جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سال سیزدهم، شماره (۲) ۱۳۸۶

تفاوت در حساسیت جدایه‌های قارچی *Fusarium moniliforme* به آنتی بیوتیک تولیدی توسط سود و مونادهای فلورسنت جدا شده از مزارع برنج استان گیلان

معصومه انوری
استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت
مصطفی نیک‌نژاد کاظم‌پور
استادیار گروه گیاه پزشکی دانشگاه گیلان

چکیده
در این پژوهش جدایه‌های قارچ *F.moniliforme* (عامل پوسیدگی طوقه و ریشه برنج) و باکتری‌های آنتاگونیست جنس سودوموناس از مزارع برنج استان گیلان، جداسازی و شناسائی شده و حساسیت ایزوله‌های قارچ به آنتی بیوتیک‌های تولیدی توسط سودومونادهای فلورسنت که از توانائی کنترل بیولوژیک این قارچ برخوردارند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشانه تنوع قابل توجه در حساسیت جدایه های قارچ به آنتی بیوتیک فوق بود. بجز یک ایزوله، سایر ایزوله‌های قارچی در غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر به آنتی بیوتیک حساسیتی بیش از ۸۰ درصد نشان دادند. یافته‌های حاصل تائیدی بر اهمیت نقش آنتی بیوتیک‌ها در اعمال کنترل بیولوژیک توسط گونه‌های فلورسنت جنس سودوموناس هم در شرایط آزمایشگاه و هم گلخانه است. با توجه به اینکه در میان جمعیت قارچی پاتوژن جدایه های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود دارد نتایج این تحقیق ضرورت استفاده از مخلوطی از گونه‌های جنس سودوموناس را که با مکانیسم های متفاوتی قادر به کنترل بیماری هستند در کنترل بیولوژیک بیماری مطرح می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه و ریشه برنج، فوزاریوم مونیلیفورم، آنتاگونیست، آنتی بیوتیک.

مقدمه
بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج با عامل بیماریزای (*Fusarium moniliforme*) یکی از بیماری‌های مهم برنج در ایران و اکثر کشورهای برنج خیز در جهان محسوب می‌شود و روی ارقام پر محصول و حساس برنج در استان‌های برنج خیز کشور مانند گیلان و مازندران و اصفهان ایجاد آلودگی می‌کند. میزان خسارت بیماری در قاره آسیا ۴۰ درصد و در ژاپن ۴۰ تا ۵۰ درصد برآورد شده است (۲). در ایران میزان خسارت بیماری را ۵ تا ۸ درصد ذکر کرده اند اما در بعضی شالیزارهای لنجان از اصفهان تا ۱۵ درصد هم می‌رسد (۱). بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج یک بیماری خاکزاد بوده ولی عموما توسط بذر آلوده نیز انتقال می‌یابد (۲).
مطالعات متعدد توانائی سودومونادهای فلورسنت مستقر در فراریشه را در مهار بیماری‌های حاصل از پاتوژنهای گیاهی ثابت کرده است. این ریزوباکترها این عمل را با مکانیسم آنتی بیوز با تولید انواعی از ترکیبات ضد میکروبی مانند ۲ ، ۴ - دی استیل

تاریخ دریافت مقاله ۸۴/۵/۵
تاریخ دریافت نسخه نهایی ۸۴/۸/۲۶

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سورو سوسیون، اوروسیسین، ستریهه، پیوتوسورین و پیروسترین انجام می‌دهند (۱)، برخی از جدایه‌های سودوموناس نیز عمل کنترل بیولوژیک را برمبنای رقابت برای عنصر آهن با تولید سیدروفور انجام می‌دهند و بدین ترتیب در شرایط فقر آهن پاتوژن را از دسترسی به آهن محروم می‌نمایند (۶). از سایر راه‌های مورد استفاده توسط این باکتریها برای مقابله با عوامل بیماریزا می‌توان به ایجاد مقاومت القائی و تسریع رشد گیاه اشاره کرد (۸).

با اینحال کارائی باکتریهای مسئول کنترل بیولوژیک بر جدایه‌های قارچی مختلف یکسان نیست. به عنوان مثال جدایه‌های موجود در یک جمعیت به متابولیت‌های ضد قارچی تولید شده توسط باکتری‌های مسئول کنترل بیولوژیک حساسیت یکسان نشان نمی‌دهند. گروسیدای و همکاران وی نشان داده‌اند که حساسیت جدایه‌های *Pyhium* نسبت به آنتی بیوتیک فنازین کربوکسیلیک اسید از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار است (۵). جونز و همکاران وی نیز ثابت کرده‌اند که جدایه‌های قارچی *R.solani* نسبت به آنتی بیوتیک تولیدی توسط *Gliocladium virens* حساسیت یکسان نشان نمی‌دهند (۷). لذا این تحقیق با هدف بررسی تعیین تنوع حساسیت جمعیت قارچی *F.moniliforme* به آنتی بیوتیک فنازین کربوکسیلیک اسید در شرایط آزمایشگاه و نیز توانائی باکتری‌های مولد آنتی بیوتیک جداسازی شده از مزارع برنج استان گیلان در کنترل بیولوژیک بیماری در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

۱ - جداسازی جدایه های قارچی

برنجهای آلوده از مزارع مختلف رشت جمع‌آوری گردیده، به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور جداسازی قارچ مزبور ابتدا طوقه و ریشه آلوده به مدت ۵ دقیقه با جریان ملایم آب شسته شدند. سپس قطعاتی به طول یک سانتی‌متر از بافتهای آلوده تهیه گردید. این قطعات به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شده و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در آب مقطر سترون شستشو داده شدند و بعد در تشتک‌های پتری به قطر ۹ سانتیمتر حاوی محیط کشت PDA (عصاره سیب‌زمینی، قنددکستروز و آگار) کشت گردیدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند . پرگنه های قارچی روی محیط کشت آب آگار به روش تک اسپور خالص سازی شدند (۱۵).

۲- تکثیر قارچ *F.moniliforme* و اثبات بیماریزایی آن روی رقم برنج خزر

جهت تکثیر قارچ از روش کریت لوو و همکاران (۱۰) استفاده شد. بدین ترتیب ۳۰۰ گرم بذر جو در فلاسکهای نیم لیتری سترون گردیدند. سپس درهر یک از فلاسک‌ها یک قطعه از کشت ۵ روزه *F.moniliforme* قرار داده شد. برای تیمار شاهد، جهت مخلوط نمودن با خاک تنها از بذر جو سترون استفاده گردید. فلاسک‌های تلقیح شده به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند پس از این مدت قارچ *F.moniliforme* به خوبی روی دانه‌های جو رشد کرده و تولید اسپور و میسلیوم نمود.

جهت اثبات بیماریزایی از روش سینگ و همکاران (۱۶) استفاده شد. بدین ترتیب تلقیح قارچ مایه بدست آمده به نسبت ۱۰ درصد حجمی با یک سوم خاک استریل قسمت فوقانی گلدان (با قطر دهانه ۲۵ سانتیمتر) مخلوط گردید و سپس در هر گلدان ۲ گرم بذر کشت گردید. این آزمایش در ۴ تکرار انجام شد و گلدانها پس از کاشت در شرایط گلخانه نگهداری شده، رطوبت مناسب برای ایجاد آلودگی آنها از طریق آبیاری تامین گردید.

۳ - جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از خاک

۱-۳- نمونه‌برداری خاک

نمونه‌های خاک از منطقه ریزوسفر برنجهای آلوده از مناطق مختلف استان گیلان جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد، نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از ۱۰ گیاه را با یکدیگر مخلوط کرده و از هر نمونه خاک مخلوط شده یک گرم برداشته شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون رقت‌های مختلف آن به طور سریال تهیه گردید (۱۵).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲-۳- جداسازی باکتریها از خاک

بدین منظور باکتریها در سطح محیط king ,s B (محیط جامد انتخابی برای جداسازی گونه های فلورسنت جنس سودوموناس) کشت داده شده و پلیتها ۲۴ ساعت در ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس کلنیها تحت تابش UV با طول موج ۳۵۶ نانومتر قرار گرفته و کلنیهای برخوردار از خاصیت فلوئورسانس در این محیط مجدداً ، خالص شدند (۱۳).

۴ - غربالگری اولیه فعالیت ضد قارچی

بدین منظور جدایه‌های باکتری به صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک‌ها و به فاصله یک سانتیمتر از حاشیه آنها در چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت NA+PDA به منظور تامین همزمان رشد قارچ و باکتری، مایه زنی شدند (۱۷). یک حلقه به قطر پنج میلیمتر از کشت ۵ روزه قارچ در مرکز آنها قرار داده شد. در تشتک‌های پتری شاهد، فقط از آب مقطر سترون استفاده گردید . تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از ۱۲ روز که حاشیه پرگنه قارچ در تشتکهای پتری شاهد به دیواره تشتک پتری برخورد نموده بود ، فواصل بازدارندگی بین جدایه های باکتری و حاشیه پرگنه قارچ اندازه‌گیری گردید.

۵ - آزمونهای افتراقی برای تشخیص باکتری‌های آنتاگونیست

جدایه‌های انتخاب شده در بررسی ایجاد هاله F1، F6، F12، F15، F16، F18، F21 و F25 طبق آزمون‌های زیر مورد مقایسه قرار گرفتند. واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، هیدرولیز نشاسته، ژلاتین، آرژنین و آرابیتوز، آزمون استفاده از سیترات، آزمون کاتالاز، ایندول، لیسیتیناز، احیاء نیترات تست فوق حساسیت و رشد در نمک طعام، آزمون تولید لوان، لهانیدن سیب‌زمینی، آزمون اکسیداز، سیترات، هیدرولیز کازئین و ال- لیزین، استفاده از قندهای آرابینوز، اینوسیتول، تری هالوز، مالتوز، گالاکتوز و سوربیتول به روش شاد (۱۵) انجام شد.

۶ - بررسی تولید آنتی بیوتیک توسط باکتریهای آنتاگونیست

این آزمون مطابق روش کراس و لوپر (۹) انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست با غلظت 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر و همچنین آب مقطر سترون برای شاهد به محیط کشت NA+PDA اضافه گردیده (۱۷) و توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. پس از این مدت با استفاده از لام سترون، کلنی جدایه‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری و تشتک‌های پتری به طور وارونه به مدت ۲۵ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس یک دیسک به قطر ۵ میلیمتر از حاشیه کشت هفت روزه قارچ *F.moniliforme* برداشته و با رعایت شرایط سترون، در مرکز هر تشتک پتری کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری قطر رشد قارچ پس از ۱۰ روز انجام گردید. این آزمایش در چهارچوب طرح کاملا" تصادفی شامل ۸ تیمار با ۳ تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. درصد بازداری از رشد با استفاده از رابطه سیوان و همکاران (۱۷) محاسبه گردید.

درصد بازدارندگی از رشد = (قطر رشد پرگند شاهد - قطر رشد پرگند تیمار) / قطر رشد پرگند شاهد × ۱۰۰

۷ - استخراج و تخلیص آنتی بیوتیک

بدین منظور از باکتری P15 که از بیشترین توانائی در تولید آنتی بیوتیک برخوردار بود استفاده شد و آنتی بیوتیک‌ها طبق روش توماس شاو و همکاران وی به ترتیب زیر از کشت باکتری استخراج شد (۱۸).

ابتدا باکتری در محیط آبگوشت Luria Berthani (LB) به مدت ۷۲ ساعت در ۲۷ درجه روی شیکر ۸۰ دور در دقیقه کشت داده شد. سپس کشت در ۱۳۰۰ دور بمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و بخش روئی جداسازی گردید. به منظور حصول اطمینان از عدم وجود باکتری، محلول از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس pH آن توسط اسید کلریدریک به ۲ رسانده شد و سپس ۲۰۰ میلی لیتر بنزن به آن افزوده و به مدت ۲ ساعت روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس جز آلی با سولفات سدیم آبگیری و طی تبخیر خشک گردید به رسوب حاصله استات سدیم ۵ درصد اضافه شد و این مرحله دو بار تکرار گردید. با این روش کارائی بازیابی آنتی بیوتیک‌ها تولیدی به ۹۰ تا ۱۰۰ درصد می‌رسد.

۸ - تعیین حساسیت جدایه های قارچ به آنتی بیوتیک

این آزمایش براساس روش مازولا و همکاران وی انجام شد (۱۱). با توجه به اینکه رشد این قارچ و سایر پاتوژنهای قارچی توسط آنتی بیوتیکها در غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر مهار می‌شود، لذا یک حلقه ۵ میلی لیتری از کشت ۴ روزه هر جدایه قارچ به طور جداگانه در محیط PDA حاوی یک میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک‌ها (تخلیص شده طی مرحله قبل) قرار داده شد. به پلیت شاهد بجای آنتی بیوتیک فوق آب مقطر استریل اضافه شد. قبل از افزودن آنتی بیوتیک به محیط، آنتی بیوتیک در محلول NaHCO3 ۵ درصد سوسپانسیونه شد. سپس کشت‌ها در ۲۵ درجه انکوبه و رشد شعاعی میسلیوم قارچ پس از ۶ روز اندازه‌گیری شد. این آزمایش برای ۲۲ جدایه قارچی بطور جداگانه انجام شد. نتایج بصورت درصد مهار رشد قارچ در مقایسه با شاهد از صفر تا صد درصد بترتیب برای عدم مهار رشد قارچ و مهار رشد کامل قارچ بر اساس رابطه سیوان و همکاران وی (۱۷) تعیین شد .

۹- آزمایشات گلخانه‌ای به منظور بررسی مهار بیماری توسط جدایه‌های آنتاگونیست

۹-۱- تهیه مایه تلقیح جدایه های باکتریایی

بدین منظور سوسپانسیونی از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌های آنتاگونیست روی محیط کشت NA با غلظت ۱×۱۰^{۹} سلول در هر میلی‌لیتر (cfu) تهیه گردید. این آزمایش در غالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی بصورت پوشش و آغشته‌سازی بذر (seed coating)، در سه تکرار اجرا گردید.

۹-۲- آغشته سازی بذر (تیمار بذر)

بدین منظور مقدار کافی از بذور برنج به مدت ۲۴ ساعت در آب معمولی خیسانده شد. و سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپو کلریت سدیم یک در صد قرار گرفته و سه بار توسط آب مقطر سترون شستشو شدند. جهت آغشته‌سازی بذور با جدایه‌های آنتاگونیست از روش رابیندران و ویدهیاسکاران (۱۲) استفاده شد. بدین ترتیب بذور ضدعفونی شده به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱×۱۰^{۹} cfu در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. بذور شاهد پس از ضدعفونی سطحی در آب مقطر سترون با سایر تیمارها نگهداری شدند.

۹-۳- کشت بذور و نگهداری گلدانهای حاوی بذور تیمار شده

پس از ضد عفونی کردن خاک تهیه شده از مزارع برنج به مدت ۲ ساعت تحت بخار آب و کشت بذور تیمار شده، همه گلدانهای قبل از مایه زنی مصنوعی با جدایه‌های قارچ عامل بیماری در محل گلخانه با شرایط نوری متناوب شبانه روزی و درجه حرارت ۲۸ درجه سانتیگراد نگه‌داری گردیدند. در این مدت از خشک شدن آب گلدان‌ها جلوگیری گردید.

۴-۹- ارزیابی میزان بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج

جهت ارزیابی میزان بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج بدین شکل عمل شد که چهار ماه پس از مایه زنی قارچ به خاک گلدان‌ها، علایم بیماری در تیمار شاهد آلوده مشاهده گردید. سپس بوته‌های بیمار در هر تیمار بیرون آورده شد. پس از بررسی وضعیت طوقه و ریشه‌ها و مشاهده علایم بیماری، از هر تیمار ده قطعه (از منطقه زخم) و مجموعا ۸۰ قطعه جدا شد. بدین ترتیب هر تیمار شامل یک جدایه آنتاگونیست باکتریایی بود قطعات با محلول ۰/۵ در صد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی سطحی گردید و روی محیط PDA کشت داده شد. پس از هفت روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، قطعاتی که کلنی قارچ در ناحیه غلاف رشد کرده بود شمارش و با مشاهده میکروسکوپی شناسایی شدند (۱۱). برای تعیین میزان بیماری در تیمارها و شاهد از فرمول سیوان و همکاران (۱۷) استفاده شد:

$$DR\% = 1- (DT/DC)\ 100$$

محاسبه گردید که DT[1] بیماری در تیمار و DC[2] بیماری در شاهد می باشد.

نتایج

۱ - جداسازی و شناسائی جدایه های قارچی

با توجه به شکل کلنی قارچ و نیز شکل و اندازه ماکروکونیدیها و نیز تعداد سلولهای هر ماکروکنیدی قارچ جداسازی شده تحت عنوان فوزاریوم مونیلیفورم شناسائی گردید. مجموعاً از نمونه های جمع آوری شده ۲۲ جدایه قارچی جداسازی گردید که بصورت Fm1 ... Fm22 نامگذاری گردیدند.

۲ - جداسازی و شناسائی باکتریها

نتایج نشان داد که از تعداد ۲۶۶ جدایه باکتریائی ۱۲ جدایه بیشترین قدرت را در ایجاد هاله بازدارندگی داشتند که به عنوان جدایه‌های آنتاگونیست انتخاب گردیدند.

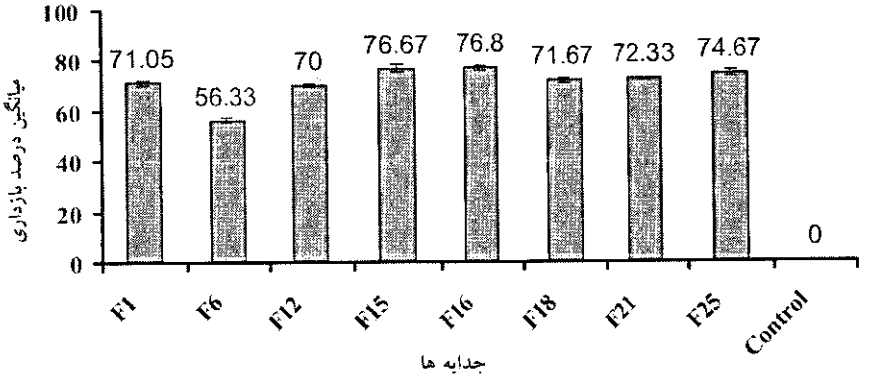
۳ - تاثیر جدایه های سودوموناد فلورسنت در جلوگیری از رشد *F.moniliforme*

بر اساس آزمون رنگ آمیزی گرم مشخص گردید که ۸ جدایه از ۱۲ جدایه آنتاگونیست انتخابی گرم منفی بودند و براساس نتایج آزمون‌های افتراقی تحت عنوان سودوموناس فلوئورسانس (biovar III) شناسائی شدند و به صورت F1 , F6 , F12 , F15 , F16 , F18 , F21 , F25 نامگذاری شدند.

۴ - نتایج حاصل از تولید آنتی‌بیوتیک

هر ۸ جدایه آنتاگونیست F1 ، F6 ، F12 ، F15 , F16 ، F18 ، F21 وF25 از *P.fluorescens* قادر به تولید آنتی‌بیوتیک بودند. این جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ با شاهد داشتند .

1. Disease Treatment
2. Disease Inoculated Control

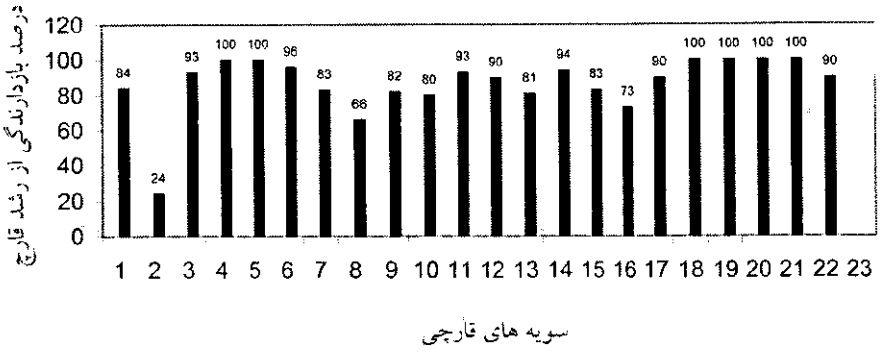


شکل ۱ - تاثیر آنتی‌بیوتیک جدایه‌های سودوموناس در جلوگیری از رشد قارچ *F.moniliforme*

براساس مقایسه میانگین‌ها جدایه F16 با ۶۹/۳۱ درصد دارای بیشترین و جدایه F6 با ۵۹/۲۶ درصد کمترین تأثیر را در بازداری از رشد داشتند (شکل ۱).

۵ - نتایج حساسیت ایزوله های قارچ به آنتی بیوتیک ها

شکل شماره ۲ نتایج مربوط به حساسیت ایزوله های قارچ به آنتی بیوتیک را نشان می‌دهد.



شکل ۲ - درصد بازداری از رشد جدایه های قارچ توسط آنتی بیوتیکهای تولید شده توسط جدایه آنتاگونیست F15

حساسیت جدایه‌های قارچ نسبت به آنتی بیوتیک از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار بود تیمارها در سطح یک درصد با شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند جدایه F.m2 با ۲۴ درصد کمترین حساسیت را به آنتی بیوتیک‌ها در غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد و جدایه‌های F.m20, F.m19 , F.m18 , F.m5 و F.m4 نسبت به آنتی بیوتیک حساسیت کامل (صد درصد) نشان دادند. در مجموع بیش از ۹۹ درصد جدایه ها حساسیت بالای ۸۰ درصد نسبت آنتی بیوتیک نشان دادند.

۶ - نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

۱ - ۶ - تعیین بیماریزایی جدایه قارچ F.moniliforme

بوته‌های برنج پس از ۱۲ هفته علائم پوسیدگی طوقه و ریشه را بطور کامل نشان دادند. در آزمون کخ نیزخصوصیات میکروسکوپی قارچ جدا شده از بوته‌های آلوده، با قارچ تلقیح شده کاملاً یکسان بود.

۲- ۶- بررسی‌های گلخانه‌ای اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی انتخابی در جلوگیری از بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج توسط *F.moniliforme*

نتایج تجزیه واریانس تاثیر جدایه‌های آنتاگونیست روی میزان بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج نشان داد که بین جدایه‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱ - مقایسه تاثیر جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی در کاهش بیماری پوسیدگی طوقه ریشه برنج در اثر *F.moniliforme* چهار ماه پس از کاشت طی پوشش بذر

تیمار	پوشش بذر درصد کاهش بیماری
Fm [1]	۰ i
F1 + Fm	۵۲/۵۵ f
F6 + Fm	۴۶/۶۶ g
F12+Fm	۴۷/۳۲ g
F15+ Fm	۵۷/۵۵ e
F16 +Fm	۴۲/۵۵ h
F18 +Fm	۴۶/۷۵ g
F21 +Fm	۴۸/۷۵ g
F25 +Fm	۴۲/۷۵ h

تیمارهای با حرف مشترک، در سطح ۱٪ اختلاف معنی دار ندارند. Fm : مایه تلقیح *F.moniliforme* است.

ارزیابی نتایج تجزیه آماری روی میزان بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج بوسیله کشت بافت‌های آلودهٔ ریشه و طوقه در طرح کاملاً تصادفی نشان داد که مقایسه میانگین تیمارها در آزمون دانکن در سطح ۱ ٪ تفاوت معنی دار وجود دارد و بین تیمارهای بذر، در همه جدایه ها نسبت به شاهد تفاوت معنی داری وجود داشت. جدایه F15 در تیمار بذر با ۳۹/۴۵ درصد دارای بالاترین کاهش میزان بیماری بوده در حالیکه جدایه F6 با ۳۴/۵۵ درصد پایین ترین کاهش میزان بیماری نسبت به شاهد را داشت.

بحث

طی دو دهه گذشته جدایه‌های بسیاری از گونه‌های فلوئورسانس جنس سودوموناس و مولد آنتی بیوتیک می‌باشند از گیاهان (رشد کرده) در خاک‌های نواحی متنوع جغرافیایی جدا شده اند. این باکتری‌های مولد آنتی بیوتیک جدا شده از خاک بطور طبیعی مهار کننده بیماری‌ها هستند. مثال‌هایی از این مواد کنترل بیماری پاخوره در گندم، پوسیدگی ریشه در تنباکو و پژمردگی سیب زمینی (ناشی از فوزاریوم) می‌باشند. در میان آنتی بیوتیکهای تولیدی توسط این باکتریها، پیولوتئورین(plt)، پیرولنیترین (prn)، فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (PCA) و ۲ و۴- دی استیل فلوروگلوسینول (Phl) بیشتر از نظر کنترل بیولوژیک مورد توجه محققان قرار گرفته اند. نتایج حاصل از تکنیکهای مولکولی و نیز جداسازی مستقیم جدایه ها هر دو نشان دهنده نقش منحصر به فرد این آنتی بیوتیکها پس از تولید در اسپرموسفر و فراریشه در مهار پاتوژنهای گیاهی است که از طریق خاک به گیاه آسیب وارد می‌سازند (۲). علیرغم اهمیت آنتی بیوزیز در کنترل بیولوژیک اطلاعات ناچیزی در مورد فراوانی و پراکندگی طبیعی اکولوژیک این جدایه ها وجود دارد . امروزه با کلون سازی و تعیین ترادف ژنهای مولد آنتی بیوتیک و بهره گیری از پرایمرها و شناساگرهای[1] اختصاصی می توان حضور این باکتریها را بطور طبیعی ثابت کرد (۸).

1. probes

در این تحقیق مجموعاً ۲۶۶ جدایه باکتریائی از منطقه فراریشه برنج آلوده جداسازی گردیدند که توانائی آنتاگونیستی ۱۳ جدایه از این باکتریها علیه قارچ عامل بیماری بر اساس قدرت هاله بازدارندگی ناشی از تولید ترکیبات برون سلولی با استفاده از روش کشت متقابل (Dual culture) به اثبات رسید. هر چند که کلیه جدایه‌های آنتاگونیست *P.fluorescens* از منطقه ریزوسفر برنج جداسازی شده بودند ولی مشخص گردید که توانایی آنتاگونیستی متفاوتی با یکدیگر دارند. جدایه‌های آنتاگونیست در آزمونهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تفاوتهایی را با یکدیگر و با دیگر جنس‌های باکتریائی نشان دادند. در نتیجه با توجه به نتایج حاصل از این آزمایشات، ۸ جدایه F1، F6، F12، F15، F16، F18، F21 وF25 از باکتری *P.fluorescens* و F14، F19، F32 و F35 گونه *B. cereus* تشخیص داده شدند. به دلیل اینکه تحقیق حاضر صرفاً به بررسی اثر ضد قارچی سودوموناسها بر پاتوژن قارچی معطوف گردید لذا سویه های جنس باسیلوس مورد آزمونهای بعدی قرار نگرفتند.

در تحقیق تاثیر آنتی‌بیوتیک جدایه *P. fluorescens* در جلوگیری از رشد قارچ *F.moniliforme* روی محیط کشت NA + PDA مشخص گردید که آنتی‌بیوتیک تولید شده توسط این جدایه‌ها، باعث بازداری از رشد قارچ مذکور در مقایسه با شاهد می‌گردند. به طوری که جدایه F15 توانست به میزان ۷۰ درصد از رشد قارچ *F.moniliforme* ممانعت بعمل آورد.

ایزوله‌های قارچ *F.moniliforme* در حساسیت نسبت به آنتی بیوتیکهای تولیدی توسط جدایه های سودوموناس فلورسنت تنوع نشان دادند تنها یک جدایه از کل جدایه های قارچی جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک حساسیت ناچیزی نشان داد و سایر جدایه ها حساسیت بیش از ۸۰ درصد نشان دادند.

نتایج حاصله مشابه با نتایج جونز و پتی درتنوع حساسیت قارچ *R.solani* به گلیوتوکسین شباهت دارد (۷).

گروسیدای و همکاران وی نیز دریافتند که جدایه های قارچ *G.graminis* var.*tritici* در حساسیت به آنتی بیوتیکهای فنازین کربوکسیلیک اسید و ۲و۴ - دی استیل فلورگلوسینول تنوع نشان دادند (۵).

میکروارگانیسمهای آنتاگونیست بصورت پوشش بذر مورد استفاده قرار گرفته و با کلنیزه نمودن منطقه فراریشه و تولید ترکیبات آنتی بیوتیک موجب کنترل عوامل بیماریزا می‌شوند. در این تحقیق جدایه آنتاگونیست *P.fluorescens* بکار گرفته شده بصورت پوشش بذر، باعث کاهش میزان بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج در شرایط گلخانه شدند. میزان کاهش بیماری در جدایه F15 بیش از سایر جدایه‌ها بود. ظاهرا سلولهای باکتری بشکل اپی فیت از طریق بذر به ریشه، ساقه و برگها حرکت می‌کنند. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج روزال و میو (۱۴) روی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه برنج کاملا مطابقت داشت.

مجموعاً نتایج حاصله تائید کننده نتایج قبلی مبنی بر حساسیت بالای جدایه های قارچی پاتوژن گیاهی به آنتی بیوتیک فنازین کربوکسیلیک اسید است.

بنظر توماس شاو و ولر تفاوت در حساسیت قارچ های فیتوپاتوژن به آنتی بیوتیک های ضد قارچی نشانه آن است که مکانیسم های ناشناخته دیگری در مهار عوامل پاتوژن توسط رایزوباکتر های آنتاگونیست وجود دارند که هنوز بخوبی شناخته نشده اند (۱۸). بعبارتی دیگر اینکه باکتری های تولید کننده فنازین در غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار تمام ایزوله های قارچ بطور یکسان نیستند نشانه آنستکه برخی از جدایه های قارچ بیماریزا از حساسیت بیشتری نسبت به مکانیسم های آنتاگونیستی اعمال شده توسط این باکتری های برخوردارند.

به عقیده مازولا و همکاران وی تنوع حساسیت قارچ *G.graminis* var.*tritici* به متابولیت های ضد قارچی تولیدی توسط سودوموناده‌ای فلورسنت را می توان به ویژگی های ژنوتیپی قارچ منسوب نمود (۱۱). این نظریه در مورد قارچ *F.moniliforme* نیز قابل تامل است با این ایده می توان در آینده نزدیک به چشم انداز های نوینی در مورد ویژگی های ژنتیکی جدایه های مقاوم و حساس قارچ و شناسائی ژنهای مسئول مقاومت به آنتی بیوتیک های ضد قارچی و در نتیجه به کنترل بیولوژیک قارچ با کارائی موثر دست یافت.

منابع و مآخذ:

۱. پاداشت دهکایی، ف. ۱۳۷۲. بررسی بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گیلان. پایان نامه فوق لیسانس. دانشکده کشاورزی کرج - تهران. ۱۱۲ صفحه .

2. Baker , PA., R. Van Peer and B. Schippers. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogen by fluorescent pseudomonads : Mechanisms and prospect. In biotic interaction and soil born disease. Elsevier Sciences publisher USA – pp. 217-230.
3. Brion K. Duffy and Genevie Defago . 1999 . Environmental Factors Modulating Antibiotic and Siderophore Biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65 , No. 6 pp. 2429–2438
4. Corbell, N. and Loper, J. E., 1995 A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.*, , 177, 6230–6236.
5. Gurusiddaiah, S., D. M. Weller, A. Sarkar, and R. J. Cook. 1986. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 29:488–495.
6. Herbert, R. B., Holliman, J. H. and Sheridan, J. B., 1976 .Biosynthesis of microbial phenazines: incorporation of shikimic acid. *Tetrahedon Lett.*, , 8 , 639–642.
7. Jones, R. W., and R. E. Pettit. 1987. Variation in sensitivity among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* to the antibiotic gliotoxin. Plant Dis. 71:34–36
8. Jos M. Raaijmakers David M. Weller, and Linda S. Thomashow 1997. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63 , No. 3 pp. 881–887
9. Kraus J, Loper JE. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 849–854.
10. Kreit Low, K. W. 1949. Agriculture Experiment Station. *In*: http. izaak. Unh. Edu/archives/guides /scicontributions. Htm-101k .
11. Mazzola. M, . Debpra K. Fujimoto, Linda S. Thomashow, and R. James Cook. 1995. Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to Antibiotics Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. and Effect on Biological Control of Take-All of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 7 , p. 2554–2559
12. Rabindran, R.., and P. Vidhysaekaran. 1996. Development for formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfalr2 for management of rice sheath blight. Crop Protection. Vol. 15. No.8. 715- 721.
13. Ramesh Kumar N, V. Thirumalai Arasu and P. Gunasekaran. 2002. Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens Current Science*, VOL. 82, NO. 12, 25
14. Rosales, A.M, and T.W. Mew. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. Plant Disease. 81: 49-52.
15. Schaad, N. W. 2001. Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic bacteria. Thrid eds. APS. St. Paul. Minnesota, USA. 373.
16. Singh, V. and B.J. Deverall. 1984. *Bacillus subtilis*, as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc. 83(3):487-490
17. Sivan, A., O. Ucko and I. Chet. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field condition. *Plant Disease*. 71, 587 - 595.
18. Thomashow. Linda S, David M. Weller, Robert F. Bonsall, and Leland S. Pierson 1990. Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent Pseudomonas species in the Rhizosphere of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 4, p. 908-912

JOURNAL OF
AGRICULTURAL
SCIENCES
Islamic Azad University

Different Fensitivity of *fusarium moniliforme* Strains to Antibiotices Produced by Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Isolated from Guilan rice Fields

M. Anvary
Assistant Prof, Biology Department, Islamic Azad University, Rasht
M. Niknejad Kazempour
Assistant Prof, Depatment of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Guilan University

Abstract
Isolates of *fusarium moniliforme*, the causal agent of collar and root rot of rice varied in sensitivity *in vitro* to antibiotic produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. which shown previously to have potential for biological control of this pathogen. One of isolates tested was insensitive to antibiotic at 1.0 mg/ml. *Pseudomonas fluorescens* produce antibiotic, effectively suppressed Bakana caused by antibiotic - sensitive isolate of *fusarium moniliforme*. Antibiotic -producing strains were able to suppress disease. These findings confirm the role of the antibiotics in the biocontrol activity of these fluorescent *Pseudomonas* spp. The results show further that isolates of fungus insensitive to antibiotic are present in the pathogen population and provide additional justification for the use of mixtures of *Pseudomonas* spp. that employ different mechanisms of pathogen suppression to manage this disease.

Keywords: sensitivity, *fusarium moniliforme*, antibiotic, *Pseudomonas fluorescens*