معرفی عوامل باکتریایی آنتاگونیست به عنوان کنترل کننده های زیستی بیماری سوختگی غلاف برنج در استان مازندران

مهدی رستمی[۱*]، سعید طریقی[۲]، حشمت اله رحیمیان[۳]، پریسا طاهری[۲]

۱- دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و مربی پژوهش، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، موسسه تحقیقات برنج کشور- معاونت مازندران، آمل

۲- دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه فردوسی، مشهد

۳- استاد ، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mrostamid@gmail.com

چکیده:

بیماری سوختگی غلاف برگ برنج (شیت بلایت) ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* AG1- IA مهمترین بیماری برنج روی ارقام پرمحصول در اکثر مناطق کشت برنج دنیا از جمله شمال ایران می‌باشد. تحقیق حاضر به منظور شناسایی موثرترین جدایه های آنتاگونیست و القاء کننده مقاومت به منظور کنترل زیستی بیماری انجام شد. قسمتهای مختلفی از گیاه (ریشه، برگ، ساقه، غلاف و بذر) و همچنین سختینه قارچ جمع آوری و پس از جدا و خالص‌سازی، ۲۹۳ جدایه *Pseudomonas* و ۵۵ جدایه *Bacillus*، شناسایی شدند. آزمون آنتی بیوزیس (کشت متقابل) به منظور غربالگری اولیه جدایه ها انجام شد و ۶۱ جدایه *Pseudomonas* spp. بر اساس آزمون تولید آنتی‌بیوتیک، مواد فرار، عصاره ضد قارچی در چهار گروه آنتاگونیست قوی، متوسط و ضعیف قرار گرفتند. ۱۰ جدایه *Bacillus* spp. نیز بر اساس آزمون کشت متقابل انتخاب و در آزمون مزرعه ای مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آنزیمی برای جدایه‌های *Pseudomonas* انجام و گونه‌های *Pseudomonas protegens*، *P. aeruginosa* و *Pseudomonas mosselii* شناسایی شدند. توان آنتاگونیستی و القاءکنندگی جدایه‌ها در کنترل بیماری سوختگی غلاف برگ در مرحله آبستنی (Booting) در گلخانه و مزرعه مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت جدایه های *Pseudomonas* با شماره های ۲۷۵(*P.protegens*)، ۳(*P. mosselii*)، ۱۲۸، ۲۴۰، ۲۸۷(*P.aeruginosa*) به عنوان جدایه‌هایی با توان آنتاگونیستی بالا و جدایه ۲۴۳ به عنوان القاء کننده مقاومت، در شرایط گلخانه، بیماری را به میزان ۲۰ تا ۵۴/۲۶ درصد در مقایسه با شاهد کنترل نمودند. جدایه های ۲۹۲، ۳، ۱۹۴ و ۴۵ از جنس *Pseudomonas* spp. و جدایه های ۱ و ۶۱ با توان آنتاگونیستی بالا از جنس *Bacillus* spp. در شرایط مزرعه و در مرحله آبستنی، بیماری را به ترتیب به میزان ۳۲/۴۵ تا ۳۹/۴۰ درصد و ۳۲/۰۸ تا ۴۰/۸۷ درصد در مقایسه با شاهد کنترل نمودند. کنترل بیماری توسط قارچکش پروپیکونازول (تیلت) در شرایط مزرعه ۶۹/۵۷ درصد و در شرایط گلخانه ۷۶/۳۴ درصد بود.

لغات کلیدی: باکتری آنتاگونیست، *Pseudomonas*، *Bacillus*، بیماری سوختگی غلاف برگ، کنترل زیستی، برنج

مقدمه:

بیماری قارچی سوختگی غلاف برگ، ناشی از قارچ خاکزاد *Rhizoctonia solani Kühn* و گروه پیوند ریسه ای AG1-IA، اولین بار در سال ۱۹۱۰، از ژاپن، سپس از سایر کشورهای آسیایی و آمریکایی گزارش شده است. خسارت به محصول در ارقام حساس تا ۵۰ درصد گزارش شده است (Ou 1985). این بیماری مهمترین بیماری در ارقام پرمحصول برنج در شمال ایران می باشد، لذا مدیریت صحیح بیماری بسیار مهم و ضروری می باشد. تا کنون در دنیا رقم مقاوم به بیماری گزارش نشده است. ارقام محلی کمی متحمل می باشند. از طرفی در صورت به کار گیری سموم شیمیایی به جهت آلودگی های زیست محیطی و خطرات ناشی از مصرف آن و همچنین بروز مقاومت قارچها به قارچکشها، در اکثر کشور ها تلاشهای فراوانی به منظور افزایش آگاهی برای دست یابی به روشهای سالم تر در جهت مبارزه با بیماری ها در بخش کشاورزی صورت می گیرد. کنترل بیولوژیک با استفاده از میکروارگانیسم های مفید یکی از رویکردهای مهم در دو دهه اخیر می باشد. ولی از آنجایی که تأثیر کنترل کنندگان زیستی عموماً محدود به شرایط اقلیمی خاص می باشد و همانند سموم در اقلیم های مختلف بر طیف وسیعی از آفات و بیماری ها موثر نمی باشند، ضروری است تحقیقات وسیعی در زمینه کنترل بیولوژیکی علیه بیماری های مهم برنج در منطقه صورت پذیرد. به همین دلیل تحقیقات گسترده ای برای کنترل آن از جنبه های مختلف صورت گرفته است. از سال ۱۹۷۰ کنترل بیولوژیک این بیماری در دنیا شروع شده است و تا کنون تعداد زیادی از میکروارگانیسم های قارچی و باکتریایی به خصوص *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* و تعدادی از گونه های متعلق به جنس *Bacillus subtilis* و *B. cereus* خاصیت آنتاگونیستی قابل قبولی را در مقابل قارچ عامل بیماری نشان دادند. برای انتخاب باکتری های آنتاگونیست موثر که بتوانند به عنوان عامل بیوکنترل عمل نمایند می بایست منبع آنتاگونیستها ترجیحا از محلهایی باشد که به طور طبیعی در آنها بیوکنترل اتفاق افتاده باشد (Spur, 1981). راجی و همکاران(Raji et al. 2016) ، تاثیر *P. fluorescens* روی کنترل بیماری های مهم برنج را به صورت تیمارهای به تنهایی و ترکیبی دو تایی و سه تایی از قبیل تیمار بذری، تیمار ریشه، تیمار خاک و اسپری پاشی، با قارچکش کاربندازیم مورد مقایسه قرار دادند و نتیجه گرفتند در صورتی که از تیمارها به صورت ترکیب سه تایی استفاده نمایند بهتر از ترکیب دو تایی و به تنهایی قادر است بیماری را در سطح معنی داری در مقایسه با شاهد کنترل نماید و در این صورت میزان کنترل بیماری شبیه به استفاده از قارچکش خواهد بود.

مواد و روش

در این تحقیق از میکروارگانیسم های باکتریایی جهت کنترل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف استفاده شد. مواد آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق شامل قارچ عامل بیماری *Rhizoctonia solani* و جدایه‌های مختلف باکتریایی می باشند. قارچ عامل بیماری از روی پنجه های آلوده به بیماری سوختگی غلاف برنج جداسازی و به روش نوک ریسه خالص سازی شد(Dehingra and Sinclair, 1995) . بیماری‌زایی قارچ جداسازی شده، روی رقم فجر ارزیابی گردید. تیمارهای آزمایش جدایه های مختلف باکتریایی شامل گونه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* بودند، که از اندام های مختلف گیاه و قارچ (ریشه، ساقه، غلاف، برگ، بذر، سختینه قارچ) در آزمایشگاه جداسازی و تک کلونی‌هایی به رنگ کرم و دارای رنگیزه فلورسانس *Pseudomonas* و همچنین پرگنه های به رنگ سفید تا کرم با حاشیه نامنظم و سطح نمدی و مضرس *Bacillus*، انتخاب و پس از خالص سازی در

درون لوله های محتوی محیط YDC کشت و در پارافین مایع نگهداری شدند(Gamliel and Katan 1991).

غربالگری اولیه باکتری ها و تعیین خصوصیات آنتاگونیستی جدایه‌ها

الف) آزمایش آنتی بیوزیس (کشت متقابل)

آزمایش آنتی بیوزیس به روش کشت نقطه ای متقابل (Dual culture) انجام شد. و قطر هاله بازدارنده و همچنین شعاع رویشی قارچ عامل بیماری اندازه گیری و درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر به کمک فرمول آبوت تعیین گردید (Abbot, 1925).

ب) تعیین مکانیزم عمل بازدارندگی جدایه های منتخب به لحاظ تولید فاکتورهای ضدقارچی

ب-۱) آزمون ترشحات فرار (Volatile Compounds)

در آزمایش ترشحات مواد فرار، تشتک های محتوی قارچ عامل بیماری به صورت وارونه روی محیط کشت محتوی باکتری انتخابی قرار داده شد و محل اتصال لبه تشتک ها با پارافیلم مسدود شدند. پس از ۱۰ روز نگهداری تشتکها، قطر کلنی بیمارگر اندازه گیری و درصد بازدارندگی از رشد رویشی عامل بیماری اندازه گیری شدند.

ب-۲) تولید آنتی بیوتیک

این آزمون بر اساس روش کراس و لوپر (Kraus and Loper, 1990) انجام شد و قطر رویشی قارچ عامل بیماری پس از ۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفت.

ب-۳) تولید عصاره خارج سلولی و ضد قارچی

آزمون بر اساس روش برگ و همکاران (Berg *et al* 2001) انجام شد و بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری با اندازه گیری قطر رویشی قارچ ، پس از ۳ الی ۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفت.

ب-۴) تعیین توان تولید سیدروفور

توان تولید سیدروفور به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱- محیط Cas agar: تهیه محیط بر اساس روش اصلاح شده الکساندر و زوبر (Alexander and Zuberer 1991) می باشد. ارزیابی میزان تولید سیدروفور جدایه ها پس از ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر اساس محاسبه نسبت قطر هاله ایجاد شده به قطر باکتری و تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲ – اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکتروفوتومتری:

سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته جدایه ها در OD برابر با ۰/۸ تهیه و در محیط سوکسینات کشت شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری رشد یافته در ارلن محتوی محیط سوکسینات قرار گرفت و بعد از ۳ روز مایع رونشین در طول موج ۴۰۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

ب-۵) تعیین توان تولید سیانید هیدروژن

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با روش پیشنهادی لورک (۱۹۴۸) اصلاح شده آلستروم و بورنز انجام شد. جهت اندازه گیری کمی میزان تولید سیانید هیدروزن ۱۰ سی سی آب مقطر به کاغذ صافی آغشته به اسید پیکریک که در اثر تصعید گاز سیانید هیدروژن تغییر رنگ یافت، اضافه و پس از ۲۴ ساعت در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

ج) تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری های آنتاگونیست

شناسایی اولیه جدایه های باکتریایی جنس *Pseudomonas* بر اساس آزمون های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ارائه شده در کتاب شاد صورت گرفت (Schaad *et al.* 2001). شناسایی اولیه جدایه های باکتریایی جنس *Bacillus* نیز بر اساس آزمون گرم، وضعیت رشدی و ریخت شناسی پرگنه روی محیط کشت آگار غذایی(Nutrient agar) انجام شد.

بررسی توانایی جدایه های باکتریایی در کنترل عامل بیماری سوختگی غلاف در شرایط گلخانه و مزرعه

الف) تاثیر جدایه های *Pseudomonas* و *Bacillus* در کنترل بیماری سوختگی غلاف برنج در مرحله آبستنی در گلخانه

در اواخر مرحله پنجه زنی و شروع آبستنی، پنجه ها ۲۴ ساعت قبل از مایه زنی با قارچ عامل بیماری *Rhizoctonia solani* ، با سوسپانسیونی از کشت ۴۸ ساعته جدایه های باکتریایی از جنس های *Pseudomonas* و *Bacillus* ، که در ۱ واحد چگالی جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر تنظیم شد، محلول پاشی شدند. ۲۴ ساعت بعد از مایه زنی با قارچ مذکور، مجدداً با سوسپانیون باکتری مورد نظر محلول پاشی شدند. دو هفته پس از قرار دادن گلدانها در شرایط مساعد رطوبتی ۹۰ الی ۹۵ درصد و دمای ۲۷ در جه سانتی گراد ، ارتفاع نسبی لکه (Relative length height) بر اساس روش استاندارد ارائه شده ایری (IRRI, 2002) محاسبه شد. پس از محاسبه DI و تعیین میزان کنترل بیماری توسط جدایه ها در مقایسه با شاهد آزمایش، داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها و گروه بندی جدایه ها براساس آزمون چند دامنه ای دانکن صورت پذیرفت.

الف) تأثیر جدایه های *Pseudomonas* و *Bacillus* در کنترل بیماری سوختگی غلاف برنج در مرحله آبستنی در مزرعه

تاثیر ۳۵ جدایه از جنس *Pseudomonas* و ۹ جدایه جنس *Bacillus* در کنترل بیماری سوختگی غلاف در مزرعه مورد ارزیابی

قرار گرفت. برای هر تیمار ۴ کپه (گیاه) در نظر گرفته شد. سوسپانسیون باکتری به منظور چسبندگی بهتر با سطح گیاه با کربوکسی متیل سلولز به میزان ۰/۱ درصد و توین ۲۰ به میزان ۰/۰۲ درصد مخلوط و با دستگاه هموژنایزر یکنواخت شدند.

تهیه زادمایه قارچی

پوسته اول برنج به مقدار ۲۵۰ گرم توزین و در ارلن ۱۰۰۰ سی سی با مقداری آب مقطر سترون جهت مرطوب شدن آن ریخته شد. ارلن محتوی پوسته در سه روز متوالی در درجه حرارت ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱ اتمسفر سترون شد. سپس ۵ دیسک محتوی میسلیوم از کشت جوان و سه روزه قارچ عامل بیماری در ارلن قرار گرفت و در انکوباتور با درجه حرارت ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ هفته قرار گرفتند.

مایه زنی قارچ عامل بیماری:

مایه زنی قارچ با استفاده از مقدار ۷ گرم پوسته برنج آغشته به قارچ به عنوان زادمایه در اواخر مرحله پنجه زنی و ابتدای آبستنی در بین پنجه ها قرار گرفت. پس از دو هفته، هر ۴ کپه برداشت و همه پنجه ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارتفاع نسبی لکه (Relative length height) بر اساس روش استاندارد ارائه شده ایری (IRRI, 2002) محاسبه شد. پس از محاسبه DI و تعیین میزان کنترل بیماری توسط جدایه ها در مقایسه با شاهد آزمایش، داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و با نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها و گروه بندی جدایه ها براساس آزمون چند دامنه ای دانکن صورت پذیرفت.

نتایج:

تاثیر آنتاگونیستی ۲۹۳ جدایه *Pseudomonas* sp.، روی رشد رویشی ریسه های بیمارگر در محیط غذایی PDA و Kings B مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۲۹۳ جدایه، تعداد ۶۱ جدایه، بر اساس جلوگیری از رشد رویشی ریسه های بیمارگر و ایجاد هاله بازدارنده، گروه بندی شدند و در سه گروه آنتاگونیست قوی، متوسط، ضعیف و غیر آنتاگونیست قرار گرفت . در مجموع ۱۷/۷۴ درصد از کل جدایه ها(۵۲ جدایه از ۲۹۳ جدایه)، باعث جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری در شدت های قوی (۸/۹۳) ، متوسط (۵/۱۵) و ضعیف (۳/۷۸) درصد در آزمون کشت متقابل شدند و ۸۲/۱۴ درصد از جدایه ها نیز هیچگونه تاثیر آنتاگونیستی روی قارچ عامل بیماری نشان ندادند. از طرفی در بین ۶۱ جدایه منتخب، ۴۲/۶۲ درصد از جدایه ها (۲۶ جدایه از ۶۱ جدایه) دارای خواص آنتاگونیستی قوی، ۲۴/۵۹ درصد از جدایه ها (۱۵ جدایه از ۶۱ جدایه) دارای خصوصیات آنتاگونیستی متوسط و ۱۸/۰۳ درصد از جدایه ها (۱۱ جدایه از ۶۱ جدایه) دارای خواص آنتاگونیستی ضعیف و ۱۴/۷۵ درصد از جدایه ها (۹ جدایه از ۶۱ جدایه) فاقد خاصیت آنتاگونیستی روی قارچ عامل بیماری بودند. همچنین تاثیر بازدارندگی جدایه های *Bacillus* نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و براساس آزمون کشت متقابل و بر اساس تفاوتهای ظاهری در وضعیت رشدی پرگنه ها تعداد ۹ جدایه در آزمون مزرعه‌ای مورد مطالعه قرار گرفتند. تغییرات مورفولوژیکی میسلیوم های قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط Invitro و در محیط کشت متقابل، در تعدادی از جدایه ها، باکتری آنتاگونیست ضمن جلوگیری از رشد رویشی بیمارگر، سبب جلوگیری از تشکیل اسکلرت بالغ قارچ شده و صرفا بافت پنبه ای فشرده‌ای از ریسه های قارچ در سطح محیط کشت مشاهده

مطالعه میکروسکوپی، تغییرات زیادی در ساختار میسلیوم های قارچ عامل بیماری مشاهده شد و واکوئوله شدن شدید تا ضعیف میسلیومها در مقایسه با شاهد در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰ × مشاهده گردید.

در آزمایش بازدارندگی از رشد میسلیوم های قارچ توسط ترکیبات فرار (Volatile compound) ، میانگین درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر با هم مقایسه و نتایج نشان داد که در بین جدایه های منتخب، ۲۲۶، ۹۹/۸۵ درصد، ۲۸۷، ۹۱/۶۳ درصد و ۱۲۸ با ۸۹/۳۷ درصد، بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر داشتند.

در آزمایش بازدارندگی از رشد میسلیوم های قارچ توسط آنتی بیوتیکها ، میانگین درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر با هم مقایسه و نتایج نشان داد که در بین جدایه های منتخب، جدایه های ۲۷۵، ۲۸۷ ، ۲۲۶، ۵۲، ۵۸ ، ۱۲۶ و ۲۴۰ به میزان ۱۰۰ درصد باعث جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری شدند.

در آزمایش بازدارندگی متابولیتها یا ترشحات خارج سلولی ضد قارچی ، میانگین درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر با هم مقایسه و نتایج نشان داد که در بین جدایه های منتخب، جدایه های ۱۹۴، ۸۵/۲۵ درصد، جدایه ۲۲۶، ۵۷/۰۲ درصد، جدایه ۳، ۴۲/۴۱ درصد و جدایه ۱۲۸، ۳۵/۹۵ درصد در غلظت ۱۰٪ عصاره ضد قارچی قادر به کنترل قارچ عامل بیماری بودند. جدایه های ۱۹۴، ۹۱/۴۳ درصد، ۲۲۶، ۸۰/۳۹ درصد و ۳، ۵۷/۳۰ درصد در غلظت ۱۵ درصد ترشحات خارج سلولی یا عصاره باکتریایی قادر به کنترل قارچ عامل بیمارگر در محیط آگار غذایی شدند، که این موضوع مبین وجود مواد ضد قارچی در متابولیت یا ترشحات خارج سلولی باکتری می باشد. همچنین جدایه های ۱۹۴، ۱۰۰ درصد، ۴۱، ۹۴/۹۴ درصد، ۲۸۱، ۹۱/۵۷ درصد، ۲۸۴، ۸۴/۱۵ درصد، ۲۲۶، ۷۸/۳۷ درصد، جدایه ۳، ۶۹/۳۸ درصد، و ۲۸۷، ۶۳/۷۹ درصد در غلظت ۲۵ درصد عصاره خارج سلولی ضد قارچی باعث کنترل قارچ عامل بیمارگر شدند.

در آزمایش تولید گاز هیدروژن درجات مختلفی از شدت و ضعف تولید گاز سیانید هیدروژن مشاهده شد. بر این اساس بیشترین میزان جذب چگالی نوری، مربوط به جدایه ۹ بود که ۰/۵۱۲ قرائت شد. پس از آن جدایه های ۴۵، با چگالی جذب نوری، ۰/۳۸۹ ، ۲، ۰/۳۸۹، ۲۱۸، ۰/۳۳۱ ، ۲۲۴، ۰/۲۹۳، ۲۴۱، ۰/۲۸۱، ۲۲۵، ۰/۲۷۴، ۲۲۶، ۰/۲۵۳ در دستگاه اسپکتروفوتومتری قرائت شدند. هیچکدام از جدایه های منتخب به لحاظ تولید گاز سیانید هیدروژن برتر از سایر جدایه ها نبودند.

در روش اسپکتروفوتومتری تولید سیدروفور ، بیشترین چگالی جذب نوری در طول موج ۴۰۰ نانومتر مربوط به قرائت پایووردین، جدایه ۲۲۲، ۱/۹۰۹ و جدایه ۲، ۱/۸۳۱ ، ۲۳۹، ۱/۷۹۳ ، ۲۷۵، ۱/۷۶۲، ۱۲۶، ۱/۷۵۷، و ۱۹۴، ۱/۷۱۶ بود. در بین جدایه های منتخب فقط جدایه ۲۷۵ بین جدایه های برتر بوده است. در طول موج ۵۲۰ نانومتر که مربوط به قرائت پایوسیانین بود، بیشترین میزان جذب چگالی نوری مربوط به جدایه های ۲۸۳، ۱/۹۹۱، ۲۸۵، ۱/۹۵۶، ۲۸۱، ۱/۹۰۷، ۲۸۲، ۱/۷۱۹، ۲۸۴، ۱/۷۱۰ بود.

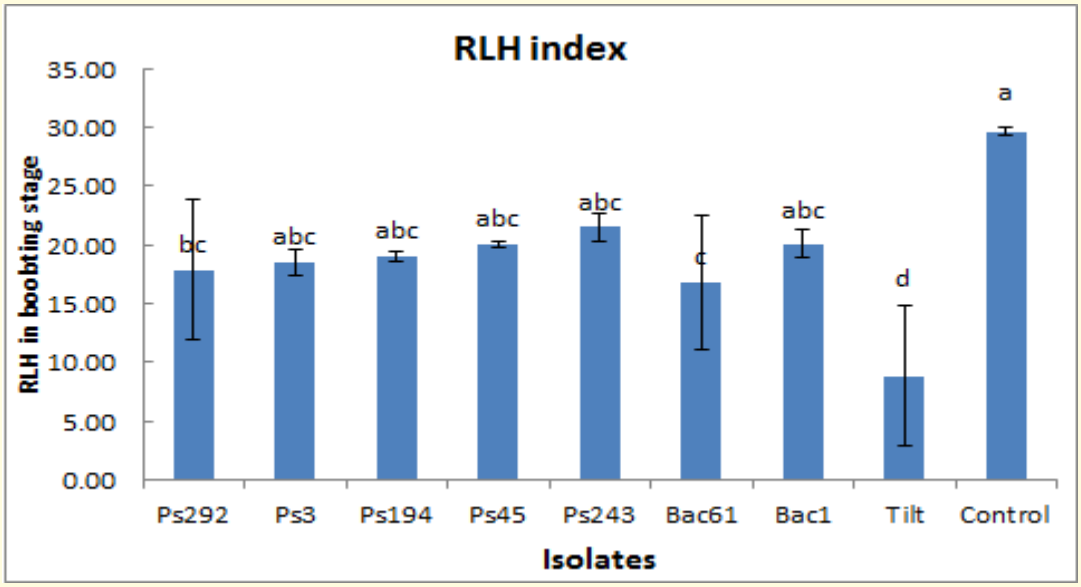
در روش CAS medium تولید سیدروفور ، بیشترین قطر هاله ایجاد شده پس از ۴۸ ساعت کشت جدایه ها در محیط کشت CAS medium، مربوط به جدایه‌های ۲۲۵، ۵/۶۷ ، ۱۲۸، ۵/۳۷، ۲۲۲، ۵/۱۷، ۲۱۶، ۴/۸۶، ۲۴۳، ۴/۸۲، ۲۷۴، ۴/۷۴ و جدایه شماره ۸، ۴/۷۲ سانتی متر بود. همچنین بیشترین قطر هاله تشکیل شده پس از ۷۲ ساعت کشت جدایه ها در محیط مزبور، مربوط به جدایه های ۲۲۵، ۶/۲۸، ۲۲۲، ۶/۱۰، ۱۲۸، ۵/۶۶، ۸، ۵/۲۲، ۲۱۶، ۵/۱۲، ۲۴۳، ۵، ۳، ۴/۸۷ سانتی متر بود.

ارزیابی جدایه های باکتریایی .*Pseudomonas* spp و .*Bacillus* spp در کاهش وقوع بیماری در شرایط مزرعه:

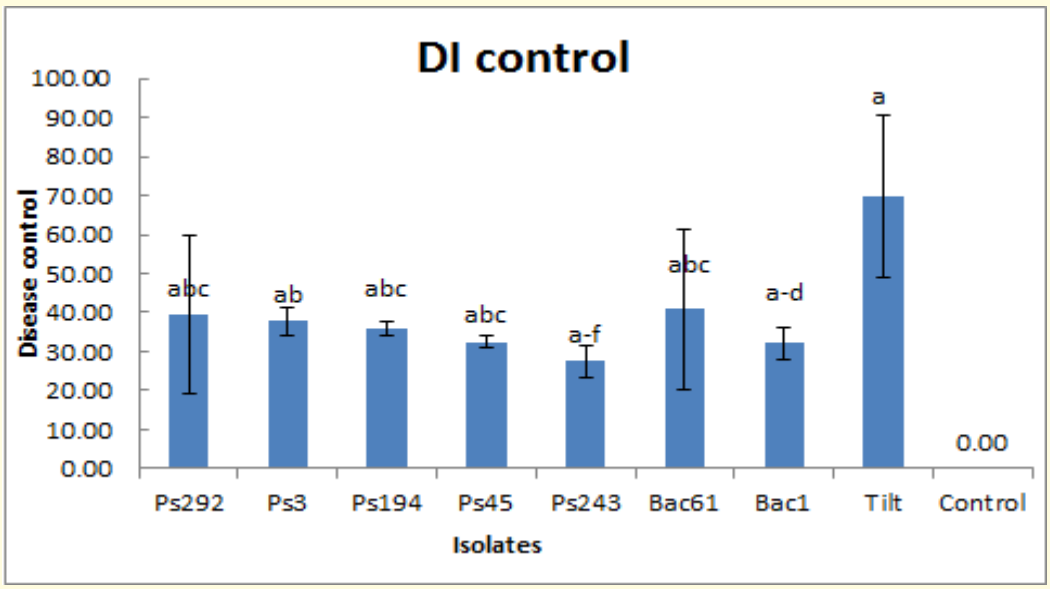
در آزمایشات مزرعه ای تعدای از جدایه های باکتریایی بر اساس محاسبه اندازه گیری ارتفاع نسبی لکه روی پنجه های بیمار و ارزیابی شاخص کنترل بیماری بالاترین سطح کنترل بیماری را در مقایسه با سایرجدایه ها نشان دادند. بین جدایه های *Pseudomonas* ، جدایه های ۲۹۲ (۳۹/۴۰ درصد)، ۳ (۳۷/۷۳ درصد)، ۱۹۴(۳۵/۷۶ درصد) و ۴۵ (۳۲/۴۵ درصد) به ترتیب کمترین ارتفاع نسبی لکه و بالاترین میزان شاخص کنترل بیماری را در مرحله آبستنی نشان دادند و به ترتیب در گروه های abc، ab، abc و abc قرار گرفتند. جدایه ۲۴۳ (۲۷/۴۰ درصد) نیز به عنوان باکتری دارای خصوصیات ضعیف آنتاگونیستی ولی دارای خصوصیات مناسب القاء کنندگی در گروه a-f قرار گرفت. در بین جدایه های *Bacillus* ، جدایه های ۶۱ (۴۰/۸۷ درصد)، و ۱ (۳۲/۰۸ درصد) کمترین ارتفاع نسبی لکه و بیشترین شاخص کنترل بیماری را نشان دادند و به ترتیب در گروه های abc و abcd قرار گرفتند. در این میان قارچکش تیلت بالاترین سطح کنترل بیماری را نشان داد(۶۹/۵۷ درصد) و در گروه a قرار گرفت (تصویر ۱و۲).

ارزیابی جدایه های باکتریایی .*Pseudomonas* spp و .*Bacillus* spp در کاهش وقوع بیماری در شرایط گلخانه

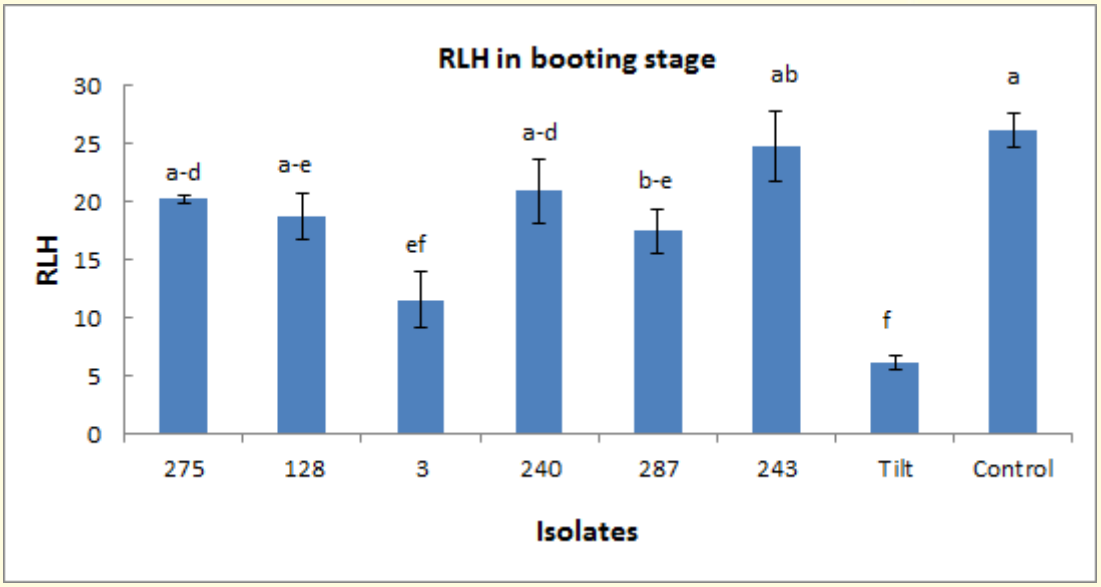
در آزمایشات گلخانه ای تعدای از جدایه های باکتریایی بر اساس محاسبه اندازه گیری ارتفاع نسبی لکه روی پنجه های بیمار و ارزیابی شاخص کنترل بیماری بالاترین سطح کنترل بیماری را در مقایسه با سایرجدایه ها نشان دادند. بین جدایه های *Pseudomonas* ، جدایه ۳ (۵۴/۲۶ درصد)، ۲۸۷ (۳۲/۲۹ درصد)، ۱۲۸(۲۸/۵۷ درصد) ، ۲۷۵(۰۵/ ۲۲ درصد) و ۲۴۰ (۲۰/۴۹ درصد) به ترتیب کمترین ارتفاع نسبی لکه و بالاترین میزان شاخص کنترل بیماری را در مرحله آبستنی نشان دادند و به ترتیب در گروه های ab، b-e، b-f، c-f و c-f قرار گرفتند. جدایه ۲۴۳ (۸/۸۶ درصد) نیز به عنوان باکتری دارای خصوصیات ضعیف آنتاگونیستی در گروه e-f قرار گرفت. در این میان قارچکش تیلت بالاترین سطح کنترل بیماری را نشان داد(۷۶/۳۴ درصد) و در گروه a قرار گرفت (تصویر ۳و۴).



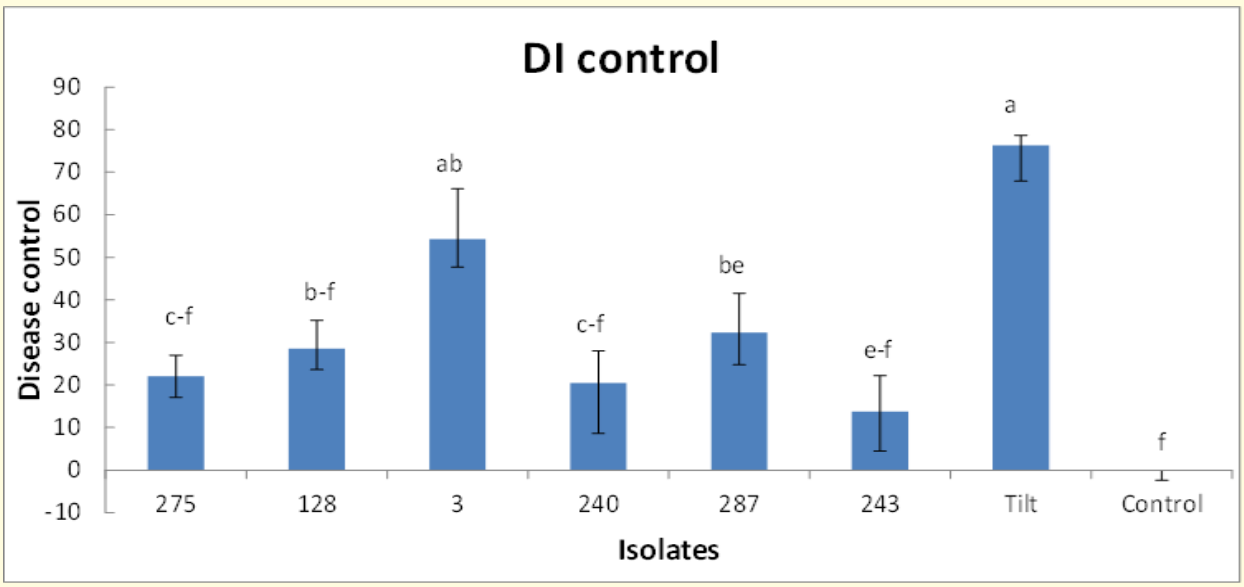
تصویر ۱: ارتفاع نسبی لکه (RLH) در رقم فجر مایه زنی شده با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف و باکتری های آنتاگونیست جدایه های .*Pseudomonas* spp و .*Bacillus* spp در شرایط مزرعه در مرحله آبستنی(Booting)



تصویر ۲: کنترل بیماری سوختگی غلاف توسط جدایه های باکتریایی آنتاگونیست جنس .*Pseudomonas* spp در شرایط مزرعه در مرحله آبستنی(Booting)



تصویر ۳: ارتفاع نسبی لکه (RLH) در رقم فجر مایه زنی شده با قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف و باکتری های آنتاگونیست جدایه های .*Pseudomonas* spp در شرایط گلخانه در مرحله آبستنی(Booting)



تصویر ۴: کنترل بیماری سوختگی غلاف توسط جدایه های باکتریایی آنتاگونیست جنس .*Pseudomonas* spp در شرایط گلخانه در مرحله آبستنی(Booting)

بحث:

Pseudomonas های فلورسنت یکی از مهمترین باکتریهای گرم منفی در کنترل بیولوژیک بوده و جزء ساکنین مقیم فراریشه محسوب میشوند. در تحقیق حاضر ۲۹۳ جدایه *Pseudomonas* از مزارع آلوده، سالم و از اندامهای مختلف برنج و سختینه قارچ جداسازی و ۶۱ جدایه بر اساس آزمون کشت متقابل انتخاب شدند. جدایه ها در سه گروه آنتاگونیست قوی، متوسط و ضعیف و فاقد خصوصیات آنتاگونیستی قرار گرفتند. ۲۰ ویژگی مهم مرتبط با خصوصیات آنتاگونیستی و القاء کنندگی در ۶۱ جدایه مورد ارزیابی قرار گرفت. هر کدام از جدایه ها در بروز یکسری از صفات مهم، برتر از دیگران بودند. جدایه هایی که در نشان دادن ۲۰ صفت آنتاگونیستی و القاء کنندگی در رتبه های بالاتری قرار گرفته و در حداقل ۹ و حداکثر ۱۵ صفت مذکور بر دیگران برتری داشتند، به عنوان آنتاگونیست ها و القاء کننده های موثر و قوی در نظر گرفته شده و در آزمون گلخانه ای و مزرعه ای در مرحله آبستنی در مقابل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف مورد مطالعه قرار گرفتند. در نهایت در مرحله آبستنی، ۵ جدایه از فراریشه برنج، غربال و شناسایی شدند. ۴ جدایه از باکتری های آنتاگونیست مذکور در آزمون کشت متقابل، در گروه آنتاگونیست های قوی و متوسط قرار گرفته بودند. در این تحقیق مشخص شد، جدایه های فراریشه (ریزوسفر) بهتر و قویتر از جدایه های اندام های مختلف گیاهی و قارچی عمل نموده و توانستند بیماری را ۵۶/۷۶ تا ۸۰/۲۸ درصد در مرحله گیاهچه ای و ۲۲/۰۵ تا ۵۴/۲۶ درصد در مرحله آبستنی کنترل نمایند. در تولید عصاره خارج سلولی ضد قارچی، جدایه ها علیرغم بازدارندگی در غلظت های پایینتر قادر به کنترل بیماری در شرایط گلخانه نبودند.

بر اساس آزمونهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، جدایه ها به جنس *Pseudomonas* تعلق داشته و به گونه های *P. protegens*، *P. mosselii* و *P.aeruginosa* شباهت های بسیار بالایی را در حدود ۹۵ تا ۹۹ درصد نشان دادند. نتیجه آزمایشات غربالگری مرتبط با صفات آنتاگونیستی نشان داد که علی رغم دارا بودن خصوصیات خوب بیوکنترلی و انتاگونیستی در جدایه ها، آنها در مراحل آزمون گلخانه ای(آبستنی) از رقابت حذف شدند و به لحاظ میزان کنترل بیماری از توان آنتاگونیستی کمتری در مقایسه با دیگران برخوردار بودند. بنابراین، اگر تعداد صفات خوب بیوکنترلی در یک جدایه بیشتر باشد، می تواند برای انتخاب جدایه ها جهت مطالعات گلخانه ای مبنا باشد، قابل قبول نمی باشد و جدایه ها می بایست پس از طی مراحل اولیه و تکمیلی غربالگری در آزمایشگاه، الزاما برای کارهای گلخانه ای و مزرعه ای انتخاب شوند. البته در محیط Invivo و یا در شرایط مزرعه‌ای، شاخص های دیگری از جمله تولید بیوفیلم می توان انتظار داشت که یک جدایه مفید و به لحاظ بیوکنترلی دارای کارایی بالاتری می باشد. لذا، توان تولید بیوفیلم بالا و قدرت کلونیزاسیون بالا در کنار خصوصیات آنتاگونیستی میتواند شاخص مهم تری برای کارایی بیشتر آنها در مزرعه باشد. این مهم در جدایه های ۳ ، ۲۴۳ و ۲۷۵ به خوبی مشهود بود. این سه جدایه توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم در جداره ارلن و پلیت الایزا داشتند و همچنین نشان دادند از قدرت بالایی برای تکثیر برخوردارند.

در مطالعات مزرعه ، جدایه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* در یک گروه آماری قرار گرفته و به یک میزان بیماری را کنترل نمودند. این در حالی بود که قارچکش تیلت بیماری را به میزان ۶۹/۵۷ درصد کنترل نموده بود. در مطالعات گلخانه ای جدایه های ۳ و ۲۸۷ از جنس *Pseudomonas* به میزان ۵۴/۲۶ تا ۳۲/۲۹ درصد بیماری را کنترل نموده و بهتر از سایر جدایه ها بودند. این

در حالی بود که قارچکش تیلت بیماری را به میزان ۷۶/۳۴ درصد کنترل نموده بود. نتایج بیانگر این است که هر چند گونه های باکتریایی آنتاگونیست (*Pseudomonas* , *Bacillus*) قادر به کنترل بیماری به اندازه قارچکش تیلت نبودند ولی می توان از گونه های مذکور در کنترل تلفیقی بیماریها و در جهت تولید محصول سالم استفاده نمود. ضمنا هر چند باکتری های آنتاگونیست قادر به کنترل قابل توجه قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی باشند، ولی شرایط در مزرعه به گونه ای دیگر رقم خواهد خورد و سطح کنترل بیماری با توجه به حاکم شدن شرایط سخت کاهش خواهد یافت.

فهرست منابع:

- ایزدیار، منوچهر و پاداشت، فریدون. ۱۳۷۲. بررسی فعالیت آنتاگونیستی بعضی از میکروارگانیسم ها علیه بیماری سوختگی غلاف برگ برنج. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه گیلان.

Abbot, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 266- 267.

Alexander, D. B., and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Bio. Fertil. Soil. 12, 39-45.

Berg, G., Fritz, A., Rostock, N., and Smalla, K. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. J. Appl. Microbiol. 91, 963-971.

Dehingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Second Edition CRC Press, Inc. 394pp

Raji, P., Sumiya, K., V., Souvidya, P., Sheela, M. S., and Narayanankutty, M. C. 2016. Evaluation of Pseudomonas fluorescens against brown spot, sheath blight and glume discoloration of rice. International journal ofl science and research. 6,65-72

Gamliel, A., and Katan, J. 1991. Involvement of *Pseudomonas fluorescent* and other microorganisms in increased growth response of plant in solarized soils. Phytopathology. 81, 494- 502.

IRRI, 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. November, 2002. 56p.

Kraus, J., and Loper, J.E. 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.

Ou, S. H. 1985. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institut, Key, Surrey. England. 380p.

Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3 rd ed. APS. St. Paul, Minnesota. 373p.

Spurr, H. W. Jr. 1981. Experiments on foliar diseases control using bacterial antagonists. In Microbial Ecology of Phylloplane, pp. 369- 381. London. Academic

Introduction of antagonistic bacterial agents on control of shaeth blight disease caused by *Rhizoctonia solani* in Mazandaran Province

M.Rostami[1]*, S. Tarighi[2], H. Rahimian[3] and P.Taheri[2]

1. Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Dept. of Plant Protection, Rice Reserch Institute of Iran- Mazandaran branch, Amol, Iran.

2. Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Dept. of Plant Protection, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

*Corresponding author email:

mrostamid@gmail.com

Abstract:

Sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* AG1-IA is one of the most important rice diseases in high yielding rice cultivars in the rice cultivation areas of North of Iran. The present study was conducted to identify the most effective isolates of antagonistic bacteria and resistance inducers for biological control of the disease. For this purpose, a large sampling of rice farms in Mazandaran province was carried out on local rice cultivars and high yielding rice. Different parts of the plant (root, leaf, stem, pod and seed) and the sclerotia were collected. After isolation and purification of 293 isolates of *Pseudomonas* and 55 isolates of *Bacillus*, the antibiotic test (Dual culture) were used for early screening of the isolates. 61 isolates of *Pseudomonas* spp. based on the antibiotic production test, compound volatile and antifungal extract were placed in four groups such as strong, moderate and weak antagonist. Also, 10 isolates of Bacillus spp., were selected based on Dual-cultural test and were used in field experiment. Physiological, biochemical and enzymatic tests were conducted on *Pseudomonas* isolates and three species of *Pseudomonas protegens*, *P. aeruginosa* and *Pseudomonas mosselii* were identified. The antagonistic and induction effects of isolates in controlling sheath blight disease in booting stage in greenhouse and field were studied. Finally, the isolates of *Pseudomonas* spp. with numbers of 275(*Pseudomonas protegens*), 3(*Pseudomonas mosselii*), 128, 240, 287(*P. aeruginosa*) as isolates with high antagonistic potential and isolate number of 243(*Pseudomonas protegens*) as resistance inducer in greenhouse conditions were reducedd the disease 20% to 54.26% compared to control. Isolates 292, 3, 194 and 45 from *Pseudomonas* sp., isolates 1 and 61 from *Bacillus* spp. with high antagonistic potential controlled the disease at booting stage from 32.45% to 39.40% and 32.08 to 40.87%, respectively in the field conditions. The control of disease by propiconazole (Tilt) in field conditions and greenhouse conditions was 69.57% and 76.34% respectively.

Keyword: Antagonistic bacteria, *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., sheath blight disease, biological control , Rice