نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، ص. ۵۴-۴۴

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 1, Spring 2012, P. 44-54

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 اسکلروت قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* تعداد ۶۱۰ استرین باکتری جداسازی شد. تعداد ۷۱ استرین (۱۱/۶۴درصد) توانایی بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری مذکور در آزمون کشت متقابل (Dual culture) در محیط غذایی PDAرا داشتند. تعداد ۳۷ استرین آنتاگونیست بر اساس دو ویژگی هاله بازدارندگی در آزمون کشت متقابل و درصد بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری درآزمون تولید مواد فرار ضدقارچی تجزیه‌کلاستر 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 استرین های آنتاگونیست ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تیمار گیاه با سایر روشهای کاربرد تفاوت معنی‌دار داشته و استرین‌های۱۵۲ (*Pseudomonas aeruginosa*) و S 7 bv3 (*Pseudomonas fluorescens*)) 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، استرین۱۵۲ (*Pseudomonas aeruginosa*) با ۱۴/۴۶ درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد، کمترین شدت بیماری را نشان داد.

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

مقدمه

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 بیشترکود 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 استفادهٔ روزافزون از کودهای شیمیایی جهت تولید اینگونه 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). به‌دلیل 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 برنج در ایران و دنیا صورت گرفته است. در ایران ایزدیار و پاداشت (۲) پس از جداسازی میکروارگانیسم‌های متعدد از خاک، آب مزرعه، ریشه و برگ گیاه برنج خاصیت آنتاگونیستی آنها علیه بیماری سوختگی غلاف 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

۱ – کارشناس ارشد بیماریهای گیاهی، مدیریت جهاد کشاورزی شفت، گیلان
(*- نویسنده مسئول: Email:marzie1808@yahoo.com)
۲- استادیارگروه 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

مختلف قارچ تریکودرما سبب ایجاد تغییراتی در هیف قارچ ریزوکتونیا می‌گردند و با رشد سریع خود سطح تشتک 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 رایزوکتونیا 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 عمدتا از سال ۱۹۸۰ آغاز شده است (۲۹). از میان تعدادی عوامل بیوکنترل متنوعی که در طبیعت یافت می شوند آنتاگونیست های باکتریایی بخاطرسرعت رشد بالا، خصوصیات احاطه سازی ریزوسفر و سادگی کارکرد با آنها جهت کنترل بیولوژیک ایده آل محسوب می شوند. مطالعات آشکار ساخته است که تعداد فراوانی از استرین های باکتریایی توانایی حفاظت از گیاهان برنج در مقابل بیماری های نظیر بلاست، سوختگی غلاف ، پوسیدگی غلاف ، پوسیدگی ساقه دارند. تعدادی از استرینهای فلورسنت و غیر فلورسنت باکتریهای انتاگونیست در ریزوسفر مناطق مختلف خاکهای lowland و upland یافت می شوند که در شرایط آزمایشگاهی ، گلخانه ای و مزرعه ای علیه سوختگی غلاف برنج موثر هستند. *باکتری Psudomonas fluorescens* علیه چندین بیمارگر برنج بین ۲۰ تا ۴۲ درصد در شرایط گلخانه و مزرعه ای موثر بوده و همچنین سبب افزایش رشد گیاه، تعداد پنجه ها و افزایش محصول بین ۳ تا ۱۶۰ درصد شده است. همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که باکتری *Psudomonas fluorescens* دارای اثرات حشره کشی 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 می شود (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. سودوموناس‌های فلورسنت و باسیلوس‌ها از مهم‌ترین عوامل بیوکنترل به شمار می آیند (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 بذر، 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 می آورند (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 avenea* و یک بیمارگر از جنس *Xanthomonas* بودند. اطلاعات نشان داده است که اکوسیستم شالیزار دارای ذخیره بالایی از عوامل بیوکنترل می‌باشد (۳۲). با ارزیابی عوامل بیوکنترل علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ 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 میسلیوم 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 بیوزیس 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 انتاگونیست 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 بذر 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.

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 ودانهء 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 ریسه 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 نمونه‌برداری از مزارع برنج استان گیلان صورت گرفت. نمونه های گیاه برنج (سالم و آلوده)، بذر، ریزوسفر، خاک مزارع برنج، آب شالیزار و اسکلروت 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[1] در آزمون کشت متقابل[2] 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 محلول۱۰ درصد Skim milk نگهداری گردیدند.

– انتخاب استرین‌های آنتاگونیست: سی و هفت استرین باکتری آنتاگونیست بر اساس دو ویژگی اندازه منطقه بازدارندگی در آزمون کشت متقابل و درصد بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری در آزمون تولید مواد فرار ضدقارچی، به کمک نرم‌افزار SPSS، به روش Ward تجزیه‌کلاستر 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 استرین های 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[3] سوسپانسیون حاوی 10^{10} سلول در هر میلی‌لیتر از هرجدایه به زیر بشره توتون تزریق گردید (۱۳) در نهایت برای تفکیک سویه های فلورسنت ساپروفیت، تولید لوان و لهانیدن ورقه های سیب زمینی (۱۵) اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز و سایر آزمون های استاندارد باکتری شناسی استفاده گردید (۲۴).

بررسی های گلخانه ای

برای بررسی تاثیر استرین‌های آنتاگونیست انتخابی برروی 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 وگیاه) 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[4] داده شدند. بذور مطابق روش رابیندران و ویدهیاسکاران (۱۹۹۹) پس از خیساندن و ضدعفونی سطحی در سوسپانسیون استرین‌های آنتاگونیست با غلظت ۱۰۹ ×۱ واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر (به روش اسپکتروفتومتری با تراکم نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) مطابق روش شر وبیکر (۱۹۸۲) همراه با محلول یک درصد کربوکسی‌متیل‌سلولز به عنوان یک عامل چسباننده به مدت ۲۴ ساعت در حرارت اتاق (۲+۲۵) نگهداری شدند. بذور شاهد نیز پس از ضدعفونی سطحی، در داخل آب مقطر استریل مخلوط شده با محلول یک درصد کربوکسی‌متیل‌سلولز به همراه سایر

1 - *In vitro*
2 - Dual cultuer

3 - Hypersensitivity reaction
4 - Seed coating

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

تیمار خاک: تعداد ۱۵ عدد بذر ضدعفونی 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: ضدغفونی 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 درصدکربوکسی‌متیل‌سلولز محلول پاشی گردیدند. در تیمار شاهد گیاهان با آب مقطر استریل همراه با محلول یک درصد کربوکسی‌متیل‌سلولز محلول پاشی گردیدند (۳۰).

مایه زنی مصنوعی گیاه : گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف بذر، خاک وگیاه در مرحله ظهور حداکثر پنجه (۶۰ روز بعد از کاشت بذر برنج) با قرار دادن سه گرم از مخلوط پوسته برنج، دانه برنج و ریسه‌های قارچ رشد یافته در این مخلوط تهیه شده مطابق روش میو وروزالز (۲۰) در بین پنجه‌های گیاه در محل دو الی چهار سانتی‌متری سطح ایستایی آب مایه‌زنی شدند و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. برای تامین رطوبت از گونی‌های مرطوب و برای کاهش شدت نور وحرارت، 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 وگیاه در مرحله حداکثر گلدهی (۹۰ روز بعداز کاشت بذر برنج) با استفاده از فرمول زیر ارزیابی گردید (۲۶).

$$\text{ایندکس شدت بیماری بر حسب درصد ارتفاع نسبی لکه شیت‌بلایت} = \frac{\text{بالاترین ارتفاع لکه شیت‌بلایت (cm)}}{\text{بالاترین ارتفاع گیاه برنج (cm)}} \times ۱۰۰$$

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 اسکلروت‌های قارچ عامل بیماری در محیط کشت ظاهر گردید. اندازه قطر میسلیوم ۸ الی ۱۲ میکرون بوده و سه الی پنج هسته در هر سلول ریسه 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 وآلوده)، بذر، ریزوسفر، خاک مزارع برنج، آب شالیزار و اسکلروت قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج تعداد ۶۱۰ استرین باکتری به دست آمد که تعداد ۷۱ استرین (۱۱/۶۴درصد) 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 نرم‌افزار 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 وگیاه انتخاب گردیدند.

شناسایی باکتری های انتاگونیست انتخابی

جدایه ها همگی گرم منفی، فلورسنت، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت بودند، به استثنای سویه *Pseudomonas aeruginsa* فاقد توانایی واکنش فوق حساسیت در توتون و لهانیدن ورقه های سیب زمینی بوده و ژلاتین را ذوب نمودند (سایر خصوصیات در جدول۳).

آزمایشات گلخانه ای

ارزیابی شدت بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط گلخانه در حضور استرین‌های آنتاگونیست به صورت تیمار بذر، خاک وگیاه نشان داد که بین تیمار گیاه با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود داشته و استرین‌های ۱۵۲ (*P.aeruginosa*) و 7s (*fluorescens* bv3 *P.*) در تیمار گیاه به ترتیب با۲۶/۵۹ 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، استرین۱۵۲ (*Pseudomonas aeruginosa*) با ۱۴/۴۶ درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد، کمترین شدت بیماری را نشان داد (جدول۴).

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

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

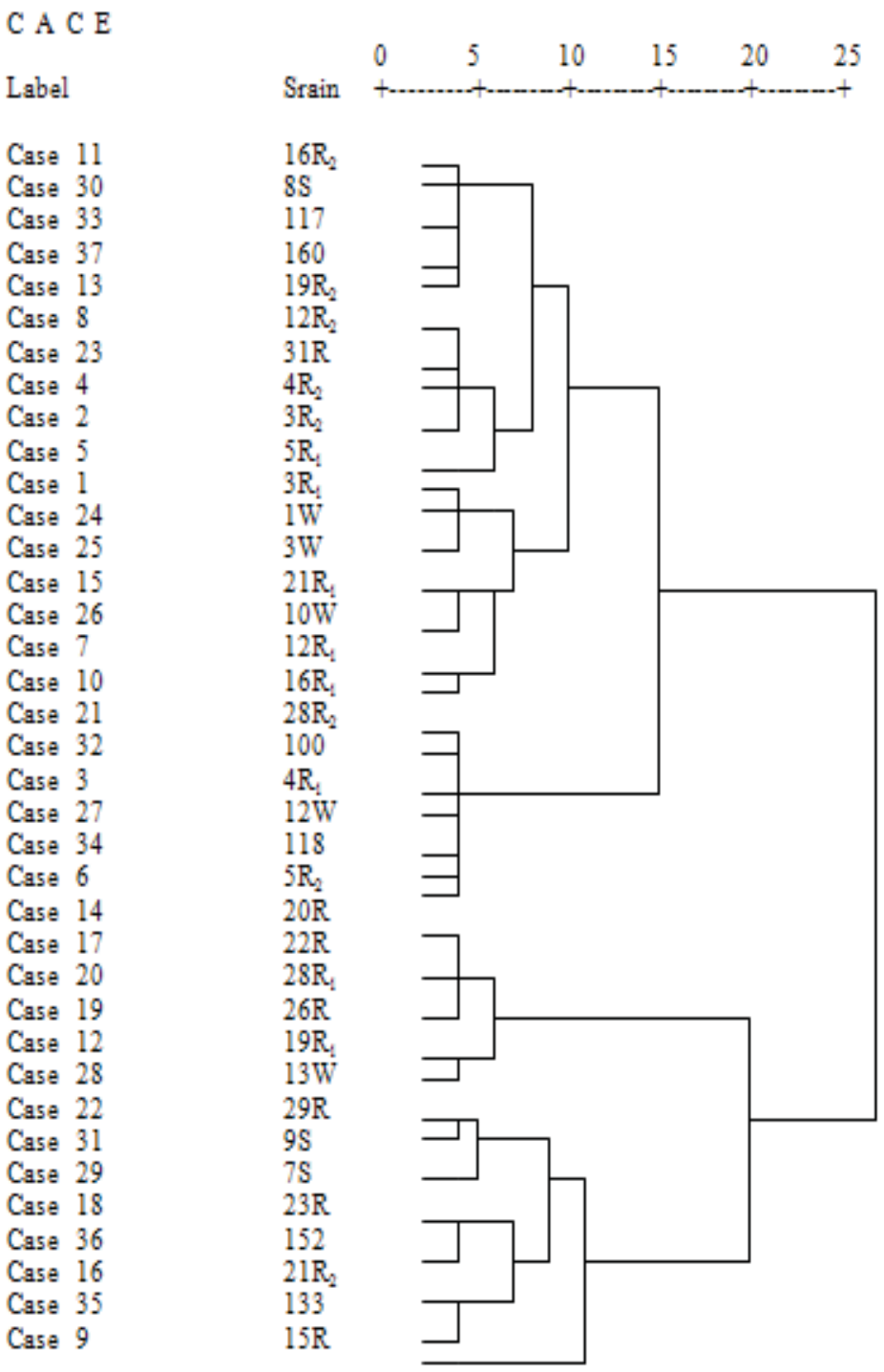
آزمون	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens* bv 3	*P. fluorescens* bv 5	*P. putida* bv A
تولید لوان	–	–	–	–
هیدرولیز ژلاتین	+	+	–	–
رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد	+	–	–	–
رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد	–	+	+	+
تولید رنگ فلوروسانت	+	+	+	+
فوق حساسیت در توتون	+	–	–	–
کاتالاز	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
آرژنین دی هیدرولاز	+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

جدول ٤- مقایسه میانگین تاثیر استرین‌های آنتاگونیست و روش کاربرد آنها روی شدت بیماری سوختگی غلاف برنج

استرین	۷S	۹S	۱۳۳	۱۵۲	۲۱R	۲۳R	۱۵R	۲۹R	شاهد
روش کاربرد									
تیمار بذر	۱۳/۸۵a	۱۵/۳۷a	۱٤/۹٦a	۱۲/۵٤a	۱۵/۲۲a	۱٤/۸۵a	۱٤/۱۵a	۱۵/۸۹a	۱۵/۲٤a
تیمار خاک	۱۹/۳۵a	۱۹/۹٦a	۱۷/۷۳ a	۱۸/۳۳a	۱٦/۵۷a	۱۹/۱۷a	۱۷/۸۷a	۱۸/۸٦a	۱۷/٦٤a
تیمار گیاه	۱٤/٤۵b	۱۷/۲۰ab	۱٦/۱٤ab	۱۵/۹٦b	۱٦/۹۳b	۱۷/٦۸ab	۱۷/۹٤ ab	۲۱/۷۹a	۲۱/۷٤a

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)

بحث

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 به‌دلیل وجود رطوبت کافی فراهم می باشد. 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 به‌دلیل 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 اسکلروت قارچ عامل بیماری می تواند به دلیل تثبیت عوامل بیوکنترل در لایه‌های درونی اسکلروت باشد که تا حدی از وارد شدن استرس‌های محیطی به عوامل بیوکنترل جلوگیری می‌کند. نتایج حاصله از بررسی اثرات آنتی بیوزیس باکتری های آنتاگونیست جداسازی از مزارع برنج استان گیلان نشان داده است که جدایه های باکتریایی آنتاگونیست از قدرت تولید آنتی بیوزیس بالایی در شرایط آزمایشگاهی برخوردارند (۵).

بررسی همزمان تاثیر استرین های انتخابی بر روی شدت بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در درجه اول اهمیت بررسی (فاکتور فرعی) و تاثیر روشهای مختلف کاربرد استرین‌های انتخابی در درجه دوم اهمیت (فاکتور اصلی) نشان می‌دهد تنها استرین های آنتاگونیست ۱۵۲ (*P. aeruginosa*) و ۷ (*P. fluorescens* bv3) در روش تیمار گیاه در میان باکتری‌های انتخابی تاثیر مثبت و معنی دار در کاهش شدت بیماری سوختگی غلاف داشته است که جهت آزمایشات بعدی مزرعه‌ای توصیه می گردند. تفاوت روش کاربرد تیمار گیاه با تیمار بذر و خاک احتمالاً به دلیل پایدار ماندن جمعیت باکتری‌های آنتاگونیست در فاصله زمانی اندک بین کاربرد اینوکلوم عامل بیماری‌زا با اینوکلوم آنتاگونیست در روش کاربرد روی گیاه می باشد. در روش کاربرد تیمار بذر و تیمار خاک تاثیر کم استرین های باکتریایی انتخابی به دلیل فاصله زمانی زیاد کاربرد اینوکلوم عامل بیماری زا با اینوکلوم آنتاگونیست تا فراهم شدن زمان مناسب برای فعالیت اینوکلوم عامل بیماری (زمان حداکثر پنجه زنی گیاه برنج) و در پی آن کاهش جمعیت آنتاگونیست ها در زمان کاربرد اینوکلوم عامل بیماری‌زا قابل توجیه است. کاربرد استرین باکتری ۱۵۲ (*P. aeruginosa*)به روش تیمار گیاه در میان باکتری های انتخابی تاثیر مثبت و معنی دار در کاهش شدت بیماری سوختگی غلاف داشته است که جمعیت آزمایشات بعدی مزرعه‌ای توصیه می گردد. اگر چه اکثر استرین های انتخابی قادر به کنترل موفق بیماری نبوده‌اند ولی باید علت را در شرایط محیطی کاربرد استرین‌ها تا زمان شروع بیماری‌زایی و فعالیت اینوکلوم عامل بیماری زا جستجو نمود و تا حد زیادی پیچیده بودن تاثیر عوامل بیوکنترل در اینجا دخالت دارد. در روش های کاربرد تیمار بذر و خاک نتایج مطلوبی در کاهش بیماری نسبت به شاهد مشاهده نشده است که نشان‌دهندهٔ بقای کم جمعیت آنتاگونیست‌ها در زمان کاربرد اینوکلوم عامل بیماری زا در زمان شروع بیماری زایی می‌باشد. از آنجائیکه چاره‌ای جز فراهم شدن زمان مناسب برای فعالیت اینوکلوم عامل بیماری‌زا تا زمان پنجه‌زنی گیاه برنج نمی‌باشد و فاصله زمانی بین کاشت بذر تا پنجه زنی 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 واردشدن کلیه استرس‌های محیطی (حرارت، رطوبت، مواد غذایی، تغییرات pH و ...) تا زمان کاربرد اینوکلوم عامل بیماری زا جلوگیری نمود که این کار در شرایط کاربردی دشوار می باشد. اما عملکرد مثبت بعضی استرین ها 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، احتمالا به خاطر حضور جمعیت کافی از آنتاگونیست در زمان شروع بیماریزایی عامل بیماری به دلیل فاصله زمانی اندک بین کاربرد آنتاگونیست تا کاربرد اینوکلوم عامل بیماری (یک روز) می‌باشد.

از آنجایی که اثر عوامل بیوکنترل به میزان زیادی تحت تاثیر طبیعت فیزیکی و شیمیایی، رطوبت و دمای خاک واقع می شود، 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 گونه های باسیلوس در خاک در درجه اول مواد غذایی در دسترس و وجود میکروارگانیسم های 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 ونتایجی که از هر روش غربال کردن به دست می آید ممکن است فقط در همان شرایط آزمایشی معتبر باشند. غربال عوامل بیوکنترل یک مرحله حیاتی در توسعه

عوامل بیـوکنترل بـوده و موفقیـت همـه مراحـل بعـدی جهـت یـک بیوکنترل موفق به مراحل غربال صحیح برای شناسـایی یـک کاندیـد مناسب بستگی دارد. بسیاری از عوامل بیوکنترل مفید با مشاهده هالـه بازدارندگی در تشتک‌های پتری شناخته شـده‌انـد. بـه هـر حـال ایـن روش، عوامل بیوکنترل بـا توانـایی‌هـایی از قبیـل پارازیتیسـم، ایجـاد مقاومت القایی و یا بعضی اشکال رقابت را شناسـایی نمـی کنـد (۱۶). بنابراین آزمایشات بعدی مزرعه‌ای برای اثبات اثر عوامل بیـوکنترل در شرایط مختلف محیطی لازم است. آنتاگونیسم در شرایط آزمایشگاهی اگر به عنوان تنها ویژگی انتخاب یک استرین به حسـاب آیـد ممکـن است منجر به حصول نتیجه مطلوب نگردد. با توجه به اهمیت غربـال عوامل بیوکنترل شاید بهترین روش انتخاب استرین های کارا آن باشد که آنها را قبل از آنکه برای استفاده توصیه گردند به صورت مرتـب در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه‌ای آزمایش نماییم (۲۳). ویدهیاسکاران و موتامیلان (۱۹۹۹) نشان دادند که توسعه فورمولاسیون پـودری تهیـه شـده از سـودوموناس‌هـای فلورسـنت جهـت کنتـرل مـوثر بیمـاری سوختگی غلاف برگ برنج بستگی به انتخاب یک استرین کارا، حضور یک جمعیت کافی از استرین باکتری، نوع ماده حامـل بـاکتری وروش کـاربرد دارد. بـا توجـه بـه اینکـه همـواره شـرایط محیطـی کـاربرد استرین‌های آنتاگونیست جهت بیوکنترل موفق بسیار مهم می‌باشد لذا تلاش برای دستیابی به فورمولاسـیون‌هـایی کـه قـادر بـه حمایـت و حفاظت استرین های آنتاگونیست در شرایط نا مساعد محیطـی باشـند نیز توصیه می گردد. اثرات عوامل بیوکنترل در شرایط طبیعی پیچیـده بـوده و بسـتگی زیـادی بـه واکـنش هـای مختلـف گیـاه، پـاتوژن، آنتاگونیست و شرایط محیطی دارد. سؤال‌هـای متنـوعی در ارتبـاط بـا طبیعت کنترل بیولوژیکی و ابـزار مـوثرتر مـدیریت آن تحـت شـرایط طبیعی وجود داردکه به نظر می رسد پرداختن به کلیه عوامل بیوکنترل بومی هر منطقه در هر اکوسیستم زراعی، یکی از مهـم تـرین مراحـل کاربردی نمودن عوامل بیوکنترل باشد.

منابع

۱- پاداشت دهکایی ف.; روحانی ح. و منصوری جاجایی ش. ۱۳۷۹. ضدعفونی 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 بیمـاری سـوختگی غـلاف بـرگ بـرنج .خلاصـه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۶۵.

۳- ایزدیار م. و بهرامی م. ۱۳۷۹. مقایسه فعالیت آنتاگونیستی چند گونه تریکودرما و تولید تجارتی پروموت روی بیماری سوختگی غـلاف بـرگ برنج در مزرعه. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۳۴.

۴- پورعبدالله ش. و بینش ح. ۱۳۷۲. بررسی امکان مبارزه بیولوژیک بـا بیمـاری سـوختگی غـلاف بـرگ. خلاصـه مقـالات یـازدهمین کنگـره گیاهپزشکی ایران. ص ۶۸.

۵- کاظم زاده م. ؛ پاداشت، ف.؛ خداکرمیان، غ. و روستایی ع. م. ۱۳۸۴. اثرات آنتی بیوزیس باکتری های آنتاگونیست سواسازی از مـزارع بـرنج استان گیلان روی قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری سوختگی غلاف بـرگ بـرنج. مجلـه علـوم کشـاورزی و منـابع طبیعـی- 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 علیـه عامـل بیمـاری سـوختگی 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. 2_{nd} 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* $PfALR_2$ 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* Pf1 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 availiability 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.