



بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج توسط آنتاگونیست‌های باکتریایی

سید افشین سجادی

کارشناس ارشد بیماری‌های گیاهی از دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات تهران

نادر حسن‌زاده

دانشیار و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات تهران

منصور بهرامی

کارشناس ارشد، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات برنج کشور- آمل

وحید خسروی

کارشناس ارشد، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات برنج کشور- آمل

چکیده

در این بررسی، مجموعاً ۱۸۶ جدایه باکتریایی از ریزوسفر، ریشه، ساقه و برگ و آب مزارع برنج آلوده و سالم استان مازندران در تابستان ۱۳۷۹ جدا شد. نخست با استفاده از روش کشت متقابل^۱ و روش پارک^۲، توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی، علیه قارچ *Rhizoctonia solani* بررسی شد. نتایج اولیه نشان داد ۴۷ جدایه از باکتریهای گرم مثبت و پسودومونادهای فلورسانت مثبت دارای خاصیت آنتاگونیستی می‌باشند. از این تعداد ابتدا ۸ جدایه برای آزمایش اول گلخانه‌ای و سپس از میان آنها ۴ جدایه که اثر بیشتری روی *R. solani* داشتند، برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مرفولوژیکی، جدایه‌های ۲۴، ۲۹، ۱۲۰ به ترتیب *B. cereus* و دو گونه *B. subtilis* شناسایی شدند در حالیکه جدایه‌های ۵، ۹۳، Ifu، B29 و T42 به *Pseudomonas fluorescens* تعلق داشتند. در بررسی‌های گلخانه‌ای، مشخص شد که جدایه‌های 5 و T42 بیشترین اثر را در کنترل بیماری دارند. در آزمایش اول (آغشته‌سازی بذور + اسپری پاشی) جدایه‌های 5، 24، ۹۳، ۱۲۰ و T42 به ترتیب، ۸۷، ۴۷، ۷۲، ۳۸ و ۹۳ درصد از بیماری را کنترل کردند در حالیکه قارچکش تیلت موجب ۷۴ درصد کنترل بیماری شد. و جدایه‌های ۲۹، Ifu، B29 اثری بر کنترل بیماری نداشتند. در آزمایش دوم، (آغشته‌سازی بذور + اسپری پاشی) جدایه‌های 5، ۲۴، ۹۳ و T42 که در آزمایش اول اثر بیشتری در کنترل کنندگی داشتند انتخاب شدند که به ترتیب ۳/۸۴، ۷/۵۴، ۵/۷۳ و ۷/۸۱ درصد بیماری را کنترل کردند در حالیکه قارچکش تیلت توانست ۹/۶۶ درصد بیماری را کنترل کند. در این بررسی‌ها مشخص شد تفاوت معنی‌داری بین آزمایش اول و دوم وجود ندارد و به نظر می‌رسد فقط ضد عفونی بذور برای کنترل بیماری کافی باشد که همه جدایه‌ها در آزمایش اول و دوم موجب افزایش ارتفاع بوته شدند. همچنین جدایه‌های 5، T42 موجب افزایش پنجه‌زنی و جدایه T42 موجب افزایش طول ریشه شد. جدایه‌های ۵، ۲۴، ۹۳، T42 باعث افزایش وزن خشک ریشه و ساقه شدند.

واژه‌های کلیدی: *Rhizoctonia solani*، باکتری‌های آنتاگونیست، سوختگی غلاف برگ برنج، مبارزه بیولوژیک

1. Dual culture
2. Park, 1989

مقدمه

بیماری سوختگی غلاف برگ برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn (مرحله جنسی *Thanatephorus cucumeris*) یکی از عوامل محدودکننده معرفی و توسعه ارقام پرمحصول جدید در اکثر کشورهای برنج‌خیز جهان از جمله ایران می‌باشد. به دنبال معرفی ارقام پرمحصول آمل ۲ و آمل ۳، خزر، سپیدرود، بچار، فجر و توسعه کشت این ارقام در استانهای مازندران و گیلان، بیماری سوختگی غلاف برگ برنج مشکل اصلی اینگونه ارقام گردید (۲). این بیماری برای اولین بار توسط میاک^۱ از ژاپن گزارش گردید و بعد از آن راین کینگ^۲ پالو^۳ وجود بیماری را در فیلیپین گزارش نمودند. از آن به بعد این بیماری در اکثر کشورهای آسیایی مشاهده و گزارش گردید و در حال حاضر در سراسر کشورهای برنج‌خیز جهان وجود آن به اثبات رسیده است (۲). کوزاکا^۴ گزارش نمود که قارچ عامل این بیماری قادر است ۱۸۸ گونه از ۳۲ خانواده مختلف گیاهان را آلوده نماید (۲). اولین کوشش‌ها در کاربرد مستقیم مبارزه علیه عوامل بیماریزای گیاهی توسط هارتلی (Hartley, 1921) و با کنترل قارچ *Pythium debaryanum* با ۱۳ قارچ آنتاگونیست انجام گرفت (۳).

دوی و همکاران^۵ در هند با استفاده از جدایه‌های فلورسانت و غیرفلورسانت باکتریایی که از ریزوسفر مزارع جنوب هند جدا شده بود از رشد هیف *R. solani* جلوگیری کردند. در این بررسی با پوشش بذور ارقام IR20 و TRM9 برنج بوسیله باکتری در سطح گلخانه به ترتیب ۴۴-۳۱ درصد و ۷۴-۵۸ درصد از بیماری را کنترل کردند و در مزارع برنج ۷۲-۶۵ درصد از بیماری سوختگی غلاف برگ برنج را کاهش دادند (۷).

تارا اوگنانامانیکام^۶ در هند از بین ۱۷۵۷ ایزوله جدا شده، توانستند آنتاگونیست‌های باکتریایی انتخاب کنند که در شرایط مزرعه موجب کنترل بیماری شیت بلایت برنج شدند. این جدایه‌ها *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* بودند. که به ترتیب ۶۸ و ۵۲ درصد بیماری را کنترل کردند در حالیکه قارچکش والیدامیسین بیماری را به میزان ۲۷٪ کنترل کرد (۱۳).

با توجه به عدم موفقیت در معرفی ارقام مقاوم و مشکلات متعدد در روش‌های شیمیایی مبارزه با این بیماری از جمله آلودگی محیط زیست و هزینه بالا، استفاده از عواملی طبیعی بخصوص باکتری‌های آنتاگونیست مورد توجه محققین قرار گرفته است و موفقیت‌هایی نیز بدست آمده است (۱).

جداسازی و انتخاب جدایه‌های موثر باکتری آنتاگونیست جهت مبارزه با بیماری سوختگی غلاف برگ برنج هدف اصلی این تحقیق به شمار می‌رود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه جدایه قارچ *R. solani*

برای جداسازی قارچ، بوته‌های آلوده برنج از مزارع مختلف استان مازندران جمع‌آوری شده و از حاشیه لکه‌ها و بین مرز سالم و آلوده غلاف قطعاتی به طول ۴-۵ mm تهیه شد. پس از شستشو با آب، به مدت ۳ دقیقه با هیپوکلریت سدیم (Na OCl) ۵٪ حجم به حجم، (وایتکس ۱۰٪) ضدعفونی سطحی انجام شد. سپس ۳ بار با آب مقطر شستشو شد و بر روی کاغذ صافی استریل خشک گردید. توسط اسکالپل استریل قطعات ریز در ابعاد ۱-۵ cm تهیه و به محیط WA^۷ منتقل شد. پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای 24-27°C، از نوک ریشه قارچ به محیط کشت PDA منتقل و جهت نگهداری طولانی مدت به لوله‌هایی که حاوی کاغذ صافی استریل و محیط کشت PDA^۸ بودند، منتقل شد. برای اثبات بیماریزایی از روش ترابی و بینش (۱۳۶۳) استفاده گردید (۲).

1. Miake, 1910
2. Rienking, 1918
3. Palo, 1926
4. Kozaka, 1965
5. Devi, et al 1989
6. Thara & Gnanamanickam, 1994
7. Water Agar
8. Potato Dextrose Agar

۲-۲- جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از مزارع برنج

جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از مزارع برنج طبق روش میو و روزالز انجام شد (۱۱). بوته‌های برنج بطور تصادفی از نقاط مختلف مزارع آلوده و سالم استان مازندران (آمل، بابل، امیرکلا، قائمشهر، ساری) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از جمع‌آوری خاک ریزوسفر ریشه و پس از مخلوط نمودن نمونه‌ها با یکدیگر، ۲۵ گرم از خاک در ۲۵۰ ml آب مقطر استریل حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. غلظت‌های مختلف بطور سریال تهیه گردید. بدین صورت که ۱۰ ml نمونه و ۹۰ ml آب مقطر استریل تاسری رقت 10^{-5} تهیه شد. $100\mu l$ از هر رقت را به محیط NA^۱ و KB^۲ منتقل و به کمک میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش شد و به مدت ۴۸ ساعت به ترتیب در دمای $25^{\circ}C$ و $28^{\circ}C$ نگهداری گردید. پرگنه‌هایی^۳ را که از نظر شکل و رنگ در محیط NA تفاوت داشتند انتخاب و روی محیط NA درون لوله آزمایش نگهداری گردید. پرگنه‌های تولیدکننده رنگدانه فلورسانت در محیط کشت KB با استفاده از نور ماوراء بنفش (U.V) در طول موج ۳۶۶ نانومتر انتخاب و روی محیط NA جهت تهیه کشت خالص مخطط گردیدند. جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از ساقه و غلاف برگ برنج و از حاشیه لکه‌های آلوده صورت گرفت. برای این منظور، حاشیه لکه‌ها به قطعات ۵mm تقسیم و برای مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شد. سوسپانسیونی از آنها (به صورتی که برای تهیه سوسپانسیون خاک ذکر شد) تهیه و بر روی محیط کشت KB کشت گردید تک کلنی‌های فلورسانت و غیرفلورسانت باکتری انتخاب و بر روی محیط NA جهت تهیه کشت خالص مخطط گردیدند. ۱۰ گرم از ریشه نمونه‌هایی که به آزمایشگاه منتقل شده بود، انتخاب و به مدت ۱۰ دقیقه در زیر آب روان شسته شده و سپس خشک شدند. ریشه‌ها به قطعات ۲۰-۲۵mm بریده شدند و با فشار کمی روی سطح محیط KB قرار داده شدند. از برخی تکه‌های ریشه هم سوسپانسیونی تهیه شد و طبق روش فوق، سری رقت تهیه گردید و بر روی محیط KB کشت داده شد و سپس خالص‌سازی و نگهداری صورت گرفت. برای جداسازی باکتریها از آب شالیزار، مستقیماً آب شالیزار بر روی محیط کشت KB لوپ زده شد و عمل خالص‌سازی و نگهداری صورت گرفت.

۲-۳- بررسی تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر روی قارچ *R.solani*

روش پارک^۴

یک حلقه ۰/۵ cm از حاشیه کلنی تازه قارچ در مرکز پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و جدایه‌های باکتریایی بصورت نقطه‌ای در چهار طرف تشتک پتری به فاصله ۴ cm از یکدیگر قرار داده شد. جدایه‌ها در دمای $25-27^{\circ}C$ نگهداری شدند. قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها پس از ۵ روز براساس فاصله‌ای که بین حاشیه پرگنه جدایه‌ها و قارچ (لایه هاله بازدارندگی)^۵ ایجاد شده بود اندازه‌گیری گردید. طرح در قالب کاملاً تصادفی در ۳ تکرار صورت گرفت.

روش متقابل^۶

ابتدا باکتری‌های مورد نظر در راستای قطر تشتک پتری و به صورت خطی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت که تشتک پتری در دمای $25^{\circ}C$ نگهداری شدند دیسک‌هایی به قطر ۵ mm در دو طرف خط وسط در حاشیه تشتک پتری قرار داده شدند. برای این کار از کشت ۳ روزه قارچ استفاده شد. اندازه‌گیری پس از ۱۰ روز انجام گرفت. در اینجا نیز طرح در قالب کاملاً تصادفی در ۳ تکرار صورت گرفت.

1. Nutrient Agar
2. King's B medium
3. Colonies
4. Park, 1989
5. Inhibition zone
6. Michael & Nelson, 1972

۴-۲- بررسی تأثیر باکتریهای آنتاگونیست در جلوگیری از سوختگی غلاف برگ برنج در شرایط گلخانه

بر اساس بررسی‌های اولیه، ۸ جدایه با بیشترین قدرت بازدارندگی جهت آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

در بررسی‌های گلخانه‌ای، دو سری آزمایش به شرح زیر انجام گردید:

در آزمایش اول بذر برنج رقم فجر آغشته‌سازی شده با باکتریهای آنتاگونیست در گلدان‌های حاوی خاک ۲ بار اتوکلاو شده کاشته

شدند. پس از ۴۵ روز، اسپری پاشی با همان باکتریهای آنتاگونیست بر روی قسمت‌های هوایی گیاه صورت گرفت. (۳)

عمل مایه‌زنی قارچ *R. solani* مطابق روش ترابی و بینش (۱۳۶۴)، ۲۴ ساعت بعد از پاشش باکتری صورت گرفت.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۲۹ تیمار در ۵ تکرار و در هر گلدان ۵ بوته برنج نگهداری شد.

در آزمایش دوم، بذرها آغشته به باکتریهای آنتاگونیست در گلدان‌های حاوی خاک طبیعی مزرعه کاشته شدند و پس از ۲۸ روز

عمل مایه‌زنی قارچ *R. solani* به روش قبلی صورت گرفت.

این آزمایش نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۵ تیمار در ۴ تکرار و در هر گلدان ۴ بوته برنج نگهداری شد. برای تیمارهای

۱۴ و ۱۵ برای هر گلدان ۱ گرم اوره، ۱/۵ گرم سوپر فسفات، ۰/۵ گرم پتاس اضافه شد تا تأثیر کود بر روی اثر آنتاگونیستی باکتریها

مشخص گردد. در هر دو آزمایش گلدان‌ها در شرایط گلخانه موسسه تحقیقات برنج آمل در دمای ۱۸-۲۵°C و رطوبت مناسب

نگهداری شدند. تجزیه داده‌ها، محاسبات آماری و مقایسه میانگین‌ها در هر دو آزمایش از نرم‌افزار MSTATC استفاده گردید. در

هر دو آزمایش برای آغشته‌سازی بذور مطابق روش ولر و کوک^۱ عمل شد. (۱۷)

غلظت جدایه‌ها به میزان 1×10^8 cfu (واحد تشکیل‌دهنده پرگنه) برای جدایه‌های ۵، ۹۳، ۴۲، Ifu, T42 و B29 و به میزان 9×10^8 cfu

برای جدایه‌های ۲۴، ۲۹ و ۱۲۰ تنظیم شد و به میزان ۲ درصد متیل سلولز به سوسپانسیون برخی تیمارها اضافه شد و بذور به مدت

۱۲ ساعت در داخل سوسپانسیون هر جدایه قرار گرفت. همچنین از قارچکش تیلت (۲ در هزار) جهت مقایسه با جدایه‌های

آنتاگونیست استفاده شد. نتایج بدست آمده از آزمایش (درجه خسارت، درصد کنترل، تعداد پنجه، ارتفاع بوته، طول ریشه وزن خشک

ریشه و ساقه) پس از ۸۰ روز یادداشت‌برداری و داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون

دانکن در سطح ۱٪ انجام شد. برای تعیین درجه خسارت تیمارها در اثر قارچ *R. solani* از فرمول آنو^۲ استفاده شد. (۲)

$$\text{درجه خسارت} = \frac{0A + 10B + 15C + 25D + 40E}{N}$$

A تعداد پنجه‌های سالم

N تعداد کل پنجه

B تعداد پنجه‌هایی که دو غلاف پایینی آنها آلوده بودند

C تعداد پنجه‌هایی که سه غلاف پایینی آنها آلوده بودند

D تعداد پنجه‌هایی که چهار غلاف پایینی آنها آلوده بودند

E تعداد پنجه‌هایی که تمام غلاف‌های آنها آلوده بودند

1. Weller & Cook, 1983

2. Colony formig unit

3. Ono, 1953

۳- نتایج و بحث

۳-۱ ویژگیهای قارچ *Rhizoctonia solani*

۳-۱-۱ ویژگیهای ماکروسکوپی

این قارچ روی محیط PDA در دمای ۲۸°C رشد سریعی دارد، به طوریکه ۳ تا ۴ روز بعد از کشت، تمام سطح پتری را می‌پوشاند. میسلیوم‌ها هم در سطح محیط کشت و هم بصورت هوایی رشد می‌کنند. کلنی قارچ در ابتدا بی‌رنگ و بعداً به رنگ کرم مایل به قهوه‌ای تغییر می‌یابد. (شکل ۱) از روز هفتم به بعد در سطح کلنی، اسکروت‌ها ظاهر می‌شوند که سفید رنگ هستند اما به تدریج بزرگ و فشرده‌تر شده و ظرف ۲ تا ۳ روز تبدیل به اسکروت‌های قهوه‌ای رنگ می‌شوند. اسکروت‌ها به فراوانی در سطح محیط کشت و نیز در سطح زیرین تشتک پتری و دیواره داخل آن تشکیل می‌شوند. اسکروت‌ها غالباً بصورت منفرد تشکیل می‌شوند ولی در مواردی، تعدادی از آنها به هم می‌چسبند و تجمع اسکروت‌ها را تشکیل می‌دهند. که قطر آنها به ۱/۴ - ۰/۴ سانتی‌متر می‌باشد. اسکروت‌ها با سطحی صاف معمولاً کروی شکل هستند ولی اشکال بیضی یا بدون شکل مشخص نیز دیده می‌شوند. در سطح بعضی از اسکروت‌ها ترشحات مایعی و به رنگ قهوه‌ای براق تشکیل می‌شود. قطر اسکروت‌ها ۵-۰/۸۴ میلی‌متر بود. (شکل ۲)

۳-۱-۲ ویژگیهای میکروسکوپی

هیف‌های قارچ به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای است (هیف‌های جوان بی‌رنگ می‌باشند) انشعابات هیف‌ها با زاویه حاده و نیز زاویه قائمه است در قاعده انشعابات فرورفتگی مشخص وجود دارد و کمی بالاتر از آن دیوار عرضی تشکیل می‌شود. (شکل ۳) تعداد هسته‌ها در سلول‌های هیف ۱۱-۳ و قطر هیف ۱۱-۶ میکرون بود. (شکل ۴) فاصله دیواره عرضی از محل فرورفتگی در انشعابات در جدایه مورد بررسی ۲۵-۳ میکرون بود. (۵)

۳-۲ انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست:

در این بررسی، توانایی آنتاگونیستی ۱۸۶ جدایه باکتریایی براساس روش کشت متقابل و روش پارک در تشتک پتری، روی *R. solani* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که از بین مجموعه جدایه‌ها باکتریایی، ۶۳ جدایه متعلق به باکتریایی گرم مثبت بودند. که از این تعداد ۶/۴ درصد هاله بازدارندگی کمتر از ۱۰ میلی‌متر و ۱۴/۲ درصد هاله بازدارندگی بیش از ۱۰ میلی‌متر ایجاد کردند. و ۷۹/۴ درصد آنها فاقد هاله بازدارندگی در مقابل *R. solani* بودند. از این مجموعه ۱۲۳ جدایه از باکتریهای گرم منفی بودند که ۱۷ جدایه متعلق به سودوموناس‌های فلورسانت بودند که ۴ درصد آنها هاله بازدارندگی کمتر از ۱۰ میلی‌متر و ۹/۷ درصد آنها دارای هاله بازدارندگی بیش از ۱۰ میلی‌متر ایجاد کردند. ۱۳/۸ درصد آنها باکتری غیرفلورسانت بوده که هاله بازدارندگی بین ۸-۲ میلی‌متر ایجاد کردند و ۷۲/۵ درصد آنها فاقد هاله بازدارندگی در مقابل *R. solani* بودند. از بین جدایه‌هایی که بالای ۱۰ میلی‌متر هاله بازدارندگی ایجاد کردند برای آزمایشات گلخانه استفاده شد.

۳-۳ شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست:

خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های ۵، ۹۳ و Ifu, B29 T42 با خصوصیات ذکر شده برای گونه *Pseudomonas fluorescens* (۹ و ۱۳) مطابقت داشت (جدول ۳) براساس خصوصیات بیوشیمیایی و مرفولوژیک، جدایه‌های ۲۴ (*Bacillus cereus*) و ۲۹ و ۱۲۰ به *B. subtilis* شباهت داشتند. (۱۳) (جدول ۴)

۳-۳ تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر فاکتورهای مختلف رشد:

تیمارهای جدایه‌های آنتاگونیست و قارچکش تیلت در هر دو آزمایش از نظر تأثیر بر ارتفاع، تعداد پنجه، طول ریشه، وزن خشک ساقه و ریشه پس از ۸۰ روز در سطح ۰/۱٪ تفاوت معنی‌داری داشتند. (جدول ۱ و ۲) براساس مقایسه میانگین‌ها همه تیمارها به جز

تیمار قارچکش و شاهد آلوده بر ارتفاع بوته اثر مثبت داشتند. جدایه‌های 5 و T42 موجب افزایش پنجه‌زنی نسبت به شاهد شدند که احتمال می‌رود با افزایش پنجه‌زنی میزان محصول هم افزایش یابد. جدایه‌های ۲۴، ۲۹ و ۹۳ و قارچکش تیلت بر تعداد پنجه بدون تاثیر بودند و جدایه‌های ۱۲۰، IFU و B29 موجب کاهش پنجه‌زنی شدند. در مورد تاثیر جدایه‌ها بر طول ریشه، فقط جدایه T42 موجب افزایش آن شد. و جدایه‌های ۵، ۲۴ و ۹۳ تفاوت معنی‌داری از خود نشان ندادند. و جدایه‌های ۲۴، ۲۹، ۱۲۰، IFU و B29 و قارچکش نیز موجب کاهش طول ریشه شدند. جدایه‌های ۵، ۹۳ و T42 موجب افزایش وزن خشک ساقه نسبت به شاهد غیرآلوده شدند و سایر تیمارها وزن خشک ساقه را کاهش دادند. جدایه‌های ۵، ۹۳ و T42 موجب افزایش وزن خشک ریشه و جدایه ۱۲۰ اثری بر وزن خشک ریشه نداشت. جدایه‌های ۲۹، IFU و B29 و قارچکش موجب کاهش وزن خشک ریشه شدند. که این تیمارها در سطح ۱٪ در آزمون دانکن تفاوت معنی‌دار داشتند.

رابین دران و ویدیهاسکاران^۱ در هند با استفاده از جدایه‌های *P. fluorescens* در گلخانه و مزرعه موفق به کنترل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج و افزایش محصول آن شدند. آنها با تیمار بذور ریشه و آغشته‌سازی باکتری با خاک و نیز اسپری آن با سطح اندام‌های هوایی گیاه به طور جداگانه موفق به کنترل بیماری شدند که در مقایسه با تیمار قارچکش کار بندازیم بسیار موفق‌تر بود (۹). در بررسی حاضر نیز برخی از جدایه‌های باکتریایی بیشتر از قارچکش تیلت موثر بودند.

میو و روزالز^۲ نشان دادند که باکتریهای پ سودوموناس فلورسانت و غیر فلورسانت ضمن ممانعت از رشد میسلیوم قارچ *R. solani* در جوانه‌زنی بذر برنج نقش داشتند. از طرفی تیمار بذور توسط باکتریهای آنتاگونیست موجب افزایش ارتفاع بوته‌ها، تعداد پنجه، وزن دانه و کاهش وقوع بیماری سوختگی غلاف برگ برنج شد (۱۱).

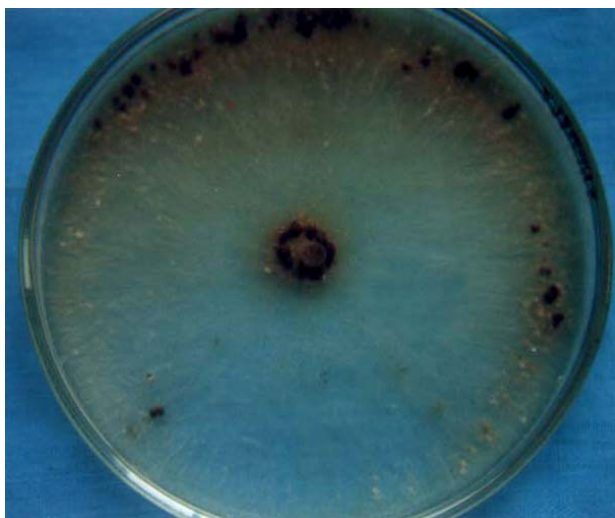
در آزمایش اول (تیمار بذور + اسپری پاشی) جدایه‌های ۵، ۲۴، ۹۳، ۱۲۰ و T42 که همراه با متیل سلولز استفاده شد در مقایسه با تیمارهایی که فقط جدایه آنتاگونیست به تنهایی استفاده شد، بیماری را بیشتر کنترل کردند و به ترتیب ۹۵ (۸۷)، ۶۷ (۴۷)، ۹۵ (۷۲)، ۶۱ (۵۸)، ۹۴ (۹۳) درصد بیماری را کنترل کردند. در آزمایش دوم جدایه‌های ۵، ۲۴، ۹۳ و T42 هنگامی که به همراه متیل سلولز یا بدون آن استفاده شد به ترتیب بیماری را ۸۶/۹ (۸۴/۳)، ۶۰ (۵۴/۷)، ۷۹/۱ (۷۳/۵)، ۸۴/۳ (۸۱/۷) درصد کنترل کردند. این موضوع در نتایج تحقیق داس و همکاران^۳ هم عنوان شده است. آنها معتقدند که متیل سلولز وقتی به همراه جدایه باکتری در تیمار بذور استفاده می‌شود. بیماری را بهتر از زمانی که فقط جدایه باکتری برای تیمار بذور به کار می‌رود کنترل می‌کند. (۶) همچنین تارا و گنانامانیکام^۴ معتقدند که کاربرد همزمان کربوکسی متیل سلولز و جدایه باکتریایی برای تیمارهای بذری بیماری کنترل می‌شود. زیرا در اثر تیمار با کربوکسی متیل سلولز چسبندگی باکتری به بذور افزایش یافته و با افزایش تعداد سلول‌های باکتری در خاک جمعیت در خاک نیز افزایش می‌یابد (۱۵).

در آزمایش دوم به دو تا از تیمارها (جدایه‌ها ۲۴ و T45)، کود به مقدار بیشتر از مقادیر توصیه شده برای مزرعه اضافه شد تا اثر کود اضافی بر آنتاگونیست بررسی شود. که در نتیجه مشخص شد کود اضافی موجب توسعه بیماری می‌شود. با توجه به اینکه جدایه‌های ۵، ۹۳، T42 (*P. fluorescens*)، ۲۴، ۱۲۰ (*Bacillus spp.*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه اثر مطلوبی در کنترل بیماری، تعداد پنجه، ارتفاع بوته، وزن خشک ریشه و ساقه داشتند، لازم است بررسی‌های تکمیلی برای جداسازی آنتاگونیست‌های مناسب از مناطق دیگر استان‌های گیلان و مازندران همراه با آزمایشات وسیع‌تر در قالب پروژه‌ها و طرح‌های ملی کشور، صورت گیرد و نتایج حاصله برای کشاورزان قابل ارائه و توصیه باشد. چنین به نظر می‌رسد کاربرد عملی عوامل کنترل بیولوژیک برای مدیریت تلفیقی بیماری‌های برنج غیر قابل اجتناب باشد.

1. Rabindran, & Vidhyasekaran, 1996
 2. Mew & Rosales, 1986
 3. Das, et al., 1998
 4. Thara & Gnanamanicham, 1993



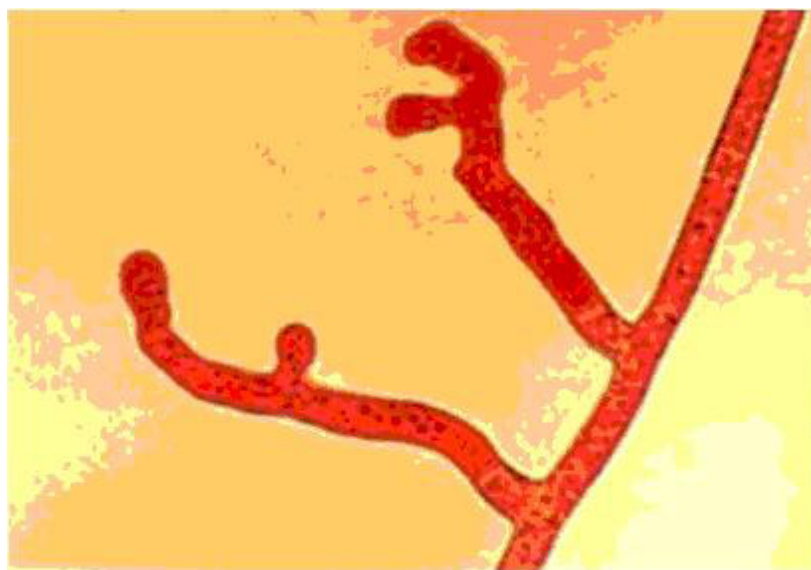
شکل ۱- نحوه رشد میسلیوم *R. solani* روی محیط کشت PDA (کشت ۳ روزه)



شکل ۲- نحوه رشد میسلیوم *R. solani* روی محیط کشت PDA (کشت ۷ روزه)



شکل ۳- ریشه قارچ *R. solani*



شکل ۴- هسته رنگ آمیزی شده قارچ R.solani

جدول ۱- تأثیر آنتاگونیست‌های باکتریایی بر بیماری شیت بلایت، ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن خشک ریشه و ساقه پس از آغشته‌سازی بذور و اسپری پاشی قسمت‌های هوایی گیاه (آزمایش اول)

گروه‌بندی	وزن خشک ریشه (گرم)	گروه‌بندی	وزن خشک ساقه (گرم)	گروه‌بندی	طول ریشه (CM)	گروه‌بندی	ارتفاع بوته (CM)	گروه‌بندی	تعداد پنجه	گروه‌بندی	درصد کنترل	گروه‌بندی	درجه خسارت	معیار اندازه‌گیری تیمار
B	۰/۷۰۸	CD	۱/۸۵	CD	۱۶	IJ	۶۷/۷۲	AB	۳۶	-	-	-	۰	شاهد
D	۰/۵۳۶	F	۱/۳	F	۱۳	R	۶۰	C	۳۲	G	۰	C	۱۰/۳۶	F+شاهد
B	۰/۷۰۸	CB	۱/۸۵	CD	۱۶	J	۶۷	AB	۳۶	G	۰	E	۰	شاهد M+
CB	۰/۵۸۸	FG	۱/۴۹	CD	۱۵	R	۵۸	BC	۳۳	C	۷۴	DE	۲/۶۶	F+قارچکش
CB	۰/۵۶	H	۱/۳	F	۱۳	R	۶۰	C	۳۲	G	۰	C	۱۰/۵	M+F
AB	۰/۷۶	CB	۱/۸۸	CD	۱۷	AB	۷۹	A	۳۸	B	۸۷	DE	۱/۳۲	F+5
B	۰/۷۱۶	AB	۱/۹۶	CD	۱۶	A	۸۱/۰۸	A	۳۸/۲	A	۹۵	E	۰/۴	F+M+5
B	۰/۷۰۸	B	۱/۹	CD	۱۶	AB	۷۹/۹۲	AB	۳۶/۲	-	-	-	۰	5
D	۰/۵۲	EF	۱/۵۶	F	۱۳/۰۸	HI	۷۱	CD	۳۱/۶	EF	۴۷	D	۵/۵	F+۲۴
D	۰/۵۱۲	CD	۱/۷۶	F	۱۳/۰۸	HI	۷۲	BC	۳۳	CD	۶۷	DE	۳/۲	M+F+۲۴
C	۰/۶۲۸	EF	۱/۵۶	CD	۱۶	HI	۷۰	AB	۳۶	-	↑	-	۰	۲۴
C	۰/۶۲	DE	۱/۶۹	D	۱۴	C	۷۷	D	۳۱	-	↑	C	۱۰/۲۶	F+۲۹
BC	۰/۶۵۲	DE	۱/۶۶	D	۱۴	C	۷۶	EF	۲۷	-	-	BC	۱۱/۵	F+M+۲۹
BC	۰/۶۸۸	C	۱/۸	CD	۱۶	C	۷۴	B	۳۴/۲	-	-	-	۰	۲۹
B	۰/۷	CB	۱/۸۶	D	۱۴	A	۸۱	B	۳۳/۸	C	۷۲	DE	۱/۳۶	F+۹۳
B	۰/۷۱	C	۱/۸	F	۱۳/۰۸	A	۸۱	A	۳۷	A	۹۵	DE	۰/۴۲	F+M+۹۳
B	۰/۷۲	A	۲/۰۶	CD	۱۶	A	۸۱	AB	۳۶	-	-	-	۰	۹۳
BC	۰/۶۸	CD	۱/۷۶	CD	۱۵	AB	۷۸	D	۳۱	DE	۵۸	DE	۴/۲	F+۱۲۰
BC	۰/۶۵	C	۱/۸۴	D	۱۴	A	۸۰/۵	F	۲۶/۸	D	۶۱	DE	۴	F+M+۱۲۰
B	۰/۷۱	DE	۱/۶۶	C	۱۷	AB	۷۸	B	۳۴	-	-	-	۰	۱۲۰
DE	۰/۴۶	HI	۱/۲۸	CD	۱۵	AB	۷۷	E	۲۹	-	↑	BC	۱۱	IFU+F
E	۰/۴۴	I	۱/۲۴	D	۱۴	CD	۷۳	E	۳۰	-	↑	AB	۱۵/۱	F+M+IFU
C	۰/۶۲	E	۱/۶۴	CD	۱۵	C	۷۷	C	۳۲	-	-	-	۰	IFU
C	۰/۶۳	HC	۱/۳۸	CD	۱۵	CD	۷۳/۱	EF	۲۷/۴	-	↑	BC	۱۱	F+B29
E	۰/۴۲	H	۱/۳۲	F	۱۳/۰۸	DE	۷۲	EF	۲۷	-	↑	A	۲۰	F+M+B29
CD	۰/۵۹	EF	۱/۵۸	C	۱۷	DE	۷۱	D	۳۱	-	-	-	۰	B29
A	۰/۸۲	C	۱/۸۲	C	۱۷	CD	۷۴/۳	A	۳۸/۴	A	۹۳	E	۰/۸	T42+F
A	۰/۸۶	A	۲/۰۱	A	۲۲	AB	۷۹	A	۳۷	A	۹۴	E	۰/۷	F+M+T
AB	۰/۷۶	A	۲/۰۲	B	۱۹/۴	CD	۷۴/۴	A	۳۸	-	-	-	۰	T42

جدول ۲- تأثیر آنتاگونیست‌های باکتریایی با تیمار بذور برنج بر شدت بیماری، ارتفاع، طول، ریشه، وزن خشک ریشه و ساقه پس از آغشته‌سازی بذور با باکتری‌های آنتاگونیست (آزمایش دوم)

معیار اندازه‌گیری تیمار	شاهد غیر آلوده	شاهد آلوده	شاهد M+	فارق + F	M+F	5+F	5+F+M	۲۴+F	۲۴+F+M	۹۳+F	۹۳+F+M	T42+F	T42+F+M	T42+F+M+K	۲۴+F+K
درجه خسارت	۰	۱۱/۵۹	۰	۳/۷	۱۱/۴۳	۱/۷	۰/۷۵	۵/۲	۴/۶	۳/۰۴	۲/۴	۲/۱	۱/۷	۳/۶	۵/۶
گروه‌بندی (۱)	۰	A	۰	BCDE	A	G	BC	BC	BCD	CDEF	DEFG	EFG	BCDE	BCDE	BC
درصد کنترل	-	۰	-	۶۶/۹	۰	۸۴/۳	۸۶/۹	۵۴/۷	۶۰	۲۳/۵	۷۹/۱	۸۱/۷	۸۴/۳	۶۸/۶	۵۱/۳
گروه‌بندی	-	G	-	CD	G	A	A	E	D	C	AB	A	CD	E	E
تعداد پنجه	۳۰	۲۶	۳۰	۳۰	۲۶	۳۴	۳۴	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۳	۳۳	۲۵	۳۲
گروه‌بندی	B	C	B	B	C	A	A	B	B	B	B	B	AB	AB	AB
ارتفاع بوته (cm)	۶۹	۶۳	۶۹	۶۴/۵	۶۳	۷۵	۷۵/۲	۷۶	۷۳/۸	۷۴	۷۳/۵	۷۵	۷۴/۸	۷۹/۸	۷۵/۸
گروه‌بندی	BC	C	BC	D	C	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
طول ریشه (cm)	۲۱/۱۳	۱۶/۱۳	۲۱/۱۳	۲۱/۱۳	۱۶	۲۱/۳	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	۲۱	۲۶	۲۵/۸	۲۵/۹	۲۵
گروه‌بندی	B	CD	B	C	CD	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A
وزن خشک ساقه	۱/۵۷	۱/۳۷	۱/۵۷	۱/۵۶	۱/۱	۲/۳	۲/۲	۲/۴۸	۲/۳	۲/۵	۱/۸۱	۲/۸۲	۲/۴۷	۲/۷۷	۳/۲
گروه‌بندی	DE	E	DE	DE	F	BCD	BCD	ABD	ABC	CD	AB	AB	AB	AB	AB
وزن خشک ریشه	۰/۹۵	۰/۷	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۷۲	۱/۷	۱/۴۵	۱/۶۲	۱/۶۲	۱/۱۵	۱/۴۵	۲/۲	۲/۳	۱/۳۲	۱/۲۵
گروه‌بندی	DE	E	DE	DE	E	BC	BC	BC	BC	CDE	BC	AB	AB	CD	CDE

اعداد متن جدول میانگین ۱۶ بوته است. F= قارچ M= متیل سلولز

جدول ۳- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استرین‌های پسودوموناس فلورسانس

خصوصیت	Character	5	۹۳	T42	Ifu	B29
واکنش فوق حساسیت در توتون	HR	-	-	-	-	-
لهانیدن سیب‌زمینی	Potato rot	-	-	-	-	-
احیاء نیترات	Nitrate reduction	+	+	+	+	+
اکسیداز	Oxidase	+	+	+	+	+
تولید لوآن	Levan	-	-	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	Strach hydrolysis	-	-	-	-	-
استفاده از:	Utilization of:					
ال-آرابینوز	L- arabinose	+	+	+	+	+
دی-گالاکتوز	D- Galactose	+	+	+	+	+
تری هلووز	Trehalose	+	+	+	+	+
سوربیتول	Sorbitol	+	+	+	+	+
ساکاروز	Sucrose	+	+	+	+	+
بتا آلانین	β -Alanine	+	+	+	+	+
سدیم تارتارات	Sodium tartarate	+	+	+	+	+
۲- کیتوگلوکانات	2- Ketogluconate	+	+	+	+	+
رشد در ۴ درجه سانتیگراد	Growth at 4 ⁰ c	+	+	+	+	+
رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد	Growth at 41 ⁰ c	-	-	-	-	-
تولید رنگدانه آبی روی KB	Pyocyanin	-	-	-	-	-

جدول ۶ - تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر شدت بیماری، ارتفاع، تعداد پنبه، وزن خشک ساقه، طول ریشه و وزن خشک ریشه گیاه برنج پس از آغشته بذر با باکتری (آزمایش اول)

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات												مقادیر F					
		شدت بیماری	ارتفاع بوته	تعداد پنبه	وزن خشک ساقه	طول ریشه	وزن خشک ریشه	شدت بیماری	ارتفاع بوته	تعداد پنبه	وزن خشک ساقه	طول ریشه	وزن خشک ریشه						
جدایه‌های آنتاگونیست	۳	۷/۸	۴۲۳/۳	۱۴/۵	۱۰۴/۱	۱۴۹/۷	۹/۳	۲۰۲/۹	۳۸/۲	۴/۸	۲/۴	۱۱/۳	۰/۳	۱/۱۲۲*	۱/۵۹۸**	۰/۹۵۳**	۱/۶**	۱/۳**	۲/۲**
خطا	۴۲	۹۸/۰۲	۲۷۰۸/۶	۲۱۴/۴	۲۱۴/۵	۱۷۰۷/۳	۳/۳	۱۶۷/۷	۱۷/۶	۵/۰۸	۱/۴	۸/۱	۰/۱۱	-	-	-	-	-	-
کل	۴۵	۸۱۵/۷	۱۱۳۴۰/۹	۶۲۶/۹	۳۱۸/۶	۴۲۱۱/۳۹	۱۲/۶	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ضریب تغییرات	-	۱۴/۲۷	۱۱/۸	۷/۳	۱۴/۴	۱۲/۳	۱۷/۸	۱۴/۲۷	۱۱/۸	۷/۳	۱۴/۴	۱۲/۳	۱۷/۸	۱۴/۲۷	۱۱/۸	۷/۳	۱۴/۴	۱۲/۳	۱۷/۸

** معنی دار در سطح ۱٪

سیاسگزاری

از جناب آقای دکتر نادر حسن‌زاده عضو هیئت علمی و آقای دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده مدیر گروه بیماری‌های گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم تحقیقات و کلیه اساتید گروه و کارکنان آن خصوصاً مهندس شهاب حاج منصور کمال تشکر و سپاس داشته و همچنین از ریاست محترم موسسه تحقیقات برنج کشور (آمل) جناب آقای مهندس منصور بهرامی و مهندس وحید خسروی عضو هیئت علمی بیماری‌های گیاهی و کلیه اعضاء هیئت علمی و کارکنان آن موسسه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع و مآخذ:

- ۱- ایزدیاری، م و پاداشت، ف: ۱۳۷۲. بررسی فعالیت آنتاگونیستی بعضی از میکروارگانیسم‌ها علیه بیماری‌های سوختگی غلاف برگ برنج. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه گیلان.
- ۲- بینش، ح و ترابی، م: ۱۳۶۴. نحوه انتقال بیماری شیت بلایت برنج و مطالعه حساسیت بعضی از ارقام. بیماری‌های گیاهی. جلد ۲۱. صفحات ۱۵-۲۵.
- ۳- حسن‌زاده، ن. ۱۳۷۱: بیوکنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد گیاهان. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی. ۱۷۹ صفحه
- ۴- حسن‌زاده، ن. ۱۳۷۴: اصول و روش‌های باکتری شناسی گیاهی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی. ۶۴۱ صفحه
- 5- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. and Blackwell, M. 1986. *Introductory Mycology*, 4d ed. Wiley, New York. 80 pp.
- 6- Baker, R, F. 1987 . Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 67- 85 pp.
- 7- Das., B. C, A.S.M. Khairuzzaman., L.C. Bora: 1998. Biological seed treatment for managemet of sheath blight of Rice. *J. Mycol. PL. Pathol.* 28: 1: 45-47.
- 8- Devi- TV, Vizhi- RM, Sakthirel- N, Gnanamanickam- SS 1989. Biological control of sheath blight of rice in India with antagonistic bacteria. *Plant and Soil.* 119- 2, 325- 330 : 15 ref.
- 9- Fahy, P.C. and Persley, G.J. 1983. *Plant Bacterial Disease -A Diagnostic Guide*. Academic Press, Australia., 393 pp.
- 10- Gnanamanickam. SS, T.W. Mew. 1990. Biological control of rice diseases (blast and sheath blight) with bacterial antagonist: nalternat strategy for disease and pest management in rice. *Elsevier Applied sience Publishers ltd.* 89- 110: 26ref.

- 11- Mew, T.W., A.M., Rosales. 1986. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 76: 1260-1264
- 12- Park, C.S. 1989. Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. *J Phytopathology*, 138(3): 189-208 pp.
- 13- Schaad, N.W. 1988. *Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic Bacteria*. 2nd ed. APS Press. 158 pp.
- 14- Rabindran, R., Vidhyasekaran, P., 1996. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PFALR2 for management of rice sheath blight. *Crop Protection*, 8: 715- 721.
- 15- Thara, R.V. and Gnanamanickam, S.S. 1994. Biological control of rice sheath blight in India: lack of correlation between chitinase production by bacterial antagonists on sheath blight suppression. *Plant and Soil*, 160: 277-280.
- 16- Tschen, J.S.M. 1987. Control of *Rhizoctonia solani* by *Bacillus subtilis*. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 28: 482- 493.
- 17- Weller, D.M. and Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73: 473-472.

A Possible Approach to Biocontrol of Rice sheath blight with some antagonistic bacteria

Seyyed. A. Sajjadi

Pathology section Tirtash Tobacco Research Institute-Behshahr.

N. Hasanzadeh

Faculty Member, science and Research, Islamic Azad university- Tehran.

M. Bahrami

Faculty member, Rice Research Institute- Amol

V. Khosravi

Faculty member, Rice Research Institute- Amol

Keywords: *Rhizoctinia solani*, Rice Sheath blight, Antagonistic bacteria, Biocontrol

Abstract

In a survey conducted in 2000, 184 bacterial isolates were collected from rhizosphere of different rice fields. To assess their antagonistic activities against *Rhizoctonia solani*, all strains were screened against *R. solani* using Park test in dual cultures. Results showed that 47 isolates mostly belong to Gram-positive bacteria and some fluorescent pseudomonads, the antagonistic bacteria were identified as follows: The strains encoded 5, 93, Ifu, B29 and T42 were identified as *Pseudomonas fluorescens*, strain 24 as *Bacillus cereus*, strains 29 and 120 as *B. subtilis*, on the basis of biochemical, physiological and morphological characters. Of these, strains with strong and promising antagonistic activity were selected for further studies. In total, strains 5, 93, T42, 24, 29, 120 inhibited normal mycelial growth of the fungus, whereas the strains 5 and T42 showed super antagonistic activities. In greenhouse trial, both bacterial strains as well as Tilt treatments did reduce variably sheath blight of rice plants. All strains in first and second experiments could promote the plant height, whereas strains both of 5, T42 could increase the numbers of tillages. Increasing the root length by strain T42 and plant dry weights by strains 5, 93, T42, 24 were some other promising results, obtained in these experiments.