مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد هشتم، شماره اول، ۱۳۹۹
۱-۱۶
www.jcri.ir

بررسی کارآیی ترکیبات بیولوژیک بر اساس *Bacillus subtilis* در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *Fusarium solani*

سمیه صادقی[1*]، مجتبی مرادزاده اسکندری[2]، فاطمه آزاد دیسفانی[2]، احمد درخشان[3]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علم و فرهنگ، شعبه کاشمر

[2]استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

[3]استادیار موسسه آموزش عالی و مرکز علمی کاربردی جهاد دانشگاهی مرکز کاشمر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۱۰

چکیده

قارچ *Fusarium solani* یکی از مهم‌ترین عوامل در مرگ گیاهچه پنبه به شمار می‌آید. یکی از روش‌های کنترل این بیماری ضدعفونی بذر پنبه با قارچ‌کش‌های شیمیایی و ترکیبات بیولوژیک است. هدف از این پژوهش امکان جایگزینی ترکیبات بیولوژیک *Bacillus subtilis* به‌جای سموم شیمیایی برای ضدعفونی بذر بود. ترکیبات بیولوژیک مورد بررسی شامل سوپرنیتروپلاس، بیوسوبتیل، کمپانیون بودند. در آزمایش زیست‌سنجی کشت متقابل مشخص گردید جدایه‌های *B. subtilis* استخراج‌شده از ترکیبات تجاری بیولوژیک بیوسوبتیل، کمپانیون و جدایه بومی *B. subtilis* B96 به ترتیب با میزان ۴۶/۶۷، ۴۴/۶۷ و ۴۱/۶۷ درصد مؤثرترین جدایه‌ها از نظر ممانعت‌کنندگی از رشد قارچ *F. solani* بودند. ترشحات فرار جدایه بیوسوبتیل و سوپرنیتروپلاس، به ترتیب با میزان ۱۲/۷۷ و ۱۰/۱۹ درصد بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ داشتند. از میان چهار قارچ‌کش مورد بررسی، قارچ‌کش کاربوکسین تیرام (ویتاواکس ۷۵٪) با درصد بازدارندگی (۴۹/۰۶) بیشترین و قارچ‌کش ایمازالیل (فونگافلور ۵٪) با درصد بازدارندگی (۹/۹۱) کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر داشتند. در آزمایش‌های گلخانه بذور پنبه ورامین با ترکیبات تجاری بیولوژیک، سوسپانسیون جدایه بومی B96 و قارچ‌کش‌های مورد آزمایش با سه غلظت متفاوت ضدعفونی و در خاک مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر کشت شدند. نتایج نشان داد تیمار بذر همراه با ترکیب بیوسوبتیل، مؤثرترین ترکیب بیولوژیک از نظر کنترل بیماری مرگ گیاهچه بوده است و این ترکیب از نظر کنترل بیماری با قارچ‌کش کاربوکسین تیرام برابر بود. نتایج کلی

*نویسنده مسئول: Sarasadeghimadah@gmail.com

حاکی از آن بود امکان جایگزینی سموم شیمیایی رایج با برخی ترکیبات بیولوژیک به‌صورت ضدعفونی بذر جهت کنترل بیماری مرگ گیاهچه وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بازدارندگی، مرگ گیاهچه، قارچ‌کش بیولوژیک.

مقدمه

بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های مهم پنبه در مناطق مختلف کشور است که همه‌ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه‌کاری وارد می‌نماید (حمدالـه زاده، ۱۹۸۹). این بیماری دارای گسترش جهانی است که به‌وسیله مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زا، خصوصاً عوامل قارچی به وجود می‌آید. از بین عوامل بیمار گر قارچ‌های *Rhizoctonia solani*،*Fusarium solani* و *Pythium* spp از مهم‌ترین قارچ‌های هستند که باعث مرگ گیاهچه می‌شوند (هیلوکس، ۱۹۹۲).

استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست برای مبارزه با عوامل بیمار گر قارچی گیاهان یکی از روش‌های مؤثر جهت کاهش مصرف سموم و در نتیجه جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست است. استرین‌های *Streptomyces* sp و باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas* spp خاصیت آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای خاکزی ازجمله *F. solani* دارا می‌باشند (عقیقی و همکاران، ۲۰۰۴).

کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه با استفاده از ترکیبات تجاری بیولوژیک، موردتوجه بسیاری از محققین در داخل و خارج از کشور قرارگرفته است. گوآ و همکاران (۲۰۱۴) طی تحقیقی ترکیبات لیپوپپتیدی شبیه فنجیسین[1] از باکتری *B. subtilis NCD-2* را مسئول جلوگیری از رشد *R. solani* در ریزوسفر پنبه و کنترل بیماری مرگ گیاهچه دانستند. امارا و همکاران (۲۰۰۹) کاهش بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *R. solani* را در شرایط گلخانه با استفاده از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* و نیز ترکیبی از دو باکتری *P. aeruginosa* و *P. putida* گزارش نمودند. اردکانی و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از دو جدایه باکتری *P. fluoresence* و ترکیب معدنی پودر بنتونیت و تالک، چهارترکیب بیولوژیک به دست آوردند که فرمولاسیون پودر معدنی بنتونیتB_1 بهترین کارایی را در کاهش بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *R. solani* داشت. جلالی و همکاران (۲۰۱۶) نیز طی تحقیقی کنترل بیولوژیک *F. oxysporum* توسط باکتری‌های آنتاگونیست باسیلوس و سودوموناس ریزوسفر گوجه‌فرنگی در لرستان را مطالعه کردند. نتایج ایشان نشان داد در روش کشت متقابل جدایه‌های *P. fluorescens* از قدرت آنتاگونیستی بالاتری برخوردار بودند، درحالی‌که در آزمایش گلخانه‌ای جدایه *B. subtilis* در افزایش رشد گیاه و کاهش بیماری مؤثرتر بود. باکتری‌های *Burkholderia cepacia*، *Bacillus subtilis*

1. Fengycin

و *B. cereus* بـا فرمولاسـیون Deny ™، Intercept ™، Kodiak ™, Kodiak HB™, Epic™, Concentrate™, Quantum 4000 and System 3™، System 3 و Pix plus plant regulator و قـارچ *Trichoderma harzianum* با فرمولاسیون Trichocash از ترکیبات بیولوژیکی می‌باشـند کـه در حـال حاضر برای کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در دنیا به کار می‌روند (ناکران و همکاران، ۲۰۰۵).

براساس تحقیقات انجام‌شده ترکیبات بیولوژیک بـا محتـوای بـاکتری *B. subtilis* سـابقه خـوبی در کنترل بیماری‌های گیاهی و بخصوص مرگ گیاهچه دارد. هدف از این پژوهش ارزیابی کارایی ترکیبـات بیولوژیک مختلف بر اساس *B.subtilis* و امکان جایگزین نمودن قارچ‌کش‌ها با ترکیبات بیولوژیک بـرای ضدعفونی بذر پنبه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ترکیبات تجاری بیولوژیک و قارچ‌کش‌ها: در این تحقیق به‌منظور کنترل بیماری مـرگ گیاهچـه پنبـه ناشـی از *F. solani* از ترکیبـات بیولوژیـک بـا محتـوای بـاکتری *B. subtilis* شـامل بیوسـوبتیل، سوپرنیتروپلاس و کمپانیون استفاده شد. جداسازی باکتری *B. subtilis* موجود در ترکیبـات تجـاری بـا استفاده از محیط آگار غذایی[1] (NA) انجام گرفت. جدایه بومی *B. subtilis* B96 و قـارچ عامـل بیمـاری مرگ گیاهچه پنبه *F. solani* از کلکسیون بخش گیاه‌پزشـکی مرکـز تحقیقـات و آمـوزش کشـاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه گردید.

در این تحقیق چهار قارچ‌کش کاربوکسین‌تیرام (ویتاواکس ۷۵٪)، ایپرودیون+ کاربندازیم (رورال ٪ ۵۲/۵)، تریادیمنول (بایتان ٪ ۷/۵) و ایمازالیل (فونگافلور ۵٪)، به‌عنوان مقیاس بازدارندگی در مقایسه با ترکیبات بیولوژیک مورداستفاده قرار گرفت.

آزمایش‌ها زیست‌سنجی

الف- بررسی ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باسیلوس: ایـن آزمـایش مطـابق روش ویـرژین کالرز و همکاران (۱۹۹۶) صورت گرفت. حلقه نیم سانتی‌متری از محیط حاوی میسیلیوم قارچ بیماری‌زا (حلقه محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA[2]) برای تیمار شاهد) در مرکز محیط کشت PDA در تشتک پتری قرار داده شد. بعد از اینکه قطر پرگنه قارچ به دو سانتی‌متر رسید، جدایه‌های باکتریایی (جدایه‌های استخراج‌شده از ترکیبات تجاری و جدایه بومی) به‌صورت نقطـه‌ای در چهـار طـرف تشـتک پتری از یکـدیگر قـرار داده شـد. تشـتک پتـری در دمـای ۲۷ درجـه سـانتی‌گـراد نگهـداری و قـدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها پس از ۱۰ روز بر اساس فاصله بین حاشیه پرگنه جدایه‌های باکتریـایی و

1. Nutrient Agar
2. Potato dextrose agar

قارچ بیماری‌زا (لایه بازدارندگی) اندازه‌گیری شد. این آزمایش با پنج تیمار، در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. درنهایت درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری} = \frac{100*(\text{میانگین قطر رشد میسیلیوم در هر تیمار} - \text{میانگین قطر رشد میسیلیوم در شاهد})}{(\text{میانگین قطر رشد میسیلیوم در شاهد})} \quad (۱)$$

ب- بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی باسیلوس در جلوگیری از رشد قارچ بیماری‌زا: این آزمون مطابق روش فیدامن و روزال (۱۹۹۴) انجام شد. در مرحله اول، سوسپانسیونی با رقت 10^{8} از کشت ۷۲ ساعته جدایه‌های باسیلوس در چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر آن بر روی محیط NA پخش شد، سپس تشتک‌های پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد.

در مرحله دوم، حلقه‌هایی به قطر نیم سانتی‌متر از حاشیه پرگنه قارچ بیماری‌زا در وسط تشتک پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. سپس در کنار شعله با رعایت شرایط سترون تشتک‌های پتری حاوی قارچ و باکتری آنتاگونیست روی‌هم قرار گرفت. لازم به ذکر است، تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلم کاملاً پوشانیده و در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت شش روز نگهداری شد. در تشتک پتری شاهد، حلقه‌هایی به قطر نیم سانتی‌متر از محیط PDA حاوی قارچ بیماری‌زا در مقابل تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA فاقد جدایه‌های باکتری قرار داده شد. قطر رشد میسیلیوم قارچ پس از ۱۰ روز اندازه‌گیری شد. این آزمایش با پنج تیمار، در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. درنهایت درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

اثر سموم شیمیایی‌بر بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زای *F. solani* در شرایط آزمایشگاه: در این تحقیق از چهار قارچ‌کش کاربوکسین تیرام، ایپرودیون+ کاربندازیم، تریادیمنول و ایمازالیل استفاده شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۱۷ تیمار و سه تکرار انجام شد. غلظت‌های مختلف تیمارهای سموم شیمیایی مورداستفاده به ترتیب ۵، ۱۵ و ۲۰ ppm بوده است. این آزمایش به روش اختلاط سم با محیط کشت PDA انجام شد (هورسفال ۱۹۵۹). لازم به ذکر است، بعد از آماده شدن محیط کشت، اختلاط بعد از اتوکلاو انجام شده است. در ادامه پس از یک هفته میزان رشد میسیلیوم در هر تشتک پتری محتوی محیط کشت واجد سموم یا شاهد تعیین و مطابق فرمول درصد بازداری رشد میسیلیوم در هر غلظت محاسبه شد (لیتل و هیل، ۱۹۷۸).

آزمایش‌ها گلخانه‌ای: این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۶ تیمار و چهار تکرار انجام شد. آغشته کردن خاک گلدان با قارچ بیماری‌زای *F. solani* مطابق روش ملرو- وارا و جیمنز- دیاس

(۱۹۹۰) در شرایط گلخانه انجام شد. برای هر تیمار چهار گلدان (تکرار) حاوی هفت عدد بذر پنبه کرک دار رقم ورامین در نظر گرفته شد. ضدعفونی بذر پنبه با هر یک از قارچ‌کش‌های شیمیایی با سه غلظت (با توجه به توصیه برچسب سم و مطابق جدول ۱)، ضدعفونی بذر با قارچ‌کش بیولوژیک با میزان توصیه‌شده بر روی برچسب بروشور محصول و ضدعفونی بذر با جدایه بومی *B. subtilis* B96 با استفاده از محیطNA و به روش حیدری و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. درصد سبز شدن به‌صورت هفته‌ای و به‌مدت ۴۵ روز پس از کاشت ثبت و در نهایت درصد مرگ گیاهچه محاسبه شد (هاول، ۲۰۰۶).

جدول ۱- غلظت‌های مختلف تیمارهای مورداستفاده در گلخانه

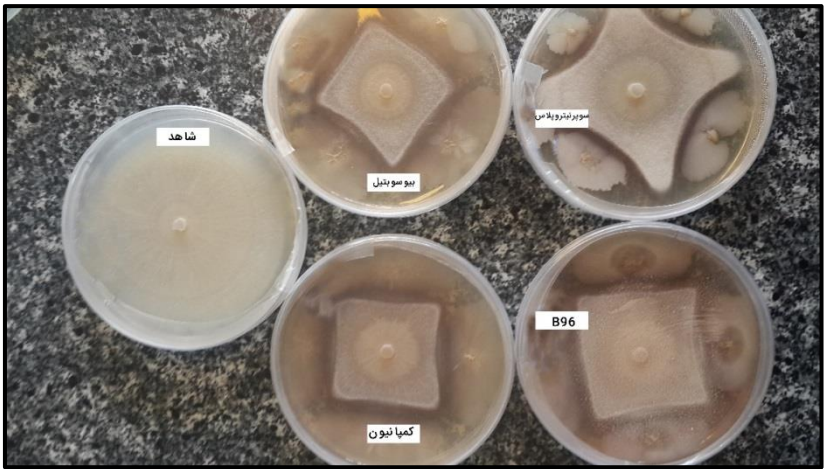
نام تیمار	غلظت‌های مورداستفاده (در هزار)
رورال	۱، ۱/۵، ۲
بایتان	۱/۵، ۲، ۲/۵
کاربوکسین تیرام	۴، ۵، ۶
ایمازالیل	۱، ۱/۵، ۲
بیوسوبتیل	۱، ۱/۵، ۴
کمپانیون	۲/۵، ۴، ۵
سوپر نیتروپلاس	۲، ۳، ۵
جدایه بومی	10^{8}،10^{10}،10^{12} (CFU/ml)

نتایج و داده‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS و Excel مورد تجزیه‌و تحلیل قرار گرفتند. به‌منظور مقایسه میانگین تیمارها از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باسیلوس: بر اساس مقایسه میانگین‌ها، هر چهار جدایه باکتری باسلیوس، با تولید ترکیبات آنتاگونیستی، موجب کاهش رشد میسیلیوم قارچ *F. solani* شدند (جدول ۲ و شکل ۱). درصد ممانعت کنندگی از رشد قارچ بیمارگر توسط جدایه‌های استخراج‌شده از ترکیبات بیولوژیک بیوسوبتیل، کمپانیون، جدایه بومی B96 و سوپرنیتروپلاس به‌ترتیب ۴۶/۶۷، ۴۴/۶۷، ۴۱/۶۷ و ۳۷/۳ درصد بود. با افزایش قطر پرگنه قارچ *F. solani*، درصد بازدارندگی جدایه‌های باکتری استخراج‌شده کاهش یافت. جدایه بیوسوبتیل دارای کمترین قطر (۱/۶ سانتی‌متر) و بیشترین درصد بازدارندگی (۴۴/۶۷) و جدایه سوپرنیتروپلاس دارای بیشترین قطر (۱/۸۸ سانتی‌متر) و کمترین درصد بازدارندگی (۳۷/۳) بود (شکل ۲). از نظر آماری جدایه‌های بیوسوبتیل، کمپانیون و جدایه بومی B96 بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری داشتند. بنابراین

می‌توان گفت جدایه‌های باکتری باسیلوس توانایی خوبی در کاهش رشد میسیلیوم قارچ *F. solani* دارند. بیسال و همکاران (۲۰۰۸) نیز جدایه *B.subtilis* EU07 را به‌عنوان بهترین آنتاگونیست بر علیه *F.oxysporum* . f.sp. *lycopersici* در مطالعات آزمایشگاهی معرفی کردند. هانه‌نه و همکاران (۲۰۱۲) جدایه *B. subtilis* SR146 را از خاک‌های شور تونس جداسازی و شناسایی نمودند که در شرایط آزمایشگاه اثرات بازدارندگی بر روی قارچ‌های بیماری‌زای *F. graminearum*، *F. oxysporum*، *F. melonis*، *F. equiseti* و *F. solani* داشتند. ترکیبات ضد قارچی این باکتری شبیه فنجی‌مایسین تشخیص داده شد. صافدل و همکاران (۲۰۱۶) نیز در آزمایش زیست‌سنجی جدایه‌های *B. subtilis* استخراج شده از ترکیبات بیولوژیک تجاری بیوسوبتیل، کمپانیون، سوپرنیتروپلاس و جدایه بومی نشان دادند جدایه استخراج شده از بیوسوبتیل بالاترین درصد ممانعت کنندگی از رشد قارچ *R. solani* را دارا بود

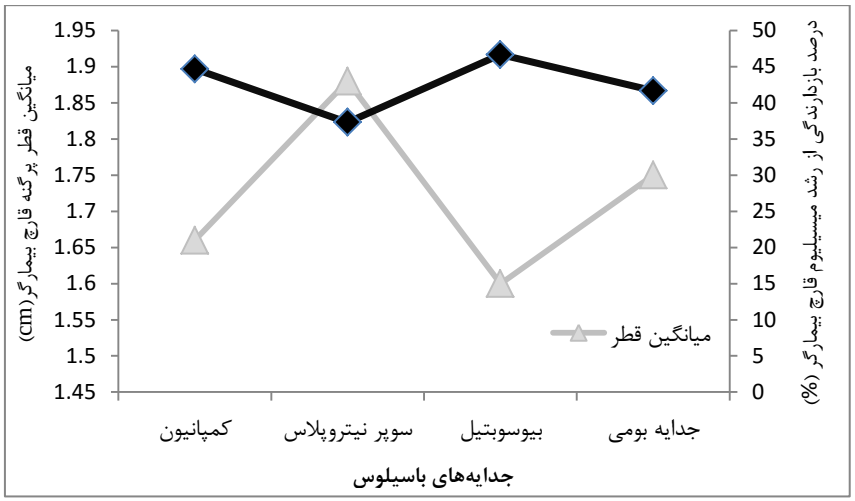


شکل ۱- ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باسیلوس

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر متقابل جدایه‌های باسیلوس در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ *F.solani*

جدایه‌های باسیلوس	درصد بازدارندگی (٪)
شاهد	۰۰/۰۰ b
کمپانیون	۴۴/۶۷ a
سوپر نیتروپلاس	۳۷/۳ ab
بیوسوبتیل	۴۶/۶۷ a
جدایه بومی	۴۱/۶۷ a

* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده‌شده‌اند، در آزمون دانکن ($P\leq0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.



شکل ۲- میانگین قطر پرگنه قارچ *F. solani* برحسب سانتی‌متر و درصد بازدارندگی جدایه‌های باسیلوس از رشد عامل بیمارگر در آزمایش کشت متقابل

بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی باسیلوس در جلوگیری از رشد قارچ بیماری‌زا *F. solani*: نتایج تجزیه‌وتحلیل آماری نشان داد، بین تیمارها، تفاوت معنی‌داری ازنظر آماری در سطح پنج درصد وجود دارد ($P\leq0.05$). ترشحات فرار تمام جدایه‌های باکتری از رشد میسیلیوم قارچ *F. solani* جلوگیری کرد که در این میان، ترشحات فرار جدایه بیوسوبتیل و سوپرنیتروپلاس به ترتیب با درصد بازدارندگی ۱۲/۷۷ و ۱۰/۱۹ بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ *F. solani* را داشتند (جدول و شکل ۳).

فیدامن (۱۹۹۳) نیز طی تحقیقی گزارش کرد، استرین‌های *B. subtilis* از طریق تولید آنتی‌بیوتیک و ترکیبات فرار ضدقارچی می‌توانند از رشد میسیلیوم قارچ‌های رده اوومیست و بازیدیومیست جلوگیری نمایند. آساکا و شودا (۱۹۹۶) آنزیم‌هایی همچون پروتئاز، فنجی‌مایسین، سورفکتین، سیانیدهیدروژن، باسیلیسین، توکسیمایسین را از مهم‌ترین ترکیبات فرار با خاصیت آنتاگونیستی تولید شده توسط باکتری *B. subtilis* گزارش کرده‌اند.

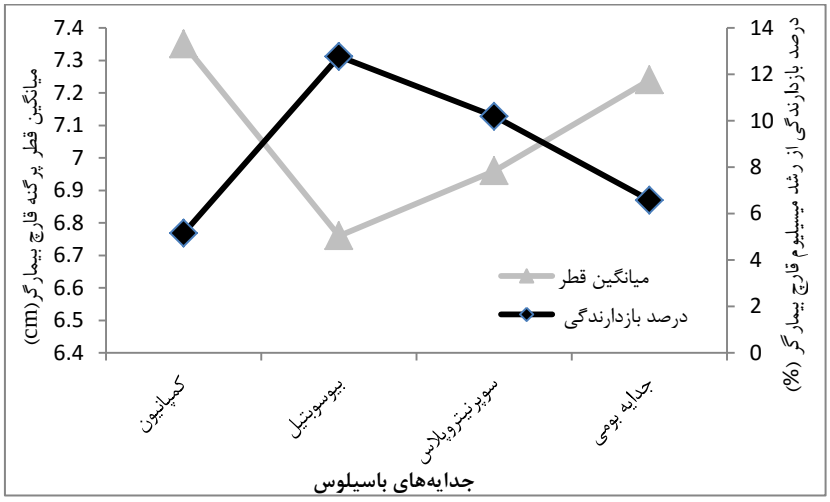
شکل ۳- تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های باسیلوس در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *F. solani*

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های باسیلوس در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *F. solani*

جدایه‌های باسیلوس	درصد بازدارندگی (٪)
شاهد	۰۰/۰۰^{b}
کمپانیون	۵/۱۶a^{b}
بیوسوبتیل	۱۲/۷۷^{a}
سوپر نیتروپلاس	۱۰/۱۹^{a}
جدایه بومی	۶/۵۸a^{b}

* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده‌شده‌اند، در آزمون دانکن ($P\leq0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

با افزایش قطر پرگنه قارچ *F. solani*، درصد بازدارندگی ترکیبات فرار جدایه‌های باکتریایی کاهش یافت. جدایه بیوسوبتیل دارای کمترین قطر (۶/۷۶ سانتی‌متر) و بیشترین درصد بازدارندگی (۱۲/۷۷) و جدایه کمپانیون دارای بیشترین قطر (۷/۳۵ سانتی‌متر) و کمترین درصد بازدارندگی (۵/۱۶) بود (شکل ۴).

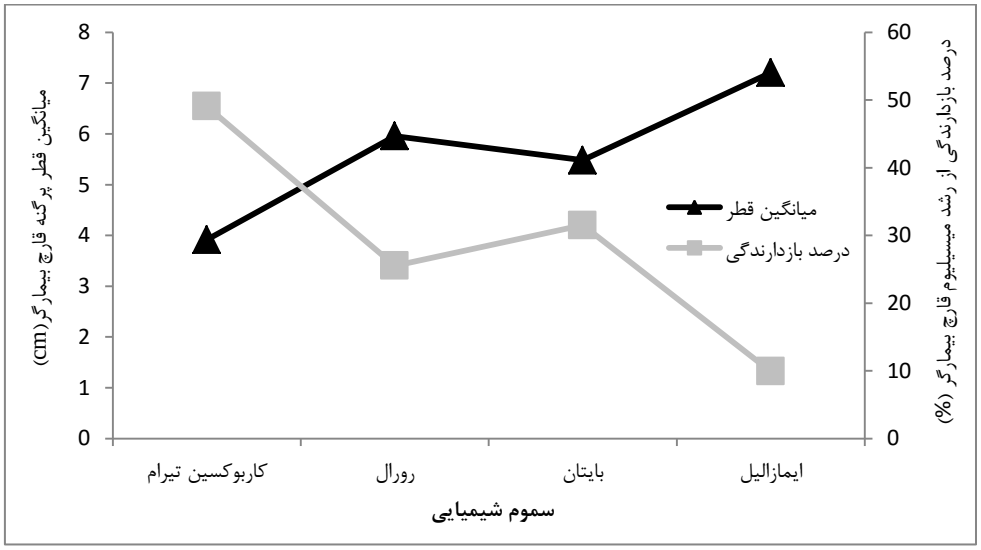


شکل ۴- میانگین قطر پرگنه قارچ *F.solani* برحسب سانتی‌متر و درصد بازدارندگی جدایه‌های باسیلیوس از رشد عامل بیمارگر در آزمایش ترکیبات فرار

اثر سموم شیمیایی‌بر بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زا *F. solani* در شرایط آزمایشگاه: نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد، بین قارچ‌کش‌های شیمیایی تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح پنج درصد وجود دارد ($P\leq0.05$). از میان قارچ‌کش‌ها، قارچ‌کش کاربوکسین تیرام (ویتاواکس ۷۵٪)، با درصد بازدارندگی (۴۹/۰۶) بیشترین و قارچ‌کش ایمازالیل (فونگافلور ۵٪) با درصد بازدارندگی (۹/۹۱)، کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *F. solani* داشتند (شکل ۵ و ۶). در کلیه قارچ‌کش‌های موردبررسی با افزایش غلظت قارچ‌کش میانگین قطر میسلیوم قارچ *F. solani* کاهش یافت. همچنین کاربوکسین‌تیرام در کلیه غلظت‌ها دارای کمترین میانگین قطر و ایمازالیل دارای بیشترین میانگین قطر بود. در کلیه قارچ‌کش‌های موردبررسی با افزایش غلظت قارچ‌کش درصد بازدارندگی میسلیوم قارچ *F. solani* افزایش، همچنین قارچ‌کش کاربوکسین تیرام در کلیه غلظت‌ها دارای بیشترین درصد بازدارندگی و قارچ‌کش ایمازالیل دارای کمترین بازدارندگی بود.

در آزمایشاتی نیز قارچ‌کش‌های شیمیایی آلیت، بنلیت و کاربندازیم در غلظت ppm ۱۰۰و مانکوزب، ریدومیل، توپسین‌ام و ویتاواکس (کاربوکسین) در غلظت ppm ۱۰۰۰ بطور کامل از رشد قارچ *F. solani* جلوگیری کردند (سلطانا و غفار، ۲۰۱۰). جهت ضد عفونی بذر پنبه برای حفاظت بذر و گیاهچه در مقابل حمله عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله *F. solani* قارچ‌کش‌های شیمیایی متعددی توصیه شده است که مهم‌ترین آنها کاربوکسین‌تیرام، کاپتان، کاربندازیم، متالاکسیل، اتریدیازول، مانکوزب، تریادیمنول، کاپتافول، تیرام، ایپرودیون، ایمازالیل می‌باشند (سولانک و کر، ۱۹۹۱؛ نوربخش، ۲۰۱۸).

شکل ۵- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد پر گنه قارچ *F. solani* در غلظت‌های مختلف قارچ‌کش شیمیایی هر عددمیانگین چهار تکرار است و خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (± SE) است. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن (P≤0.05) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.



شکل ۶-میانگین قطر پرگنه قارچ *F.solani* برحسب سانتی‌متر و درصد بازدارندگی جدایه‌های و درصد بازدارندگی از قارچ بیمارگر در غلظت (۱۵ ppm) سموم شیمیایی

تأثیر ترکیبات تجاری بیولوژیک و قارچ‌کش‌های شیمیایی در جلـوگیری از مـرگ گیاهچـه پنبـه در شرایط گلخانه: نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۴)، بین قارچ‌کش‌ها و ترکیبات تجاری بیولوژیک تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح پنج درصد وجود دارد ($P\leq0.05$). در شـرایط گلخانـه از میـان قارچ‌کش‌های مورد بررسی، قارچ‌کش کاربوکسین تیرام با علظت پنج در هزار کارآمدترین (۲/۰۳ درصد) و قارچ‌کش ایمازالیل با غلظـت یـک در هـزار (۳۵/۰۲ درصـد) کـم اثرتـرین قـارچ‌کـش از نظـر درصـد گیاهچه‌میری بوده است. همچنین از بین ترکیبات تجاری بیولوژیک مورد بررسی، بیوسوبتیل با غلظـت چهار در هزار (۶/۰۲ درصد مرگ گیاهچه) مؤثرترین ترکیب بیولوژیکی و سوپرنیتروپلاس بـا غلظـت دو در هزار (۲۵/۰۲ درصد مرگ گیاهچه) کم اثرترین ترکیب بیولوژیک از نظـر کنتـرل مـرگ گیاهچـه در شرایط گلخانه بوده است (جدول ۵). تیمار بذر با ترکیب بیوسوبتیل مؤثرترین ترکیب بیولوژیـک ازنظـر کنترل بیماری مرگ گیاهچه بوده است و به لحاظ آماری این ترکیب ازنظر کنترل بیماری با قارچ‌کـش کاربوکسین تیرام برابری می‌کند.

مک نایت و روسال (۱۹۹۰) در تحقیقی نشان دادند که استرین *B. subtilis* توانست ریشه‌های پنبه را در شرایط مزرعه برای بیش از چهار ماه کلنیزه کند و گیاهچه‌های پنبه را در مقابـل قـارچ *R. solani* محافظت نماید. برانن و کنی (۱۹۹۷) نیز محصول تجاری کودیاک آر حـاوی بـاکتری *B. subtilis* را بـر روی بذر پنبه آزمایش کردند و نتایج قابل توجهی در افزایش رشد و نیز کنترل بیماری مـرگ گیاهچـه با عوامل قارچی فوزاریوم و رایزوکتونیا را گزارش نمودند. باکتری*B. subtilis* که امروزه در ایالات متحده بعنوان کودیاک در کنترل بیولوژیک پنبه مطرح می‌باشد یک واریانت اصلاح شده از *B. subtilis* GB03 می‌باشد (ماهافی و بکمن، ۱۹۹۳). سلطان‌زاده خبیصی(۲۰۱۱) در تحقیقی گـزارش نمـود جدایـه‌هـای فعال اکتینومیست، به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش شدت بیماری پوسیدگی سیاه ریشه نخود بـا عامـل *F. solani* شدند. حیدری و همکـاران (۲۰۰۶) در تحقیقـی امکـان کنتـرل بیولوژیـک بیمـاری مـرگ گیاهچه پنبه ناشی از *R. solani* را با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار دادند. ایشان ۷ جدایه باکتریایی متعلق به دو جنس باسیلوس و سـودوموناس را بعنـوان مـوثرترین جدایه‌ها از نظر کاهش بیماری مرگ گیاهچه نسبت به دو قارچ‌کـش کاربوکسـین تیـرام و کاربوکسـین معرفی نمودند. عرب‌سلمانی و اعلایی (۲۰۱۴)، با استفاده از اختلاط مواد ضدعفونی‌کننده بـذر، بیمـاری مرگ گیاهچه و پژمردگی ورتسیلیومی پنبه را موردبررسی قرار دادند. نتایج ایشان نشان داد کـه امکـان کاربردی توأم تریکودرمین بی، سوبتیلین به‌منظور کنترل مرگ گیاهچه به‌تنهایی و یا مخلوط بـا گـاچو، لاروین به‌منظور کنترل تریپس زرد پنبه به‌صورت ضدعفونی بـذر وجـود دارد و اثـرات سـوء جـانبی در دزهای توصیه‌شده مشاهده نشد. کیقبادی و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشـی بـا اسـتفاده از یـک جدایـه

باسیلوس جداسازی شده از ریشه گیاهان زراعی توانستند بیماری مرگ گیاهچه پنبه (*R. solani*) را در شرایط گلخانه کنترل نمایند. این جدایه در افزایش رشد گیاه نیز موثر بود.

جدول ۴- تجزیه واریانس درصد مرگ‌ومیر گیاهچه پنبه در شرایط گلخانه

منابع تغییرات	میانگین مربعات	
	درجه آزادی	درصد مرگ و میر گیاهچه (٪)
تیمارها مورد آزمایش (ترکیبات سم و بیولوژیک)	۲۵	۹/۷۴۲*
اشتباه	۳۸	۱/۱۵۶
ضریب تغییرات (CV%)	-	۱۵/۲۳

* در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۵- درصد جلوگیری از مرگ‌ومیر گیاهچه پنبه از طریق ترکیبات تجاری بیولوژیک و قارچ‌کش‌های شیمیایی

نام تیمار	غلظت‌های مورد استفاده	درصد مرگ‌ومیر گیاهچه (٪)
شاهد (مثبت)	-	۵۸/۰۲ a
شاهد (منفی)	-	۰۰/۰۰ f
رورال	۱	۲۵/۰۲ c
	۱/۵	۱۶/۰۳ d
	۲	۱۶/۰۳ d
بایتان	۱/۵	۱۵/۰۱ d
	۲	۱۵/۰۱ d
	۲/۵	۱۵/۰۱ d
کاربوکسین تیرام	۴	۸/۰۶ e
	۵	۲/۰۳ ef
	۶	۴/۰۷ ef
ایمازالیل	۱	۳۵/۰۳ b
	۱/۵	۲۱/۰۴ cd
	۲	۱۷/۰۵ d
بیوسوبتیل	۱	۱۷/۰۵ d
	۱/۵	۱۲/۰۴ de
	۴	۶/۰۲ e
کمپانیون	۲/۵	۲۱/۰۴ cd
	۴	۱۵/۰۱ d
	۵	۱۲/۰۴ de

سوپرنیتروپلاس	۲	۲۵/۰۲ c
	۳	۲۱/۰۴ cd
	۵	۱۶/۰۳ d
جدایه بومی	$۱۰^{۸}$	۱۶/۰۳ d
	$۱۰^{۱۰}$	۱۶/۰۳ d
	$۱۰^{۱۰}$	۱۵/۰۱ d

نتیجه‌گیری

جدایه‌های باکتری *B.subtilis* بومی و استخراج شده از ترکیبات تجاری (بیوسوبتیل، سوپرنیتروپلاس و کمپانیون) که در این تحقیق مورداستفاده قرار گرفتند، توانستند با مکانیسم‌های مختلف از رشد میسیلیوم قارچ *F. solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه جلوگیری کنند. در آزمایش کشت متقابل تمامی جدایه‌ها قادر به جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر بودند. تأثیر متابولیت‌های فرار ضد قارچی روی رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری نیز نشان داد، جدایه‌های *B. subtilis* این آزمایش می‌توانند ترکیبات فرار علیه قارچ *F. solani* تولید نمایند. از آنجا که یکی از اجزای مهم مدیریت تلفیقی بیماری‌های پنبه استفاده از سموم کم خطر و کاهش مقدار مصرف سم می‌باشد و از طرفی با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌آید امکان جایگزینی سموم شیمیایی رایج با برخی ترکیبات بیولوژیک در ضدعفونی بذر پنبه وجود دارد. در این تحقیق بیوسوبتیل بعنوان بهترین ترکیب بیولوژیک از نظر کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه معرفی گردید. این ترکیب می‌تواند در شرایط مزرعه و جهت کنترل بیماری توصیه گردد. در صورت استفاده در شرایط مزرعه‌ای با در نظر گرفتن وجود مواد آلی و میکروفلور خاک طبیعی، کنترل این بیماری شاید موفق‌تر نیز باشد.

منابع

Aghighi, S.G.H., ShahidiBonjar, R., Rawashsdeh, S., Batayneh, K. and Saasoun, I. 2004. First report of antifungal spectra of Iranian Actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Phytophthera megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cervisiae*. Asian lornal of plant sciences. 3:463-471.

Amara, M.A.T., Rawhia, A.A., Ebtisam, M.E., Nagwa, M.S., and Rabaa, Y. K. 2009. Biological control of soreshin disease of cotton by *pseudomonas fluorescent* isolated from Egyption desert soil. Egyptian Journal of Natural Toxins. 6(2): 32-64.

Arabsalmani, M., and Alai, M. 2014. Management of Cotton Seedling Damping- off and Verticillium Wilt Using Seed treatments Mixing Effect. Pp:29 *In:* The First

National Conference on Sustainable Agriculture and Resources. 30 Jan. Tehran. Iran. (In Persian).

Ardakani, S.S., Heydari, A.,Khorasan, N.A., Arjmandi, R., and Ehteshami, M. 2009. Preparation of new biofungicides using antagonistic bacteria and mineral compounds for controlling cotton seedling damping- off disease. Journal of Plant Protection Research. 49 (1): 49-55.

Asaka, O. and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* Rb14. Applied Environmental Microbiology. 62: 4081-4085.

Baysal, Ö., Çalışkan, M., and Yeşilova, Ö. 2008. An inhibitory effect of a new Bacillus subtilis strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 73(1-3), 25-32.

Brannen, P.M. and Kenney, D.S. 1997. Kodiak ® —a successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 19(3): 169-171.

Fiddaman, P.J. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology. 54: 701-702.

Fiddaman, P.J. and Rossal, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal Applied Bacteriology. 76: 395-405.

Gua, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X., Wang, Y. and Ma, P. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. Microbiological Research. 169(7-8):533-540.

Hamdollahzadeh, A. 1989. Final Report of Design "Study of Cotton Diseases in Gorgan". Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center. Gorgan. 42p.

Hanene, R., Abdeljabbar, H., Marc, R., Abdellatif, B., Ferid, L. and Najla, S.Z. 2012. Biological control of Fusarium foot rot of wheat using fengycin-producing *Bacillus subtilis* isolated from salty soil. African Journal of Biotechnology. 11(34): 8464-8475.

Heydari, A., Fatahi, H., Zamani, N., Naraghi, L. 2006. Investigation on the possibility of using bacterial antagonists for biological control of cotton seedling damping-off in green house. Entomology and Phytopathology. 72(1):51-68. (In Persian).

Hillocks, R.J. 1992. Cotton Diseases. C.A.B International Wallingford. UF. 415p.

Horsfall, J.G. 1959. Principales of fungicidal action. Chronica Botanica Co. Wattman, U.S.A. 124p.

Howell, C.R. 2006. Effect of seed quality and combination fungicide–*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and postemergence damping-off in cotton. Phytopathology. 97: 66-71.

Jalali, S., Panjekeh, N., Darvishnia, M., Salari, M., and Salehi, A. 2016. Biological control of Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici by antagonistic bacteria *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from tomato rhizosphere in Lorestan province. Journal Management System. 4(1): 67-78. (In Persian with English Abstract).

Keyghobadi, S. Fallahzadeh, Mamaghani, V. and Shirzad, A. 2016. Biological control of cotton seed rot and seedling damping-off with *Bacillus* isolated from root crops. *In:* 3rd Conference on new finding in environment and agricultural ecosystems. 25 Sep. Tehran. Iran. (In Persian).

Little, T.M. and Hills, F.J. 1978. Agricultural experimentation and analysis .John Willey and Sons, Inc. New York. 98p.

Mahaffee W.F., and Backman P.A. 1993. Effects of seed factors on spermosphere and rhizosphere colonization of cotton by *Bacillus subtilis* GB03. Phytopathology. 83: 1120-1125.

Mcknight, S.E., and Rossall, S. 1991. Root colonization of cotton seedling by *Bacillus subtilis* (MBI 600). Bulletin SROP. 14 (8): 365-369.

Melero- Vara J.M., and Jimenez-Dias, R.M. 1990. Etiology, incidence and distribution of cotton seedling damping- off in southern Spain. Plant Disease. 74: 597-600.

Nakkeeran, S., Dilantha Fernando, W.G. and Siddiqui, Z. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases *In*: Z.A. Siddiqui (ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, the Netherlands. 257-296.

Noorbakhsh, S. 2018. List of important pests, diseases and weeds of major agricultural products, pesticides and recommended methods for their control. Plant Protection Organization press. 216p.

Safdel, J., Moradzadeh Eskandari, M., Azad Disfani, F., and Derakhshan, A. 2016. Investigation on commercial and native isolates of *Bacillus subtilis as* biocontrol agent of potato black scurf. Pp: 252 *In:* 3rd National Meeting on Biocontrol in Agriculture and Natural Resources of Iran. 2-3 feb. Mashhad. Iran. (In Persian).

Solanke, R.B. and Kore, S.S. 1991. Effects of fungicidal seed treatment on germination, vigour and mycoflora in cotton. Journal Maharashtra Agricultural universities. 3: 450-451.

Soltanzadeh Khabisi, M. 2011.Evaluation of antagonistic effects of soil actinomycetes on chickpea root rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. M.Sc thesis of plant pathology. Department of plant protection. Shahid Bahonar University of Kerman. 108p.

Sultana, N. and Ghaffar, A. 2010. Effect of fungicides, Microbial antagonists and oilcakes in the control of *Fusarium solani*, the cause of seed rot, seedling and root infection of bottle gourd, bitter ground and cuumber. Pakistan journal of Botany. 42(4): 2921-2934.

Virgen-Callers, G., M. Salar-Godoy, V. Olalde-Portagal, L. Aguilera-Gomez and Hernadez-Delgadillo, R. 1996. *In vitru* inhibition of *Fusarium* and *Verticillium* sp. With *Bacillus circulans*. 27 (4): 12-32.