معرفی صفات بیوکنترلی و القاء کنندگی سودوموناس‌های فلورسنت فراریشه در کنترل بیماری سوختگی غلاف برنج

مهدی رستمی[1*]، سعید طریقی[2]، حشمت اله رحیمیان[3]، پریسا طاهری[4]

۱- دانشجوی مقطع دکتری دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیات علمی معاونت موسسه تحقیقات برنج

۲- دانشیار گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۴- دانشیار گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

Email: Mrostamid@gmail.com*

چکیده

بیماری سوختگی غلاف برنج (شیت بلایت) ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* AG1- IA مهمترین بیماری برنج روی ارقام پرمحصول در اکثر مناطق کشت برنج دنیا از جمله ایران می‌باشد. در دو دهه اخیر کنترل بیولوژیک بیماری با استفاده از میکروارگانیسم های مفید و پروبیوتیک به علت سالم بودن روش مبارزه، حفظ محیط زیست مورد توجه قرار گرفته است. تحقیق حاضر به منظور شناسایی موثرترین جدایه¬های بیوکنترلی دارای توان آنتاگونیستی بالا و تحریک به القاء مقاومت جهت کنترل بهینه بیماری صورت گرفت. نمونه برداری وسیعی از مزارع شالیکاری استان مازندران، از روی ارقام مختلف محلی و پرمحصول برنج صورت گرفت. اندامهای گیاه(ریشه، برگ، ساقه، غلاف، سختینه قارچ و بذر) جمع آوری و ۲۹۱ جدایه سودوموناس فلورسنت جداسازی شد. آزمون آنتی بیوزیس جهت غربالگری اولیه جدایه ها انجام شد و ۶۱ جدایه بر اساس آزمون¬های کشت متقابل، تولید آنتی بیوتیک، ترشحات مواد فرار، عصاره ضد قارچی در چهار گروه آنتاگونیست قوی، متوسط، ضعیف قرار گرفتند. آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیمی جهت شناسایی جدایه ها انجام و دو گونه *Pseudomonas fluorescens* و *P. aeruginosa* شناسایی گردید. صفات آنتاگونیستی(تولید آنتی بیوتیک، سیدروفور، مواد فرار(VOC)، سیانید هیدروژن، آنزیم¬های پروتئاز، کیتیناز، آمیلاز، لیپاز، بتاگلوکوناز، تولید بیوسورفکتانت و بیوفیلم) و القاء کنندگی (تولید سیدروفور، سالسیلیک اسید، ایندول استیک اسید) و محرک رشد (تولید سیدروفور، اکسین، مواد ازته، حل کنندگی فسفات) جدایه ها مثبت و قوی تا متوسط ارزیابی شد. همچنین توان بیوکنترلی جدایه‌ها در کنترل بیماری سوختگی غلاف در مراحل گیاهچه‌ای (Seedling) و حداکثر پنجه زنی (Tillering) مورد بررسی قرار گرفت و جدایه 287، بیماری را به میزان ۷۹.۳۱ درصد در مرحله گیاهچه‌ای و جدایه ۳، بیماری را به میزان ۶۱.۱۰ در مرحله پنجه‌زنی کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: القاء کننده مقاومت، باکتری آنتاگونیست، برنج، بیماری سوختگی غلاف

مقدمه

بیماری سوختگی غلاف برگ، ناشی از قارچ خاکزاد *Rhizoctonia solani* Kühn و گروه پیوند ریسه ایAG1-IA ، اولین بار در سال ۱۹۱۰، از ژاپن، سپس از سایر کشورهای آسیایی و آمریکایی و درحال حاضر در اکثر کشورهای برنج خیز دنیا وجود آن به اثبات رسیده است .(Webster and Gunnell 1992) بیماری مذکور، مهمترین بیماری در ارقام پرمحصول برنج در شمال ایران می باشد(پاداشت و همکاران ۱۳۹۲) و خسارت محصول در ارقام حساس تا ۵۰ درصد گزارش شده است (Meng et al. 2001) . در حال حاضر ارقام فجر ، شیرودی و کشوری از جمله ارقام پرمحصولی و کیفی می‌باشند که در استان های شمالی و به خصوص در مازندران سطح زیر کشت قابل توجهی داشته که به این بیماری حساس می باشند. به منظور تولید محصول سالم و مدیریت بهینه بیماری، استفاده از روشهای غیر شیمیایی به خصوص کنترل بیولوژیک میتواند جایگزین مناسبی برای قارچکشها تلقی شود. چرا که علاوه بر جلوگیری از ایجاد مقاومت به قارچکشها، سبب کاهش آلودگی و حفظ محیط زیست نیز خواهد گردید. کنترل بیولوژیکی با استفاده از باکتریهای‌های پروبیوتیک گزینه مناسبی در مدیریت تلفیقی بیماریها می‌باشد، که با هدف حداکثر بهره‌وری و حداقل پیامدهای منفی زیست محیطی و اکولوژیکی هدف‌گذاری شدند(Jacobsen and Backman, 1993). Peseudomonads فلورسنت خاکزاد به طور گسترده برای کنترل سوختگی غلاف برنج استفاده شدند. آنها قادرند رشد و عملکرد گیاه را همزمان با جلوگیری از رشد بیمارگر افزایش دهند (Vidhyasekaran and Muthamilan 1999) . در گزارشی عنوان شد که *Pseudomonas fluorescens* بیماری بلاست و سوختگی غلاف برنج را ۸۲-۷۹٪ کنترل نمود و باعث افزایش عملکرد دانه در برنج شد(Gnanamanickam *et al.* 1998) . مکانیزم های کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی توسط سودوموندهای فلورسنت شامل رقابت برای مواد غذایی، تولید متابولیت‌های ثانویه باکتریایی مانند سیدروفورهای کلاته کننده آهن، ترکیبات فرار مانند سیانید هیدروژن (HCN)، آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های لایتیک دیواره سلولی(کیتیناز، بتاگلوکونار)، بیوسورفکتانتها، هورمونها و مقاومت القایی سیستمیک می‌باشد (O'Sullivan and O'Gara 1992 ; Van Loon *et al*., 1998) . آنتاگونیست‌های موفق باکتریایی اغلب تلفیقی از اثرات هم افزای مکانیسم‌های مسئول را برای یک تعامل موفق ضد قارچی اعمال میکنند (O'Sullivan and O'Gara, 1992). در تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی Psudomonad های فلورسنت آنتاگونیست و القاء کننده مقاومت به بیماری از شالیزارهای استان مازندران صورت گرفت و ضمن تعیین ویژگیهای آنتاگونیستی و القاءکنندگی جدایه‌ها، میزان تاثیر آنها در کنترل بیماری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی و موثرترین جدایه‌های بیوکنترل معرفی شدند.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی:

جدایه‌های مختلف جنس *Pseudomonas* spp از اندام های مختلف گیاه و قارچ (ریشه، ساقه، غلاف، برگ، بذر، سختینه قارچ) و از مناطق متنوع اقلیمی و جغرافیایی(دشت، میان بند جنگلی و مرتفع کوهستانی) استان مازندران جداسازی شدند.

ارزیابی خاصیت آنتاگونیستی و القاء کنندگی جدایه‌ها :

آزمایش آنتی بیوزیس به روش کشت نقطه ای متقابل (Dual culture) بر اساس روش پارک (Park, 1989) و هاجدرون و همکاران (Hagedron *et al*. 1989)انجام شد. طول هاله بازدارنده و قطر رویشی قارچ عامل بیماری اندازه گیری و درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر با فرمول آبوت تعیین گردید(Abbot, 1925) . تولید ترکیبات فرار ضد قارچی باکتری به روش کرائوس و لوپر (Kraus and Loper. 1990)انجام شد. ۴ الی ۵ روز پس از نگهداری تشتک‌ها، در ۲۶ درجه سانتیگراد، قطر پرگنه قارچ بیمارگر اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد رویشی عامل بیماری اندازه‌گیری شد. تولید آنتی بیوتیک بر اساس روش رایت و همکاران (Wright *et al*. 2001)، تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش پیشنهادی لورک (۱۹٤۸) اصلاح شده آلستروم و بورنز (Alstrom, and Burns 1989) ، اندازه گیری کمی و کیفی تولید سیدروفور با روش اسپکتروفتومتری مطابق با روش کاستاندا و همکاران (Castaneda *et al*. 2005) و استفاده از محیط آبی رنگ (Chrome azurol-S) مطابق با روش الکساندر و انریک (Alecxander and Enrique 2007)انجام شد. تولید بیوسورفکتانت به صورت تهیه عصاره متابولیت باکتری پس از سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ rpm و برداشت مایه رونشین و مخلوط با ۲ سی سی نفت خام و اندازه گیری ستون امولوسیون شونده ارزیابی شد (Siegmund and Wagner 1991, Mulligan *et al*. 1984). تشکیل بیوفیلم بر اساس روش مـادولا و همکاران (Maddula *et al*. 2006) انجام شد. بررسی میزان تولید سالسیلیک اسید مطابق با روش (Meyer *et al*. 1992) ، ایندول استیک اسید با استفاده از Salkowski's reagent، حلالیت فسفات بر اساس تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه باکتری و تولید مواد ازته با استفاده از معرف Neslers reagent مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه داده ها براساس طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (Dehingra and Sinclair, 1995).

مطالعات گلخانه ای بررسی وضعیت جدایه های باکتری در کنترل عامل بیماری سوختگی غلاف

تاثیر ۶۱ استرین از گونه های جنس *Pseudomonas* آنتاگونیست، آنتاگونیست ضعیف و غیر آنتاگونیست انتخابی (بر اساس آزمون کشت متقابل و تاثیر ترشحات مواد فرار) در گلخانه و روی رقم فجر، رقم حساس به بیماری در مرحله گیاهچه ای مورد ارزیابی قرار گرفت و داده ها بر اساس طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. اواخر مرحله پنجه زنی و ابتدای آبستنی، پنجه ها با سوسپانسیونی از کشت ۴۸ ساعته جدایه های منتخب که در مرحله گیاهچه‌ای بیماری را کنترل نمودند، اسپری پاشی و ۲۴ ساعت بعد با قارچ عامل بیماری مایه زنی و سپس ۲۴ ساعت بعد با سوسپانسیون باکتری مجددا اسپری پاشی شدند. گلدانها در شرایط مساعد رطوبتی۹۰ الی ۹۵ درصد و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته و پس از دو هفته، ارتفاع نسبی لکه (Relative length height) محاسبه شد (IRRI, 2002) .آزمایش در چهار تکرار انجام و داده‌ها با استفاده از طرح کاملا تصادفی و نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

ج) شناسایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی

شناسایی اولیه جدایه های باکتریایی جنس *Pseudomonas* بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی ارائه شده در شاد صورت گرفت .(Schaad *et al*. 2001)

نتیجه و بحث

بررسی تاثیر آنتاگونیستی ۲۹۱ جدایه *Pseudomonas* spp ، روی رشد رویشی بیمارگر قارچی در محیط غذایی PDA&Kings B موردارزیابی قرار گرفت. از ۲۹۱ جدایه، ۶۱ جدایه بر اساس جلوگیری از رشد رویشی بیمارگر و طول هاله بازدارنده در آزمون غربال‌گری (کشت متقابل) گروه بندی شده و در سه گروه آنتاگونیست قوی، متوسط و ضعیف و غیر آنتاگونیست قرار گرفته و برای آزمایشات گلخانه‌ای در نظر گرفته شدند. تاثیر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست بین حداقل ۳۰.۳۶ و حداکثر ۴۷.۵ درصد و هاله بازدارنده بین ۶.۵۶ الی ۱۷.۲۰ میلیمتر در مقابل قارچ عامل بیماری متغیر بود. تعدادی از جدایه‌های .*Psedomonas* spp ضمن جلوگیری از رشد رویشی بیمارگر، سبب جلوگیری از تشکیل اسکلرت بالغ شدند. واکوئوله شدن میسلیومهای قارچ عامل بیماری در آزمونهای کشت متقابل، تولید عصاره ضد قارچی، تولید آنتی بیوتیک، مواد فرار مشاهده گردید. از طرفی تعداد زیادی از جدایه های *Pseudomonas* spp*که* خاصیت انتاگونیستی نداشتند، در محیط های کشت *Pseudomonas* agar F و *Pseudomonas* agar P قادر به تولید رنگیزه پیووردین به رنگ آبی و سبز و گاز سیانید هیدروژن بودند. این موضوع بیانگر وجود جدایه‌هایی است که با تولید مواد مترشحه و متابولیتهای فرار از جمله سیانید هیدروژن و سیدروفور باعث ارتقاء رشد گیاه و بهبود عملکرد محصول و یا القاء مقاومت به بیماری در مقابل بیماری های مهم قارچی می‌شوند. جدایه‌ها درجات مختلفی از تولید متابولیتهای مهم بازدارنده از رشد قارچ در آزمایشگاه را نشان دادند(جدول ۱). بررسی میزان کنترل بیماری در گلخانه نشان داد که جدایه ۳ قادر به کاهش ۶۱.۱۰ درصدی شاخص کاهش بیماری بیماری در مرحله حداکثر پنجه دهی و جدایه ۲۸۷ قادر به کاهش ۷۹.۳۱ درصدی شاخص کاهش بیماری در مرحله گیاهچه ای در شرایط گلخانه شدند (جدول ۲). توانایی تولید مواد ضد قارچی، ارتقاء دهنده رشد و القاء کننده مقاومت توسط سودوموناس های فلورسنت توسط محققین بسیاری گزارش شده است (Alecxander, J. and Enrique 2007; Castaneda *et al.* 2005; VanLoon *et al.* 1998; Gnanamanickam *et al.* 1998)

جدول ۱: ویژگی های مهم آنتاگونیستی، القاء کنندگی و محرک رشد تعدادی از جدایه های *Pseudomonas fluorescens* فراریشه برنج

شماره جدایه	سیدروفور (سوکسینات (OD)	سیدروفور (CAS)	سیانید هیدروژن (OD)	مواد فرار (GI)	تولید آنتی بیوتیک (GI)	بیوفیلم(OD)	بیوسورفکتانت (ستون امولوسیون)	مواد ازته (OD)	حلالیت فسفات (قطر هاله)	ایندول استیک اسید	سالسیلیک اسید
۲۷۵	۱.۷۶	۲.۸۹	۰.۲۲	۶۴.۸۸	۱۰۰	۰.۱۶	۰.۶	۳	۱.۳۶	۰.۰۰۷۷	۰.۰۱۹۱
۲۴۰	۰.۹۴	۴.۱۳	۰.۲۱	۷۲.۷۲	۱۰۰	۰.۲۱	۰.۵۸	۱.۵	۱.۲۷	۰	۰.۰۲۵۴
۱۲۸	۱.۳۵	۵.۶۶	۰.۲۲	۸۹.۳۷	۸۶.۶۶	۰.۳۲	۰.۳۳	۱.۵	۱.۳۱	۰.۰۰۲۲	۰.۰۰۰۱
۳	۱.۴۶	۴.۸۶	۰.۱۴	۲۲.۳۱	۹۰.۵۵	۰.۶۲	۰	۱	۱	۰.۰۰۲۴	۰.۰۱۲۷
۲۸۷	۱.۰۷	۴.۱۳	۰.۰۳	۹۱.۶۲	۱۰۰	۰.۱۰	۰.۵۶	۲.۵	۱.۲۱	۰.۰۲۱۸	۰.۰۵۳۷
۲۴۳	۱.۶۲	۴.۹۹	۰.۰۵	۰	۸۵.۵۵	۰.۱۹	۰.۶	۲.۷۵	۱.۳۳	۰	۰.۰۴۴۴

جدول ۲- کنترل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاه (آزمون کشت متقابل) و گلخانه در مرحله حداکثر پنجه زنی ، و گیاهچه‌ای در رقم فجر با استفاده از جدایه‌های آنتاگونیست

شماره جدایه	گونه	میانگین بازدارندگی از رشد(GI)	میانگین هاله بازدارنده(mm)	میانگین ارتفاع نسبی لکه/ارتفاع گیاه(RLH) در حداکثر پنجه زنی (شدت بیماری)	شاخص تاثیر در کاهش بیماری Effectiveness) (Index	میانگین طول لکه در گیاچه	شاخص تاثیر در کاهش بیماری Effectiveness) (Index
۳	*P. fluorescens*	۳۰.۳۶	۱۲.۵۷	۱۱.۵۲	۶۱.۱۰	۳.۹۰۵	۵۵.۴۲
۲۸۷	*P. aeruginosa*	۴۳.۷	۶.۵۶	۱۷.۴۴	۴۱.۱۲	۱.۸۱	۷۹.۳۱
۱۲۸	*P. . fluorescens*	۴۷.۵	۱۷.۲۰	۱۸.۶۸	۳۶.۹۳	۲.۹۱	۶۶.۷۴
۲۷۵	*P. . fluorescens*	۴۳.۴	۱۶.۵۸	۲۰.۱۵	۳۱.۹۷	۲.۱۶۵	۷۵.۳۱
۲۴۰	*P. . fluorescens*	۳۷.۷۵	۱۳.۵۲	۲۰.۸۷	۲۹.۵۴	۲.۳۳۷۵	۷۳.۳۷
تیلت		-	-	۶.۱۴	۷۹.۲۷	۱.۵	۸۲.۸۵
شاهد		۰	۰	۲۹.۶۲	-	۸.۷۵	-

منابع

۱. پاداشت دهکایی، ف.، ویلکویت ، ل.، عبادی، ع. ا.، قدسی، م.، داریوش، س.، دودابی نژاد، ۱. و پورفرهنگ، ح. ۱۳۹۲. بررسی مقاومت نسبی در ارقام برنج ایرانی و ارقام منتخب خارجی در مقابل بیماری سوختگی غلاف . (*Rhizoctonia solani* . AG-1 IA) نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۴۴، شماره ۲، صفحه ۳۱۷-۳۰۷

2. Abbot, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 266- 267.
3. Alecxander, J. and Enrique, L. 2007. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. Appl. Environmental Microbiology 10, 7083-7090.
4. Alstrom S Burns RG (1989) Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soils 7, 232-238.
5. Castaneda G.C., Munoz T.J.J., and Videa J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of *Pseudomonas fluorescent* in the presence of copper and iron. Microchemical Journal 81,35-40.
6. Dehingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Second Edition CRC Press, Inc. 394pp.

7. Gnanamaickam, S. S., Valasubramanian, K., Thara, V. and Chaterjee, A. K. 1998. Microbial antagonists for rice diseases control: molecular approaches in microbes: for health, wealth and sustainable environment. Ed: Ajit varma. pp. 371-388.
8. Hagedorn, C., Could, W. D. & Bradinelli, RT. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology 55, 2793-2797.
9. IRRI (International Rice Research Institute). 2002. Standard Evaluation System for Rice., Manila (philippines): International Rice Research Institute. 56p.
10. Jacobsen, B., J. and Backman, P.A. 1993. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. Plant Dis 77, 311–315
11. Kraus, J. and J.E. Loper. 1990, Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf5: Mechanistic studies pp. 177. In: Keel, C. Koller, B. and Defago, G(eds.) Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The Second International Workshop on plant growth promoting rhizobacteria, Interlaken, Switzerland.
12. Meng QZ, Liu ZH, Wang HY, Zhang SS, Wei SH (2001) Research progress in rice sheath blight. (in Chinese with English abstract) J. Shenyang AgricUniv 32:376â€“381
13. Maddula V.S.R.K., Zhang Z., Pierson E.A., and Pierson III L.S. 2006. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) Strain 30-84. Plant Pathology and Microbiology 52, 289-301.
14. Meyer, J. M., Azelvandre, P. and Georges, C. 1992. Iron metabolism in Pseudomonads: salicylic acid, siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Biology Factors 4, 23-27.
15. Mulligan C, Cooper D, Neufeld R. 1984. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. J Fermentation Technol 62(4), 311–314.
16. O'Sullivan, D. J., O'Gara., F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol Rev 56, 662-676.
17. Park,c.s.1989.Identification of some bacteria from paddy antagonistic to several rice fungal pathogens. J Phytopathology 138(3), 189-208.
18. Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guid for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. New York. 3rdAmerican Phytopathology Society Press. 373p.
19. Siegmund, I., Wagner, F. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by
20. *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnol Techniques 5(4), 265–268
21. VanLoon L. C, Bakker, PAHM., and Pieterse, CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36, 453–483.
22. Vidhysaekaran , P., and M. Muthamilan. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. Biocontrol Science and Technology 8, 67-74.
23. Webster R. K., and Gunnell, P. S. 1992. Compendium of rice diseases. APS PRESS. 62p
24. Wright, S. A. I., Zumoff, C. H., Schneider, L. and Beer, S. V. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. Applied and Environmental Microbiology 67(1), 284- 292.