Crop Biotechnology Open Access

Winter (2024) 14 (2): 51-68.
DOI: 10.30473/cb.2024.70671.1960

ORIGINAL ARTICLE

The effect of *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* and *Bacillus subtilis* bacteria on biological control of *Pythium ultimum*

Mohammad Reza Shirafkan[1], Samira Shahbazi[2](ORCID: 0000000282913887), Mohammad Ali Ebrahimi[3], Hamid Sobhanian[4]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2. Department of Plant Pathology, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
3. Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran. & Systems Biology Research Department, ABRII, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Correspondence
Samira Shahbazi
Email: sshahbazi@aeoi.org.ir

Received: 2, Mar. 2024
Accepted: 19, Jun. 2024

How to cite:
Shirafkan, M.R., Shahbazi, S., Ebrahimi, M.A., & Sobhanian, H. (2024). The effect of *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* and *Bacillus subtilis* bacteria on biological control of *Pythium ultimum*. *Crop Biotechnology, 14*(2), 51-68.
(DOI: 10.30473/cb.2024.70671.1960)

ABSTRACT

Growth-promoting bacteria or plant probiotics are an effective part of biocompatible and sustainable agriculture. In this study, changes in some vegetatative i and plant physiological indicators and the biocontrol of *P. ultimum* (damping-off disease agent) in Lettuce plants treated with two types of growth stimulating bacteria (A lipoferum and *A. brasilense*) and a biocontrol species (B. subtilis and two gamma irradiated mutant isolates 419 and 600) were investigated in greenhouse conditions in the form of a completely randomized design (CRD) with four replications. The results showed bacterial treatments inthe all growth and physiological indicators, were significantly different from the control at the 5% level. In the *P. ultimum* inoculated treatments, the damping-off and diseases severity(DI) were significantly reduced as a result of the treatment with *B. subtilis* mutants obtained from gamma ray irradiation, but *Azospirillium* strains were not effective in biocontrol. The comparison of physiological inddexs in infected plants showed that peroxidase, polyphenol oxidase enzymes and proline increased and malonaldehyde decreased as a result of treatment with *B. subtilis* mutants. From the total results of this research, it can be concluded that the induction of mutation with gamma ray due to the improvement of antagonistic potential of *B. subtilis* ,leaded to increase the biological control activities of *B. subtilis* mutants without adverse effects on the growth and physiology of lettuce, so that the efficiency of these mutants in the biocontrol of pseudo-fungus *P. ultimum* and induction of physiological indicators of resistance in the lettuce plant is higher than that of Azosprilium efficiency.

KEYWORDS

Pythium ultimum, Azospirillum lipoferum, Azospirillum brasilense, Bacillus subtilis, Biological control.

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره دوم، پیاپی ۴۸، زمستان ۱۴۰۳ (۶۸-۵۱)
DOI: 10.30473/cb.2024.70671.1960

«مقاله پژوهشی»

تأثیر باکتری‌های *Azospirillum lipoferum*، *A. brasilense* و *Bacillus subtilis* بر کنترل زیستی شبه‌قارچ *Pythium ultimum*

محمدرضا شیرافکن[۱]، سمیرا شهبازی[۲](ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۲۸۲۹۱۳۸۸۷)**، محمدعلی ابراهیمی[۳]، حمید سبحانیان[۱]**

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
۲. گروه گیاهپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران.
۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
و بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران/

نویسنده مسئول:
سمیرا شهبازی
رایانامه: sshahbazi@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۳۰

استناد به این مقاله:
شیرافکن، محمدرضا؛ شهبازی، سمیرا؛ ابراهیمی، محمد علی و سبحانیان، حمید (۱۴۰۳). تأثیر باکتری‌های *Azospirillum lipoferum*، *A. brasilense* و *Bacillus subtilis* بر کنترل زیستی شبه‌قارچ *Pythium ultimum*. *فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی*، ۱۴(۲)، ۶۸-۵۱.
(DOI: 10.30473/cb.2024.70671.1960)

چکیده

باکتری‌های محرک رشد یا پروبیوتیک گیاه، بخش مؤثری از کشاورزی زیست سازگار و پایدارند. در این تحقیق، تغییرات برخی شاخص‌های رویشی و فیزیولوژیکی گیاه کاهو و کنترل زیستی عامل بیماری مرگ گیاهچه (*P. ultimum*)، تحت تیمار با دو سویه باکتری محرک رشد (*A. lipoferum* و *A. brasilense*) و سویه *B. ubtilis* و دو موتانت شماره‌های چهارصدونوزده و شش‌صد *B. subtilis* حاصل از پرتوتابی با پرتو گاما به عنوان سویه های بیوکنترلی، در شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نتایج تحقیق نشان داد کلیه شاخص‌های رویشی و فیزیولوژیک کاهو در اثر تیمار با باکتری‌ها *A. lipoferum, A.brasilense, Bacillus subtilis*) در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند. در تیمارهای آلوده با *P. ultimum*، شاخص‌های درصد بوته میری و شدت بروز بیماری در اثر تیمار با موتانت‌های *B. subtilis* کاهش معنی‌داری یافت؛ اما سویه‌های *Azospirillum* ازنظر بیوکنترلی مؤثر نبودند. مقایسه شاخص‌های فیزیولوژیک در گیاهان آلوده به بیمارگر نشان داد آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پرولین در اثر تیمار با موتانت‌های *B. subtilis* افزایش و مالون‌دی‌آلدئید کاهش داشته است. درمجموع، القاء جهش با پرتوی گاما در باکتری *B. subtilis* به‌دلیل بهبود فعالیت آنتاگونیستی، توانسته بدون تأثیر نامطلوب بر رشد و فیزیولوژی گیاه کاهو، به بهبود توانایی بیوکنترل موتانت‌های *B. subtilis* کمک کند؛ به شرطی که کارایی این موتانت‌ها در بیوکنترل شبه‌قارچ *P. ultimum* و القاء شاخص‌های فیزیولوژیک مرتبط با مقاومت در گیاه کاهو بالاتراز *Azospirillum* باشد.

واژه‌های کلیدی

Pythium ultimum، *Azospirillum lipoferum*، *Azospirillum brasilense*، *Bacillus subtilis*، کنترل زیستی.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۳ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.
این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.
(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

استفاده از مواد شیمیایی برای کنترل بیماری‌های خاکبرد به‌دلیل پیچیدگی اکوسیستم خاک؛ احتمال جذب این مواد در کلوئیدهای خاک؛ تأثیر متابولیت سایر میکروارگانیسم‌ها و تجزیه و غیرفعال‌شدن ترکیبات شیمیایی کارایی پایین تری در مقایسه با کاربرد سموم شیمیایی علیه بیماری‌های هوازاد دارد. بنابراین تولیدکنندگان محصولات کشاورزی از دزهای بالاتر سموم علیه بیماری‌های خاکبرد استفاده می‌کنند تا کارایی مورد نظر تأمین شود و همین امر به بروز آلودگی منابع آب و خاک می‌انجامد. برای جلوگیری از آلودگی‌های زیست محیطی، در برنامه‌های مدیریت تلفیقی بیماری‌های خاکبرد می‌توان تیمار خاک با ترکیباتی که ماده مؤثره زیستی (مانند باکتری *B. subtilis*) دارند را جایگزین ترکیبات شیمیایی کرد (Rostaminia*et al.*, 2021). افزایش کارایی جزءزیستی از راهکارهای مهم ارائه ترکیبات زیستیِ جایگزین برای کنترل بیماری‌ها به‌منظورکاهش مصرف سموم شیمیایی است. یکی از راهکارهای افزایش کارایی جزءزیستی، ارتقای قدرت آنتاگونیستی در جزءزیستی است (Afsharmanesh*et al.*, 2014). باکتری‌های محرک رشد گیاهی[1] (*PGPRs*)، گروهی از میکروب‌های مرتبط با گیاه هستند که تأثیری مفید در بهبود تحمّل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. این باکتری‌ها به جذب مواد مغذی توسط گیاهان کمک کرده و ارتقاء سلامت گیاه از تاثیرات آنهاست. بیشتر جنس‌های *PGPR* شامل سودوموناس، آئروموناس، کلبسیلا، آزوآرکوس، انتروباکتر، آزوسپیریلوم، کلستریدیوم، آزوتوباکتر، آرتوباکتر، ریزوبیوم، گلوکونواستوباکتر و باسیلوس‌ها هستند(Rezalu*et al.*, 2022). کاهو با نام علمی (*Lactuca sativa L*) جزء خانواده آستراسه و از سبزیجات برگی است. منبع غذایی کم‌کالری و مغذی متشکل از مواد معدنی و ویتامین دارد و به‌دلیل شکل مصرف به‌صورت تازه، تولید آن بدون استفاده از ترکیبات شیمیایی صورت می‌گیرد. تأثیر باکتری‌های محرک رشد مانند *Azospirillum* و*Bacillus* به‌منظور افزایش جوانه‌زنی بذر و تحریک رشد کاهو تأیید شده است (Rezalu*et al.*, 2022). از آن‌جایی‌که کاشت کاهو معمولاً به‌صورت نشاءکاری است، درصورت آلودگی به شبه‌قارچ *P. ultimum* در مرحله نشاءکاری و بروز مرگ گیاهچه (بوته‌میری) خسارت بالاتری به کاهو وارد می‌شود. این تحقیق کارایی دو سویه باکتری *A. lipoferum* و *A. brasilense* (که به عنوان محرک رشد شناخته می شوند) و دو موتانت باکتری *B. subtilis* (سویه‌های شماره های چهارصد و نوزده وششصد حاصل از القای جهش با پرتوتابی در ژنوم سویه والد که دارای توانایی آنتاگونیستی هستند) را با دو هدف مورد مطالعه قرار داده است: الف) بررسی کارایی این سویه‌های باکتریایی درکاهش بروز آلودگی گیاهچه کاهو به شبه‌قارچ *P. ultimum*؛ ب) بررسی امکان استفاده از روش القاء جهش در ژنوم باکتری *Bacillus* با پرتو گاما به منظور افزایش قدرت آنتاگونیستی آن علیه *P. ultimum* و بررسی اثرات جانبی تیمار با باکتری موتانت بر برخی شاخص‌های رشد و فیزیولوژی کاهو.

پیشینهٔ پژوهش

شبه‌قارچ *P. ultimum* از مخرب‌ترین بیمارگرهای خاکزاد گیاهی و محدودکننده تولید کاهو در سراسر دنیاست که به میکروارگانیسم‌های شبه‌قارچی (اوومیست) تعلّق دارد. این شبه‌قارچ به‌صورت پوده‌زی در خاک فعال می‌ماند و قادر است از راه خاک، نشاء آلوده، بقایای گیاهی و آبِ آبیاری انتقال یابد. این بیمارگرِ شبه‌قارچی، با تولید کیسه اسپوری (اسپورانژیوم) که هر یک حاوی صدها زئوسپور است، منتشر می‌شود. زئوسپورها پس‌از رسیدن به سطح ریشه و سیستی‌شدن، جوانه زده و به بافت ریشه با تولید میسیلیوم‌های آلوده‌گر، رخنه می‌کنند. نشانه‌های بروز آلودگی با این بیمارگر در کاهو براساس زمان بروز آلودگی ممکن است به‌صورت مرگ گیاهچه (آلوده‌شدن در مرحله نشاء) یا بروز پوسیدگی طوقه و ریشه (آلوده‌شدن در مراحل استقرار گیاه در گلخانه و مزرعه) بروز نماید (Amaradasa*et al.*, 2024). مرگ گیاهچه می‌تواند پیش‌از خروج گیاهچه از خاک یا پس‌از

1. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

آن ظاهر شود و خسارت شدیدی وارد آورد. مؤثرترین راهکار برای مدیریت آلودگی با شبه‌قارچ، کنترل اینوکولوم بیمارگر در خاک است. این نوع کنترل را می توان با استفاده ضدعفونی خاک با سموم شیمیایی یا آفتاب‌دهی (به‌شرط غنی‌کردن بستر کاشت یا خاک گلخانه به‌ویژه پس‌از ضدعفونی) یا با استفاده ازعوامل کنترل‌زیستی انجام داد. *B. subtilis* به‌دلیل داشتن ویژگی‌های خاص، ازقبیل تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی ضد قارچی به‌ویژه ایتورین و آنزیم‌های هیدرولیتیک و توانایی تولید اسپور پایدار، عامل کنترل‌زیستی موفق علیه بیماری‌های گیاهی است (Constantinescu*et al.*, 2010). مطالعات نشان داده است باکتری‌های محرک رشد مانند *Azospirillum*، اگرچه فعالیت آنتاگونیستی بالایی ندارند، با افزایش حلالیت و قابلیت جذب عناصر ماکرو و میکروالمنت توسط گیاه، می‌توانند موجب بهبود بنیه و رشد گیاه و سیستم ریشه‌ای شده و گیاه را در برابر عوامل بیماری‌زا مقاوم کنند (Yasari and Patwardhan, 2007).

باتوجه به اهمیت شناسایی عوامل زیستی مؤثر در تدوین برنامه‌های کنترل زیستی بیماریها و کاهش مصرف سموم شیمیایی در محصولات تازهخوری مانند کاهو، مطالعه حاضر با هدف مقایسه کارایی سویههای محرک رشد *Azospirillum* و سویه آنتاگونیست *B. subtilis* بر میزان کاهش بروز علایم ناشی از بیمارگر *P. ultimum*انجام شد. همچنین تأثیر تیمار با این باکتریها بر گیاهچه‌های کاهو از طریق اندازهگیری مؤلفه‌های رویشی و فیزیولوژیکی، تحت تنش زیستی با بیمارگر *P. ultimum* و شرایط عادی (بدون بیمارگر) مقایسه شد. با توجه به مشاهده کارایی بهتر سویه *B. subtilis* در مهار زیستی *P. ultimum*، تأثیر القاء جهش با پرتو گاما در اصلاح ژنتیکی و بهبود کارایی گونه *B. subtilis*، از طریق مقایسه تیمار با سویه والد و موتانت*B. subtilis* علیه *P. ultimum* در کاهو در شرایط گلخانه بررسی شد و مؤلفه‌های رویشی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های کاهو، تحت تنش زیستی با *P. ultimum* و بدون بیمارگر درتیمار با سویههای موتانت و والد *B. subtilis* مقایسه گردید.

روش‌شناسی پژوهش

سویه‌های باکتری *Bacillus subtilis* و موتانت‌های شماره چهارصدونوزده و شش‌صد حاصل از آن که با استفاده از تکنیک القاء جهش تصادفی حاصل از پرتوی گاما تولید شده‌اند (Afsharmanesh*et al.*, 2014) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی (گروه گیاه‌پزشکی- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای -پژوهشگاه علوم و فنون هستهای) دریافت شدند. جدایه پرآزار شبه‌قارچ *P. ultimum* نیز از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی (گروه بیماری‌شناسی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه تربیت مدرس) دریافت شد. بررسی توانایی ممانعت از رشد سویه والد (پرتوندیده) باکتری *B. subtilis* و موتانت‌های آن با استفاده از روش محمدی و همکاران انجام شد و توانایی بیوکنترل هر دو موتانت و سویه والد باکتری به اثبات رسید (Mohamady*et al.*, 2017). نشاءهای سالم واریته پرمصرف کاهوی پیچ بلند آمریکایی از شرکت بهاران (شهرستان قزوین) تهیه و در شرایط گلخانه ای (دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سیلیسیوس و نسبت نور به تاریکی ۱۶:۸ و رطوبت ۸۵٪) کشت شد. خاک گلدان‌های ۴ کیلویی با ترکیب ۵۰٪ خاک مزرعه (شنی- لومی) و ۵۰٪ پیت‌ماس پر شد. pH خاک گلدان حدود ۶/۶ تنظیم و خاک همهٔ گلدان‌ها به‌منظور حذف فاکتورهای ارگانیک در ارزیابی‌ها، نخست با اتوکلاو استریل شده؛ سپس با عوامل باکتریایی و قارچی تلقیح شد.

تیمار با سویههای محرک رشد: دو کودزیستی با فرمولاسیون مایع، هرکدام حاوی گونه‌های *Azospirillum lipoferum* و *A. brasilense* از مؤسسه تحقیقات آب و خاک کشور تهیه و برای ارزیابی گلخانه‌ای استفاده شد. ۱۰ میلی‌لیتراز کودزیستی مایع برای هر یک از باکتری‌ها، در هر گلدان (سه‌بار طی رشد از مرحله سه برگی نشاءها با فواصل سه‌هفته‌ای تا قبل‌از تشکیل ساقهٔ گل بر روی بوته) طبق توصیه درج‌شده بر روی بسته‌بندی استفاده شد.

تیمار با سویههای آنتاگونیست: تیمار هر گلدان (یک‌بار طی رشد در مرحله سه برگی نشاها) با سویه‌های باکتری *B. subtilis* و موتانت‌های آن به میزان ۱۰ میلی لیتر با غلظت 10^4 (سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) انجام شد. شاخص‌های رویشی (ارتفاع ریشه و ساقه، حجم ریشه، وزن تر ریشه و ساقه) پیش‌از تشکیل ساقهٔ گل بر روی بوته اندازه‌گیری شد. وزن تر به کمک ترازو با دقت ۰/۰۰۱ و ارتفاع توسط خط‌کش مدرج و برای تعیین حجم ریشه از روش تغییر حجم آب در استوانه مدرج استفاده شد. نمونه‌ها برای تعیین وزن خشک اندام هوایی و ریشه، مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. قبل‌از کشت محصول هر گلدان برای ارزیابی میزان کنترل بروز بیماری، با چهار تکرار در هر تیمار به‌جز شاهد، میزان ۵ گرم اینوکولوم قارچ بیمارگر (کشت ۱۰ روزه میسلیوم بر روی بذر شاهدانهٔ دوبار اتو کلاو شده) اضافه شد. درصد بروز مرگ گیاهچه با محاسبه درصد گیاهچه‌های زنده به‌صورت درصد محاسبه شد. شاخص شدت بیماری بر حسب درصد از رابطه (۱)، ۳۰ روز پس‌از کشت نشا، براساس مقیاس ۱ تا ۵ از روش اصلاح‌شده فاتوروس و همکاران محاسبه شده است (Fatouros*et al.*, 2019).

۰- گیاهان سالم و بدون هیچ‌گونه علائم آلودگی.

۱- کمتر از ۲۰٪ گیاه آلوده شده و حداقل یک شانکر با ابعاد ۲ میلی‌متر و نکروز داشته باشد.

۲- حدود ۵۰٪ گیاه دارای شانکر تیپیک با ابعاد ۲ میلی متر باشد.

۳- بیش‌از ۶۰-۷۵٪ گیاه دارای شانکر تیپیک با ابعاد ۲ میلی‌متر باشد.

۴- مرگ گیاهچه پس‌از سبز شدن از خاک، طول گیاهچه کمتر از ۵ سانتی‌متر باشد.

۵- مرگ گیاهچه قبل‌از سبز شدن از خاک یا پوسیدگی بذر.

پروتئین محلول به‌منظور سنجش شاخص‌های فیزیولوژیکی، از بافت برگی (هر تیمار ۰/۵ گرم نمونه برگ) استخراج گردید. از روش برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین استفاده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد. همچنین برای محاسبه میزان پروتئین با استفاده از نمودار استاندارد به‌دست‌آمده از پروتئین خالص سرم آلبومین گاوی، در محدوده غلظت ۰ــ۱۰۰۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید (Rezalou*et al.*, 2024). اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (*POD*) براساس میزان اکسیدشدن گایاکول توسط این آنزیم و در طول موج ۴۷۰ نانومتر محاسبه شد (Altunkaya*et al.*, 2011). فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با استفاده از بافر فسفات و سوبسترای پیرو گالول انجام شد (Altunkaya*et al.*, 2011). برای اندازه‌گیری کلروفیل، یک گرم برگ داخل فویل را در نیتروژن مایع انداخته با استون ۸۰٪ عصاره‌گیری شد. عصاره حاصله مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی در بالن‌های حجمی ۲۵ میلی‌لیتری با استون ۸۰٪ به حجم رسانده شد. محلول حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت و میزان کلروفیل *a* (رابطه ۱) و کلروفیل *b* (رابطه ۲) و کارتنوئید (رابطه ۳) با روابط زیر محاسبه شد:

رابطه ۱) Chlorophyll a (U/g FW) = (12.25 Abs 663nm – 2.79 Abs 646nm)

رابطه ۲) Chlorophyll b (U/g FW) = (21.21 Abs 646nm – 5.1 Abs 663nm)

رابطه ۳) Carotenoid = (1000 Abs 470nm–1.8 Chl a–85.02 Chl b)/198

از برگ‌های تازه برداشت‌شدهٔ هر گلدان برای اندازه‌گیری پرولین (۰/۵ گرم نمونه برگی) به‌طور تصادفی نمونه‌برداری شد و با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ ٪هموژن کرده و مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس محلول صاف‌شده با دو میلی‌لیتر محلول نین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک مخلوط و یک‌ساعت در بن‌ماری قرارداده تا کاملاً خنک شود. به هر لوله آزمایش چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه و ۲۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط شد. مایع موجود در لوله آزمایش به دو بخش مجزا تقسیم و میزان جذب بخش رنگی حاوی تولوئن در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست آمد[۴]. اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به‌وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (*TBA*) با

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. مقدار ۰/۵ گرم بافت تر برگ و ریشه در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (*TCA*) ۰/۱٪ همگن شده؛ آنگاه عصاره حاصل به فالکون انتقال یافته و مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گشت. مقدار چهار میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید به یک میلی‌لیتر از محلول رویی اضافه شد. مخلوط فوق مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتیگراد) انکوبه و بلافاصله در حمام یخ، سرد و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گشت. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت و جذب ناویژه در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر شد.

غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب تصحیح ۰/۱۵۵ محاسبه و طبق واحد میکرومول بر گرم، وزن تر برگ ($\mu mol\ g^{-1}\ FW$) محاسبه و ارائه گردید.خوانش‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل ۶۳۱۵ *GENWAY*انجام شد.

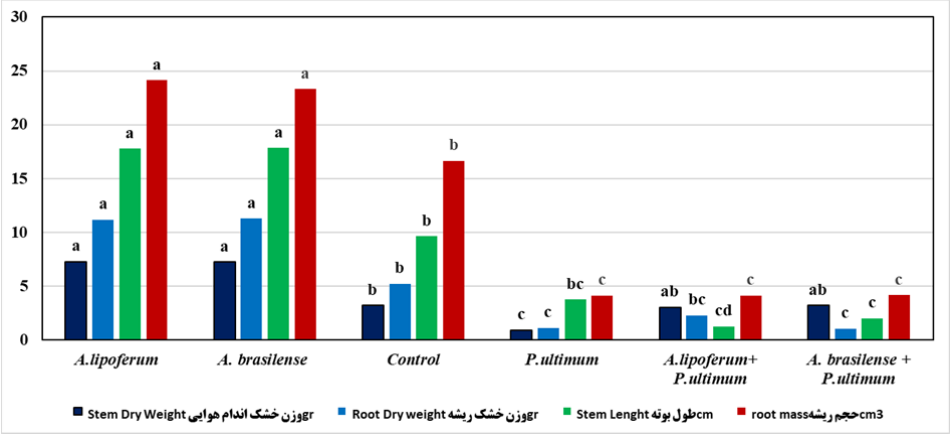
آزمایشات با چهار تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام و داده‌های آن با نرم‌افزار *SPSS Var. 13* تجزیه شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت.

یافته‌های پژوهش

تأثیر تیمارها بر شاخص‌های رویشی

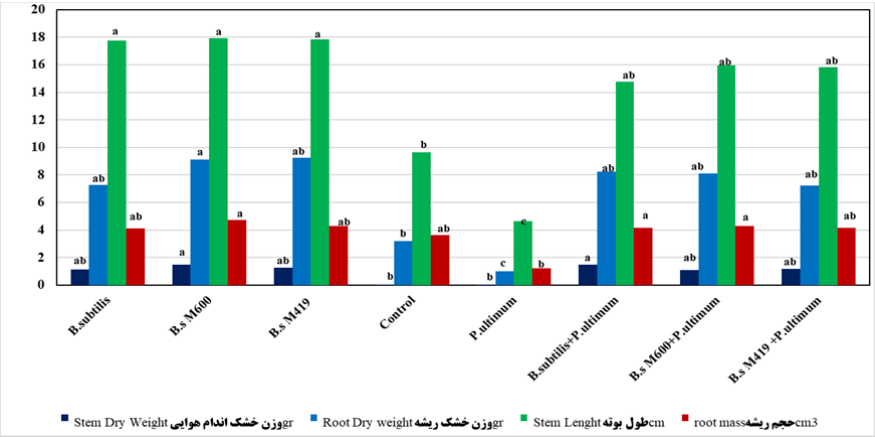
آنالیز واریانس شاخصهای رویشی اندازه‌گیری شده در گیاه کاهوی تحت تیمار با کود زیستی با فرمولاسیون مایع حاوی گونه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* اثر تیمار را در سطح ۵٪ معنی‌دار نشان داد. مقایسه میانگین در تمامی شاخص‌ها نیز نشان داد تیمار با دوگونه مذکور در مقایسه با شاهد به‌صورت معنی‌داری بالاتر بوده است. شکل زیر شاهد این مدعاست.

همان‌طورکه در شکل ۱ مشاهده می‌شود شاخص‌های رویشی (طول بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و حجم ریشه) بین دو نوع باکتری تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما در تمام شاخص‌ها تیمار با *A. lipoferum* تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت و می‌توان به این نتیجه رسید که این سویه باکتری همزیست*A. lipoferum*، کارایی بهتری در افزایش رشد بوته در مقایسه با *A. brasilense* از خود نشان داده است.



شکل ۱. مقایسه ویژگی‌های رویشی گیاه کاهوی تحت تیمار با سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* باشاهد.*A:lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense*، *Control*: گیاه شاهد (بدون تیمار)، *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر پی‌تی‌اوم، *A. lipoferum + P. ultimum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A:lipoferum* و بیمارگر، *A. brasilense + P. ultimum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر. (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 3. Comparison of vegetative characteristics of lettuce plants treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains with the control; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum; A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense;* Control: control plant without pathogen treatment; and *P. ultimum*: plants treated with pathogen; *A. lipoferum+ P. ultimum*: plants treated with *A. lipoferum* and *P. ultimum*; *A. brasilense+ P. ultimum*: plants treated with *A. brasilense* and *P. ultimum*. (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates $p<0.05$).



شکل ۲. مقایسه ویژگی‌های رویشی گیاه کاهوی تلقیح‌شده با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد، *B.sM600* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد، *B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، Control: گیاه شاهد (بدون تیمار) و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر، *B.subtilis+P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با باکتری باسیلوس والد و بیمارگر ، *B. sM600+P.ultimum* گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، *B.sM419+P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 2. Comparison of vegetative characteristics of lettuce plants treated with *P. ultimum,* wild type and mutants of *B. subtilis* with the control; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis;* B. Sm419: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* Control: control plant without treatment; *P. ultimum*: plants treated with pathogen; *B.subtilis+ P.ultimum:* plants treated with wild type *B. subtilis* and *P.ultimum*; B. sM600+: *P.ultimum* plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and *P. ultimum*; BsM419+ *P.ultimum*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and *P. ultimum.* (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates p<0.05).

در شکل بالا، آنالیز واریانس ویژگی‌های رویشی اندازه‌گیری‌شده در گیاه کاهوی تلقیح‌شده با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* در سطح ۵٪ اثر متقابل تیمار با شبه‌قارچ بیمارگر و باکتری‌های آنتاگونیست معنی‌دار را نشان داد. مقایسه میانگین در شاخص حجم ریشه نیز نشان داد تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* در سطح ۵٪ به‌طور معنی‌داری باعث توسعه و رشد ریشه شده و از بروز علایم توقف رشد ناشی از آلودگی به شبه‌قارچ پی‌تی‌اوم در ریشه ممانعت نموده است؛ تاجایی‌که با حجم ریشه گیاهِ شاهدِ سالم، تفاوت معنی‌داری نداشته است. این مسئله درحالی است که در گیاهان تلقیح‌شده با بیمارگر حجم ریشه به‌طور معنی‌داری پایین‌ترین میزان در تمامی تیمارها بوده است (شکل ۲). روند داده‌ها در شاخص وزن خشک ریشه نیز همانند حجم ریشه بود. تیمار با سویه والد و موتانت شماره چهارصدونوزده با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما تیمار با سویه *B. subtilis* موتانت شماره شش‌صد به‌طور معنی‌داری در سطح ۵٪ به‌طور معنی‌داری بالاتر از کنترل بود. میانگین داده‌های وزن خشک اندام هوایی مشابه با شاخص وزن خشک ریشه بودند. در شاخص ارتفاع اندام هوایی بین تیمارها و شاهد سالم تفاوت معنی‌دار نبود و فقط گیاهان بیمار به‌طور معنی‌داری ارتفاع کمتری داشتند. بین تیمار با سویه باکتری والد و موتانت‌های آن در شرایط آلودگی با بیمارگر و بدون بیمارگر، از نظر شاخص‌های رشد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما بالاتربودن میانگین شاخص‌های رشد در تیمار با انواع *B. subtilis* در مقایسه با شاهد، توانایی کنترل‌زیستی *B. subtilis* والد و موتانت‌های آن را

به‌منظور جلوگیری از بروز علایم نشان داد. تلقیح گیاه با بیمارگر، پایین‌ترین عملکرد را درگیاهان بیمار نشان داد، در تیمار با *B. subtilis* موتانت شش‌صد نیز تفاوت معنی‌داری با شاهد یا باکتری *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده و والد آن دیده شد. این مسئله نشان می‌دهد تأثیر این موتانت در بهبود عملکرد گیاه در شرایط بروز بیماری نیز بهتر از سویه والد یا موتانت شماره چهارصدونوزده بوده است.

عملکرد گیاهان تحت تیمار با *A. lipoferum* در شرایط تلقیح با بیمارگر به‌طور معنی‌داری بهتر از گیاهان تحت تیمار با *A. brasilense* بود. به‌طورکلی در تمامی تیمارها، بهبود شاخص عملکرد بوته در مقایسه با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری نشان داد که از تأثیر مثبت همهٔ سویه‌های باکتری استفاده‌شده در تیمارها حکایت داشت. اثر تیمارهای آزمایش دو باکتری *B. subtilis* و *Azospirillum* با احتمال ۵٪ بر ارتفاع گیاه کاهو معنی‌دار بود. شکل ۲ و ۱ شاهد این مدعا هستند. بیشترین ارتفاع گیاه در شرایط عدم تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم در تیمار *B. subtilis* موتانت شماره شش‌صد با گیاهان تحت تیمار با *A. brasilense* و *A. lipoferum* بود؛ اما تیمار با دو باکتری *B. subtilis* والد و *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند. این مسئله، کارایی بهتر *Azospirillum* در القاء رشد در کاهو در مقایسه با *B. subtilis* نشان می‌دهد.

تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم و تیمار با باکتری *B. subtilis* والد نیز به‌طور معنی‌داری کارایی بهتری از تیمار با سایر باکتری‌ها داشت. بوته در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ پی‌تی‌اوم و در شرایط بدون بیمارگر، در تیمار شاهد و *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده، کمترین ارتفاع را داشت. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر وزن خشک کاهو نشان داد وزن خشک در شرایط تلقیح/ عدم تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم در *A. lipoferum*، بیشترین میزان را داشت. کمترین میزان وزن خشک در شرایط عدم تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم در تیمار شاهد به‌دست آمد که تأثیر مثبت کلیه باکتری‌ها در افزایش رشد را نشان می‌دهد. تلقیح با بیمارگر در تیمار با *B. subtilis* والد و هر دو موتانت، کمترین میزان وزن خشک، حاصل آن بود. تلقیح بیمارگر در شرایط عدم تیمار با باکتری نیز باعث تولید کمترین میزان وزن خشک کاهو شد.

تأثیر تیمارها بر شاخص‌های کنترل بیولوژیکی

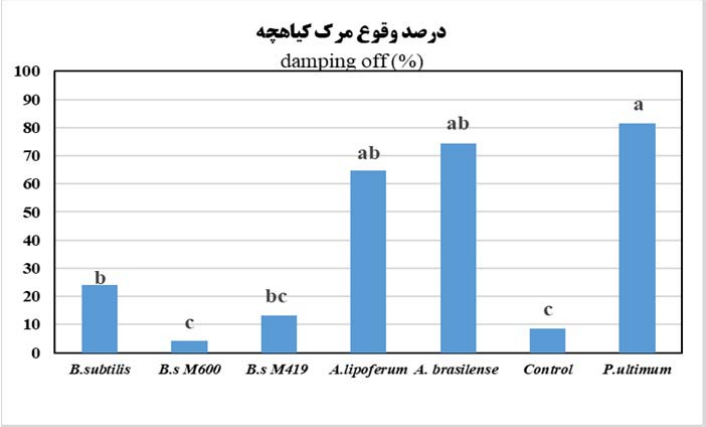
مقایسه درصد مرگ گیاهچه در گیاهان تحت تیمار با *P. ultimum* در شرایط گلخانه‌ای نشان داد اینوکولوم استفاده شده و جدایه بیمارگر کاملاً فعال و پرآزار بوده و بیش‌از ۸۰٪ مرگ گیاهچه در گیاهان آلوده به بیمارگر و بدون تیمار با باکتری آنتاگونیست بوده است. این نتایج از شدت بالای بروز این علامت در کاهو و حساسیت رقم انتخاب‌شده به بیمارگر حکایت داشت. درصد بروز مرگ گیاهچه در گیاهان تحت تیمار با سویه *B. subtilis* موتانت شماره به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از تیمار با سویه والد و موتانت شماره چهارصدونوزده بود و میزان بروز بوته‌میری در شاهد سالم با این دو تیمار تفاوت معنی‌داری نداشت. داده‌های مذکور، موفقیت این عامل آنتاگونیست در بیوکنترل *P. ultimum* را در شرایط گلخانه‌ای نشان می‌دهد(شکل۳). اما تیمار با سویه‌های *Azospirillum* نتوانست از بروز بوته‌میری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد ممانعت کند. به عبارت دیگر، استفاده از کودهای‌زیستی، علی‌رغم تأثیر مثبتی که در افزایش شاخص‌های رشد از خود نشان دادند، کارایی مناسبی در کنترل بیماری در صورت بروز آلودگی در مراحل اولیه رشد گیاهچه ندارند.

شدت بروز بیماری در ارزیابی گلخانه‌ای، آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل باکتری‌های آنتاگونیست و عامل بیماری در سطح ۵٪ در مقایسه با شاهد سالم معنی‌دار بوده و تیمار با آنها بر شدت بروز بیماری تأثیر معنی‌داری داشته است. در گیاهان تلقیح‌شده با شبه‌قارچ *P. ultimum* در شرایط ارزیابی گلخانه‌ای، بالاترین شدت بروز علایم به ثبت رسید که پرآزار بودن جدایه شبه قارچ استفاده شده و حساسیت واریته میزبان را تأیید نمود. میزان شدت علائم در گیاهان تحت تیمار در سطح ۵٪ با سویه موتانت‌های *B. subtilis* موتانت شش‌صد تفاوت معنی‌داری با سویه والد و موتانت چهارصدونوزده نداشت؛ اما کلیه تیمارها با باکتری‌های آنتاگونیست به‌طور معنی‌داری با شاهد سالم تفاوت داشتند.

باتوجه به شکل ۴ دوسویه باکتری‌های همزیست *A. brasilense* و *A. lipoferum* ازنظر شدت بروز بیماری تفاوت معنی‌داری با شاهد آلوده به *P. ultimum* نداشتند؛ ازسوی‌دیگر با میزان شدت بیماری ظهوریافته در گیاهان تحت تیمار با بیمارگر و*B.subtilis* والد نیز تفاوت نداشتند. این نتایج نشان داد کارایی دوسویه باکتری همزیست *A. brasilense* و *A. lipoferum* به‌طور معنی‌داری در شاخص میزان شدت بروز بیماری، پایین‌تر از موتانت‌های *B.subtilis* است. این مسئله ممکن است به‌دلیل عدم فعالیت آنتاگونیستی مؤثر این سویه‌ها علیه بیمارگر و نیز پرآزار بودن سویه بیمارگر مورد استفاده در این ارزیابی گلخانه‌ای باشد.

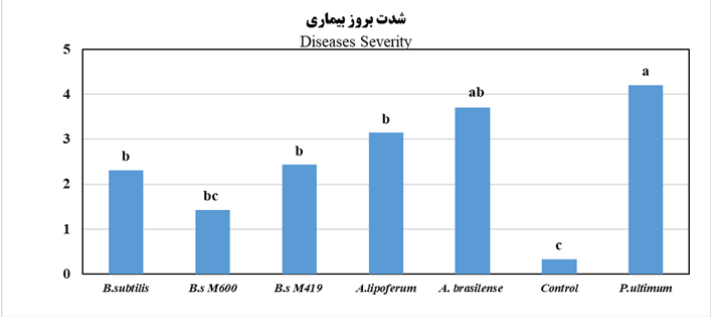
تأثیر تیمارها بر شاخص‌های فیزیولوژیکی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد در سطح احتمال، ۵٪ تفاوت معنی‌داری در میزان تولید پروتئین محلول در برگ کاهو بین تیمارها و شاهد وجود دارد؛ و تیمارهای *B. subtilis* والد پرتوندیده و دو موتانت منتخب، باعث افزایش معنی‌دار تجمع پروتئین محلول در برگ کاهو نسبت به شاهد شده است. ازاین‌رو، بالاترین میزان تجمع پروتئین در گیاهان کاهوی تیمارشده با باکتری *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده اندازه‌گیری شد. در گیاهان تحت تیمار با بیمارگر تفاوت معنی‌داری با شاهد مشاهده نشد؛ اما در گیاهان تحت تیمار با بیمارگر با استفاده از باکتری*B. subtilis* والد و آزوسپریلیوم، توانست به افزایش بیان و تجمع پروتئین در بافت کمک کند. بیشترین میزان پروتئین برگ در گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و کمترین میزان در گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* والد مشاهده شد. بین تیمار با باکتری باسیلوس موتانت در شرایط بیماری و بدون بیماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. این موضوع را می‌توان در شکل ۵ به وضوح دریافت.



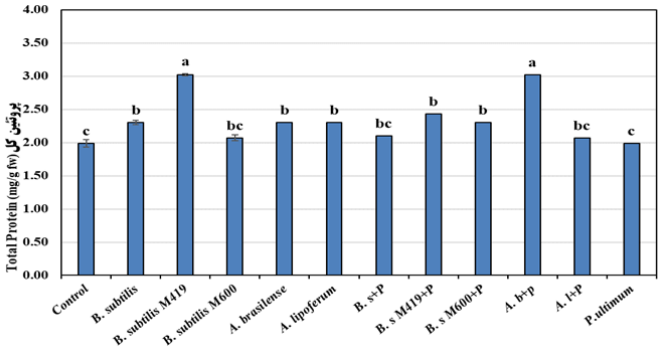
شکل ۳. مقایسه درصد وقوع مرگ گیاهچه ناشی از *P. ultimum*، در گیاه کاهوی تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* با شاهد. *B. subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM600*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر ،*B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت چهارصدونوزده و بیمارگر، *A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر ، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Control: گیاه شاهد (بدون تیمار با بیمارگر) و *P. ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر. (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 3. Comparison of the of seedling damping off percentage caused by *P. ultimum* in lettuce plants treated with *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* with the control. *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; BsM419: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; Control: control plant without pathogen treatment and *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates $p<0.05$).



شکل ۴. مقایسه شدت بروز بیماری ناشی از *P. ultimum* در گیاه کاهوی تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* با شاهد. *B. subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر ، B.sM600 گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر ،B.sM419: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت چهارصدونوزده و بیمارگر ، *A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر ، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری*A. brasilense* و بیمارگر ، Control: گیاه شاهد (بدون تیمار با بیمارگر) و *P. ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر. (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون¬ها، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 4. Comparison of the of diseases severity caused by *P. ultimum* in lettuce plants treated with *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* with the control. *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; BsM419: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; Control: control plant without pathogen treatment and *P. ultimum*: plants treated with pathogen. (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates $p<0.05$).

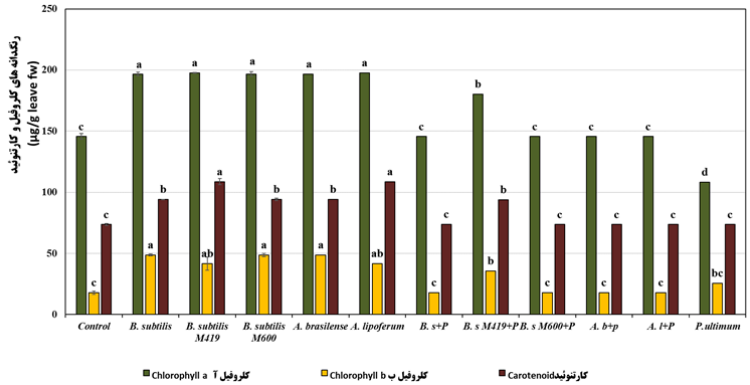


شکل ۵. مقایسه پروتئین کل (میلی‌گرم پروتئین به ازای هر گرم وزن تر گیاه) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های*B.subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد.Control : گیاه شاهد (بدون تیمار)؛ *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد،*B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B.sM600* گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شش‌صد،*A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* ، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* *B.s+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر ، *B. sM600+P* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، Ab+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Al+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 5. Comparison of Total protein (mg/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis; A.brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A.lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P:* plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; BsM419+ *P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen*;* B. sM600+*P* :plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen*; A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates $p<0.05$).

اندازه‌گیری میزان محتوای رنگدانه‌ها (کلروفیل و کارتنوئید) درشرایط عدم تلقیح با *P. ultimum*، میزان کلروفیل *a* در گیاه تیمارشده با *B. subtilis* والد و هر دو موتانت آن و دو سویه باکتری *A. brasilense* و *A. lipoferum* نشان می‌دهد افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد یافته است. کلروفیل b و کارتنوئید هم در همین شرایط نسبت به شاهد، افزایش نشان می‌دهد. میزان کلروفیل a در تیمار گیاه با *B. subtilis* والد و موتانت شش‌صد و دو سویه A. *brasilense* و *A. lipoferum* در شرایط تلقیح با *P. ultimum* تغییری نشان نداد و درواقع، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت؛ فقط در تیمار باموتانت چهارصدونوزده *B. subtilis* و پی‌تی‌اوم، افزایش نشان داد. میزان کلروفیل *b* نیز فقط در همان تیمار افزایش یافت و در سایر موارد تغییری نداشت. میزان کارتنوئید نیز در تیمار با موتانت چهارصدونوزده *B. subtilis* و پی‌تی‌اوم افزایش یافت و تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت.

میزان کارتنوئید بین گیاه شاهد و گیاهان بیمار تحت تیمار با باکتری*Azospirillum* تفاوت معنی‌داری نداشت و تنها *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده به‌طور معنی‌داری میزان کارتنوئید بالاتر از شاهد را نشان داد. در شرایط عدم آلودگی با بیمارگر، رنگدانه در کلیه تیمار گیاه با باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کارتنوئید (میکروگرم رنگدانه به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های*B.subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد.Control : گیاه شاهد (بدون تیمار)؛ *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد،*B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B.sM600* گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شش‌صد،*A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* ، *A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* *B.s+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر ، *B. sM600+P* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، Ab+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Al+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

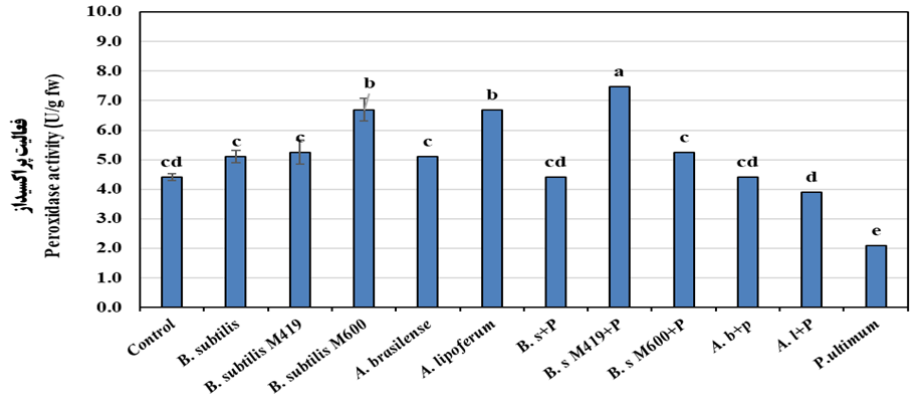
Figure 6. Comparison of Chlorophyll a and b and carotenoids (µg/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis; A.brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A.lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P:* plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; BsM419+ *P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen*;* B. sM600+*P* :plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen*; A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates p<0.05).

نتایج سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد در اثر تیمار کاهو با باکتری‌ها در شرایط عدم تلقیح با *P. ultimum* و *B. subtilis* موتانت شش‌صد و *A. lipoferum*، آنزیم پراکسیداز افزایش بیشتری داشته است و تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند.

در تیمار با *B. subtilis* والد و موتانت چهارصدونوزده و *A. brasilense* میزان فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد کمتر بود؛ اما در شرایط تلقیح با *P. ultimum*، تیمار با موتانت چهارصدونوزده *B. subtilis* آنزیم پراکسیداز بیشترین افزایش فعالیت را داشت که تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان داد. کمترین مقدار آنزیم پراکسیداز در شرایط تلقیح پی‌تی‌اوم و تیمار با *A. lipoferum* مشاهده شد (شکل ۷).

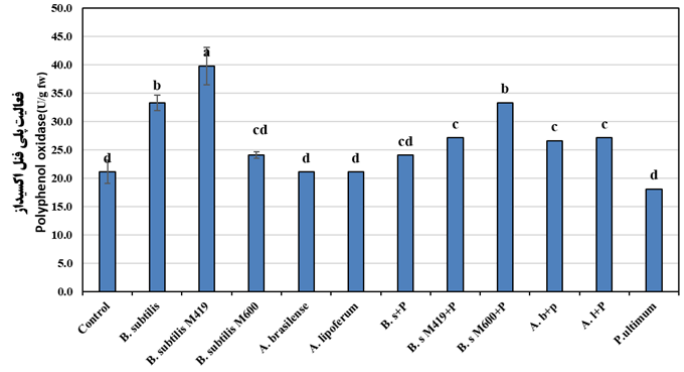
نتایج سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در شکل ۸، نشان داد در شرایط عدم تلقیح با بیمارگر، تیمار کاهو با *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین مقدار افزایش این آنزیم را در برگ گیاه داشته است. کمترین مقدار فعالیت در شاهد و گیاهان تیمارشده با *A. lipoferum* و *A. brasilense* بوده است.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در شرایط تلقیح بیمارگر در گیاهان تحت تیمار با *B. subtilis* موتانت شش‌صد و کمترین فعالیت این آنزیم در گیاهان تحت تیمار با *B. subtilis* والد مشاهده شد.



شکل ۷. مقایسه فعالیت پراکسیداز (*Unit* فعالیت آنزیم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B.subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد. Control : گیاه شاهد (بدون تیمار)؛ *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد، *B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B.sM600* ، *A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد، *A. lipoferum* ، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* *B.s+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر ، *B. sM600+P* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، Ab+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Al+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 7. Comparison of Peoxidase activity (U/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis; A.brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A.lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P:* plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; BsM419+ *P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen*;* B. sM600+*P* :plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen*; A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates p<0.05).

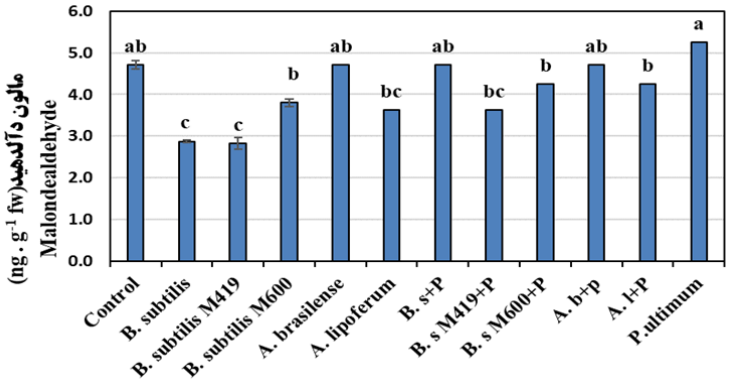


شکل ۸. مقایسه فعالیت پلی فنل اکسیداز (*Unit* فعالیت آنزیم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های*B.subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد.Control : گیاه شاهد (بدون تیمار)؛ *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد،*B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B.sM600* ، گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شش‌صد،*A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* ، *A. brasilense*؛ گیاهان تیمارشده با باکتری *B.s+P A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*؛ گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر ، *B. sM600+P* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، Ab+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Al+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 8. Comparison of Polyphenol oxidase activity (U/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis; A.brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A.lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P:* plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; BsM419+ *P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen*;* B. sM600+*P* :plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen*; A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates p<0.05).

میزان مالون‌دی‌آلدئید با میزان بروز آسیب به غشای سیتو پلاسمی سلول‌ها مرتبط است. بیشترین مقدار آن در گیاهان تلقیح‌شده با *P. ultimum* مشاهده شد؛ که احتمالاً به‌دلیل تأثیر نامطلوب بیمارگر و ایجاد تنش فیزیولوژیک در سلول بوده است و با داده‌های درصد بروز بیماری (شکل ۳) و شدت بیماری (شکل ۴) در گیاهان تحت تیمار با این شبه‌قارچ تطابق داشت. گیاهان تحت تیمار در شرایط عدم تلقیح با *P.ultimum* نتایج سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید با *A. brasilense* تفاوت معنی‌داری با گیاهان بیمار نداشتند؛ اما گیاهان تحت تیمار با *A. lipoferum* تفاوت معنی‌داری داشتند؛ اگرچه این دو سویه باکتریِ همزیست در گیاهان سالم، تفاوت معنی‌داری نشان نداده بودند. این درحالی‌است‌که در گیاهان سالم، تیمار با موتانت چهارصدونوزده باکتری *B.subtilis* به تجمع کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت انجامید و با توانایی آنتاگونیستی این سویه موتانت منطبق بود (شکل ۹).

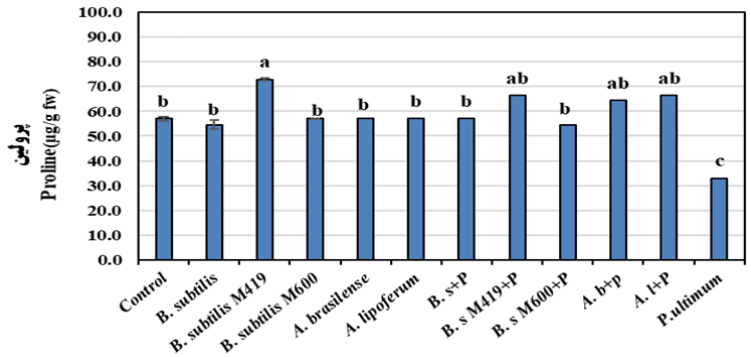
سنجش پرولین در بافت برگی در شکل ۱۰ نشان داد تیمار کاهو در شرایط عدم تلقیح با *P. ultimum* با موتانت شش‌صد *B. subtilis* بیشترین مقدار پرولین را داشته و کمترین مقدار در شرایط عدم تلقیح بیمارگر، مربوط به *Bacillus subtilis* بوده است. نتایج سنجش پرولین در شرایط تلقیح *Pythium ultimum* و تیمار با *A.lipoferum+P* و *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده بیشترین مقدار پرولین را نشان داد؛ اما تیمار با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره شش‌صد به‌جز گیاه آلوده به *P. ultimum* کمترین میزان پرولین مشاهده شد.



شکل ۹. مقایسه مالون‌دی‌آلدهید (نانوگرم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های*B.subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد.Control : گیاه شاهد (بدون تیمار)؛ *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد،*B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، ، *B.sM600* گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شش‌صد،*A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* ، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* *B.s+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر ، *B. sM600+P* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، Ab+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Al+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 9. Comparison of Malondialdehyde (ng/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis; A.brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A.lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P:* plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; BsM419+ *P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen*;* B. sM600+*P* :plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen*; A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates p<0.05).

گزارشاتی از تأثیر یک گونه باکتری *Azospirillum* بر افزایش تعداد برگ کاهو منتشر شده که نشان داده تلقیح گیاه ذرت با این‌نوع باکتری‌های محرک رشد می‌تواند باعث افزایش رشد گیاه شود. نتایج تحقیق یساری و همکارانش نشان داد استفاده از کودهای بیولوژیک حاوی آزوسپریلیوم و ازتوباکتر در کلزا سبب افزایش ارتفاع بوته و وزن خشک و تر اندام هوایی شده است (Yasari*et al.*, 2007). آنها دلیل عمده افزایش وزن خشک برگ ذرت و افزایش وزن تر در تیمار با *A. brasilense* و *P. putida* را قابلیت تولید مواد هورمونی و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط این سویه‌های باکتری همزیست ذکر کرده‌اند (Yasari*et al.*, 2007). تلقیح بذرهای سیاهدانه نیز با آزوسپریلیوم، ازتوباکتر و سودموناس فاکتورهای رشد نظیر ارتفاع گیاه را افزایش داده است (Li*et al.*, 2007). فهرست طولانی کاربرد *A. lipoferum* و *A. brasilense*، به‌عنوان تحریک‌کنندهٔ رشد در گیاهان مختلف نشان می‌دهد تیمار با این باکتری‌ها می‌تواند برای بهبود رشد و عملکرد گیاهان اثربخش باشد؛ به‌همین‌دلیل گزینه مناسبی برای جایگزینی ترکیبات شیمیایی محرک رشد در تولید محصولاتی مانند کاهو است (Utkhede*et al.*, 2000). نتایج این بررسی، نشان‌دادن کارایی هر دو سویه مذکور به منظور بهبود شاخص‌های رشد کاهوست.



شکل ۱۰. مقایسه پرولین (میکروگرم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum*، تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های*B.subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد.Control : گیاه شاهد (بدون تیمار)؛ *B.subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد،*B.sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، ، *B.sM600* گیاهان تیمارشده با باکتری*B.subtilis* موتانت شش‌صد،*A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* ، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.s+P A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر ، *B. sM600+P* گیاهان تیمارشده با باکتری *B.subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، Ab+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Al+P: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P.ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

Figure 10. Comparison of Proline (µg/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum, A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B.subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis;* B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis; A.brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A.lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P:* plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; BsM419+ *P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen*;* B. sM600+*P* :plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen*; A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates $p<0.05$).

گونه *P. ultimum* دارای دامنه میزبانی تقریبا بزرگی است. استفاده از عامل کنترل‌زیستی قارچی و باکتریایی برای کنترل این بیمارگرها بسیار مؤثرتر و ایمن‌تر از سموم شیمیایی رایج است (Utkhede*et al*., 2000). باتوجه به این مسئله، در هر دو شاخص، درصد کاهش مرگ گیاهچه و میزان کاهش شدت بیماری ناشی از تیمار با *P. ultimum* اندازه‌گیری شد تا میزان کارایی این‌نوع عوامل باکتریایی در بیوکنترل و بهبود شاخص‌های رشد در صورت بروز آلودگی در ابتدای فصل و فواصل رشد با هم مقایسه شود.

مقایسه میانگین درصد مرگ گیاهچه در گیاهان تحت تیمار با *P. ultimum* نشان داد گیاهان تحت تیمار با سویه *B. subtilis* موتانت شش‌صد پایین‌ترین درصد مرگ گیاهچه را داشتند. مهم اینکه کارایی این موتانت در بیوکنترل این علایم بهتر از تیمار با سویه والد و موتانت چهارصدونوزده است؛ درحالی‌که تیمار با سویه‌های *Azospirillum* نتوانست از بروز بوته‌میری به‌طور معنی‌داری ممانعت کند. به‌عبارت‌دیگر، استفاده از سویه‌های *Azospirillum*با وجود بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد گیاهچه، کارایی مناسبی در کنترل بیماری در صورت بروز آلودگی در مراحل نخستینِ کاشت نشاء را ندارند. ازنظر شاخص شدت علائم، سویه موتانت‌های *B. subtilis* تفاوت معنی‌داری با گیاه آلوده داشتند و توانایی بیوکنترل قابل قبولی را ارائه دادند؛ اما دو سویه باکتری همزیست

آزوسپریلیوم تفاوت معنی‌داری با شاهد بیمار نداشت؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت کارایی دو سویه باکتری همزیست *Azospirillum* به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از *B. subtilis* (والد و موتانت) بوده است؛ اما باتوجه به پرآزار بودن سویه بیمارگر مورد استفاده در این ارزیابی گلخانه‌ای، درصدی از کاهش بروز علایم در تیمار با باکتری‌های همزیست مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل مکانیسم‌های القاء رشد و بهبود جذب مواد مغذی و القاء مقاومت عمومی در گیاه باشد. در سال‌های اخیر مبحث کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به‌ویژه باکتری‌های *B. subtilis* برای کنترل بیماری‌های قارچی و نیز باکتریایی ریشه گیاهان زراعی توجه فراوان شده است.

سویه‌های *B. subtilis* ازجمله مهم‌ترین انواع باکتری‌های عامل بیوکنترل محسوب می‌شوند؛ زیرا در بهبود رشد گیاه به‌طور غیرمستقیم؛ و ازسویی‌دیگر به‌طورمستقیم، ازطریق توانایی در حذف عوامل بیماری‌زا از حوزهٔ فعالیت سیستم ریشه‌ای نقش اساسی دارند(Li*et al*., 2007). سویه آنتاگونیست *B. subtilis* تولید متابولیت‌های ثانویه ضدقارچی و طیف وسیعی از متابولیت‌های میکروبی شامل *2,4-diacetylphloroglucinol*، *Phenazines*، *Pyoluteorin* و *Pyrrolnitrin* هستند (Li*et al*., 2007). گونه *B. subtilis* پیش‌تر به‌عنوان عامل بیوکنترل *P.ultimum* و تعدادی دیگر از بیمارگرهای خاکزاد قارچی و شبه‌قارچی گزارش شده بوده است (Mangmang*et al*., 2023; Romero*et al*., 2011; Sarti*et al*., 2007).

دراین مطالعه، کارایی سویه والد و موتانت‌های این باکتری بر روی میزبان کاهو(*Lactuca sativa* L.) برای کنترل مرگ گیاهچه و کاهش شدت بروز علائم بیماری مشاهده شد. براساس نتایج به‌دست آمده از ارزیابی‌ها،کارایی روش القاء جهش در ژنوم *B. subtilis* برای بهبود ویژگی‌های آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی (حتی جدایه‌های پرآزار) کارآمد است. این روش، دسترسی به موتانت‌های شماره‌های ششصد و چهارصدونوزده است که کاندیدهای مناسبی برای مطالعات ارزیابی کارایی بعدی خواهد شد. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های ایمنی‌زیستی ازنظر عدم سمّیت موتانت‌های حاصل از پرتودهی با پرتوی گاما بر روی میزبان و موجودات مفید در اکوسیستم در گام‌های بعدی انجام شود.

تیمارهای باکتری *B. subtilis* (والد و موتانت) باعث افزایش معنی‌دار پروتئین برگ کاهو شده است؛ اما بیشترین میزان پروتئین در گیاهان تیمارشده با باکتری *A.brasilense* اندازه‌گیری شد؛ و کمترین میزان در گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* پرتوندیده دیده شد. بین تیمار با *B. subtilis* موتانت در شرایط بیماری و بدون بیماری، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

نتایج اندازه‌گیری میزان محتوای رنگدانه‌ها (کلروفیل و کارتنوئید) نشان داد میزان تجمع رنگدانه‌ها در تیمار با کلیه باکتری‌های *Azospirillum* و *B. subtilis* (والد و موتانت) بالا رفته است؛ اما در تیمار با بیمارگر موتانت‌های *B. subtilis* تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند. یکی از دلایل کاهش بیشتر شدت علائم در ارزیابی‌های گلخانه‌ای در تیمار با موتانت‌های *B. subtilis* ، تأثیر فیزیولوژیک این گونه باکتری‌ها در بهبود تجمع رنگدانه‌ها و کاهش علایم زردی گیاهان است.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط عدم آلودگی به بیمارگر و تیمار با *B.subtilis* موتانت شش‌صد و *A. lipoferum* بالاتر بود؛ اما با بروز آلودگی، *B.subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت پراکسیداز داشت. سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نشان داد *B.subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین القاء فعالیت را در پی داشته است؛ اما هر دو سویه *Azospirillum*کمترین فعالیت این آنزیم را القاء نمودند. درحالی‌که با بروز بیماری، *B. subtilis* موتانت شش‌صد بیشترین تأثیر را در القاء فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز داشت و با نتایج کاهش شدت بیماری تطابق نشان داد.

سنجش پرولین نیز روند مشابهی از پاسخ فیزیولوژیک گیاهچه‌های کاهو را نشان داد و *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین مقدار پرولین را در شرایط عدم تیمار با بیمارگر و بروز بیماری نشان داد؛ هرچند سویه‌های *Azospirillum* نیز قادر به القاء افزایش

تجمع پرولین در شرایط بروز بیماری بودند. دراین تیمارها، کاهش شدت بیماری غیرمعنی‌داری که در شاخص بیماری مشاهده شد می‌تواند به‌دلایل مختلف ازجمله افزایش تجمع پرولین باشد.

نتایج سنجش مالون‌دی‌آلدئید نیز نتایج سایر شاخص‌های فیزیولوژیکی را تأیید نمود. تیمار گیاه با *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید را نشان داد که با بیشترین توانایی بیوکنترل بیمارگر تطابق داشت.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

براساس نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی‌ها، امکان استفاده از روش القاء جهش در ژنوم *B. subtilis* برای بهبود ویژگی‌های آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی متعلّق به جنس شبه‌قارچ *P.ultimum*، وجود دارد. این روش با ایجاد تنوع ژنتیکی ازطریق القاء جهش، می‌تواند به دسترسی موتانت‌های شش‌صد و چهارصدونوزده بینجامد؛ زیرا بهبود کارایی زیستی آنها در نتایج نخستینِ ارزیابی گلخانه‌ای تأیید شده و می‌تواند کاندیدهای مناسبی برای استفاده در مدیریت بوته‌میری ناشی از *P. ultimum* باشد. نتایج این تحقیق نشان داد کارایی *B. subtilis* در بیوکنترل بیمارگر *P. ultimum* در شرایط گلخانه‌ای بهتر از سویه‌های همزیست *A. brasilense* و *A. lipoferum* بود؛ اما بررسی امکان تلفیق این دو جنس باکتری در خاک برای ایجاد کنسرسیوم زیستی با هدف تقویت گیاه و کنترل بیمارگر می‌تواند در بررسی‌های بعدی گنجانده شود. با ایجاد موتانت در *B. subtilis* و بالابردن اثر آنتاگونیستی آن و تولید متابولیت‌های ثانویه ضدقارچی و میکروبی می‌توان به مبارزه بیولوژیکی در آینده امیدوار بود. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر و ارزیابی کارایی این موتانت‌ها در گلخانه‌های تجاری و بررسی تثبیت کارایی این موتانت‌ها در خاک، موضوع تحقیقات بعدی باشد. همچنین تأکید می‌شود عدم سمّیت موتانت‌های حاصل از پرتودهی با پرتوی گاما بر روی گیاه میزبان و موجودات مفید در اکوسیستم در گام‌های بعدی بررسی شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., & Behboudi, K. (2014). Improvement in biocontrol activity of Bacillus subtilis UTB1 against Aspergillus flavus using gamma-irradiation. *Crop Protection*, *60*, 83-92. (in Persian).

Altunkaya, A.,*et al*. (2011). Purification and characterization of polyphenol oxidase, peroxidase and lipoxygenase from freshly cut lettuce (L. sativa). *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 249-256.

Amaradasa, B. S., Mei, C., He, Y., Chretien, R. L., Doss, M., Durham, T., & Lowman, S. (2024). Biocontrol potential of endophytic Pseudomonas strain IALR1619 against two Pythium species in cucumber and hydroponic lettuce. *Plos one*, *19*(2), e0298514.

Constantinescu, F., Tomescu, A., Şesan, T. E., & Ştirbu, P. M. (2010, July). Biocontrol of Soil Borne Fungi in Tomato Crop by Using Beneficial Bacillus subtilis Strains. In *III International Symposium on Tomato Diseases, 914*, 381-384.

Fatouros, G., Gkizi, D., Fragkogeorgi, G. A., Paplomatas, E. J., & Tjamos, S. E. (2018). Biological control of Pythium, Rhizoctonia and Sclerotinia in lettuce: association of the plant protective activity of the bacterium Paenibacillus alvei K165 with the induction of systemic resistance. *Plant pathology*, *67*(2), 418-425.

Li DeQuan, L.D., Nie FengYa, N.F., Wei LiHui, W.L., Wei BenQiang, W.B., & Chen ZhiYi, C.Z. (2007). Screening of high-yielding biocontrol bacterium Bs-916 mutant by ion implantation. *Applied microbiology and biotechnology*, 75,1401-1408.

Mangmang, J. S., Deaker, R., & Rogers, G. (2015). Optimal plant growth-promoting concentration of Azospirillum brasilense inoculated to cucumber, lettuce and tomato seeds varies between bacterial strains. *Israel Journal of Plant Sciences*, *62*(3), 145-152.

Mohamady, A., Abbas Akhavan Sepahi, A., & Hosseini Doust, S. R. (2017). Biological control of Pythium ultimum and Fusarium solani by indigenous strains Bacillus subtilis. *Journal of Microbial Biology*, *6*(21), 1-14. (in Persian).

Rezalou, Z., Shahbazi, S., Alilou, A. A., & Ghorbani, A. (2023). Biostimulant impact of Trichoderma species on physiological characteristics of beans. *Iranian Journal of Genetics & Plant Breeding (IJGPB)*, *12*(2). (in Persian).

Rezalu, Z.,*et al*. (2022). *Investigating the effect of growth-promoting bacteria in stimulating germination and improving the growth components of seeds*. Iran seed science and technology.(in Persian).

Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2011). An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in B. subtilis biofilms. *Molecular microbiology*, *80*(5), 1155-1168.

Rostaminia, M., *et al*. (2021). Effect of three commercial bio-fertilizers prepared with Pseudomonas on yield and morphophysiological traits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Iran Agricultural Research*, 39(2) 99-107. (in Persian).

Sarti, G. C., Galelli, M. E., Arreghini, S., Cristóbal-Miguez, J. A. E., Curá, J. A., & Paz-González, A. (2023). Inoculation with Biofilm of Bacillus subtilis Promotes the Growth of Lactuca sativa. *Sustainability*, *15*(21), 15406.

Utkhede, R. S., Lévesque, C. A., & Dinh, D. (2000). Pythium aphanidermatum root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *22*(2), 138-144.

Yasari, E., & Patwardhan, A. M. (2007). Effects of (Azotobacter and Azosprillium) inoculants and chemical fertilizers on growth and productivity of canola (*Brassica napus* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*.