مقاله تحقیقی

جداسازی باکتری‌های اندوفیت توت‌فرنگی و بررسی تأثیرات ضد قارچی آن‌ها بر *Colletotrichum nymphaeae* عامل بیماری آنتراکنوز توت‌فرنگی

زهرا علی‌جانی[۱]، جهانشیر امینی[۱]، مراحم آشنگرف[۲]، بهمن بهرام‌نژاد[۳]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

۲- گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان

۳- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

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

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۲۱ ۸(۱) ۲۹-۴۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۲۹

چکیده

در این مطالعه سویه‌های باکتریایی اندوفیت از بخش‌های استولون و دمبرگ گیاهچه‌های سالم توت‌فرنگی (*Fragaria* × *ananassa*) جداسازی شده و تاثیر آنتاگونیستی این سویه‌ها علیه قارچ عامل آنتراکنوز توت‌فرنگی *Colletotrichum nymphaeae* در شرایط آزمایشگاه، درون شیشه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. سه سویه جداسازی‌شده با استفاده از ویژگی‌های بیوشیمیایی و آنالیز مولکولی ژن *16S rDNA* در جنس *Bacillus* قرار گرفتند. سویه‌های باکتریایی باعث کاهش معنی‌دار رشد قارچ عامل بیمارگر در آزمون کشت متقابل شدند به‌طوری‌که درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در سویه‌های MarD40، MarD35 و MarG2 به‌ترتیب به‌میزان ۵۰، ۵۴/۹۲ و ۴۷/۸۷ درصد ارزیابی شد. ترکیبات فرّار تولید شده توسط سویه‌ها نیز باعث کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر شد ولی این بازدارندگی بسیار کمتر از تاثیر آن‌ها در آزمون کشت متقابل بود و بیشترین درصد بازدارندگی در سویه MarD35 (۲۴/۷ درصد) مشاهده گردید. همچنین در نتیجه تاثیر ترکیبات خارج سلولی سویه‌های باکتریایی بر رشد پرگنه و جوانه‌زنی قارچ بیمارگر بیشترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه توسط سویه MarG2 (۳۴/۹۶ درصد) و بیشترین ممانعت از جوانه‌زنی اسپور بیمارگر توسط سویه MarD35 (۵۲/۰۷ درصد) مشاهده گردید. ارزیابی تاثیر سویه‌های باکتریایی اندوفیت بر شدت بیماری آنتراکنوز میوه در شرایط درون شیشه نشان داد که هر سه سویه قادر به کاهش شدت بیماری آنتراکنوز توت فرنگی هستند و بیشترین تاثیر توسط دو سویه MarD40 با درصد بازدارندگی ۸۵/۶۳ و MarD35 با درصد بازدارندگی ۸۱/۷۲ مشاهده گردید. همچنین سویه‌های باکتریایی به‌میزان قابل توجهی باعث کاهش شدت بیماری آنتراکنوز بر روی گیاهچه‌های توت‌فرنگی در شرایط گلخانه در مقایسه با شاهد شدند که در روش محلولپاشی بیشترین تاثیر در سویه MarD40 (۹۴/۴۴ درصد) و در روش خیساندن خاک در سویه MarD35 (۷۷/۷۷ درصد) ارزیابی شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که سویه‌های مورد بررسی قادر به جلوگیری از رشد و گسترش قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه، درون شیشه و گلخانه می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اندوفیت، ترکیبات ضدقارچی، ترکیبات فرار، کنترل زیستی

مقدمه

توت‌فرنگی (*Fragaria*) متعلق به خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) و گیاه علفی و دولپه است که امروزه گونه تجاری آن *Fragaria* × *ananassa* Duch در سراسر جهان کشت می‌گردد. میوه توت‌فرنگی سرشار از ویتامین‌ها، قندها و مواد معدنی بوده و طعم و عطر مطلوب این میوه سبب محبوبیت این محصول در سراسر جهان شده است. این میوه به دلیل دارا بودن آهن، فیبر، ویتامین ث، کلسیم، پتاسیم،

فسفر و ترکیبات فلاونوئیدی در سلامتی انسان نقش بسزایی دارد. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در میوه تاثیرات ضدسرطان، ضد تومور داشته و از بیماری‌های قلبی و عروقی جلوگیری می‌کند (Konczak & Zhang, 2004). در ایران، استان کردستان به‌عنوان یکی از مهمترین منطقه کشت توت‌فرنگی مطرح می‌باشد (Karimi *et al*., 2019). آفات و بیماری‌های زیادی کشت این محصول را محدود می‌کند که بیماری آنتراکنوز یکی از مهمترین آن‌ها می‌باشد. در این بیماری همه قسمت‌های گیاه از جمله طوقه، میوه، برگ‌ها، دمبرگ و استولون یا ساقه خزنده به قارچ عامل بیماری حساسیت نشان می‌دهند. در روی میوه نارس و رسیده در اثر حمله عامل بیمارگر لکه های قهوه‌ای تا سیاه و آبسوخته ایجاد می‌گردد که این لکه‌ها در شرایط مرطوب گسترش می‌یابند. در روی برگ‌ها و دمبرگ گیاه لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه ایجاد شده و پوسیدگی طوقه سبب پژمردگی و مرگ گیاه می‌گردد (Curry *et al*., 2002). آنتراکنوز توت‌فرنگی در اثر چند گونه *Colletotrichum* spp. ایجاد می‌گردد که موجب کاهش شدید محصول شده و گیاه در همه مراحل رشدی به آلودگی قارچ حساسیت نشان می‌دهد (Cai *et al*., 2009). جنس *Colletotrichum* متعلق به شاخه Ascomycota، زیرشاخه Pezizomycotina، رده Sordariomycetes، راسته Glomerellales و خانواده Glomerellaceae می‌باشد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند شکل و اندازه کنیدی، وجود خار و چنگک، اسکلروت، آسروول، فرم جنسی، ویژگی‌های کشت مانند رنگ پرگنه و میزان رشد آن در شناسایی گونه‌های مختلف *Colletotrichum* به کار می‌رود (Sutton, 1992). به منظور مدیریت بیماری آنتراکنوز در مزرعه و گلخانه روش‌های مختلفی انجام می‌گردد که شامل روش‌های زراعی، کاربرد سموم شیمیایی و ارقام مقاوم می‌باشد (Karimi *et al*., 2017). به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی و بروز مقاومت در عوامل بیمارگر ناشی ازکاربرد بیش از حد قارچکش‌های شیمیایی، روش‌های جایگزین بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند که یکی از این روش‌ها کاربرد عوامل بیوکنترل می‌باشد. میکروارگانیسم‌هایی که باعث سرکوب عوامل بیمارگر می‌شوند را در اصطلاح عوامل کنترل زیستی می‌نامند. این عوامل می‌توانند به صورت مستقیم (پارازیتیسم، آنتی‌بیوز، تولید متابولیت‌های سلولی) و غیر مستقیم (رقابت بر سر مکان و مواد غذایی) از فعالیت عوامل بیماری‌زا ممانعت کنند (Pal & Gardener, 2006). کاربرد اندوفیت‌ها در کنترل عوامل بیمارگر در مقایسه با سایر عوامل بیوکنترل دارای مزایای بیشتری است، زیرا این عوامل بافت‌های داخلی گیاه را کلونیزه کرده و توسط میزبان محافظت شده و کمتر تحت‌تاثیر تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند (Collinge *et al*., 2019). کاربرد روش‌های کنترل زیستی نسبت به سایر روش‌ها در دراز مدت، مقرون به صرفه و ارزان‌تر است. عوامل بیوکنترل در برابر بیماری‌های گیاهی بسیار موثر بوده و روی گیاه میزبان ایجاد مسمومیت نمی‌کنند. این عوامل برای محیط زیست امن بوده و باعث آلودگی زیست‌محیطی نمی‌شوند، همچنین به آسانی در خاک تکثیر شده و باعث حذف عامل بیمارگر در محل آلودگی می‌گردند. این میکروارگانیسم‌ها علاوه بر کنترل بیماری سبب افزایش رشد گیاه و افزایش عملکرد آن شده و نیز قابلیت اختلاط با کودهای زیستی را دارند (Chandrashekara *et al*., 2012). میکروارگانیسم‌های موجود در داخل بافت‌های هوایی، زیرزمینی و بذر گیاه که دارای اثرات مثبت روی رشد و توسعه گیاه هستند به‌عنوان اندوفیت شناخته می‌شوند (Chebotar *et al*., 2015). به‌عبارت دیگر، میکروارگانیسم‌هایی که توانایی کلونیزاسیون بافت‌های داخلی گیاهان بدون ایجاد بیماری و تاثیرات مضر بر رشد و توسعه گیاهی را دارند به‌عنوان اندوفیت مطرح می‌باشند (Schulz & Boyle, 2006). این میکروارگانیسم‌ها محیط داخلی گیاه (اندوسفر) را به‌عنوان یک نیچ اکولوژیکی منحصر به فرد اشغال کرده و از آن‌ها در برابر تغییرات و تنش‌های محیطی محافظت می‌کنند، بطوری‌که این پدیده طی صدها میلیون سال تکامل یافته است (Krings *et al*., 2007). این موجودات می‌توانند از طریق بذر، ریشه و زخم‌های ایجاد شده به گیاه منتقل گردند (Chebotar *et al*., 2015). همچنین می‌توانند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم از توسعه بیمارگرهای گیاهی ممانعت

کرده و از طریق افزایش حلالیت فسفر، تولید ایندول استیک اسید، تولید سیدروفور و ذخیره ویتامین‌های ضروری سبب افزایش رشد گیاهان گردند (Ryan *et al*., 2008). هدف از انجام این پژوهش، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ عامل بیماری آنتراکنوز توت‌فرنگی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

قارچ بیمارگر

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

نمونه‌برداری

در ماه‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۵ در مزارع توت-فرنگی مناطق مریوان از بوته‌های سالم به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت نمونه‌برداری انجام شد.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

ابتدا بوته‌های سالم توت‌فرنگی به منظور حذف ذرات گل و لای در زیر جریان آب، شستشو داده شد. سپس قسمت‌های مختلف بافت گیاهی از هر نمونه شامل ریشه، طوقه، برگ، دمبرگ، گلبرگ، دم میوه، ساقه، استولون، میوه نارس و میوه رسیده به قسمت‌های کوچک تقسیم گردید. به منظور ضدعفونی، هر بخش از نمونه‌ها یک دقیقه در اتانول ۷۰٪، ۲–۴ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪، ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ قرار داده شد و سپس سه بار با آب مقطر سترون هر کدام به مدت یک دقیقه شستشو داده شد. هر بخش از نمونه‌ها بعد از قرار دادن در آب مقطر سوم در هاون سترون قرار داده شد و به هر کدام ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید و کوبیده شد و به مدت ۳۰ دقیقه به منظور خروج باکتری‌ها به محیط اطراف رها گردید. سپس از سوسپانسیون مربوط به هر نمونه به طور جداگانه ۵۰ میکرولیتر روی محیط‌های Nutrient agar (NA)، King's B و Tryptic soy agar (TSA) کشت چمنی انجام گردید و نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد (Costa *et al*., 2012). سپس پرگنه‌هایی که از نظر رنگ، شکل و اندازه متفاوت بودند، انتخاب و روی محیط کشت NA به صورت خطی کشت و خالص گردید. پس از رشد سویه‌ها در محیط NB، گلیسرول سترون به نسبت ۲۰ ٪ حجمی به نمونه‌ها اضافه و در فریزر ۷۰– درجه سلسیوس نگهداری شد.

واکنش فوق حساسیت

به منظور بررسی عدم بیماری‌زایی سویه‌های باکتریایی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه و باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* به‌عنوان شاهد مثبت با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون به برگ‌های گیاهچه‌های سه ماهه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) توسط سرنگ، تلقیح گردید و نتایج بعد از گذشت ۹۶ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت (Ben Abdallah *et al*., 2016).

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه‌های باکتریایی

جهت بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی هر سویه آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرام، کاتالاز، فسفاتاز، اکسیداز، لیپاز، اوره‌آز، مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته، ذوب ژلاتین، تولید سولفید هیدروژن، تولید گاز از گلوکز، احیای نیترات و آزمایش اکسیداسیون و احیاء بر اساس روش‌های معمول در باکتری‌شناسی گیاهی انجام شد (Schaad *et al*,. 2001).

بررسی تولید ترکیبات محرک رشد گیاه توسط سویه‌های باکتریایی

آزمون تولید اندول استیک اسید

سویه‌های باکتریایی در پنج میلی‌لیتر محیط غذایی LB (Luria–Bertani) در غیاب و یا به همراه ۰/۲ حجمی ال–تریپتوفان کشت و به مدت ده روز در شرایط بدون روشنایی بر روی دستگاه لرزاننده با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها جهت اطمینان از رشد

سویه‌های باکتری با نمونه‌های شاهد مقایسه و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ گردید و دو میلی‌لیتر از فاز رویی به لوله آزمایش جدید منتقل و دو برابر حجم آن Salkowski reagent (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeSO_4.6H_2O$ ۰/۵ مولار) اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و تغییر رنگ ایجاد شده در هر سویه بررسی گردید. سپس ضریب جذب در ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (SPECORD® PC/210, Analytik jena, Germany) قرائت و با منحنی استاندارد مقایسه و غلظت هورمون در هر نمونه ارزیابی شد (Ben Abdallah *et al.*, 2016)

آزمون تولید جیبرلین

سویه‌های باکتریایی در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط Jensen broth (Sucrose 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 به مدت ۷ روز بر روی دستگاه لرزاننده با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ و پس از حذف رسوب، اسیدیته فاز رویی با اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار به ۱–۲ رسانده شد. مایع به بورت منتقل و سه بار با حجم مساوی از اتیل استات مخلوط گردید. فاز استخراج شده با بافر فسفات مخلوط و ضریب جذب در ۲۵۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و مقدار جیبرلین تولید شده توسط هر سویه با رسم منحنی استاندارد ارزیابی شد (Holbrook *et al.*, 1961).

آزمون تولید آنزیم حل‌کننده فسفات

به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم حل‌کننده فسفات، سویه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای بر روی محیط کشت Pikovskaya حاوی $Ca_3(PO_4)_2$ کشت و در انکوباتور در دمای ۲۶±۲ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت هفت روز، تشکیل هاله شفاف اطراف کلونی‌های باکتری ارزیابی شد (Dias *et al.*, 2009).

بررسی توانایی تولید سیدروفور

به منظور تهیه محیط کشت CAS–agar مقدار ۰/۰۶ گرم ماده CAS در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید، سپس به آن ۱۰ میلی‌لیتر محلول $FeSO_4.6H_2O$ یک میلی‌مولار در محلول ۱۰ میلی‌مولار اسید کلریدریک اضافه شد. در این حالت رنگ محلول قرمز جگری می‌شود. در ادامه ۴۰ میلی‌لیتر محلول HDTMA حین تکان دادن به محلول فوق اضافه شد که رنگ محلول آبی تیره می‌گردد و این محلول اتوکلاو گردید. همچنین محیط کشت LB تهیه و اسیدیته آن به ۶/۸ رسانده شد و اتوکلاو شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول CAS–HDTMA با ۹۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت سترون در زیر هود مخلوط شد. در تشتک پتری‌ها، ابتدا محیط کشت باکتری ریخته شد و پس از سرد شدن، نیمی از آن توسط تیغه سترون حذف و به جای آن محیط آماده شده CAS–HDTMA مخلوط شده با محیط LB ریخته شد و سویه‌های باکتریایی به صورت خطی در مرز بین دو محیط، کشت گردید سپس در شرایط تاریکی در دمای ۲۶±۲ درجه سلسیوس نگهداری شد. تشکیل هاله رنگی در اطراف سویه‌ها بررسی شد (Schwyn & Neilands, 1987; Louden *et al.*, 2011; Arora and Verma, 2017).

بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها

تولید سیانید هیدروژن

به این منظور سویه‌های باکتریایی بر روی محیط NA کشت گردید و در درب ظروف پتری کاغذ صافی سترون آغشته با محلول ۲ ٪ Na2CO3 و ۵ ٪ Picric acid قرار داده و با پارافیلم پوشانده شد. پتری‌ها در دمای ۲۶±۲ درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد کم رنگ تا قرمز پر رنگ مورد بررسی قرار گرفت (Alstrom & Burns, 1989).

تولید آنزیم پروتئاز

به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم پروتئاز از محیط کشت اسکیم میلک ۳٪ سترون شده به روش تندالیزاسیون استفاده شد. سویه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای روی محیط، کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲±۲۶ درجه سلسیوس نگهداری و سپس ایجاد هاله شفاف در اطراف کلونی‌های باکتریایی بررسی شد (Tiru *et al*., 2013).

تولید آنزیم کیتیناز

به منظور تهیه کلوییدال کیتین، چهار گرم از پودر کیتین تجاری با ۱۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریدریک ۱۰ نرمال مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۹۹۰ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰٪ به آن اضافه گردید و بعد از گذشت ۲۴ ساعت در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل دوبار با اتانول ۷۰٪ شستشو و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Mathivanan *et al*., 1997). به منظور بررسی توانایی تولید کیتیناز در سویه‌های باکتریایی محیط کشت حاوی کلوییدال کیتین ۵ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۲ گرم، NaCl ۰/۱ گرم، آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطر تهیه و سترون گردید. سپس سویه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای کشت شد و به مدت ۴ روز در دمای ۲±۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شد. ایجاد هاله شفاف اطراف کلونی با محلول لوگول بررسی شد (Shanmugaiah *et al*., 2008).

تولید آنزیم پکتیناز

به منظور تهیه پودر پکتین از میوه سیب استفاده گردید. ابتدا اسیدیته ۴۰۰ میلی‌لیتر آب با اسید هیدروکلریک به ۱/۵ رسانده شد. سپس به آن ۲۰۰ گرم میوه سیب رنده شده اضافه و روی حرارت در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار داده و با همزن شیشه‌ای مدام به هم‌زده شد تا غلیظ گردید. محلول غلیظ شده با استفاده از تنظیف پارچه‌ای چندین مرتبه صاف شد و محلول صاف شده مجددا روی حرارت قرار داده شد تا حجم آن نصف گردید. سپس ۷۵٪ حجم محلول، اتانول ۹۶٪ به تدریج اضافه شد تا پکتین به صورت ژله‌ای به سطح محلول آمد. پکتین حاصل در آون در درجه ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس پودر شد (Giovanetti Canteri *et al*., 2005). برای بررسی توانایی تولید آنزیم پکتیناز، از محیط Vincent'agar حاوی Sucrose ۱ گرم، KNO_3 ۰/۶ گرم، KH_2PO_4 ۱ گرم، $MgSO_4.7H_2O$ 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 استفاده گردید. پس از سترون شدن، سویه‌های باکتریایی به صورت نقطه‌ای کشت و در دمای ۲±۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت چهار روز ایجاد هاله شفاف توسط محلول لوگول (۶ گرم یدید پتاسیم و ۳ گرم ید در یک لیتر آب مقطر) ارزیابی شد (Aaisha & Barate, 2016).

آزمون‌های کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاه

بررسی اثرات ضد قارچی سویه‌های بیمارگر با روش کشت متقابل

در این روش سویه‌های باکتریایی در یک طرف تشتک پتری‌های حاوی محیط Potato dextrose agar (PDA) به صورت خطی کشت شدند و در طرف مقابل یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر قرار داده شد. در تیمار شاهد دیسک قارچ به تنهایی کشت گردید. پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از گذشت هفت روز قطر کلونی قارچ اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید. درصد بازدارندگی هر سویه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moreira *et al*., 2014).

۱۰۰×(میانگین رشد قارچ در شاهد/میانگین رشد قارچ در تیمار−میانگین رشد قارچ در شاهد)=درصد بازدارندگی

بررسی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های فرار تولید شده توسط سویه‌های باکتریایی بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر

به منظور بررسی تاثیرات ضد قارچی ترکیبات فرار، سویه‌های باکتریایی بر روی محیط NA به صورت چمنی کشت گردید. همچنین یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز تشتک پتری‌های حاوی محیط PDA قرار داده شد. در شرایط سترون تشتک پتری‌های حاوی قارچ بیمارگر روی تشتک پتری‌های باکتریایی قرار داده شد و با پارافیلم محکم پوشانده شد. در تیمار شاهد تشتک پتری حاوی قارچ بیمارگر بر روی محیط‌کشت بدون تلقیح باکتری قرار داده شد. تشتک پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز قطر کلونی قارچ اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید. درصد بازدارندگی طبق فرمول ذکر شده در بخش بررسی اثرات ضد قارچی سویه‌های بیمارگر با روش کشت متقابل محاسبه گردید(Gao *et al*., 2017).

بررسی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های خارج سلولی تولید شده توسط سویه‌های باکتریایی بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر

ابتدا سویه‌های باکتریایی در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۵ میلی‌لیتر محیط مایع سترون کشت و به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه لرزاننده با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت در ۵۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی از فیلتر سرنگی قطر ۰/۲۲ میکرون ساخت شرکت Millipore تحت شرایط سترون عبور داده شد. به منظور بررسی تاثیر متابولیت‌های استخراج شده از هر سویه از پتری‌های سه بخشی حاوی محیط PDA استفاده شد. یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز هر قسمت قرار داده شد و به فاصله ۲۵ میلی‌متر از دیسک قارچ، یک چاهک پنج میلی‌متری ایجاد و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره فیلتر شده هر سویه در هر چاهک ریخته شد. در تیمار شاهد در چاهک، محیط کشت تلقیح نشده اضافه گردید. تشتک پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز قطر کلونی در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی طبق فرمول ذکر شده در بخش بررسی اثرات ضد قارچی سویه‌های بیمارگر با روش کشت متقابل محاسبه شد (Jangir *et al*., 2018).

بررسی 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 ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب در لوله‌های حاوی پنج میلی‌لیتر محیط Potato dextrose broth (PDB) مخلوط و روی دستگاه لرزاننده با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شد. در تیمار شاهد سوسپانسیون اسپور بدون اضافه کردن متابولیت استفاده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان جوانه‌زنی، توسط میکروسکوپ نوری ارزیابی گردید و درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه شد (Mohammadi *et al*., 2017; Saechow *et al*., 2018).

۱۰۰×(اسپورهای جوانه‌زده در شاهد/ اسپورهای جوانه‌زده در تیمار−اسپورهای جوانه‌زده در شاهد)= درصد بازدارندگی

آزمون کنترل زیستی در شرایط درون شیشه‌ای

این آزمون به منظور تاثیر سویه‌های باکتریایی بر مهار بیماری آنتراکنوز در میوه ارزیابی شد. ابتدا میوه‌های توت-فرنگی سالم و هم‌اندازه انتخاب و با آب معمولی جهت حذف ذرات خاک شستشو شد. سپس میوه‌ها به منظور ضدعفونی سطحی به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ٪۷۰ قرار داده شد و پس از آن سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد و روی کاغذ صافی سترون خشک گردید. میوه‌های ضدعفونی شده برای هر تیمار، جداگانه در سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت پنج دقیقه قرار داده شد و پس از آن در بسته‌های سترون قرار داده شد و در دمای۲±۲۵ درجه

سلسیوس نگهداری شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت هر میوه با سوزن سترون خراش داده شد و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب در محل زخم تلقیح گردید و مجددا در بسته‌های خود قرار داده شدند. در تیمار شاهد مثبت فقط سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت ذکر شده تلقیح گردید و در تیمار شاهد منفی آب مقطر سترون به میوه‌ها تلقیح شد و در دمای ذکر شده به مدت هفت روز نگهداری گردید (Huang *et al.*, 2011). پس از آن شعاع و ارتفاع هر میوه اندازه‌گیری و با در نظر گرفتن آن به صورت یک مخروط مساحت سطح آلوده در هر میوه نسبت به سطح سالم آن توسط نرم‌فزار اتوکد ارزیابی گردید (Souza *et al.*, 2019) 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

آزمون کنترل زیستی در شرایط گلخانه

جهت بررسی تاثیر سویه‌های باکتریایی در مهار بیماری آنتراکنوز از دو روش خیساندن خاک (soil drenching) و محلولپاشی استفاده شد. ابتدا گیاهچه‌های پنج هفته‌ای توت-فرنگی رقم پاروس در کیسه‌های پلاستیکی کشت شدند. سپس در روش خیساندن خاک ۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر سویه باکتری با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب در پای ریشه ریخته شد. در روش محلولپاشی، پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون هر سویه باکتری با غلظت مشابه بر روی اندام-های هوایی اسپری شد و گلدان‌ها در شرایط گلخانه 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 در تیمار شاهد منفی آب مقطر سترون محلولپاشی شد (Freeman *et al.*, 2001; Rakotoniriana *et al.*, 2013). گیاهچه‌ها در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس در گلخانه نگهداری شدند و شدت بیماری بعد از گذشت ۶۰ روز ارزیابی شد.

ارزیابی شاخص‌های بیماری روی دمبرگ به روش (1980) Delp & Milholand به صورت ذکر شده در 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

پس از ارزیابی شاخص در شاهد و تیمار درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

۱۰۰ ×(شاخص بیماری در شاهد/شاخص بیماری در تیمار– شاخص بیماری در شاهد)=درصد بازدارندگی

تشخیص مولکولی باکتری‌های اندوفیت

ابتدا استخراج DNA به روش Murray & Thompson (1980) انجام و به منظور شناسایی سویه‌های باکتریایی از آغازگرهای عمومی ژن *16S rDNA*، (´۳–AGAGTTTGATCATGGCTCAG–´۵) FD2 و(´۳–ACGGTTACCTTGTTACGACTT–´۵) RP1 استفاده شد (Weisburg *et al.*, 1991). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل BIO RAD T100™ با حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر از هر آغازگر، یک میکرولیتر DNA و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون انجام شد. چرخه حرارتی به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس شروع و در ادامه به صورت ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه در نظر گرفته شد.

محصول واکنش PCR در روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی گردید (Bereswill *et al*., 1995).

تعیین توالی محصول PCR و آنالیز فیلوژنتیکی

توالی‌یابی محصول واکنش PCR برای هر سویه توسط ABI3730xl DNA sequencer شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد و توالی‌های دریافتی 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 نرم‌افزارMEGA7 انجام شد (Hall, 1999).

تکثیر ژن‌های اختصاصی لیپوپپتید در گونه‌های باسیلوس

به منظور انجام واکنش PCR برای سه ژن *FenD*، *ItuD* و*srfAA* از سه جفت آغازگر اختصاصی استفاده گردید. آغازگرهای (۳´–TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT–۵´) FenD1f و (۳´–GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC–۵´) FenD1r برای ژن *FenD* با طول قطعه تکثیری ۹۶۴ جفت بازی و (۳´–GATGCGATCTCCTTGGATGT–۵´) ItuD1f و (۳´– ATCGTCATGTGCTGCTTGAG –۵´) ItuD1r برای ژن *ItuD* با طول قطعه تکثیری ۶۴۷ جفت بازی، چرخه حرارتی به صورت واسرشت سازی اولیه پنج دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و۳۰ 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 در نظر گرفته شد (Gond *et al*., 2015). شرایط واکنش برای ژن *srfAA* با آغازگرهای (۳´– TCGGGACAGGAAGACATCAT –۵´) SRFAF و (۳´– CCACTCAAACGGATAATCCTGA –۵´) SRFAR با طول قطعه تکثیری ۲۰۱ جفت بازی 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 انجام شد (Mora *et al*., 2011). ارزیابی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام گردید.

نتایج

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

در این تحقیق سویه MarD40 و MarG2 از استولون و سویه MarD35 از دمبرگ گیاهچه‌های سالم مزارع توت‌فرنگی شهرستان مریوان استان کردستان جداسازی شد.

آزمون فوق حساسیت

انجام آزمون فوق حساسیت بر روی گیاهچه‌های توتون پس از ۹۶ ساعت هیچ علائم نکروزی را توسط هیچ‌یک از سویه‌ها نشان نداد در صورتی که در شاهد مثبت پس از گذشت ۲۴ ساعت علائم نکروز را مشاهده گردید.

بررسی تولید ترکیبات محرک رشد گیاه توسط سویه‌های باکتریایی

هر سه سویه باکتریایی توانایی تولید هورمون‌های گیاهی ایندول استیک اسید (IAA) و جیبرلین را داشتند ولی این توانایی در سویه MarG2 بیشتر بود. توانایی حلالیت فسفات در سویه‌های MarD35 و MarG2 مشاهده گردید. همچنین توانایی تولید سیدروفور در هر سه سویه مشاهده شد اگرچه این توانایی در سویه MarD40 ضعیف‌تر از دو سویه دیگر بود. در بین سویه‌های مورد بررسی فقط سویه MarD40 قادر به تثبیت ازت بود و این توانایی در دو سویه دیگر مشاهده نشد (جدول ۱).

بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها

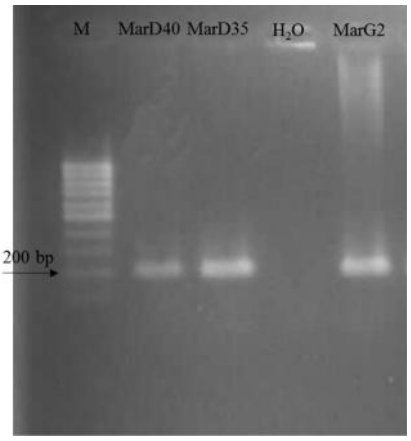
بررسی‌ها نشان داد که توانایی تولید سیانید هیدروژن (HCN) در هیچ‌یک از سویه‌ها مشاهده نشد. توانایی تولید آنزیم کیتیناز در همه سویه‌ها وجود داشت ولی در سویه MarD40 با قدرت کمتری نسبت به دو سویه دیگر تولید شد. همچنین توانایی تولید آنزیم پروتئاز فقط در دو سویه MarD35 و MarG2 مشاهده گردید و سویه MarD40 قادر

به تولید این آنزیم نبود. توانایی تولید آنزیم پکتیاز نیز فقط در دو سویه MarD40 و MarD35 مشاهده شد (جدول ۱).

شناسایی سویه‌های باکتریایی اندوفیت

سویه‌های باکتریایی توسط آغازگرهای FD2 و RP1 بررسی و قطعه ژنومی *16S rDNA* به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد و توالی‌یابی توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام گردید. پس از انجام BLAST در سایت NCBI شباهت‌یابی توالی‌های سویه‌های باکتریایی با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. نتایج بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد که سویه‌های باکتریایی متعلق به جنس *Bacillus* می‌باشند که سویه MarD40 با ۹۷/۷۷٪ به گونه *B. tequilensis*، سویه MarD35 با ۹۶/۶۶٪ به گونه *B. licheniformis* و سویه MarG2 با ۹۹/۷۹٪ به گونه *B. subtilis* شباهت داشتند. اعضای جنس *Bacillus* متعلق به شاخه Firmicutes، رده Bacilli، راسته Bacillales، خانواده Bacillaceae می‌باشند. اعضای این خانواده گرام مثبت و میله‌ای شکل بوده و ریخت‌شناسی پرگنه در بین گونه‌ها اشکال متفاوتی دارد. گونه‌های مختلف این جنس کاتالاز مثبت بوده و می‌توانند اکسیداز مثبت یا منفی باشند و قادر به تولید اسپور هستند. بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی نشان داد که سویه MarD40 اکسیداز منفی بوده و توانایی حلالیت ژلاتین را ندارد. این سویه بر روی محیط کشت NA، تولید کلونی‌های با رنگ صورتی روشن، صاف، محدب با کناره‌های مشخص می‌کند. سویه MarD35 نیز دارای کلونی‌های کدر، چسبیده به سطح محیط کشت و کناره های نامنظم بوده و توانایی مصرف سیترات را ندارد. کلونی‌های سویه MarG2 دارای رنگ سفید تا کرم با حاشیه‌ای مضرس بوده که به صورت سطحی رشد می‌کند. ویژگی‌های بیوشیمیایی این سویه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

توالی‌های ژن *16S rDNA* سویه باکتریایی MarD40 با شماره دسترسی MH161579 ، سویه MarD35 با شماره دسترسی MH161575 و سویه MarG2 با شماره دسترسی MH161572 در بانک ژن ثبت شدند. بررسی توانایی تولید لیپوپپتیدهای فنجایسین، ایتورین و سورفکتین نشان داد که فقط توانایی تولید لیپوپتید سورفکتین در هر سه سویه مورد بررسی مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱– لیپوپتید سورفکتین. قطعه ۲۰۱ جفت بازی در هر سویه نشان‌دهنده وجود ژن اختصاصی لیپوپپتید سورفکتین می‌باشد. .(M) 1 Kb DNA ladder

Fig 1. Surfactin lipopeptide. The 201 bp fragment in each isolate indicates the presence of a surfactin–specific lipopeptide gene. 1 Kb DNA ladder (M).

آزمون‌های کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاه

بررسی توانایی سویه‌های باکتریایی در آزمون کشت متقابل حاکی از آن است که هر سه سویه باکتریایی قادر به جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان دادند. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر به ترتیب در سویه MarD35، ٪۵۴/۹۲، در سویه MarD40، ٪۵۰ و در سویه MarG2 به میزان ٪۴۱/۸۷ ارزیابی شد. همچنین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در آزمون توانایی تولید ترکیبات فرار برای سویه MarD40، MarD35 و MarG2 به میزان ٪۱۳/۶۹، ۲۴/۷ و ۳/۸۶ ارزیابی گردید که فقط در سویه MarD35 این تفاوت معنی‌دار بود. توانایی سویه‌های باکتریایی در تولید ترکیبات خارج سلولی با خاصیت آنتاگونیستی نشان داد که با توجه به درصد بازدارندگی در سویه‌های باکتریایی MarD40 (٪۲۰/۹۷)، MarD35 (٪۲۳/۰۷) و MarG2 (٪۳۴/۹۶) ترکیبات خارج سلولی تولید شده توسط این سویه‌ها باعث کاهش معنی‌دار رشد پرگنه قارچ بیمارگر نسبت به شاهد شدند (جدول ۲).

درصد بازدارندگی از جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر در سویه MarD35، ٪۵۲/۰۷، در سویه MarD40، ٪۲۷/۴۱ و در سویه MarG2 به میزان ۲۷/۴۱ درصد برآورد گردید (جدول۳).

جدول ۱– ویژگی‌های بیوشیمیایی سویه‌های باکتریایی

Table 1. Biochemical characteristics of bacterial isolates

Taxonomic/Functional traits	MarD40	MarD35	MarG2
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_2S production	–	–	–
Gas from glucose agar	–	–	–
Urease	++	++	–
Oxidative fermentative (OF)	+	+++	+++
Hypersensitive Response Test	–	–	–

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

+ represents production, – represents 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 ۷ روز در شرایط آزمایشگاه.

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

Treatments	Dual culture		Volatile metabolite		Non–volatile metabolite	
	Colony diameter (mm)	Inhibition %	Colony diameter (mm)	Inhibition %	Colony diameter (mm)	Inhibition %
MarD40	2.03 ± 0.05 bc	50	2.9 ± 0.17 ab	13.69	1.13 ± 0.11 b	26.54
MarD35	1.83 ± 0.20 c	54.92	2.53 ± 0.64 b	24.7	1.1 ± 0.00 b	23.07
MarG2	2.36 ± 0.15 b	41.87	3.23 ± 0.05 a	3.86	0.93 ± 0.15 b	34.96
Control	4.06 ± 0.30 a	–	3.36 ± 0.15 a	–	1.43 ± 0.2 a	–

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی‌دار 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 هفت روز در شرایط درون شیشه و تاثیر ترکیبات خارج سلولی سویه‌های باکتریایی بر جوانه زنی اسپور قارچ بیمارگر.

Table 3. Effect of bacterial isolates on fruit decay development *in vivo* after 7 days and Efficacy of the cell free culture filtrates of bacterial strain on conidial germination of *Colletotrichum nymphaeae*

Treatments	Living cell		Conidial germination	
	Disease severity	Biocontrol efficacy (%)	Germinated conidia	Biocontrol efficacy (%)
MarD40	0.043 ± 0.016 b	85.63	17.66± 2.08 ab	27.41
MarD35	0.055 ± 0.019 b	81.72	11.66 ± 1.15 b	52.07
MaeG2	0.119 ± 0.068 b	60.63	17.66± 0.57 ab	27.41
Control	0.302 ± 0.066 a	–	24.33 ± 7.5 a	–

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی‌دار 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).

آزمون کنترل زیستی در شرایط درون شیشه و گلخانه

ارزیابی درصد بازدارندگی از شدت بیماری‌زایی قارچ عامل آنتراکنوز روی میوه در حضور سویه‌های باکتریایی اندوفیت نشان داد که هر سه سویه باعث جلوگیری از ایجاد علائم قارچ بیمارگر شده و این کاهش در هر سه سویه نسبت به شاهد معنی‌دار می‌باشد. درصد بازدارندگی از شدت بیماری در سویه MarD40، ٪۸۵/۶۳، در سویه MarD35، ٪۸۱/۷۲ و در سویه MarG2 به میزان ٪۶۰/۶۳ محاسبه شد (جدول ۳).

همچنین بررسی تاثیر این سویه‌ها بر کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه حاکی از کاهش علائم بیماری هم در روش اسپری و هم خیساندن خاک می‌باشد. درصد بازدارندگی در سویه MarD40، MarD35 و MarG2 در روش اسپری به ترتیب ۴۱/۱۷، ۷۷/۷۷ و ۶۱/۱۱ درصد و در روش خیساندن خاک به ترتیب ۹۴/۴۴، ۵۵/۵۵ و ۵۰ درصد به‌دست آمد (جدول ۴).

جدول ۴– تاثیر سویه‌های باکتریایی بر شدت بیماری آنتراکنوز پس از ۶۰ روز تحت شرایط گلخانه

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

Treatments	Soil drench		Plant spraying	
	Disease severity	Disease reduction (%)	Disease severity	Disease reduction (%)
MarD40	2.75 ± 1.25 ab	41.17	0.25 ± 0.5 b	94.44
MarD35	1.00 ± 2.00 b	77.77	2.00 ± 2.30 b	55.55
MarG2	1.75 ± 2.06 b	61.11	2.25 ± 2.06 ab	50
Control	4.50 ± 0.57 a	–	4.50 ± 0.57 a	–

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی‌دار 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).

بحث

بیماری آنتراکنوز توسط گونه‌های قارچ *Colletotrichum* spp. ایجاد و به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های توت‌فرنگی پس از بیماری پوسیدگی خاکستری مطرح می‌باشد. گونه مرکب *C. acutatum* عامل اصلی پراکنش بیماری در دنیا بوده و محققین بیماری‌شناسی نیز همین گونه را در مزارع توت‌فرنگی کردستان گزارش کرده‌اند (Karimi *et al*., 2017). مطالعات چند فازی نشان داد که این گونه مرکب شامل ۳۱ گونه بوده که شش گونه قادر به ایجاد بیماری آنتراکنوز روی توت‌فرنگی می‌باشند.

در این پژوهش گونه *C. nymphaeae* از کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی انتخاب گردید. تحقیقات قبلی نشان می‌دهند که این گونه خسارت اقتصادی زیادی را بر روی میوه در استان کردستان ایجاد می‌کند (Karimi *et al*., 2017).

امروزه با توجه به کاربرد بیش از اندازه سموم شیمیایی و آلودگی‌های زیست‌محیطی برای مدیریت بیماری آنتراکنوز در مزارع توت‌فرنگی، هدف اصلی تحقیقات صورت گرفته مبتنی بر یافتن روش‌های جایگزین مناسب برای مدیریت و کاهش خسارت بیماری می‌باشد. از این رو کاربرد باکتری‌های مفید در حفاظت محصول از طریق رقابت بر سر غذا و مکان، کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی، تولید هورمون‌های گیاهی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، سیدروفورها، ترشح ترکیبات ضد قارچی و القا مقاومت سیستمیک به‌عنوان روش جایگزین و موثر، مطرح می‌باشد (Duffy & Défago, 1999; Whipps, 2001; Bhattacharyya & Jha, 2012). در این راستا تاثیر چندین سویه باکتری *Bacillus* spp. جداسازی شده از گیاهان سالم از مزارع توت‌فرنگی در بازدارندگی از رشد و ایجاد علائم قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه، درون شیشه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج آزمایش‌های کشت متقابل، تاثیر ترکیبات فرار و غیر فرار بر رشد میسلیوم قارچ بیمارگر و همچنین تاثیر ترکیبات غیرفرار بر جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه نشان داد که سه سویه باکتریایی تاثیر بازدارندگی بر رشد قارچ بیمارگر را دارند و قطر کلونی در مقایسه با شاهد کاهش یافته و نیز ترکیبات غیرفرار تولید شده توسط آن‌ها باعث کاهش قدرت جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر می‌گردد. تحقیقات نشان می‌دهد که این تاثیرات می‌تواند به دلیل ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی، تولید سیدروفور و ترکیبات فرار و غیر فرار ضد قارچی باشد (Ben Abdallah *et al*., 2016).

نتایج نشان داد که سه سویه باکتریایی قادر به تولید آنزیم کیتیناز بودند ولی توانایی تولید آنزیم پروتئاز در سویه MarD40 مشاهده نشد. این آنزیم‌ها دارای توانایی کنترل زیستی در برابر قارچ‌های بیمارگر می‌باشند. تعدادی از جنس‌های باکتریایی شامل *Bacillus*، *Burkholderia*، *Serratia*، *Acinetobacter*، *Pseudomonas*، *Enterobacter* و *Stenotrophomonas* آنزیم‌های پروتئاز و پکتیناز ترشح می‌کنند که در تجزیه دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر دخیل می‌باشند (Ben Abdallah *et al*., 2016). گونه *B. atrophaeus* استرین‌های LB14، HM03 و HM17 با ترشح آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز و تولید سیدروفور از رشد هیفی *C. acutatum* و *C. gloeosporioides* ممانعت می‌کنند (Han *et al*., 2015). همچنین توانایی تولید آنزیم پکتیناز فقط در سویه‌های MarD35 و MarD40 مشاهده گردید. ترشح آنزیم پکتیناز توسط باکتری‌های اندوفیت، کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی را تسهیل کرده و از طرف دیگر تجزیه الیگوساکاریدها و قطعات پکتیکی فعال دیواره سلولی گیاه به‌عنوان الیسیتورهای درون‌زا عمل کرده که سبب تحریک سیستم دفاعی در گیاه می‌گردد (Davis *et al*., 1984). همچنین پکتیناز تولید شده توسط *Penicillium oxalicum* استرین BZH–2002 مقاومت موضعی را در برابر *Cladosporium cucumerinum* در خیار تحریک می‌کند (Peng *et al*., 2004).

تولید سیدروفور نیز به‌عنوان یکی از راه‌کارهای مهم باکتری‌ها در کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی مطرح می‌باشد. سویه‌های مورد آزمایش در این تحقیق توانایی تولید سیدروفور را دارند ولی توانایی تولید سیدروفور در سویه MarD40 ضعیف‌تر از دو سویه دیگر ارزیابی شد. سیدروفور در تعاملات میکروبی ریزوسفر دارای اهمیت بوده و در شرایط کمبود آهن تولید شده و با جذب آهن باعث عدم دستیابی عامل بیمارگر به آن می‌گردد (Eisendle *et al*. 2004). تحقیقات نشان داده است که سیدروفور تولید شده توسط *Pseudomonas putida* استرین B10 سبب سرکوب قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* می‌شود (Kloepper *et al*., 1980). همچنین *Bacillus subtilis* با ترشح سیدروفور توانایی کنترل بیماری‌های ایجاد شده توسط *Fusarium oxysporium* f. sp. *ciceri* و

Macrophomina phaseolina را در لوبیا دارد (Patil *et al*., 2014). در تحقیق دیگری نشان داده شده است که پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با تولید سیدروفور توسط *B. pumilus* کنترل می‌گردد (Heidarzadeh & Baghaee–Ravari, 2015).

همچنین تولید لیپوپپتیدهای سورفکتین، ایتورین و فنجایسین در سویه‌های باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت و فقط لیپوپپتید سورفکتین در هر سه سویه تولید می‌گردد. لیپوپپتیدها به‌عنوان ترکیبات آنتی‌بیوتیکی در گونه‌های جنس باسیلوس مطرح بوده و تحقیقات زیادی حاکی از خاصیت ضد قارچی آن‌ها می‌باشد (Ongena & Jacques, 2008). همچنین این ترکیبات قادر به تحریک سیستم دفاعی در گیاه هستند (Ongena *et al*., 2007). ایتورین ترشح شده توسط *B. subtilis* باعث کاهش بیماری‌زایی *Rhizoctonia solani* روی گوجه‌فرنگی می‌گردد (Asaka & Shoda, 1996). استرین S499 همین گونه باسیلوس با تولید سورفکتین، ایتورین و فنجایسین سبب جلوگیری از ایجاد زخم‌های میوه سیب در اثر *Botrytis cinerea* می‌گردد (Ogena *et al*., 2007).

هورمون‌های گیاهی با منشاء میکروبی ترکیبات مهم در افزایش رشد و تحمل تنش‌های محیطی گیاه بوده و سبب ایجاد مقاومت یه بیمارگر می‌شوند (Yasmin *et al*., 2017). هورمون ایندول استیک اسید باعث افزایش تکثیر سلولی و رشد طولی و توسعه ریشه گیاه شده و در نتیجه موجبات افزایش مقاومت میزبان را به آلودگی بیمارگر فراهم می‌سازد (Yu *et al*., 2009; González–Lamothe *et al*., 2012). همچنین تولید هورمون جیبرلین سبب افزایش سطح و تعداد ریشه می‌گردد (Bhattacharyya & Jha 2012). عوامل کنترل زیستی میزان دسترسی گیاه به مواد غذایی را به وسیله توانایی تثبیت ازت و حلالیت فسفات افزایش می‌دهد (Alori *et al*., 2017). توانایی تولید هورمون‌های ایندول استیک اسید و جیبرلین در هر سه سویه مشاهده شد.

تولید ترکیبات فرار به‌عنوان یکی دیگر از مکانیسم‌های کنترل زیستی مطرح می‌باشد. تحقیقات نشان می‌دهد ترکیبات فرار ضد قارچی تولید شده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها در کاهش بیماری‌های گیاهی نقش به سزایی دارند (Schnabel & Mercier, 2006; Huang *et al*., 2011). ترکیبات فرار باکتری‌های اندوفیت فعالیت ضد قارچی داشته و باعث تحریک مقاومت گیاه و جلوگیری از رشد هیف و جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر می‌گردند (Monte, 2001). ترکیبات فرار *Paenibacillus polymyxa* استرین WR–2 با تاثیر ضد قارچی بسیار، سبب جلوگیری از رشد *F. oxysporum* می‌گردد (Raza *et al*., 2015). تحقیقات نشان می‌دهد، ترکیبات فرار باکتری *B. amyloliquefaciens* پس از پنج روز سبب کاهش رشد *Ralstonia solanacearum* می‌شود (Raza *et al*., 2016). تولید ترکیبات فرار در هر سه سویه مورد بررسی، مثبت ارزیابی گردید.

ترکیبات غیر فرار تولید شده توسط باکتری‌ها دارای فعالیت ضد قارچی می‌باشند. تحقیقات نشان داده ترکیبات خارج سلولی *B. subtilis* استرین EDR4 باعث کاهش رشد میسلیومی عامل بیماری پاخوره گندم و کاهش رشد و جوانه‌زنی اسپور *Sclerotinia sclerotiorum* در کلزا می‌گردد (Chen *et al*., 2014). همچنین ترکیبات خارج سلولی دو استرین I2R21 و W1R33 باکتری *Pseudomonas* sp. سبب ممانعت از رشد کلونی گونه‌های *Botryosphaeriaceous* می‌شود (Wicaksono *et al*., 2017).

تاثیر بازدارندگی سویه‌های باکتریایی در شرایط درون شیشه نشان داد که این باکتری‌ها قادر به جلوگیری از گسترش علائم بیماری آنتراکنوز می‌باشند. این اثر می‌تواند به دلایل رقابت بر سر منابع کربن و مکان، تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی، آنتی‌بیوز و تحریک مقاومت سیستمیک باشد (Carmona–Hernandez *et al*., 2019). احتمالا باکتری‌های اندوفیت چند سازوکارتوام با هم را برای کنترل بیماری به کار می‌برند که در این بین تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی عامل بیماری و ترشح ترکیبات ضد قارچی با توجه به نتایج به دست آمده، محتمل‌تر می‌باشد.

همچنین تاثیر این سویه‌های باکتریایی بر بیماری آنتراکنوز در گلخانه به دو روش اسپری و خیساندن خاک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور باکتری اندوفیت در روی اندام‌های هوایی و اطراف ریشه، گیاه را در برابر حمله و ایجاد آلودگی توسط قارچ بیمارگر محافظت می‌کند. این نتایج می‌تواند به دلیل کلونیزاسیون گیاه و اشغال نیچ اکولوژیکی، ایجاد رقابت بر سر مواد غذایی، ترشح ترکیبات فعال زیستی مانند آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ بیمارگر، تولید سیدروفور و همچنین تحریک مقاومت سیستمیک در میزبان گیاهی باشد (Mates *et al*., 2019).

مدیریت بیماری‌های گیاهی به منظور حفظ کیفیت و فراوانی غذا دارای اهمیت زیادی می‌باشد. انواع سازوکارهای مدیریت بیماری‌های گیاهی جهت حذف یا کاهش بیماری وجود دارد که اغلب این سازوکارها بر پایه کاربرد سموم و کودهای شیمیایی می‌باشد. در سال‌های اخیر، با توجه به تاثیر مخرب کاربرد سموم شیمیایی بر سلامتی انسان و اکوسیستم طبیعی و ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی، تلاش‌های زیادی در جهت استفاده از روش‌های جایگزین و توسعه مهار زیستی انجام گرفته است(Pal and Gardener, 2006). تاکنون تحقیقات زیادی در جهت مهار عوامل ایجادکننده بیماری‌های گیاهی با استفاده از عوامل کنترل زیستی صورت گرفته است. شناسایی ارتباط بین عوامل کنترل زیستی و بیمارگرهای گیاهی ممکن است پیچیده بوده که می‌تواند شامل تولید ترکیبات شیمیایی علیه بیمارگر، رقابت بر سر غذا و مکان و یا تحریک سیستم دفاعی میزبان باشد (Cook and Baker, 1983). تعداد زیادی از عوامل کنترل زیستی میکروبی توانایی غلبه بر بیمارگرهای گیاهی تحت شرایط محیطی گوناگون و نیز توانایی مدیریت طیف وسیعی از این بیمارگرها را دارند (Shafi *et al*., 2017). در این تحقیق ویژگی‌های ضد قارچی سویه‌های باکتریایی اندوفیت جداسازی شده از گیاهچه‌های سالم مزارع توت‌فرنگی بر عامل آنتراکنوز بررسی گردید. در تعامل با قارچ بیمارگر این باکتری‌ها ممکن است از سازوکارهای چندگانه مانند رقابت بر سر مواد غذایی و فضا، اشغال نیچ اکولوژیک، ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی بیمارگر، تولید سیدروفور و متابولیت‌های ضدقارچی و همچنین تحریک مقاومت گیاه استفاده کنند. با توجه به اهمیت کشت این گیاه در استان کردستان و عدم تاثیر سموم کاربردی و آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از آن کاربرد روش‌های جایگزین مانند کنترل زیستی ضروری می‌باشد. جهت کاربرد موفق عوامل کنترل زیستی، مطالعات اکولوژیکی این عوامل ضروری به نظر می‌رسد. قطعا ایمنی و ارزش این عوامل با موفقیت کاربرد آن‌ها در شرایط مزرعه تعیین می‌گردد. درک نحوه عمل، تنوع و توزیع اکولوژیکی و تعامل آن‌ها با محیط، به منظور سازگاری این عوامل و موفقیت آن‌ها در مهار بیماری‌های گیاهی در جهت تولیدات گیاهی سالم دارای اهمیت می‌باشد. ارزیابی عملکرد کنترل زیستی این عوامل در یک محیط اختصاصی، قدم اول برای شناسایی نحوه عمل آن‌ها در مدیریت بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. در نتیجه، به دلیل پیچیدگی شرایط مزرعه، آزمایشات وسیع در جهت درک کامل سازوکارهای به کار رفته توسط این عوامل برای مدیریت بیمارگرهای گیاهی نیاز است(Shafi *et al*., 2017).

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* dampingoff 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.

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.

Chandrashekara, C., Bhatt, J.C., Kumar, R. & Chandrashekara, K.N. 2012. Supressive soils in plant disease management. pp. 241–256. In: Singh, V.K., Singh, y. & Singh, A. (eds.). Eco–Friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management. International Book Distributors, 682 P.

Chebotar, V.K., Malfanora, N.V., Scherbakov, A.V., Ahtemova, G.A. & Borisor, 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.

Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, 539 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.

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., Fertonani, 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., Torresa, 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. atrains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. Plant Pathology Journal, 31(2): 165–175.

Heidarzadeh, N. & Baghaee–Ravari, S. 2015. Application of *Bacillus pumilus* as a potential biocontrol agent of *Fusarium* wilt of tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 48: 841–849.

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.

Karimi, K., Arzanlou, M., & Pertot, I. 2019. Weeds as potential inoculum reservoir for *Colletotrichum nymphaeae* causing strawberry anthracnose in Iran and Rep–PCR fingerprinting as useful marker to differentiate *C. acutatum* complex on strawberry. Frontiers in Microbiology, 10(129): 1–13.

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.

Krings, M., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N. & hermsen, E.J. 2007. Fungal endophytes in a 400–million–yr–old land plant: infection pathways spatial distribution and host responses. New Phytologist, 174: 648–657.

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.

Mathivanan, N., Kabilan, V. & Murugesan, K. 1997. Production of chitinase by *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. Indian Journal of Experimental Biology, 35(8): 890–893.

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 Microbiolog and Biotechnology, 28(9): 1527–1535.

Shafi, J., Tian, H. & Ji, M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 31(3): 446–459.

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.

Schulz, B., Boyle, C. 2006. What are endophytes?. pp. 1–13. In: Schulz, B.J.E., Boyle, C.J.C & Siber, T.N, (eds.). Microbial root endophytes. Springer–Varlag, Berlin, 367 P.

Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. Analytical Biochemistry, 160(1): 47–56.

Souza, L.C.S., Assis, L.A.G., de Moraes Catarino, A. & Hanada, R.E. 2019. Screening of chilli pepper genotypes against anthracnose (*Colletotrichum brevisporum*). Emirates Journal of Food and Agriculture, 31(12): 919–929.

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.

Isolation of strawberry endophytic bacteria and investigation of their antifungal effects on *Colletotrichum nymphaeae*, the causal agent of strawberry anthracnose

Zahra Alijani[1], Jahanshir Amini[1], Morahem Ashengroph[2], Bahman Bahramnejad[3]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
Corresponding author: Jahanshir Amini, email: jamini@uok.ac.ir

Received: Aug., 11, 2020 8(1) 29-46 Accepted: Dec., 19, 2020

Abstract

In this study, three nonpathogenic endophytic bacterial isolates recovered from Fragaria × ananassa stolon and petal and their antagonistic activity was evaluated against *Colletotrichum nymphaeae*, the causal agent of strawberry anthracnose under *in vitro*, *in vivo*, and greenhouse conditions. Bacterial isolates were identified as *Bacillus* spp. using a combination of phenotypic, biochemical properties and molecular phylogenetic analysis of the *16S rDNA* gene sequence. The living cells of bacterial isolates inhibited the mycelial growth of *C. nymphaeae* using dual culture method and inhibition percentage was evaluated as 41.87, 50, and 54.92 % in MarG2, MarD40 and MarD35, respectively. The volatile compounds (VOCs) produced by bacterial isolates inhibited the mycelial growth of *C. nymphaeae* and the highest inhibition was observed in MarD35 isolate (24.7%). Moreover, the cell free culture filtrates of bacterial isolates reduced the mycelial growth and conidial germination of pathogen and the highest inhibition was observed in MarG2 (34.96%) on mycelial growth and in MarD35 (52.07%) on conidial germination. The living cells of bacterial isolates decreased anthracnose fruit rot at postharvest and the highest inhibition was observed in MarD40 (85.63%) and MarD35 (81.72%), respectively. Furthermore, disease severity of strawberry anthracnose by bacterial isolates was reduced using drenching soil and plant spraying techniques. The findings of this study showed that bacterial isolates have the ability to prevent the growth of fungal pathogen under *in vitro*, *in vivo* and greenhouse conditions.

Keywords: antifungal compounds, endophytic bacteria, strawberry anthracnose, volatile compounds