

Biological control of *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* by indigenous strains *Bacillus subtilis*

Afagh Mohammady

M.Sc. of Microbiology, Islamic Azad University, Branch of Pharmaceutical science, Tehran, Iran, afagh_mohamadi07@yahoo.com

Abbas Akhavansepahy *

Associate Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North of Branch, Tehran, Iran, akhavansepahy@gmail.com

Seyed Reza Hooseynidoust

Professor of Microbiology, Islamic Azad University, Branch of Pharmaceutical science, Tehran, Iran, rhdoust@gmail.com

Abstract

Introduction: Different *Bacillus subtilis* products of secondary metabolites include iturin lipopeptides, that may control plant disease effectively. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of Indigenous strains *Bacillus subtilis* against plant pathogenic fungi *Pythium ultimum* and *Fusarium solani*.

Materials and methods: Seven soil samples were collected and *B. subtilis* were isolated from each soil sample. The isolates were screened by antifungal activity. Best strains were identified by 16srDNA sequence. The culture conditions were optimized for the best production of antifungal metabolites. The bacterial metabolites were then obtained from 4 days grown isolates, purified and were confirmed iturin existence by chromatography method. The iturin A (Sigma) was used as standards.

Results: Totally, 91 strains were isolated from soil samples, 23 spp were confirmed as *B. subtilis* by morphological and biochemical features. In subsequent experiments, two strains 48 and 83 showed the greatest activity against the *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* respectively. 16srDNA sequence analyses for selected isolates confirmed 100% similarity to *B. subtilis*. Then nutrient broth with carbon and nitrogen sources glucose, yeast extract, neutral pH and 30°C incubation temperature were optimized for best production. The HPLC results showed the best productivity of iturin A for two isolates *B. subtilis* by comparing peaks and retention times between iturin A (Sigma) and native strains.

Discussion and conclusion: Iranian native strains also have the ability to produce antifungal metabolites. Therefore, this strain can be a good candidate for biological control of plant pathogenic fungi and an alternative for chemical fungicides.

Key words: Biological control, *Bacillus subtilis*, Iturin, *Pythium ultimum*, *Fusarium solani*

* Corresponding author

Received: May 31, 2014 / Accepted: October 28, 2015

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۱۴-۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۶

کنترل زیستی قارچ‌های پیتیوم اولتیموم و فوزاریوم سولانی توسط سویه‌های بومی باسیلوس سوبتیلیس

آفاق محمدی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران، afagh_mohamadi07@yahoo.com
عباس اخوان سهیلی*: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران، akhavansepahy@gmail.com
سیدرضا حسینی دوست: استاد تمام میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران، rhdoust@gmail.com

چکیده

مقدمه: سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس به جهت داشتن قابلیت کنترل بیماری‌های گیاهی از طریق تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه لیپوپپتیدهای گروه ایتورین، مهم‌اند. هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی باسیلوس سوبتیلیس علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی است.

مواد و روش‌ها: سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس از ۷ نمونه خاک پارک‌های جنگلی تهران جداسازی و فعالیت ضدقارچی این سویه‌ها طی روش چاهک‌گذاری بررسی شد. بهترین سویه‌های باکتریایی با روش *16S rDNA* شناسایی شدند. محیط نوترینت برات از نظر منابع کربن و نیتروژن، pH و دمای مناسب رشد جهت تولید بیشترین متابولیت ضدقارچی توسط سویه‌های بومی منتخب بهینه شد. سپس این متابولیت‌ها از کشت ۴ روزه سویه‌های ذکر شده، تخلیص و وجود آنتی‌بیوتیک ایتورین A با استفاده از روش کروماتوگرافی تأیید شد.

نتایج: از مجموع ۹۱ سویه باکتریایی جدا شده از نمونه‌های خاک، ۲۳ سویه مطابق خصوصیات مرفولوژیک و بیوشیمیایی به‌عنوان باسیلوس سوبتیلیس تعیین هویت شدند. در آزمایش‌های بعدی، ۲ سویه ۴۸ و ۸۳ به ترتیب علیه قارچ‌های پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی بیشترین فعالیت را نشان دادند که نتایج حاصل از تطبیق توالی سویه‌های منتخب، ۱۰۰ درصد شباهت را به گونه باسیلوس سوبتیلیس تأیید کرد. سپس سویه‌های منتخب در محیط نوترینت برات با منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصاره مخمر، pH خنثی و دمای گرماگذاری ۳۰ درجه سانتیگراد، بیشترین فعالیت ضدقارچی را از خود بروز دادند. نتایج HPLC نیز از طریق مطابقت زمان ظهور پیک ایتورین A استاندارد در سویه‌های بومی نشان داد که هر ۲ سویه توانستند در محدوده زمانی مشابه با سویه استاندارد، ایتورین A را تولید کنند.

بحث و نتیجه‌گیری: سویه‌های بومی ایران نیز توانایی تولید متابولیت‌های ضدقارچی را دارند. از این جهت این سویه‌ها می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و جایگزینی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی باشند.

واژه‌های کلیدی: کنترل زیستی، باسیلوس سوبتیلیس، ایتورین، پیتیوم/ولتیموم، فوزاریوم سولانی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط عوامل بیماری‌زای موجود در خاک، از مشکلات عمده در تولید محصولات کشاورزی به شمار می‌آیند (۱). قارچ‌های پیتیوم/ولتیموم^۱ و فوزاریوم سولانی^۲ از جمله شایع‌ترین قارچ‌های مؤثر در ایجاد بیماری در گیاهان هستند. قارچ پیتیوم/ولتیموم از معمول‌ترین قارچ‌های جداسازی شده در استرالیا، برزیل، چین، کره و بسیاری از مناطق جهان، عامل مرگ گیاهچه و بیماری‌های ریشه‌ای در گیاهانی از جمله کلم، هویج، خیار، خربزه و گندم است. بیماری مرگ گیاهچه با پوسیدگی طوقه و ریشه گیاهچه همراه است به طوری که قسمت پوسیده شده تحمل وزن اندام هوایی گیاهچه را نخواهد داشت و در نتیجه گیاهچه به زمین می‌افتد و می‌پوسد (۲). قارچ فوزاریوم سولانی از قارچ‌های جداسازی شده در آرژانتین و سایر مناطق جهان عامل بیماری‌های پوسیدگی و خشکیدگی گیاهان است که در بسیاری از محصولات زراعی از جمله لوبیا، خیار و سیب زمینی شیرین از طریق پژمردگی به میزان درخور توجهی سبب از بین رفتن محصول می‌شود. سویه‌های فوزاریوم سولانی به قدری فراوانی‌شان در خاک و مواد گیاهی فاسد زیاد است که تجزیه کننده نیز محسوب می‌شوند (۳). قارچ‌کش‌های شیمیایی برای مدت طولانی به عنوان عوامل قدرتمند جهت کاهش بروز بیماری‌های قارچی استفاده می‌شدند؛ اما به دلایل پرهزینه بودن، ایجاد آلودگی در محیط زیست و مقاومت عوامل بیماری‌زا نسبت به آن‌ها، استفاده از مواد شیمیایی کاهش یافته است. کنترل زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها از بروز بیماری‌های گیاهی جلوگیری می‌کند و جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی به حساب می‌آید (۴). از میان باکتری‌های مؤثر در کنترل

زیستی اعضای جنس *باسیلوس*^۳ به دلیل داشتن مزایایی از قبیل تشکیل اندوسپور و مقاومت در شرایط دشوار نسبت به سایر عوامل کنترل زیستی مهم هستند (۵). جنس *باسیلوس* شامل باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت، هوازی و اکثراً ساپروفیت بوده که می‌توانند متابولیت‌های ثانویه با طیف وسیعی از فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی تولید کنند (۶ و ۷). تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی از جمله خانواده‌های لیوپتیدی ایتورین^۴، سورفاکتین^۵ و فنجسین^۶ توسط سویه‌های کنترل زیستی *باسیلوس سوبتیلیس*^۷ می‌تواند نقش کلیدی در سرکوب بیماری‌های گیاهی ایفا کند زیرا این آنتی‌بیوتیک‌ها دارای مزایایی نسبت به دیگر آفت‌کش‌ها از جمله سمیت کم، تجزیه زیستی بالا و خصوصیات مساعد و سازگار با محیط زیست هستند و به خوبی می‌توانند از رشد و تکثیر قارچ‌ها و برخی باکتری‌های بیماری‌زا ممانعت کنند (۸ و ۹ و ۱۰). مهم‌ترین عضو خانواده ایتورین، ایتورین A شامل ۷ α آمینواسید متصل به β آمینوئوفتی اسید است که فعالیت سمیت قارچی قوی علیه عوامل بیماری‌زای مختلف دارد (۱۱). این آنتی‌بیوتیک با مولکول استرول غشای سلولی قارچ‌های بیماری‌زا واکنش و نفوذپذیری غشا سلول را تغییر داده و از هدایت یونی جلوگیری می‌کند و در نهایت سبب مرگ سلول هدف می‌شود (۱۲). از این رو در این پژوهش به بررسی فعالیت ضد قارچی سویه‌های بومی *باسیلوس سوبتیلیس* در ایران علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی پیتیوم/ولتیموم ATCC20692 و فوزاریوم سولانی ATCC1460 و انتخاب بهترین سویه مولد آنتی‌بیوتیک انجام شده است. همچنین شرایط تولید آنتی‌بیوتیک برای سویه‌های منتخب از نظر منبع کربن، منبع نیتروژن، اسیدیته و دما بهینه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باسیلوس سوبتیلیس: سویه‌های

باسیلوس استفاده شده در این پژوهش از ۷ نمونه خاک پارک‌های جنگلی تهران (چیتگر، طالقانی، شیان، سرخه حصار، پردیسان، مناطق جنگلی بوستان نهج‌البلاغه، مناطق جنگلی بوستان گفتگو) جداسازی شدند، به این طریق که به فاصله ۱ متر از ریشه و از عمق ۳ تا ۱۰ سانتی‌متری خاک تحت شرایط استریل نمونه‌برداری انجام گرفت (۱۳) و سپس نمونه‌ها سریعاً در دمای ۴ درجه سانتیگراد جهت آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند. در ابتدا نمونه‌های موردنظر طی روش غنی‌سازی حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتیگراد جهت حفظ اسپورها و حذف سلول‌های رویشی تیمار شدند (۱۴). سپس از روش تهیه رقت استفاده شد به این صورت که طی روش پورپلیت^۱ رقت‌های متوالی از نمونه‌ها در آب مقطر استریل تهیه شد و از رقت ۰/۱ رقت‌های متوالی تا ۱۰/۱۰ از هر نمونه خاک تهیه شد و میزان ۱ میلی‌لیتر از هر یک از این رقت‌ها در داخل پلیت استریل ریخته شد و سپس محیط کشت نوترینت آگار^۲ (شامل ۵ گرم بر لیتر پپتون، ۳ گرم بر لیتر عصاره گوشت و ۱۵ گرم بر لیتر آگار) اتوکلاو شد و در شرایط استریل روی آنها ریخته شد و محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند (۱۵). سپس از کلنی‌های مشابه باسیلوس سوبتیلیس براساس خصوصیات مرفولوژیکی (رنگ، شکل ظاهری کلنی و قوام) طی کشت ۴ منطقه‌ای در محیط نوترینت آگار کشت خالص تهیه شد و به منظور جداسازی انحصاری سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس، بررسی‌های میکروسکوپی (رنگ آمیزی گرم و مالاشیت‌گرین) و بررسی‌های بیوشیمیایی شامل تست‌های کاتالاز، استفاده

از سیترات، هیدرولیز لستین، حرکت، احیای نیترات و تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مانیتول و گزیلوز انجام شد.

سویه‌های قارچی: سویه‌های قارچی پیتیوم/ولتیموم ATCC20692 و فوزاریوم سولانی ATCC1460 که از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند، به ترتیب در محیط‌های کشت کورن میل آگار^۱ (شامل ۲ گرم بر لیتر کورن میل و ۱۵ گرم بر لیتر آگار) و سابروز دکستروز آگار^۱ (شامل ۵ گرم بر لیتر پپتون کازین، ۵ گرم بر لیتر پپتون گوشت، ۴۰ گرم بر لیتر دی-گلوکز و ۱۵ گرم بر لیتر آگار) که پس از تهیه، در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده بودند، کشت داده شدند و سپس در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند.

بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی

باسیلوس سوبتیلیس: جهت بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس به دست آمده از نمونه‌های خاک علیه قارچ‌های پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی از روش چاهک‌گذاری استفاده شد. در این روش از کشت ۷۲ ساعته هر قارچ، به طور جداگانه، مطابق با شاهد نیم‌مک‌فارلند ($10^8 \times 1/5$) در محیط سابروز دکستروز برات^۲، سوسپانسیون تهیه شد، به این صورت که در ابتدا برای شاهد، یک استاندارد نیم‌مک‌فارلند تهیه شد به این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر کلرور باریم را به ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک اضافه کرد و جذب نوری این محلول برابر با ۱ خوانده شد. سپس مقداری از کلنی رشد کرده روی پلیت ۷۲ ساعته قارچی در ۳ تا ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل شد و کدورت آن را با نیم‌مک‌فارلند تنظیم شد (مطابق با استاندارد

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر (10x)، ۳/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرو مول dNTPs، ۱/۲۵ واحد آنزیم از Taq DNA Polymerase، ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA و ۱ میکرولیتر آب مقطر دی‌یونیزه انجام شد. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۰/۵ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۸ درصد بررسی شد. محصول PCR جهت تعیین توالی به مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران فرستاده شد. جهت تأیید شناسایی باکتری‌ها، توالی‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار بلاست^{۱۵} با توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک اطلاعات ژنی، تطبیق داده شد.

بیهینه‌سازی پارامترهای محیطی جهت تعیین بهترین

فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب: پس از سنجش فعالیت ضدقارچی سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس، در این مرحله، تأثیر عوامل و پارامترهای محیطی و اکولوژیکی بر میزان فعالیت ضدقارچی سویه‌های برگزیده بررسی شد. در همه مراحل فوق، به‌عنوان شاهد در یک چاهک ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری بدون تغییر شرایط محیط کشت استفاده شد و برای هر آزمایش ۳ تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری شده در این مرحله با استفاده از آزمون دامنه چندگانه دانکن^{۱۶} تحلیل شدند که یک شیوه متداول برای مقایسه تمام جفت‌های میانگین‌هاست.

نیم‌مک‌فارلند سوسپانسیون میکروبی تهیه‌شده با این روش باید کدورتی معادل 10^8 CFU/ml × ۱/۵ کلنی داشته باشد (۱۶). سپس هر سوسپانسیون قارچی به یک پلیت منتقل و به کمک سوآپ استریل کشت متراکم داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتریایی تهیه شده در محیط نوترینت برات^{۱۳} معادل شاهد نیم‌مک‌فارلند، به‌طور جداگانه در داخل هر چاهک ریخته شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵-۲۶ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند (۱۷). برای هر آزمایش ۳ بار تکرار در نظر گرفته شد. به‌عنوان شاهد عدم رشد ۵۰ میکرولیتر محیط نوترینت برات استریل در یک چاهک ریخته شد. در نهایت قطر هاله‌های عدم‌رشد قارچ در اطراف چاهک‌ها و نیز میانگین قطر هاله‌ها با استفاده از خط کش آنتی‌بیوگرام اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه^{۱۴} انجام شد که به‌منظور بررسی وجود اختلاف معنادار در میانگین مقادیر گروه‌های مورد آزمایش است.

شناسایی مولکولی سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس با

بیشترین میزان فعالیت ضدقارچی: شناسایی تکمیلی سویه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن *16srRNA* انجام شد. به این منظور ابتدا باکتری‌ها روی محیط نوترینت آگار کشت چمنی داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) DNA ژنومی استخراج شد و با استفاده از آغازگرهای

27F: 5- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 و

1492R: 5- GGTTACCTTGTTACGACTT_3

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (۱۸).

جدایه‌های منتخب، محیط‌ها در ۳ دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت، میزان فعالیت ضدقارچی بررسی شد (۱۹ و ۲۰).

تخلیص متابولیت‌های ضدقارچی از سویه‌های

باسیلوس سوبتیلیس: باکتری‌های منتخب در داخل ارلن‌مایرهای ۱ لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت بهینه، کشت و به منظور تولید متابولیت ثانویه به مدت ۴ روز در انکوباتور شیکردار (شرکت ژال تجهیز^{۱۷} مدل gts190) با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور گردشی معادل ۱۰۰ دور در دقیقه (۱۰۰ rpm/min) گرماگذاری شدند. سپس محیط‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (شرکت هتیک^{۱۸}) با دور $8000 \times g$ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی فاقد سلول‌های باکتری با اسید کلریدریک به pH معادل ۲ رسانده شد و رسوب شکل گرفته مجدداً با دور $2000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب ایجاد شده در ۲ تا ۳ میلی‌لیتر متانول حل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و دور گردش $2000 \times g$ برای مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت مایع رویی حاصله حاوی متابولیت‌های ضدقارچی به صورت عصاره متانولی برداشته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۵).

آنالیز متابولیت‌های ضدقارچی با استفاده از HPLC:

میزان $20 \mu\text{l}$ از عصاره‌های متانولی سویه‌های منتخب به دست آمده از مرحله قبل به دستگاه کروماتوگرافی با شرایط زیر تزریق شد: ستون ۱۸-C به عنوان فاز ثابت ($250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$) و مخلوط استونیتریل و آب با نسبت ۷۰:۳۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و مدت زمان ۲۰ دقیقه، طول موج دستگاه نیز روی ۲۴۰

الف- منبع کربن: به منظور بررسی تأثیر منبع کربن از سه قند گلوکز (منوساکارید)، لاکتوز (دی‌ساکارید) و نشاسته (پلی‌ساکارید) استفاده شد که جایگزین عصاره گوشت (منبع کربن در محیط نوترینت برات) شدند. پس از کشت سویه‌های منتخب در این محیط‌ها، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از آن با استفاده از روش چاهک‌گذاری و اندازه‌گیری قطر هاله عدم‌رشد ایجاد شده با استفاده از خط کش آنتی‌بیوگرام و آزمون آنالیزی دامنه دانکن تأثیر این مواد در روند میزان تولید متابولیت ضدقارچی ایتورین بررسی شد.

ب- منبع نیتروژن: در این مرحله تأثیر منابع نیتروژن مختلف شامل ازت آلی (عصاره مخمر) و ازت معدنی (نترات آمونیوم) ارزیابی شد. این مواد جایگزین پیتون شدند که به عنوان منبع اصلی نیتروژن در محیط نوترینت برات تلقی می‌شود. سوسپانسیون باکتری‌ها طبق روش ذکر شده در بند الف تهیه و پس از گرماگذاری، فعالیت ضدقارچی آنها بررسی شد. سپس بهترین منبع نیتروژن با توجه به میانگین قطر هاله عدم‌رشد قارچ تعیین شد.

ج- اسیدیته: با استفاده از اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم محیط‌های کشت نوترینت برات حاوی مناسب‌ترین منابع کربن و نیتروژن با pH اسیدی و قلیایی تهیه شد. پس از کشت و گرماگذاری سوسپانسیون جدایه‌های منتخب در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد طبق روش ذکر شده در مراحل قبلی، فعالیت ضدقارچی آنها بررسی و با هم مقایسه شد.

د- دما: محیط کشت نوترینت برات حاوی مناسب‌ترین منابع کربن و نیتروژن و همچنین مناسب‌ترین میزان اسیدیته (طبق نتایج حاصله، pH 7) ساخته شد و پس از تهیه و کشت سوسپانسیون

رشد، دارای کلنی‌های مخملی سفیدرنگ است که به تدریج خاکستری می‌شود. طبق بررسی‌های انجام‌شده و نتایج به‌دست آمده از مقالات مشابه، مشخص شد که این قارچ در محیط کشت کورن‌میل آگار بهتر و بیشتر از سایر محیط‌ها رشد می‌کند (۲۱).

قارچ فوزاریوم‌سولانی قارچی تندرشد، دارای کلنی‌های مخملی سفید- صورتی‌رنگ است که به سرعت تغییر رنگ داده و به کلنی‌هایی با سطح مخملی یا پنبه‌ای تبدیل می‌شوند. می‌توان از محیط‌های کشت پوتیتود کستروز آگار^{۲۰}، ساپروز کستروز آگار و کورن‌میل آگار برای رشد این قارچ استفاده کرد که طی ۲۴-۷۲ ساعت روی این محیط‌ها رشد می‌کند.

بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی

باسیلوس سوبتیلیس: نتایج بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌های بومی جداسازی‌شده از خاک پارک‌های جنگلی تهران با استفاده از روش چاهک‌گذاری نشان داد که از میان ۲۳ سویه منتخب در مرحله قبل، ۷ سویه علیه پیتیموم/ولتیموم و فوزاریوم‌سولانی فعالیت ضدقارچی از خود نشان دادند که طبق بررسی‌های آماری صورت گرفته، از این میان فعال‌ترین سویه‌ها درباره قارچ پیتیموم/ولتیموم، سویه شماره ۴۸ با میانگین قطر هاله عدم‌رشد ۱۵/۳ میلی‌متر و درباره قارچ فوزاریوم‌سولانی سویه شماره ۸۳ با میانگین قطر هاله عدم‌رشد ۲۰/۶ میلی‌متر بودند (جدول ۱).

نانومتر تنظیم شد. پس از تزریق نمونه به دستگاه با شرایط ذکرشده نتیجه به صورت پیک‌هایی در منحنی کروماتوگرام حاصله بر روی دستگاه مانیتور متصل به دستگاه کروماتوگرافی ظاهر و زمان ظهور^{۱۹} و محدوده زیر هر پیک نیز جداگانه ثبت شد. در این بررسی از متابولیت ضدقارچی ایتورین A که به صورت خالص از شرکت سیگما خریداری شد به‌عنوان شاهد استفاده گردید. به این منظور محلول ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن در حلال متانول، تهیه و ۱۱۱۲۰ از آن به‌عنوان شاهد، قبل از نمونه‌های مجهول به دستگاه تزریق شد (۵).

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس:

در مرحله جداسازی سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس از نمونه‌های خاک براساس خصوصیات مرفولوژیک، ۹۱ کلنی سفیدرنگ، مایل به کرم، دوکی - گرد با قوام کره‌ای، سطحی خشن، حاشیه‌ای مضرس و بویی نامطبوع جداسازی و از آنها کشت ۴ منطقه‌ای تهیه شد و طی بررسی‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی با کنار گذاشتن سویه‌های مشابه در هر نمونه، در نهایت ۲۳ سویه به‌عنوان باسیلوس سوبتیلیس تعیین هويت شدند که در مرحله بعد براساس فعالیت ضدقارچی علیه قارچ‌های ذکرشده غربالگری شدند.

سویه‌های قارچی: قارچ پیتیموم/ولتیموم قارچی تند

جدول ۱- میانگین \pm انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم‌رشد قارچ‌های پیتیموم/ولتیموم و فوزاریوم‌سولانی در اثر فعالیت ضدقارچی به ترتیب

سویه‌های منتخب ۴۸ و ۸۳

شماره باکتری قارچ	۵	۱۹	۳۱	۴۶	۴۸	۷۲	۸۳	p-مقدار
پیتیموم/ولتیموم	۱۲/۶۷ \pm ۰/۵۸	۱۳/۰۰ \pm ۰/۰۰	۱۴/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱۳/۰۰ \pm ۰/۰۰	۱۵/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱۴/۰۰ \pm ۰/۰۰	۱۳/۳۳ \pm ۰/۵۸	<۰/۰۰۱
	d	d	b	d	a*	b,c	c,d	
فوزاریوم سولانی	۱۸/۰۰ \pm ۰/۰۰	۱۸/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱۹/۶۷ \pm ۰/۵۸	۱۹/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱۸/۳۳ \pm ۰/۵۸	۱۹/۶۷ \pm ۰/۵۸	۲۰/۶۷ \pm ۰/۵۸	<۰/۰۰۱
	c	c	b	b	c	b	a*	

کربن، بهترین منبع نیتروژن، بهترین pH و بهترین دما به ترتیب قند گلوکز، عصاره مخمر، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد است.

با توجه به جدول ۲، در هر دو قارچ بررسی شده، منابع کربن مختلف بر میزان هاله عدم رشد تأثیر گذارند (p-value < 0/001). با توجه به آزمون دامنه دانکن، میزان فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب باسیلوس سوبتیلیس در حضور قند گلوکز به عنوان منبع کربن در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفتند و در نتیجه گلوکز به عنوان مناسب‌ترین منبع کربن در نظر گرفته می‌شود.

با توجه به جدول ۳، در هر دو قارچ بررسی شده، منابع نیتروژن مختلف بر میزان هاله عدم رشد تأثیر گذارند (p-value < 0/001). با توجه به آزمون دامنه دانکن، میزان فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب باسیلوس سوبتیلیس در حضور عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفتند و در نتیجه عصاره مخمر به عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن در نظر گرفته می‌شود.

گروه‌بندی آماری تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح (p-value < 0/001) انجام شد و در هر ردیف تیمارهای دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (با توجه به نزدیک بودن مقادیر میانگین‌های سویه‌ها، هر سویه ممکن است در چندین گروه قرار بگیرد. میانگین هاله عدم رشد سویه‌هایی که در یک گروه قرار گرفتند، تفاوت معناداری ندارد). طبق جدول درباره قارچ پیتیوم/ولتیموم سویه شماره ۴۸ و درباره قارچ فوزاریوم سولانی سویه شماره ۸۳ در گروه آماری a قرار گرفته‌اند و در نتیجه بیشترین میزان فعالیت ضدقارچی را دارند که طبق نتایج حاصل از آنالیز *16srDNA* و بررسی‌های ژنتیکی انجام شده شباهت ۱۰۰ درصد به گونه باسیلوس سوبتیلیس را نشان دادند.

بهبودسازی پارامترهای محیطی جهت رسیدن به بهترین فعالیت ضدقارچی سویه‌های منتخب: طبق نتایج حاصل از مرحله بهبودسازی که در جداول شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ آمده است، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بهترین منبع

جدول ۲- میانگین \pm انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم رشد قارچ‌های پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی در اثر فعالیت ضدقارچی به ترتیب سویه‌های منتخب شماره ۴۸ و ۸۳ کشت داده شده در محیط نوترینت برات با منابع کربن مختلف بر حسب میلی‌متر

منبع کربن / قارچ	گلوکز	لاکتوز	نشاسته	p-مقدار
پیتیوم/ولتیموم	۱۶/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۱۰/۳۳ \pm ۰/۵۸ c	۱۱/۰۰ \pm ۰/۰۰ b	<۰/۰۰۱
فوزاریوم سولانی	۲۲/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۱۱/۶۷ \pm ۰/۵۸ c	۱۵/۶۷ \pm ۰/۵۸ b	<۰/۰۰۱

جدول ۳- میانگین \pm انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم رشد قارچ‌های پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی در اثر فعالیت ضدقارچی به ترتیب سویه‌های منتخب شماره ۴۸ و ۸۳ کشت داده شده در محیط نوترینت برات با منابع نیتروژن مختلف بر حسب میلی‌متر

منبع نیتروژن / قارچ	پپتون	عصاره مخمر	نترات آمونیوم	p-مقدار
پیتیوم/ولتیموم	۱۶/۰۰ \pm ۰/۰۰ b	۱۷/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۷/۳۳ \pm ۰/۵۸ c	<۰/۰۰۱
فوزاریوم سولانی	۲۲/۰۰ \pm ۰/۰۰ b	۲۵/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۱۳/۳۳ \pm ۰/۵۸ c	<۰/۰۰۱

با توجه به جدول ۴، در هر دو قارچ بررسی شده، pHهای مختلف بر میزان هاله عدم رشد تأثیر گذارند (p < 0/001). با توجه به آزمون دامنه دانکن، مشخص شد که مناسب‌ترین pH، خنثی است که در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفته است.

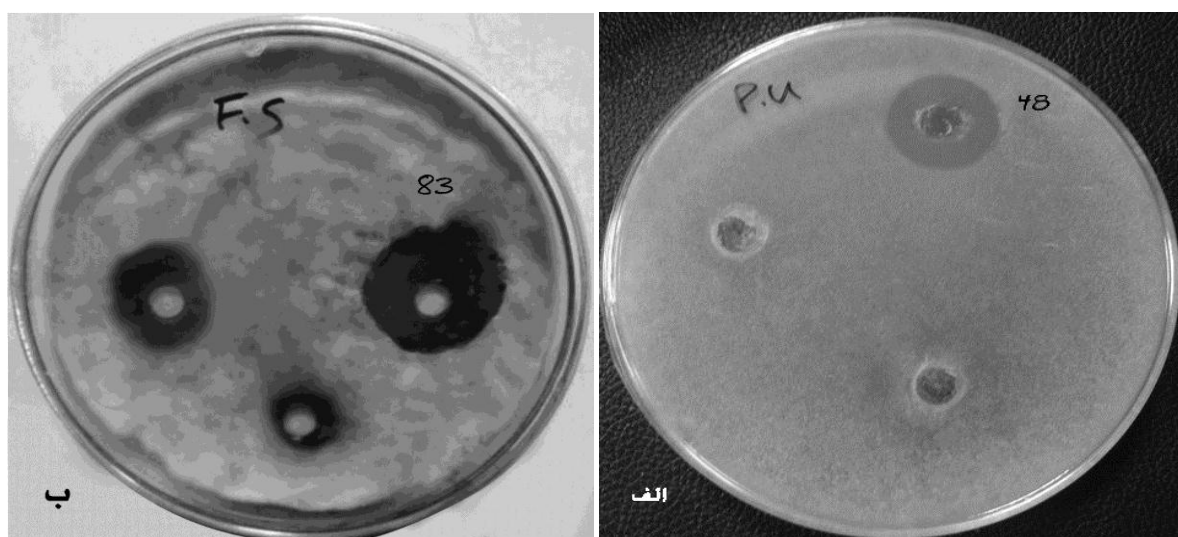
با توجه به جدول ۴، در هر دو قارچ بررسی شده، pHهای مختلف بر میزان هاله عدم رشد تأثیر گذارند (p < 0/001). با توجه به آزمون دامنه دانکن، مشخص شد که مناسب‌ترین pH، خنثی است که در بالاترین گروه آماری (a) قرار گرفته است.

جدول ۴- میانگین \pm انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم رشد قارچ‌های پیتیموم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی در اثر فعالیت ضدقارچی به ترتیب سویه‌های منتخب شماره ۴۸ و ۸۳ کشت داده شده در محیط نوترینت برات با pHهای مختلف بر حسب میلی‌متر

pH قارچ	اسیدی	خنثی	قلیایی	p-مقدار
پیتیموم/ولتیموم	۱۲/۳۳ \pm ۰/۵۸ b	۱۷/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۱۰/۶۷ \pm ۰/۵۸ c	<۰/۰۰۱
فوزاریوم سولانی	۱۴/۳۳ \pm ۰/۵۸ b	۲۵/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۱۳/۶۷ \pm ۰/۵۸ c	<۰/۰۰۱

جدول ۵- میانگین \pm انحراف استاندارد قطر هاله‌های عدم رشد قارچ‌های پیتیموم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی در اثر فعالیت ضدقارچی به ترتیب سویه‌های منتخب شماره ۴۸ و ۸۳ کشت داده شده در دماهای مختلف بر حسب میلی‌متر

دما قارچ	۲۵ درجه سانتیگراد	۳۰ درجه سانتیگراد	۳۷ درجه سانتیگراد	p-مقدار
پیتیموم/ولتیموم	۱۴/۶۷ \pm ۰/۵۸ c	۱۷/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۱۶/۳۳ \pm ۰/۵۸ b	۰/۰۰۲
فوزاریوم سولانی	۲۰/۰۰ \pm ۰/۰۰ c	۲۵/۰۰ \pm ۰/۰۰ a*	۲۲/۳۳ \pm ۰/۵۸ b	<۰/۰۰۱

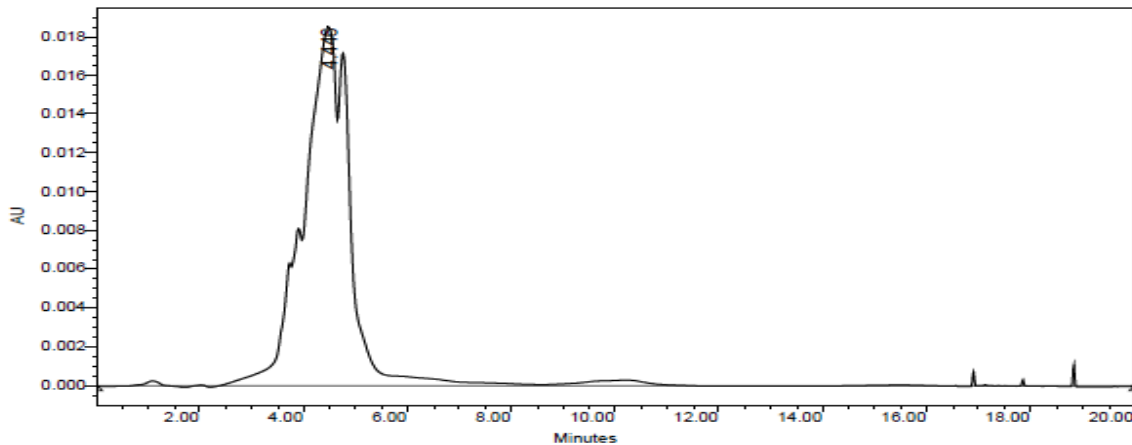


شکل ۱- قطر هاله عدم رشد قارچ‌های پیتیموم/ولتیموم (الف) و فوزاریوم سولانی (ب) در اثر فعالیت ضدقارچی به ترتیب سویه‌های منتخب ۴۸ و ۸۳ در بهترین شرایط (منبع کربن گلوکز، منبع نیتروژن عصاره مخمر، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد)

شناسایی متابولیت ضدقارچی ایتورین A در

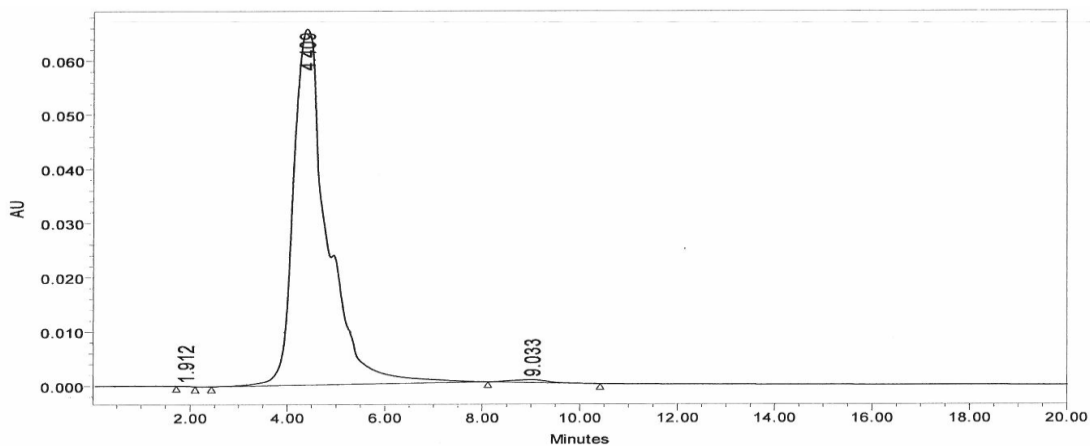
سویه‌های منتخب: با بررسی کروماتوگرام‌های به‌دست آمده از نمونه شاهد و سویه‌های منتخب مشخص شد که پیک مربوط به ایتورین A استاندارد در کروماتوگرام حاصل از آن، در زمان ۴ دقیقه و ۴۴ صدم ثانیه ظاهر شد که با پیک مشابه در همین بازه زمانی در

کروماتوگرام حاصل از سویه‌های منتخب مطابقت دارد که این هم‌پوشانی در زمان ظهور یکسان این پیک در نمونه‌ها بیان‌کننده حضور ایتورین A در سویه‌های بومی مورد آزمایش است. شکل‌های ۲، ۳ و ۴ کروماتوگرام‌های حاصل از HPLC نمونه شاهد (ایتورین A) و سویه‌های بومی منتخب را نشان می‌دهد.



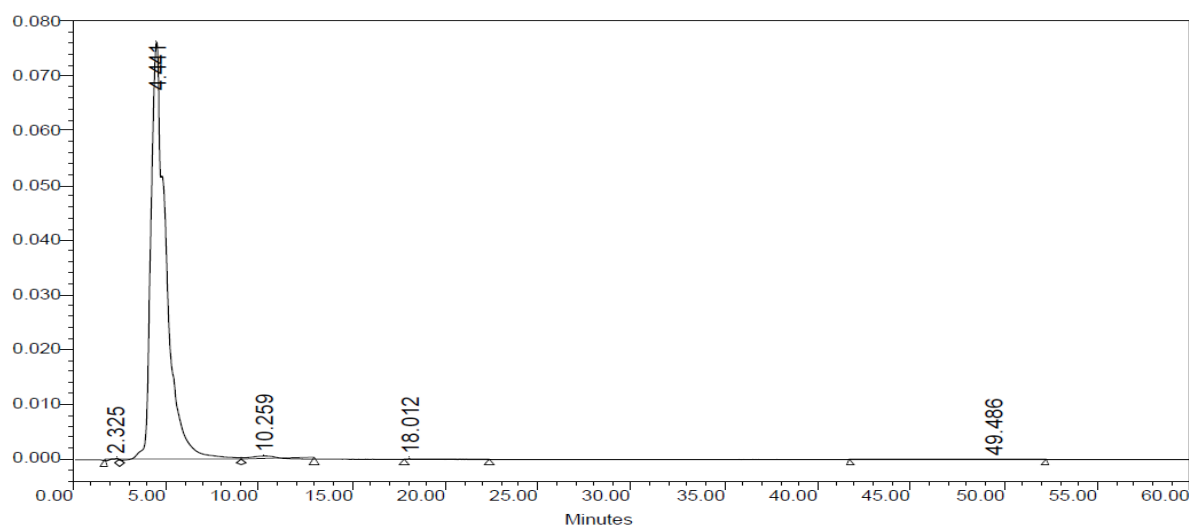
	RT (min)	Peak Type	Area (VSec)	%Area	Height (V)	%Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
۱	۴/۴۴۶	Unknown	۱۲۱۱۲۱۶	۱۰۰/۰۰	۱۸۵۴۲	۱۰۰/۰۰	BB	۱۱۹۹	۰/۰۱۷	۲۰/۰۰۰

شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از ایتورین A



	RT (min)	Peak Type	Area (VSec)	%Area	Height (V)	%Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
۱	۱/۹۱۲	unknown	۱۰۶۵	۰/۰۳	۸۸	۰/۱۳	BB	۲۳	۱/۷۱۷	۲/۱۰۰
۲	۴/۴۰۹	unknown	۳۱۷۳۰۳۴	۹۹/۱۶	۶۵۶۸۹	۹۹/۰۸	BB	۳۴۱	۲/۴۳۳	۸/۱۱۷
۳	۹/۰۳۳	unknown	۲۵۹۶۷	۰/۸۱	۵۲۵	۰/۷۹	BB	۱۳۸	۸/۱۱۷	۱۰/۴۱۷

شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از HPLC سویه بومی شماره ۴۸



	RT (min)	Peak Type	Area (VSec)	%Area	Height (V)	%Height	Integration Type	Points Across Peak	Start Time (min)	End Time (min)
۱	۲/۳۲۵	unknown	۱۰۸۵۰	۰/۲۴	۰/۵۵	BV	۴۹	۱/۶۸۳	۲/۵۰۰	۱/۶۸۳
۲	۴/۴۴۱	unknown	۴۳۸۲۵۲۴	۹۸/۱۲	۹۸/۴۴	VV	۳۹۳	۲/۵۰۰	۹/۰۵۰	۱/۶۸۳
۳	۱۰/۲۴۹	unknown	۶۸۱۳۷	۱/۵۳	۰/۸۰	VB	۲۳۶	۹/۰۵۰	۱۲/۹۸۳	۱/۶۸۳
۴	۱۸/۰۱۲	unknown	۱۶۱۱	۰/۰۴	۰/۱۹	BB	۲۷۱	۱۷/۸۱۷	۲۲/۳۵۰	۱۷/۸۱۷
۴	۴۹/۴۸۶	unknown	۳۳۰۹	۰/۰۷	۰/۰۲	BB	۶۲۸	۴۱/۷۳۳	۵۲/۲۱۷	۴۱/۷۳۳

شکل ۴- کروماتوگرام حاصل از HPLC سویه بومی شماره ۸۳

بحث و نتیجه گیری

و بیماری‌های گیاهی مهم است (۲۳). قارچ پتیوم *اولتیموم* عامل بیماری مرگ گیاهچه و بیماری‌های ریشه‌ای (۲) و قارچ *فوزاریوم سولانی* عامل بیماری خشکیدگی و پوسیدگی در گیاهان در بسیاری از مناطق جهان (۳) هستند. بر همین اساس در پژوهش حاضر با توجه به اهمیت این دو قارچ بیماری‌زا در ایجاد خسارات عمده به محصولات کشاورزی و نقش مؤثر *باسیلوس سوبتیلیس* در سرکوب این قارچ‌ها، به مطالعه سویه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* جداشده از خاک پارک‌های جنگلی تهران و بررسی اثر آنتاگونیستی آنها روی این عوامل بیماری‌زا پرداخته شده است. ۲۳ سویه از مجموع ۹۱ سویه بومی جداسازی شده از خاک پارک‌های جنگلی تهران براساس خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی به‌عنوان

به این دلیل که استفاده از مواد شیمیایی به‌عنوان آفت‌کش برای از بین بردن عوامل بیماری‌زای گیاهی، سبب آلودگی محیط زیست می‌شود و نیز به دلیل مقاومت عوامل بیماری‌زای گیاهی نسبت به این آفت‌کش‌ها، تلاش‌های زیادی جهت جایگزینی روش‌های مؤثرتر برای حفاظت از گیاهان انجام شده است (۲۲). کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید روش مؤثری جهت کنترل خسارات واردشده به محصولات کشاورزی است (۸). *باسیلوس سوبتیلیس* به‌واسطه داشتن یک سری ویژگی‌های خاص، از قبیل تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی ضدقارچی به‌ویژه ایتورین و نیز آنزیم‌های هیدرولیتیک و توانایی تولید اسپور پایدار، به‌عنوان عامل کنترل آفات

پاتوژن میکروسپوروم فولوم^{۲۴} و تریکوفیتون^{۲۵} را ارزیابی شدند و به نتایج قابل ملاحظه‌ای دست یافتند که دال بر تأیید این روش است (۲۴).

نتایج ما نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده در مرحله بهینه‌سازی در محیط نوترینت برات دارای قند گلوکز به عنوان منبع کربن، عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن، pH خنثی و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، بیشترین فعالیت ضدقارچی را به ترتیب علیه قارچ‌های بیماری‌زای پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی نشان دادند. اوهنو^{۲۶} و همکاران تأثیر بهینه‌سازی پارامتر دما را در تولید ایتورین A توسط باسیلوس سوبتیلیس RB14 بررسی شدند. آنها مشخص کردند بهترین دما برای تولید ایتورین A، ۲۵ درجه سانتیگراد است که با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر تفاوت دارد که می‌تواند به علت رشد بهتر جدایه‌های بررسی شده در دمای ۳۰ درجه باشد (۱۹). از طرفی ژانگ^{۲۷} طی مطالعات خود تأیید کرد باسیلوس سوبتیلیس B-FS06 گرماگذاری شده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد بیشترین فعالیت ضدقارچی را علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس^{۲۸} دارد که با نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر همسو است (۲۵).

نتایج حاصل از تخلیص ماده مؤثره و بررسی و مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از HPLC حضور متابولیت ضدقارچی ایتورین A را در پژوهش جاری تأیید کرد. گروور و همکاران، با روش HPLC به این نتیجه رسیدند که اثر آنتی‌بیوتیکی و فعالیت ضدقارچی سویه باسیلوس سوبتیلیس RP24 به علت توانایی این سویه در تولید لیپوپپتید ایتورین A است (۵).

لیپوپپتیدهای متعلق به خانواده ایتورین، پپتیدهای حلقوی آمفی‌فیلیک‌اند که شامل α ۷ آمینواسید متصل به β آمینوفتی‌اسید هستند و طول نیمه اسیدچرب ممکن

باسیلوس سوبتیلیس تعیین هویت شدند. آزمون‌های تکمیلی شامل بررسی فعالیت ضدقارچی سویه‌ها با استفاده از روش چاهک‌گذاری نشان داد که دو سویه ۴۸ و ۸۳ بیشترین توانایی را در کنترل زیستی پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی دارند. در مقایسه با مطالعاتی که در گذشته در زمینه اثر ضدقارچی سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی انجام شده این دو باکتری توانایی بالاتری در مهارکنندگی رشد قارچ‌های ذکر شده داشتند. براساس مطالعه گروور^{۲۱} و همکاران سویه باسیلوس سوبتیلیس RP24 جداسازی شده از ریزوپلن^{۲۲} لوبیای سودانی قادر است علیه قارچ‌های پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی، قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۷/۵۰ و ۷/۸۵ میلی‌متر را با استفاده از روش چاهک‌گذاری ایجاد کند که در مقایسه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر که قطر هاله بازدارندگی به ترتیب ۱۷ و ۲۵ میلی‌متر مشاهده شد، بسیار کمتر بود که این تفاوت می‌تواند به علت تولید بیشتر متابولیت ضدقارچی ایتورین و اثر مهارکنندگی بیشتر سویه‌های بررسی شده علیه پیتیوم/ولتیموم و فوزاریوم سولانی نسبت به جدایه باسیلوس سوبتیلیس RP24 باشد (۵). از این رو سویه‌های باسیلوس سوبتیلیس به دست آمده از مطالعه حاضر علی‌رغم بومی بودن و دسترسی ساده‌تر به آنها و نیز اثر مهارکنندگی بیشتر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در مقایسه با سویه‌های غیربومی می‌توانند مهم باشند. پیش‌تر نیز کومار^{۲۳} و همکاران استفاده از روش چاهک‌گذاری و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط‌کش آنتی‌بیوگرام را نیز جهت تعیین سنجش اثر مهارتی سویه باسیلوس سوبتیلیس MTCC8114 جدا شده از نمونه‌های خاک باغ‌های ایالت آگرا در هند، روی قارچ‌های

پژوهشات تهران، برای اهدای سویه‌های قارچی و نیز از مرکز پژوهشات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References

- (1) Bennet A., Leifert C., Whipps J. Survival of the biocontrol agents *Coniothyrium minitans* and *Bacillus subtilis* MBI600 introduced into pasteurised, sterilised and non-sterile soils. *Soil Biology & Biochemistry* 2003; 35(12): 1565-73.
- (2) Hendrix F., Campbell W. *Pythiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 1973; 11(1): 77-98.
- (3) Khatiri Y., Bahador N., Pordeli H. A study on isolated endophytic bacteria from glycine sp. And their role on control of some plant pathogenic fungi. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2(5): 51-61.
- (4) Shin I., Kuo C., Hsieh F., Kao S., Hsieh C. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturinA production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 2008; 39(6): 635-43.
- (5) Grover M., nain L., singh S., saxena A. Molecular and Biochemical Approaches for Characterization of Antifungal Trait of a Potent Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* RP24. *Current Microbiology* 2010; 60(2): 99-106.
- (6) Liu B., Huang L., Buchenauer H., Kang Zh. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010; 98(2): 305-11.
- (7) Earl A., Losick R., Kolter R. Ecology and Genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 2008; 16(6): 269-75.
- (8) Ongena M., Jacquea Ph. *Bacillus* lipopeptids: versatile weapons for plant diseases biocontrol. *Trends in Microbiology* 2007; 16(3): 115-25.

است از C₁₄ تا C₁₇ برای آنها متنوع باشد (۱۱). اعضای این خانواده فعالیت ضدقارچی قوی دارند و می‌توانند از رشد طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی از طریق واکنش با استرول موجود در غشای قارچ و ایجاد منافذی در غشا و افزایش نفوذپذیری آن که در نهایت منجر به تخریب غشا و مرگ قارچ می‌شود، به‌خوبی ممانعت کنند (۱۲). با توجه به آنچه گفته شد می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های بومی باسیلوس سوبتیلیس منتخب در این بررسی فعالیت ضدقارچی قوی علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی پتیوم اولتیموم و فوزاریوم سولانی دارند که این توانایی آنها به‌علت تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی خانواده ایتورین است که با توجه به اثر مهارکنندگی بیشتر سویه‌های منتخب در مقایسه با سویه‌های غیربومی علیه قارچ‌های ذکر شده (۵) می‌توان استدلال کرد که این سویه‌ها از سویه‌های غیربومی متابولیت بیشتری تولید کرده‌اند، از این رو این پژوهش تأییدی بر توانایی باکتری باسیلوس سوبتیلیس در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی است که می‌توان از آن در جهت کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای محصولات کشاورزی که سبب بازده پایین این محصولات می‌شوند استفاده کرد و در نتیجه می‌تواند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی شوند که با تجمع یافتن در خاک، سبب آلودگی محیط زیست شوند و نیز عوامل بیماری‌زا نسبت به آنها مقاومت حاصل می‌کنند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر زمانی‌زاده مدیر گروه محترم مقطع دکتری رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم

- (9) Fickers P., Leclère V., Guez J., Béchét M., Coucheney F., Joris B., et al. Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Research in Microbiology* 2008; 159(6): 449-57.
- (10) Cho K., Math R., Hong S., Islam S., Mandanna D., Cho J., et al. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control* 2009; 20(4): 402-6.
- (11) Romero D., De Vicente A., Rakotoaly H., Dufour S., Veening J., Arrebola E., et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 2006; 20(4): 430-40.
- (12) Latoud C., Peypoux F., Michel G. Action of iturin A on membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*: activation of phospholipase A and B activities by picomolar amounts of iturin A. *Journal of Antibiotics* 1988; 41(11): 1699-700.
- (13) Cazorla F., Romero D., Perez-Garcia A., Lagtenberg B., De Vicente A., Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Applied Microbiology* 2007; 103(5): 1950-59.
- (14) Hanene R., Abdeljabbar H., Marc R., Abdellatif B., Feried L., Najla S. Biological control of *Fusarium* foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil. *African Journal of biotechnology* 2012; 11(34): 8464-75.
- (15) Leelasuphakul W., Hemmanee P., Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 2008; 48(1): 113-21.
- (16) Klepser M., Wolfe E., Pfaller M. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41(1): 397-401.
- (17) Qi-qin L., Xian-ying M., Xue W., Weil L., Cheng-jie D., Jia-xun F., et al. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. *Agricultural Sciences in China* 2006; 5(5): 363-9.
- (18) Joo M., Hur S., Han Y., Kim J. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* strains from the traditional Korean soybean-fermented food, Chungkookjang. *Journal of Applied Biological Chemistry* 2007; 50(4): 202-210.
- (19) Ruangwong O., Chang C., Lamine S., Liang WJ. Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *African Journal of Microbiology* 2012; 6(16): 3732-8.
- (20) Ohno M., Ano T., Shoda M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1995; 80(5): 517-9.
- (21) Akhavansepay A., Selselehakeri S., Rezapanah M., Motevaze K. An investigation of antifungal activity of *Bacillus subtilis* against some pathogens plant fungi. *Journal of Biological Sciences* 2007; 2(2): 1-10.
- (22) Nagórska K., Bikowski M., Obuchowski M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54(3): 495-508.
- (23) Jacobsen BJ., Zidack NK., Larson BJ. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 2004; 94(11): 1272-5.

- (24) Kumar A., Saini P., Shirvastava JN.
Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*.
Indian Journal of Experimental Biology 2009; 47(1): 57-62.
- (25) Zhang T., Shi Z., Hu L., Wang F.
Antifungal compound from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting The growth of *Aspergillus flavus*.
Word Journal of Microbiology and Biotechnology 2007; 93(10): 142-146.

¹-*Pythiummultimum*

²-*Fusariumsolani*

³-*Bacillus* sp.

⁴-Iturin

⁵-Surfactin

⁶- Fengycin

⁷-*Bacillus subtilis*

⁸- Pour plate

⁹-Nutrient Agar

¹⁰-Corn Meal Agar

¹¹-Sabouraud Dextrose Agar

¹²-Sabouraud Dextrose Broth

¹³- Nutrient Broth

¹⁴ One-way Analysis of Variance (ANOVA)

¹⁵- Blast

¹⁶ Duncan's Test

¹⁷- JAL Tajhiz

¹⁸- Hettich

¹⁹- Retention Time

²⁰- Potato Dextrose Agar

²¹- Grover

²²- Rizoplane

²³- Kumar

²⁴-*Microsporium fulvum*

²⁵-*Trichophyton*

²⁶- Ohno

²⁷- Zhang

²⁸- *Aspergillus flavus*