Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 52, No 2, Autumn and Winter 2021 (87-95)
DOI: 10.22059/IJPPS.2021.315025.1006962

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۲، شمارۀ ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۰ (ص۹۵-۸۷) مقاله پژوهشی

ارزیابی قارچ‌کش بیولوژیکی رویین ۱ در مدیریت بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه چغندرقند

مهیار شیخ الاسلامی[1*]، شهرام نعیمی[2]، سیدباقر محمودی[3] و علی جلیلیان[4]

۱. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

۲. موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۳. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۴. بخش تحقیقات چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۲۴- تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۳/۳۰)

چکیده

در این تحقیق، کارآیی ماده بیولوژیکی رویین ۱ بر اساس باکتری ***Bacillus subtilis* BS 106** در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند با عامل ***Rhizoctonia solani*** بررسی شد. آزمایش به صورت طرح آماری کرت‌های خردشده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در دو مزرعه تحقیقاتی در شهرستان کرمانشاه در سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ انجام گردید. عامل اصلی شامل شش تیمار به ترتیب تیمار بذر با ماده بیولوژیکی رویین ۱ با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ گرم ماده تجارتی برای چهار کیلوگرم بذر مصرفی در هکتار، تیمار بذر با رویین ۱ با استفاده از دستگاه پوشش‌دهی بذر با محلول حاوی۲۰۰ گرم ماده تجارتی در چهار کیلوگرم بذر، تیمار کربوکسین تیرام و شاهد. عامل فرعی عبارت از محلول‌ریزی در دو سطح شامل کاربرد و عدم استفاده از آن بود. نتایج این تحقیق نشان داد که عامل اصلی به صورت پوشش بذر به صورت‌های مختلف تاثیری در کاهش شدت بیماری و یا افزایش محصول نداشت، اما عامل فرعی به صورت محلول‌ریزی سبب کاهش شدت بیماری و افزایش عملکرد در سطح آماری یک درصد شد. با اعمال تیمار محلول‌ریزی ماده تجارتی رویین ۱ به میزان ۲۰۰ گرم در هکتار در دو مرحله ۴۵ و ۹۰ روز بعد از کاشت، میانگین شاخص بیماری از ۴/۴ (میانگین تیمار شاهد) به ۳/۵۸ (میانگین تیمار محلول‌ریزی) رسید. در نتیجه شاخص بیماری به میزان ۰/۸۲ واحد (معادل تقریبی۸/۲ درصد میزان آلودگی) کاهش یافت. همچنین میانگین محصول از ۳۹۵۶۰ کیلوگرم در تیمار شاهد به ۴۸۰۸۰ در تیمار محلول ریزی افزایش یافت که معادل ۱۷/۷۲ درصد افزایش محصول در هکتار است.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه، تیمار بذر، کنترل بیولوژیکی.

Evaluation of the Rouin1 biological fungicide in management of Rhizoctonia root rot of sugarbeet

Mahyar Sheikholeslami[1*], Shahram Naeimi[2], Seyed Bagher Mahmoudi[3] and Ali Jalilian[4]

1. Plant Protection Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education center, Kermanshah, Iran (AREEO).
2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3. Sugar Beet Seed Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
4. Sugar Beet Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education center, Kermanshah, Iran (AREEO).

(Received: ecember 14, 2020 - Accepted: June 20, 2021)

Abstract

In this study, the efficacy of the biological material named as Rouin1 based on *Bacillus subtilis* BS106 in controlling Rhizoctonia root rot disease of sugar beet was evaluated. The experiment was carried out as split plots in the pattern of randomized complete block design in two research farms in Kermanshah county. The major factor was seed coating with Rouin1 at various conditions. The minor factor was irrigating and not irrigating the plots with Rouin1 solution. All of the plants were inoculated with *R. solani* RS 124 inoculum 8 weeks after planting. The results of this study showed that major factor as seed coating had no effect on disease severity or crop yield in different forms, but minor factor as irrigating with bacterial solution reduced disease severity and increased crop yield at 1% probability level. By applying irrigation treatment of Rouin1 commercial material at the rate of 200 g/ha at two stages of 45 and 90 days after planting, the average disease index decreased from 4.4 (average control treatment) to 3.58 (average irrigation treatment). As a result, the disease index decreased by 0.82 units (approximately equivalent to 8.2% of the infection rate). Also, the average yield increased from 39,560 kg in the control treatment to 48080 in the irrigation treatment, which is equivalent to 17.72% of production increasing per hectare.

Key words: Biological control, Rhizoctonia root rot, seed treatment.

* Corresponding author E-mail: m1sheikh@yahoo.com

مقدمه

بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه از جمله مهمترین بیماری‌های چغندرقند می‌باشد. مدیریت این بیماری بسیار مشکل بوده و همه ساله خسارات فراوانی را به کشاورزان وارد می‌نماید. در دهه هفتاد میلادی از مهم‌ترین بیماریهای چغندرقند در آمریکا به حساب آمده و میزان خسارت آن را بالغ بر هفت درصد برآورد کرده‌اند (Hecker & Ruppel, 1975). رابطه بین شدت بیماری‌های ریشه‌ای چغندرقند ناشی از قارچ‌های مختلف و تولید شکر در آمریکا نشان داده‌است که به ازای هر یک درصد افزایش بیماری بوته‌میری و پوسیدگی ریشه، ۸۰-۷۰ کیلوگرم شکر در هکتار خسارت وارد می‌شود (Harveson *et al*., 2002). در اروپا، پوسیدگی ریزوکتونیایی به صورت یک مشکل جدی نمایان شده و ۱۳ درصد مزارع هلند، هشت درصد مزارع اسپانیا، پنج درصد مزارع فرانسه و یونان و دو درصد مزارع ایتالیا و آلمان تحت تاثیر این بیماری قرارگرفته‌است (Rother, 1999). پوسیدگی ریزوکتونیایی در بیشتر مناطق چغندرکاری ایران وجود دارد، بطوری‌که از حدود یک سوم نمونه‌های با علایم پوسیدگی ریشه طی سال‌های ۸۳-۷۸ بیمارگر ریزوکتونیا جداسازی شده‌است (Mahmoudi *et al*., 2004).

در ایران در صورتی‌که شرایط محیطی برای توسعه بیماری مهیا باشد خسارت این بیماری می‌تواند راندمان محصول را تا ۳۰ درصد کاهش دهد (Behdad, 1980). با توجه به خاکزی بودن و دوام طولانی قارچ در خاک تاکنون هیچ قارچ‌کشی نتوانسته اثر قاطع درمانی در کنترل این بیماری داشته باشد و همچنین تناوب تاثیر چندانی در کنترل بیماری ندارد و لذا استفاده از روش مدیریت تلفیقی تنها راه کاهش میزان خسارت ناشی از آن می‌باشد که در این بین استفاده از ارقام مقاوم، رعایت اصول اولیه کشت، آبیاری به‌موقع، کوددهی متعادل و استفاده از ترکیبات بیولوژیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در ایران بیش از چهارده گونه مختلف قارچی به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه چغندر گزارش شده‌اند که سه نوع پوسیدگی ریشه ریزوکتونیایی، فیتوفتورایی و پیتیومی به ترتیب با ۲۸/۵، ۲۰ و ۱۴/۵ درصد بیشترین فراوانی را دارا می‌باشند (Mahmoudi & Soltani, 2005). از نظر میزان خسارت، مهمترین قارچ عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند در دنیا *R. solani* معرفی شده است که میزان خسارت آن در دهه هفتاد در آمریکا بالغ بر هفت درصد گزارش شده است (Whitney & duffus, 1986). کیونیک و همکاران (Kiewnick *et al*., 2001)نیز پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از *R. solani* را در چغندرقند به عنوان یکی از مهمترین عوامل خسارت‌زا در بیش از ۲۵ درصد سطح زیر کشت آن در امریکا عنوان نموده‌اند. بهترین راه کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است اما با توجه به اینکه همواره درصدی از بیماری حتی با وجود کاشت ارقام مقاوم وجود دارد و همینطور شکسته شدن مقاومت، استفاده از مدیریت تلفیقی جهت کنترل این بیماری توصیه می‌گردد (Cornelissen *et al*., 1996). در این بین استفاده از ترکیبات بیولوژیک از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا فاقد مشکلات زیست‌محیطی هستند. در میان ترکیبات بیولوژیک ترکیباتی که بر مبنای باکتری‌های مفید *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn می‌باشند از جایگاه خاصی برخوردارند. این باکتری مفید و مقیم خاک جزو باکتری‌های گروه ریزوباکترهای افزایش‌دهنده رشد گیاه (PGPR) بوده و ترکیبات حاوی آن به عنوان ترکیبات چندمنظوره مورد استفاده قرار می‌گیرند. از خصوصیات مهم این باکتری عبارتند از: توانایی تشکیل اندوسپور، تولید دامنه وسیعی از متابولیت‌های مفید همچون هورمون‌های گیاهی، اسیدهای آمینه، ترکیبات فرار، سیدروفور، آنزیم‌هایی همچون ACC دی‌آمیناز و ایجاد مقاومت القایی در گیاهان نسبت به عوامل بیماری‌زای گیاهی (Bhattacharyya & Jha, 2012). استرین‌های مختلف *B. subtilis* همچنین توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون ائومایسین، باسیلیسین، باسیلومایسین، باسیلوپپتین ای‌بی‌سی، فنجی‌مایسین، ایتورین ای‌بی‌ایی، مایکوسوبتیلین، سوبتیلین و توکسیمایسین را دارند که نقش عمده‌ای

در خاصیت آنتاگونیستی این باکتری علیه قارچ‌ها، مخمرها و باکتری‌ها دارد که البته میزان این آنتی-بیوتیک‌ها در استرین‌های مختلف متفاوت است (Kajimora *et al*., 1995 ; Gond *et al*., 2015 ; Fendrihan *et al*., 2016 ; Neeta & Manjusha, 2017) نتایج حاصل از کشت متقابل و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که استرین *B. subtilis* RH5 فعالیت آنتاگونیستی قابل توجهی (۸۴/۴۱ درصد) بر علیه *R. solani* عامل بیماری خشکیدگی غلاف برنج داشته است. استرین RH5 دارای فعالیت‌های مختلفی شامل توانایی تولید اندول استیک اسید، سیدروفور، سیانید هیدروژن بوده است (Jamali *et al*., 2020). میزان ممانعت کنندگی یک استرین از *B. subtilis* که بر علیه *R. solani* عامل بیماری شوره سیب زمینی در شرایط گلدان و مزرعه مورد آزمایش قرارر گرفت به ترتیب ۷۱ و ۵۰ درصد بوده است (Hussain & Khan, 2019). فیدامن و رسال (Fiddaman & Rossal, 1993, 1994) نیز مشاهده نمودند که استرین-NCILB *B. subtilis* (12376 ترکیبات فرار ضدقارچی علیه *R. solani* و *P. ultimum* تولید می‌نمایند که رشد قارچ در حضور آن به شدت کاهش می‌یابد . در چغندرقند دان‌لیوی (Dunleavy, 1955) باکتری *B. subtilis* را علیه *R. solani*عامل مرگ گیاهچه چغندرقند به کار برد و استفاده از آن را در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مفید ارزیابی نمود. الکذاذ و همکاران (El-Kazzaz *et al*., 2002) استفاده از ترکیبات بیولوژیک مختلف را روی *Fusarium oxysporum*، *Macrophomina phaseolina*، *R. solani* و *Sclerotium rolfsii* عوامل مختلف بوته‌میری و پوسیدگی ریشه چغندرقند در مصر مورد بررسی قرار دادند و موثر بودن *B. subtilis* را جهت کنترل این بیماری‌ها در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای نشان دادند. آنها همچنین افزایش عملکرد در تیمارهای مورد استفاده از این ترکیب را نسبت به شاهد مشاهده کردند. در ایران نیز شهیری طبرستانی و همکاران (Shahiri Tabarestani *et al*., 2004) اثر باکتری *B. subtilis* را بر بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که پوشش دادن بذر چغندرقند با عوامل آنتاگونیست و یا اضافه نمودن آن‌ها به خاک درکاهش مرگ و میر گیاهچه‌ها در فاصله ۳۰ روز پس از کاشت، تأثیر خوبی دارد. آنها اعلام کردند که در استرین مورد آزمایش آنها، اضافه‌کردن باکتری به خاک، نسبت به پوشش دادن بذر در کاهش مرگ و میر گیاهچه موثرتر است. نتایج تحقیقات کریمی و همکاران (Karimi *et al*., 2016) نشان داد که چهار استرین از باکتری باسیلوس شامل *B. amyloliquefaciens* SB14، *B. pumilus* SB6، *B. siamensis* AP2 و *B. siamensis* AP8 به صورت پوشش بذر دارای تاثیر معنی‌داری در کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند در مقایسه با سایر جدایه‌های بکاررفته بودند. با این حال تیمار بذر با باکتری *B. amyloliquefaciens* SB14 تاثیر بهتری در کنترل بیماری داشت، به‌طوری‌که مرگ گیاهچه چغندر قند توسط جدایه *R. solani* AG-4 به میزان ۵۸ درصد و مرگ گیاهچه توسط *R. solani* AG-2-2 به میزان ۵۲/۵ درصد کاهش یافت. این تحقیقات نشان داد که باکتری‌های مفید جدا شده از ریزوسفر چغندرقند می-توانند شانس انتخاب جدایه برتر برای کنترل بیماری را افزایش دهند (Karimi *et al*., 2016). هدف از این تحقیق بررسی کارایی ترکیب تجارتی رویین ۱ بر اساس باکتری *B. subtilis* جهت کنترل بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند با عامل *R. solani* بود.

مواد و روش‌ها

آزمون زنده مانی باکتری و تعیین جمعیت آن بر مبنای تعداد واحد پرگنه ساز با روش سری رقت مشخص شد (Suslow & Schroth, 1982). همچنین وجود و یا عدم وجود آلودگی قارچی و باکتریایی با قراردادن ماده بیولوژیکی روی محیط های کشت‌های Nutrient Agar، Potato Dextrose Agar و Malt Extract Agar بررسی گردید. برای تایید شناسایی مولکولی جدایه از توالی ژن های 16S rDNA و *rpoB* استفاده شد (Qi *et al*., 2001). برای عملیات زراعی، در بهار سال ۱۳۹۸ در منطقه کرمانشاه، دو قطعه زمین یکی در باغ تحقیقاتی در مجاورت مرکز

تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه (مزرعه شماره ۱) و دیگری در ایستگاه تحقیقاتی مهرگان (مزرعه شماره ۲) برای انجام آزمایش در نظر گرفته شدند. با توجه به مزایای آبیاری قطره‌ای نواری و امکان تنظیم آبیاری از این روش در پروژه استفاده شد. طرح آماری در این تحقیق، کرت‌های خردشده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی بود. عامل اصلی شامل شش تیمار به ترتیب شاهد (تیمار ۱)، استفاده از ماده رویین ۱ با مقادیر۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ گرم ماده تجارتی (تیمارهای ۲، ۳ و ۴) برای ضدعفونی ۴ کیلوگرم بذر (بذر مصرفی در یک هکتار)، بذر تیمارشده با ماده رویین توسط دستگاه مخصوص پوشش‌دهی بذر (تیمار ۵) به نسبت ۲۰۰ گرم در چهارکیلوگرم بذر مصرفی در هکتار و بذر تیمار شده توسط سم کربوکسین تیرام (تیمار ۶) به صورت گرد وتابل ۷۵ درصد به نسبت دو در هزار بودند. عامل فرعی شامل محلول‌ریزی توسط محلول ماده بیولوژیکی رویین ۱ (به نسبت ۲۰۰ گرم در هکتار) برای نیمی از کرت‌ها در مقابل عدم محلول-ریزی (شاهد) بود. برای آماده‌سازی بذور در تیمارهای ۲، ۳ و۴ توسط ماده بیولوژیکی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، برای بذرمال کردن، مقدار مورد نظر از ترکیب در حجم مناسبی از آب حل شده و پس از صاف کردن محلول توسط پارچه‌ی نازک، بر روی بذرها پاشیده و مخلوط گردید تا تمامی سطوح بذور به آن آغشته شوند. نوارهای تیپ با فاصله ۴۰ سانتی متری از هم قرار داشتند و اندازه هر کرت به صورت شش ردیف با فواصل ۴۰ سانتی متری به طول دو متر در نظر گرفته شد. تعداد بوته پس از عملیات تنک وجین حدود ۶۰ بوته در هر کرت و تعداد تکرار برای هر تیمار ۴ عدد در نظر گرفته شد. فاصله بین کرت‌ها و همچنین فاصله بین بلوک‌ها یک متر بودند.

پس از برقراری سیستم آبیاری کشت بذور انجام شد و بلافاصله بعد از کاشت، مزرعه به طور طبیعی و بر اساس نیاز آبیاری گردید، اما هیچ نوع تیمار کودی استفاده نشد. در فاصله ۴۵ و۹۰ روز بعد از کاشت بذور، محلول‌ریزی توسط ترکیب محلول رویین ۱ به نسبت ۲۰۰ گرم در هکتار در نیمی از هر کرت (سه ردیف) انجام شد.

برای مایه‌زنی بوته‌ها پس از دریافت جدایه قارچ *R. solani* RS-124 AG-2-2 از موسسه تحقیقات چغندر قند این جدایه روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار کشت داده شد. برای تهیه ماده تلقیح، بذور ذرت به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده و سپس داخل ظروف شیشه‌ای ارلن دو روز متوالی در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. پس از سرد شدن، قطعات قارچ با ابعاد دو سانتی‌متر روی ذرت‌های استریل قرار گرفت و به مدت سه هفته در شرایط دمای ۲۵ درجه سلسیوس داخل انکوباتور قرار داده شدند. پس از آماده شدن ماده تلقیح، هشت هفته بعد از کاشت، ابتدا اطراف بوته‌ها کنار زده شد و سپس مقدار تقریبی پنج گرم از ماده تلقیح قارچ *R. solani* در کنار هر ریشه قرار گرفت و پس از مایه‌زنی بلافاصله آبیاری انجام شد (Windels *et al*., 1997). عملیات کنترل علف‌های هرز به صورت وجین دستی در چند مرحله از زمان کاشت تا برداشت انجام گردید. در مزرعه شماره ۲ برای کنترل کک چغندرقند از سم فوزالون (EC 35%) به نسبت دو لیتر در هکتار به صورت محلول‌پاشی استفاده شد. عملیات برداشت و سرزنی در مزرعه شماره ۱ در تاریخ ۹۸/۸/۱۲ و در مزرعه شماره ۲ در تاریخ ۹۸/۸/۱۹ صورت گرفت. پس از برداشت تمامی بوته‌های داخل هر کرت بر اساس روش باتنر و همکاران از نظر شدت علایم ارزیابی شدند (Büttner *et al*., 2004). در این روش مقیاس از یک تا ۹ و به شرح زیر است.

نمره ۱ : گیاهان با ریشه های سالم (فاقد لکه یا زخم روی ریشه)

نمره ۲ : حدود یک درصد سطح ریشه دارای زخم ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۳ : یک تا ۵ درصد سطح ریشه دارای زخم ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۴ : پنج تا ۱۰ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۵ : ده تا ۲۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۶ : بیست و پنج تا ۵۰ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۷ : پنجاه تا ۷۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۸ : بیش از ۷۵ درصد سطح ریشه دارای زخم و شانکر خشک ناشی از ریزوکتونیا

نمره ۹: گیاهان مرده، ریشه کاملا پوسیده

شاخص بیماری(DI) به صورت زیر تعیین گردید.

$$DI=\frac{\text{مجموع (تعداد گیاهان در آن سطح × سطح بیماری)}}{\text{مجموعه گیاهان در کرت مورد ارزیابی}}$$

پس از ارزیابی شدت بیماری روی ریشه‌ها، تمامی ریشه‌های برداشت شده داخل هر کرت توزین و یادداشت‌برداری شدند. داده‌های بدست آمده از مراحل مختلف آزمایش‌ها در نرم افزار SAS-9.2 آنالیز شدند.

یافته‌ها

نتایج شناسایی مولکولی بر اساس توالی ژن‌های 16S rDNA و *rpoB* نشان داد که باکتری عامل فعال قارچکش با قطعیت بالا به گونه *B. subtilis* تعلق دارد. همچنین تعداد واحد پرگنه‌ساز به میزان (CFU) $۱۰^{۹}$ ×۲ در هر گرم ماده تجارتی بر اساس سری رقت محاسبه شد. همچنین هیچگونه آلودگی قارچی و یا باکتریایی مشاهده نشد.

نتایج بررسی تاثیر ماده بیولوژیکی رویین۱ بر روی کاهش شدت بیماری و همچنین افزایش کمیت محصول در جداول پیوست آمده است. این آزمایش در دو مزرعه انجام شده که نتایج آن به تفصیل می‌آید.

مزرعه شماره ۱: بخشی از این تحقیق در زمین باغ تحقیقاتی مرکز تحقیقات انجام شد و زمین مورد استفاده سابقه‌ای از کشت محصولات زراعی نداشت. نتایج در این مزرعه نشان داد که تیمارهای مختلف بذر (عامل اصلی) اختلاف معنی‌داری در کنترل بیماری و یا افزایش محصول نداشتند، اما از نظر تاثیر عامل فرعی محلول‌ریزی پای بوته‌ها تاثیر این عمل بر کاهش شدت بیماری و همچنین افزایش محصول در سطح یک درصد معنی‌دار بود. آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن تمام تیمارهای بذر را از نظر تاثیر بر شدت بیماری و همچنین میزان محصول در یک گروه قرار داد. از نظر اختلاف بین تیمارهای محلول‌ریزی نشده و شده انجام محلول‌ریزی میانگین شاخص شدت بیماری را در این مزرعه از ۳/۲۹ در تیمار شاهد به ۲/۶۲ در تیمار استفاده از محلول‌ریزی به میزان ۰/۶۷ واحد کاهش داد. در مقایسه اثر تیمار محلول‌ریزی و عدم محلول‌ریزی ماده بیولوژیکی رویین ۱ براساس مقایسه میانگین‌ها، انجام محلول‌ریزی، میانگین وزن محصول را از ۵۲۴۰۰ کیلوگرم در تیمار شاهد به ۶۱۶۰۰ کیلوگرم در تیمار محلول‌ریزی به میزان۹۲۴۰ کیلوگرم در هر هکتار افزایش داد.

مزرعه شماره ۲: مزرعه شماره دو در ایستگاه تحقیقاتی مهرگان و در زمینی واقع بود که سابقه کاشت محصولاتی نظیر سیب‌زمینی، گوجه فرنگی، ذرت، گندم و جو را داشت. این مزرعه دارای خاک سنگین رسی و سطح بالای آب زیرزمینی است. نتایج آزمایش در این مزرعه نشان داد که تیمار بذر توسط ترکیبات مختلف تاثیری در کاهش شدت بیماری ندارد، اما تاثیر این تیمار بر روی میزان محصول در سطح آماری یک‌درصد معنی‌دار بود. بر اساس آزمون مقایسه‌ای دانکن تمام تیمارهای بذر از نظر تاثیر بر شدت بیماری همگی در یک گروه قرار گرفتند و با هم اختلاف نداشتند، اما بر اساس این آزمون، تیمار بذر سبب اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بر کمیت محصول شد، اما این آنالیز نشان‌دهنده برتری تیمار شاهد نسبت به سایر تیمارها بود که موضوعی غیرعادی بنظر می‌رسد که دلایل آن در قسمت بحث مطرح می‌شود. در مقایسه آماری تاثیر محلول‌ریزی و عدم محلول‌ریزی، نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار این تیمار بود. به طوری که مقایسه میانگین‌ها نشان داد که انجام محلول‌ریزی شاخص بیماری را از ۵/۵ در تیمار شاهد به ۴/۵ در تیمار محلول ریزی کاهش داد. همچنین همین مقایسه نشان داد که تیمار محلول-ریزی سبب افزایش محصول از ۲۶۷۶۰ کیلوگرم در تیمار شاهد به ۳۴۵۲۰ در تیمار محلول‌ریزی به میزان۷۹۲۰ کیلوگرم در هکتار شد.

نتایج مربوط به تجزیه مرکب داده‌های دو مزرعه

تجزیه مرکب داده‌های مربوط به دو مزرعه نتایج نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تاثیر مکان بر شدت بیماری و میزان محصول در سطح آماری یک درصد بود. همچنین تیمار بذر تاثیر معنی‌داری بر شدت بیماری بین تیمارهای مختلف نداشت و بر اساس آزمون مقایسه‌ای دانکن تمام تیمارهای بذر از نظر تاثیر بر شدت بیماری و میزان محصول همگی در یک گروه قرار گرفتند و با هم اختلاف نداشتند (جداول ۱ و ۲).

بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها در تجزیه مرکب دو مزرعه انجام محلول‌ریزی سبب کاهش شاخص بیماری از ۴/۴ در تیمار شاهد به ۳/۸۹ در تیمار محلول‌ریزی به میزان ۰/۸۲ واحد شدت بیماریزایی (معادل کاهش تقریبی ۸/۲ درصد از خسارت بیماری) و افزایش محصول ریشه از ۳۹۵۶۰ کیلوگرم در تیمار شاهد به ۴۸۰۸۰ در تیمار محلول ریزی معادل ۸۵۲۰ کیلوگرم در هکتار شد (جداول ۳ و ۴).

جدول ۱- آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در مورد تاثیر تیمارهای مختلف بذر بر شدت بیماری بر اساس تجزیه مرکب داده‌های دو مزرعه شماره (۱) و (۲) در سطح احتمال ۵٪

Table 1. Duncan's mean comparison test on the effect of different seed treatments on disease severity based on combined analysis of data from the fields (1) and (2) at probability level of 5%

Treatment	Mean disease severity
Seed treated with Rouin1 in the machine	4.23[a]
Seed treated with Rouin1 100g/h	4.21[a]
Control	4.1[a]
Seed treated with Rouin1 400g/h	4.01[a]
Seed treated with Carboxin-Thiram	3.78[a]
Seed treated with Rouin1 200g/h	3.62[a]

میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

Means followed the same letter are not significantly different.

جدول ۲- آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در مورد تاثیر تیمارهای مختلف بذر بر میزان محصول بر اساس تجزیه مرکب داده‌های دو مزرعه شماره (۱) و (۲) در سطح احتمال ۵٪

Table 2. Duncan's mean comparison test on the effect of different seed treatments on the crop yield based on combined analysis of data from two fields (1) and (2) at the probability level of 5%

Treatment	Mean product (kg in 2.5/m^2)
Seed treated with Carboxin-Thiram	12.1[a]
Control	11.48[ab]
Seed treated with Rouin1 in the machine	11.4[ab]
Seed treated with Rouin1 200g/h	11a[b]
Seed treated with Rouin1 400g/h	10.13[ab]
Seed treated with Rouin1 100g/h	9.36[b]

میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌دار آماری ندارند.

Means followed the same letter are not significantly different.

جدول ۳- آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن در مورد تاثیر محلول‌ریزی ترکیب رویین ۱ بر روی شدت بیماری بر اساس تجزیه داده‌های مزارع شماره (۱) و (۲) در سطح احتمال ۵٪

Table 3. Duncan's mean comparison test on the effect of irrigating the plots with Rouin1 solution on disease severity based on combined analysis of the fields (1) and (2) at 5% probability level

Treatment	Mean disease severity
No bacterial solution irrigating	4.4[a]
Bacterial solution irrigating	3.58[b]

میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است ($P<0.05$) .

Means followed different letters in a column are significantly different ($P<0.05$).

جدول ۴- آزمون مقایسه میانگین به روش دانکن در مورد تاثیر محلول‌ریزی ترکیب رویین ۱ بر روی میزان محصول بر اساس تجزیه داده‌های مزارع شماره (۱) و (۲) در سطح احتمال ۵٪

Table 4 - Duncan's mean comparison test on the effect of irrigating the plots with Rouin1 solution on crop yield based on combined analysis of the fields (1) and (2) at 5% probability level

Treatment	Mean product (kg in 2.5/m^2)
Bacterial solution irrigating	12.02[a]
No bacterial solution irrigating	9.89[b]

میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است (P<0.05) .

Means followed different letters in a column are significantly different (P<0.05).

بحث

بر اساس نتایج این تحقیق انجام تیمار بذر به صورت‌های مختلف تاثیری بر کاهش شدت بیماری نداشت و بر اساس تجزیه مرکب داده‌های دو مزرعه، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و شاهد مشاهده نشد. با توجه به اینکه پوسیدگی ریشه‌ها در زمان طولانی بعد از کاشت اتفاق می‌افتد، وقوع این شرایط در مزرعه دور از ذهن نیست. بر اساس تحقیقات انجام شده، کاشت بذر چغندرقند پرایم‌شده و یا تیمارشده توسط ریزوباکتری‌ها و یا قارچ‌کش‌ها توانسته است از آلودگی زودهنگام گیاهچه‌ها ممانعت کرده و منجر به پایداری بیشتر گیاهان شود، اما هیچیک از این اقدامات نتوانست از آلودگی‌های بعدی و توسعه پوسیدگی طوقه و ریشه تا پایان فصل ممانعت کند (Suslow & Schrott, 1982).

در همین حال تحقیقاتی که بر اساس پوشش‌دهی بذور چغندرقند توسط سوسپانسیون باکتری *B. subtilis* انجام شده، تاثیر مناسبی در کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند نشان داده است (Mahmoud, 2016). همچنین نتایج این تحقیق با نتایج شهیری طبرستانی و همکاران، ۱۳۸۳ هماهنگی دارد که کاربرد باکتری در خاک تاثیر بهتری نسبت به کاربرد بذرمال داشته است (Shahiri Tabarestani *et al*., 2004). تحقیقات در مورد مقایسه باکتری‌های مختلف برای کنترل بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندر قند، نشان‌دهنده برتری *B. subtilis* در کنترل بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندر قند نسبت به سایر باکتری‌های مورد آزمایش بوده است (El-kazzaz *et al*., 2002). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد سوسپانسیون باکتری در خاک ۴۵ و۹۰ روز بعد از کاشت تاثیر معنی‌داری در کاهش شدت بیماری و افزایش بازده محصول داشت. آزمایش‌های انجام‌شده توسط سایر محققین نشان داده است که کاربرد سوسپانسیون باکتری *B. subtilis* RB14 و یا محیط کشت مایع از باکتری‌های تکثیر شده بدون وجود سلول باکتری، توانست توسعه بیماری مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی توسط *R. solani* را در خاک متوقف کند که از یک سو نشان‌دهنده توانایی باکتری *B. subtilis* در کشت خاکی و از سوی دیگر قابلیت ترشحات باکتری شامل Iturin A و Surfectin در کنترل بیماری است (Asaka & Shoda, 1996). همچنین در مورد پوسیدگی ریشه فلفل توسط *R. solani* ، با کاربرد باکتری *B. subtilis* به صورت کاربرد پوشش بذر و مصرف در خاک به ترتیب ۶۶ و ۸۴ درصد کاهش بیماری مشاهده شده است (Narasimhan & Shivakumar, 2016). نتایج تحقیقات بررسی تاثیر دو جدایه از باکتری *Streptomyces* sp. به صورت افزودن به خاک حاکی از ممانعت از بیمارگرهای مهم چغندر قند شامل *R. solani*، *F. oxysporum* و *Phytophthora drechsleri* بوده است (Karimi *et al*., 2012). یکی از تیمارها در تحقیق حاضر کاربرد سم کربوکسین تیرام به صورت ضدعفونی بذر بود که نتایج کاربرد آن برای کاهش شدت بیماری تفاوتی با شاهد نداشت که با توجه به زمان طولانی بعد از ضدعفونی بذر تا وقوع آلودگی این عدم کارآیی می‌تواند به دلیل تجزیه قارچ‌کش تا زمان وقوع بیماری باشد. در آزمایش‌های انجام شده، سموم آزوکسی استروبین و تبوکونازول تاثیر خود را در کنترل بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه چغندر قند بعد از ۵ هفته از دست دادند که

دلیل آن تجزیه قارچ‌کش‌ها ذکر شده است (Brantner & Windels, 1999). نتایج این تحقیق نشان دهنده تاثیر استفاده از محلول حاوی باکتری در افزایش معنی‌دار محصول بود. نتایج تحقیقات جمالی و همکاران (Jamali *et al*., 2020) نشان داد که وجود *B. subtilis* در اطراف ریشه می‌تواند منجر به افزایش حلالیت فسفر، روی و پتاسیم در ریزوسفر چغندر شود که نتیجه نهایی آن افزایش محصول است. در آزمایش‌های ما در مزرعه شماره دو اگرچه تاثیر کاربرد باکتری به صورت بذرمال تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد در کاهش شدت بیماری نداشت، اما در مورد تاثیر در افزایش محصول اختلاف معنی‌دار بود، به صورتی که راندمان در تیمار شاهد بیشتر از سایر تیمارها بود. در مزرعه شماره دو شدت بیماری بسیار بالا بود و علاوه بر آلودگی ریزوکتونیایی فعالیت سایر بیمارگرها به ویژه شبه قارچ *P. aphanidermatum* روی ریشه‌ها قابل توجه بود که فعالیت مجموعه عوامل بیماریزا سبب بالارفتن شدت بیماری و نابودی بسیاری از ریشه‌ها تا زمان برداشت گردید. همچنین خاک مزرعه در ایستگاه مهرگان (محل آزمایش دوم) دارای رس بالایی است که موجب ماندابی شدن مزرعه و فعالیت بهتر قارچ‌های بیماریزا می‌گردد و ایجاد این تفاوت در وزن ریشه‌ها را می‌توان به این موضوع نسبت داد. تاثیر مکان بر شدت بیماری و کمیت محصول در سطح یک درصد معنی‌دار بود اما در مجموع و در تجزیه مرکب اگرچه اختلاف تیمارها از نظر تاثیر تیمار بذر در افزایش محصول معنی‌دار شد اما در مقایسه میانگین‌ها، تمام تیمارها به جز یک مورد که تیمار بذر توسط باکتری به میزان ۲۰۰ گرم در هکتار بود بقیه تیمارها با هم اختلاف معنی‌دار نداشتند.

نتیجه‌گیری کلی

در هر دو مزرعه آزمایشی، فقط تاثیر تیمار فرعی محلول‌ریزی روی کاهش شاخص بیماری و افزایش میزان تولید معنی‌دار بود. بر اساس نتایج این تحقیق تیمار بذر توسط باکتری *B. subtilis* با مقادیر مختلف و یا سم کربوکسین تیرام تاثیری در کاهش شدت بیماری و یا افزایش محصول نداشت، اما تیمار بوته‌ها به صورت محلول‌ریزی در دو نوبت ۴۵ و ۹۰ روز بعد از کاشت هم در کاهش شدت بیماری و هم افزایش محصول در سطح یک درصد معنی‌دار بود.

سپاسگزاری

این مقاله از پروژه تحقیقاتی خاص به شماره ۹۸۰۲۹۱-۰۴۷-۱۶-۵۵-۲۴ استخراج شده است که گزارش نهایی آن با شماره فروست ۵۷۷۷۱ مورخ ۴/۵/ ۹۹ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی به ثبت رسیده است. تامین کننده مالی پروژه شرکت زیست فناور سبز بوده است که بدینوسیله از آن شرکت قدردانی می گردد.

" هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد " .

REFERENCES

1. Asaka, O. & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 4081-4085.
2. Behdad, E. (1980). *Diseases of field crops in Iran*. Ashrafi publications. Esfahan. Iran. 428p.
3. Bhattacharyya, P. N. & Jha, D. K. (2012). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9.
4. Brantner, J. R. & Windels, C. E. (1999). In furrow and postemergence application of Quadris for control of Rhizoctonia damping off and root and crown rot. *Sugar beet Research and Extension Reports*, 29, 275-277.
5. Büttner, G., Pfähler, B. & Märländer, B. (2004). Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to Rhizoctonia root and crown rot .*Plant Breeding*, 123, 158-166.
6. Dunleavy, J. (1955). Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 45, 252-258.
7. El-Kazzaz, M. K., Badr, M. M., El-Zahaby, H. M. & Gouda, M. I. (2002). Biological control of seedling damping-off and root rot of sugar beet plants. *Plant Protection Science*, 38(2), 645–647.

8. Fendrihan, S., Constantinescu, F., Sicuia, O. A. & Dinu, S. (2016). Beneficial Bacillus strains improve plant resistance to phytopathogens: a review. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 1(2), 137-142.
9. Fiddaman, P. J. & Rossal, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 119-126.
10. Fiddaman, P. J. & Rossal, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 395-405.
11. Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S. & White J. J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defense gene expression in maize. *Microbiological Research*, 172, 79-87.
12. Harveson, R. M., Hein, G. L., Smith, J. A., Wilson, R. G. & Yonts, C. D. (2002). An integrated approach to cultivar evaluation and selection for increased profitability: a successful case study for the Central High Plains. *Plant Disease*, 86, 192-204.
13. Hecker, R. J. & Ruppel, E. G. 1975. Inheritance of resistance to Rhizoctonia root rot in sugarbeet. *Crop Science*, 15, 487-490.
14. Hussain, T. & Khan, A. A. (2019). *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its antifungal activity against potato black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on tuber, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, doi: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101443
15. Jamali, H., Sharma, A., Roohi & Srivasta, A. K. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 60(3), 268-280.
16. Karimi, E., Sadeghi, A., Abbaszade Dehaji, P., Dalvand, Y., Omidvari, M. & Kakouie nezhad, M. (2012). Biocontrol activity of salt tolerant Streptomyces isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 22, 333-349
17. Karimi, E, Safaie, N., Shams-Baksh, M. & Mahmoudi, S. B. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates Rhizoctonia damping-off disease on sugar beet. *Microbiological Research*, 192, 221–230.
18. Kajimora, Y., Svgiyama, M. & Kaneda, M. (1995). Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* FR-2. *The Journal of Antibiotics*, 48 (10), 1095-103.
19. Kiewnick, S., Jacobsen, B. J., Braun-Kiewnick, A., Eckhoff, J. L. A. & Bergman, J. W. (2001). Integrated control of Rhizoctonia crown and root rot of sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. *Plant Disease*, 85, 718-722.
20. Mahmoudi, S. B., Mesbah, M. & Alizadeh, A. (2004). Pathogenic variability of sugar beet isolates of *Rhizoctonia solani*. *Iranian Journal of PlantPathology*, 40 (3-4), 253-280.
21. Mahmoudi, S. B. & Soltani, J. (2005). Sugar beet root rot in Iran. *Newsletter of Training Center for Studying Sugar Industry in Iran*, 178, 14-18.
22. Mahmoud, A. F. (2016). Suppression of sugar beet damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using bacterial and fungal antagonists. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(19–20), 575–585. http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2016.1245052.
23. Narasimhan, A. & Shivakumar, S. (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* root rot of chilli by *Bacillus subtilis* formulations under pot conditions. *Journal of Biological Control*, 30(2), 109-118, doi: 10.18641/jbc/30/2/91995
24. Neeta, L. & Manjusha, C. (2017). Production of Levansucrase from a soil isolate *Bacillus subtilis* (DQ922949). *International Journal of Emerging Trends in Science and Technology*, 4, 5714-5721.
25. Rother, B. (1999). Situation of Rhizoctonia in Europe. *International Institute for Sugar Beet Research Info*, 4, 2-6.
26. Qi, Y., Patra, G., Liang, X., Williams, L. E., Rose, S., Redkar, R. J. & DelVecchio, V. G. (2001). Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-ime PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3720-3727.
27. Shahiri Tabarestani, M., Falahati Rastegar, M., Jafarpour, B. & Rohani, H. (2004). Investigation of antagonistic effect of *Bacillus subtilis* on biological control of sugar beet damping-off disease. *Sugar Beet*, (20) 2, 161-175.
28. Suslow, T. V. & Schroth, M. N. (1982). Rhizobacteria of sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, 72, 199-206.
29. Windels, C. E., Kuznia, R. A. & Call, J. (1997). Characterization and pathogenicity of *Thanatephorus cucumeris* from sugar beet in Minnesota. *Plant Disease*, 81, 245-249.
30. Whitney, E. D. & Duffus, J. E. (1986). *Compendium of beet diseases and insects*. APS Press. 76p.