"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد دهم، شماره ٤، زمستان ١٤٠٠
(ص ١٠٢-٨٥)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 10, No.: 4, Winter 2022
(pp: 85-102)
DOI: 10.22092/ijsst.2021.352932.1377
Research Article

بیوپرایمینگ بذر با باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 جهت کنترل بیمارگر قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه (*Fusarium pseudograminearum*) و بهبود برخی از شاخص‌های رشدی گندم

محسن ساسانی[1]، مسعود احمدزاده[2*]، محمدرضا جهانسوز[3]، ثریا نوید[4]

[1] دانشجوی دکتری گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
[2] استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
[3] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
[4] دانشجوی دکتری زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹)

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه گندم از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که توسط گونه‌های قارچ فوزاریوم ایجاد می‌شود. پژوهش حاضر با هدف بیوپرایمینگ بذر با جدایه باکتری *Bacillus Velezensis* UTB96 جهت کنترل بیمارگر قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه و بهبود شاخص‌های رشدی گندم، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در سال ۱۳۹۸ انجام شد. اثر بازدارندگی باکتری بر رشد بیمارگر قارچی در شرایط آزمایشگاه در آزمون کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و عصاره فیلتر شده کشت مایع باکتری به‌ترتیب ۶۰، ۵۰ و ۳۰ درصد بود. جدایه باکتریایی توانایی تولید آنزیم‌های بیوکنترلی، متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشدی نظیر اکسین، سیدروفور و آنزیم ACC deaminase را داشت. در آزمایشگاه، ضدعفونی بذر گندم قبل از پرایمینگ، تأثیر به‌سزایی بر افزایش کارایی تکنیک بیوپرایمینگ با باکتری داشت، زیرا که در بذرهای گندم ضدعفونی نشده، باکتری در کاهش قارچ بیمارگر نقشی نداشت. به‌ترتیب محلول بیواسموپرایمینگ، اسموپرایمینگ و هالوپرایمینگ بیشترین تأثیر را در کنترل قارچ بیمارگر و بهبود شاخص‌های رشدی گندم (درصد جوانه‌زنی، طول و وزن خشک اندام‌های ریشه و ساقه)، در شرایط گلخانه داشتند. محلول پودر تالک و صمغ اگرچه در بذور جوانه زده باعث کاهش بیماری قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه شد، ولی در صد جوانه‌زنی بذرهای گندم در این تیمار کاهش یافت. ترکیب پودر تالک + صمغ زانتان با باکتری، باعث بهبود صفات مذکور شد.

کلمات کلیدی: اسموپرایمینگ، باسیلوس، جوانه‌زنی، کنترل بیماری.

Biopriming of seed with *Bacillus Velezensis* UTB96 to control the fungal pathogen of root and crown rot (*Fusarium pseudograminearum*) and improving some growth indicators of wheat

M. Sasani[1], M. Ahmadzadeh[2*], M.R. Jahansuz[3], S. Navid[4]

[1] Ph.D. Student of Plant Protection, University college of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[2] Professor in the Department of Plant Protection, University college of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[3] Professor in the Department of Agronomy and Plant Breeding, University college of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
[4] Ph.D. Student of Agronomy and Plant Breeding, University college of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 13, 2021 – Accepted: Mar. 09, 2021)

Abstract

Wheat root and crown rot is one of the most important diseases caused by Fusarium fungi. The aim of this study was to seed biopriming with *Bacillus Velezensis* UTB96 isolate in order to control the fungal pathogen of root and crown rot and improve the growth indices of wheat, in vitro and in greenhouse in 2019. The effect of bacteria inhibition on fungal pathogen growth in vitro in cross-culture test, volatile metabolites and filtered extract of bacterial liquid culture were 60, 50 and 30%, respectively. Bacterial isolate was able to produce biocontrol enzymes, metabolites and growth-promoting hormones such as auxin, siderophore and ACC deaminase. In vitro, disinfection of wheat seeds before priming had the effect of increasing the efficiency of the biopriming technique with bacteria, because in wheat seeds it is not disinfected, the Bacteria had no role in controlling the pathogen Biosmopriming, osmopriming and halopriming solution, respectively, have a great effect on the control of pathogen and increase the growth indices of wheat (germination, length and dry weight of root and stem organs), in greenhouse conditions. Although the solution of talc powder and gum in the germinated seeds reduced root and crown rot, but reduced the germination of wheat seeds in this treatment. The combination of talc powder + xanthan gum with bacteria improved the mentioned traits.

* Email: ahmadz@ut.ac.ir

Key words: Osmopriming, Bacillus, germination, disease control.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum L.*) از محصولات غذایی مهمی است که بیش از هر گیاه زراعی دیگری در دنیا و مناطق خشک کشت می‌شود و به‌عنوان محصولات استراتژیک نقش مهمی در امنیت غذایی مردم ایران و جهان را بر عهده دارد (FAO, 2018). تولید گندم در دنیا در درجه اول برای تغذیه انسان و در درجه دوم برای تغذیه پرندگان، حیوانات و مصارف صنعتی می‌باشد (FAO, 2018; Beyranvand *et al*., 2013). بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه که عمدتاً توسط گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم ایجاد می‌شود، از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در شرایط آب و هوای گرم و مرطوب و مراحل ابتدایی رشد می‌باشد (Alahmad *et al*., 2018). این قارچ علاوه بر تأثیر بر عملکرد محصول، با تولید متابولیت‌های ثانویه (توکسین‌های قارچی)، باعث خسارت کیفی به دانه‌های گندم و فرآورده‌های حاصل از آن می‌شود (Obanor *et al*., 2013). علائم بیماری به‌صورت زخم‌های قهوه‌ای روی ریشه، میان‌گره و زیر طوقه غلات قابل مشاهده بوده و در شرایط محیطی مساعد، در سطح مزرعه پراکنده می‌شود (Cook, 1980; Smiley *et al*; 2009). از روش‌های مدیریتی مناسب جهت کنترل بیماری می‌توان به اصلاح خاک، استفاده صحیح از منابع آبی، ضدعفونی بذرها، ارقام مقاوم، تناوب زراعی، مصرف صحیح کودهای شیمیایی، کنترل بیولوژیک و بیوپرایمینگ بذر (Biopriming)، اشاره کرد (Kaur *et al*., 2020).

باتوجه به ناکارآمدی روش‌های شیمیایی در کنترل قارچ پوسیدگی ریشه و طوقه گندم، تأثیر سوء بر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و اثرات مخرب زیست محیطی (Wagacha and muthombi, 2007)، استفاده از روش‌های بیولوژیک حائز اهمیت می‌باشد (Narayanasmy, 2013). کنترل بیولوژیک، علاوه بر توانایی کنترل بیماری‌های قارچی، با تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشد موجب افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Ocallagham, 2016). با توجه به آن‌که کلنیزاسیون موفق ریزوسفر یکی از شروط لازم برای موفقیت باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شود، لذا استفاده از باکتری‌ها برای کنترل بیماری‌های گیاهی حائز اهمیت است (Grosu *et al*., 2105). جوانه‌زنی اولین مرحله نموی در گیاه است، که از مراحل مهم و حساس در چرخه زندگی گیاهان است و از زمانی‌که بذر درون خاک قرار می‌گیرد در معرض حمله بسیاری از عوامل بیمارگر و تنش‌های مختلف قرار دارد، لذا هرچه روند جوانه‌زنی بذر سریع‌تر طی شود به‌نفع گیاه و به ضرر بیمارگر خواهد بود (Sivasubramaniam *et al*., 2011).

پرایمینگ یکی از روش‌های مرسوم در کشاورزی به منظور افزایش سرعت و میزان جوانه‌زنی بذور می‌باشد، بیوپرایمینگ بذر، یکی از روش‌های پرایمینگ است، در این روش بذر را قبل از کاشت با عوامل بیولوژیک تلقیح کرده، به‌نحوی‌که این عوامل روی بذر استقراریافته و با حفظ جمعیت خود در نهایت موجب افزایش رشد گیاه و حفاظت آن در برابر تنش‌های محیطی می گردند (Murunde and Wainwright, 2018). روش بیوپرایمینگ به‌دلیل تأثیر بر جوانه‌زنی بذر و یکنواختی سبز شدن بسیار مؤثرتر از پوشش‌دهی معمولی بذر با باکتری‌ها است (Kaur *et al*., 2020). پوشش‌دهی روشی برای پوشاندن بذرها با مواد همراه و چسباننده برای بهبود عملکرد بذر و استقرار گیاه در خاک می‌باشد. در روش پوشش‌دهی معمولی بذر، عامل بیولوژیک همراه با مواد همراه (چسباننده و پخش شونده) روی بذر مستقر می شود (Ma, 2019). مزیت بیوپرایمینگ بر این روش پیش‌جوانه‌دار کردن بذر است که موجب تسریع و بهبود جوانه‌زنی بذور می شود. محققین گزارش کردند که بیوپرایمینگ بذر سویا با باکتری *P. choloraphis* MAB42، سبب بهبود رشد و کنترل ورتیسلیوم و فوما شد (Abuamshaet *et al*., 2011).

در تحقیق دیگر بیوپرایمینگ بذر برنج، سبب افزایش عملکرد و کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج شد (Reddy *et al*., 2013). بیوپرایمینگ جو بهاره با باکتری *Azetobacter chrococcum* و *Azetobacter lipoferum* سبب افزایش عملکرد شد (Mirshekari *et al*., 2012). بیوپرایمینگ بذر سیب‌زمینی با باکتری‌های پروبیوتیک و صمغ زانتان و پودر تالک سبب افزایش زنده مانی باکتری، بهبود استقرار گیاه و افزایش شاخص‌های رشدی شد (Kloepper *et al*., 1981). با توجه به کمبود عناصر ریزمغذی در خاک های زراعی دنیا که یکی از عوامل کاهش تولید محصولات کشاورزی در جهان است (Cakmac, 2008)، و تأثیر مثبت عناصر ریزمغذی روی و منیزیم در تحریک جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در غلات (Harris *et al*., 2008)، و اثر مثبت این عناصر در افزایش زنده‌مانی و پایداری باکتری، کاربرد این ترکیبات ریزمغذی در محلول بیوپرایمینگ، سبب افزایش کلنیزاسیون ریزوسفر گندم توسط باکتری شده و علاوه بر اثر کنترلی روی بیمارگر می‌تواند سبب افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاه گردد (Rehman *et al*., 2012 Rengel, 2015, Ahmadzadeh, 2015). در این راستا، اثر محلول‌های مختلف بیوپرایمینگ، در بیوکنترل قارچ بیمارگر پوسیدگی ریشه و طوقه و بهبود شاخص‌های رشدی ارقام گندم در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه باکتری آنتاگونیست، قارچ بیمارگر و رقم

جهت بررسی تأثیر عوامل باکتریایی در کنترل بیماری قارچی عامل پوسیدگی ریشه و طوقه (*F. pseudograminearum*)، و شاخص های رشدی گندم، جدایه باکتریایی *Bacillus Velezensis* UTB96 از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست آزمایشگاه کنترل بیولوژیک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. گونه قارچی مورد نظر نیز از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه تهیه و پس از خالص‌سازی و شناسایی مورفولوژیک و مولکولی، روی بذرهای جو در دمای چهار درجه سلسیوس و به روش کاغذ صافی (Leung and Taga., 1998) نگهداری شد. سپس روی محیط کشت PDA کشت و آزمون اثبات بیماری‌زایی آن نیز مطابق روش اسمیلی و یان انجام شد (Smiley and Yan, 2009). به‌منظور بررسی توانایی بیماری‌زایی و شدت بیمارگری قارچ بیمارگر و بر اساس پژوهش های اخیر که در آن مقاومت ارقام داخلی گندم نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه مورد بررسی قرار گرفته بود (Mansouri *et al*., 2002)، ارقام فلات (حساس)، مروارید (مقاوم) و سایسون (رقم جدیدی که مطالعات قابل استنادی از نظر میزان مقاومت به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه انجام نشده است)، انتخاب شدند. بذر ارقام مذکور از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. ۵۰۰ گرم بذر گندم با چهار قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ روی محیط PDA در ارلن دو بار اتوکلاو و به‌مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. بذرهای گندم در قالب طرح کاملاً تصادفی، با شش تیمار و سه تکرار در گلدان‌های سه کیلویی در دو شرایط (بدون حضور و در حضور عامل بیمارگر)، در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران در آبان‌ماه ۱۳۹۸، کشت شد. ۴۰ روز پس از کاشت، شدت بیماری بر اساس شاخص اسمایلی و یان اندازه‌گیری شد (Smiley and Yan, 2009).

۲- توان باکتری در تولید هورمون، آنزیم و متابولیت‌های محرک رشد

جهت ارزیابی توان باکتری در تولید اکسین، از روش پتن و گلیک استفاده شد (Patten and Glic, 2002). بدین منظور باکتری پس از تلقیح به محیط TSB، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰rpm انکوبه شد. سه میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۱۰ دقیقه

و با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ و در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از محلول رونشین حاصل با چهار میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی ترکیب گردید. پس از ۲۵ دقیقه میزان جذب نوری رنگ ایجاد شده به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه گیری و مقدار تولید اکسین باکتری با توجه به منحنی استاندارد (Patel, 2014) محاسبه شد. توانایی تثبیت نیتروژن باکتری نیز به روش آزمون کاهش استیلن (پیش ماده و کوفاکتور آنزیم نیتروژناز)، انجام شد (Miladiarsi *et al*., 2017). بدین منظور باکتری در محیط NFB کشت و پس از پنج روز انکوبه شدن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، وضعیت باکتری بررسی شد. اطراف کلونی باکتری، وجود هاله تغییر رنگ یافته از سبز به آبی، نشان دهنده تثبیت نیتروژن بود. جهت ارزیابی توان باکتری در تولید سیدروفور به روش CAS آگار، از محیط کروم‌آزورول‌اس مطابق روش الکساندر و زوبرا استفاده شد (Alexander and Zuberer., 1991). بدین منظور، پنج میکرولیتر از باکتری به وسط تشتک پتری محیط CAS آگار منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. اگر رنگ محیط کشت شد، به‌دلیل خروج آهن از محیط CAS آگار، به نارنجی تغییر پیدا کند، نشان‌دهنده تولید سیدروفور توسط باکتری است.

جهت بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری از محیط اسکیم میلک آگار (شامل: ۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و نه گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)، استفاده شد. باکتری به‌صورت خطی در تشتک‌های حاوی محیط کشت مذکور کشت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. تشکیل هاله بی‌رنگ اطراف کلونی باکتری، نشانه فعالیت آنزیم پروتئاز است (Bajaj and Aharma, 2011). جهت تعیین توان تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتری نیز از روش روبرتز و اسلایترنیکوف استفاده شد (Roberts and Selitrennikoff, 1988). بدین منظور مقدار چهار درصد حجمی کیتین کلوئیدال به محیط آب آگار ۱/۵ در صدی اضافه گردید. پس از اتوکلاو و انتقال به تشتک پتری، باکتری به‌صورت خطی کشت و پس از ۴۸ ساعت وضعیت باکتری بررسی گردید. وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان‌دهنده تجزیه کیتین توسط باکتری است.

توانایی تولید آنزیم فیتاز مطابق روش چانشان و همکاران انجام شد (Chunshan *et al*., 2001)، بدین صورت‌که ابتدا یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط NA به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB منتقل‌شد و پس از ۲۴ ساعت ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به‌صورت نقطه‌ای در وسط تشتک پتری محیط فیتات (شامل: ۱/۵ درصد گلوکز، ۰/۵ درصدآمونیوم سولفات، ۰/۰۵ درصد کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ درصد منیزیم سولفات، ۰/۰۱ درصد سدیم کلرید (نمک طعام)، ۰/۰۱ درصد کلرید کلسیم، ۰/۰۰۱ درصد سولفات آهن، ۰/۰۰۱ درصد منگنز سولفات و ۰/۵ درصد فیتات سدیم)، کشت و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری، نشان‌دهنده توانایی باکتری در تولید آنزیم فیتاز است.

برای تعیین توانایی تولید آنزیم ACC deaminase از روش پنروز و گلیک استفاده شد (Penrose and Glick., 2003). ابتدا باکتری در محیط کشت TSB کشت سپس ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۳۰ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل شد و به‌مدت ۱۲ ساعت روی شیکر انکوباتور با ۱۸۰دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس باکتری در محیط حاوی ACC و محیط DF و همچنین محیط LB کشت شد و درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، نسبت به بررسی رشد باکتری در محیط های مختلف اقدام شد. به‌منظور ارزیابی کمی توانایی باکتری در تولید آنزیم ACC deaminase، باکتری رشد یافته در محیط TSB به لوله سانتریفیوژ منتقل شده، به

مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های باقیمانده در ته لوله با محیط حداقل DF شست‌وشو شد، ۴۵ میکرولیتر از محلول به سوسپانسیون باکتریایی فوق اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه و ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد، تا فعالیت آنزیم القاء شود. پس از سانتریفیوژ، سلول‌های باقیمانده در ته لوله در ۶۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۰/۱ مولار (PH=۸/۵) حل شد، سپس ۳۰ میکرولیتر تلوئن به آن اضافه و درون ویال‌های ۱/۵ میلی لیتری ورتکس شد. ۲۰ میکرو لیتر ACC ۰/۵مولار به هر یک از تیوب‌ها اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس یک هیدروکلریک اسید ۰/۵۶ مولار به هر لوله اضافه و محلول نهایی پنج دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۸۰۰ میکرو لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۵۶ مولار و ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۴-۲ دی نیترو فنیل هیدرازین ورتکس شد. محتویات هر لوله برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری، سپس دو میلی‌لیتر NaOH دو مولار به محلول افزوده شد و از ورتکس، جذب نور در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. برای تهیه محلول‌های استاندارد از آلفا - کتوبوتیرات استفاده شد.

۳- توانایی سلول، ترکیبات فرار، غلظت های مختلف باکتری *B. Velezensis* UTB96 و محلول های بیوپرایمینگ در کنترل رشد بیمارگر قارچی در شرایط آزمایشگاه

برای بررسی توانایی باکتری در کنترل رشد بیمارگر قارچی در شرایط آزمایشگاه، از روش تام ماسایتیرونگ و همکاران استفاده شد (Thammasittirong *et al*., 2016). در این روش یک قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ (*F. pseudograminearum*)، به‌فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبه تشتک پتری ۸ سانتی‌متری حاوی محیط NA+PDA قرار داده شد. یک لوپ از باکتری به صورت خطی و با فاصله ۴/۵ سانتی‌متر از قارچ بیمارگر کشت شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از هفت روز، شعاع رشد پرگنه قارچ در حضور باکتری و تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از رشد قارچ توسط باکتری با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

رابطه ۱ = درصد ممانعت از رشد قارچ

$$[(R1 - R2)/R1] \times 100$$

در رابطه بالا R1 شعاع رشد قارچ در تیمار شاهد و R2 شعاع رشد قارچ در حضور باکتری می‌باشد.

اثر ترکیبات فرار باکتری بر کنترل قارچ بیمارگر طوقه و ریشه گندم نیز مطابق روش فیدامان و روسال بررسی شد (Fiddaman and Rossall, 1994). ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت شده، روی محیط LBA پخش شد. هم‌زمان یک قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ روی محیط PDA کشت و سپس در مقابل محیط حاوی باکتری قرار داده شد و تشتک‌های پتری به‌مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره باکتری بر رشد بیمارگر نیز، عصاره باکتری مطابق روش تنیولا و همکاران به‌دست آمد (Teniola *et al*., 2005). از کشت ۷۲ ساعته باکتری تکثیر یافته در محیط مایع LB، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه)، از مایع رویی جدا شد. عصاره حاصل با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتری سترون، فیلتر و در فالکون‌های استریل در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد از عصاره برون‌سلولی حاصل، به محیط کشت PDA افزوده شد و درون تشتک‌های پتری شیشه‌ای ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد. از حاشیه کشت هفت روزه قارچ بیمارگر، یک قرص پنج میلی‌متری در وسط تشتک پتری کشت شد. تیمار شاهد فاقد عصاره باکتری بود. تشتک‌های پتری به‌مدت هفت روز و در دمای ۲۸ درجه

سلسیوس انکوبه شدند. درصد کنترل غلظت‌های مختلف عصاره باکتری، با مقایسه میزان رشد قارچ بیمارگر نسبت به تیمار شاهد به‌دست آمد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد.

برای بررسی اثر محلول های بیوپرایمینگ در کنترل قارچ بیمارگر گندم، بذرهای گندم سایسون، به دو شکل ضدعفونی سطحی، خیساندن در ۷۰ درصد اتانول به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن خیساندن در هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه، (Safdarian *et al*., 2019) و بدون ضدعفونی استفاده شدند. بذرها پس از پرایمینگ در تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت NA+PDA کشت شدند. در هر تشتک پتری سه بذر پرایم شده با محلول‌های پرایمینگ و یک بذر به‌عنوان شاهد (بدون پرایمینگ)، استفاده شد. بذرها درون تشتک پتری قرار گرفتند و یک پلاگ پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ *F. pseudograminearum* نیز در وسط تشتک پتری قرار گرفت. پس از گذشت هفت روز نسبت به بررسی تأثیر محلول‌ها در جلوگیری از پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه اقدام شد. این آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

٤- محلول های پرایمینگ بذر در کنترل قارچ بیمارگر و افزایش شاخص های رشدی گندم در شرایط گلخانه

به‌منظور تهیه اینوکولوم باکتریایی، یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته باکتری به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط LB منتقل‌شد و به‌مدت ۴۸ ساعت درون دستگاه شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ (با سرعت ۱۰۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه)، رسوب داده شدند و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جمعیت آن‌ها به 10^8 CFU/ml رسانیده شد. تعداد هشت عدد بذر سایسون به‌مدت شش ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰rpm پرایم شدند. کاشت بذرها و افزودن قارچ بیمارگر (مشابه آزمون اثبات بیماری‌زایی)، به روش اسمایلی و یان انجام شد (Smiley and Yan, 2009). بدین منظور بذر رقم سایسون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با هشت تیمار و سه تکرار در گلدان‌های سه کیلوگرمی (خاک زراعی، کود دامی و ماسه) در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران در آبان‌ماه۱۳۹۸، کشت شد (جدول ۱). هر سه روز یک‌بار نسبت به آبیاری گلدان‌ها اقدام شد. پس از گذشت ۴۰ روز از کاشت بذرها، ارزیابی اثر محلول‌های پرایمینگ در افزایش شاخص‌های رشدی گندم (وزن خشک و طول اندام‌های ساقه و ریشه، درصد جوانه‌زنی)، در حضور و عدم حضور بیمارگر و کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه انجام شد. درصد کنترل بیماری نیز از رابطه ۲ محاسبه شد:

رابطه ۲

$$\text{درصد کنترل بیماری} = \frac{\text{(شدت بیماری در تیمار اعمال شده} - \text{شدت بیماری در تیمار شاهد}}{\text{شدت بیماری در تیمار شاهد}}$$

بعد از جمع‌آوری داده‌ها و ثبت در اکسل (Excel)، تمامی تجزیه‌های آماری صورت گرفته در تحقیق حاضر با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS (SAS Institute, 2008)، صورت گرفت. بدین منظور و با توجه به نیاز از رویه‌های GLM، MEANS و CORR استفاده شد. قبل از تجزیه واریانس، از نرمال بودن توزیع خطای آزمایشی در هر یک از تیمارها اطمینان حاصل شد و سپس عملیات تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد صورت گرفت.

جدول ۱- تیمارهای مورد مطالعه در آزمایش حاضر

Table 1- Studied treatments of this experiment

سوسپانسیون باکتری Bacterial suspension	باکتری Bacteria
محلول نمکی (هالوپرایمینگ) Salt solution (halopriming)	(هالوپرایمینگ) محلول نمک (Halopriming) Salt solution
محلول نمکی + باکتری (بیوهالوپرایمینگ) Salt solution + bacteria (biohallopriming)	باکتری + نمک(بیوهالوپرایمینگ) Bacteria + salt (biohallopriming)
محلول سولفات روی + سولفات منیزیم (اسموپرایمینگ) Zinc sulfate solution + magnesium sulfate (osmopriming)	روی + منیزیم(اسموپرایمینگ) Zinc + magnesium (osmopriming)
محلول سولفات روی و منیزیم + باکتری (بیواسموپرایمینگ) Zinc and magnesium sulfate solution + bacteria (biosmopriming)	روی + منیزیم + باکتری(بیو اسموپرایمینگ) Zinc + Magnesium + Bacteria (Biosmopriming)
پودر تالک و صمغ زانتان Talcum powder and xanthan gum	پودر تالک + صمغ زانتان Talcum powder and xanthan gum
پودر تالک و صمغ زانتان + باکتری Talcum powder and xanthan gum + bacteria	پودر تالک + صمغ زانتان + باکتری Talcum powder and xanthan gum + bacteria
شاهد Control	شاهد Control

نتایج و بحث

۱- شناسایی قارچ بیمارگر پوسیدگی ریشه و طوقه گندم (*F. pseudograminearum*)

رشد پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA بسیار سریع بود، به‌طوری که پس از ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب ۱۲/۱۲ ساعت نور فلورسنت و تاریکی، تقریباً تمام تشتک پتری ۸ سانتی‌متری پر شد. میسلیوم‌های هوایی در این‌گونه، پنبه‌ای تا پودری و در ابتدا سفید و با گذشت زمان به رنگ قرمز تغییر کرد. در محیط کشت CLA اسپورودشیوم‌های نارنجی پس از گذشت ۱۴ الی ۲۰ روز تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم‌های روی اسپورودوشیوم نیز، به رنگ نارنجی کم‌رنگ، نسبتاً کشیده و دارای چندین دیواره عرضی با سلول انتهایی باریک و به‌شکل پاشنه بود ند. در محیط کشت، زنجیره اسپوری و میکروکنیدیوم مشاهده نشد. صفات مورفولوژیک مذکور با صفات مورفولوژیک قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه بر اساس کلید های شناسایی مطابقت داشت (Cook, 1980; Nelson, 1981).

۲- بیماری‌زایی قارچ پوسیدگی ریشه و طوقه (*F. pseudograminearum*) در ارقام گندم در آزمایشگاه

اثر قارچ بیمارگر بر درصدهای جوانه‌زنی و بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ارقام گندم در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیمارگر قارچی در شرایط آزمایشگاه، با ایجاد بیماری با شدت‌های مختلف باعث پوسیدگی و کاهش درصد جوانه‌زنی بذر ارقام گندم شد (جدول ۳ و شکل ۱). به‌ترتیب شدت بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه و کاهش درصد جوانه‌زنی بذر در رقم حساس فلات ۷۰ و ۲۵ درصد، در رقم سایسون ۶۶ و ۴۱ درصد، و مروارید ۳۷ و ۲۱ درصد بود (جدول ۳ و شکل ۱). بنابراین اگرچه رقم مروارید (۶۶ درصد)، نسبت به ارقام سایسون (۸۰ درصد)، و فلات (۷۵ درصد)، جوانه‌زنی بذر

کمتری در شرایط بدون حضور قارچ بیمارگرداشت؛ ولی این رقم تا حدودی نسبت به بیماری متحمل بوده و نسبت به دو رقم دیگر درصدهای بیماری و کاهش جوانه‌زنی در حضور بیمارگر به شکل معنی‌داری کمتر بود. پس از خارج کردن گیاهان از خاک، به‌منظور حصول اطمینان از بیماری‌زایی جدایه قارچی مورد نظر اصول کخ انجام شد. پس از ضدعفونی، بافت گیاهی در محیط های اختصاصی فوزاریوم محیط SNA، CLA وPPA، کشت داده شد(Leslie and Summerell, 2006). پس از بررسی خصوصیات مورفولوژی مشخص شد که جدایه بیمارگر گونه *F. pseudograminearum* بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر قارچ بیمارگر بر جوانه‌زنی و بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ارقام گندم

Table 2- Analysis of variance for the effect of pathogen on germination and root and crown rot of wheat cultivars

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	جوانه زنی بذر Seed Germination	بیماری Disease
بلوک Block	2	422.1ns	75 ns
تیمار Treatment	5	583.9**	3421.9**
خطا Error	10		
CV	-	10.1	16.05

ns و ** به‌ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و وجود تفاوت معنی‌دار در سطح آماری یک درصد می‌باشد.

ns and **: Non- Significant and significant differences at 1% level of probability, respectively.

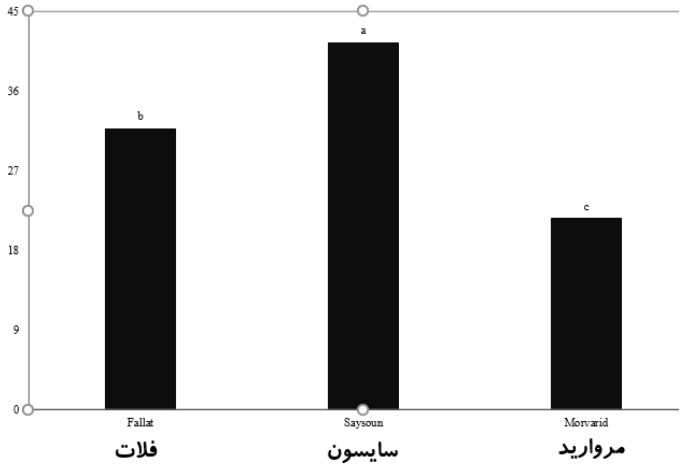
جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر قارچ بیمارگر بر جوانه‌زنی و بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ارقام گندم

Table 3- Compared the effect of pathogenic fungus on germination and root and crown rot of wheat cultivars

رقم گندم Wheat cultivar	(%) جوانه زنی Germination (%)	(%) بیماری Disease (%)
(شاهد) فلات Fallat (control)	75.6ab	-
فلات + بیمارگر Fallat +Pathogen	51.6c	70.6a
سایسون (شاهد) Saysoun + (control)	80.3a	-
سایسون + بیمارگر Saysoun + Pathogen	47.0c	66a
مروارید(شاهد) Morvarid + (control)	66.3b	-
مروارید + بیمارگر Morvarid + Pathogen	52c	37.6b

* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

* Mean in each column with the same letter is not significantly different at P<0.01.



شکل ۱- درصد جوانه‌زنی بذر ارقام گندم در حضور قارچ بیمارگر

Figure 1- Percentage reduction of seed germination of wheat cultivars in the presence of pathogenic fungus compared to control treatment

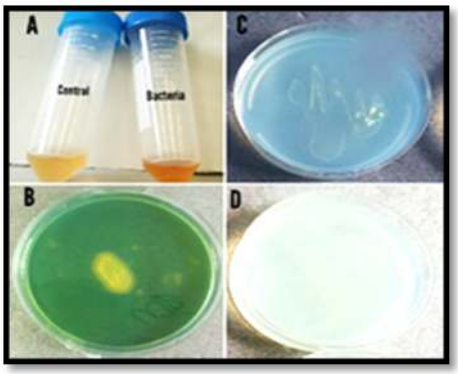
شکل ۲- اثبات بیماری‌زایی قارچ در ارقام گندم: گیاه بیمار (A و B) و سالم (C و D)

Figure 2- Pathogenicity of the fungus in wheat cultivars: diseased (A and B) healthy (C and D) plant

۳- توانایی جدایه باکتری *B. velezensis* UTB96 در تولید هورمون، آنزیم و متابولیت های محرک رشد

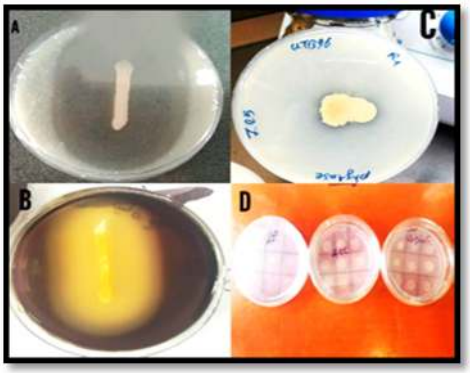
نتایج نشـــان داد که جدایه باکتری قادر به تولید سیدروفور در محیط CAS آگار، تثبیت نیتروژن در محیط NFB و هورمون اکسین به‌میزان ۴/۸۳ میلی‌گرم بر لیتر بود (شـــکل ۳). همچنین در محیط کشـــت جامد نیز آنزیم‌های پروتئاز، کیتیناز، فیتاز و ACC deaminase تولید کرد (شـــکل ۴). ارزیابی کمی توانایی باکتری در تولید آنزیم ACC deaminase نشان داد که باکتری قادر به تولید ۱۸۰ نانومول آنزیم آلفا کتوبوتیرات بود. باکتری قادر اســـت با تولید متابولیت ها و بازدارنده های رشـــد، بیمارگر را در

شرایط آزمایشگاهی کنترل کند. در آزمون بررسی تأثیر متابولیت های فرار، پس از جداسازی باکتری، قارچ بیمارگر مجدداً توانست رشد کند، که این امر نشان‌دهنده تأثیر متابولیت های باکتریایی بر بیمارگر است. افزایش طول و حجم ریشه، موجب افزایش توانایی گیاه در جذب آب و مواد غذایی شده و بهبود رشد و عملکرد گیاه را در پی خواهد داشت. یکی از عواملی که می‌تواند موجب افزایش رشد ریشه گردد، هورمون اکسین است که توانایی تولید این هورمون در باکتری (*Bacillus subtilis*) به اثبات رسیده است (Araujo *et al*., 2005). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که جدایه *B. velezensis* UTB96 قادر به تولید هورمون اکسین و سیدروفور بود، بنابراین در شرایط کمبود آهن، باکتری‌ها می‌توانند با تولید سیدروفور مقادیر اندک آهن موجود در محیط را کلاته کرده، از دسترس بیمارگر خارج کرده و در اختیار خود و گیاه قرار دهند. بنابراین تولید سیدروفور می‌تواند هم به‌عنوان یک محرک رشد عمل کند و هم از طریق مکانیسم رقابت باعث کنترل بیماری گردد (Ahmadzadeh, 2014). با توجه به توانایی باکتری در کنترل بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی و تولید متابولیت‌ها، آنزیم‌ها و هورمون‌های محرک رشد، این احتمال وجود دارد که کاربرد این باکتری در سطح مزرعه می‌تواند در جهت افزایش تولید راه‌گشا باشد.



شکل ۳- توانایی باکتری در تولید اکسین (A) ، سیدروفور (B) تثبیت ازت (C و D)

Figure 3- Bacterial ability to produce auxin (A), siderophore (B) and nitrogen fixation (C and D)



شکل ۴- توانایی باکتری در تولید آنزیم‌های پروتئاز (A)، کیتیناز (B)، فیتاز (C) ACC deaminase (D)

Figure 4- Ability of bacteria in produce protease (A), chitinase (B), phytase (C) and ACC deaminase (D) anzyme

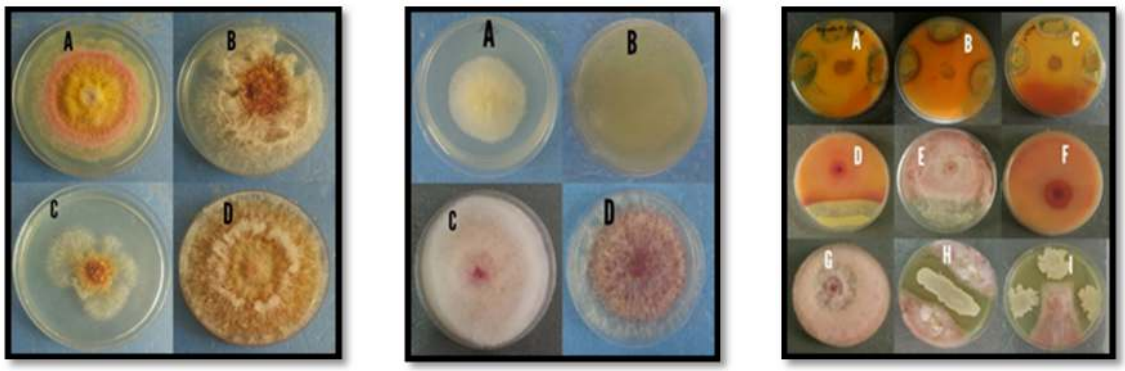
٤- تأثیر باکتری *B. velezensis* UTB96 و محلول های بیوپرایمینگ بر رشد قارچ بیمارگر (*F. pseudograminearum*) و جوانه‌زنی بذر گندم در شرایط آزمایشگاه

قارچ بیمارگر پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در تیمار شاهد رشد سریعی داشت، در حالی‌که حضور باکتری آنتاگونیست و متابولیت‌های فرار باکتری به‌ترتیب باعث کاهش ۵۰ و ۵۸ درصدی رشد آن شد (جدول ۴). بیشترین درصد ممانعت از رشد قارچ توسط عصاره فیلتر شده کشت مایع باکتری در غلظت باکتری ۱۵ درصد و کمترین در تیمار شاهد مشاهده شد. بنابراین با افزایش غلظت عصاره فیلتر شده کشت مایع باکتری در محیط کشت، درصد جلوگیری از رشد قارچ نیز افزایش یافت (جدول و شکل ۵). در بذرهای ضدعفونی شده با الکل(۲ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم(۱۰ دقیقه)، قارچ بیمارگر با استقرار روی بذرها در تیمار شاهد، موجب پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه گندم شد (شکل ۶). در بذرهای ضدعفونی نشده، هیچ کدام از محلول‌های بیوپرایمینگ به‌تنهایی نتوانستند از پوسیدگی بذر جلوگیری کنند که این امر احتمالا به‌دلیل حضور سایر میکروارگانیسم‌ها(قارچی یا باکتریی) روی سطح بذور ضدعفونی نشده باشد(شکل ۶). در تیمارهای بیوپرایمینگ، باکتری با استقرار روی بذر سبب ممانعت از رشد قارچ شده و با جلوگیری از نزدیک شدن قارچ به بذور از پوسیدگی گیاهچه گندم جلوگیری کرد.

جدول ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره فیلتر شده کشت مایع باکتری از رشد قارچ پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در شرایط آزمایشگاه

Table 5- The effect of different concentrations of filtered extracts of bacterial culture on the growth of root and crown rot fungus of wheat in vitro

غلظت عصاره فیلتر شده کشت مایع باکتری (%) Concentration of filtered extract of bacterial culture (%)	ممانعت از رشد بیمارگر (%) Inhibition of pathogen growth (%)
0	0d
5	11.1c
10	26b
15	63.3a



تفاوت غلظت های مختلف عصاره باکتری
Different concentrations of bacterial extract

متابولیت
Metabolite

باکتری
Bacteria

شکل ۵- تأثیر باکتری، متابولیت فرار و غلضت‌های مختلف عصاره باکتری در کنترل قارچ پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در آزمایشگاه

Table 5- The effect of bacteria, Metabolite and different concentration of bacteria extract in control of the growth of wheat crown and root rot pathogenic fungi in laboratory conditions

شکل ۶- تأثیر محلول های بیوپرایمینگ بر جلوگیری از رشد بیمارگر و اثر بیمارگر بر پوسیدگی بذر (A)، تأثیر محلول بیواسموپرایمینگ در کنترل قارچ بیمارگر در بذرهای ضدعفونی شده (B) و ضدعفونی نشده (C)، تأثیر بیوهالوپرایمینگ در کنترل قارچ بیمارگر در بذرها ضدعفونی شده (D)، تأثیر بیواسموپرایمینگ در کنترل قارچ بیمارگر در بذرهای ضدعفونی نشده (E)، اثر پودر تالک و صمغ بر جوانه‌زنی بذر گندم (F)

Figure 6- The effect of biopriming solutions on preventing pathogen growth and the effect of pathogen on seed rot (A), the effect of bio-esmo-perime on control of pathogenic fungi in infected (B) and uninfected seeds (C), the effect of bio-halo-perime on control of pathogenic fungi in uninfected seeds (B), the effect of Talc powder and Xanthan gum on seed germination of wheat

نتایج نشان داد که تأثیر محلول‌های بیوپرایمینگ بذر با باکتری بر جوانه‌زنی بذرهای گندم در شرایط آزمایشگاه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ولی تیمار باکتری به تنهایی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (جدول ۶). در شرایط آزمایشگاه، بیشترین مقدار بذر جوانه‌زده در تیمار شاهد و کمترین در محلول پودر تالک و صمغ مشاهده شد (جدول ۷). بنابراین محلول‌های پرایمینگ مورد مطالعه، به‌تنهایی تأثیر چندانی بر افزایش جوانه‌زنی بذر گندم نداشتند و حضور برخی از آن‌ها مثل محلول پودر تالک و صمغ به‌شدت مانع جوانه‌زنی بذر گندم شد و حتی باکتری نیز نتوانست در حضور این عوامل موجب جوانه‌زنی بذر گندم گردد.

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر محلول‌های بیوپرایمینگ بر جوانه‌زنی بذرهای گندم در شرایط آزمایشگاه

Table 6- Analysis of variance for the effect of biopriming solutions on seeds germination of wheat in laboratory conditions

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	تعداد بذور جوانه‌زده - میانگین مربعات Number of sprouted seeds - average square	
		بعد از ۲۴ ساعت After 24 hours	بعد از ۳۶ ساعت After 36 hours
بلوک Block	2	0.00.^{ns}	1.25 ^{ns}
تیمار Treatment	7	46.07**	50.45**
خطا Error	14	0.85	0.36
ضریب تغییرات CV	-	13.71	۷,۳۰

^{ns} و ** به‌ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و وجود تفاوت معنی‌دار در سطح آماری یک درصد می‌باشد.

^{ns} and **: Non- Significant and significant differences at 1% level of probability, respectively.

جدول ۷- مقایسه میانگین تأثیر محلول‌های بیوپرایمینگ بر جوانه‌زنی بذرهای گندم در شرایط آزمایشگاه

Table 7- Mean comparison of the effect of Biopriming solutions on seeds germination of wheat in laboratory conditions

تیمار Treatment	تعداد بذور جوانه‌زده Number of sprouted seeds	
	بعد از ۲۴ ساعت After 24 hours	بعد از ۳۶ ساعت After 24 hours
باکتری Bacteria	8.3ab	11a
هالوپرایمینگ Halopriming	9.6a	10.3ab
بیو هالوپرایمینگ Bihalopriming	8.3ab	10.3ab
اوسموپرایمینگ Osmopriming	8b	9.3b
بیوهالوپرایمینگ Bioosmopriming	8.6ab	10.6a
پودر تالک و صمغ زانتان Talcum powder and xanthan gum	0.3c	1.3c
پودر تالک و صمغ زانتان + باکتری Talcum powder and xanthan gum + bacteria	0.6c	2c
شاهد Control	10a	11a

* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

* Mean in each column with the same letter is not significantly different at P<0.01.

بنابراین، به نظر می‌رسد که ضدعفونی بذر گندم قبل از پرایمینگ، تأثیر به‌سزایی بر افزایش کارایی تکنیک بیوپرایمینگ بذر با جدایه UTB96 داشت، زیرا که در بذرهای گندم ضدعفونی نشده، باکتری نتوانست از تمامی بذرها محافظت کند. بنابراین می‌توان گفت که ضدعفونی سطحی بذرها، می تواند موجب افزایش کارایی بیوپرایمینگ شود.

۵- تأثیر محلول های بیوپرایمینگ در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه و شاخص‌های رشدی گندم در حضور قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه در گلخانه

تأثیر محلول‌های پرایمینگ در کنترل بیماری و شاخص‌های رشدی گندم در حضور قارچ بیمارگر و در شرایط گلخانه در سطح احتمال یک در صد معنی‌دار بود (جدول ۸). در گلخانه، بیوپرایمینگ بذر گندم با محلوهای مختلف، موجب کاهش ۱۴ تا ۷۷ درصدی بیماری قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در شرایط آزمایشگاه شد (جدول ۹). بیشترین میزان کنترل بیماری در تیمارهای بیواسموپرایمینگ (۸۲ درصد)، پودر تالک و صمغ زانتان+ باکتری (۷۷ درصد)، و کمترین در هالوپرایمینگ (۱۴ درصد)، و پودر تالک و صمغ زانتان (۴۱ درصد)، مشاهده شد (جدول ۹). به‌دلیل کنترل بالای بیماری در محلول بیواسموپرایمینگ و حضور عناصر سولفات روی ($ZnSo_4$)، سولفات منیزیم ($MgSo_4$) در محلول بیوپرایمینگ، بیشترین تعداد بذر جوانه‌زده (۷/۰ عدد)، طول و وزن اندام‌های ساقه (به‌ترتیب ۴۲/۶ سانتی‌متر و ۱/۰ گرم)، ریشه (به‌ترتیب ۴۲/۶ سانتی‌متر و ۰/۳۹ گرم)، و درصد بیماری (۱۲/۰ درصد)، در این تیمار مشاهده شد. همچنین پس از تیمار

بیواسموپرایمینگ، محلول‌های اسموپرایمینگ و هالوپرایمینگ در بهبود شاخص‌های رشدی گندم نقش بسزایی نسبت به شاهد و سایر تیمارها داشتند. لازم به ذکر است که در تیمار بیواسپوپرایمینگ، پس از خروج ریشه‌ها از خاک و ضدعفونی سطحی آن‌ها، ریشه‌ها در محیط کشت LBA حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شدند و پس از ۴۸ ساعت کلونی باکتری روی ریشه گیاه مشاهده شد، که این امر می‌تواند افزایش حجم، طول و وزن خشک‌ریشه گندم را حتی در حضور بیمارگر، در مقایسه با گیاه شاهد توجیه کند. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر مثبت عناصر روی و منیزیم برافزایش زنده مانی باکتری باشد، چرا که پس از گذشت ۴۰ روز از کاشت بذر ها، در هیچ یک از تیمار های پرایمینگ جز تیمار بیواسموپرایمینگ کلونی باکتری روی ریشه در محیط حاوی آنتی بیوتیک مشاهده نشد. منیزیم در سودوموناس‌های فلوئورسنت نقشی کلیدی در تشکیل بیوفیلم توسط باکتری دارد(Song and Left, 2006) موجب افزایش تشکیل بیوفیلم در باکتری سودوموناس شد، بنابراین این احتمال وجود دارد که عنصر منیزیم می‌تواند سبب تحریک رشد باکتری و همچنین افزایش زنده‌مانی و بقای باکتری گردد از طرفی یکی از روش های نگهداری باکتری، نگهداری در محلول سولفات منیزیم یک‌دهم مولار است (Weller, 1983).

در تحقیقات مختلف، بر تأثیر مثبت عناصر روی و منیزیم در بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاه، سنتز کلروفیل و پروتئین تأکید شده است (Pandey *et al*., 2006; Harris *et al*, 2007, Pandey *et al*., 2006). در ارتباط با عنا صر روی و منیزیم نیز می‌توان چنین اظهار داشت که حضور این عناصر می‌تواند از یک سو موجب افزایش مقاومت گیاه در برابر بیماری گردد و از سوی دیگر با تحریک رشد و افزایش ماندگاری باکتری منجر به کاهش بیماری گردد (Rehman *et al*., 2012, Rengel, 2015, Welch, 1999). در آزمایش گلخانه‌ای و آزمایشگاهی نیز، محلول پودر تالک و صمغ اگر چه در گیاهان جوانه زده باعث کاهش بیماری قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه شد، ولی درصد جوانه‌زنی بذرهای گندم در این تیمار کاهش یافت، که ترکیب پودر تالک + صمغ زانتان با باکتری، باعث بهبود صفات مذکور شد.

جدول ۸- تجزیه واریانس تأثیر محلول‌های پرایمینگ در بیوکنترل بیماری و صفات گندم در حضور قارچ بیمارگر در شرایط گلخانه

Table 8- Analysis of variance for the effect of priming solutions on bio control of disease and traits of wheat in presence of fungus pathogen in greenhouse condition

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Meaning of squares						
		تعداد بذور جوانه زده Number germinated of seeds	بیماری Disease	کنترل بیماری Disease control	طول ریشه Root length	طول ساقه Stem length	وزن ریشه Root weight	وزن ساقه Stem weight
بلوک Block	2	0.48ns	106.03 ns	123.73 ns	0.77 ns	777.36 ns	0..00 ns	0.004 ns
تیمار Treatment	8	14.75**	1596.44**	3195.54**	23.50**	231.41**	0.035**	0.311**
خطا Error	16	0.68	38.82	29.46	1.44	16.73	0.004	0.029
ضریب تغییرات CV	-	20.02	2.49	9.56	9.32	12.96	10.01	7.87

ns و ** به‌ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و وجود تفاوت معنی‌دار در سطح آماری یک درصد می‌باشد.

ns and **: Non- Significant and significant differences at 1% level of probability, respectively.

جدول ۹- مقایسه میانگین اثر محلول‌های پرایمینگ در بیوکنترل بیماری و صفات گندم در حضور قارچ بیمارگر در گلخانه

Table 9- Mean comparison of the effect of priming solutions on bio control of disease and traits of wheat in presence of fungus pathogen in greenhouse condition

تیمار Treatment	تعداد بذور جوانه‌زده Number germinated of seeds	طول ریشه (cm) Root length (cm)	طول ساقه (cm) Stem length (cm)	وزن ریشه (g) Root weight (g)	وزن ساقه (g) Stem weight (g)	بیماری (%) Disease (%)	کنترل بیماری (%) Disease control (%)
باکتری Bacteria	4.33cd	33b	15.66a	0.84ab	0.17cd	24cd	65.47b
هالوپرایمینگ Halopriming	4.33cd	23c	10c	0.19de	0.06 de	60.66a	14.22 c
بیوهالوپرایمینگ Bihalopriming	5bc	37.66ab	15.33a	0.86ab	0.23 bc	21.33de	69.77b
اسموپرایمینگ Osmopriming	6.33ab	36.33ab	13b	0.65bc	0.22 bc	27.66c	60.62b
بیواسموپرایمینگ Bioosmopriming	7a	42.66a	15.66a	1.06a	0.39 a	12e	82.86a
پودر تالک و صمغ زانتان Talcum powder and xanthan gum	1e	20c	12c	0.43cd	0.13 de	41.33b	70.75e
پودر تالک و صمغ زانتان + باکتری Talcum powder and xanthan gum + bacteria	0.66 e	31b	13b	0.85ab	0.26 b	16e	77.33ab
اثبات بیماری‌زایی Proof of pathogenicity	3.33d	19.666c	7.33d	0.16e	0.04e	70.66a	-
شاهد Control	5.33bc	40.33a	14a	0.54bc	0.19bc	-	-

* میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون فاقد تفاوت معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

* Mean in each column with the same letter is not significantly different at P<0.01.

بیو هالوپرایمینگ
Bio-Hallopriming

بیو اسموپرایمینگ
Bio osmopriming

شکل ۷- تأثیر تیمارهای بیو هالوپرایمینگ و بیواسموپرایمینگ بر رشد ریشه و بیوکنترل قارچ عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در شرایط گلخانه

Figure 7- The effect of bio hallopriming and bio osmopriming on root growth and bio control of fungus causal agent of root and crown rot of wheat in greenhouse condition

نتیجه‌گیری نهایی

در شرایط آزمایشگاه، ضدعفونی بذر گندم قبل از پرایمینگ، تأثیر به‌سزایی بر افزایش کارایی تکنیک بیوپرایمینگ با جدایه باکتری *B. Velezensis* UTB96 داشت، زیرا که در بذرهای گندم ضدعفونی نشده، باکتری نتوانست از تمامی بذرها محافظت کند. همچنین نوع پرایمینگ و مواد همراهی که در محلول های پرایمینگ استفاده می‌شوند، تأثیر بسزایی بر توانایی کنترل بیولوژیک قارچ بیمارگر پوسیدگی ریشه و طوقه (*F. pseudograminearum*) و بهبود شاخص های رشدی گندم (درصد جوانه‌زنی، طول و وزن خشک اندام‌های ریشه و ساقه) در شرایط گلخانه دا شتند. به‌ترتیب محلول بیواسموپرایمینگ، اسموپرایمینگ و بیوهالوپرایمینگ بهترین کارایی را در صفات مذکور نشان دادند، لذا استفاده از آن‌ها در کنترل بیولوژیک و افزایش عملکرد گندم می‌تواند حائز اهمیت باشد.

در آزمایش گلخانه‌ای و آزمایشگاهی نیز، محلول پودر تالک و صمغ اگر چه در گیاهان جوانه زده باعث کاهش بیماری قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه شد، ولی درصد جوانه‌زنی بذرهای گندم در این تیمار کاهش یافت، اما ترکیب پودر تالک + صمغ زانتان با باکتری، باعث بهبود صفات مذکور شد. بنابراین، با توجه به توانایی بالای جدایه باکتری مذکور در بیوکنترل قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم و در تولید متابولیت های محرک، می‌توان از آن در سطوح مختلف استفاده کرد. حضور سلول زنده باکتری برای فرآیندهای بیوکنترلی و محرک رشدی الزامی است، لذا شیوه کاربرد این باکتری بسیار مهم بوده و بایستی در سطح مزرعه به نحوی باشد که باعث افزایش توانایی باکتری در تولید متابولیت‌ها محرک رشد و پایداری باکتری در محیط شود.

منابع

Reference

Abuamsha, R., M. Salman, and R. Ehlers. 2011. Differential resistance of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* ssp. oleifera) to *Verticellium longisporum* infection is affected by rhizosphere colonisation with antagonistic bacteria, *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas chlororaphis*. Biocontrol. 56(1): 101-112.

Ahmadzadeh, M. 2014. Biological control of plant diseases: plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, Tehran Iran. (In Persian)

Alahmad, S., S. Simpfendorfer, A.R. Bentley, and L.T. Hickery. 2018. Crown rot of wheat: *Fusarium pseudograminearum* taxonomy, papulation biology and disease management. Aust.J.Plant Path. 47: 285-299.

Alexander, D.B., and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagent evaluates siderophore production by *rhizosphere bacteria*. Biol. Fertil. Soils. 12: 39-45.

Bajaj, B.K., and P. Sharma. 2011. An alkali - thermo tolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. New Biotechnol. 28(6): 725-732.

Basra, S.M.A., M. Ashraf, N. Iqbal, A. Khaliq, and R. Ahmad. 2004. Physiological and biochemical aspects of pre sowing heat stress on cottonseed. Seed Sci Technol, 32: 765-774.

Beyranvand, H., A. Farnia, S.H. Nakhjavan, and M. Shaban. 2013. Response of yield and yield components of maize (*Zea mays* L.) to different bio fertilizers. Int. J. Adv. Biol Biomed. Res. 1(9): 1068-1077.

Cakmak, I. 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic bio fortification. Plant Soils. 302: 1-17.

Chunshan, Q., Z. Linghua, W. Yunji, and O. Yoshiyuki. 2001. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast candida krusei. J. Biosci. Bioeng. 92: 154-160.

Cook, R.J., 1980. Fusarium foot rot of wheat and its control in the Pacific Northwest. Plant Dis. 69:1061-1066

FAO. 2018. FAOSTAT Database on Agriculuyre, Food and Agiculture Organization of the United Nation

Fiddaman, P.J., and K. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus* subtilis. J. Appl. Bacter. 76: 395-405.

Gothwal, R.K., V.K. Nigam, M.K. Mohan, D. Sasmal, and P. Ghosh. 2008. Screening of nitrogen fixers from rhizospheric bacterial isolates associated with important desert plants. Appl. Ecol. Environ. Res. 6(2): 101-109.

Grosu, A.I., O. Sucuia, A. Dobre, C. Voaide, and C.P. Cornea. 2015. Evaluation of some *Bacillus* Spp. Strains for the biocontrol of *Fusarium graminearum* and *F. Culmorum* in wheat. Agric. Sci. Proc. 6: 559-566.

Harris, D., D. Rashid, G. Miraj, M. Arif, and H. Shah. 2007. On-farm seed priming with zinc sulphate solution – A cost-effective way to increase the maize yields of resource-poor farmers. Field Crops Res. 102: 119–127.

Kaur, N., K. Sunish, D. Sehgal, Byamukama, E., and Shaukat, A. 2020. Impact of *Fusarium graminearum* on seed germination and seedling blight in hard red spring wheat. J. Plant Path. Microbiol. 11(5): 495-503.

Kloepper, J.W., and M.N. Schroth. 1981. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. Phytopathol. 71(6):590-592.

Leslie, J.F., and B.A. Summerell. 2006. Fusarium laboratory workshops—a recent history. Mycotoxins. Res. 22(2):73-74.

Leung, H., and M. Taga. 1988. Magnaporthe Grise a (Pyricularia Species), the Blast Fungus. Vol 6. Pp 175-188. *In* Advances in plant pathology. J.H. Andrews, and I.C. Tommerup (Eds). Academic Press, London.

Miladiarsi, N.R.M., and R. Widyastuti. 2017. Selection, Characterization and Application of *Rhizobacteria* and its Effect on Chili (*Capsicum annuum* L.) Plant Growth. Res. J. Microbiol. 12: 161-169.

Mirshekari, B. 2012. Seed priming with iron and boron enhances germination and yield of dill (*Anethum graveolens*). Turk. J. Agric. For. 36(1): 27-33.

Narayanasmamy, P. 2013. Biological management of diseases of crops. Springer Science, Dordrecht.

Nelson, P.E., T. Toussoun, and R.J. Cook. 1981. Fusarium: diseases, biology and taxonomy. Pennsylvania State University Press, U.S.

O'Callagham, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. App. Microbiol. Biotechnol. 100: 5729–5746.

Obanor, F., S. Neate, S. Simpfendorfer, R. Sabburg, P. Wilson, and S. Chakraborty. 2013. *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* caused the 2010 head blight epidemics in Aust. Plant Pathol. 62(1): 79-91.

Pandey, N., G.C. Pathak, and C.P. Sharma. 2006. Zinc is critically required for pollen function and fertilization in lentil. J. Trace Elements Med. Biol. 20(2): 89-96.

Patel, M.V., and R.K. Patel. 2014. Indole-3-acetic acid (IAA) production by endophytic bacteria isolated from saline dessert, the little Runn of Kutch. CIB. Tech J. Microbiol, 3(2):17-28.

Patten, C.L., and B.R. Glick. 2002. Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in the development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3795–3801

Rehman, H., T. Aziz, M. Farooq, A. Wakeel, and Z. Rengel. 2012. Zinc nutrition in rice production systems: a review. Plant Soil. 361: 203-226.

Rengel, Z., J. Bose, Q. Chen, and B.N. Tripathi. 2015. Magnesium alleviates plant toxicity of aluminum and heavy metals. Crop Sci. 66:1298–1307.

Roberts, W.K., and C.P. Selitrennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. J. Gen. Microbiol. 134: 169–176.

Safaie, D., H. Younesi, and M. Sheikheslami. 2011. *Fusarium* species that cause root and crown rot in Kermanshah province. Plant Dis. 48(2): 265-268.

Safdarian, M., H. Askari, V. Shariati, and G. Nematzadeh. 2019. Transcriptional responses of wheat roots inoculated with Arthrobacter nitroguajacolicus to salt stress. Sci. Rep. 9(1):1-12.

Sivasubramaniam, K., R. Geetha, K. Sujatha, R. Sripunitha, and R. Selvarani. 2011. Seed Priming: Triumphs and Tribulations. Madras Agric. J. 98(7-9): 197-209.

Smiley, R.W., H. Yan. 2009. Variability of *Fusarium* crown rot tolerances among cultivars and lines of spring and winter wheat. Plant Dis. 93: 945-961.

Sunhamoy, M., K.D.A. Srivastva, A. Rashmi, D.V. Sigh, S. Mandal, and L.G. Tyryshkin. 2003. Resistance to Disease in wheat collection samples as somaclonal varians. Czech J. Genetics. and Plant Breed. 39: 21-23.

Teniola, O.D., I. M. Addo, I.M. Brost, P.Farber, K.D. Jany, J.F. Alberts, W.H. Van Zyl, P.S. Steyn, and W.H. Holzapfel. 2005. Degradation of aflatoxin B (1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM 44556(T). Int. J. Food Microbiol. 105: 111-117.

Thammasittirong, S.N.R. 2016. In vitro Inhibitory effect of Bacillus subtilis BAS114 against Curvularia lunata. Adv. Environ. Biol. 10(1): 176-183.

Wagacha, J.M., and J.W. Muthomi. 2007. *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. Crop Prot. 26: 877-885.

Welch, R.M. 1999. Importance of seed mineral nutrient reserves in crop growth and development. In: Mineral nutrition of crops: Fundamental mechanisms and implications. Food Products Press, New York.

Weller, D.M., and R.J. Cook. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathol. 73: 463-469.