کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۶، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ (۱۹۵-۱۸۷)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.230657.190

تأثیر برخی مواد معدنی بر کارامدی بیوکنترلی *Bacillus pumilus* INR7 علیه *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچهٔ لوبیا

۱. ارغوان اردلان؛ ۲. سعید عباسی*؛ ۳. روح الله شریفی
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۳)

چکیده

یکی از راهبردهایی که در امر تجاری سازی عوامل بیوکنترل در نظر گرفته می‌شود، بحث طراحی محیط کشت برای تولید انبوه این باکتری‌هاست. این پژوهش با هدف بررسی اثر برخی عناصر معدنی روی تولید زیست‌توده و فعالیت بیوکنترلی باکتری *Bacillus pumilus* INR7 علیه *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچهٔ لوبیا به اجرا درآمد. عناصر معدنی مورد استفاده در این پژوهش شامل آهن، روی، مس، بُر، کبالت، مولیبدن و منگنز بود که هر کدام در سه غلظت مورد استفاده قرار گرفتند. در این میان، غلظت متوسط و بیشینهٔ آهن (۳۶ و ۷۲ میکرومول) و مس (۷ و ۱۴ میکرومول) و غلظت کمینهٔ منگنز (۱۲/۵ میکرومول) به صورت معنی‌داری باعث افزایش جمعیت باکتری شدند. غلظت کمینه و متوسط روی (۳۵ و ۷۰ میکرومول) و بیشینهٔ کبالت (۱۴ میکرومول) باعث کاهش معنی‌دار جمعیت باکتری در مقایسه با محیط پایه M1 شدند. در آزمون گلخانه‌ای، عناصر آهن در غلظت متوسط (۳۶) و مس در غلظت بیشینه (۱۴ میکرومول) بیشترین اثر را در افزایش کارایی باکتری در کنترل بیماری مرگ گیاهچهٔ لوبیا نشان دادند. در مقابل، غلظت‌های بیشینهٔ آهن (۷۲ میکرومول)، کمینهٔ روی (۳۵ میکرومول)، بیشینهٔ منگنز (۵۰ میکرومول) و متوسط مولیبدن (۸/۱ میکرومول) باعث کاهش معنی‌دار کارایی بیوکنترلی باکتری در مقایسه با محیط پایه M1 شدند. در مجموع، غلظت بهینه برای عناصر مورد استفاده مشابه نبود و حتی در مورد یک عنصر خاص بین غلظت بهینه برای تولید زیست‌توده و کارایی باکتری در بیوکنترل بیماری اختلاف وجود داشت.

کلید واژگان: باسیلوس، عناصر معدنی، کنترل بیولوژیک، بوته‌میری، لوبیا.

Effect of some mineral elements on biocontrol efficiency of *Bacillus pumilus* INR7 against bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*

Arghavan Ardalan[1], Saeed Abbasi[2*], Rouhallah Sharifi[3]
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
(Received: Apr. 5, 2017 - Accepted: Sep. 14, 2017)

ABSTRACT

Culture design for mass production of biocontrol agents is one of the main approaches in commercialization of biocontrol agents. In this work, effects of some micro-nutrients have been investigated on biomass production and efficacy of *B. pumilus* against *R. solani*, the causal agent of bean damping-off. Seven elements, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, Co and B have been used in three concentrations. Bacterial biomass increased significantly in medium ammended with maximum concentrations of Fe (36 and 72 µM) and Cu (7 and 14 µM) and minimum concentration of Mn (12.5 µM). Bacterial population decreased significantly in minimum and medium concentrations of Zn (35 and 70 µM) and maximum concentration of Cobalt (14 µM) compared to M1 basal medium. In greenhouse experiment, highest disease suppression achieved in medium concentration of Fe (36 µM) and maximum concentration of Cu (14 µM). In other hand, maximum concentration of Fe (72 µM), minimum concentration of Zn (35 µM), maximum concentration of Mn (50 µM) and medium concentration of Mo (8.1 µM) decreased efficiency of bacteria in suppression of bean damping-off, significantly. In conclusion, the optimum concentration was not the same for tested elements. Even in the case of individual element, there was difference between optimum concentration for biomass production and efficacy of bacteria in biological control of the plant disease.

Keywords: *Bacillus*, Bean, Biological control, Inorganic elements.

* Corresponding author E-mail: sabbasikhs@razi.ac.ir

تازه‌های تحقیق

این پژوهش در ادامه پژوهش آشفته و همکاران (۲۰۰۹)، به منظور ارزیابی نقش عناصر معدنی روی رشد و کارایی عوامل بیوکنترلی از جنس باسیلوس طراحی و انجام شد. در مقایسه با سودوموناس‌ها، عنصر آهن بیشترین اثر را در بهبود کارایی سویه باسیلوس مورد استفاده ایفا کرد. در مقابل،عنصر روی اثر منفی در کارایی باکتری داشت. با بهینه‌سازی اجزای محیط کشت رشد و کارایی بیوکنترلی سویهٔ مورد آزمایش بهبود چشمگیری یافت.

مقدمه

قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn. یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زی است که باعث مرگ گیاهچه و بوته‌میری بسیاری از محصولات مهم زراعی مانند برنج، لوبیا، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی می‌شود (Ownley and Trigiano 2016). از آن‌جا که عامل بیماری خاک‌زاد است، کاربرد قارچ‌کش‌ها هزینه‌بر و غیر عملی است و موجب بروز اثرات ناخواسته در محیط زیست می‌شود (Bruggen and Finckh 2016). یکی از روش‌های جدید در کنترل بیماری‌ها استفاده از عوامل زیستی است؛ کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌های خاک‌زی به‌خصوص باکتری‌ها، جایگزین قدرتمندی برای آفت‌کش‌های شیمیایی می‌باشد (Asaka and Shoda 1996, Bruggen and Finckh 2016). در میان عوامل بیوکنترل، گونه‌های *Bacillus* spp. به دلیل تولید اسپور مقاوم، ترشح آنتی‌بیوتیک‌های متعدد، توانایی القای مقاومت در گیاه و تولید هورمون‌های رشدی گیاهی دارای موقعیت مناسبی جهت کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد می‌باشند (Kilian *et al.* 2000, Mahadtanap *et al.* 2007, Sharifi and Ryu 2017, Slininger and Shea-Wilbur 1995). بر این اساس، این جنس به تنهایی ۸۵ درصد از بازار تجاری عوامل بیوکنترل را به خود اختصاص داده است (Posada-Uribe *et al.* 2015).

جهت تکثیر عوامل بیوکنترل به‌صورت انبوه و در حجم زیاد، محیط کشت باید به گونه‌ای باشد که با حداقل هزینهٔ اقتصادی، حداکثر میزان رشد سلولی و کارایی علیه بیمارگر هدف را داشته باشد (Costa *et al.* 2001, Kilian *et al.* 2000, Lewis 1991). البته اجزای محیط کشت و شرایط محیطی مورد نیاز برای سویه‌های مختلف متفاوت است و برای هر سویه، محیط کشت باید بهینه شود (Flores *et al.* 1997, Gu *et al.* 2005). برای مثال گلوتامات در گونهٔ *B. cereus* باعث افزایش رشد شده است و در گونه‌های دیگر این جنس، بازدارنده رشد بوده است (Buhr *et al.* 2008). صفری اصل و همکاران نشان دادند که عصاره سیب‌زمینی و سویا بهترین محیط کشت برای افزایش جمعیت باکتری و افزایش هالهٔ بازدارندگی علیه *Pythium aphanidermatum* است (Safari Asl *et al.* 2010). البته مشخص شده است که عناصر غذایی می‌توانند اثر متفاوتی روی رشد یا کارایی باکتری داشته باشند. در سویهٔ *P. fluorescens* 2-79، عنصر روی، سبب افزایش تولید آنتی‌بیوتیک‌ها شده است؛ اما اثر چندانی در افزایش رشد باکتری نداشته است. حال آن‌که، آهن، بیش از آن که کارایی باکتری را افزایش دهد، در تولید زیست‌توده نقش داشته است (Slininger and Jackson 1992). این امر می‌تواند به این علت باشد که هر کدام از این عناصر باعث تحریک متابولیت‌های خاصی می‌شوند. مشخص شده است که تولید آزمایشگاهی PHL[1] و PLT[2] توسط عنصر روی (Zn) و تولید سالیسیلیک اسید توسط مولیبدن و منگنز تحریک می‌شود (Duffy and Défago 1995)، حال آن‌که در دسترس بودن آهن برای تولید سیانید هیدروژن مهم و اساسی است (Blom *et al.* 2011).

هدف از این پژوهش این بود که (۱) اثر عناصر معدنی در افزایش زیست‌تودهٔ سویهٔ *B. pumilus* INR7 مشخص شود. (۲) کارایی باکتری به‌دست آمده از محیط کشت‌های مختلف در شرایط آزمایشگاه آزموده شود و (۳) در نهایت بهترین عناصر و غلظت‌های بهینه آن‌ها معرفی شوند.

مواد و روش‌ها

جدایهٔ بیمارگر

جدایهٔ *R. solani* AG4 از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه رازی تهیه شد. بیماری‌زایی این جدایه روی لوبیا پیش از این به اثبات رسیده بود. در مدت اجرای

1. 2,4-diacetylphloroglucinol
2. Pyoluteorin

این پژوهش، جدایهٔ بیمارگر روی بذرهای یولاف یا به روش کشت مورب نگه‌داری شد.

سویهٔ باکتری

سویهٔ INR7 باکتری *Bacillus pumilus* از پروفسور کلوپر از دانشگاه اوبورن ایالات متحدهٔ امریکا دریافت شد. این سویهٔ باکتری از اندوریزوسفر خیار جدا شده است و روی بیمارگرهای متعددی مؤثر است. این سویه با نام تجاری یلد شیلد[1] فرموله شده است (Jeong *et al.* 2014). در پژوهش پیشین مشخص شد این سویه، بهترین سویهٔ مورد استفاده در کنترل بیماری مرگ گیاهچهٔ لوبیا بوده است (Ardalan *et al.* 2015). برای نگهداری میان مدت و طولانی مدت باکتری به‌ترتیب از دو روش نگهداری زیر پارافین مایع و نگهداری در گلیسرول ۲۰ درصد و در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس استفاده شد (Sharifi *et al.* 2006).

آزمون ارزیابی اثر عناصر معدنی روی زیست‌تودهٔ باکتری

در آزمون ارزیابی اثر عناصر معدنی روی جمعیت باکتری، اثر عناصر آهن، روی، بور، مس، منگنز، کبالت و مولیبدن در سه غلظت کم، متوسط و زیاد، هریک در چهار تکرار و در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی روی تولید زیست‌توده بررسی شد. غلظت بهینه و نوع نمک هر عنصر بر اساس منابع انتخاب شد و بر اساس آن غلظت کم و زیاد هر عنصر به صورت نصف و دو برابر آن در نظر گرفته شد (Ashofteh *et al.* 2009, Duffy and Défago 1999, Gu *et al.* 2005, Milner *et al.* 1995, Posada-Uribe *et al.* 2015, Slininger and Jackson 1992). در این آزمون، نخست، محیط پایهٔ M1، شامل عصارهٔ مخمر، سه گرم در لیتر، ساکاروز، ۱۰ گرم در لیتر، کربنات کلسیم، ۰/۴ گرم در لیتر، سولفات منیزیوم، ۰/۴ گرم در لیتر و $K_2HPO_4.3H_2O$، ۰/۹۸ گرم در لیتر تهیه گردید. محیط M1 تحت شرایط سترون به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. سه غلظت کم، متوسط و زیاد عناصر معدنی بر اساس جدول (۱) به لوله‌های فالکون اضافه شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط کشت NB[2]، به لوله‌های فالکون اضافه گردید و لوله‌های فالکون به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار داده شدند. سپس محیط‌های کشت به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع رویی، رسوب باکتری در ۲۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (۸ گرم NaCl در لیتر) به صورت سوسپانسیون درآمد و از آن سری رقت تهیه شد. سپس جمعیت باکتری با شمارش کلونی در محیط کشت NA تعیین گردید. برای تیمار بذر و خاک مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری و مشابه شرایط بالا تهیه شد.

جدول ۱. نوع و غلظت ترکیبات شیمیایی مورد استفاده جهت ارزیابی اثر عناصر معدنی در تولید زیست‌توده و کارایی بیوکنترلی باکتری *Bacillus pumilus* INR7

Table 1. Chemical elements and their concentrations used for mass production of biocontrol strain *Bacillus pumilus* INR7

Elements	Molecular formula	Concentrations (µM)		
		Low	Medium	High
Iron	$FeSO_4.7H_2O$	18	36	72
Zinc	$ZnSO_4.7H_2O$	35	70	140
Boron	H_3BO_3	9.8	19.6	39.2
Copper	$CuSO_4.5H_2O$	3.5	7	14
Manganese	$MnCl_2.4H_2O$	12.5	25	50
Cobalt	$CoCl_2.6H_2O$	3.5	7	14
Molybdenum	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	4.05	8.1	16.2

آزمون ارزیابی اثر عناصر معدنی بر کارایی بیوکنترلی باکتری *B. pumilus* INR7

تهیهٔ مایهٔ بیمارگر

برای تهیهٔ مایهٔ بیمارگر از بذر ارزن استفاده شد. بذرهای ارزن، ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده و سپس طی دو نوبت با فاصلهٔ زمانی ۲۴ ساعت در اتوکلاو (دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه) سترون گردیدند. سپس در شرایط سترون، از حاشیهٔ پرگنهٔ در حال رشد *R. solani* روی محیط کشت PDA، چند قرص میسلیومی با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن، جدا و به داخل بطری‌های حاوی بذر ارزن، انتقال داده شد. بطری‌های مذکور به مدت ۳ هفته یعنی تا زمانی که سطح بذرها کاملاً با ریسه‌های قارچ پوشانده شود، در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس داخل انکوباتور نگهداری شدند و سپس بذرهای کلنیزه شده به‌عنوان مایهٔ بیمارگر در آزمون گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

1. Yield Shield

2. Nutrient broth

آماده‌سازی و تیمار بذرهای لوبیا با باکتری آنتاگونیست

به‌منظور ضدعفونی سطحی، ابتدا بذرهای لوبیا قرمز رقم ناز به‌مدت دو دقیقه با الکل ۷۰ درصد و سپس به‌مدت یک دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی شدند و پس از چند بار شستشو با آب مقطر سترون، برای جوانه‌زنی در سطح کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. کشت باکتری مطابق روشی که در آزمون ارزیابی اثر عناصر معدنی روی جمعیت باکتری اشاره شد، صورت گرفت. به‌منظور تیمار بذرهای لوبیا، پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری، رسوب حاصل با سرم فیزیولوژیک و متیل سلولز ۰/۵ درصد به غلظت 1×10^{9} CFU/ml رسانده شد. سپس بذرهای از قبل جوانه‌زده، به‌مدت نیم ساعت به تفکیک تیمارهای آزمایش درون سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند.

نحوهٔ اجرای آزمون در شرایط گلخانه

آزمون ارزیابی اثر عناصر معدنی بر کارایی باکتری *B. pumilus* INR7 در کنترل بیماری مرگ گیاهچهٔ لوبیا، در شرایط گلخانه و در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت. به این منظور از گلدان‌های پلاستیکی به قطر دهانه ۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر استفاده شد. گلدان‌ها به اندازهٔ تقریبی نیمی از گنجایش آن با خاک سترون (شامل خاک مزرعه، پرلیت و ورمی‌کمپوست به نسبت ۳: ۱:۱) پر شدند. سپس یک گرم مایهٔ بیمارگر به هر گلدان اضافه گردید. روی مایهٔ بیمارگر با خاک سترون به ارتفاع دو سانتی‌متر پوشانده شده و بذرهای تیمار شده با باکتری آنتاگونیست در سطح خاک گلدان قرار داده شدند؛ در نهایت، روی بذرها با خاک سترون پوشانده شد. اولین آبیاری با ۵۰ میلی‌لیتر از جمعیت 1×10^{9} CFU/ml باکتری انجام شد و پس از آن آبیاری از طریق زیرگلدانی و یک روز در میان صورت گرفت. گلدان‌ها به صورت کاملاً تصادفی قرار گرفتند و تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری در گلخانه در شرایط ۱۸ ساعت روشنایی و دمای ۲۰ تا ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت حدود چهار هفته از زمان کاشت، گیاهچه‌ها به آرامی از درون گلدان خارج و پس از شستشوی ریشه، شدت آلودگی بر اساس شاخص ۰-۵ مورد ارزیابی قرار گرفت (Sharifi *et al.* 2006).

تجزیهٔ داده‌ها

تجزیهٔ واریانس و مقایسهٔ میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی‌دار[1] (LSD, P < 0/05) و با استفاده از روش مدل خطی[2] توسط نرم‌افزار SAS (SAS 9.1 SAS institute, Cary, NC) انجام گرفت.

نتایج

اثر عناصر معدنی روی زیست تودهٔ باکتری

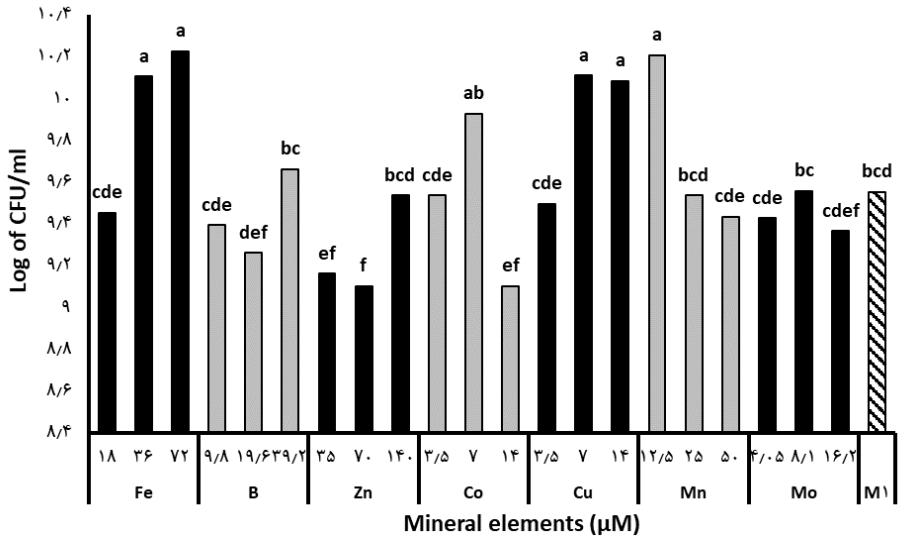
همان‌طور که در شکل (۱) مشخص است در مورد عنصر آهن، جمعیت باکتری با افزایش غلظت از ۳۶ به ۷۲ میکرومول، افزایش پیدا کرد ولی با افزایش بیشتر غلظت آهن، تولید زیست‌تودهٔ باکتری تغییر معنی‌داری نیافت. عنصر بُر در مجموع، اثر معنی‌داری روی جمعیت باکتری نداشت. عنصر روی در غلظت‌های ۳۵ و ۷۰ میکرومول نه تنها رشد را افزایش نداد، بلکه اثر منفی روی جمعیت باکتری داشت. با افزایش غلظت به ۱۴۰ میکرومول این اثر منفی برطرف شد و جمعیت باکتری به سطح شاهد رسید. در غلظت کمینهٔ کبالت، جمعیت باکتری مشابه شاهد بود ولی با افزایش غلظت به‌مقدار ۷ میکرومول، جمعیت باکتری افزایش معنی‌داری پیدا کرد و در نهایت با رسیدن غلظت کبالت به ۱۴ میکرومول، جمعیت به شدت کاهش پیدا کرد. روند اثرگذاری مس مشابه با آهن بود، در این عنصر نیز غلظت کمینه ۳/۵ میکرومول مشابه با شاهد بود ولی با افزایش غلظت به ۷ و ۱۴ میکرومول جمعیت باکتری افزایش معنی‌داری پیدا کرد. غلظت حداقل منگنز با جمعیت $1/5\times10^{10}$ CFU/ml یکی از بهترین تیمارهای آزمایش بود. با افزایش غلظت این عنصر، جمعیت باکتری به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت؛ به‌طوری که با کاربرد بیشترین غلظت منگنز (۵۰ میکرومول) کمترین جمعیت باکتری به میزان $2/7\times10^{9}$ CFU/ml مشاهده شد. در مورد مولیبدن، اختلاف بین غلظت‌ها معنی‌دار نبود و جمعیت در همه غلظت‌های مولیبدن مشابه شاهد بود. در مجموع، بیشترین زیست‌تودهٔ باکتری در حضور غلظت ۳۶ و ۷۲ میکرومول آهن و غلظت ۷ و ۱۴ میکرومول مس، غلظت ۷ میکرومول کبالت و غلظت ۱۲/۵ منگنز تولید شده است. کمترین افزایش

1. Least significance difference (LSD)
2 General linear model procedure (GLM)

جمعیت نیز در حضور غلظت ۳۵ و ۷۰ میکرومول روی، غلظت ۱۴ میکرومول کبالت دیده شد (شکل ۱).

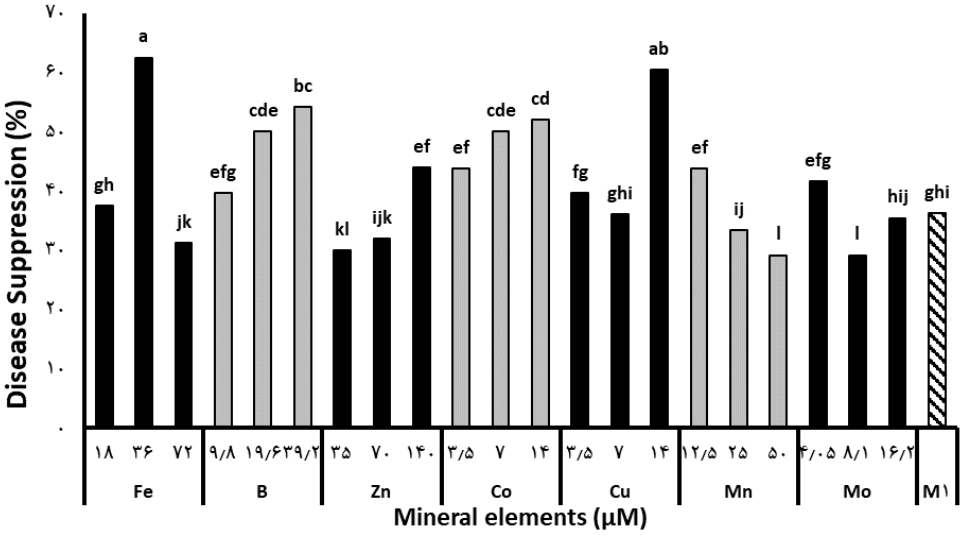
اثر عناصر معدنی بر کارایی بیوکنترلی *B. pumilus* INR7

مطابق شکل ۲، با افزودن غلظت کم آهن یعنی ۱۸ میکرومول شاخص بیماری مشابه با شاهد بود. با افزایش آهن به غلظت متوسط ۳۶ میکرومول، کارایی باکتری در کنترل بیماری به‌شدت افزایش یافت و به ۶۲/۵ ٪ رسید که بیشترین میزان کنترل بیماری در کل تیمارهای این آزمون بود. با افزایش غلظت بیش از ۳۶ میکرومول، کارایی باکتری در کنترل بیماری دوباره کاهش یافت و کنترل بیماری به ۳۱٪ رسید که کمتر از محیط پایه بود. در بررسی اثر باکتری حاصل از محیط غنی شده با بُر، با افزایش غلظت بُر کنترل بیماری نیز به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین کارایی در کنترل بیماری (۵۴٪) در غلظت بیشینهٔ ۳۹/۲ میکرومول حاصل شد. غلظت ۳۵ و ۷۰ میکرومول عنصر روی، اثر معنی‌داری روی کارایی باکتری نداشت ولی با افزایش غلظت به بیشینهٔ ۱۴۰ میکرومول، کنترل بیماری نیز افزایش یافت و به ۴۴٪ رسید. عنصر کبالت در همه غلظت‌ها روی کارایی باکتری در کنترل بیماری مؤثر بود. با افزایش غلظت عنصر کبالت، کنترل بیماری نیز افزایش یافت ولی در مجموع، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف دیده نشد. غلظت‌های کم و متوسط مس اثری روی فعالیت بیوکنترلی باکتری نداشت و مقدار بیماری مشابه شاهد بود؛ اما با افزودن غلظت بیشینهٔ ۱۴ میکرومول، شاخص کنترل بیماری به بیشترین مقدار خود (۶۰ ٪) رسید که بیش از ۱/۶ برابر محیط پایه بود. منگنز صرفاً در غلظت حداقل ۱۲/۵ میکرومول باعث افزایش کارایی باکتری شد. با افزایش غلظت منگنز، کنترل بیماری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و از ۴۳/۷٪ به ۲۹٪ کاهش یافت. افزودن غلظت ۴ میکرومول مولیبدن اثر قابل ملاحظه‌ای در کارایی بیوکنترلی باکتری نداشت ولی با افزایش غلظت به حد متوسط ۸/۱ میکرومول کارایی باکتری در کنترل بیماری به کمترین مقدار خود رسید که به صورت معنی‌داری پایین‌تر از شاهد بود. با افزایش غلظت، درصد کنترل بیماری نیز افزایش یافت. در مجموع، بیشترین کنترل بیماری توسط آهن در غلظت متوسط ۳۶ میکرومول مشاهده شد. مس در غلظت ۱۴ میکرومول با اختلاف کمی پس از آهن در کنترل بیماری نقش مثبت داشته است. کمترین درصد کنترل بیماری در عنصر مولیبدن با غلظت ۸/۱ میکرومول، منگنز ۵۰ میکرومول و روی ۳۶ میکرومول دیده شد (شکل ۲).



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف عناصر معدنی بر جمعیت باکتری *Bacillus pumilus* INR7. اثر سه غلظت هر عنصر به‌صورت جداگانه در محیط پایهٔ M1 روی رشد جمعیت مورد ارزیابی قرار گرفت. جمعیت‌ها به‌صورت لگاریتم نمایش داده شده‌اند. مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون حفاظت شدهٔ فیشر و در سطح پنج درصد انجام گرفته است. حروف مشابه روی ستون‌ها به‌منزلهٔ عدم اختلاف معنی‌دار بین دو میانگین در نظر گرفته می‌شود.

Figure 1. Effect of different concentrations of microelements on growth of *Bacillus pumilus* INR7. Population data are shown in log scale. Mean compression analysis were done by Fisher protected LSD. Means with same letters do not have significant difference.



شکل ۲. نقش غلظت‌های مختلف عناصر معدنی بر فعالیت بیوکنترلی سویهٔ *Bacillus pumilus* INR7 علیه بیماری مرگ گیاهچهٔ لوبیا با عامل *Rhizoctonia solani* در شرایط گلخانه. سویهٔ باکتری در محیط کشت پایه حاوی ترکیبات مختلف هر عنصر قرار گرفت. بذرهای لوبیا با سوسپانسیون باکتری به‌دست آمده از هر کدام از تیمارها مایه‌زنی شده و در خاک سترون کشت شدند.

Figure 2. Effect of different concentrations of microelements on biocontrol activity of *Bacillus pumilus* INR7 against Bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in greenhouse situation. The bacterium strain was grown in culture media containing different concentration of microelements. Inoculated seed with biocontrol strain were sown in autoclaved soil.

بحث

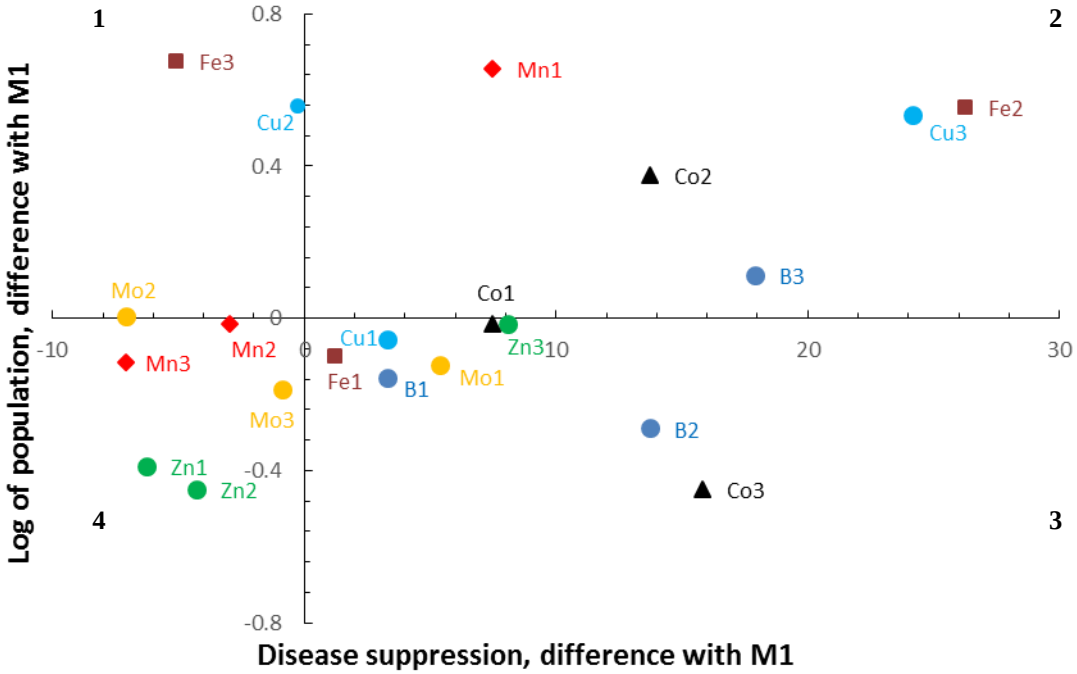
در این پژوهش، هدف این بود که اثر برخی از عناصر معدنی روی فعالیت بیوکنترلی باکتری *B. pumilus* INR7 علیه *R. solani* عامل بیماری مرگ گیاهچهٔ لوبیا بررسی شود. از آن‌جا که محیط کشت باکتری روی بسیاری از ویژگی‌های باکتری به‌خصوص قدرت بقا و دوام آن مؤثر است، در این پژوهش سعی شد تا با به‌کارگیری برخی عناصر معدنی روی محیط کشت باکتری، هم در شرایط آزمایشگاه و هم در گلخانه، تأثیر آن‌ها بر عملکرد باکتری مشخص شود.

در تعیین جمعیت باکتری در حضور عناصر معدنی مختلف عناصر آهن، بُر، مس و روی در غلظت‌های بالا، جمعیت را افزایش دادند، به‌طوری که آهن و بُر به‌ترتیب در غلظت ۷۲ و ۳۹/۲ میکرومول بیشترین افزایش جمعیت را نشان دادند. در مقابل عناصر کبالت و مولیبدن به‌ترتیب در غلظت میانه یعنی ۷ و ۸/۱ میکرومول جمعیت را افزایش دادند. منگنز با افزایش غلظت، جمعیت را کاهش داد؛ یعنی بیشترین جمعیت در کمترین غلظت آن دیده شد. در مجموع بیشترین جمعیت در غلظت ۷۲ میکرومول آهن و کمترین جمعیت در ۷۰ میکرومول روی مشاهده شد.

در مورد اثر باکتری روی درصد کنترل بیماری مرگ گیاهچهٔ لوبیا در حضور عناصر مختلف مشخص شدکه عناصر مس، بُر و روی در غلظت‌های بالا بیماری را کنترل کردند؛ اما آهن برخلاف آزمون قبل در غلظت‌های کم به‌طور معنی‌دار بیماری را کاهش داد. کبالت نیز با افزایش غلظت بیماری را کاهش داد. منگنز نیز در کمترین غلظت بیشترین کنترل را ایجاد کرد. بیشترین کاهش بیماری در غلظت ۳۶ میکرومول آهن و کمترین کاهش در غلظت ۷۰ میکرومول عنصر روی، مشاهده شد.

برای تفسیر بهتر نتایج، شکل (۳) ترسیم شد. در شکل (۳) با استفاده از نمودار پراکنش، غلظت‌های مختلف عناصر معدنی بر اساس چگونگی تأثیر بر تولید زیست‌تودهٔ سویهٔ *B. pumilus* INR7 و کارایی آن در چهار گروه دسته‌بندی شدند. گروه اول شامل سطح دو مس و سطح سه آهن، تولید زیست‌تودهٔ باکتری را افزایش داده ولی کارایی آن در کنترل بیماری را کاهش دادند. مس از عناصر مؤثر این پژوهش بود که با افرایش غلظت، ابتدا باعث افزایش زیست‌تودهٔ باکتری شد و در بیشینهٔ غلظت ۱۴ میکرومول با حفظ اثر مثبت روی زیست‌توده، کارایی باکتری را نیز به‌صورت قابل توجهی

افزایش داد. در مورد سویهٔ *P. fluorescens* CHA0 نیز افزودن مس اثر مثبتی روی کارایی بیوکنترلی این سویه بر کنترل بیولوژیک بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* در گوجه فرنگی داشته است (Duffy and Défago 1999). در مقابل مس باعث کاهش کارایی سویهٔ *P. fluorescens* UTPF61 در کنترل پوسیدگی اسکلروتینیایی آفتابگردان شده است (Ashofteh *et al.* 2009). مس عنصری ضروری برای رشد باکتری‌هاست ولی افزایش غلظت آن می‌تواند باعث بروز فعالیت باکتری‌کشی آن شود. با توجه به حساسیت سویه به این عنصر، بازدارندگی می‌تواند در غلظت‌های مختلفی حادث شود. در مورد *Escherichia coli* غلظت‌های بالای شش میلی‌مول اثر کشندگی داشتند که بسیار بالاتر از غلظت‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر است (Grey and Steck 2001). در مورد عنصر آهن نیز پژوهشگران مختلف اثر دو گانهٔ آن در رشد سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه را گزارش کرده‌اند. شریفی و همکاران گزارش کرده‌اند که افزایش غلظت آهن از طرفی تکثیر باکتری را افزایش می‌دهد و از طرفی به‌شدت تولید سیدروفور را کاهش می‌دهد (Sharifi *et al.* 2006). علاوه بر سیدروفور، متابولیت‌های ثانویهٔ متعددی تحت تنظیم مثبت یا منفی آهن قرار می‌گیرند که بسته به اهمیت آن‌ها در سویهٔ باکتری می‌توانند کارایی باکتری را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهند (Djavaheri *et al.* 2012). در باسیلوس نیز، بسیاری از آنزیم‌های مهم در فیزیولوژی باکتری تحت تنظیم آهن هستند که البته به‌غیر از سیدروفور و زویتروماییسین، نقش آن‌ها در فعالیت بیوکنترلی باکتری ارزیابی نشده است (Milner *et al.* 1995, Smaldone *et al.* 2012). حداقل در مورد باکتری گرم مثبت استرپتومایسس تولید بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها تحت تنظیم آهن است (Weinberg 1969).



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف عناصر معدنی در جمعیت و کارایی بیوکنترلی سویهٔ *Bacillus pumilus* INR7. غلظت‌های گروه اول باعث افزایش جمعیت باکتری شدند، ولی میزان کارایی در کنترل بیماری را کاهش دادند. غلظت‌های گروه دوم هم جمعیت باکتری را افزایش دادند و هم باعث افزایش کارایی باکتری در کنترل بیمارگر شدند. غلظت‌های عنصری گروه سوم باعث کاهش جمعیت باکتری در محیط شدند، ولی کارایی بیوکنترلی آن را بهبود بخشیدند. غلظت‌های موجود در گروه چهارم ضمن کاهش تکثیر باکتری، فعالیت بیوکنترلی آن را نیز کاهش دادند.

Figure 3. Effect of different concentrations of microelements on population growth and biocontrol efficiency of *Bacillus pumilus* INR7. Concentrations in first group increased population growth but reduced biocontrol efficiency. Concentrations in second group improved both population growth and biocontrol efficiency. Concentrations in third group decreased population growth but increased biocontrol efficiency. Concentrations in fourth group not only decreased population growth but also reduced biocontrol efficiency

گروه دوم در نمودار پراکنش تیمارها، شامل پنج تیمار است که ضمن افزایش زیست‌تودهٔ باکتری کارایی بیوکنترلی آن را بهبود بخشیدند. از این تیمارها می‌شود به‌خوبی برای طراحی محیط‌کشت باکتری بهره گرفت. آهن در غلظت دوم (۳۶ میکرومول) نه تنها بیشترین اثر را در افزایش کارایی باکتری داشته است، بلکه در افزایش زیست‌تودهٔ باکتری نیز اثر قابل توجهی ایفا کرده است. حداقل در یک مورد مشخص شده است که آهن نقش مثبتی در تولید آنتی‌بیوتیک زویترومایسین و افزایش کارایی بیوکنترلی باسیلوس داشته است (Milner *et al.* 1995). در مورد سویهٔ *P. fluorescens* 2-79 نیز مشخص شده که غلظت ۳۶ میکرومول بهترین غلظت در تولید آنتی‌بیوتیک فنازین و افزایش کارایی باکتری بوده است (Slininger and Shea-Wilbur 1995). البته با توجه به این که آهن وظایف متعددی را در سلول انجام می‌دهد، می‌تواند بسته به غلظت، نتایج متفاوتی را ظاهر سازد. افزایش غلظت آهن به‌صورت خطی باعث کاهش تولید سیدروفور در *P. fluorescens* شده است و در غلظت‌های بالای ۵۰ میکرومول تولید سیدروفور را به حداقل رسانده است (Sharifi *et al.* 2006). در مجموع، بر اساس نتایج این پژوهش غلظت ۳۶ میکرومول آهن را می‌توان به‌عنوان غلظت مؤثر برای طراحی محیط کشت در نظر گرفت. گروه سوم از تیمارهای آزمایش، شامل هشت تیمار می‌شود که روی رشد باکتری اثر منفی داشتند ولی کارایی بیوکنترلی آن را بهبود بخشیدند. کبالت در غلظت سوم (۱۴ میکرومول) بیشترین اثر را در کاهش جمعیت سویهٔ مورد نظر داشت. در گروه چهارم غلظت‌هایی قرار گرفتند که هم تولید زیست‌توده باکتری را کاهش دادند و هم روی کارایی آن اثر منفی داشتند. در این گروه شش غلظت عنصری قرار می‌گیرد که باید در طراحی محیط کشت، توجه ویژه‌ای به آن‌ها شود. غلظت اول و دوم روی (۳۵ و ۷۰ میکرومول) بیشترین اثر منفی را روی رشد و کارایی باکتری نشان دادند. در پژوهش‌های دیگر نشان داده شده است که عنصر روی اثر چندانی در افزایش جمعیت باکتری سودوموناس نداشته است (Slininger and Jackson 1992) ولی در مقابل، کارایی بیوکنترلی آن را افزایش داده است. این اثر روی، مربوط به نقش مثبت آن در تولید آنتی‌بیوتیک‌های PHL، PLT و فنازین و تولید سیدروفور از نوع پایووردین بوده است (Duffy and Défago 1995, Slininger and Shea-Wilbur 1995) که البته هیچ یک از این متابولیت‌ها توسط سویه‌های باسیلوس تولید نمی‌شود. در این پژوهش مشخص شد که در غلظت ۱۴۰ میکرومول روی، اثر منفی آن روی رشد باکتری از بین رفت و تا حدودی باعث افزایش کارایی باکتری نسبت به محیط پایه شد. شریفی و همکاران نشان دادند که روی تا غلظت ۱۲۵ میکرومول باعث افزایش رشد باکتری سودوموناس می‌شود ولی با افزایش بیشتر آن رشد باکتری کاهش یافت (Sharifi *et al.* 2006). در آن پژوهش مشخص شد تولید سیدروفور نوع پایووردین تا غلظت ۲۵۰ میکرومول روی نیز پاسخ مثبت می‌داد ولی بالاتر از آن تولید سیدروفور کاهش پیدا می‌کرد. لذا در پژوهش‌های آتی می‌توان با غلظت‌های بیشتر، به‌ویژه غلظت‌های بالاتر از ۱۴۰ میکرومول، نقش دقیق روی را بر تولید زیست‌توده و کارایی باکتری مشخص کرد.

در مجموع می‌توان گفت که عناصر معدنی اثرات متفاوتی را روی کارایی بیوکنترلی و افزایش زیست‌تودهٔ باکتری دارند. لذا صرف توجه به تولید زیست‌توده برای دستیابی به حجم بالای سلولی می‌تواند به‌شدت کارایی بیوکنترلی باکتری را تهدید کند. با توجه همزمان به دو ویژگی افزایش تکثیر سلولی و کارایی باکتری همانند آن‌چه که در شکل ۳ قابل مشاهده است می‌توان به غلظتی از عناصر دست یافت که هر دو صفت را در حد مطلوبی بهبود ببخشند. در این پژوهش، به‌ترتیب غلظت ۳۶ و ۱۴ میکرومول دو عنصر آهن و مس قادر بودند هر دو صفت را بهبود بخشند. صرف اضافه کردن منگنز در طراحی محیط کشت این سویه، اهمیت خاصی دارد. ولی افزایش غلظت آن به ۲۵ میکرومول و بالاتر به‌شدت هم روی کارایی بیوکنترلی و هم روی تولید زیست‌تودهٔ سویه نقش منفی دارد.

REFERENCE

Ardalan A, Abbasi S, Sharifi R (2015) Comparison of some commercial *Bacillus* strains on biological control of Bean damping- off caused by *Rhizoctonia solani*, Proceedings of the 8th Congress in Advances in Agricultural Research, University of Kurdestan, Sanandaj. (in Persian)

Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology 62: 4081-4085.

Ashofteh F, Ahmadzadeh M, Fallahzadeh-Mamaghani V (2009) Effect of mineral components of the medium used to grow biocontrol strain UTPF61 of *Pseudomonas fluorescens* on its antagonistic activity against *Sclerotinia* wilt of sunflower and its survival during and after the formulation process. Journal of Plant Pathology 607-613.

Blom D, Fabbri C, Eberl L, Weisskopf L (2011) Volatile-mediated killing of *Arabidopsis thaliana* by bacteria is mainly due to hydrogen cyanide. Applied and Environmental Microbiology 77: 1000-1008.

Bruggen AHCv, Finckh MR (2016) Plant diseases and management approaches in organic farming systems. Annual Review of Phytopathology 54: 25-54.

Buhr TL, McPherson DC, Gutting BW (2008) Analysis of broth-cultured *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus cereusspores*. Journal of Applied Microbiology 105: 1604-1613.

Costa E, Teixidó N, Usall J, Atarés E, Viñas I (2001) Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 367-371.

Djavaheri M, Mercado-Blanco J, Versluis C, Meyer JM, Van Loon LC, Bakker PAHM (2012) Iron-regulated metabolites produced by *Pseudomonas fluorescens* WCS374r are not required for eliciting induced systemic resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Arabidopsis. Microbiology Open 1: 311-325.

Duffy B, Défago G (1995) Influence of cultural conditions on spontaneous mutations in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Phytopathology 85: 1146.

Duffy BK, Défago G (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied and Environmental Microbiology 65: 2429-2438.

Flores ER, Pérez F, de la Torre M (1997) Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. Journal of Fermentation and Bioengineering 83: 561-564.

Grey B, Steck TR (2001) Concentrations of copper thought to be toxic to escherichia coli can induce the viable but nonculturable condition. Applied and Environmental Microbiology 67: 5325-5327.

Gu X-B, Zheng Z-M, Yu H-Q, Wang J, Liang F-L, Liu R-L (2005) Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. Process Biochemistry 40: 3196-3201.

Jeong H, Choi S-K, Kloepper JW, Ryu C-M (2014) Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. Genome Announcements 2: e01093-01114.

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 1: 1.

Lewis JA (1991) Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi, The Rhizosphere and Plant Growth. Springer Nature, pp. 279-287.

Mahadtanap S, Sanguanser M, Cutler RW, Sardsud V, Anuntalabh S (2007) Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus* spp. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 2: 54-61.

Milner JL, Raffel SJ, Lethbridge BJ, Handelsman J (1995) Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin A by *Bacillus cereus* UW85. Applied Microbiology and Biotechnology 43: 685-691.

Ownley BH, Trigiano RN (2016) Plant pathology concepts and laboratory exercises. CRC Press.

Posada-Uribe LF, Romero-Tabarez M, Villegas-Escobar V (2015) Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. Bioprocess and Biosystems Engineering 38: 1879-1888.

Safari Asl F, Rouhani H, Falahati Rastegar M, Jahanbakhsh V (2010) effect of C and N source on the growth and antifungal activity of *Bacillus subtilis* bs against *Pythium aphanidermatum*. Journal of Plant Protection 24: 53-61. (in Persian)

Sharifi R, Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Fallahzadeh V (2006) Competition for iron uptake by fluorescent pseudomonads to control of *Rhizoctonia solani* kuhn causing agent of bean damping-off disease. Journal of Plant Protection 22: 183-195. (In Persian).

Sharifi R, Ryu CM (2017) Chatting with a tiny belowground member of the holobiome: communication between plants and growth-promoting rhizobacteria. Advances in Botanical Research 82: 135-160.

Slininger P, Jackson M (1992) Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied Microbiology and Biotechnology 37: 388-392.

Slininger PJ, Shea-Wilbur MA (1995) Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Applied Microbiology and Biotechnology 43: 794-800.

Smaldone GT, Revelles O, Gaballa A, Sauer U, Antelmann H, Helmann JD (2012) A global investigation of the *Bacillus subtilis* iron-sparing response identifies major changes in metabolism. Journal of Bacteriology 194: 2594-2605.

Weinberg ED (1969) Biosynthesis of secondary metabolites: roles of trace metals. Advances in Microbial Physiology 4: 1-44.