Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(1):75-86

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Isolation and Identification of Soil-Borne Bacteria with the Inhibitory Effect of *Fusarium oxysporum* in Tomato

Maryam Safdarian [1,*], Jamshid Razmjoo[2]

1- Ph.D. Graduated, Zist Farayand Notrika Isfahan Science and Technology Town, Isfahan, Iran.
2- Full Professor, Agriculture faculty, Department of Agronomy and Plant Breeding Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Place of Research: Zist Farayand Notrika Isfahan Science and Technology Town, Isfahan, Iran.

Article Info

Article History:

received 04.08.2023
revised 08.09.2023
accepted 08.24.2023
online 08.24.2023

KeyWords:

Bacteria
Biocontrol
Bacillus
Fusarium oxysporum

*Corresponding author:
E-mail address

*maryam.safdarian7@gmail.com
krazmjoo@gmail.com

Abstract

Introduction: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) is an alternative to chemical pesticides against harmful microorganisms especially soil-borne diseases. Fusarium oxysporum is one of the important pathogenic fungi of tomato wilt that causes serious damage to agricultural products.
Aim: The purpose of this research is to investigate the inhibition of the growth of Fusarium oxysporum with bacteria isolated from soil in laboratory conditions.
Materials and methods: In order to isolate biological inhibitors, isolates were screened based on the ability to auxin and phosphorus solubilization, siderophore production and fungal growth inhibition. Molecular identification of selected isolates was done by 16SrDNA gene amplification. Investigating the ability of bacteria to control the pathogen Fusarium oxysporum. It was done under greenhouse conditions.In this study, to screen successful bacterial isolates, the inhibition of pathogen growth was evaluated in-vitro.
Results: Moreover,. Among the 80 isolates studied, seven isolates had the ability to produce auxin, ten isolates had the ability to P solubility, six isolates had the ability to produce siderophore, and seven isolates had the ability to inhibition pathogen growth. Among the isolates 56 and 83 had the highest amount of auxin production and the P solubility and the fungal growth inhibition. Multiple alignment of the 16SrDNA sequence of two selected bacteria with other 16SrDNA sequences in the NCBI gene bank showed that isolates 56 and 83 with 98 and 99.9 percent similarity belong to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus atrophaeus*, respectively.
Conclusion: Among the isolates, seven isolates in vitro conditions showed a good ability to inhibit the growth of *F. oxysporum*. In greenhouse experiments, all 5 isolates as significantly ($P<0.05$) they controlled the disease, and the most control was related to isolate 56.

Cite this article: Safdarian M*., Razmjoo J. Isolation and Identification of Soil-Borne Bacteria with theInhibitory Effect of *Fusarium oxysporum* in Tomato. Iranian Journal of Biologiacal Sciences. 2023; 18(1):75-86

10.30495/zisti.2023.1983549.1159 DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.6.3
Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

جداسازی و شناسایی باکتریهای خاکزاد با ارزیابی توان مهار زیستی *Fusarium oxysporum* در گوجه فرنگی

مریم صفدریان *[۱]، جمشید رزمجو[۲]

۱- فارغ التحصیل دکتری تخصصی، واحد تحقیق و توسعه، شرکت دانش بنیان زیست فرایند نوتریکا، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات ، دانشکده کشاورزي ، دانشگاه صنعتي اصفهان، ایران

محل انجام تحقیق: واحد تحقیق و توسعه، شرکت دانش بنیان زیست فرایند نوتریکا، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۲/۰۱/۱۹
بازنگری ۱۴۰۲/۰۵/۱۸
پذیرش ۱۴۰۲/۰۶/۰۲
نمایه ۱۴۰۲/۰۶/۰۲

کلمات کلیدی
باکتری
مهارزیستی
Bacillus
Fusarium oxysporum

* نویسنده مسؤل
*maryam.safdarian7@gmail.com
krazmjoo@gmail.com

چکیده

مقدمه: مقدمه: باکتری های ریزوسفری محرک رشد، جایگزینی مناسب برای سموم شیمیایی در کنترل بیمارگرها به‌خصوص بیمارگرهای خاکزاد هستند. ***Fusarium oxysporum*** یکی از قارچ های مهم بیماریزای پژمردگی گوجه فرنگی است که خسارات جدی به محصولات کشاورزی وارد می کند.

هدف: هدف از این پژوهش، بررسی میزان بازدارندگی از رشد قارچ ***Fusarium oxysporum*** با باکتری های جدا شده از خاک در شرایط آزمایشگاه می باشد.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی مهارگرهای زیستی، باکتری ها از لحاظ تولید اکسین، انحلال فسفر، تولید سیدروفور، بازدارندگی رشد قارچ غربال شدند. شناسایی مولکولی جدایه های منتخب توسط تکثیر ژن ۱۶SrDNA انجام شد. بررسی توانایی باکتری ها در کنترل بیمارگر ***Fusarium oxysporum***. در شرایط گلخانه انجام شد.

نتایج: از بین ۸۰ جدایه مورد مطالعه هفت جدایه توانایی تولید اکسین، ده جدایه توانایی انحلال فسفات، شش جدایه توانایی تولید سیدروفور و هفت جدایه توانایی جلوگیری از رشد بیماری‌گر داشتند که از میان آنها جدایه‌های ۵۶۰ و ۸۳ بیشترین میزان تولید اکسین و توانایی حل فسفات و درصد بازدارندگی از رشد قارچ را داشتند. تطابق چندگانه (Multiple alignment) توالی ۱۶SrDNA دو باکتری منتخب، با سایر توالی‌های ۱۶SrDNA موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که جدایه ۵۶ و ۸۳ با ۹۸ و ۹۹/۹ درصد شباهت به ترتیب متعلق به ***Bacillus amyloliquefaciens*** و ***Bacillus atrophaeus*** می‌باشند.

نتیجه‌گیری: از بین جدایه ها، هفت جدایه در شرایط آزمایشگاه توانایی خوبی در بازدارندگی از رشد ***F. oxysporum*** نشان دادند، برای بررسی آزمایش های گلخانه ای انتخاب شدند. در آزمایش های گلخانه ای، هر ۵ جدایه به طور معنی داری (P<۰/۰۵) بیماری را کنترل کردند که بیشترین کنترل کنندگی مربوط به جدایه ۵۶ بود.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : صفدریان م*. رزمجو ج.جداسازی و شناسایی باکتریهای خاکزاد با ارزیابی توان مهار زیستی *Fusarium oxysporum* در گوجه فرنگی. مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸(۱):۷۵-۸۶

DOR 20.1001.1.17354226.1402.18.1.6.3
doi 10.30495/zisti.2023.1983549.1159

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

در سال های اخیر استفاده مکرر از مواد شیمیایی به منظور تولید محصولات کشاورزی، سبب بروز مشکلاتی مانند آلودگی محیط زیست و بروز مقاومت در عوامل بیماری زای گیاهی شده است. علاوه بر این، هزینه بالای استفاده از مواد شیمیایی را نیز باید در نظر گرفت. با توجه به نکات یاد شده، تحقیقات اخیر به سمت جایگزینی این روش با سایر شیوه ها از جمله کنترل بیولوژیک گسترش یافته است. کنترل زیستی به عنوان راهکار جایگزین سموم شیمیایی گوناگون برای کنترل بیماری‌های گیاهی توسعه یافته است. بر خلاف عوامل سنتتیک، موادی که به شکل میکروزیستی از گونه‌های مؤثر گرفته شده‌اند سمیت کمتر داشته، به راحتی قابل تجزیه بوده، و آلرژی‌زایی کمی دارند. این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی‌شوند و نیز ارزان و مناسب برای مصرف در مقیاس صنعتی هستند. با استفاده از کنترل زیستی، خود میکروارگانیسم‌ها، می‌توانند با تولید آنتی‌بیوتیک و یا آنزیم‌های تجزیه کننده به طور مستقیم بر علیه بیماری‌های گیاهی گوناگون به کار روند (۱،۲). گیاه گوجه‌فرنگی با تولید سالانه حدود ۵۰ میلیون تن، جزء محبوب ترین سبزي ها محسوب می گردد که عوامل بیماریزای بسیاري به آن حمله می‌کنند. بیماري پژمردگی گوجه فرنگی در اثر *F. oxysporum f.sp. lycopersici* اولین بار توسط ماسی در سال ۱۸۹۵ در انگلستان گزارش شد و هم اکنون در بیش از۳۲ کشور جهان این بیماري گزارش شده است (۳). علائم بیماري در مراحل مختلف رشدي به صورت زردي یکطرف بوته، قهوه اي شدن آوندها ظاهر می شوند و این انتشار بیماري از طریق بقایاي گوجه فرنگی، خاك آلوده، بذر آلوده و ماشین آلات کشاورزي صورت می گیرد (٤). براساس تحقیقات محققان، کنترل شیمیایی بیماري پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی باید قبل از کاشت با ضد عفونی خاك انجام شود (٥).

قارچ[1] *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* به عنوان یکی از بیماری های مهم خاکزاد سالانه موجب خسارت ٦٠ درصدی محصولات گلخانه ای و مزرعه ای گوجه فرنگی می شود (٦). باکتری های جنس باسیلوس (به ویژه باسیلوس سوبتیلیس) به دلیل توانایی در تولید ترکیباتی با خواص ضدمیکروبی مانند لیپوپپتیدهای ضدقارچی، علیه عوامل بیماریزای گیاهی مؤثر هستند (۷). باسیلوس سوبتیلیس یک میکروارگانیسم غالب خاک است که قادر به تولید تعداد زیادی ترکیبات ضدمیکروبی مانند پپتیدها، لیپوپپتیدها، فسفولیپیدها و پلی‌ان‌ها[2] می باشد. همچنین، به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک علیه برخی از باکتری ها و قارچ های بیماری‌زای گیاهی کاربرد دارد. توانایی تشکیل اسپور مقاوم به وسیله این باکتری نیز آن را به عنوان یکی از بهترین کاندیداها در فرآیند کنترل بیولوژیک معرفی نموده است (۸). هدف از این بررسی، جداسازی و شناسایی گونه‌هایی از باکتری باسیلوس در خاک‌های استان اصفهان است که برای کاهش عوارض ناشی از استفاده از کود و سموم شیمیایی با تولید آنزیم کیتیناز قابلیت بیوکنترلی داشته باشند.

۱ FORL
۲ Polyene

مواد و روش ها

بررسی برخی از مکانیسم ها ی بیوکنترلی باکتری جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

نمونه گیری از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک مناطق بیابانی از بیابان‌های شور استان اصفهان صورت گرفت. برای جداسازی باکتری‌ها یک گرم از نمونه خاک در ۹ میلی لیتر از محلول نمکی استاندارد (۰/۸۵٪ نمک طعام) حل و به مدت یک

ساعت روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و تا رقت 10^{-9}رقیق شدند. ۶۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خاک روی چند محیط کشت انتخابی (جدول ۲) پخش و در دمای ۲ ± ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تا ظهور کلونی ها انکوبه شدند. کلونی‌هایی که مورفولوژی متفاوتی داشتند، انتخاب و با کشت متوالی خالص سازی و برای مطالعات بیشتر در دمای ٤ درجه سانتی گراد روی محیط جامد نگهداری شدند (۷).

برآورد ایندول ۳- استیک اسید (اکسین)

برآورد اکسین تولید شده توسط باکتری با استفاده از اسپکتروفتومتری انجام گردید (۹).

برآورد انحلال فسفات معدنی

برای اندازه‌گیری قدرت حل کنندگی فسفات توسط باکتری ها، هر جدایه به طور جداگانه در پتری های حاوی روی محیط کشت جامد پیکوفسکی (PKV) کشت و پتری‌ها در دمای ۲±۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز نگهداری شدند. برای شناسایی قدرت حل کنندگی فسفات از خصوصیت شفاف سازی محیط پیرامون کلنی استفاده گردید (۱۰،۱۱).

ارزیابی تولید سیدروفور

اندازه گیری سیدروفور تولید شده توسط باکتریها با استفاده از روش کاس شاتل صورت گرفت. در صورت وجود سیدروفور، آهن از ترکیب رنگی محیط کشت حذف و باعث کاهش در شدت رنگ آبی می شود. شدت رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شدند (۱۲).

بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری

برای بررسی قدرت بازداری از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش Thammasittirong (۲۰۱۶) استفاده شد (۱۳). ابتدا یک قرص پنج میلیمتری از کشت پنج روزه قارچ *F. oxysporum* که از آزمایشگاه گیاه پزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شد و به فاصله ۱/۲ سانتیمتری از لبه تشتک پتری حاوی محیطNA+PDA قرار داده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از کشت باکتری به صورت دو نقطه و با فاصله ٤/۱ سانتیمتر از قارچ بیمارگر داخل چاهک های پلیتها ریخته شد. تشتکهای پتری در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. برای مقایسة قدرت بازدارندگی باکتری ها، فاصلة کلنی باکتری تا کلنی قارچ محاسبه شد و با مقایسة قطر کلنی شاهد توان بازدارندگی باکتری ها سنجیده شد. درصد ممانعت از رشد قارچ توسط باکتری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد ممانعت از رشد قارچ = [(R1 – R2)/R1] × 100

R1 شعاع رشد قارچ در تیمار شاهد

R2 شعاع رشد قارچ درحضور باکتری

شناسایی مولکولی

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام گرفت (۱٤). به منظور انجام واکنش PCR و تکثیر ژن SrDNA16 با طول 1500 bp، از پرایمرهای 27F و 1492R, استفاده گردید (۱۵).

Primer 27 F: 5' – AGAGTTTGATCMTGGCTC-3'
Primer1492 R:5'-ACGGYTACCTTGTTACGACT-3'

هر واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mixes kit ,(Thermo Scientific, USA) ۵۰ نانوگرم DNA و ۲۰ µmol از هر پرایمر بود. شرایط PCR شامل دمای واسرشت سازی ۹٤ درجه به مدت ۵ دقیقه، به همراه ۳۵ سیکل حرارتی با دمای ۹٤ درجه به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولPCR از روی ژل آگارز (یک درصد) بریده و توسط کیت (MN آلمان) خالص سازی شد و توالی یابی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گرفت. توالی ژن SrDNA16 باکتری‌های مورد نظر که مشابه با توالی های SrDNA16 سایر باکتری ها در بانک ژنی /GenBank EMBL/DDBJ بودند از طریق برنامه BLASTN مقایسه و با نرم افزار MEGA٦ همردیف شدند (۱٤،۱۵).

آزمایش های گلخانه ای

بررسی توانایی باکتری ها در کنترل بیمارگر *Fusarium oxysporum*. در شرایط گلخانه اینوکلوم قارچ به روش پال و همکاران (۲۰۰۱) تهیه شد (۱۶). ابتدا، برای کشت یک سوم گلدان ها با خاک استریل و سپس، دو سوم بقیه با خاک حاوی اینوکلوم (۱ گرم اینوکلوم به ازای ۳ کیلوگرم خاک) پر شد. بذرها با الکل ۹۶ درصد به مدت یک دقیقه و محلول هیپوکلریت سدیم با ۱/۵ درصدکلر فعال به مدت ۵ دقیقه استریل سطحی شده و به منظور حذف سمیت هیپوکلریت سدیم بذرها با استفاده از آب مقطر استریل ۱۰ بار آبکشی شدند. بذرهاي استریل شده به داخل تشتک‌هاي پلاستيكي استریل ریخته و در زیر هود لامینار خشك شدند. در شرایط استریل ۱ گرم از بذرهاي استریل شده با ۱ میلي لیتر از سوسپانسیون باکتري در داخل تشتك هاي پتري با قطر ۸ سانتي متر تلقیح شدند. در هر گلدان ده عدد بذر گوجه فرنگی آغشته به مایه تلقیح، کشت شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. آبیاری به صورت یک روز در میان انجام شد گیاهان پس از ۴۰ روز برای مشاهده علائم بررسی شدند . طول ساقه، ریشه در کنار وزن خشک و تر آن ها اندازه گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

از مناطق نمونه گیری شده، ۸۰ جدایه جداسازی و خالص سازی شد. از بین ۱۲۰ جدایه بدست آمده، هفت جدایه توانایی تولید اکسین، ده جدایه توانایی انحلال فسفات، شش جدایه توانایی تولید سیدروفور و هفت جدایه توانایی جلوگیری از رشد بیماری‌گر داشتند. بر اساس تشکیل هاله نارنجی و هاله تولید سیدروفور روی محیط CAS، شش جدایه توان تولید سیدروفور را داشتند. تمامی جدایه ها توانایی رشد روی محیط حداقلی آب-آگار را دارا بودند. از هشتاد جدایهٔ خالص شده، هفت جدایه توانایی تولیداکسین داشتند. جدایه های ٦١ و ٥٦ پس از ۷۲ ساعت نگهداری، به ترتیب با تولید ۱۲۸و ٤٨ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسین بیشترین میزان اکسین را تولید کردند (جدول ۱). ده جدایه قادر به انحلال فسفات نامحلول بودند. ۳ جدایهٔ ٧٦ با ۱۸۸ میکروگرم بر میلی لیتر کمترین و جدایهٔ ٤٨ با ۲۰۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین میزان انحلال فسفات نامحلول را داشتند (جدول ۱).

بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری

با استفاده از روش چاهک گذاری مشخص گردید که از میان۸۰ سویه جدا شده،هفت جدایه دارای فعالیت ضد قارچی علیه *Fusarium oxysporum* بود. با استفاده از روش کشت متقابل درون تشتک پتری، مورد ارزیابی قرار گرفت، هفت جدایه باکتریایی درصد مناسبی از کنترل قارچ بیمارگر را نشان دادند، جدایه ٥٦ بالاترین درصد کنترل قارچ بیمارگر را داشت.در این آزمایش متابولیت‌های فرّار تولید شده توسط سویه های منتخب توانستند از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کنند که به ترتیب جدایه های ٥٦ و ۸۳ بیشترین درصد ممانعت کنندگی از رشد را نشان دادند (شکل ۱، جدول ۱).

شناسایی مولکولی

تطابق چندگانه (Multiple alignment) توالی ١٦SrDNA دو باکتری منتخب، با سایر توالی های ١٦SrDNA موجود در بانک ژنی NCBI نشان داد که جدایه ٥٦ و ۸۳ با ۹۸ و ۹۹/۹ درصد شباهت به ترتیب متعلق به *Bacillus amyloliquefaciens* و *Bacillus atrophaeus* ، (جدول ۲). این باکتری ها با شماره دسترسی (Accession Number) در جدول ۲ و مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (Biotechnology Information National Center for) معروف به NCBI قابل دسترسی هستند.

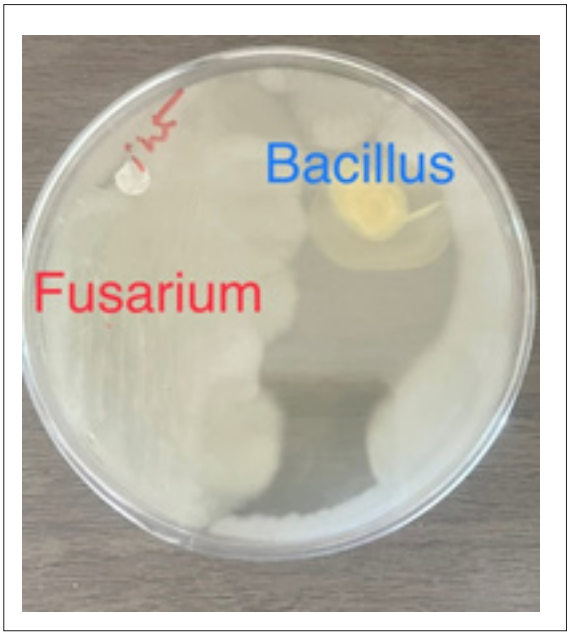
آزمایشات گلخانه ای

نتایج گلخانه اي بررسی تاثیر هفت باکتری منتخب مهارگر رشد قارچ در شرایط آزمایشگاه روی شدت بیماری

جدول ۱- صفات محرک رشد ایزوله های باکتری و اثر بازدارندگی آنها در ممانعت از رشد قارچ

شماره ایزوله	اکسین (میکرو گرم بر میلی لیتر)	حل‌کنندگی فسفات (میکروگرم بر میلی گرم)	درصد سیدروفور	بازدارندگی رشد بیمارگر ۱۲۰ ساعت پس از کشت (٪)
۵۶	۱۲۸/۷ ± ۲/۳	۱۳۹۹ ± ۵/۴	۲۰/۰±۰/۰	۴۲
۵۴	۱۳/۴ ± ۰/۲۲	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۲۳
۵۵	۳۰ ± ۱/۲	۰/۰±۰/۰	۱۱ ± ۰/۷۱	۰
۵۳	۴/۱ ± ۰/۰۳	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰
۶۱	۴۸ ± ۰/۵۳	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰
۶۵	۱۸ ± ۰/۴۴	۰/۰±۰/۰	۱۴ ± ۰/۷۵	۱۱
۶۷	۶/۵ ± ۰/۰۵	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰	۰
۴۷	۰/۰±۰/۰	۱۰۰۸ ± ۶/۲	۰/۰±۰/۰	۰
۴۸	۰/۰±۰/۰	۲۰۱۲ ± ۶/۸	۰/۰±۰/۰	۳۳
۵۷	۰/۰±۰/۰	۱۶۶۷ ± ۳/۶	۰/۰±۰/۰	۲۴
۶۵	۰/۰±۰/۰	۱۴۸۰ ± ۴/۶	۰/۰±۰/۰	۰
۶۹	۰/۰±۰/۰	۱۳۷۷ ± ۸/۸	۰/۰±۰/۰	۱۲
۷۶	۰/۰±۰/۰	۳۸۸ ± ۲/۹	۰/۰±۰/۰	۰
۸۳	۰/۰±۰/۰	۱۷۹۷ ± ۵/۶	۰/۰±۰/۰	۳۷
۸۴	۰/۰±۰/۰	۲۱۹ ± ۱/۴	۰/۰±۰/۰	۰
۹۶	۰/۰±۰/۰	۱۸۸ ± ۳/۱	۰/۰±۰/۰	۰
(۵ درصد) LSD	۳/۲	۲۱/۱	۰/۵	

خطای استاندارد ± مقادیر: میانگین سه تکرار



شکل ۱- اثر مهار رشد قارچ فوزاریوم در شرایط in vitro در اثر جدایه ٥٦

پوسیدگی طوقه و ریشه و همچنین افزایش شاخص های رشدی گوجه فرنگی نشان داد که جدایه ها در حضور قارچ بیمارگر باعث کاهش شدت بیماری شدند ولی تنها جدایه ٥٦ توانست در برهمکنش با قارچ بیماریگر اختلاف معنی داری روی همه فاکتورهای رشدی داشته باشد (جدول ۳).

جدول ۲ - شناسه مولکولی بهترین ایزوله ها در این مطالعه

ایزوله‌ها	نزدیکترین سویه	شماره دسترسی در NCBI	درصد شباهت	طول قطعه 16sRNA (bp)
٥٦	*Bacillus amyloliquefaciens*	KU374977	۹۹/۹	۱۳۷۰
۸۳	*Bacillus atrophaeus*	KU374973	۹۹	۱۱۲۷

جدول ۳- اثر آنتاگونیستی جدایه های باکتری روي *Fusarium oxysporum* مقایسه و فاکتورهاي رشدي و کاهش بیماري در شرایط گلخانه

ایزوله	وزن خشک ساقه (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک کل (گرم)	ارتفاع گیاه (سانتی متر)
شاهد	۲/۱۹ ± ۰/۰۰۵	۰/۲۸۵ ± ۰/۰۱۱	۲/۴۵۴± ۰/۰۱۸	۲۶/۹ ± ۱/۲
۵۶	۲/۴۰۹± ۰/۰۱۹	۰/۲۷۷± ۰/۰۲۱	۲/۶۸۶± ۰/۰۳۹	۳۵/۲± ۲/۵۵
۵۴	۲/۱۶۸± ۰/۰۱۴	۰/۱۸۲± ۰/۰۲۲	۲/۳۵± ۰/۰۳۳	۲۵± ۲/۵
۶۵	۱/۸۰۳± ۰/۰۱۹	۰/۱۰۷± ۰/۰۰۹	۱/۹۱± ۰/۰۴۷	۲۵± ۲/۷
۴۸	۲/۱۵۴± ۰/۰۱۴	۰/۱۴۴± ۰/۰۱۲	۲/۲۹۸± ۰/۰۳۱	۲۸/۷± ۲/۶
۵۷	۱/۹۸۵± ۰/۰۱۷	۰/۱۸۴± ۰/۰۱۹	۲/۰۶۹± ۰/۰۳۱	۲۵± ۲/۲
۶۹	۲/۱۷۹± ۰/۰۱۶	۰/۱۶± ۰/۰۱۶	۲/۳۳۹± ۰/۰۴۸	۳۱± ۳/۶
۸۳	۲/۲۰۷ ± ۰/۰۱۹	۰/۲۵۶ ± ۰/۰۲۳	۲/۴۶۲± ۰/۰۵۳	۳۲/۱ ± ۳/۰
LSD (۵ درصد)				

± استاندارد ارور مقادیر میانگین سه تکرار

بحث

حلالیت فسفات توسط جنس *Bacillus sp* . جدا شده از خاک‌های شور توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (۱۷,۱۶). حل کنندگی فسفات صفت بسیار مهم محرک رشد گیاه است. در این فرآیند میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات، فسفات نامحلول را حل و آن را در دسترس گیاهان قرار می‌دهد (۱۷،۱۸). محققین دیگر نیز آزادسازی فسفات به وسیله باکتری ها را مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که مولکول های آلی با وزن مولکولی پایین باعث آزادسازی و حل شدن فسفات معدنی می شود (۱۹،۲۰). در تحقیقات پژوهشگران مشخص گردید که اسید سیتریک، اسید گلوتانیک، اسید لاکتیک و اسید پروپیونیک مهمترین اسیدهای آلی جدا شده از محیط کشت باکتریایی هستند که موجب آزادسازی فسفات خاک می شوند. تولید ایندول استیک اسید یک صفت مهم محرک رشد گیاه برای باکتری می‌باشد به طوری که این فیتوهورمون سیستم ریشه گیاه را توسعه می‌دهد جذب مواد غذایی را بهبود می‌بخشد (۱۷). در این آزمایش، متابولیت‌های فرّار تولید شده توسط سویه های منتخب توانستند از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کنند که به ترتیب جدایه های ٥٦ و ۸۳ بیشترین درصد ممانعت کنندگی از رشد را نشان دادند. همچنین به نظر می رسد که اثر این ترکیبات فرّار وابستگی بسیاری به حضور باکتری دارد و این ترکیبات غالبا نقش قارچ ایستایی دارند، چرا که پس از باز شدن درب پتری دیش، قارچ بیمارگر مجددا پس از گذشت ۹ روز توانست تمام سطح پتری دیش را پر کند. باکتري *B. subtilis* یکي از پرکاربردترین باکتري ها در کنترل بیولوژیك بیماري هاي گیاهي است (۲۱). این باکتري به همراه دیگر گونه هاي باسیلوس ماده موثر حدود نیمي از آفت‌کش‌هاي زیستي تجاري شده در بازارهاي دنیا را به خود اختصاص داده است. متابولیت هاي ثانویه تولید شده توسط باسیلوس ها داراي ساختار شیمیایي متنوعي بوده و کاربرد آن ها در کنترل بیماري هاي عفوني از اهمیت زیادي برخوردار است (۲۲) در پژوهشي مشابه با مطالعه حاضرباسیلوس سرئوس ازخاك هاي شور در جنوب تونس جداسازي شد که توانایي تولید ترکیب ضدقارچي مهار رشد قارچ ها از جمله فوزاریوم را نشان داد (۲۳). هم چنین Siddikee و همکاران توانستند ٦ جدایه باسیلوس مقاوم به گرما و داراي فعالیت ضد میکروبي از خاك جدا کنند (۲٤).

طبق بررسی انجام شده، در آزمایش های قارچکش بیولوژیکی و در گلخانه جدایه ٥٦ بیشترین تأثیر را در کنترل قارچ بیمارگر داشتند که این به دلیل وجود سیستم پیچیده بیولوژی و اکولوژی خاک و استقرار آنتاگونیست در منطقه ریزوسفر و قدرت کلونیزاسیون ریشه و بقای عامل آنتاگونیست،pH خاک و بافت خاک می باشد بر اساس نتایج به دست آمده جدایه ٥٦ بیشترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر و همچنین افزایش ارتفاع ، وزن تر و خشک بوته و کاهش شدت بیماری را در بین تیمارهای مختلف مورد آزمایش داشته است(جدول ۳). باکتری در شرایط گلخانه ای تا حدود بسیار زیادی از بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر قارچ F. *oxysporum f. sp. lycopersici* جلوگیری نمود .جدا شدن قارچ‌هایTrichoderma از خاک مناطق مختلف نشان از وجود آنها در بسیاری از خاک‌های زیر کشت گیاهان است. بنابراین به نظر می‌رسد برای مبارزه با بیماری‌ها می توان این عوامل را به طور مصنوعی تکثیر و به خاک اضافه نمود. نتایج به دست آمده در این آزمایش با نتایج (۲۵). همچنین که گزارشی مشابه از کاهش شدت بیماری توسط *R. solanacearum* و کنترل بیماری گیاهان گوجه فرنگی بعد از تیمار با . *Bacillus sp* و *Pseuodomonas fluorescens* دارند مطابقت دارد (۲٦). در بررسی های محققان بر مکانیسم های اصلی کنترل بیماری پاخوره گندم توسط استرین۲-۷۹ باکتری *P.fluorescens* مشخص شد که آنتی بیوتیک فناژین-۱- کربوکسیلیک اسید نقش اصلی را دارد (۲۷). محققین کنترل بیولوژیک پژمردگی فوزاریومی ترب به وسیله سودوموناس های فلورسنت را به تولید سیدروفور توسط باکتری ها و رقابت برای یون آهن نسبت دادند (۲۸). ترکیبات آلی فرار باکتریایی می تواند رشد و نمو و تمایز یکسري از قارچهاي پاتوژن گیاهی مثل*Phytophthora* ، *Sclerotinia sclerotium* *Fusarium oxysporum infestans* و *R. solani* را مهار

کننـد (۳۱-۲۹). ترکیبـات خـارج سـلولی دو اسـترین باکـتري *Pseudomonas sp* . سـبب ممانعـت از رشـد کلونـی قـارچ Botryosphaeriaceous مـی شـود(۳۲) . تاثیـر بازدارندگـی سـویه هـاي باکتریایـی در شرایـط درون شیشـه نشـان داد کـه ایـن باکتریهـا قـادر بـه جلوگیـري از گسـترش علائـم بیـماري آنتراکنـوز مـی باشـند. ایـن اثـر مـی توانـد بـه دلایـل رقابـت بـر سر منابـع کربـن و مـکان، تولیـد آنزیمهـاي تجزیـه کننـده دیـواره سـلولی، آنتی‌بیـوز و تحریـک مقاومـت سیسـتمیک باشـد (۳۳). بـر اسـاس بررسـی هـاي مکانیسـم هـاي مختلفـی بـراي *B. subtilis* ذکـر شـده کـه شـامل رقابـت، کلونیزاسـیون ریشـه، تولیـد آنتـی بیوتیـک، ایجـاد مقاومـت القایـی در گیاهـان میزبـان و تولیـد ترکیبـات هورمونی مشـابه سـیتوکنین و اکسـین مـی باشـند کـه در نهایـت موجـب افزایـش رشـد گیـاه مـی شـود (۳٤). بـه طـور کلـی مـی تـوان گفـت کـه اسـتفاده از عوامـل کنـترل بیولوژیـک بـه عنـوان روش مناسـبی جهـت مدیریـت بسـیاري از بیـماري هـاي گیـاهی محسـوب می‌شـود.

نتیجه گیری:

تحقیقـات ایـن پژوهـش نشـان مـی دهـد کـه باکـتری هـای ناحیـة ریزوسـفر بـا مکانیسـم هـای مسـتقیم و غیرمسـتقیم باعـث کاهـش خسـارت بیمارگـر مـی شـوند. جدایـه هـای ٥٦ و ٨٣ کـه از لحـاظ صفـات تحریـک کنندگـی، جدایـه هـای کارآمـد بودنـد و توانایـی کنـترل کنندگـی را داشـتند؛ کـه احتـمال ایـن اسـت کـه ایـن جدایـه هـا بـا تولیـد اکسـین و سـیدروفور از طریـق بهبـود رشـد گیـاه باعـث مقاومـت گیـاه در برابـر عوامـل بیـماری‌زا شـده باشـد. همچنیـن، همـة جدایـه هـا باعـث افزایـش صفـات رشـد در حضـور بیمارگـر شـدند.

تقدیر و تشکر:

ایـن مقالـه بـا اسـتفاده از اعتبـارات پژوهشـی شرکـت دانـش بنیـان زیسـت فرایند نوتریکا انجام شـده اسـت، بدینوسـیله نویسـندگان لازم مـی داننـد از شرکـت مذکـور تقدیـر و تشـکر نمایند.

تعارض منافع:

نویسندگان اعلام می دارند که تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1.Nagorska, K., Bikowski, M., and Obuchowski, M. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of Bacillus subtilis as a powerful biocontrol agent. Acta Biochim Pol. 2007; 54(3): 495-508.

DOI:10.18388/abp.2007_3224

2.Ongena, M., Jacquea, Ph. Bacillus lipopeptids: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 2007; 16(3): 115-125.

DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009

3. Jones, J. B. and Jones,J. P. Compendium of tomato disease . 1991. APS Press.

doi.org/10.1094/9780890544341.

4. Niknejad Kazempour, M. Sharifi Tehrani, A., and Akhot, M. Investigating the effect of antagonistic fungi Trichoderma spp against fusarium wilt of tomato caused by Fusarium oxysporum f.sp lycopersici. In greenhouse conditions. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 2001; 31(1):1.31-.37.

Doi: 10.22067/jpp.2021.32846.0

5. Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. Control of soil borne pathogens of tomato using a commercial formulation of Streptomyces griseoviridis and so-larization. CropProtect.2006; 25,468–475.

doi.org/10.1016/j.cropro.2005.08.001.

6. Igo, N. Survey of greenhouse management practices in Essex County, Ontario, in relation to Fusarium foot and root rot of tomato. Plant Disease. 1983; 67 (1): 36-79.

DOI: 10.1094/PD-67-38.

7. Sarkar, S., Beura, S.K., Nandi, A., Das, S., Dash, S.K., Senapati, N., Pandey, G. and Patnaik, A. Management of early blight of tomato (Alternaria solani Ellis and Martin) by chemicals and biocontrol agents under field condition. Journal of Mycopathological Research. 2016; 54(1): 81–84.

DOI:10.20546/ijcmas.2019.806.175.

8. Dimopoulou, A., Theologidis, I., Liebmann, B., Kalantidis, K., Vassilakos, N and Skandalis, N. Bacillus amyloliquefaciens MBI600 differentially induces tomato defense signaling pathways depending on plant part and dose of application. Scietific. Reports. 2019; 9, 19120.

doi.org/10.1038/s41598-019-55645-2.

9.Brick, J.M., Bostock, R.M and Silverstone, S.E. Rapid in-situ assay for indole acetic acid pro duction by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. Applied and Environmental Microbiology. 1991; 57:535–8.

doi: 10.1128/aem.57.2.535-538.1991

10. Kiran, K.K and Chandra, T.S. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic Bacillus sp. strain TSCVKK. Applied Microbiology and Biotechnology. 2008; 77:1023–31. **DOI: 10.1007/s00253-007-1250-z** .

11. Watanabe, F., and Olsen, S.Test of an ascorbic acid method for determining phosphorous in water and NaHCO3 extracts from soil. Soil Science Society of America, Proceedings. 1956; 29:677–678.

12. Payne, SM. Detection, Isolation and characterization of siderophores. Methods in Enzymology. 1994; 235:329–44.

https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1.

Thammasittirong, S.N.R. In vitro Inhibitory effect of Bacillus subtilis BAS114 against Curvularia lunata. Advances in Environmental Biology. 2016; 10(1): 176-183.

DOI:doi.org/10.1007/s13213-011-0290-x

13. Sambrook, J. and Russel, D. W. Molecular cloning. Cold Spring Harbor. 2000. New York.

https://doi.org/10.1002/abio.370050118

14. Lane, DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds)Nucleic acid techniques in bacteria systematics. John Wiley & Sons Inc., 1991. New York. 115–175.

doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb24388.x

15. Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R and Singh, C.S. Suppression of maize root diseases caused by Macrophomina phaseolina, Fusarium moniliforme and Fusarium graminearum by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research. 2001; 156: 209-223.

DOI: 0944-5013/01/156/03-209.

16. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A andYoung, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology. 2006; 34: 33-41.

DOI:10.1016/j.apsoil.2005.12.002.

17. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., and Mora, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. Joural soil Sciece plant Nutrotion. 2010; 10: 293–319.

DOI:10.4067/S0718-95162010000100006.

18. Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T. and Bashan, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant Soil. 2006; 287, 15–21. • **DOI:10.1007/s11104-006-9056-9.**

19. Ogut, M., Er, F. and Kandemir, N. Phosphate solubilization potentials of soil Acinetobacter strains. Biol Fertil Soils. 2010; 46, 707–715.

doi.org/10.1007/s00374-010-0475-7.

20.Ongena, M. and Jacques, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology. 2008; 16: 115–125.

DOI:10.1016/j.tim.2007.12.009.

21. Youcef-Ali, M., Chaouche, N.K., Dehimat, L., Bataiche, I., Mounira, K. and Cawoy, H. Antifungal activity and bioactive compounds produced by Bacillus mojavensis and Bacillus subtilis. African Journal Microbiology Research. 2014, 8(6): 476-484.

DOI:10.5897/AJMR2013.6327.

22. Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M.R., Boudabbous, A. and Belanger, R. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by Bacillus cereus. Ann Microbiol. 2002, 52(3): 323-37.

DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00431.x.

23. Siddikee, M. A., Chauhan, P. S., Anandham, R., Han, G. & Sa, T. Isolation characterization , and use for plant growth promotion under salt stress , of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. J Microbiol Biotechnol. 2010; 20, 1577–1584.

DOI: 10.4014/jmb.1007.07011.

24. Guo, S., G. J. S. Bluth, W. I. Rose, I. M. Watson, and A. J. Prata,. Re-evaluation of SO2 release of the 15 June 1991 Pinatubo eruption using ultraviolet and infrared satellite sensors. Geochem. Geophys. Geosyst. 2004; 5,Q04001doi:10.1029/2003GC000654.

doi.org/10.1029/2003GC000654.

25. Wydra K., Semrau J. Phenotypic and molecular characterization of the interaction of antagonistic bacteria with Ralstonia solanacearum causing tomato bacterial wilt. In: Wolfgang Zeller, Cornelia Ulrich (eds.). 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant diseases, Darmstadt, Germany. 2006: 112-118.

doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.11.002.

26.Thomashow LS, Weller DM, Bonsall RF, Pierson LS. Production of the antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent Pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. Appl Environ Microbiol. 1990; 56:908–912.

DOI:10.1128/AEM.56.4.908-912.1990

27. Shippers B, Baker AW, and Baker AHM. Interaction of deleterious and benefical rhizospher 28-microorganism and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology. 1998; 25: 59-339.

28. Wu, Y.C., Yuan, J., Yaoyao, E., Raza, W., Shen, Q.R. and Q.W. Huang. Effects of volatile organic compounds from Streptomyces albulus NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens. Journal of Basic Microbiology. 2015; 55: 1104–1117.

DOI:10.1146/annurev.py.25.090187.002011.

29. Giorgio, A., De Stradis, A., Lo Cantore, P. and N.S. Iacobellis. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on Sclerotinia sclerotiorum. Frontiers in Microbiology. 2015; 6: Article ID 1056.

doi: 10.3389/fmicb.2015.01056.

30. Elkahoui, S., Djebali, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R. and F. Limam. Antifungal activity of volatile compounds-producing Pseudomonas P2 strain against Rhizoctonia solani. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015; 31: 175–185.

doi: 10.1007/s11274-014-1772-3.

31. Wicaksono, W.A., Jones, E.E., Monk, J. & Ridgway, H.J. Using bacteria endophytes from a New Zealand native medicinal plant for control of grapevine trunk diseases. Biological Control. 2017; 114: 65–72.

doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.003.

32. Carmona–Hernandez, S., Reyes–Pérez, J. J., Chiquito–Contreras, R. G., Rincon–Enriquez, G., Cerdan–Cabrera, C. R. & Hernandez–Montiel, L. G. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by

bacterial antagonists: Agronomy Journal. 2019; 9: 1–15.
doi.org/10.3390/agronomy9030121.

33. Ogaiah, S. Biocontrol Agents and Secondary Metabolites: Applications and Immunization for Plant Growth and Protection 1st Edition. 2021.
https://doi.org/10.1016/C2019-0-03577-7.