مقاله تحقیقی

فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی متعلق به *Bacillus* علیه بیماری سوختگی شمشاد جنگلی در شرایط گلخانه

سمانه سماوات

مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: سمانه سماوات، ایمیل: samaneh.samavat@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷ ۹(۲) ۱۵۳–۱۶۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴

چکیده

شیوع بیماری سوختگی روی شمشاد جنگلی ناشی از قارچ *Calonectria pseudonaviculata* در جنگل‌های هیرکانی منجر به تلاش برای یافتن روش‌های مؤثر به منظور کنترل این بیماری شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به کنترل زیستی بیماری توسط میکروارگانیسم‌های مفید اشاره کرد. در همین راستا، پژوهش حاضر در دو سطح آزمایشگاهی و گلخانه‌ای و در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. در ابتدا، به کمک آزمون کشت متقابل فعالیت آنتاگونیستی ۱۵ جدایه از *Bacillus* علیه قارچ بیمارگر بررسی شد و جدایه‌های باکتریایی برتر (FRBP2، FRBS9، FRBS10، و FRBS15) به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد در سطح گونه شناسایی شدند. تبوکونازول و Serenade® به ترتیب به عنوان شاهد کنترل شیمیایی و زیستی و مطابق با دستورالعمل مربوطه استفاده شدند. در شرایط گلخانه، اثر سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی برتر (10^8 CFU/ml)، بر درصد شدت بیماری سوختگی شمشاد جنگلی ارزیابی شد. در میان جدایه‌های باکتریایی، بیشترین بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ (۷۶/۴٪) و کمترین آن (۲۶/۵٪) به ترتیب مربوط به *B. subtilis* FRBS9 و *B. pumilus* FRBP2 بود. در شرایط گلخانه نیز *B. subtilis* FRBS9 و *B. subtilis* FRBS10 کمترین شدت بیماری را منجر شدند و با Serenade® اختلاف آماری معنی‌داری نشان ندادند ($P<0.05$). به این ترتیب، جدایه‌هایی از گونه‌های یکسان یا متفاوت از *Bacillus*، سطوح مختلفی از فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ بیمارگر هدف نشان دادند. این جدایه‌ها از طریق آنتی‌بیوز و تولید طیفی از آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به کنترل قارچ عامل سوختگی شمشاد جنگلی بودند. اما مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی سایر مکانیسم‌های آنتاگونیستی و تهیه فرمولاسیون‌های مناسب از آن‌ها ضروری است.

واژه‌های کلیدی: آنتی بیوز، بلایت، سوسپانسیون، *Bacillus pumilus*، *Bacillus subtilis*

مقدمه

شمشاد جنگلی (خزری) با نام علمی *Buxus hyrcana* Pojark. از خانواده شمشاد (Buxaceae) و از مهم‌ترین گونه‌های گیاهی پهن برگ و همیشه سبز بومی جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران است. این گونه گیاهی ارزشمند از دیرزیستی نسبتاً بالایی (بالغ بر ۱۵۰۰ سال) برخوردار است و در مناطق مختلف استان‌های گلستان، مازندران و گیلان می‌روید (Mozafarian, 2015). این گیاه در بین ذخایر جنگلی جهان از اهمیت خاصی برخوردار است و در فهرست گونه‌های گیاهی در خطر انقراض اتحادیه بین‌المللی حفظ طبیعت (IUCN) (The International Union for Conservation of Nature) قرار دارد (Jalili & Jamzad, 1999). رویشگاه‌های شمشاد اگرچه مساحتی حدود ۷۲ هزار هکتار از عرصه‌های جنگلی شمال کشور را به خود

اختصاص داده‌اند، اما متأسفانه در طی سال‌های اخیر عوامل متعددی از جمله بروز اپیدمی بیماری نوظهور سوختگی (بلایت) شمشاد، این گونه گیاهی با ارزش را مورد تهدید قرار داده است.

بیماری سوختگی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های شمشاد جنگلی است که منجر به ظهور لکه‌های قهوه‌ای تیره با هاله زردرنگ بر روی برگ‌ها، خزان شدید و زوال درخت‌های حساس شمشاد در شرایط گرم و مرطوب و سایه می‌شود (Henricot *et al*., 2008). این بیماری نخستین بار در سال ۱۹۹۴ میلادی از بریتانیا گزارش شد و پس از آن به دلیل انتقال مواد گیاهی آلوده، در سراسر اروپا انتشار یافت (Henricot & Culham, 2002). در سال ۱۹۹۸ میلادی علایم مشابه با این بیماری در نیوزلند مشاهده شد (Crous *et al*., 2002). پس از آن، در سال ۲۰۱۱ میلادی نیز برای نخستین بار از آمریکای شمالی گزارش شد. به این ترتیب، این بیماری تاکنون از آلمان، ایتالیا، اسپانیا، کرواسی، نروژ، اتریش، چک، دانمارک، گرجستان، بلژیک، ایرلند، هلند، فرانسه، ترکیه، ایالت متحده آمریکا و کانادا گزارش شده است. از سال ۲۰۰۴ میلادی به بعد نیز بیماری سوختگی شمشاد در فهرست بیماری‌های گیاهی تحت مراقبت سازمان حفظ نباتات اروپا (European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)) قرار گرفته است (Gehesquiere *et al*., 2013).

متأسفانه در طی سال‌های اخیر مشاهدات بسیاری حاکی از بروز خشکیدگی شمشاد خزری در بسیاری از رویشگاه‌های مناطق جنگلی شمال کشور است. این خشکیدگی که در تمام مراحل زیستی این‌گونه از نهال تا درختان مسن دیده می‌شود، ناشی از بیماری سوختگی شمشاد شناخته شده‌است. بر طبق منابع معتبر، نخستین بار در ایران در سال ۲۰۱۳ میلادی از تنکابن واقع در استان مازندران و پس از آن از جنگل‌های استان گیلان گزارش شد (Mirabolfathy *et al*., 2013). در سال ۱۳۹۴ انتشار این بیماری در منطقه بندرگز استان گلستان مشاهده شد که نشان دهنده گسترش سریع بیماری در مدت سه سال تا شرق جنگل‌های هیرکانی است (Khazaeli *et al*., 2015).

چرخه‌های این بیماری بسیار کوتاه و سریع است و هر چرخه بیماری در شرایط مناسب کمتر از یک هفته تکمیل می‌شود. در نتیجه پیشرفت بیماری بسیار سریع رخ می‌دهد به طوری که در سال ۱۳۹۱ در سطح وسیعی از عرصه‌های شمشاد استان‌های گیلان و مازندران مشاهده شد و انتشار بیماری به سرعت از غرب به شرق در حال توسعه و گسترش است. هم اکنون میزان خشکیدگی ناشی از این بیماری به بیش از ۴۰ هزار هکتار از رویشگاه‌های شمشاد خزری رسیده است (Fakhredin & Mirabolfathy, 2014).

این بیماری ممکن است ناشی از دو گونه قارچی *Calonectria pseudonaviculata* و یا *Calonectria henricotiae* باشد. با وجود این‌که هردو گونه متعلق به یک جنس هستند ولی به لحاظ فیلوژنتیک از یکدیگر مجزا هستند و نسبت به تغییرات دما و اثرات قارچکش‌ها پاسخ‌های مختلفی از خود نشان می‌دهند (Shishkoff, 2016). در حال حاضر نیز تنها گونه *C. pseudonaviculata* به عنوان عامل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی در ایران شناسایی شده است (Mirabolfathy *et al*., 2013).

اقدامات مدیریتی معمول علیه این بیماری عمدتاً شامل تلفیقی از روش‌های مبارزه زراعی و شیمیایی است. از جمله می‌توان به رعایت اصول بهداشتی، کاشت ارقام متحمل و مصرف قارچکش‌های شیمیایی اشاره کرد (Henricot *et al*., 2008; LaMondia, 2014; 2015). اگرچه تاکنون کارایی قارچکش‌های تجاری مختلفی به صورت انفرادی و یا توأم با یکدیگر، علیه رشد ریسه و جوانه‌زنی اسپور قارچ *C. pseudonaviculata* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شده است (Henricot *et al*.,2008; LaMondia, 2015)، اما به دلیل اثرات منفی چنین قارچکش‌هایی بر سلامت انسان و محیط زیست و ممنوعیت کاربرد آنها در رویشگاه‌های جنگلی، یافتن روش‌های جایگزین برای کنترل این بیماری ضروری می‌نماید. از جمله روش‌های جایگزین می‌توان به استفاده از عوامل سازگار با محیط زیست همچون میکروارگانیسم‌های مفید بیوکنترل، اشاره کرد.

از عوامل باکتریایی آنتاگونیست علیه بیمارگرهای گیاهی می‌توان به باسیلوس‌ها اشاره کرد. باکتری‌های جنس

Bacillus متعلق به شاخه Firmicutes، رده باسیل‌ها، راسته Bacillales و خانواده Bacillaceae هستند. این باکتری‌ها گرم مثبت، نسبتاً بزرگ، هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل هستند که اغلب به صورت زنجیری دیده می‌شوند (Hasanzadeh, 2005). این باکتری‌ها بدلیل تحمل به تغییرات دمایی، اسیدیته، و شوری محیط و نیز تولید فرم مقاوم به صورت اندوسپور به عنوان عوامل مناسبی در کنترل زیستی مطرح هستند(Taghinasab *et al*., 2007). این قبیل باکتری‌ها طیف وسیعی از مولکول‌های زیستی، با خاصیت بازدارندگی را تولید می‌کنند، بر اساس بررسی‌های صورت گرفته این جنس توانایی تولید ۱۶۷ ترکیب زیستی فعال و مؤثر علیه میکروارگانیسم‌ها را دارد. در واقع با تولید ترکیبات بیوشیمیایی اعم از آنزیم‌ها (Kajimura *et al*., 1995)و آنتی‌بیوتیک‌ها (Loeffler *et al*., 1986) باعث کاهش جمعیت بیمارگرهای گیاهی می‌شوند. به عنوان مثال گونه *B. subtilis* قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی چون مایکو باسیلین، ایتورین A، باسیلومایسین، فنجی‌مایسین، باسیلین و سابسپورین است (Schreiber *et al*., 1988). از طرف دیگر، افزایش رشد و القای مقاومت در گیاهان متعددی توسط بسیاری از جدایه‌های *باسیلوس* به اثبات رسیده است (Singh *et al*., 2008).

به این ترتیب، با توجه به محدود بودن رویشگاه‌های شمشاد جنگلی و مطرح بودن آن به عنوان یک گونه نادر و ذخیره‌گاهی، شناسایی کارآمدترین جدایه‌های باکتریایی بیوکنترل از جنس *Bacillus* برای مهار عامل بیماری سوختگی مهم می‌باشد. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس *Bacillus* علیه قارچ *C. pseudonaviculata*، عامل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی، در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی اثرات بازدارندگی آن‌ها بر شدت بیماری در شرایط گلخانه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

۱-جدایه قارچی بیمارگر

جدایه Cy–08 از *C. pseudonaviculata* مورد استفاده در پژوهش حاضر که از شدت بیماریزایی نسبتاً بالایی برخوردار بود از کلکسیون میکروبی گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران دریافت شد (Khazaeli *et al*., 2015). این قارچ پیشتر بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، سنجش بیماری‌زایی و بررسی‌های مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌ای ITS113F و ITS4 شناسایی شده بود (Khazaeli *et al*., 2015). به طور معمول این قارچ بر روی محیط استاندارد PDA (Merck، آلمان) کشت داده شد. به منظور نگهداری کوتاه مدت، کشت مورب قارچ بر روی محیط PDA صورت گرفت و لوله‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲- تیمار قارچ‌کش شیمیایی

قارچ‌کش تبوکونازول با نام تجاری Fungus Fighter Concentrate® و فرمولاسیون ساسپو–امولسیون (Suspo–emulsion) (SE)که محصولی از شرکت بایر آلمان است، مطابق با دستورالعمل مربوطه با غلظت چهار در هزار به عنوان شاهد کنترل شیمیایی استفاده شد.

۳- تیمار قارچ‌کش زیستی

قارچ‌کش زیستی Serenade® با فرمولاسیون سوسپانسیون غلیظ که شامل سویه باکتریایی *Bacillus subtilis* QST713 و محصولی از شرکت بایر (Bayer) آلمان است، به عنوان شاهد قارچ‌کش زیستی مطابق با دستورالعمل مربوطه استفاده شد. بر این اساس غلظت ۲ تا ۴ انس در گالن آب که معادل ۱۲/۵ تا ۲۵ در هزار بود از آن تهیه شد.

۴- جدایه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه پیشتر از ریزوسفر درختان صنوبر مستقر در رویشگاه‌های البرز، خجیر، سیراچال جداسازی و خالص‌سازی شده بودند (Samavat *et al*., 2019). مکان جغرافیایی و گونه گیاهی مرتبط با

جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه در جدول (۱) آورده شده است. شناسایی تکمیلی جدایه‌های باکتریایی خالص شده در سطح گونه مطابق راهنمای سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی (Bergey) و بر اساس شکل، تشکیل اسپور، رنگ آمیزی گرم، تولید آنزیم کاتالاز، تولید ایندول، تولید گاز از گلوکز، تولید اسید از گلوکز، نشاسته و گلیکوژن، رشد بی‌هوازی، تحرک، هیدرولیز نشاسته، کازئین و ژلاتین، احیای نیترات، آزمون وگس پروسکائور، رشد در محیط کشت حاوی ۵، ۷ و ۱۰٪ NaCl، رشد در درجه حرارت‌های ۵، ۱۰، ۵۰، ۵۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد و مصرف سیترات انجام شد (De Vos *et al*., 2009). به منظور نگهداری میان مدت، جدایه‌های باکتریایی در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیوم ($MgSO_4.7H_2O$) و در داخل یخچال نگهداری شدند.

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی، از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت مایع LB –Luria) (Bertani (Merck، آلمان) سوسپانسیونی با غلظت 10^8 CFU/ml در محلول کلرید سدیم ۰/۸٪ تهیه شد. برای این منظور از روش سری رقت و تهیه نمودار استاندارد به کمک میزان جذب نوری در طیف ۶۰۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد (Schaad, 2001).

۵- آزمون کشت متقابل

با توجه به کندی رشد قارچ *C. pseudonaviculata*، در ابتدا یک قرص با ابعاد ۰/۵ cm× ۰/۵ cm از کشت تازه آن بر مرکز ظرف پتری محتوی محیط کشت PDA قرار داده شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت، از کشت تازه (۴۸ ساعته) جدایه‌های باکتریایی به صورت سه نقطه ای و با فاصله نیم سانتی‌متر از لبه پتری تحت شرایط استریل کشت داده شد. پتری‌های تیمار شده در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه رشد قارچ بیمارگر است، قرار داده شدند. میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر (به صورت هاله بازدارندگی) در تیمارهای قارچ‌کش شیمیایی تبوکونازول و نیز قارچ‌کش زیستی ® Serenadeنیز مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. درصد بازدارندگی از رشد ریسه قارچ بیمارگر توسط فرمول زیر محاسبه شد (Hagedorn *et al*., 1989). این آزمون در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با چهار تکرار به ازای هر تیمار انجام شد.

۱۰۰× {(قطر پرگنه قارچ در تیمار – قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد)– ۱} =درصد بازدارندگی

۶–القای اسپورزایی در قارچ بیمارگر

مطابق روش Alfenas *et al*., (2013)، در ابتدا محیط کشت Glucose Asparagine Agar (GAA) مطابق روش Dhingra & Sinclair (1995) تهیه شد. سپس قطعاتی با ابعاد ۰/۵ cm× ۰/۵ cm از جدایه قارچی بیمارگر در سطح محیط کشت مذکور قرار داده شد و در داخل انکوباتور (دمای ۲۵±۲°C و شرایط تاریکی) به مدت ۱۵ روز قرار داده شد تا پرگنه قارچ رشد یابد. پس از آن ریسه‌های هوایی قارچ بیمارگر توسط یک قلم‌موی نرم خراشیده شد و سپس سطح محیط کشت با آب شیر شسته و آب اضافی دور ریخته شد. سپس پرگنه قارچ مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در آب شیر غوطه‌ور گردید. پس از آن آب رویی دور ریخته شد و باقیمانده رطوبت به کمک گاز استریل زدوده شد. در نهایت درب پتری‌ها به کمک نوار پارافیلم کاملاً بسته شد و به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور مطابق با شرایط مشروح قرار داده شد تا اسپورزایی رخ دهد. به این ترتیب اسپورهای دو حجره‌ای و سیلندری شکل بر روی کنیدیوفورهای فرچه مانند قارچ بیمارگر به وفور تشکیل شد.

۷– عملیات گلخانه ای

۱–۷– تهیه نهال‌های گلدانی شمشاد جنگلی

به ازای هر تیمار، چهار نهال گلدانی دو ساله شمشاد جنگلی از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهیه شد. نهال‌های مربوطه توسط محلول ۱۰٪ الکل اتیلیک ضدعفونی سطحی شدند.

۲–۷– آماده سازی زادمایه قارچ بیمارگر

سوسپانسیون اسپور قارچ مورد نظر با افزودن چند قطره Tween 80 به آب مقطر استریل تهیه شد. با استفاده از لام هماسیتومتر شمارش اسپورها انجام گرفت و غلظت اسپورها به میزان ۴×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد (Henricot *et al*., 2008).

۳-۷- ارزیابی اثرات تیمارها در شرایط گلخانه

شرایط گلخانه: رطوبت نسبی ۹۰٪، تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۳ درجه سانتی‌گراد در شب

مطابق با روش Yang & Hong (2018)، تیمار نهال‌های شمشاد جنگلی با سوسپانسیون تهیه شده از جدایه‌های باکتریایی برتر با جمعیت $۱۰^{۸}$ cfu/ml، قارچ‌کش تبوکونازول و قارچ‌کش زیستی Serenade® در شرایط گلخانه و در فواصل زمانی مشخص۱۴ روز و ۶ ساعت قبل از مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپورهای قارچ بیمارگر (با غلظت ۴×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر) انجام شد. در تیمار شاهد آلوده، تنها نهال‌های شمشاد جنگلی با قارچ بیمارگر آلوده شدند و هیچ‌گونه تیمار دیگری بر روی آن‌ها انجام نشد. نهال‌های تیمار شده به صورت یک روز در میان آبیاری می‌شدند و به لحاظ ظهور علایم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. پس از گذشت ده روز از مایه‌زنی نهال‌های آلوده با تیمارهای مورد بررسی، ثبت داده‌های مربوط به شدت بیماری سوختگی شمشاد جنگلی انجام شد. به منظور ارزیابی شدت بیماری، سه شاخه از هر نهال شمشاد جنگلی به صورت تصادفی انتخاب شد و درصد تعداد برگ‌های آلوده به کل برگ‌های آن شاخه اندازه‌گیری شد. این آزمون در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با چهار تکرار به ازای هر تیمار انجام شد.

۸- تجزیه و تحلیل داده های آماری

پس از جمع بندی داده‌های حاصل از مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه، تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از این پژوهش به کمک نرم افزار SPSS (Version 22; SPSS Inc., IBM Company Chicago, USA) انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

جدول ۱- مکان جغرافیایی و گونه گیاهی مرتبط با جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه

Table 1. Geographical location and plant species related to the studied bacterial isolates

Bacterial isolate	Plant species	Location
FRBS1	*Populus deltoides*	Karaj–Alborz
FRBP2	*Populus nigra*	Karaj–Alborz
FRBS3	*P. deltoides*	Karaj–Alborz
FRBS4	*P. nigra*	Sirachal–Alborz
FRBS5	*Populus alba*	Sirachal–Alborz
FRBP6	*P. alba*	Sirachal–Alborz
FRBS7	*Populus euphratica*	Khojir–Tehran
FRBP8	*P. euphratica*	Khojir–Tehran
FRBS9	*P. euphratica*	Khojir–Tehran
FRBS10	*P. alba*	Khojir–Tehran
FRBS11	*P. alba*	Khojir–Tehran
FRBP12	*P. nigra*	Karaj–Alborz
FRBS13	*P. nigra*	Karaj–Alborz
FRBP14	*P. alba*	Sirachal–Alborz
FRBS15	*P. nigra*	Sirachal–Alborz

نتایج

در جدول (۲)، نتایج مربوط به آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس *Bacillus* در سطح گونه آورده شده است. بر این اساس جدایه‌های FRBS1، FRBS3، FRBS4، FRBS5، FRBS7، FRBS9، FRBS10، FRBS11، FRBS13، و FRBS15 متعلق به گونه *B. subtilis* و جدایه‌های FRBP2، FRBP6، FRBP8، FRBP12، و FRBP14 متعلق به گونه *B. pumilus* تشخیص داده شدند.

نتایج حاصل از بررسی درصد بازدارندگی از رشد ریسه *C. pseudonaviculata* توسط تیمارهای مورد آزمون، نشان داد که از بین ۱۵ جدایه باکتریایی بررسی شده، فقط جدایه‌های FRBP2، FRBS9، FRBS10، و FRBS15 قادر به بازدارندگی از رشد ریسه قارچ بیمارگر بودند. این جدایه‌ها که به عنوان جدایه‌های باکتریایی برتر شناخته شدند، سطوح مختلفی از بازدارندگی را نشان دادند (شکل ۱ و ۲).

قارچ‌کش شیمیایی تبوکونازول قادر به بازدارندگی صد در صدی از رشد ریسه قارچ بیمارگر بود و در گروه اول آماری قرار گرفت ($P<0.05$). در مقایسه کارایی جدایه‌های باکتریایی، بیشترین و کمترین درصد بازدارندگی به ترتیب مربوط به FRBS9 و FRBP2 بود. جدایه FRBS9 نیز به طور معنی‌داری نسبت به قارچ‌کش زیستی ®Serenade درصد بازدارندگی بیشتری را منجر شد (شکل ۲). تجزیه واریانس میانگین‌های مربوطه در جدول (۳) آورده شده است.

جدول ۲– آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه در سطح گونه

Table 2. Morphological and biochemical tests to identify the bacterial isolates at the species level

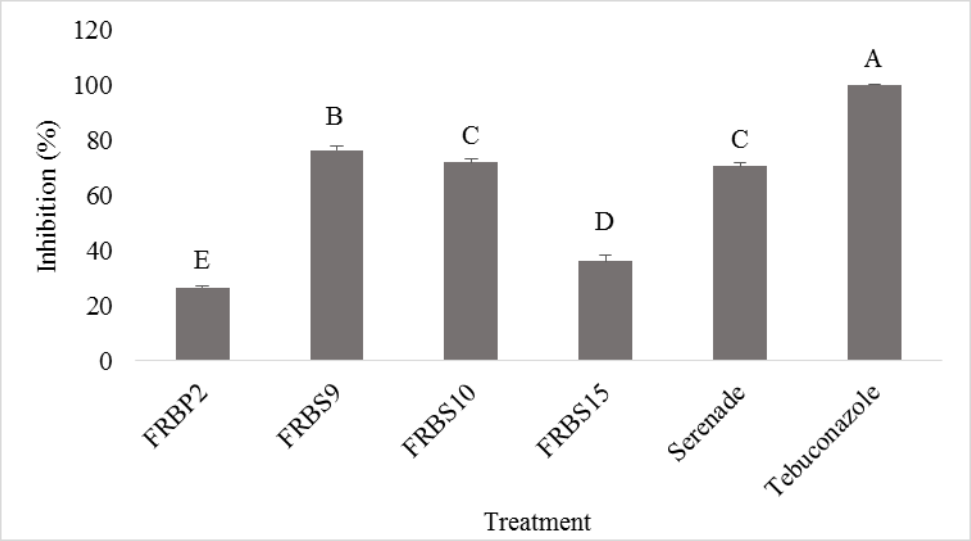
Characteristic	*B. subtilis*	*B. pumilus*
Shape	Rod	Rod
Gram staining	+	+
Spore formation	+	+
Catalase	+	+
Indole production	–	–
Gas from glucose	–	–
Acid from glucose	+	+
Anaerobic growth	–	–
Motility	+	+
Acid from glycogen	+	–
Acid from starch	+	–
Hydrolysis of starch	+	–
Hydrolysis of casein	+	+
Hydrolysis of gelatin	+	+
Nitrate reduction	+	–
Growth in NaCl:		
5%	+	+
7%	+	+
10%	nd	+
Growth at:		
5°C	–	+
10°C	+	+
50°C	+	+
55°C	–	–
65°C	–	–
Voges–Proskauer	+	+
Utilization of citrate	+	+

nd: مشخص نشده

nd: not determined

شکل ۱– تشکیل هاله بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ *C. pseudonaviculata* در حضور جدایه *B. subtilis* FRBS10 در محیط PDA (چپ)، پرگنه قارچ در تیمار شاهد (راست)

Figure 1. Formation of inhibition halo zone from the growth of *C. pseudonaviculata* colony in the presence of *B. subtilis* FRBS10 isolate in PDA medium (left), the fungus colony in the control treatment (right)



شکل ۲– درصد بازدارندگی از رشد ریسه *C. pseudonaviculata*، توسط جدایه‌های باکتریایی مورد آزمون. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است (P<0.05) (n=4)

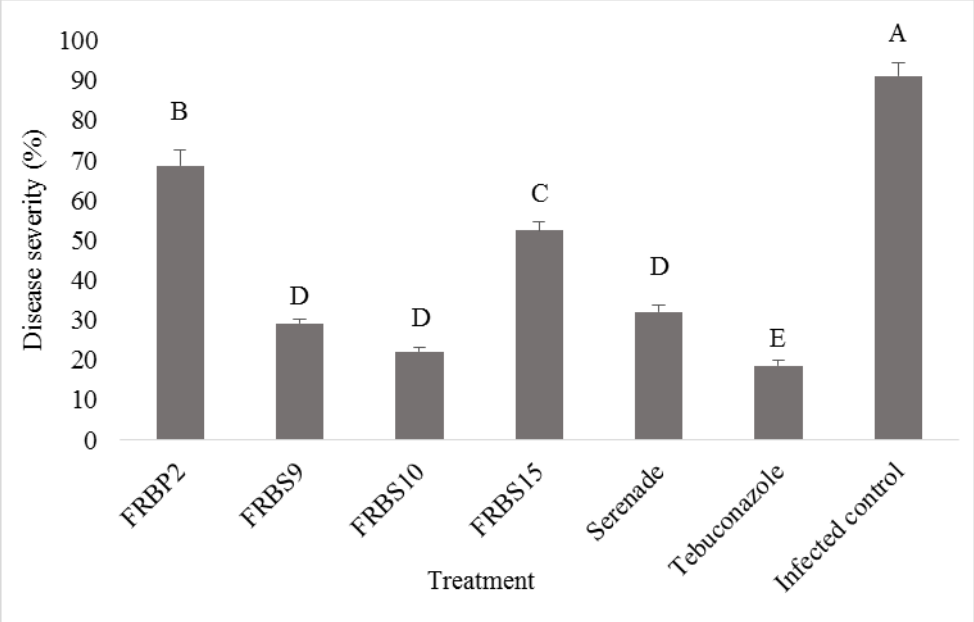
Figure 2. Inhibition percentage of the mycelia growth of *C. pseudonaviculata* by the bacterial isolates. Similar letters indicate no statistical difference (P<0.05) (n=4)

جدول ۳– تجزیه واریانس درصد بازدارندگی از رشد ریسه *C. pseudonaviculata*، توسط جدایه‌های باکتریایی مورد آزمون (P<0.05) (n=4)

Table 3. Analysis of variance for inhibition percentage of *C. pseudonaviculata* mycelia growth by the bacterial isolates (P<0.05) (n=4)

Source of variation	df	Mean square	F value	P value
Treatment	5	2241.78	1081.59	0.000
Replication	2	0.65	0.31	0.739
Error	10	2.07		
Total	17			

نتایج مربوط به مقایسه اثرات تیمارهای مورد آزمون بر شدت بیماری سوختگی شمشاد جنگلی در شرایط گلخانه در شکل (۳) آورده شده است. بیشترین و کمترین میزان درصد شدت بیماری به ترتیب مربوط به تیمار شاهد آلوده و قارچ‌کش شیمیایی تبوکونازول بود. در بین جدایه‌های باکتریایی، FRBS9 و FRBS10 از کارایی مطلوبتری برخوردار بودند و با قارچ‌کش زیستی Serenade® اختلاف آماری معنی‌داری را نشان ندادند ($P<0.05$). تجزیه واریانس میانگین‌های مربوطه در جدول (۴) آورده شده است.



شکل ۳– درصد شدت بیماری سوختگی شمشاد جنگلی ناشی از *C. pseudonaviculata*، در نهال‌های تیمار شده با سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی برتر. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است ($P<0.05$) (n=4).

Figure 3. Disease severity percentage of boxwood blight caused by *C. pseudonaviculata*, in seedlings treated with superior bacterial isolates suspensions. Similar letters indicate no statistical difference ($P<0.05$) (n=4).

جدول ۴– تجزیه واریانس درصد شدت بیماری سوختگی شمشاد جنگلی ناشی از *C. pseudonaviculata*، در نهال‌های تیمار شده با سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی برتر ($P<0.05$) (n=4)

Table 4. Analysis of variance for disease severity percentage of boxwood blight caused by *C. pseudonaviculata*, in seedlings treated with superior bacterial isolates suspensions ($P<0.05$) (n=4)

Source of variation	df	Mean square	F value	P value
Treatment	6	1991.92	319.51	0.000
Replication	2	1.08	0.17	0.843
Error	12	6.23		
Total	20			

.

بحث

تاکنون مطالعات معدودی بر روی کنترل زیستی بیماری سوختگی شمشاد جنگلی انجام شده است. نخستین بار Hebert *et al*., (2014) متوجه شدند که گونه هایی از قارچ بیوکنترل تریکودرما (*Trichoderma*) که از ریزوسفر درختان شمشاد جنگلی جداسازی شده بودند منجر به کاهش رشد پرگنه قارچ *C. pseudonaviculata*، عامل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی، تا بیش از ۹۹٪/۴ شدند.

پس از آن در مطالعات صورت گرفته توسط Kong & Hong (2017) مشخص شد که جدایه Mb2 متعلق به قارچ بیوکنترل *Trichoderma koningiopsis* که در طی اضمحلال قارچ‌های وحشی خوراکی بدست آمده بود، به طور معنی‌داری منجر به بازدارندگی از رشد ریسه قارچ بیمارگر *C. pseudonaviculata* شد. همچنین آلودگی ناشی از این بیمارگر قارچی را تا حدود ۸۵٪ بر روی رقم Suffruticosa و تا حدود ۵۴ تا ۶۳٪ بر روی رقم Justin Brouwers از شمشاد جنگلی کاهش داد. علاوه بر این در بررسی صورت گرفته توسط این محققین، اثر قارچ‌کش‌های زیستی تجاری متعددی به عنوان جایگزینی بالقوه برای کنترل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بین، محصول تجاری Root Shield PLUS WP منجر به کاهش شدت بیماری سوختگی تا بیش از ۴۴/۴٪ شدند.

افزون بر قارچ‌های بیوکنترل، برخی باکتری‌های مفید نیز به عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای قارچی گیاهان بکار می‌روند. از جمله متداول‌ترین این عوامل می‌توان به باکتری‌های متعلق به جنس‌های *Agrobacterium*، *Pseudomonas* و *Bacillus* اشاره کرد. مکانیزم‌هایی که این قبیل باکتری‌ها در برابر قارچ‌های بیمارگر گیاهی بکار می گیرند عمدتاً شامل آنتی بیوز، رقابت، پارازیتیسم و القای مقاومت است (McSpadden Gardener & Fravel, 2002).

بر طبق نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، از بین ۱۵ جدایه باکتریایی مورد مطالعه متعلق به جنس *Bacillus*، فقط جدایه‌های FRBP2، FRBS9، FRBS10، و FRBS15 از خاصیت آنتاگونیستی برخوردار بودند و قادر به ممانعت از رشد ریسه قارچ *C. pseudonaviculata* در طی آزمون کشت متقابل بودند. در همین راستا، مطالعات صورت گرفته توسط Yang & Hong (2018) نشان داد که از بین ۱۵۴۷ سویه باکتریایی مورد مطالعه به لحاظ توانایی در کنترل بیولوژیکی قارچ عامل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای تنها سه سویه 34B6، 13A3 و 14D5 متعلق به باکتری *Pseudomonas protegens* از بیشترین قابلیت از این نظر برخوردار بودند.

در آزمون کشت متقابل مشخص شد که جدایه‌های باکتریایی FRBS9 و FRBS10 متعلق به *B. subtilis* به ترتیب با ۷۶ و ۷۱ درصد بازدارندگی از بیشترین کارایی از این نظر برخوردار بودند. یافته‌های Yang & Hong (2018) نیز نشان داد که سویه‌های باکتریایی 13A3 و 14D5 *P. protegens* منجر به ۹۵ تا ۱۰۰٪ بازدارندگی از رشد ریسه‌های قارچ *C. pseudonaviculata* در طی آزمون کشت متقابل شدند. سماوات (۱۳۹۸) نیز نشان داد که جدایه‌های باکتریایی FRPF6 و FRPF8 متعلق به *Pseudomonas fluorescens* توانستند به ترتیب ۴۶ و ۵۶٪ منجر به بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ عامل سوختگی شمشاد جنگلی در آزمون کشت متقابل شوند (Samavat, 2020). در واقع، جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس‌ها و گونه‌های یکسان یا متفاوت از سطوح مختلفی از فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ بیمارگر هدف برخوردار هستند. به این ترتیب این نتایج با یافته‌های سایر محققان سازگار است.

نتایج نشان داد که کمترین درصد شدت بیماری سوختگی، در تیمار نهال‌های شمشاد جنگلی با سوسپانسیون جدایه‌های FRBS9 و FRBS10 رخ داده است، به گونه‌ای که شدت بیماری به ترتیب به ۲۹/۲٪ و ۲۲/۱٪ رسید. در واقع این جدایه‌ها از طریق مکانیسم آنتی‌بیوز و با تولید انواعی از آنتی بیوتیک‌ها قادر به کاهش شدت بیماری هدف شدند. بر طبق گزارشات صورت گرفته توسط Yang & Hong (2018) نیز سویه باکتریایی 14D5 *P. protegens* توانست تا بیش از ۵۰٪ از شدت آلودگی بیماری سوختگی شمشاد جنگلی در شرایط گلخانه بکاهد، در صورتی که سویه‌های 13A3 و 34B6 *P. protegens* بین ۴۰ تا ۴۶ ٪ بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر را منتج شدند. این محققین نشان دادند که این سویه‌های باکتریایی از طریق مکانیسم آنتی‌بیوز و تولید طیفی از آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به کنترل قارچ عامل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی هستند. در پژوهش حاضر مشخص شد که اگرچه فعالیت آنتی بیوز جدایه FRBS9 به طور معنی‌داری بیشتر از جدایه FRBS10

بود ولی به لحاظ اثر بر کاهش شدت بیماری سوختگی، جدایه FRBS10 کاراتر بود. این امر نشان می‌دهد که افزون بر آنتی بیوز، در این جدایه ممکن است مکانیسم‌های احتمالی دیگری چون القای مقاومت در گیاه میزبان نقش فعالی در قابلیت آنتاگونیستی آن داشته باشد. به این ترتیب مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی سایر مکانیسم‌های بازدارندگی این جدایه‌های بیوکنترل ضروری می‌نماید.

جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست ممکن است در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی و یا حتی گلخانه‌ای اثرات مطلوب خود به لحاظ کنترل زیستی بیمارگر گیاهی را به خوبی نشان دهند ولی به محض معرفی به عرصه (شرایط غیرقابل کنترل) با شکست مواجه شوند و یا اثری متوسط داشته باشند (Cook, 2000). بر این اساس فرموله کردن جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست نه تنها منجر به افزایش نرخ زنده‌مانی آن‌ها می‌شود، بلکه منجر به افزایش کارآمدی جدایه‌ها هم می‌شود. به این ترتیب تحقیقات در زمینه یافتن کارآمدترین میکروارگانیزم‌ها جهت کنترل بیماری سوختگی شمشاد جنگلی هنوز در مراحل ابتدایی خود است. پژوهش حاضر نیز گامی در راستای دستیابی به این هدف ارزشمند است تا در آینده‌ای نه چندان دور با شناسایی دیگر جدایه‌های قارچی و باکتریایی آنتاگونیست و مکانیزم‌های بیوکنترل آن‌ها، اقداماتی جهت فرمولاسیون، تجاری‌سازی و در نهایت تولید انبوه آن‌ها جهت کاربرد در عرصه‌های فضای سبز و حتی جنگلی صورت پذیرد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر قسمتی از یک پروژه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور است. بدین وسیله از مؤسسه مذکور که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم کرده است، سپاسگزاری می‌شود. همچنین از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به پاس در اختیار قرار دادن نهال‌های شمشاد جنگلی و جدایه قارچی بیمارگر بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

References

Alfenas, R.F., Pereira, O.L., Freitas, R.G., Freitas, C.S., Dita, M.A.D. & Alfenas, A.C. 2013. Mass spore production and inoculation of *Calonectria pteridis* on *Eucalyptus* spp. under different environmental conditions. Tropical Plant Pathology, 38(5): 406–413.

Cook, R.J. 2000. Advances in plant health management in the 20th century. Annual Review of Phytopathology, 38: 95–116.

Crous, P.W., Groenewald ald, J.Z. & Hill, C.F. 2002. *Cylindrocladium pseudonaviculatum* sp. nov. from New Zealand, and new *Cylindrocladium* records from Vietnam. Sydowia, 54(1): 23–34.

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Three, The Firmicutes. Dordrecht; New York: Springer, 1422.

Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. 2nd Edition, Lewis Publishers, Bacarton, P. 434.

Fakhredin, F. & Mirabolfathy, M. 2014. Comparative effects of some fungicides to control boxwood blight. Proceeding of 21st Iranian Plant Protection Congress, Iran. p. 23.

Gehesquiere, B., D'Haeyer, S., Pham, K.T.K., Van Kuik, A.J., Maes, M., Hofte, M. & Heungens, K. 2013. qPCR assays for the detection of *Cylindrocladium buxicola* in the plant, water, and air samples. Plant Disease, 97: 1082–1090.

Hagedorn, C., Gould, W.D. & Bradinelli, R.T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied Environmental Microbiology, 55(11): 2793–2797.

Hasanzadeh, N. 2005. Identification and classification of phytopathogenic bacteria. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran, 520 p. (In Persian with English summary)

Hebert, J.B., Crouch, J.A., Cornelius, L., Ndukwe, P., Ismaiel, E. & Beirn, L.A. 2014. The fungal rhizosphere of boxwoods: implications for control of the blight fungus *Calonectria pseudonaviculata*. 2014 APS–CPS Joint Meeting August 9–13 Minneapolis, Minnesota .

Henricot, B. & Culham, A. 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus* spp, and its phylogenetic status. Mycologia, 94(6): 980–997.

Henricot, B., Gorton, C., Denton, G. & Denton, J. 2008. Studies on the control of *Cylindrocladium buxicola* using fungicides and host resistance. Plant Disease, 92: 1273–1279.

Jalili, A. & Jamzad, Z. 1999. Red data book of Iran: A preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran, 748p.

Kajimura, Y.M. 1995. Sugiyama and M. Kaneda. "Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR–2. The Journal of Antibiotics, 48(10): 1095–1103.

Khazaeli, P., Rezaee, S., Mirabolfathy, M., Zamanizadeh, H., & Kiadaliri, H. 2015. Distribution, specific detection, and the pathogenesis variation of *Calonectria pseudonaviculata* isolates, the causal agent of boxwood blight disease, in the Hyrcanian forest of Iran. Entomology and Phytopathology, 84(1): 141–156. (In Persian with English summary), https://doi.org/10.22092/JAEP.2016.106536.

Kong, P. & Hong, C.X. 2017. Biocontrol of boxwood blight by *Trichoderma koningiopsis* Mb2. Crop Protection, 98: 124–127.

LaMondia, J.A. 2014. Fungicide efficacy against *Calonectria pseudonaviculata*, the causal agent of boxwood blight. Plant Disease, 98: 99–102.

LaMondia, J.A. 2015. Management of *Calonectria pseudonaviculata* in boxwood with fungicides and less susceptible host species and varieties. Plant Disease, 99(3): 363–369.

Loeffler, W., Tschen, J.S.M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T.F. & Wu, T.G. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. Journal of Phytopathology, 115(3): 204–213.

McSpadden Gardener, B.B. & Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. Plant Health Progress. http://dx.doi.org/10.1094/PHP–2002–0510–01–RV.

Mirabolfathy, M., Ahangaran, Y., Lombard, L. & Crous, P.W. 2013. Leaf blight of *Buxus sempervirens* in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*. Plant Disease, 97: 1121.

Mozafarian, V. 2015. Identification of medicinal and aromatic plants of Iran. Farhang Moaser, 1444Pp. (In Persian)

Samavat, S. 2020. Evaluation of the antagonistic activity of some bacterial isolates belonging to *Pseudomonas fluorescens* against boxwood blight disease. 7th National Conference on Applied Research in Healthy Food Sciences from Farm to Table. Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. January, 15: 1–10. (In Persian with English summary)

Samavat, S., Samavat, S. & Matinizadeh, M. 2019. Assessment of mineral phosphate solubilization potential of rhizobacteria associated with poplar habitats in Tehran and Alborz provinces in order to produce phosphate biofertilizers. Final report of the project approved by the Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. 66 pages. (In Persian with English summary)

Schaad, N.W., Jones, J.G. & Chen, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd Edition, APS Press, St. Paul.

Schreiber, L.R. Gregory, G.F., Krause, C.R. & Ichida, J.M. 1988. Production, partial purification, and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*. Canadian Journal of Botany, 66(11): 2338–2346.

Shishkoff, N. 2016. Survival of microsclerotia of *Calonectria pseudonaviculata* and *C. henricotiae* exposed to sanitizers. Plant Health Research, 17(1): 13–17.

Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. & Maheshwari, D.K. 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(9): 1669–1679.

Taghinasab, M., Ruhani, H. & Karimi, 2007. Evaluation of the antagonistic activity of *Bacillus subtilis* isolates on *Pythium ultimum*, the causal agent of cucumber damping–off. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 14 (1): 83–93. (In Persian with English summary)

Yang, X. & Hong, C. 2018. Biological control of boxwood blight by *Pseudomonas protegens* recovered from recycling irrigation systems. Biological Control. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.014.

Antagonistic activity of bacterial isolates belonging to *Bacillus* against boxwood blight disease under greenhouse conditions

Samaneh Samavat

Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
Corresponding authors: Samaneh Saavat, email: samaneh.samavat@gmail.com

Received: Feb., 06, 2023 9(2) 153–164 Accepted: Mar., 03, 2023

Abstract

The outbreak of boxwood blight disease caused by *Calonectria pseudonaviculata* in the Hyrcanian forests has led to efforts to find effective methods to control the disease. Biological control of the disease by beneficial microorganisms is one of these measures. In this regard, the present study was carried out in a completely randomized design with four replications at both laboratory and greenhouse levels. First, the antagonistic activity of 15 *Bacillus* isolates against the fungal pathogen was investigated using the dual–culture test, and the superior isolates (FRBP2, FRBS9, FRBS10, and FRBS15) were identified using standard biochemical tests at the species level. Tebuconazole and Serenade® were used as chemical and biological controls, respectively, according to their relevant instructions. The effect of the superior isolates' suspension (10^8 CFU/ml) on the severity percentage of boxwood blight disease was evaluated under greenhouse conditions. Among the isolates, the highest (76.4%) and the lowest (26.5%) inhibition of the fungal colony growth was related to *B. subtilis* FRBS9 and *B. pumilus* FRBP2, respectively. In greenhouse conditions, *B. subtilis* FRBS9 and *B. subtilis* FRBS10 caused the lowest disease severity and showed no statistically significant difference with Serenade® ($P<0.05$). Thus, isolates belonging to the same or different species of *Bacillus* showed different levels of antagonistic activity against the target fungal pathogen. These isolates were able to control the fungal agent of boxwood blight through antibiosis and the production of a range of antibiotics. But more studies are needed to find their other antagonistic mechanisms and prepare their appropriate formulations.

Keywords: Antibiosis, blight, suspension, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*