهار سویه اندوفیت در این تحقیق ارزیابی گردید.

یکی دیگر از سازوکارهای کنترل زیستی تولید ترکیبات فرار می‌باشد. ترکیبات فرار تولید شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها در جلوگیری از بیماری‌های گیاهی نقش مهمی دارند (Schnabel & Mercier, 2006; Huang *et al.*, 2011). ترکیبات فرار تولید شده توسط باکتری‌های اندوفیت خاصیت ضد قارچی داشته و سبب تحریک مقاومت گیاه و ممانعت از رشد پرگنه و جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر می‌شوند (Monte, 2001). *Paenibacillus polymyxa* با تولید ترکیبات فرار باعث بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* می‌گردد (Raza *et al.*,

در این تحقیق هر چهار سویه قادر به تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولی شامل پروتاز، کیتیناز و پکتیناز بودند که این آنزیم‌ها توانایی کنترل زیستی در برابر قارچ‌های بیمارگر را دارند. ترشح آنزیم‌های پروتاز و پکتیناز در تعدادی از جنس‌های باکتریایی شامل *Burkholderia*، *Bacillus*، *Serratia*، *Pseudomonas*، *Acinetobacter*، *Enterobacter* و *Stenotrophomonas* وجود دارند که سبب تجزیه دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر می‌شوند (Ben Abdallah *et al.*, 2016). برخی از استرین‌های گونه *B. atrophaeus* با ترشح آنزیم‌های پروتاز و کیتیناز و همچنین تولید سیدروفور از رشد پرگنه قارچ‌های *C. acutatum* و *C. gloeosporioides* جلوگیری می‌کنند (Han *et al.*, 2015). تولید آنزیم پکتیناز نیز در تسهیل کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی نقش داشته و با تجزیه الیگوساکاریدها و قطعات پکتیکی فعال دیواره سلولی گیاه باعث تحریک مقاومت دفاعی در میزبان گیاهی می‌شود (Davis *et al.*, 1984). در مطالعه‌ای نشان داده شد که *Penicillium oxalicum* با تولید آنزیم پکتیناز سبب تحریک مقاومت موضعی را در برابر *Cladosporium cucumerinum* در خیار می‌گردد (Peng *et al.*, 2004).

توانایی تولید سیدروفور در بسیاری از باکتری‌ها به عنوان یک ویژگی مهم در کنترل بیماری‌های گیاهی می‌باشد. هر چهار سویه در این تحقیق قادر به تولید سیدروفور بودند. سیدروفور در شرایط کمبود آهن تولید و با افزایش جذب آهن باعث از دسترس خارج کردن آن برای عامل بیمارگر و گرسنگی آن می‌شود (Eisendle *et al.*, 2004). تحقیقات نشان داد که *Pseudomonas putida* با تولید سیدروفور باعث جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* می‌شود (Kloepper *et al.*, 1980). سیدروفور تولید شده توسط *Bacillus subtilis* نیز توانایی جلوگیری از بروز بیماری‌های ایجاد شده توسط *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* و *Macrophomina phaseolina* در لوبیا دارد (Patil *et al.*, 2014).

لیپوپتیدها ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های مختلف جنس باسیلوس بوده که دارای خاصیت ضد قارچی بوده و

تجزیه کننده‌ی دیواره سلولی قارچ بیمارگر و تولید ترکیبات ضد قارچی محتمل تر می‌باشد.

نتایج حاصل از تاثیر سویه‌های باکتریایی اندوفیت بر بیماری آنتراکنوز در گلخانه به دو روش اسپری و خیساندن خاک نشان داد که حضور این باکتری‌ها در روی اندام‌های هوایی و اطراف ریشه، از گیاه میزبان در برابر حمله‌ی قارچ بیمارگر محافظت می‌کند که می‌تواند به سبب کلونیزاسیون گیاه و اشغال نیچ اکولوژیکی، ایجاد رقابت بر سر مواد غذایی، تولید ترکیبات ضدقارچی مانند آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره سلولی قارچ بیمارگر، تولید سیدروفور و همچنین ممکن است تحریک مقاومت سیستمیک در میزبان گیاهی باشد (Mates et al., 2019). با توجه به اهمیت کشت توت‌فرنگی در استان کردستان و عدم تاثیر سموم کاربردی و آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف سموم، روش‌های جایگزین مانند کنترل زیستی ضروری بوده و ارزیابی تاثیر این سویه‌های باکتریایی در شرایط مزرعه پیشنهاد می‌گردد.

منابع مالی

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه کردستان انجام شده است (Grant No: 99/11/25567).

References

- Aaisha, G.A. & Barate, D.L. 2016. Isolation and Identification of Pectinolytic Bacteria from Soil Samples of Akola Region, Indian International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(1): 514–524.
- Alstrom, S. & Burns, R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, 7(3): 232–238.
- Alori, E.T., Glick, B.R. & Babalola, O.O. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1–8.
- Arora, N.K. & Verma, M. 2017. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7(381): 1–9.
- Asaka, O. & Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4081–4085.
- Ben Abdallah, R.A., Mejdoub-Trabelsi, B., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddin, H. & Daami-Remadi, M. 2016. Isolation of endophytic bacteria from *Withania somnifera* and assessment of their ability to suppress *Fusarium* wilt disease in tomato and to promote plant growth. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7(352): 1–11.
- Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. & Geider, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): 2636–2642.
- Bhattacharyya, P.N. & Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4: 1327–1350.

(2015). همچنین مطالعات نشان داده است که، ترکیبات فرار تولید شده توسط *B. amyloliquefaciens* سبب کاهش رشد *Ralstonia solanacearum* می‌شود (Raza et al., 2016). تولید ترکیبات فرار در هر چهار سویه مورد بررسی در این تحقیق مثبت ارزیابی شد.

ترکیبات خارج سلولی باکتری‌های اندوفیت خاصیت ضد قارچی داشته و مطالعات نشان می‌دهد که *B. subtilis* با ترشح ترکیبات خارج سلولی سبب کاهش رشد پرگنه قارچ عامل پاخوره‌ی گندم و کاهش رشد و جوانه‌زنی اسپور *Sclerotinia sclerotiorum* در کلزا می‌شوند (Chen et al., 2014). باکتری *Pseudomonas sp.* نیز با تولید ترکیبات خارج سلولی ضدقارچی باعث جلوگیری از رشد گونه‌های *Botryosphaeriaceae* می‌گردد (Wicaksono et al., 2017).

سویه‌های اندوفیت مورد بررسی در این تحقیق قادر به جلوگیری از گسترش علائم بیماری آنتراکنوز در شرایط درون شیشه بوده که می‌تواند به دلایل مختلف از جمله رقابت بر سر منابع غذایی و مکان، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، آنتی‌بیوز و تحریک مقاومت سیستمیک باشد (Carmona-Hernandez et al., 2019). احتمالاً این باکتری‌ها چندین سازوکار همزمان با هم را برای کاهش بیماری به کار برده که در این میان ترشح آنزیم‌های

- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Waller, J., Abang, M.M. & Johnston, P.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers*, 39: 183–204.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J.J., Chiquito-Contreras, R.G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C.R. & Hernandez-Montiel, L.G. 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: *Agronomy Journal*, 9: 1–15.
- Chebotar, V.K., Malfanora, N.V., Scherbakov, A.V., Ahtemova, G.A. & Borisov, A.Y. 2015. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51: 271–277.
- Chen, Y., Gao, X., Chen, Y., Qin, H., Huang, L. & Han, Q. 2014. Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. *Biological Control*, 78: 67–76.
- Collinge, D.B., Jørgensen, H.J., Latz, M.A., Manzotti, A., Ntana, F., Rojas Tayo, E.C. & Jensen, B. 2019. Searching for novel fungal biological control agents for plant disease control among endophytes. pp. 25–51. In: Hodkinson, T.R., Doohan, F.M., Saunders, M.J. & Murphy, B.R. (eds.). *Endophytes for a Growing World*. Cambridge University Press, 444 P.
- Costa, L.E.D.O., Queiroz, M.V.D., Borges, A.C., Moraes, C.A.D. & Araújo, E.F.D. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4): 1562–1575.
- Curry, K.J., Abril, M., Avant, J.B. & Smith, B.J. 2002. Strawberry anthracnose: Histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. *Phytopathology*, 92(10): 1055–1063.
- Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G. & Albersheim, P. 1984. Host-pathogen interactions: XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. *Plant Physiology*, 74(1): 52–60.
- Delp, B. & Milholland, R.D. 1980. Evaluation strawberry plants for resistance to *Colletotrichum fragariae*. *Plant Disease*, 64(12): 1071–1073.
- Dias, A.C.F., Costa, F.E.C., Andreote, F.D., Lacava, P.T., Teixeira, M.A., Assumpcao, L.C., Araujo, W.L., Azevedo, J.L. & Melo, I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 189–195.
- Duffy, B.K. & Défago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2429–2438.
- Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P. & Hass, H. 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cells*, 2: 561–563.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu1, A., Dag1, A., Shafir, S. & Elad, Y. 2001. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 110(4): 361–370.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J. & Zhang, Y. 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105: 27–39.
- Giovanetti Canteri, M.H., Fertoni, H.C.R., Waszczynskyj, N. & Wosiacki, G. 2005. Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2): 259–266.
- Gond, S.K., Bergen, M.S., Torres, M.S. & White, J.F. 2015. Endophytic *Bacillus* spp produce antifungal lipopeptides and induce host defense gene expression in maize. *Microbiological Research*, 17: 79–87.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N. & Bouarab, K. 2012. The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell*, 24: 762–777.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*. 41(41): 95–98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979–c2000.
- Han, J.H., Shim, H., Shin, J.H. & Kim, K.S. 2015. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Plant Pathology Journal*, 31(2): 165–175.
- Holbrook, A.A., Edge, W.J.W. & Bailey, F. 1961. Spectrophotometric method for determination of Gibberellic acid. *Advances in Chemistry*, 28: 159–167.
- Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H. & Huang, H.C. 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7): 859–869.
- Jangir, M., Pathaka, R., Sharma, S. & Sharmab, S. 2018. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123: 60–70.

- Karimi, K., Babai Ahari, A., Arzanlou, M., Amini, J. & Pertot, I. 2017. Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124: 453–466.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. & Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286(5776): 885–886.
- Konczak, I. & Zhang, W. 2004. Anthocyanins—more than nature's colours. *BioMed Research International*, 2004(5): 239–240.
- Louden, B.C., Haarmann, D. & Lynne, A.M. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*, 12(1): 51–53.
- Mates, A.D.P.K., de Carvalho Pontes, N. & de Almeida Halfeld-Vieira, B. 2019. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. *Biological Control*, 137: 104013
- Mohammadi, P., Elif, T., Recep, K. & Senol, K.M. 2017. Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science*, 53(3): 134–143.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, 4(1): 1–4.
- Mora, I., Cabrefiga, J. & Montesinos, E. 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology*, 14(4): 213–223.
- Moreira, R.R., Nesi, C.N. & De Mio, L.L.M. 2014. *Bacillus* spp. and *pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. *Biological Control*, 72: 30–37.
- Murray, M.G. & Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19): 4321–4326.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. & Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4): 1084–1090.
- Ongena, M. & Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3): 115–125.
- Pal, K.K. & Gardener, B.M. 2006. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instructor*, 2: 1117–1142.
- Patil, S., Bheemaraddi, M.C., Shivannavar, C.T. & Gaddad, M.S. 2014. Biocontrol activity of siderophore producing *Bacillus subtilis* CTS–G24 against wilt and dry root rot causing fungi in chickpea. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 7: 63–68.
- Peng, X., Zhang, H., Bai, Z. & Li, B. 2004. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. *Phytoparasitica*, 32(4): 377–387.
- Rakotoniriana, E.F., Rafamantanana, M., Randriamampionona, D., Rabemanantsoa, C., Urveg–Ratsimamanga, S., El Jaziri, M., Munaut, F., Corbisier, A.M., Quetin–Leclercq, J. & Declerck, S. 2013. Study *in vitro* of the impact of endophytic bacteria isolated from *Centella asiatica* on the disease incidence caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(1): 121–133.
- Raza, W., Yuan, J., Ling, N., Huang, Q. & Shen, Q. 2015. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR–2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biological Control*, 80: 89–95.
- Raza, W., Ling, N., Yang, L., Huang, Q. & Shen, Q. 2016. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR–9. *Scientific Reports*, 6: 1–13.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Federation of European Microbiological Societies*, 278: 1–9.
- Saechow, S., Thammasittirong, A., Kittakoop, P., Prachya, S. & Na–Ranong Thammasittirong, S.N.R. 2018. Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(9): 1527–1535.
- Shanmugaiah, V., Mathivanan, N., Balasubramanian, N. & Manoharan, P.T., 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *African Journal of Biotechnology*, 7(15): 2562–2568.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. St. Paul, MN: APS press. 373 P.
- Schnabel, G. & Mercier, J. 2006. Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. *Postharvest Biology and Technology*, 42 (1): 121–123.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47–56.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. pp. 1–26 In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J (eds.). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, UK, 388 P.

- Tiru, M., Muleta, D., Bercha, G. & Adugna, G. 2013. Antagonistic effect of rhizobacteria against coffee wilt disease caused by *Gibberella xylarioides*. *Asian Journal Plant Pathology*, 7(3): 109–122.
- 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.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487–511.
- Wicaksono, W.A., Jones, E.E., Monk, J. & Ridgway, H.J. 2017. Using bacteria endophytes from a New Zealand native medicinal plant for control of grapevine trunk diseases. *Biological Control*, 114: 65–72.
- Yasmin, S., Hafeez, F.Y., Mirza, M.S., Rasul, M., Hafiz, M.I., Arshad, H.M.I., Zubair, M. & Iqbal, M. 2017. Biocontrol of Bacterial Leaf Blight of Rice and Profiling of Secondary Metabolites Produced by Rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1–23.
- Yu, T., Chen, J., Lu, H. & Zheng, X. 2009. Indole-3-acetic acid improves postharvest biological control of blue mold rot of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 99: 258–64.

Investigating the efficiency of four strains of *Bacillus* spp. in biological control of strawberry anthracnose disease**Zahra Alijani¹, Jahanshir Amini²**

1., 2. post-Doctora researcher, Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Corresponding author: Jahanshir Amini, email: jamini@uok.ac.ir

Received: Oct., 18, 2022

9(2) 165–180

Accepted: Mar., 13, 2023

Abstract

Endophytic bacterial strains, isolated from healthy strawberry seedlings (*Fragaria × ananassa*) collected in Kurdistan province and its antifungal activity against *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose was evaluated under *in vitro*, *in vivo*, and greenhouse conditions. Bacterial strains were identified as *Bacillus* spp. using biochemical properties and molecular phylogenetic analysis of the *16S rDNA* gene sequences. The results of biocontrol tests *in vitro* showed that the bacterial strains had an effective antifungal activity against *C. nymphaeae* of strawberry anthracnose. All strains represented *in vitro* antifungal activity against *C. nymphaeae* by dual culture test with (64.04%) in MarG19, (60.59%) in SN3, (61.57%) in DM6 and (54.18%) LN1. As well as, the cell-free-culture filtrates of bacterial strains decreased the mycelial growth and conidial germination of pathogen and inhibition was assayed in MarG19 (79.02%), in SN3 (41.95%), in DM6 (32.86%) and in LN11 (34.96%) on mycelial growth and inhibitory percentage with 86.31% in MarG19, 75.33% in SN3, 41.10% in DM6 and 76.73% in LN11 on conidial germination. Also, volatile compounds (VOCs) partially reduced the mycelium growth of *C. nymphaeae*. The *in vivo* test on fruit was done and decreased disease severity by 71/19% in MarG19, 76/15% in SN3, 88.07% in DM6 and 85.43% in LN11. The biocontrol efficacy under greenhouse conditions was measured using drenching soil and inoculated plants. The highest inhibitory percentage in DM6 and MarG19 was (77.77%) in drenching soil method and in SN3 was (100%) in plant inoculation method.

Keywords: Antifungal compounds, Bacterial endophyte, Biological control, *16S rDNA* gene
