

مقاله تحقیقی

شناسایی میکروارگانسیم‌های آنتاگونیست همراه فیلوسفر توت فرنگی و ارزیابی آنها در مهار زیستی
*Botrytis cinerea*نسرین سیدی^۱، حمیدرضا علیزاده^۲، مهدی آزادوار^۳، امیررضا امیرمیحانی^۴

۱، ۲، ۴- کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۳- دانشیار، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران.

مسئول مکاتبات: امیررضا امیرمیحانی، ایمیل: ar.amirmijani@ujroft.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۶

۶۹-۴۹ (۱) ۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰

چکیده

بیماری کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* یکی از بیماری‌های مهم توت‌فرنگی است که باعث پوسیدگی میوه پیش و پس از برداشت محصول می‌شود. کنترل زیستی با استفاده از عوامل بیوکنترل یک روش ایمن و سالم برای کاهش خسارت این بیماری است. در این پژوهش با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت، در مجموع ۲۶۸ جدایه باکتریایی و ۱۳۶ جدایه قارچی از فیلوسفر گیاهان توت‌فرنگی گلخانه‌ای و فضای باز شهرستان جیرفت جداسازی و خالص‌سازی شد. اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها در برابر بیمارگر *B. cinerea* به روش‌های کشت متقابل و بررسی هاله بازدارنده و اثر ترکیبات فرار در شرایط آزمایشگاه و همچنین خواص ضدقارچی باکتری-های آنتاگونیست روی میوه توت‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی جدایه‌های باکتری و قارچی منتخب براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به ترتیب با تعیین توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16S-rDNA و ناحیه ITS-rDNA انجام گرفت. نتایج نشان داد که از بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌های باکتریایی UJB1، UJB3، UJB4، UJB10، UJB5، UJB6، UJB7، UJB11، UJB2، UJB8، UJB9 و جدایه قارچی UJF1300، UJF1301، UJF1302، UJF1303، UJF1304، UJF1305 اثر بازدارندگی موثری علیه *B. cinerea* داشتند و ترکیبات فرار آنها رشد پرگنه بیمارگر را کاهش داد. در ارزیابی اثر ضدقارچی جدایه‌های باکتری روی میوه توت‌فرنگی، جدایه‌های باکتریایی UJB8، UJB2، UJB11، UJB6، UJB5، UJB10، UJB4، UJB1، میزان شاخص بیماری ناشی از قارچ *B. cinerea* را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش دادند. نتایج آنالیز داده‌های حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدی نشان داد که جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس‌های *Delftia* (جدایه‌های UJB1، UJB3، UJB4، UJB10)، *Bacillus* (جدایه‌های UJB5، UJB6، UJB7، UJB11 و UJB2) و *Stenotrophomonas* (جدایه‌های UJB8 و UJB9) و جدایه‌های قارچی متعلق به گونه‌های *Albifimbria verrucaria*، *Seimatosporium* و *Pseudozyma flocculosa*، *Pilidium lythri*، *Leptosphaerulina australis*، *Aspergillus terreus* می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیوکنترل، جیرفت، ITS-rDNA، 16S-rDNA

مقدمه

باعث کاهش عملکرد محصول آن می‌شوند. بیماری کپک خاکستری ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* Pers. Fr. یکی از بیماری‌های مهم توت‌فرنگی در دنیا محسوب می‌شود (Williamson et al., 2007; Huang et

توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch) یک گیاه علفی دائمی از خانواده گل سرخیان (*Rosaceae*) است. آفات و بیماری‌های متعددی به این گیاه آسیب می‌رسانند و

میسلیومی *B. cinere* را مهار کردند (Bruisson *et al.*, 2019). مخمرهای اپی‌فیتیک *Candida oleophila* و *Debaryomyces hansenii* و باکتری‌های اپی‌فیتیک *B. subtilis* و *B. pumilus*، *Bacillus amyloliquefaciens* از پوست مرکبات جدا شده و به طور قابل توجهی بروز پوسیدگی ناشی از *Penicillium digitatum* و *P. italicum* عوامل ایجاد کننده کپک سبز و آبی، را روی میوه‌های مرکبات کاهش دادند (Hammami *et al.*, 2022). باکتری‌های اپی فیت *Asaia* و *Bacillus velezensis* و *spathodeae* باعث کنترل بیماری‌های کپک خاکستری و پوسیدگی آلترناریایی ناشی از *B. cinere* و *Alternaria alternata* در زغال اخته شدند (Chacón *et al.*, 2022). با توجه به اهمیت کشت توت فرنگی در منطقه جیرفت و گزارش‌های متعدد مبنی بر خسارت ناشی از کپک خاکستری روی این محصول، این پژوهش با هدف شناسایی میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست همراه فیلوسفر توت فرنگی و ارزیابی آنها در مهار زیستی *B. cinere* انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ‌ها و باکتری‌های فیلوسفر توت فرنگی

به منظور بررسی جامعه میکروبی فیلوسفر توت فرنگی، طی فصول تابستان و زمستان سال ۱۳۹۷ در شهرستان جیرفت نمونه برداری تصادفی از اندام‌های برگ، گل و ساقه گیاه سالم توت فرنگی صورت گرفت. نمونه‌های جمع آوری شده از هر مزرعه یا گلخانه به قطعات کوچک خرد و در هاون چینی پودر شدند. سوسپانسیونی از ۵ گرم نمونه پودر شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل آماده و هفت سری رقت از آن تهیه شد که رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} برای جداسازی قارچ‌ها و 10^{-4} تا 10^{-7} برای جداسازی باکتری‌ها استفاده شد (Redmond *et al.*, 1987). برای کشت، از هر سری رقت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت PDA به منظور جداسازی قارچ‌ها و روی محیط کشت NA برای جداسازی باکتری‌ها استفاده شد (Redmond *et al.*, 1987). برای خالص سازی باکتری‌ها از کشت مخطط (پنج ضلعی) و برای

(*al.*, 2011) برای کنترل این بیماری از قارچ‌کش‌های مختلفی استفاده می‌شود. کاربرد قارچ‌کش‌ها علیه بیماری، باعث اختلال در عمل گرده‌افشانی، وجود باقیمانده سم روی میوه و ظهور پدیده مقاومت در قارچ بیمارگر می‌شود و لازم است از دیگر روش‌ها برای مدیریت بیماری استفاده کرد (Rabolle *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2011). یکی از روش‌های ایمن و سالم برای کاهش آسیب و زیان بیماری‌های پس از برداشت، از جمله بیماری پوسیدگی میوه توت فرنگی، کنترل زیستی و استفاده از عوامل بیوکنترل نظیر عوامل میکروبی موجود در فیلوسفر گیاهان است. مهار *B. cinerea* در برگ‌های توت فرنگی به طور موثر با *Bacillus subtilis* (Helbig & Bochow, 2001) و مخمر *Cryptococcus albidus* گزارش شده است (Helbig, 2002). باکتری‌های اپی‌فیت *Paenibacillus macerans* و *Bacillus pumilus* که از سطح برگ‌های سالم گوجه فرنگی جدا شدند باعث کنترل لکه باکتریایی ناشی از *Xanthomonas vesicatoria* و لکه موجی ناشی از *Alternaria solani* شدند (Lanna Filho *et al.*, 2010). مخمر اپی‌فیتیک *Issatchenkia terricola* در انگور باعث کنترل *B. cinerea* شد (Vargas *et al.*, 2012). باکتری‌های *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis*، *Delftia lacustris* از فیلوپلن برخی گیاهان زراعی مانند گوجه فرنگی، بامیه، بادام زمینی و ... جداسازی شدند و علیه عوامل ایجاد کننده پوسیدگی و پژمردگی ریشه مانند *Fusarium oxysporum*، *Sclerotium lycopersici*، *Pythium ultimum* f. sp. *rolfsii* و *Rhizoctonia solani* بکار برده شدند و شدت بیماری ناشی از این بیمارگرها را کاهش دادند (Janahiraman *et al.*, 2016). مخمرهای *Candida saitoana*، *Curvibasidium pallidicorallinum*، *Metschnikowia chrysoperlae* و *Metschnikowia pulcherrima* جدا شده از میوه و جوانه‌های انگور، در شرایط آزمایشگاهی توانایی مهار *B. cinerea* را داشتند و روی میوه علائم بیماری ناشی از این بیمارگر را کاهش دادند (Wang *et al.*, 2018). شش سویه اپی‌فیت باسیلوس در انگور به طور قابل توجهی رشد

سلسیوس نگهداری و میزان بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها پس از ۷ روز براساس فاصله‌هایی که بین حاشیه پرگنه قارچ و جدایه باکتری (هاله بازدارندگی) ایجاد شده بود اندازه‌گیری شد (Utkhede & Sholberg., 1986).

تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های باکتریایی روی *Botrytis cinerea* در شرایط آزمایشگاهی

برای این منظور ابتدا، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری توسط میله شیشه‌ای بر سطح محیط کشت NA پخش شد و تشتک‌های پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در اتاقک رشد نگهداری شدند. سپس، دیسک میسلومی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه و در حال رشد قارچ بیمارگر *B. cinerea* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. در شرایط سترون تشتک‌های پتری حاوی قارچ به طور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی باکتری آنتاگونیست قرار گرفت و لبه تشتک‌ها روی هم قرار گرفته توسط نوار پارافیلیم بطور کامل مسدود شدند. در تشتک پتری شاهد فقط دیسکی از محیط کشت PDA حاوی قارچ در مقابل پتری حاوی NA بدون باکتری قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز نگهداری شدند. درصد بازدارندگی از رشد میسلوم پس از ۷ روز با اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ و بر اساس فرمول زیر (Shi & Sun, 2017) محاسبه شد. این آزمون برای باکتری‌هایی که قادر به ایجاد هاله بازدارنده در برابر *B. cinerea* بودند انجام شد.

خالص‌سازی قارچ‌ها از روش تک اسپور و نوک ریشه استفاده شد (Sanders, 2012; Zhang et al., 2013). برای نگهداری باکتری‌ها از گلیسرول ۱۵ درصد و سولفات منیزیم یک صدم مولار و برای نگهداری قارچ‌ها از روش کاغذ صافی سترون استفاده شد.

تهیه قارچ بیمارگر *Botrytis cinerea*

میوه‌های توت‌فرنگی با علائم کپک خاکستری از گلخانه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. با استفاده از سوزن استریل از ریشه‌ها و کنیدیوم‌های سطح میوه آلوده برداشته و در محیط کشت PDA کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از تکمیل رشد قارچ از روش تک اسپور برای خالص‌سازی قارچ بیمارگر استفاده شد (Rasiukevičiūtė et al., 2018). شناسایی مورفولوژیکی قارچ *B. cinerea* با استفاده از منابع معتبر (Ellis, 1971; Mirzaei et al., 2008) انجام شد و به منظور تایید شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌ها بخشی از ناحیه ژنی ITS-rDNA توالی‌یابی شد.

بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی از رشد *Botrytis cinerea* در شرایط آزمایشگاهی

برای این منظور، یک دیسک ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه پرگنه فعال قارچ *B. cinerea* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA+NA (۵۰/۵۰) قرار داده شد و جدایه‌های باکتری بصورت نقطه‌ای در چهار طرف تشتک پتری قرار داده شدند. ظروف پتری در دمای ۲۷-۲۵ درجه

قطر کلنی قارچ پتری دیش تیمار-قطر کلنی قارچ پتری دیش شاهد

قطر کلنی قارچ در پتری دیش شاهد

×۱۰۰

=درصد بازدارندگی از رشد

از حاشیه تشتک پتری حاوی PDA قرار داده شدند (Pandey et al., 1993). در تیمار شاهد به جای دیسک قارچ، از یک دیسک PDA سترون استفاده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. قدرت آنتاگونیستی بر مبنای واکنش‌های محل برخورد دو کلنی و

آزمون کشت متقابل برای قارچ بیمارگر و قارچ‌های آنتاگونیست

در این روش دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه هفت روزه هر یک از جدایه‌های قارچی و قارچ بیمارگر *B. cinerea* مقابل یکدیگر و به فاصله نیم سانتی‌متر

در سولفات منیزیم ۰/۰۱ مولار تهیه و پس از دو بار شستشوی سلول‌ها، با استفاده از اسپکتروفتومتر غلظت (10^8 cfu/ml) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (Thompson et al., 1996). برای تهیه مایع تلقیح بیمارگر سوسپانسیون اسپور از کشت هفت روزه قارچ *B. cinerea* تهیه و غلظت 10^5 با استفاده از لام هموسایتومتر تهیه و استفاده شد.

میوه‌های یکنواخت توت‌فرنگی رقم پاروس از گلخانه تهیه با هیپوکلرید سدیم دو درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس در آب مقطر استریل سه بار آبکشی و روی دستمال کاغذی استریل قرار گرفتند تا رطوبت سطحی حذف شود. برای انجام این آزمون از ظروف یکبار مصرف درب‌دار استفاده شد در داخل هر ظرف یک پارچه مرطوب شده با آب مقطر استریل و یک توری فلزی قرار داده شد. سپس میوه‌های سالم روی توری قرار گرفت و باکتری آنتاگونیست با غلظت 10^8 CFU/ml روی میوه‌ها اسپری شد و بعد از ۱۲ ساعت سوسپانسیون 10^5 اسپور در میلی لیتر قارچ *B. cinerea* روی میوه‌ها اسپری شد. در یک تیمار فقط از باکتری آنتاگونیست، در تیمار شاهد آلوده فقط از بیمارگر استفاده شد و در شاهد سالم از هیچ یک از آنتاگونیست و بیمارگر استفاده نشد. از هر تیمار سه تکرار و در هر تکرار از سه میوه توت‌فرنگی استفاده شد (Donmez et al., 2011; Zangoei et al., 2013). ارزیابی میزان بروز بیماری هفت روز بعد از تلقیح با بیمارگر براساس نمره‌دهی علائم روی میوه‌ها، صفر بدون بیماری، ۱ = میوه کمتر از ۵ درصد، ۳ = میوه ۶ تا ۱۰ درصد، ۵ = ۱۱ تا ۲۵ درصد، ۷ = ۲۶ تا ۵۰ درصد، ۹ = بیشتر از ۵۰ درصد میوه‌ها صورت گرفت و شاخص بیماری براساس فرمول زیر محاسبه شد (Shi & Sun, 2017).

$$100 \times (\text{بالاترین نمره} \times \text{تعداد کل میوه}) / (\text{تعداد میوه با نمره میزان بیماری مشابه} \times \text{نمره میزان بیماری}) = \text{شاخص بیماری}$$

شناسایی جدایه‌هایی که در دو آزمون کشت متقابل و ترکیبات فرار به عنوان موثرترین جدایه‌ها انتخاب شدند، به

همچنین رشد کلنی آنتاگونیست روی بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفت (Pandey et al., 1993).

آزمون تولید ترکیبات فرار ضد قارچی در قارچ‌های آنتاگونیست

دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت جوان قارچ و *B. cinerea* به طور جداگانه در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شدند. سپس درب تشتک‌های پتری مربوط به جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر تحت شرایط استریل برداشته و تشتک حاوی *B. cinerea* به طور وارونه روی تشتک قارچ آنتاگونیست قرار گرفت. در تشتک‌های پتری شاهد، دیسکی از محیط کشت PDA جایگزین قارچ آنتاگونیست شد. محل تماس دو تشتک پتری با پارافیلیم و نوار چسب به خوبی مسدود شد تا ارتباط داخل دو تشتک با محیط خارج به صورت کامل قطع شود. تشتک‌های پتری در انکوباتور با درجه حرارت ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی قرار داده شدند. و قطر پرگنه قارچ بیمارگر به طور منظم اندازه‌گیری و درصد ممانعت از رشد بیمارگر توسط جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از رابطه $A-B/A \times 100$ محاسبه شد. در این فرمول A قطر کلنی بیمارگر در شاهد، B قطر کلنی بیمارگر در تیمار است (Dennis & Webster, 1971). این آزمون برای قارچ‌هایی که در کشت متقابل قادر به ایجاد هاله بازدارنده در برابر *B. cinerea* بودند، انجام شد.

بررسی خواص ضدقارچی باکتری‌های آنتاگونیست در برابر *Botrytis cinerea* روی میوه توت‌فرنگی

مایه تلقیح جدایه‌های باکتریایی منتخب از کشت ۲۴ ساعته روی محیط کشت NA تهیه شد. سوسپانسیون باکتری

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

میانگین-ها در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه آماری احتمال پنج درصد صورت گرفت. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار اکسل (Excel ver. 2013) ترسیم شدند.

نتایج

جداسازی و شناسایی *Botrytis cinerea*

قارچ *B. cinerea* از نمونه‌های میوه توت فرنگی دارای علائم بیماری پوسیدگی خاکستری جداسازی و خالص سازی و با استفاده از نوشته (Ellis, 1971; Mirzaei et al., 2008) شناسایی شد. شناسایی دقیق قارچ مذکور با بررسی‌های مولکولی تأیید شد. نتایج حاصل از تعیین توالی بخشی از ناحیه ITS-rDNA شباهت ۱۰۰ درصدی با *B. cinerea* را نشان داد که با شماره OP219728 در پایگاه داده NCBI قابل دسترسی می‌باشد. اثبات بیماری‌زایی قارچ مذکور روی میوه‌های جدا شده توت فرنگی انجام شد. در این آزمون، علائم بیماری کپک خاکستری ناشی از *B. cinerea* ۴۸ ساعت پس از مایه زنی میوه‌ها با سوسپانسون قارچ بیمارگر، به صورت ریشه‌های سفید که با گذشت زمان و تولید اسپور به صورت توده‌های خاکستری رنگ، روی سطح میوه ظاهر شدند (شکل ۱). قارچ بیمارگر مجدد از میوه‌های دارای علائم جداسازی شد.



شکل ۱- (a) میوه‌های تلقیح شده با *Botrytis cinerea*، (b) شاهد

Fig. 1. a) Fruits inoculated with *Botrytis cinerea*, b) control

جداسازی و غربال قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست

از نمونه‌های مورد بررسی ۲۶۸ جدایه باکتری و ۱۳۶ جدایه قارچ جداسازی و خالص‌سازی شد و توان

روش مولکولی و با تعیین توالی بخشی از ناحیه ژنی 16S-rDNA به صورت زیر انجام شد.

استخراج DNA باکتری‌ها به روش جوشاندن و از کشت جوان آن صورت گرفت (Dashti et al., 2009). به منظور تکثیر قطعه‌ای از ناحیه 16S-rDNA از آغازگرهای عمومی پروکاریوت‌ها (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' rD1 و 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با مراحل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، اتصال آغازگرها ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، تکثیر رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد (Weisburg et al., 1991).

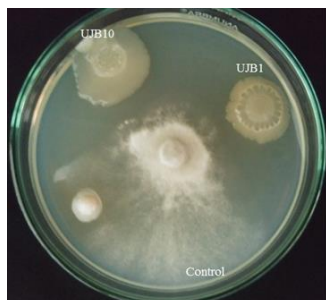
تکثیر ناحیه ITS-rDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به جدایه‌های قارچی آنتاگونیست

برای این منظور استخراج DNA از جدایه‌های قارچی با استفاده از روش سنس (Cenis, 1992) انجام شد. تکثیر بخشی از ناحیه ژنی ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-ITS4 و 3'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-ITS5) انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت شش دقیقه انجام شد (Dehghani et al., 2022).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با روش تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه

UJB6، UJB7 به ترتیب با ۱۵/۳، ۱۲/۶، ۱۱/۶، ۱۱/۳، ۱۱/۳، ۱۱/۳، ۱۰، ۹، ۸، ۸ میلی‌متر، هاله بازدارنده در برابر *B. cinerea* ایجاد کردند (شکل ۳).

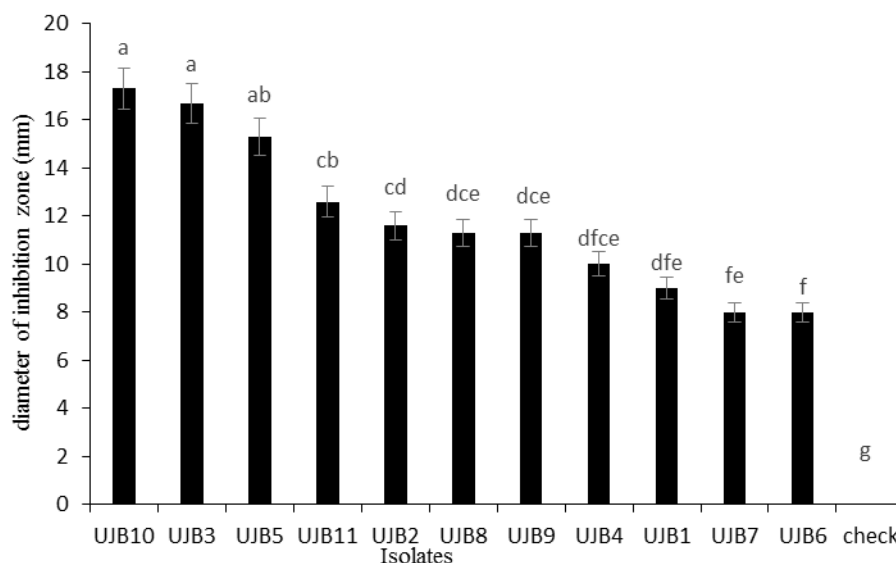


شکل ۲- هاله بازدارنده ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتریایی UJB10 و UJB1 علیه *Botrytis cinerea* پس از هفت روز

Fig. 2. Inhibition zone created by bacterial isolates UJB10 and UJB1 against *Botrytis cinerea* after seven days.

آنتاگونیستی آنها در شرایط آزمایشگاهی در برابر قارچ *B. cinerea* با آزمون هاله بازدارنده و ترکیبات فرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های مختلف باکتری علیه *B. cinerea* نشان داد که از میان ۲۶۸ جدایه باکتریایی، یازده جدایه قادر به ایجاد هاله بازدارنده در برابر *B. cinerea* بودند و در گروه‌های آماری مختلفی گروه‌بندی شدند. از این نظر بین جدایه‌های آنتاگونیست و شاهد در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری وجود داشت. نتایج نشان داد از میان این جدایه‌های باکتری، جدایه باکتری UJB10 و UJB3 به ترتیب با میانگین قطر هاله ۱۷/۳ و ۱۶/۷ میلی‌متر بیشترین بازدارندگی از ریشه *B. cinerea* را ایجاد کردند (شکل ۲).

علاوه بر جدایه‌های UJB10 و UJB3 جدایه‌های UJB1، UJB4، UJB9، UJB8، UJB2، UJB11، UJB5



شکل ۳- مقایسه میانگین‌های قطر هاله بازدارنده جدایه‌های باکتریایی علیه *Botrytis cinerea* در کشت متقابل پس از هفت روز، ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0/5$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

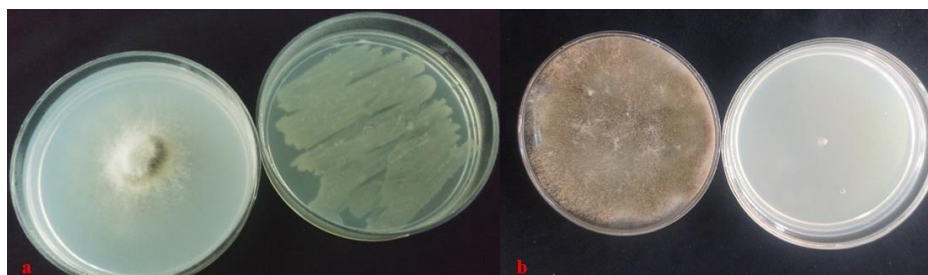
Fig. 3. Comparison between the average diameters of inhibition zone created by bacterial isolates in dual culture assays against *Botrytis cinerea* after seven days. The mean diameter of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). Columns with at least one common letter are not statistically different.

مورد بررسی و شاهد از نظر تولید ترکیبات فرار در سطح آماری پنج درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بر اساس این نتایج ترکیبات فرار جدایه باکتری UJB11 به میزان

آزمون تولید ترکیبات فرار برای یازده جدایه باکتری که قادر به تولید هاله بازدارنده بودند انجام شد. نتایج حاصل از اثر ترکیبات فرار جدایه‌های مختلف باکتریایی علیه بیمارگر *B. cinerea* نشان داد که بین جدایه‌های باکتری

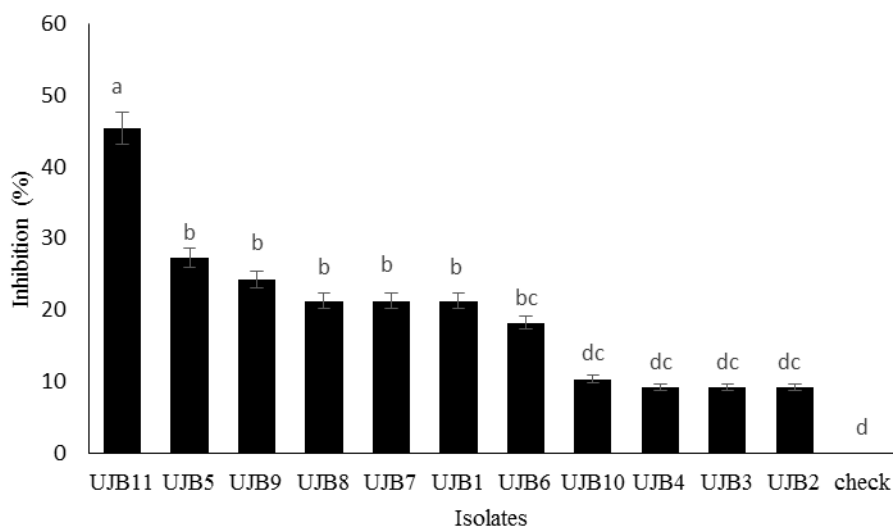
UJB2 و UJB3 به ترتیب ۲۷/۲۷، ۲۴/۲۴، ۲۱/۲۱، ۲۱/۲۱، ۲۱/۲۱، ۱۸/۱۸، ۱۰/۳، ۹/۰۹، ۹/۰۹، ۹/۰۹ درصد بود (شکل ۵).

۴۵/۴۵ درصد از رشد پرگنه *B. cinerea* جلوگیری کرد و این جدایه بیشترین درصد بازداری را دارا بود (شکل ۴). در حالی که درصد بازداری جدایه‌های UJB5، UJB4، UJB10، UJB6، UJB1، UJB7، UJB8، UJB9



شکل ۴- تاثیر ترکیبات فرار تولید شده توسط جدایه باکتریایی UJB11 بر قارچ *Botrytis cinerea*؛ a) در مقایسه با شاهد (b) پس از هفت روز

Fig. 4. The effect of volatile compounds produced by bacterial isolate UJB11 on *Botrytis cinerea*; a) compared to control b) after seven days.



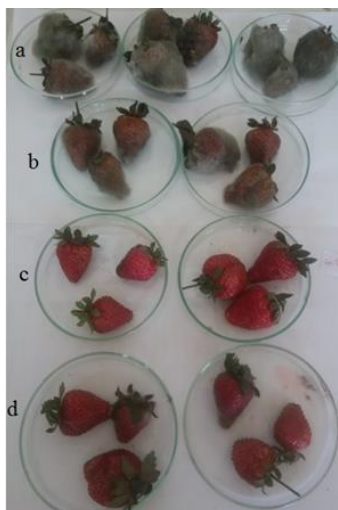
شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین ترکیبات فرار تولید شده به وسیله جدایه‌های باکتریایی بر رشد پرگنه *Botrytis cinerea* پس از هفت روز، ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 5. Comparison between the inhibiting effects of volatile compounds released by bacterial isolates on growth of *Botrytis cinerea* after seven days. The mean diameters of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). Columns with at least one common letter are not statistically different.

بیماری ناشی از *B. cinerea* بودند. جدایه‌های UJB9، UJB8، UJB4، UJB6، UJB1 و UJB11 به ترتیب با ۳۳/۳۳، ۵۳/۳۳، ۵۲/۲۲، ۴۴/۴۴، ۳۸/۸۹، ۳۳/۳۳ و ۳۳/۳۳ درصد شاخص بیماری با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بهترین

بررسی خواص ضدقارچی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی میوه توت‌فرنگی

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که همه جدایه‌های باکتریایی منتخب قادر به کاهش میزان شاخص



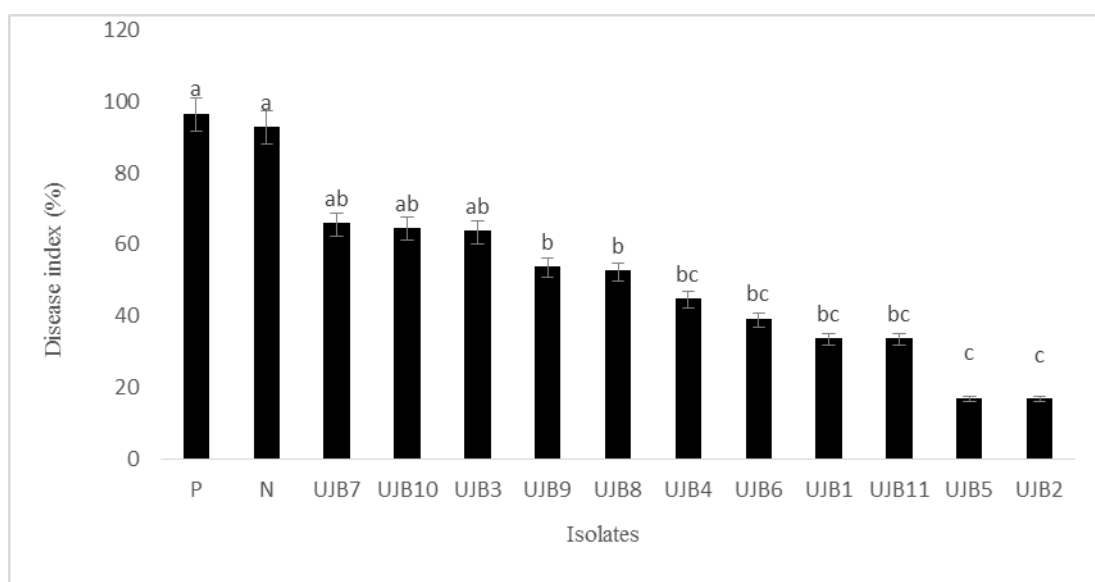
شکل ۶- اثر بازدارندگی جدایه باکتریایی UJB2 بر کاهش کپک خاکستری، *Botrytis cinerea* در مقایسه با شاهد آلوده روی میوه توت‌فرنگی هفت روز پس از تلقیح، (a) شاهد آلوده، (b) شاهد سالم، (c) فقط آنتاگونیست، (d) آنتاگونیست و بیمارگر

Fig. 6. The inhibitory effect of bacterial isolate UJB2 on the reduction of gray mold, *Botrytis cinerea* compared to the infected control on strawberry fruit seven days after inoculation, a) infected control, b) healthy control, c) only antagonist, d) antagonist and pathogen

عملکرد مربوط به جدایه‌های UJB2 و UJB5 بود که هر دو از جنس *Bacillus* بودند و شاخص بیماری را به میزان ۱۶/۶۶ درصد کاهش دادند و از گسترش بیماری جلوگیری کردند (شکل ۷ و ۶).

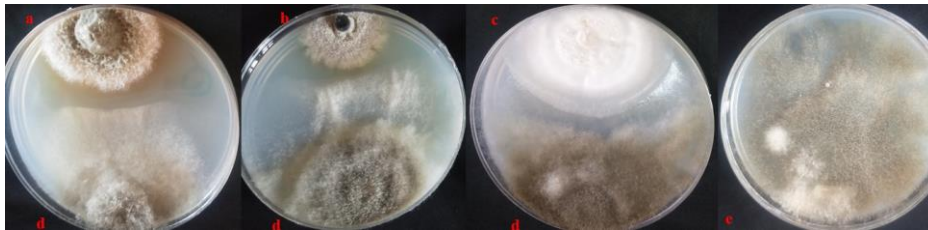
قابلیت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاهی

نتایج حاصل از بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های مختلف قارچی علیه *B. cinerea* نشان داد که از میان ۱۳۶ جدایه قارچی شش جدایه قادر به جلوگیری از رشد میسلومی *B. cinerea* بودند. از این نظر بین جدایه‌های آنتاگونیست و شاهد در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج آزمون کشت متقابل قارچ‌ها نشان داد که جدایه UJF1300 با میانگین قطر هاله ۷/۲۳ میلیمتر بیشترین هاله بازداری را در برابر قارچ *B. cinerea* ایجاد کرد (شکل ۸). و جدایه‌های UJF1302، UJF1301، UJF1303، UJF1304 و UJF1305 به ترتیب ۶/۱۶، ۵/۳۳، ۴، ۵، ۳/۶۶ میلیمتر هاله بازدارنده در برابر *B. cinerea* ایجاد کردند (شکل ۹).



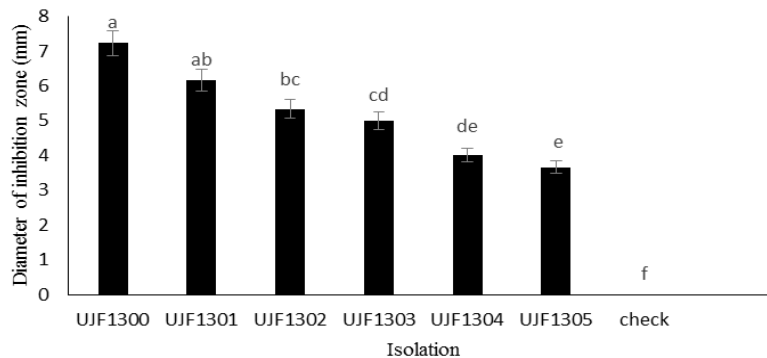
شکل ۷- نمودار مقایسه میانگین تاثیر جدایه‌های باکتریایی بر میزان شاخص بیماری ناشی از بیمارگر *Botrytis cinerea*

Fig. 7. Comparison chart of the average effect of bacterial isolates on the disease index caused by the pathogen *Botrytis cinerea*



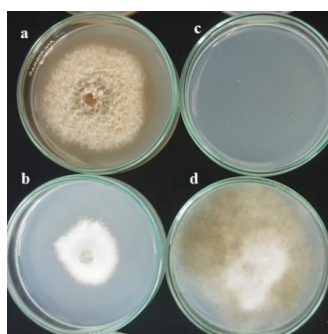
شکل ۸- (d) مهار رشد *Botrytis cinerea* توسط جدایه‌های قارچی (a) UJF1300، (b) UJF1304، (c) UJF1301، (e) شاهد (*B. cinerea*)

Fig. 8. d) *Botrytis cinerea* growth inhibition by fungal isolates a) UJF1300, b) UJF1304, C) UJF1301, e) control (*B. cinerea*)



شکل ۹- نمودار مقایسه میانگین قطر هاله بازدارندگی جدایه‌های قارچی در برابر *Botrytis cinerea* در کشت متقابل بعد از هفت روز، ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0/5$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

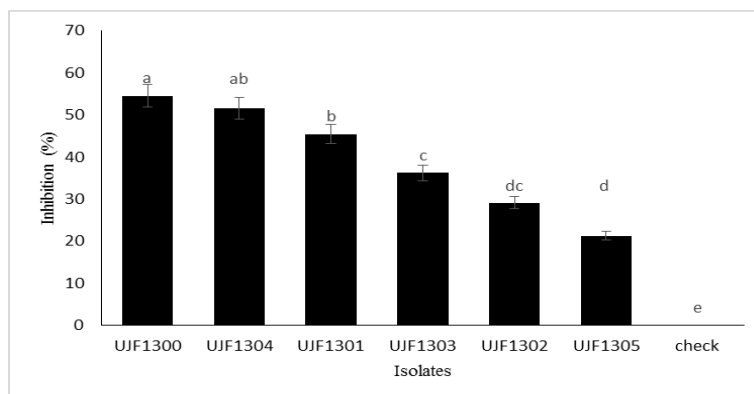
Fig. 9. Comparison between the average diameters of inhibition zone created by fungal isolates in dual culture assays against *Botrytis cinerea* after seven days. The mean diameter of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). Columns with at least one common letter are not statistically different.



شکل ۱۰- تاثیر ترکیبات فرار تولید شده توسط UJF1300 (a) در مهار رشد *Botrytis cinerea* (b) شاهد (c) محیط کشت *B. cinerea* (d)، PDA

Fig. 10. The effect of volatile compounds produced by a) UJF1300 in inhibiting the growth of b) *Botrytis cinerea*, control [c] PDA medium, d) *B. cinerea*

نتایج حاصل از اثر ترکیبات فرار جدایه‌های مختلف قارچی علیه *B. cinerea* نشان داد که بین جدایه‌های مورد بررسی و شاهد از نظر تولید ترکیبات فرار در سطح آماری پنج درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. این نتایج نشان داده که جدایه UJF1300 با ۵۴/۵۴ درصد، بیشترین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ *B. cinerea* را دارا بود (شکل ۱۰) و درصد بازدارندگی جدایه‌های UJF1301، UJF1304، UJF1303، UJF1302، UJF1305 به ترتیب ۵۱/۵۱، ۴۵/۴۵، ۳۶/۲، ۲۹/۰۸، ۲۱/۲۱ درصد می‌باشد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- نمودار مقایسه میانگین ترکیبات فرار تولید شده به وسیله جدایه‌های قارچی در برابر *Botrytis cinerea* پس از هفت روز، ستون‌های دارای حرف‌های مشترک در آزمون دانکن ($P \leq 0/5$) تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 11. Comparison between the inhibiting effects of volatile compounds released by fungal isolates on growth of *Botrytis cinerea* after seven days. The mean diameters of fungal colony in different treatments were compared using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). Columns with at least one common letter are not statistically different.

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

جست‌وجوی بلاست، مشخص شد که این توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن درصد مشابهت بالایی دارند. و برای این اساس جدایه‌های UJB1، UJB3، UJB4 و UJB10 به جنس *Delftia* و جدایه‌های UJB5، UJB6، UJB7، UJB11 و UJB2 به جنس *Bacillus* و جدایه‌های UJB8 و UJB9 به جنس *Stenotrophomonas* تعلق دارند (جدول ۱).

در جدایه‌های مختلف پس از انجام واکنش PCR استفاده از جفت آغازگرهای FD1/RD1 قطعه‌ای از DNA مربوط به توالی کد کننده 16S-rDNA با طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد. براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعات تکثیر شده و مقایسه آنها با توالی‌های موجود در بانک ژن در پایگاه NCBI و با استفاده از

جدول ۱- نتایج حاصل از توالی نوکلئوتیدی محصولات PCR برای باکتری‌های موثر

Table 1. Results of nucleotide sequence of PCR products for effective bacteria

Isolate	genus	Per. Ident	Accession number
UJB1	<i>Delftia</i> sp.	99/37%	OP218025
UJB3	<i>Delftia</i> sp.	99/46%	OP218026
UJB4	<i>Delftia</i> sp.	99/73%	OP218027
UJB10	<i>Delftia</i> sp.	99/37%	OP218028
UJB5	<i>Bacillus</i> sp.	98/35%	OP218029
UJB6	<i>Bacillus</i> sp.	98/34%	OP218030
UJB7	<i>Bacillus</i> sp.	100%	OP218031
UJB11	<i>Bacillus</i> sp.	98/45%	OP218032
UJB2	<i>Bacillus</i> sp.	98/40%	OP218033
UJB8	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99/45%	OP218034
UJB9	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99/36%	OP218035

ایران این قارچ گزارش شده است (Khezrinejad *et al.*, 2009)، اما بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از خاصیت آنتاگونیستی این قارچ است. خاصیت آنتاگونیستی این قارچ در دنیا در منابع مختلف گزارش شده است (Wagenaar & Clardy, 2001; Chen *et al.*, 2016).

کد جدایه UJF1303

میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط PDA و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از چهار روز به هفت سانتی متر می‌رسد. در این جدایه وزیکول‌های انتهایی معمولاً بیضوی، فیالید روی متولا و کنیدیوم‌ها به صورت ستونی روی آنها قرار دارند. کنیدیوفورها دارای دیواره، صاف، شفاف و طول آنها ۲۰۰-۸۷/۵ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها کوچک ۲-۱/۸ میکرومتر، گرد تا بیضوی و صاف می‌باشند (شکل ۱۳). خصوصیات جدایه مورد بررسی با توصیف ارائه شده توسط (de Hoog *et al.*, 2000) مطابقت داشت. این قارچ در گذشته از ایران گزارش شده است (Ershad, 2009). خاصیت آنتاگونیستی این قارچ در دنیا در منابع مختلف گزارش شده است (Melo *et al.*, 2006; Halo *et al.*, 2018). بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از خاصیت آنتاگونیستی *Aspergillus terreus* در ایران است.

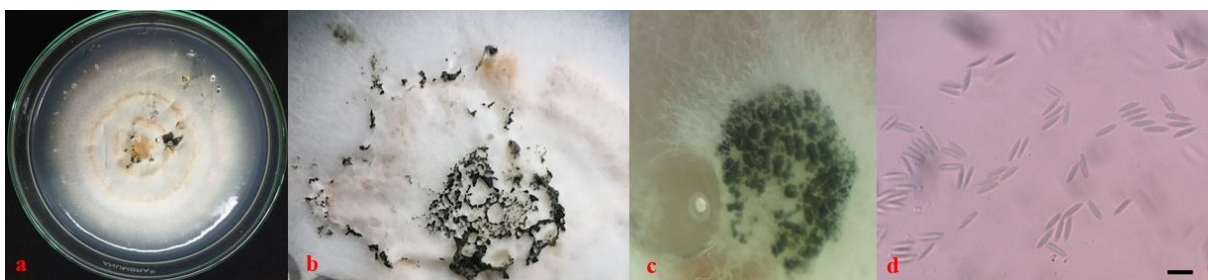
شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی جدایه‌های قارچی آنتاگونیست

شناسایی مورفولوژیکی قارچ‌ها براساس ویژگی‌هایی مانند سرعت رشد، رنگ پرگنه، خصوصیات میکروسکوپی مانند نوع پیکنیدیوم، ابعاد کنیدیوم‌ها و کنیدیوفورها، نوع آسکوکارپ، ابعاد آسک و آسکوسپور و ... و شناسایی مولکولی آنها از طریق استخراج DNA و با استفاده از واکنش PCR با آغازگرهای عمومی ITS4/ITS5 انجام شد و به شرح زیر می‌باشد:

Albifimbria verrucaria (Albertini and Schweinitz) L. Lombard and Crous, *Persoonia* 36: 177 (2016)

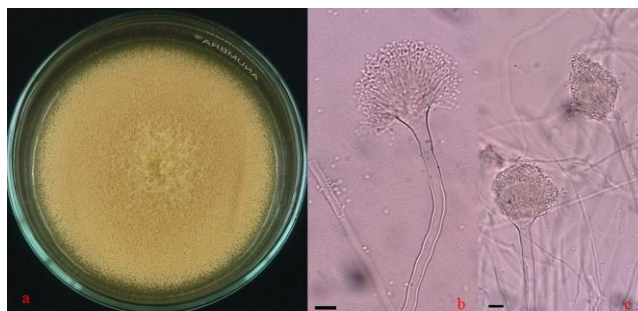
کد جدایه UJF1302

میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط PDA و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از ۱۴ روز به پنج سانتی متر می‌رسد. در سطح پرگنه اسپوردوخیوم‌ها و اسپورهای قارچ تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها ۳/۱-۱ × ۱۱-۶ میکرومتر، بدون دیواره عرضی، صاف و شفاف می‌باشند (شکل ۱۲). خصوصیات جدایه مورد بررسی با توصیف گونه *Albifimbria verrucaria* ارائه شده توسط تالک (Tulloch, 1972) مطابقت داشت و نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی نیز آن را تأیید کرد (جدول ۲). در



شکل ۱۲- قارچ *Albifimbria verrucaria* (a) پرگنه قارچ روی محیط PDA پس از ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، (b, c) اسپوردوخیوم‌ها در سطح پرگنه، (d) کنیدیوم‌های قارچ، مقیاس ۱۰ میکرومتر

Fig. 12. *Albifimbria verrucaria*, a) colony on PDA after 14-day at 25°C, b and c) showing sporodochium on colony surface, d) Conidia. Scale bars: 10µm
Aspergillus terreus Thom, American Journal of Botany, 5(2): 85 (1918)



شکل ۱۳- قارچ *Aspergillus terreus* (a) پرگنه قارچ روی محیط PDA پس از چهار روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ، b و c) کنیدیوفور، متولا و فیالید، مقیاس ۱۰ میکرومتر

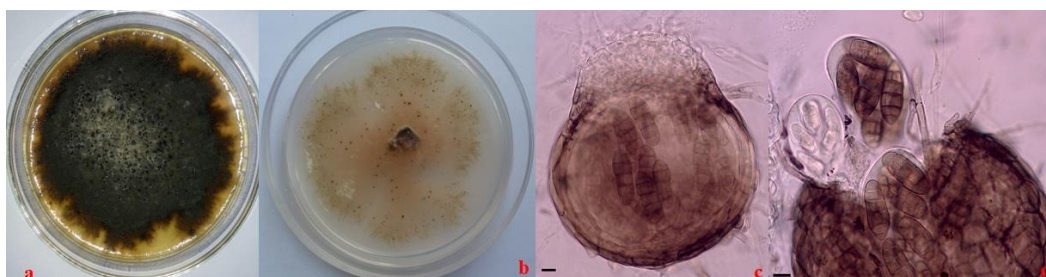
Fig. 13. *Aspergillus terreus*, a) colony on PDA medium after four days at 25°C, b and c) conidiophores, Metulae and Phialides. Scale bars: 10µm

Leptosphaerulina australis McAlpine, Fungus diseases of stone-fruit trees in Australia and their treatment: 103 (1902)

کد جدایه UJF1304

دیواره عرضی و ۳-۲ دیواره طولی، در دو انتها گرد و ۱۵-
۱۰ × ۲۷-۳۷ می‌باشند (شکل ۱۴). خصوصیات جدایه مورد
بررسی با توصیف ارائه شده توسط (Crous et al., 2011)
مطابقت داشت و نتایج حاصل از تعیین توالی بخشی از ناحیه
ITS-rDNA آن را تایید کرد (جدول ۲). براساس اطلاعات
ما این اولین گزارش از وجود قارچ *Leptosphaerulina*
australis در ایران و همچنین اولین گزارش در رابطه با
خاصیت آنتاگونیستی این قارچ در دنیا و ایران می‌باشد.

میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط SNA و در دمای
۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز به دو سانتی‌متر
می‌رسد. در محیط سودوتسیوم‌های کروی تا نیمه کروی،
منقرد یا خوشه‌ای، به رنگ قهوه‌ای تا سیاه ۲۰۰-۱۵۰ ×
۱۵۰-۱۰۰ میکرومتر تولید می‌کند. و دارای یک روزنه
مرکزی می‌باشد. آسک ۳۰-۴۵ × ۶۵-۱۲۰ میکرومتر،
شفاف، دوجداره و دارای هشت آسکوسپور است.
آسکوسپور در ابتدا شفاف و سپس قهوه‌ای، دارای ۴-۵



شکل ۱۴- قارچ *Leptosphaerulina australis* (a) پرگنه قارچ روی محیط PDA، (b) پرگنه قارچ روی محیط SNA پس از ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، (c) سودوتسیوم، (d) آسک و آسکوسپور، مقیاس ۱۰ میکرومتر

Fig. 14. *Leptosphaerulina australis*, a) colony on PDA medium, b) Fungal colony on SNA medium after 14 days at 25 °C, C) Pseudothecium, d) Asci and ascospores. Scale bars: 10µm

Pilidium lythri (Desm.) Rossman, IMA Fungus 5 (1): 105 (2014)

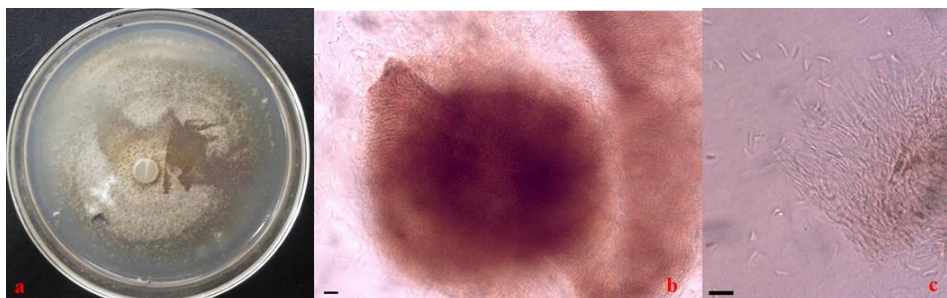
کد جدایه UJF1305

گرفته‌اند. کنیدیوم‌ها ۲-۱ × ۸-۶ میکرومتر، شفاف، بدون
دیواره عرضی، دوکی شکل و قایقی می‌باشند (شکل ۱۵).
توصیف نمونه مورد بررسی با توصیف ارائه شده توسط
(Ayoubi et al., 2016) مطابقت داشت و نتایج حاصل از
توالی‌یابی، این شناسایی را تایید کرد (جدول ۲). این گونه

میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط PDA و در دمای
۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز به هشت سانتی‌متر
می‌رسد. کنیدیوفورها ۱ × ۱۲-۵۰ میکرومتر، شفاف، تک
سلولی، نخی شکل و در یک لایه به صورت منظم قرار

قارچ در دنیا و ایران می باشد.

در ایران قبلا گزارش شده است (Ershad, 2009). براساس اطلاعات ما این اولین گزارش از خاصیت آنتاگونیستی این



شکل ۱۵- قارچ *Pilidium lythri* (a) پرگنه قارچ روی محیط PDA پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، (b) پیکنیدیوم قارچ، (c) لایه هیمیونیوم، مقیاس ۱۰ میکرومتر

Fig. 15. *Pilidium lythri*, a) colony on PDA medium after seven days at 25°C, b,c) Pycnidium, d) Hymenium layer. Scale bars: 10µm

Pseudozyma flocculosa (Traquair, L.A. Shaw and Jarvis) Boekhout and Traquair, Journal of General and Applied Microbiology Tokyo 41 (4): 364 (1995)

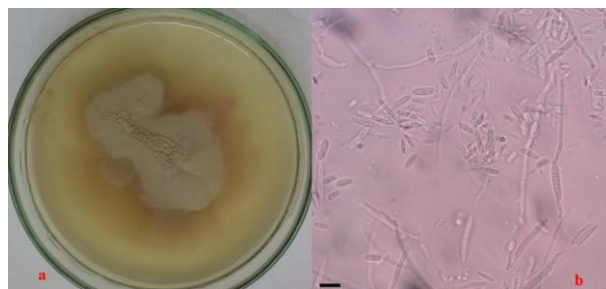
قهوه ای تیره تا سیاه تشکیل می شوند. کنیدیوفور شفاف، منشعب و دارای سه تا چهار دیواره و $3-4 \times 20-45$ میکرومتر می باشد. کنیدیومها بیضوی تا دوکی شکل، دارای سه دیواره هستند که دو سلول میانی قهوه ای رنگ و سلولهای بالایی و پایینی شفاف و دارای زائده می باشند. کنیدیومها $3-5 \times 12-22$ ، زائده بالایی $7-10$ و زائده پایینی $10-20$ میکرومتر اندازه گیری شد (شکل ۱۷). توصیف موجود با توصیف ارائه شده توسط کروس و همکاران مطابقت داشت (Crous *et al.*, 2014) و داده های به دست آمده از توالی ناحیه ITS-rDNA صحت شناسایی را تأیید کرد (جدول ۲). این جدایه با شماره دسترسی IRAN 3749C در مجموعه کشت های زنده، بخش تحقیقات رستنی ها، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی، تهران نگهداری می شود. در ایران این قارچ روی پسته گزارش شده است (Crous *et al.*, 2014). خاصیت ضدقارچی این قارچ در دنیا گزارش شده است (Hussain *et al.*, 2015) و بر اساس اطلاعات ما، این اولین گزارش از خاصیت آنتاگونیستی این قارچ در ایران می باشد.

کد جدایه UJF1301

شناسایی این قارچ مخمری به دلیل عدم تولید اندام های تولید مثل با روش مولکولی انجام شد و براساس داده های به دست آمده از توالی ناحیه ITS-rDNA این قارچ گونه *Pseudozyma flocculosa* شناسایی شد (جدول ۲). این قارچ از قارچ های مخمری شاخه *Basidiomycota* رده *Ustilaginomycetes*، راسته *Ustilaginales*، تیره *Ustilaginaceae* می باشد (شکل ۱۶). این قارچ مخمری در ایران گزارش شده است (Sabeti Mohammadi *et al.*, 2019). خاصیت آنتاگونیستی این قارچ در دنیا در منابع مختلف گزارش شده است (Hammami *et al.*, 2008; Paulitz & Bélanger, 2001). بر اساس اطلاعات ما این اولین گزارش از خاصیت آنتاگونیستی قارچ *Pseudozyma flocculosa* در ایران می باشد.

کد جدایه UJF1300

میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط PDA و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از ۱۴ روز به هفت سانتی متر می رسد. آسرونها به صورت منفرد در محیط به رنگ



شکل ۱۶- مخمر *Pseudozyma flocculosa*، (a) پرگنه مخمر روی محیط PDA بعد از هفت روز، (b) اسپوره‌های مخمر، مقیاس ۱۰ میکرومتر

Fig. 16. *Pseudozyma flocculosa*, a) colony on PDA medium after seven days, b) Spore. Scale bar: 10µm
Seimatosporium pistaciae Crous and Mirab. Persoonia 33: 249 (2014)



شکل ۱۷- قارچ *Seimatosporium pistaciae*، (a) پرگنه قارچ روی محیط PDA پس از دو هفته، (b) آسروول‌های تشکیل شده در محیط کشت، (c) کنیدیوم‌ها، مقیاس ۱۰ میکرومتر

Fig. 17. *Seimatosporium pistaciae*, a) colony on PDA medium after two weeks, b) acervulus formed in the culture medium, c) conidia. Scale bar: 10µm

جدول ۲- نتایج حاصل از توالی نوکلئوتیدی محصولات PCR برای قارچ‌های موثر

Table 2. Results of nucleotide sequence of PCR products for effective fungal

Isolate	genus	Per. Ident	Accession number
UJF1300	<i>Seimatosporium pistaciae</i> .	100%	OP219724
UJF1301	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	99/84%	OP219722
UJF1302	<i>Albifimbria verrucaria</i>	100%	OP219723
UJF1304	<i>Leptosphaerulina australis</i>	100%	OP219725
UJF1305	<i>Pilidium lythri</i>	100%	OP219726

بحث

Leptosphaerulina australis، *Aspergillus terreus* و *Pseudozyma flocculosa*، *Pilidium lythri* و *Seimatosporium pistaciae* بودند.

جدایه‌های UJB10 و UJB3 با میانگین قطر هاله ۱۷/۳ و ۱۶/۷ میلی‌متر بیشترین قطر هاله بازدارنده را علیه *B. cinerea* ایجاد کردند. در حالی که میزان ترکیبات فرار تولید شده توسط آنها نسبت به جدایه UJB11 که بیشترین میزان ترکیبات فرار را داشت قابل توجه نبود. ترکیبات فرار جدایه باکتری UJB11 به میزان ۴۵/۴۵ درصد از رشد پرگنه

در این پژوهش در مجموع ۲۶۸ جدایه باکتریایی و ۱۳۶ جدایه قارچی از فیلوسفر گیاهان توت‌فرنگی گلخانه‌ای و فضای باز شهرستان جیرفت جداسازی و خالص‌سازی شد. از میان ۲۶۸ جدایه باکتریایی ۱۱ جدایه و از میان ۱۳۶ جدایه قارچی شش جدایه در آزمون‌های کشت متقابل و ترکیبات فرار توانایی بازداری از رشد *B. cinerea* را داشتند. جدایه‌های باکتریایی متعلق به جنس‌های *Delftia*، *Stenotrophomonas* و *Bacillus* بودند و جدایه‌های قارچی متعلق به گونه‌های *Albifimbria verrucaria*

در شرایط گلخانه‌ای جدایه‌های UJB2، UJB5، UJB11 و UJB6 که همگی متعلق به جنس *Bacillus* بودند شاخص بیماری را به میزان قابل توجهی نسبت به شاهد کاهش دادند که ممکن است به علت متابولیت‌های تولید شده توسط این جنس باشد. گونه‌های مختلفی از جنس *Bacillus* از خاک و سطح برگ جداسازی شده که به دلیل تولید دامنه وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفتند (Baker et al., 1985). برای مثال متابولیت‌هایی مانند سورفکتین، ایتورین و فنجی‌سین تولید شده توسط *Bacillus subtilis* قادر به کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی می‌باشند (Kaspar et al., 2019). در پژوهشی فعالیت ضدقارچی جدایه‌ای از *Bacillus cinerea* در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه روی برگ‌های جداشده کاهو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه مذکور رشد مسلیومی و جوانه‌زنی قارچ *B. cinerea* را کاهش داد و همچنین قادر به تولید سیدروفور، آمونیاک، هیدروژن سیانید و کیتیناز بود (Bensidhoum et al., 2015). در پژوهشی یک سویه باکتری، *Bacillus cabrialesii* BH5، که از خاک ریزوسفر گوجه‌فرنگی جدا شده بود، برای کنترل پاتوزن قارچی *B. cinerea* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این سویه باکتری فعالیت ضد قارچی قوی علیه *B. cinerea* دارد. نتایج کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی جرمی نشان داد که این سویه یک لیپوپپتید حلقوی از خانواده فن‌جی‌سین با نام فن‌جی‌سین H تولید می‌کند که با تخریب غشای سلولی ریشه قارچ از رشد آن جلوگیری می‌کند و علاوه بر آن باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاهان گوجه‌فرنگی می‌شود (Zhou et al., 2021). در یک پژوهش باکتری اندوفیت *Bacillus velezensis*. JRX-YG39 از انگور جداسازی شد و فعالیت ضدقارچی آن علیه *B. cinerea* مورد بررسی قرار گرفت، با تجزیه و تحلیل کروماتوگراف گازی و طیف‌سنج جرمی، سی و یک متابولیت ثانویه شناسایی شد که از میان آنها ترکیب دی بوتیل فتالات بیشترین میزان را دارا بود و یک ترکیب ضدقارچی قوی بود (Feng et al., 2022).

B. cinerea جلوگیری کرد. از این رو ممکن است ایجاد هاله بازدارنده به دلیل تولید برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌هایی مانند کیتینازها و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (Fokkema, 1973; Raaijmakers et al., 2002; Jiang et al., 2018; Miljaković et al., 2020). در پژوهشی نشان داده شده است که نوع محیط کشت می‌تواند بر میزان تولید آنتی‌بیوتیک توسط آنتاگونیست‌ها اثر بگذارد و قطر هاله بازدارنده در کشت متقابل را تغییر دهد (Whipps, 1987). جدایه‌های UJB2 و UJB5 روی میوه شاخص بیماری را نسبت به شاهد، به میزان قابل توجهی کاهش دادند. روش‌های آزمایشگاهی مانند کشت متقابل به تنهایی کارایی یک آنتاگونیست را در شرایط گلخانه تایید نمی‌کند و داشتن یک عامل بیوکنترل خوب نیازمند یک سیستم بررسی دقیق و پیچیده از جمله بیمارگر، آنتاگونیست، گیاه و شرایط محیطی می‌باشد (Kohl et al., 2019; South et al., 2020).

جدایه‌های UJB10 و UJB3 متعلق به جنس *Delftia*، جدایه‌های UJB11، UJB2 و UJB5 متعلق به جنس *Bacillus* بودند. (Janahiraman et al., 2016). باکتری‌های *Delftia lacustris*، *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* را از فیلوپلن برخی گیاهان زراعی مانند گوجه‌فرنگی، بامیه، بادام زمینی و ... جداسازی کردند که علیه عوامل ایجاد کننده پوسیدگی و پژمردگی ریشه مانند *Pythium*، *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*، *Rhizoctonia solani* و *Sclerotium rolfsii ultimum* موثر بودند. کاربرد آنها در شرایط گلخانه باعث افزایش پروتئین‌های (کیتیناز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز) و آنزیم‌های دفاعی (فنیل‌آلانین-آمینولیا، پروکسیداز، پلی-فنل‌اکسیداز و کاتالاز) شد. در پژوهشی دیگر نشان داده شد که باکتری *Delftia acidovorans* علاوه بر اینکه باعث رشد و بهبود متابولیسم نیتروژن در گیاه نیشکر می‌شود فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ *Bipolaris sacchari* عامل لکه برگی نیشکر دارد. همچنین نشان داده شد که این باکتری توانایی تولید سیدروفور و ایندول‌استیک‌اسید را دارد (da Silveira et al., 2019).

ترکیب از *A. verrucaria* و *A. roridum* ۳۰ ترکیب از Wagenaar & Clardy 2001; Chen *et al.*, 2016). در پژوهشی قارچ‌های آنتاگونیست *Penicillium*، *Myrothecium* spp، *Clonostachys* spp و *Trichoderma* spp از ریزوسفر هویج جداسازی و اثر آنها علیه *Alternaria radicina*، *Alternaria dauci* و *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum* و *Sclerotinia sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت نتایج حاصله نشان داد که این قارچ‌ها رشد قارچ‌های *S. sclerotiorum*، *A. radicina* و *A. dauci* به خوبی کاهش دادند و اثر آنتاگونیستی کمتری علیه *F. oxysporum* و *R. solani* داشتند (Elzbieta *et al.*, 2018). قارچ *Albifimbria verrucaria* که از برگ‌های انگور جدا شده است توانایی کنترل *B. cinerea* را دارد. این قارچ به طور قابل توجهی رشد میسلیموم و جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ *B. cinerea* را کاهش داد و در محیط کشت مایع Czapek قادر به تولید کیتیناز بود (Li *et al.*, 2020).

قارچ مخمری *Pseudozyma flocculosa* در شرایط آزمایشگاهی به طور موثری باعث کنترل *B. cinerea* شد. که احتمالاً به علت تولید برخی ترکیبات می‌باشد. مخمرهای جنس *Pseudozyma* اکثراً اپی‌فیت و ساپروفیت می‌باشند و برای گیاهان بیمارزا نیستند (Buxdorf *et al.*, 2013). Marchand *et al.* (2009) نشان دادند که این مخمر با تولید یک ترکیب گلیکولیپیدی به نام فلوکولوزین سفیدک‌های پودری را به خوبی کنترل می‌کند. این قارچ با نام تجاری فلوکولوزین به بازار عرضه شده و برای مبارزه با سفیدک‌های پودری استفاده می‌شود (Hammami *et al.*, 2008; Paulitz & Bélanger, 2001). قارچ مخمری *Pseudozyma flocculosa* با تولید یک ترکیب ضدقارچی به نام cis-9-Heptadecenoic acid رشد میسلیموم و جوانه‌زنی اسپوره‌های *B. cinerea* را کاهش داد (Avis & Bélanger, 2001). در یک پژوهش فعالیت آنتاگونیستی مخمر *Pseudozyma flocculosa* در برابر *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Laur *et al.*, 2018).

جدایه‌های UJB8 و UJB9 که متعلق به جنس *Stenotrophomonas* بودند با ایجاد هاله بازدارنده ۱۱/۳ میلیمتری، درصد بازداری ۲۱/۲۱ و ۲۴/۲۴ درصد و کاهش شاخص بیماری به میزان ۵۲/۲۲ و ۵۳/۳۳ درصد عملکرد قابل قبولی را در کاهش وقوع بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی نشان دادند. که این عملکرد احتمالاً به دلیل تولید ترکیبات ضد میکروبی می‌باشد. تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط طیف گسترده‌ای از باکتری‌های بیوکترول مانند جنس‌های *Pantoea*، *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Stenotrophomonas*، *Serratia*، *Pseudomonas* و *Streptomyces* و بسیاری از جنس‌های دیگر گزارش شده است (Köhl *et al.*, 2019). دو باکتری اندوفیت *Stenotrophomonas Pseudomonas stutzeri* E25 و *maltophilia CR71* که از گیاه توماتیلو جداسازی شده بودند علاوه بر اینکه باعث بهبود مکانیسم رشدی گیاه شدند، رشد میسلیمومی *B. cinerea* را بیش از ۴۲ و ۵۰ درصد کاهش دادند و با تولید ترکیبات فرار عملکرد فوق‌العاده‌ای در کنترل *B. cinerea* داشتند (Rojas-Solís *et al.*, 2018). در یک پژوهش نشان داده شده که باکتری *Stenotrophomonas rhizophila* که از گیاه *Glycyrrhiza uralensis* Fisch جدا شده است از رشد پنج قارچ بیمارگر *Botrytis*، *Fusarium acuminatum*، *Phyllosticta* sp، *Scutellariae botrytis*، *Fusarium oxysporum*، *cinerea* جلوگیری کرده است و همچنین نشان داده شده که این باکتری توانایی تولید پروتاز، سلولاز و سیدروفور را دارد (Wang *et al.*, 2022).

از میان ۱۳۶ جدایه قارچی شش، جدایه قادر به کنترل *B. cinerea* بودند. که در این میان بهترین عملکرد مربوط به جدایه UJF1300 (*Seimatosporium pistaciae*) می‌باشد. حسین و همکاران از این قارچ ترکیبی به نام سمیترون جداسازی کردند که خاصیت ضدقارچی دارد (Hussain *et al.*, 2015). در شرایط آزمایشگاهی قارچ *Albifimbria verrucaria* (\equiv *Myrothecium verrucaria*) قادر به کنترل *B. cinerea* بود. جنس *Albifimbria* از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه دارای اهمیت می‌باشد. بیش از ۲۰

باعث تخریب دیواره سلولی قارچ *Pythium aphanidermatum* که از جنس گلوکان است شده در نتیجه ریشه‌های بیمارگر در محدوده مه‌ار، غیر عادی رشد کردند (Halo et al., 2018).

سپاسگزاری

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول ارایه شده به دانشگاه جیرفت است که بدین وسیله از دانشگاه جیرفت جهت فراهم آوردن امکانات و شرایط انجام پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

گونه *Aspergillus terreus* در شرایط آزمایشگاهی قارچ *B. cinerea* را مه‌ار کرد. (Melo et al., 2006) اثر آنتاگونیستی این قارچ را در برابر قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* نشان دادند و اظهار داشتند که این بازدارندگی به علت مایکوپارازیت و تخریب دیواره سلولی بیمارگر توسط آنتاگونیست است (Melo et al., 2006). در پژوهشی اثر آنتاگونیستی دو جدایه *Aspergillus terreus* علیه *Pythium aphanidermatum* بیمارگر خیار مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که هر دو جدایه رشد بیمارگر را کاهش دادند و مشخص شد که آنزیم گلوکاناز تولید شده توسط جدایه‌های *Aspergillus terreus*

References

- Avis, T.J. & Bélanger R.R. 2001. Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid cis-9 Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*. Applied and Environmental Microbiology Journal, 67(2): 956-960.
- Ayoubi, N., Soleimani, M.J., Zare, R. 2016. *Pilidium concavum*, causing tan-brown rot on strawberry in Iran. Journal of Plant Pathology, 667-669. (In Persian with English summary)
- Baker, C.J., Stavelly, J.R., Mock, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease, 69(9): 770-772.
- Bensidhoum, L.B., Abdelwahab, R., Nassira, T., Nabila, K., Meriem, K & Elhafid, N. 2015. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Bacillus* sp. Strain S7LiBe under abiotic stress. International Journal of Scientific Research in Science and Technology, 1(6): 7-14.
- Bruisson, S., Zufferey, M.L., Haridon, F., Trutmann, E., Anand, A., Dutartre, A., De Vrieze, M. & Weisskopf, L. 2019. Endophytes and epiphytes from the grapevine leaf microbiome as potential biocontrol agents against *phytopathogens*. Frontiers in Microbiology, 10: 2726.
- Buxdorf, K., Rahat, I., Gafni, A. & Levy, M. 2013. The epiphytic fungus *Pseudozyma aphidis* induces jasmonic acid-and salicylic acid/nonexpressor of PR1-independent local and systemic resistance. Plant physiology, 161(4): 2014-2022.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research, 20(9): 2380.
- Chen, Y., Ran, S.F., Dai, D.Q., Wang, Y., Hyde, K.D., Wu, Y.M. & Jiang, Y.L. 2016. Mycosphere Essays 2. Myrothecium Mycosphere, 7(1): 64-80.
- Chacón, F.I., Sineli, P.E., Mansilla, F.I., Pereyra, M.M., Diaz, M.A., Volentini, S.I., Poehlein, A., Meinhardt, F., Daniel, R. & Dib JR 2022. Native Cultivable Bacteria from the Blueberry Microbiome as Novel Potential Biocontrol Agents. Microorganisms, 10(5): 969.
- Crous, P.W., Summerell, B.A., Swart, L., Denman, S., Taylor, J.E., Bezuidenhout, C.M., Palm, M.E., Marinowitz, S. & Groenewald, J.Z. 2011. Fungal pathogens of Proteaceae. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 27(1): 20-45.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Schumacher, R. K., Summerell, B. A., Giraldo, A., Gené, J., Guarro, J., Wanasinghe, D. N., Hyde, K. D., Camporesi, E. & Groenewald, J. Z. 2014. Fungal Planet description sheets: 281-319. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 33(1): 212-289.
- da Silveira, A.P.D., Íório, R.D.P.F., Marcos, F.C.C., Fernandes, A.O., de Souza, S.A.C.D., Kuramae, E.E. & Cipriano, M.A.P. 2019. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. Antonie van Leeuwenhoek, 112(2): 283-295.
- Dashti, A.A., Jadaon, M.M., Abdulsamad, A.M. & Dashti, H.M. 2009. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. Kuwait Medical Journal, 41(2): 117-122.
- Dehghani, K., Amirmijani, A.R. & Pordel, A. 2022. Fungal species associated with leaf spot on mango trees in Iran. Mycologia Iranica, 9(1): 75-83.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M.J. 2000. Atlas of clinical fungi (No. Ed. 2). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

- Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25, IN3.
- Donmez, M.F., Esitken, A., Yildiz, H. & Ercisli, S. 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. Journal of Animal and Plant Sciences, 21(4): 758–763.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Dematiaceous hyphomycetes.
- Elzbieta, P., Agnieszka, J. & Marzena, B.W. 2018. Antagonistic activity of selected fungi of the soil environment of carrot. Plant Soil and Environment, 64(2): 58–63.
- Ershad, D.J. 2009. Fungi of Iran. Dept. Botany, Publi. No. 10 pp 277. Ministry of Agriculture and Natural Resources, Teheran, Iran.
- Feng, B., Chen, D., Jin, R., Li, E. & Li, P. 2022. Bioactivities evaluation of an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* JRX–YG39 inhabiting wild grape. BMC microbiology, 22(1): 1–9.
- Fokkema, N.J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiological Plant Pathology, 3(2): 195–205.
- Halo, B.A., Al–Yahyai, R.A & Al–Sadi, A.M. 2018. *Aspergillus terreus* inhibits growth and induces morphological abnormalities in *Pythium aphanidermatum* and suppresses *Pythium*–induced damping–off of cucumber. Frontiers in microbiology, 9: 95.
- Hammami, W., Labbé, C., Chain, F., Mimee, B & Bélanger, R.R 2008. Nutritional regulation and kinetics of flocculosin synthesis by *Pseudozyma flocculosa*. Applied microbiology and biotechnology, 80(2): 307.
- Hammami, R., Oueslati, M., Smiri, M., Nefzi, S., Ruissi, M., Comitini, F., Romanazzi, G., Cacciola, S.O & Sadfi Zouaoui, N. 2022. Epiphytic Yeasts and Bacteria as Candidate Biocontrol Agents of Green and Blue Molds of Citrus Fruits. Journal of Fungi, 8(8): 818.
- Helbig, J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. BioControl, 47(1): 85–99.
- Helbig, J. & Bochow, H. 2001. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (Isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry/Wirksamkeit von *Bacillus subtilis* (Isolat 25021) bei der Bekämpfung von *Botrytis cinerea* an der Erdbeere. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection, 545–559.
- 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.
- Hussain, H., Root, N., Jabeen, F., Al-Harrasi, A., Ahmad, M., Mabood, F., Hassan, Z., Shah, A., Green, I.R., Schulz, B. & Krohn, K. 2015. Microsphaerol and seimatorone: Two new compounds isolated from the endophytic fungi, *Microsphaeropsis* sp. and *Seimatosporium* sp. Chemistry and biodiversity, 12(2): 289–294.
- Janahiraman, V., Anandham, R., Kwon, S.W., Sundaram, S., Karthik Pandi, V., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Samaddar Sand & Sa. T. 2016. Control of Wilt and Rot Pathogens of Tomato by Antagonistic Pink Pigmented Facultative Methylophilic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. Frontiers in Plant Science, 7: 1626.
- Jiang, C.H., Liao, M.J., Wang, H.K., Zheng, M.Z., Xu, J.J. & Guo, J.H. 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Biological Control, 126: 147–157.
- Kaspar, F., Neubauer, P., Gimpel, M. 2019. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. Journal of natural products, 82(7): 2038–2053.
- Khezzinejad, N., Gosta, Y & Niknam, G. 2009. Fungi Associated with Sugar Beet Cyst Nematode (*Heterodera schachtii*) From Fields of West Azarbaijan Province, Iran (II). Journal of Agricultural Science and Sustainable Production1, (1): 95–106. (In Persian with English summary)
- Köhl, J., Kolnaar, R. & Ravensberg, W.J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Frontiers in plant science, 10: 845.
- Lanna Filho, R., Romeiro, R.D.S. & Alves, E. 2010. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 45(12): 1381–1387.
- Laur, J., Ramakrishnan, G.B., LabbÚ, C., Lefebvre, F., Spanu, P.D & BÚlanger, R.R. 2018. Effectors involved in fungal–fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent–powdery mildew–plant. New Phytologist, 217(2): 713–725.

- Marchand, G., Rémus-Borel, W., Chain, F., Hammami, W., Belzile, F. & Bélanger, R.R. 2009. Identification of genes potentially involved in the biocontrol activity of *Pseudozyma flocculosa*. *Phytopathology*, 99(10): 1142–1149.
- Melo, I.S., Faull, J.L., Nascimento, R.S. 2006. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4): 417–419
- Miljaković, D., Marinković, J. & Balešević-Tubić, S. 2020. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7): 1037.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E.M., Shams-Bakhsh, M. & Safaie, N. 2008. Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *Journal of phytopathology*, 156(1): 21–28.
- Pandey, R.R., Arora, D.K. & Dubey, R.C. 1993. Antagonistic interactions between fungal pathogens and phylloplane fungi of guava. *Mycopathologia*, 124(1): 31–39.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual review of phytopathology*, 39(1): 103–133.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. & De Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1): 537–547.
- Rabølle, M., Spliid, N.H., Kristensen, K. & Kudsk, P. 2006. Determination of fungicide residues in field-grown strawberries following different fungicide strategies against gray mold (*Botrytis cinerea*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3): 900–908.
- Rasiukevičiūtė, N., Rugienius, R. & Šikšnianienė, J.B. 2018. Genetic diversity of *Botrytis cinerea* from strawberry in Lithuania. *Zemdirbyste-Agric*, 105(3).
- Redmond, J.C., Marois, J.J. & MacDonald, J.D. 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant Disease*, 71(9): 799–802.
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Macías-Rodríguez, L. & Santoyo, G. 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 13: 46–52.
- Sabeti Mohammadi, s., Atghia, O., Hamidian, A.H. & Javan-Nikkhah, M. 2019. Identification of tolerant fungal species in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons contaminated soils. 4th Iranian Mycological Congress. (In Persian with English summary)
- Sanders, E.R. 2012. Aseptic laboratory techniques: plating methods. *Journal of Visualized Experiments*, (63), e3064.
- Shi, J.F. & Sun, C.Q. 2017. Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4): 706–714.
- South, K.A., Peduto Hand, F. & Jones, M.L. 2020. Beneficial bacteria identified for the control of *Botrytis cinerea* in petunia greenhouse production. *Plant disease*, 104(6): 1801–1810.
- Thompson, D.C., Clarke, B. & Kobayashi, D. 1996. Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms in Kentucky bluegrass. *Plant Disease*, 80(8): 856–862.
- Tulloch, M. 1972. The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. Commonwealth Mycological Institute.
- Utkhede, R.S. & Sholberg, P.L. 1986. In vitro inhibition of plant pathogens by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and in vivo control of two postharvest cherry diseases. *Canadian journal of microbiology*, 32(12): 963–967.
- Vargas, M., Garrido, F., Zapata, N. & Tapia, M. 2012. Isolation and selection of epiphytic yeast for biocontrol of *Botrytis cinerea* Pers. on table grapes. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(3): 332.
- Wagenaar, M.M & Clardy, J. 2001. Two new roridins isolated from *Myrothecium* sp. *The Journal of Antibiotics*, 54(6): 517–520.
- Wang, X., Glawe, D.A., Kramer, E., Weller, D. & Okubara, P.A. 2018. Biological control of *Botrytis cinerea*: interactions with native vineyard yeasts from Washington State. *Phytopathology*, 108(6): 691–701.
- Wang, L., Xi, N., Lang, D., Zhou, L., Zhang, Y. & Zhang, X. 2022. Potential biocontrol and plant growth promotion of an endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhiza uralensis* seeds. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 132(1): 1–16.
- 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. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist*, 107(1): 127–142.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & van Kan, J.A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5): 561–580

- Zangoei, E., Etebarian, H.R. & Sahebani, N. 2013. Biological control of gray mold on apple by combining of some yeast and *Bacillus subtilis* isolates and induction of defense responses. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 141–153. (In Persian with English summary)
- Zhang, K., Yuan–Ying, S. & Cai, L. 2013. An optimized protocol of single spore isolation for fungi. *Cryptogamie, Mycologie*, 34(4): 349–356.
- Zhou, L., Song, C. Muñoz, C.Y. & Kuipers, O.P. 2021. *Bacillus cabrialesii* BH5 Protects Tomato Plants against *Botrytis cinerea* by Production of Specific Antifungal Compounds. *Frontiers in microbiology*, 12, 707609.

Identification of antagonistic microorganisms associated with strawberry phyllosphere and their evaluation in the biological control of *Botrytis cinerea*

Nasrin Seyyedi¹, Hamidreza Alizadeh², Mehdi Azadvar³, Amirreza Amirmijani⁴

1., 2., 4. Former Master's student, Associate professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Kerman, Iran.

Corresponding author: Amirreza Amirmijani, ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir

Received: Dec., 21, 2022

10(1) 49–69

Accepted: Apr., 26, 2023

Abstract

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea* is one of the most important diseases in strawberry, causing pre- and postharvest fruit rot. One of the safe and healthy ways to reduce this disease is biocontrol and the use of biological control agents. In this study, using culture-based methods, 268 bacterial strains, and 136 fungal isolates, were isolated and purified from the phyllosphere of strawberry plants in the greenhouse and field in Jiroft city. The antagonistic effect of the isolates against the pathogen *B. cinerea* was investigated using dual culture and investigation of the inhibition zone, and the effect of volatile compounds under in vitro conditions, as well as the antifungal properties of the antagonistic bacteria on strawberry fruit. Identification of the selected bacterial and fungal strains was made by polymerase chain reaction, respectively, by determining the nucleotide sequence of a part of the 16S-rDNA gene and its region. The results showed that among the examined isolates, bacterial isolates UJB1, UJB3, UJB4, UJB10, UJB5, UJB6, UJB7, UJB11, UJB2, UJB8 and UJB9 and fungal isolates UJF1300, UJF1301, UJF1302, UJF1303, UJF1304, UJF1305 had an effective inhibitory effect against *B. cinerea* and their volatile compounds reduced pathogenic mycelium growth. In evaluating the antifungal impact of bacterial isolates on strawberry fruit, bacterial isolates UJB8, UJB2, UJB11, UJB6, UJB5, UJB10, UJB4, and UJB1 significantly increased the disease index caused by *B. cinerea* compared to They reduced the witness. According to morphological and molecular data, bacterial isolates belonging to the genera *Delftia* (isolates UJB1, UJB3, UJB4, UJB10), *Bacillus* (isolates UJB5, UJB6, UJB7, UJB11, and UJB2) and *Stenotrophomonas* (isolates UJB8 and UJB9) and fungal isolates belonging to *Albifimbria verrucaria*, *Aspergillus terreus*, *Leptosphaerulina australis*, *Pilidium lythri*, *Pseudozyma flocculosa*, and *Seimatosporium pistaciae* species.

Keywords: Antagonist, biological control, Jiroft, ITS-rDNA, 16S-rDNA.
