

بررسی کنترل بیولوژیک بیماری سوختگی غلاف برگ برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* توسط برخی باکتری‌های آنتاگونیست در استان گیلان

محمد کاظم زاده^{*۱} - علی روستایی^۲ - فریدون پاداشت^۳ - غلام خداکرمیان^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

از میان ۱۶۰ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع برنج استان گیلان شامل گیاه برنج، بذر، ریزوسفر، خاک مزارع برنج، آب شالیزار و اسکروت قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* تعداد ۶۱۰ استرین باکتری جداسازی شد. تعداد ۷۱ استرین (۱۱/۶۴ درصد) توانایی بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری مذکور در آزمون کشت متقابل (Dual culture) در محیط غذایی PDA را داشتند. تعداد ۳۷ استرین آنتاگونیست بر اساس دو ویژگی هاله بازدارندگی در آزمون کشت متقابل و درصد بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری در آزمون تولید مواد فرار ضدقارچی تجزیه کلاستر و گروه‌بندی شدند. استرین‌های قرار گرفته در بالاترین گروه از نظر قدرت آنتاگونیستی شناسایی شده و برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند. شدت بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در شرایط گلخانه با روشهای مختلف تیمار بذر، خاک و گیاه با استرین‌های آنتاگونیست ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تیمار گیاه با سایر روشهای کاربرد تفاوت معنی‌دار داشته و استرین‌های ۱۵۲ (*Pseudomonas aeruginosa*) و S 7 (*Pseudomonas fluorescens* bv3) به ترتیب با ۲۶/۵۹ درصد و ۳۳/۵۴ درصد کاهش در شدت بیماری، بیشترین اثر را نشان داده و نسبت به شاهد در گروه جداگانه‌ای قرار داشتند. در بین سه روش به کار رفته، استرین ۱۵۲ (*Pseudomonas aeruginosa*) با ۱۴/۴۶ درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد، کمترین شدت بیماری را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: برنج، کنترل بیولوژیک، استان گیلان، *Rhizoctonia solani*، *Pseudomonas*

مقدمه

ارقام سبب افزایش بیماری‌ها می‌گردد، ثانیاً به موازات استفاده از یک رقم در سطح وسیعتر احتمال خسارت بیشتر از طریق اپیدمی شدن بیماری‌ها نیز فراهم می‌گردد (۱). به دلیل خاکزاد بودن عامل بیماری و مشکل بودن کنترل آن توسط روش شیمیایی، کنترل بیولوژیک می‌تواند جایگزین مناسبی برای کنترل این بیماری باشد. مطالعات فراوانی درباره انتخاب اولیه و ارزیابی آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در ایران و دنیا صورت گرفته است. در ایران ایزدی‌ار و پاداشت (۲) پس از جداسازی میکروارگانسیم‌های متعدد از خاک، آب مزرعه، ریشه و برگ گیاه برنج خاصیت آنتاگونیستی آنها علیه بیماری سوختگی غلاف برگ برنج را مورد مطالعه قرار دادند، که در نتیجه سه گونه از جنس قارچی *Trichoderma*، یک گونه از جنس قارچی *Gliocladium* و یک باکتری دارای خاصیت آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی انتخاب گردید. پورعبدالله و بینش (۴) امکان مبارزه بیولوژیک با عامل بیماری را بررسی نمودند. مشاهدات آن‌ها نشان داد، جدایه‌های

بیماری سوختگی غلاف برگ برنج *Rhizoctonia solani* (kühn) بعد از بیماری بلاست یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در دنیا محسوب می‌شود (۱۷). به دنبال معرفی ارقام پرمحصول و پرپنجه که به کاربرد بیشتر کود نیتروژنه پاسخ داده و میکروکلیمای مناسبی برای گسترش بیماری فراهم می‌سازند این بیماری از اهمیت بیشتری برخوردار گردیده است (۱۲). مشکلات مربوط به بیماری‌های ارقام پرمحصول برنج در آینده از اهمیت بیشتری نیز برخوردار خواهد شد، زیرا اولاً استفاده روزافزون از کودهای شیمیایی جهت تولید اینگونه

۱ - کارشناس ارشد بیماری‌های گیاهی، مدیریت جهاد کشاورزی شفت، گیلان

(* - نویسنده مسئول: Email:marzie1808@yahoo.com)

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی مجتمع آموزش عالی ابوریحان بیرونی، دانشگاه تهران

۳- استادیار موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

سودوموناس‌های فلورسنت و باسیلوس‌ها از مهم‌ترین عوامل بیوکنترل به شمار می‌آیند (۱۲، ۱۳ و ۱۸). فرمولاسیون‌های مختلفی از جدایه‌های مختلف سودوموناس‌های فلورسنت با استفاده از پودر تالک و خاک پیت تهیه شدند که به صورت تیمار بذری، محلول پاشی روی گیاه و تیمار خاک مفید بودند. این فرمولاسیون‌ها سبب دوام بیشتر آنتاگونیست در شرایط طبیعی و امکان کاربرد در سطح وسیع را فراهم می‌آورند (۲۰ و ۳۰). هفده گونه از هفت جنس باکتریایی که دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه یک یا بیش از شش بیمارگر اصلی برنج بودند توسط زای و همکاران (۳۲) گزارش شد. در میان آنها یازده گونه غیرفلورسنت و چهارگونه فلورسنت بوده که استرین‌های فلورسنت دامنه وسیعتری از ویژگی آنتاگونیستی را نسبت به استرین‌های غیرفلورسنت نشان دادند. استرین‌های غیرفلورسنت آنتاگونیست شامل گونه‌های باسیلوس و سراتیا بوده که نه تنها آنتاگونیست سه گونه از قارچ‌های بیماریزای برنج بود، بلکه آنتاگونیست باکتری‌های بیماریزایی از قبیل *Acidovorax avenae* و یک بیمارگر از جنس *Xanthomonas* بودند. اطلاعات نشان داده است که اکوسیستم شالیزار دارای ذخیره بالایی از عوامل بیوکنترل می‌باشد (۳۳). با ارزیابی عوامل بیوکنترل علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در سراسر دنیا اعضای چهار جنس از باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، اروینیا و سراتیا به عنوان آنتاگونیست بیمارگرهای *R. solani* و *Fusarium fujikuroi* در برنج شناخته شده‌اند (۲۱ و ۲۲). استرین‌هایی از سودوموناس‌های فلورسنت از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف جلوگیری کرده و رشد گیاهچه‌های برنج را در شرایط آزمایشگاهی افزایش دادند (۱۹). در سه مزرعه آزمایشی باکتری‌های آنتاگونیست سبب کنترل معنی‌دار بیماری مذکور گردیده و بهتر از قارچ‌کش والیدامایسین عمل نمودند (۱۲). رابطه مستقیم بین تولید کیتیناز و فعالیت آنتی بیویزیس در استرین‌های سودوموناس گزارش شده است (۱۰). باکتری‌های آنتاگونیست فلورسنت و غیر فلورسنت ردیابی شده از گیاهان آلوده به شیت بلایت در صورت تیمار گیاهچه و سختینه قارچ عامل بیماری قبل از مایه زنی سبب کنترل صد در صدی بیماری شدند (۹). باکتری‌های آنتاگونیست در خاک‌های اسیدی و دارای سمیت بر در مقایسه با خاک‌های قلیایی و دارای کمبود روی کنترل بهتری از بیماری شیت بلایت را نشان دادند. همچنین در آزمایشی در روش کشت مستقیم بذری نسبت به کشت نشایی کنترل بهتری از بیماری مذکور مشاهده گردید (۱۲).

اهمیت کاربرد این عوامل به غیر از بی‌خطر بودن آنها برای محیط زیست از آن جهت است که در خاک مزرعه مستقر شده و برای مدت طولانی می‌توانند به عنوان عوامل بیوکنترل طبیعی عمل نمایند.

مختلف قارچ تریکودرما سبب ایجاد تغییراتی در هیف قارچ ریزوکتونیا می‌گردند و با رشد سریع خود سطح تشک را پوشانده و از تشکیل سختینه جلوگیری می‌نمایند. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز استفاده از سوسپانسیون قارچ تریکودرما بر روی رقم آمل ۲ در مرحله پنجه‌زنی به صورت اسپورپاشی به فاصله سه روز بعد از مایه‌زنی با قارچ ریزوکتونیا تاثیر بیشتری در کاهش بیماری داشت. ایزدیار و بهرامی (۱۳۷۹) فعالیت آنتاگونیستی چند گونه تریکودرما و تولید تجاری پروموت را روی بیماری سوختگی غلاف برنج در مقایسه با قارچ‌کش پروپیکونازول ۲۵ درصد (تیلت) در شرایط مزرعه بررسی نمودند. نتایج آنها نشان داد که بین تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌دار وجود داشته و کلیه تیمارها نسبت به شاهد باعث کاهش آلودگی در مزرعه گردیده و محصول را نیز افزایش دادند. نیک‌نژاد و همکاران (۶) تاثیر چند قارچ‌کش و قارچ‌های آنتاگونیست را علیه بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه مورد بررسی قرار دادند. نتایج به دست آمده نشان داد که قارچ‌های آنتاگونیست در گلخانه سبب کاهش بیماری سوختگی غلاف برنج گردید.

تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای برنج عمدتاً از سال ۱۹۸۰ آغاز شده است (۲۹). از میان تعدادی عوامل بیوکنترل متنوعی که در طبیعت یافت می‌شوند آنتاگونیست‌های باکتریایی بخاطر سرعت رشد بالا، خصوصیات احاطه سازی ریزوسفر و سادگی کارکرد با آنها جهت کنترل بیولوژیک ایده آل محسوب می‌شوند. مطالعات آشکار ساخته است که تعداد فراوانی از استرین‌های باکتریایی توانایی حفاظت از گیاهان برنج در مقابل بیماری‌های نظیر بلاست، سوختگی غلاف، پوسیدگی غلاف، پوسیدگی ساقه دارند. تعدادی از استرین‌های فلورسنت و غیر فلورسنت باکتری‌های آنتاگونیست در ریزوسفر مناطق مختلف خاک‌های *lowland* و *upland* یافت می‌شوند که در شرایط آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای علیه سوختگی غلاف برنج موثر هستند. باکتری *Pseudomonas fluorescens* علیه چندین بیمارگر برنج بین ۲۰ تا ۴۲ درصد در شرایط گلخانه و مزرعه‌ای موثر بوده و همچنین سبب افزایش رشد گیاه، تعداد پنجه‌ها و افزایش محصول بین ۳ تا ۱۶۰ درصد شده است. همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که باکتری *Pseudomonas fluorescens* دارای اثرات حشره‌کشی روی ناقل بیماری ویروسی تانگرو برنج (*Nephotetix virescens*) بوده و سبب ۹۰ درصد تلفات در حشره مذکور در صورت تغذیه از برگ‌های تیمار یافته با استرین مذکور می‌شود (۲۹).

مطالعات دیگری نیز نشان داده است که تعداد زیادی از عوامل بیوکنترل باکتریایی در مزارع برنج وجود دارند که امکان استفاده از آنها به عنوان عوامل بیوکنترل بیماری سوختگی غلاف وجود دارد.

کشت متقابل و درصد بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری در آزمون تولید مواد فرار ضدقارچی، به کمک نرم‌افزار SPSS، به روش Ward تجزیه کلاستر و گروه‌بندی شدند و در دندروگرام به دست آمده تعداد هشت استرین آنتاگونیست که در بالاترین گروه از نظر قدرت آنتاگونیستی قرار داشتند شناسایی و جهت بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

– شناسایی استرین‌های انتخابی: جهت شناسایی مقدماتی از آزمون حلالیت در پتاس ۳ درصد (۲۸) و رنگ آمیزی به روش گرم (۲۴) استفاده گردید. تولید رنگ فلورسانس روی محیط K.B بررسی شد. برای تعیین واکنش فوق حساسیت^۳ سوسپانسیون حاوی ۱۰^{۱۰} سلول در هر میلی‌لیتر از هر جدایه به زیر بشره توتون تزریق گردید (۱۳) در نهایت برای تفکیک سویه‌های فلورسانس ساپروفیت، تولید لوان و لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی (۱۵) اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز و سایر آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی استفاده گردید (۲۴).

بررسی‌های گلخانه‌ای

برای بررسی تاثیر استرین‌های آنتاگونیست انتخابی بر روی بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در شرایط گلخانه آزمایشی در قالب کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با کرت اصلی شامل روش‌های کاربرد استرین‌های آنتاگونیست انتخابی (تیمار بذر، خاک و گیاه) و کرت فرعی شامل استرین‌های آنتاگونیست انتخابی (هشت استرین) و شاهد در سه تکرار اجرا گردید. در این آزمایش از بذور رقم سپیدرود، حساس به بیماری سوختگی غلاف برگ برنج استفاده گردید.

تیمار بذر: بذور به وسیله استرین‌های آنتاگونیست آغشته سازی و پوشش^۴ داده شدند. بذور مطابق روش رایبندران و ویدیهاسکاران (۱۹۹۹) پس از خیساندن و ضدعفونی سطحی در سوسپانسیون استرین‌های آنتاگونیست با غلظت ۱۰^۹ × ۱ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر (به روش اسپکتروفتومتری با تراکم نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) مطابق روش شر و بیکر (۱۹۸۲) همراه با محلول یک درصد کربوکسی‌متیل سلولز به عنوان یک عامل چسباننده به مدت ۲۴ ساعت در حرارت اتاق (۲۵±۲) نگهداری شدند. بذور شاهد نیز پس از ضدعفونی سطحی، در داخل آب مقطر استریل مخلوط شده با محلول یک درصد کربوکسی‌متیل سلولز به همراه سایر

پتانسیل آنتاگونیستی و امکان کاربرد عوامل بیوکنترل باکتریایی عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج *R. solani* در استان گیلان از اهداف مهم این بررسی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

قارچ عامل بیماری

قارچ عامل بیماری از غلاف برگ‌های آلوده در شالیزارهای رشت مطابق روش امین (۷) جداسازی گردید. جدایه قارچ عامل بیماری پس از جداسازی و خالص سازی در مخلوط پوسته برنج ودانه برنج تهیه شده مطابق روش میو وروزالز (۱۸) تکثیر گردید. جدایه قارچ عامل بیماری جهت شناسایی از لحاظ مشخصات کلنی در محیط کشت PDA، تعداد هسته و سایر مشخصات میکروسکوپی با رشد نوک ریشه در محیط آب آگار ۲ درصد با رنگ آمیزی هسته مورد بررسی قرار گرفت (۲۷).

عوامل بیوکنترل باکتریایی

– جداسازی، خالص سازی و نگهداری عوامل بیوکنترل: در سال زراعی ۱۳۸۱-۱۳۸۰ و همچنین بعد از برداشت برنج در همان سال زراعی نمونه برداری از مزارع برنج استان گیلان صورت گرفت. نمونه های گیاه برنج (سالم و آلوده)، بذر، ریزوسفر، خاک مزارع برنج، آب شالیزار و اسکروت قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج (*R. solani*) جمع آوری گردیدند. پس از کشت نمونه‌ها در روی محیط کشت K.B و N.A اقدام به جداسازی و خالص‌سازی کلونی‌های باکتریایی رشد یافته متفاوت از لحاظ مشخصات کلونی گردید. توانایی همه استرین‌های باکتریایی جداسازی شده، در جلوگیری از رشد جدایه قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی^۱ در آزمون کشت متقابل^۲ مورد بررسی قرار گرفت (۱۱). استرین‌های دارای منطقه بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری به عنوان عوامل بیوکنترل باکتریایی قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج انتخاب و جهت بررسی‌های بعدی در محلول ۱۰ درصد Skim milk نگهداری گردیدند.

– انتخاب استرین‌های آنتاگونیست: سی و هفت استرین باکتری آنتاگونیست بر اساس دو ویژگی اندازه منطقه بازدارندگی در آزمون

3 - Hypersensitivity reaction

4 - Seed coating

1 - *In vitro*

2 - Dual cultuer

درصد کربوکسی متیل سلولز محلول پاشی گردیدند. در تیمار شاهد گیاهان با آب مقطر استریل همراه با محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز محلول پاشی گردیدند (۳۰).

مایه زنی مصنوعی گیاه: گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف بذر، خاک و گیاه در مرحله ظهور حداکثر پنجه (۶۰ روز بعد از کاشت بذر برنج) با قرار دادن سه گرم از مخلوط پوسته برنج، دانه برنج و ریشه‌های قارچ رشد یافته در این مخلوط تهیه شده مطابق روش میو و روزالز (۲۰) در بین پنجه‌های گیاه در محل دو الی چهار سانتی متری سطح ایستایی آب مایه‌زنی شدند و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. برای تامین رطوبت از گونی‌های مرطوب و برای کاهش شدت نور و حرارت، روی شیشه‌های گلخانه آب و گل پاشیده شد (۳۰).

ارزیابی شدت بیماری سوختگی غلاف برگ برنج: شدت بیماری سوختگی غلاف برگ برنج مربوط به تیمارهای مختلف بذر، خاک و گیاه در مرحله حداکثر گلدهی (۹۰ روز بعد از کاشت بذر برنج) با استفاده از فرمول زیر ارزیابی گردید (۲۶).

$$\text{شیت بلایت} = \frac{\text{ایندکس شدت بیماری بر حسب درصد ارتفاع نسبی لکه}}{\text{بالاترین ارتفاع لکه شیت بلایت (cm)}} \times 100$$

آب شالیزار و اسکروت قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج تعداد ۶۱۰ استرین باکتری به دست آمد که تعداد ۷۱ استرین (۱۱/۶۴ درصد) دارای قدرت بازدارندگی از رشد قارچ در آزمون کشت متقابل در محیط غذایی PDA بودند (جدول ۱). در دندروگرام به دست آمده براساس آزمون تجزیه کلاستر با استفاده از نرم افزار SPSS (شکل ۱) تعداد هشت استرین باکتری آنتاگونیست که دارای بیشترین اندازه منطقه بازدارندگی به همراه بیشترین درصد کاهش رشد جدایه قارچ عامل بیماری در آزمون تولید مواد فرار بودند و در یک گروه (بالاترین گروه) قرار گرفته بودند (جدول ۲) مطابق آزمون های استاندارد باکتری شناسی شناسایی گردیده و جهت آزمایشات گلخانه‌ای به صورت تیمار بذر، خاک و گیاه انتخاب گردیدند.

شناسایی باکتری های آنتاگونیست انتخابی

جدایه ها همگی گرم منفی، فلورسنت، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت بودند، به استثنای سویه *Pseudomonas aeruginosa* فاقد توانایی واکنش فوق حساسیت در توتون و لهانیدن ورقه های سیب زمینی بوده و ژلاتین را ذوب نمودند (سایر خصوصیات در جدول ۳).

تیمارها نگهداری شدند. پانزده عدد بذر در هر گلدان پر شده با خاک مزرعه در سه تکرار کاشته شده و پس از تنک کردن، سه نشاء در هر گلدان باقی گذاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و حرارت طبیعی روزانه (اردیبهشت ماه گیلان) و آبیاری مرتب روزانه نگهداری گردیدند.

تیمار خاک: تعداد ۱۵ عدد بذر ضد عفونی شده در خاک هر گلدان حاوی خاک مزرعه در سه تکرار کاشته شد. سپس خاک گلدان‌ها با سوسپانسیون استرین‌های آنتاگونیست تهیه شده مطابق روش قبل تا خیس شدن کامل خاک گلدان محلول پاشی گردید. تیمار شاهد فقط با آب مقطر محلول پاشی گردید. و پس از تنک کردن، سه نشاء در هر گلدان باقی گذاشته شد.

تیمار گیاه: ضد عفونی سطحی و کاشت بذر و تنک کردن گیاهان همانند مراحل قبل صورت گرفت. گیاهان در زمان حداکثر پنجه‌زنی یک روز قبل از مایه‌زنی مصنوعی با قارچ عامل بیماری، توسط ۲۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری‌های انتخابی همراه با محلول یک

بالاترین ارتفاع لکه شیت بلایت (cm)

بالاترین ارتفاع گیاه برنج (cm)

ارتفاع گیاه در هر پنجه با اندازه‌گیری طول پنجه از محل ابتدای پایه گیاه برنج تا نوک برگ پرچم و ارتفاع لکه در هر پنجه نیز با اندازه‌گیری طول لکه ناشی از بیماری سوختگی غلاف برنج از محل ابتدای پایه تا آنجائیکه لکه روی گیاه دیده شود، انجام شد (۲۶).

نتایج

قارچ عامل بیماری

میسلیوم قارچ عامل بیماری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت PDA رشد نموده و در مدت زمان ۴۰ ساعت تمام سطح تشتک پتری به قطر نه سانتی‌متر را پوشانید. پس از گذشت هفت روز در همین دما اسکروت‌های قارچ عامل بیماری در محیط کشت ظاهر گردید. اندازه قطر میسلیوم ۸ الی ۱۲ میکرون بوده و سه الی پنج هسته در هر سلول ریشه مشاهده گردید و به نام *Rhizoctonia solani* AG-1 1A kÜhn شناسایی گردید (۲۷).

ردیابی و انتخاب عوامل بیوکنترل باکتریایی

از تعداد ۱۶۰ نمونه گرفته شده از اکوسیستم مزارع برنج استان گیلان شامل گیاه برنج (سالم و آلوده)، بذر، ریزوسفر، خاک مزارع برنج،

آزمایشات گلخانه ای

ارزیابی شدت بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط گلخانه در حضور استرین‌های آنتاگونیست به صورت تیمار بذر، خاک و گیاه نشان داد که بین تیمار گیاه با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود داشته و استرین‌های ۱۵۲ (*P.aeruginosa*) 7s و (*P. fluorescens* bv3) 7s (*P.*) در تیمار گیاه به ترتیب با ۲۶/۵۹ درصد و ۳۳/۵۴ درصد کاهش در شدت بیماری، بیشترین اثر را در کاهش شدت بیماری نشان داده و

نسبت به شاهد در گروه جداگانه‌ای قرار داشتند. در بین سه روش به کار رفته، استرین ۱۵۲ (*Pseudomonas aeruginosa*) با ۱۴/۴۶ درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد، کمترین شدت بیماری را نشان داد (جدول ۴).

جدول ۱- باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از منابع نمونه برداری مختلف

منبع نمونه	تعداد نمونه	تعداد باکتری‌های سواسازی شده	تعداد باکتری‌های آنتاگونیست	درصد باکتری‌های آنتاگونیست
گیاه برنج	۷۴	۱۴۶	۸	۵/۴۸
بذر برنج	۲۰	۸۰	۳	۰/۰۳
ریزوسفر برنج	۲۶	۲۵۴	۴۲	۱۶/۵۳
خاک شالیزار	۱۳	۷۷	۶	۷/۷۹
آب شالیزار	۱۳	۴۴	۱۰	۲۲/۷۲
اسکلروت قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج	۴	۹	۲	۲۲/۲۲
مجموع	۱۶۰	۶۱۰	۷۱	۱۰۰

جدول ۲- استرین‌های آنتاگونیست انتخابی جداسازی شده از منابع مختلف نمونه برداری

شماره نمونه	محل نمونه برداری	منبع نمونه	تشخیص
7s	زمیدان لاهیجان	خاک شالیزار	<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv 3
9s	سوستان لاهیجان	خاک شالیزار	<i>P. fluorescens</i> bv 3
133	راسته کنار رشت	گردن خوشه‌آلوده به بلاست	<i>P. fluorescens</i> bv 5
152	تازه‌آباد رضوانشهر	گره‌های پایین‌آلوده به بلاست	<i>P. aeruginosa</i>
15R	مراد دهنده لاهیجان	ریزوسفر برنج	<i>P. fluorescens</i> bv 5
29R	کورنده لاهیجان	ریزوسفر برنج	<i>P. fluorescens</i> bv 5
21R	نخجیر کلایه لاهیجان	ریزوسفر برنج	<i>P. putida</i> bv A
23R	نخجیر کلایه لاهیجان	ریزوسفر برنج	<i>P. fluorescens</i> bv 5

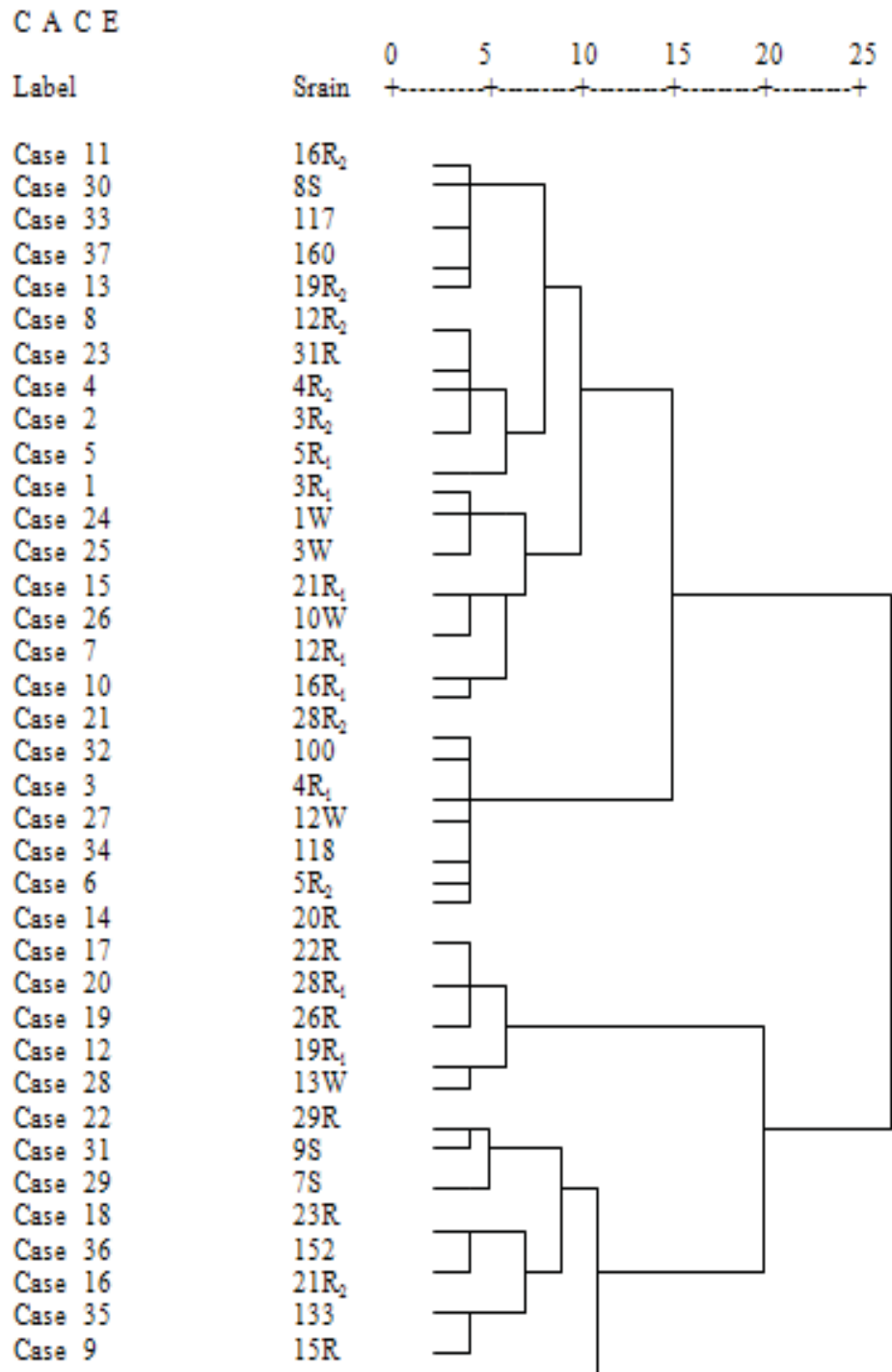
جدول ۳- خصوصیات بیوشیمیایی استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست انتخابی (Schaad et al., 2001)

آزمون	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i> bv 3	<i>P. fluorescens</i> bv 5	<i>P. putida</i> bv A
تولید لوآن	-	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+	-	-
رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد	+	-	-	-
رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد	-	+	+	+
تولید رنگ فلوروسانت	+	+	+	+
فوق حساسیت در توتون	+	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
آرژنین دی هیدرولاز	+	+	+	+
لهانیدن سیب زمینی	-	-	-	-
استفاده از: ال آرابینوز	-	-	+	+
// دی گالاکتوز	-	+	+	-
// ساکاروز	-	+	+	+
// سوربیتول	-	-	+	-
// مایواینوزیتول	-	+	+	-
// ادنیتول	-	-	-	-
// اتانول	+	+	+	+
// ترهالوز	-	+	+	-

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر استرین‌های آنتاگونیست و روش کاربرد آنها روی شدت بیماری سوختگی غلاف برنج

شاهد	۲۹R	۱۵R	۲۳R	۲۱R	۱۵۲	۱۳۳	۹S	۷S	استرین
									روش کاربرد
۱۵/۲۴a	۱۵/۸۹a	۱۴/۱۵a	۱۴/۸۵a	۱۵/۲۲a	۱۲/۵۴a	۱۴/۹۶a	۱۵/۳۷a	۱۳/۸۵a	تیمار بذر
۱۷/۶۴a	۱۸/۸۶a	۱۷/۸۷a	۱۹/۱۷a	۱۶/۵۷a	۱۸/۳۳a	۱۷/۷۳ a	۱۹/۹۶a	۱۹/۳۵a	تیمار خاک
۲۱/۷۴a	۲۱/۷۹a	۱۷/۹۴ ab	۱۷/۶۸ab	۱۶/۹۳b	۱۵/۹۶b	۱۶/۱۴ab	۱۷/۲۰ab	۱۴/۴۵b	تیمار گیاه

- ۱- اعداد شامل درصد ارتفاع نسبی زخم ناشی از بیماری سوختگی غلاف برگ برنج می‌باشد.
 ۲- تیمارهای دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با همدیگر ندارند (آزمون دانکن سطح ۵ درصد)



شکل ۱- دندروگرام استرین‌های آنتاگونیست بر اساس هاله بازدارندگی و تولید مواد فرار (تجزیه کلاستر، روش Ward)

بیماری‌زا قابل توجه است. کاربرد استرین باکتری ۱۵۲ (P. aeruginosa) به روش تیمار گیاه در میان باکتری‌های انتخابی تأثیر مثبت و معنی‌دار در کاهش شدت بیماری سوختگی غلاف داشته است که جمعیت آزمایشات بعدی مزرعه‌ای توصیه می‌گردد. اگر چه اکثر استرین‌های انتخابی قادر به کنترل موفق بیماری نبوده‌اند ولی باید علت را در شرایط محیطی کاربرد استرین‌ها تا زمان شروع بیماری‌زایی و فعالیت اینوکولوم عامل بیماری را جستجو نمود و تا حد زیادی پیچیده بودن تأثیر عوامل بیوکنترل در اینجا دخالت دارد. در روش‌های کاربرد تیمار بذر و خاک نتایج مطلوبی در کاهش بیماری نسبت به شاهد مشاهده نشده است که نشان‌دهنده بقای کم جمعیت آنتاگونیست‌ها در زمان کاربرد اینوکولوم عامل بیماری‌زا در زمان شروع بیماری‌زایی می‌باشد. از آنجائیکه چاره‌ای جز فراهم شدن زمان مناسب برای فعالیت اینوکولوم عامل بیماری‌زا تا زمان پنجه‌زنی گیاه برنج نمی‌باشد و فاصله زمانی بین کاشت بذر تا پنجه‌زنی گیاه برنج در حدود یک ماه با توجه به رقم و شرایط محیطی می‌باشد لذا در این مدت زمان، جمعیت آنتاگونیست‌ها به خصوص سودوموناس‌های فلورسنت پایین می‌آید. بنابراین باید حتی‌الامکان از وارد شدن کلیه استرس‌های محیطی (حرارت، رطوبت، مواد غذایی، تغییرات pH و...) تا زمان کاربرد اینوکولوم عامل بیماری‌زا جلوگیری نمود که این کار در شرایط کاربردی دشوار می‌باشد. اما عملکرد مثبت بعضی استرین‌ها در کاربرد به صورت محلول پاشی بر روی گیاه (تیمار گیاه) در کاهش معنی‌دار بیماری نسبت به شاهد، غیر از ویژگی‌های مربوط به استرین آنتاگونیست، احتمالاً به خاطر حضور جمعیت کافی از آنتاگونیست در زمان شروع بیماری‌زایی عامل بیماری به دلیل فاصله زمانی اندک بین کاربرد آنتاگونیست تا کاربرد اینوکولوم عامل بیماری (یک روز) می‌باشد.

از آنجایی که اثر عوامل بیوکنترل به میزان زیادی تحت تأثیر طبیعت فیزیکی و شیمیایی، رطوبت و دمای خاک واقع می‌شود، فاکتور محدود کننده در کاربرد عوامل بیوکنترل باکتریایی بقاء در شرایط استرس عوامل محیطی به خصوص استرس خشکی است (۳۱). آزمایشات وست و همکاران (۱۹۸۵) نشان داد که مهمترین عوامل در بقای گونه‌های باسیلوس در خاک در درجه اول مواد غذایی در دسترس و وجود میکروارگانیسم‌های بومی و بعد از آنها رطوبت و pH خاک می‌باشند. آندروز (۱۹۹۲) اعتقاد دارد که صفات زیادی از یک آنتاگونیست در موفقیت امر بیوکنترل دخالت دارند و بیوکنترل نتیجه یک سری از رویدادها است و نتایجی که از هر روش غربال کردن به دست می‌آید ممکن است فقط در همان شرایط آزمایشی معتبر باشند. غربال عوامل بیوکنترل یک مرحله حیاتی در توسعه

نتایج حاصله از نمونه‌برداری برای ردیابی باکتری‌های آنتاگونیست نشان داد که مزارع برنج استان گیلان غنی از عوامل بیوکنترل باکتریایی بوده و شرایط برای تکثیر و بقای آنها به دلیل وجود رطوبت کافی فراهم می‌باشد. مطالعات میو و روزالز (۲۰) نشان داده است که تعداد زیادی از آنتاگونیست‌های باکتریایی در اکوسیستم مزارع برنج در مناطق معتدل وجود دارند که دارای پتانسیل جایگزین برای مدیریت بیماری‌های برنج می‌باشند و استفاده از این باکتری‌ها به عنوان عوامل بیوکنترل شیت بلایت برنج در مزارع برنج (با سیستم غرقابی) امکان‌پذیر است. تعداد کم استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست به دست آمده از گیاه و بذر برنج می‌تواند به دلیل آن باشد که شرایط برای بقای عوامل بیوکنترل به دلیل استرس‌های محیطی فراهم نبوده است، در حالیکه نمونه‌های آب شالیزار، خاک شالیزار و ریزوسفر برنج شرایط مساعد را برای بقاء و تکثیر عوامل بیوکنترل فراهم می‌سازند. تعداد بالای استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست به دست آمده از اسکروت قارچ عامل بیماری می‌تواند به دلیل تثبیت عوامل بیوکنترل در لایه‌های درونی اسکروت باشد که تا حدی از وارد شدن استرس‌های محیطی به عوامل بیوکنترل جلوگیری می‌کند. نتایج حاصله از بررسی اثرات آنتی بیوزیس باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی از مزارع برنج استان گیلان نشان داده است که جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست از قدرت تولید آنتی بیوزیس بالایی در شرایط آزمایشگاهی برخوردارند (۵).

بررسی همزمان تأثیر استرین‌های انتخابی بر روی شدت بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در درجه اول اهمیت بررسی (فاکتور فرعی) و تأثیر روش‌های مختلف کاربرد استرین‌های انتخابی در درجه دوم اهمیت (فاکتور اصلی) نشان می‌دهد تنها استرین‌های آنتاگونیست ۱۵۲ (P. aeruginosa) و ۷ (s fluorescens bv3) (P. aeruginosa) (۱۵۲) در روش تیمار گیاه در میان باکتری‌های انتخابی تأثیر مثبت و معنی‌دار در کاهش شدت بیماری سوختگی غلاف داشته است که جهت آزمایشات بعدی مزرعه‌ای توصیه می‌گردند. تفاوت روش کاربرد تیمار گیاه با تیمار بذر و خاک احتمالاً به دلیل پایدار ماندن جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست در فاصله زمانی اندک بین کاربرد اینوکولوم عامل بیماری‌زا با اینوکولوم آنتاگونیست در روش کاربرد روی گیاه می‌باشد. در روش کاربرد تیمار بذر و تیمار خاک تأثیر کم استرین‌های باکتریایی انتخابی به دلیل فاصله زمانی زیاد کاربرد اینوکولوم عامل بیماری‌زا با اینوکولوم آنتاگونیست تا فراهم شدن زمان مناسب برای فعالیت اینوکولوم عامل بیماری (زمان حداکثر پنجه‌زنی گیاه برنج) و در پی آن کاهش جمعیت آنتاگونیست‌ها در زمان کاربرد اینوکولوم عامل

سوختگی غلاف برگ برنج بستگی به انتخاب یک استرین کارا، حضور یک جمعیت کافی از استرین باکتری، نوع ماده حامل باکتری و روش کاربرد دارد. با توجه به اینکه همواره شرایط محیطی کاربرد استرین های آنتاگونیست جهت بیوکنترل موفق بسیار مهم می باشد لذا تلاش برای دستیابی به فورمولاسیون هایی که قادر به حمایت و حفاظت استرین های آنتاگونیست در شرایط نا مساعد محیطی باشند نیز توصیه می گردد. اثرات عوامل بیوکنترل در شرایط طبیعی پیچیده بوده و بستگی زیادی به واکنش های مختلف گیاه، پاتوژن، آنتاگونیست و شرایط محیطی دارد. سؤال های متنوعی در ارتباط با طبیعت کنترل بیولوژیکی و ابزار موثرتر مدیریت آن تحت شرایط طبیعی وجود دارد که به نظر می رسد پرداختن به کلیه عوامل بیوکنترل بومی هر منطقه در هر اکوسیستم زراعی، یکی از مهم ترین مراحل کاربردی نمودن عوامل بیوکنترل باشد.

عوامل بیوکنترل بوده و موفقیت همه مراحل بعدی جهت یک بیوکنترل موفق به مراحل غربال صحیح برای شناسایی یک کاندید مناسب بستگی دارد. بسیاری از عوامل بیوکنترل مفید با مشاهده هاله بازدارندگی در تشتک های پتری شناخته شده اند. به هر حال این روش، عوامل بیوکنترل با توانایی هایی از قبیل پارازیتسم، ایجاد مقاومت القایی و یا بعضی اشکال رقابت را شناسایی نمی کند (۱۶). بنابراین آزمایشات بعدی مزرعه ای برای اثبات اثر عوامل بیوکنترل در شرایط مختلف محیطی لازم است. آنتاگونیسم در شرایط آزمایشگاهی اگر به عنوان تنها ویژگی انتخاب یک استرین به حساب آید ممکن است منجر به حصول نتیجه مطلوب نگردد. با توجه به اهمیت غربال عوامل بیوکنترل شاید بهترین روش انتخاب استرین های کارا آن باشد که آنها را قبل از آنکه برای استفاده توصیه گردند به صورت مرتب در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه ای آزمایش نماییم (۲۳). ویدیهاسکاران و موتامیلان (۱۹۹۹) نشان دادند که توسعه فورمولاسیون پودری تهیه شده از سودوموناس های فلورسنت جهت کنترل موثر بیماری

منابع

- ۱- پاداشت دهکایی ف.؛ روحانی ح. و منصوری جاجایی ش. ۱۳۷۹. ضد عفونی بذور برنج به وسیله چند میکروارگانیسم آنتاگونیست علیه بیماری پوسیدگی طوقه. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۲۴۹.
- ۲- ایزدیار م. و پاداشت ف. ۱۳۷۲. بررسی فعالیت آنتاگونیستی بعضی از میکروارگانیسمها علیه بیماری سوختگی غلاف برگ برنج. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۶۵.
- ۳- ایزدیار م. و بهرامی م. ۱۳۷۹. مقایسه فعالیت آنتاگونیستی چند گونه تریکودرما و تولید تجارتي پروموت روی بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در مزرعه. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۳۴.
- ۴- پور عبدالله ش. و بینش ح. ۱۳۷۲. بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با بیماری سوختگی غلاف برگ. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۶۸.
- ۵- کاظم زاده م.؛ پاداشت، ف.؛ خداکرمیان، غ. و روستایی ع. م. ۱۳۸۴. اثرات آنتی بیوزیس باکتری های آنتاگونیست سوا سازی از مزارع برنج استان گیلان روی قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. سال دوازدهم. شماره ششم. بهمن و اسفند ۱۳۸۴- صفحات ۱۴۶ الی ۱۵۳
- ۶- نیک نژاد کاظم پور، م.، پدرام فر و س.ع. الهی نیا. ۱۳۷۹. بررسی اثر چند قارچکش و قارچهای آنتاگونیست علیه عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج *Rhizoctonia solani*. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۲۴۸.
- 7- Amin K.S. 1975. An improved method for evaluating rice sheath blight. *Phytopathology* 65: 214-215
- 8- Andrews J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathology* 30: 603-633.
- 9- Bashar M., Hossain A., Rahman M. M., Uddin M.N. and Begum M. N. 2010. Biological control of sheath Blight Disease of Rice by using Antagonistic Bacteria . *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 45(3), 225-232

- 10- Choi G. J., Kim J. C., Park E.J., Choi Y.H., Jang K.S., Lim H.K., Cho K. Y., Lee S. W. 2006. Biological control activity of two isolates of *Pseudomonas fluorescens* against rice sheath blight. *Plant Pathol. J.* 2: 289-294
- 11- Dhingra O., and Sinclair I. 1995. 2nd ed. Basic plant pathology methods. 434pp.CRC lewis publishers.
- 12- Gnanamanickam S.S., Candole B.L., and Mew T.W. 1992. Influence of soil factors and cultural practice on biological control of sheath blight of rice with antagonistic bacteria. *Plant and Soil* 144: 67-75
- 13- Gnanamanickam S.S., and Mew T.W. 1989. Biological control of rice diseases (blast and sheath Blight) with bacterial antagonists. An alternate sterategy for disease management. In: Grayson, B.T., Green, M.B., and Copping,L.G.(eds) *Pest Management In Rice*.SCI, Elsevier Science Publisher, England, PP.87-110.
- 14- Klement Z., Farkas G. L. and Lovreicovich L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- 15- Lelliott R.A., Billing E. and Hyward A. C. 1966. A determinative Scheme for thr fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol* 29: 470-489
- 16- Mcspadden G. B. B., and Fravel D. R. 2002. Biological contttrol of plant pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. Online. *Plant Health Progress* Doi: 10. 1094/ PHB-2002- 0510-01-RV.
- 17- Marshal D. S., and Rush M. S. 1980. Infection cushion formation on rice sheaths by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 947-950.
- 18- Mew T.W., and Rosales A.M. 1986. Bacterization of rice plants for the control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 76: 1260-1264.
- 19- Nandakumar R., Babu S., Viswanathan R., Raguchandeer T., and Samiyappan R. 2000. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry* 33(2001), 603-612.
- 20- Rabindran R., and Vidhyasekaran P. 1996. Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR₂ for management of rice sheath blight. *Crop protection*, 15: 715-717.
- 21- Rosales A.M., Thomashow L., Cook R. J., Mew T.W. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice associated antagonistic *Pseudomonas* spp . *Phytopathology* 85: 1028-1032.
- 22- Rosales A.M., Vantomme R., Swings J., Delay J., and Mew T. W. 1993. Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. *Jurnal of phytopathology* 138: 189-203.
- 23- Sakthivel N., and Gnanamanicham S.S. 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oriza sativa* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2056-2059.
- 24- Schaad N, Jones W., J, B and Chum W. 2001. Labroatory Guide for Identification plant pathogenic Bacteria. Third edition APS. 374 pp.
- 25- Scher F.M., and Baker R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness of Fusarium wilt pathogenes. *Phytopathology* 72: 1567-1573.
- 26- Sharma N.R., and Teng P.S. 1990. Comparison of rice sheath blight assessment methods. *International Rice Research Newsletter* 15: 6.

- 27- Sneh B., Burpe L., and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. American Phytopathological Society. 132 pp.
- 28- Suslow T.V., Schroth M. N. and Isaka M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-918
- 29- Vasudevan P., Kavitha S., Priyadarisini V. B., Babujee L., and Gnanamanickam S.S. 2002. Biological control of rice disease. Pp. 11-32 in: S.S. Gnanamanickam (ed.) *Biological Control of Crop Disease*. Marcel Dekker Inc. New York, 486p.
- 30- Vidhyasekaran P., and Muthamilan M. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology* 8: 67-74.
- 31- West A.M., Burges H.D., Dixon T.J., and Wybron C.H. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *B. subtilis* spore inocula in soil. Effects of pH, Moisture, Nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil. Biol. Biochem.* 17(5), 657-665.
- 32- Xie G., Wu Z. X., and Yu X. F. 2001. Microbial diversity of nonpathogenic pseudomonas and related bacteria from rice seeds in Zhejiang province of China and Luzan Island of the Philippines. *Chin. J. Rice Scie.* 13(4): 233-238.