تأثیر میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست خاک‌های شالیزار گیلان روی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج

فریدون پاداشت دهکایی[۱]، شهناز منصوری جاجایی[۲] و حمید روحانی[۳]

چکیده

یک صد و دو جدایه میکروارگانیسم از ۸۵ نمونه خاک شالیزارهای نقاط مختلف استان گیلان سواسازی شدند. پس از بررسی آثار آنتاگونیستی آنها در مقابل قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج (Gibberella fujikuroi) در محیط غذایی PDA، بیست و یک جدایه برای آغشتن بذر در محیط مرطوب انتخاب شدند. هفت جدایه که تأثیر خوبی در کاهش تشکیل پرگنه بیمارگر روی بذر و گیاهچه داشتند، اثرشان در کنترل بیماری در یک آزمایش گلخانه‌ای و به‌صورت اسپلیت پلات بررسی شدند. این جدایه‌ها شامل Bacillus subtilis، B. circulans، Bacillus sp.، Trichoderma harzianum، T. virens (دو جدایه) و F. 23 (شناسایی نشده) بودند.

نتایج نشان داد که همه آنتاگونیست‌ها در مقایسه با شاهد در کاهش بیماری در خاک سترون مؤثر بودند ولی تأثیر کلی B. circulans، T. harzianum و T. virens بهتر از بقیه آنتاگونیست‌ها و کمتر از تیمار قارچ‌کش(تیوفانات متیل تیرام، ۲ گرم در لیتر) بود. هم‌چنین مشخص شد که آغشتن بذر با آنتاگونیست‌ها قبل از آلوده‌سازی به بیمارگر تأثیر معنی‌داری در کاهش آلودگی نسبت به تأخر به کارگیری آنتاگونیست‌ها بعد از آلوده‌سازی به بیمارگر داشته است.

واژه‌های کلیدی: *برنج، بیماری‌ها، کنترل بیولوژیک، پوسیدگی طوقه، میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست*

مقدمه

بیماری پوسیدگی طوقه برنج یکی از بیماری‌های مهم برنج است که از مرحله جوانه‌زنی، خزانه تا شالیزار روی برنج دیده می‌شود(۱۶) در ایران نخستین بار ابراهیم نسبت(۱) این بیماری را از شالگوراب فومن گزارش کرد و عامل آن را *Fusarium moniliforme* تعیین کرد. فرم جنسی عامل این بیماری نیز با نام *Gibberella fujikuroi* Wollenw (Saw.) برای نخستین بار از ایران در مزارع شهرستان فومن جمع‌آوری و گزارش گردید(۳). این بیماری عموماً به عنوان بیماری بذرزاد شناخته شده است ولی عامل این بیماری علاوه بر بذر، در خاک نیز قادر به ادامه حیات است ولی در مناطق گرمسیری نمی‌تواند مدت زیادی در خاک دوام داشته باشد(۱۷). بررسی‌های انجام

۱. استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت
۲. مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، کرج
۳. دانشیارگیاه‌پزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

شده در گیلان نشان داد که عامل بیماری در بقایای گیاهی تا فصل زراعی بعد در مزرعه زنده می‌ماند(۵). برای کنترل این بیماری بهترین راه توصیه شده ضد عفونی بذور می‌باشد که در گیلان نیز قارچ کش‌های بنومیل تیرام (40% W. P.) و تیوفانات متیل تیرام (80% W. P.) برای این منظور معرفی شده‌اند(٤). سموم شیمیایی در پایداری تولید و نگه‌داری غذای بشر نقش انکارناپذیری دارند ولی به عنوان آلاینده محیطی نگرانی‌ها و مشکلات زیادی را در سرتاسر جهان امروز به وجود آورده‌اند چنانچه راجوت(۱۸) مخاطرات آنها را جز چند مسئله فوری از مسائل دشوار کشاورزی ذکر کرده است. با مشخص شدن تأثیر سوءسموم بر محیط زیست و سلامتی انسان، دست‌یابی به روش‌های سالم جایگزین، یکی از اهداف مهم در کنترل عوامل خسارت‌زای زنده به محصولات در کشاورزی شده است. کنترل بیولوژیک یکی از روش‌هایی است که امروزه سرمایه‌گذاری گسترده‌ای در دنیا به این امر اختصاص یافته است. هر چند که این روش در بسیاری از محصولات به صورت عملی در مزارع به اجرا در نیامده است ولی تاریخچه علوم نشان می‌دهد که پیگیری در تداوم پژوهش‌ها، در نهایت به دست آوردهای عملی و گسترش دانش در آن عرصه‌ها منجر شده است.

برنج در زمره محصولاتی است که تحقیقات نسبتاً خوبی به‌منظور شناسایی عوامل کنترل کننده بیولوژیک بیماری‌های پوسیدگی طوقه، لکه قهوه‌ای، بلاست و مخصوصاً سوختگی غلاف برگ (Sheath blight) روی آن صورت گرفته است. در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج نشان داده شد که باکتری‌هایی سواسازی شده از مزارع برنج علاوه بر متوقف کردن بیماری سوختگی غلاف برنج، از رشد رویشی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه نیز جلوگیری کردند و تیمار کردن بذرهای آلوده با باکتری‌های نام برده سبب افزایش جوانه‌زنی آنها و کاهش آلودگی پنجه‌ها شد (۱۲). در کره از ۱٦۷ باکتری سواسازی شده از آب، خاک و بافت‌های آلوده و سالم گیاه برنج، تعداد باکتری‌های غیر فلورسنت بیشتر از فلورسنت‌ها بودند و ۱۲ جدایه از هر دو گروه قادر به جلوگیری از رشد رویشی قارچ‌های عامل بیماری بلاست، سوختگی غلاف و پوسیدگی طوقه برنج بوده‌اند(۱۳). روزالز و همکاران(۱۹) تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده از مزارع را که علاوه بر خاصیت آنتاگونیستی در مقابل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ(*Rhizoctonia solani*)، خاصیت مشابهی نیز در مقابل عامل پوسیدگی طوقه برنج داشتند شناسایی کردند. این باکتری‌ها شامل *Bacillus subtilis*، *B. laterosporus*، *B. pumilus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Erwinia herbicola-like*، *Serratia marcesces* و پسودوموناس‌های ساپروفیت روی بذر شامل *P. Putida* و *P. cepacia* بودند. روزالز و میو(۲۰) گزارش کردند که از ٤٤۱ جدایه باکتری سواسازی شده از مزارع برنج ۱۱۳ جدایه از رشد رویشی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه جلوگیری کردند. تأثیر این باکتری‌ها در جلوگیری از بروز بیماری در خزانه به‌صورت غوطه‌ور کردن بذور با آلودگی طبیعی در سوسپانسیون باکتری‌ها، ۷۱/۷ الی۹۳/٦ درصد بود.

در این بررسی اثر آنتاگونیستی میکروارگانیزم‌های سواسازی شده از خاک مزارع برنج استان گیلان روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج و شناسایی آنها مورد مطالعه قرار می‌گیرد. در این ارتباط تاکنون پژوهش دیگری در ایران صورت نگرفته است ولی گزارش‌هایی در رابطه با کنترل بیولوژیک بیماری‌های سوختگی غلاف و بلاست برنج منتشر شده است(۲ و ٦).

مواد و روش‌ها

۱. تهیه نمونه‌های خاک

با شروع فصل زراعی از خزانه و مزارعی که بیماری پوسیدگی طوقه برنج در آنها کم و یا قابل رویت نبود و هم‌چنین خارج از فصل، نمونه‌های خاک از۸۵ مزرعه از نقاط مختلف استان گیلان تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. در هر مزرعه از پنج نقطه نمونه‌هایی با ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر تهیه و سپس با هم مخلوط

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

گردید. هر نمونه مخلوط معرف یک نمونه از یک مزرعه یا محل تلقی شد.

۲. جداسازی میکروارگانیزم‌ها

قارچ عامل بیماری را در شیشه‌های درب‌دار حاوی آب آگار کشت داده، پس از این‌که قطر کلنی آن حدود۲ سانتی‌متر شد از هر نمونه خاک به ارتفاع ۲ سانتی‌متر روی کلنی بیمارگر به طور جداگانه قرار داده شدند(هر نمونه خاک در ۳ شیشه). این شیشه‌ها به مدت یک ماه در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با نور متناوب ۱۲ ساعته نگه‌داری شدند. سپس در هر شیشه قرصی به قطر ٦ میلی‌متر از محیط غذایی PDA (حاوی۲۰ گرم آگار در لیتر) روی خاک قرار داده، یک هفته بعد از نگه‌داری در همان شرایط، قرص‌های PDA را برداشته و روی محیط غذایی PDA در تشک پتری کشت داده شدند. هفت تا ۱۰ روز بعد کلنیزه شده قرص‌های مذکور توسط قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفتند(۹). در هر نمونه، از قرص‌های PDA کشت شده که فقط توسط میکروارگانیزم‌های خاک کلنیزه شده و قارچ عامل بیماری از روی آنها قابل مشاهده و ردیابی نبود، به روش تک اسپورسازی و تک کلنی میکروارگانیزم‌های رشد یافته جداسازی شدند.

۳. بررسی خاصیت آنتاگونیستی میکروارگانیزم‌های سواسازی شده

الف) کشت متقابل

قرصی به قطر ٦ میلی‌متر از هر جدایه قارچ و یا یک لوپ از سوسپانسیون باکتری‌های سواسازی شده، در شاهد یک قرص PDA و یا یک لوپ از آب مقطر استریل را در مرکز تشتک پتری و چهار قرص از بیمارگر به فاصله ۳ سانتی‌متر در چهار طرف آن روی محیط PDA کشت شدند(٢٤). تشتک‌های پتری را در انکوباتور در حرارت۲۸ درجه سانتی‌گراد و با نور متناوب ۱۲ ساعته قرار داده، پس از ٤ و ۷ روز شعاع رشد بیمارگر اندازه‌گیری شد. به علاوه تغییرات مرفولوژیکی میسیلوم‌های بیمارگر در مقایسه با شاهد مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

ب) ترشحات فرار

قرصی از کشت تازه بیمارگر و قارچ‌های سواسازی شده و یا یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های جداسازی شده را روی محیط غذایی PDA کشت داده (هر میکروارگانیزم مورد آزمایش در ۳ تکرار)، تشتک‌های پتری حاوی بیمارگر را به طور وارونه روی تشتک‌های حاوی قارچ‌ها و باکتری‌های مورد آزمایش قرار داده، محل اتصال لبه تشتک‌ها با پارافیلم مسدود شدند. در شاهد تشتک‌های حاوی قرص بیمارگر روی تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA که روی آن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل پخش شده یا قرصی از PDA در مرکز آن گذاشته شده بود به طور وارونه قرار داده شد. تشتک‌ها را در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی گراد و با نور متناوب ۱۲ ساعته قرار داده و پس از هفت روز قطر پرگنه بیمارگر اندازه‌گیری و درصد بازداری از رشد بیمارگر تعیین شد.

٤. ارزیابی اثر آنتاگونیست‌ها به‌صورت آغشته نمودن بذر

در کلیه آزمایش‌های زیر بذر برنج مورد استفاده از رقم حساس خزر بوده که نخست به مدت ۱۵ دقیقه با آب جاری(آب لوله‌کشی شهری) شستشو شده و سپس ۱۵ دقیقه در آب مقطر در حرارت ۵۷-۵۲ درجه سانتی گراد ضد عفونی سطحی گردید.

آلوده‌سازی بذر به قارچ عامل بیماری (*Fusarium fujikuroi* Syn. *F. moniliforme*) به روش وادا و همکاران(۲۳) انجام شد که به ازای هر ۵۰ گرم بذر ۹ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به نسبت یک میلیون اسپور در هر میلی‌لیتر به آن اضافه و به خوبی مخلوط شد.

برای تیمار کردن بذر به آنتاگونیست‌ها، غلظت اسپور قارچ‌های آنتاگونیست ۱۰ میلیون اسپور در هر میلی‌لیتر و باکتری‌ها با کدورت مناسب(حدوداً 10^8 =cfu) در محلول ژلاتین ۲/۵ گرم در لیتر بوده است.

الف) در محیط مرطوب

یازده جدایه باکتری و ده جدایه قارچ آنتاگونیست انتخابی به طور جداگانه و به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفتند.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

۱- آغشته کردن بذرها به آنتاگونیست‌ها و سپس آلوده‌سازی به بیمارگر(محافظت): بذر برنج را در سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها و در تیمار شاهد در محلول ژلاتین غوطه‌ور نموده، به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. پس از آن با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری آلوده شده و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت گردیدند.
۲. آلوده‌سازی بذرها به بیمارگر و سپس آغشته کردن آنها به آنتاگونیست‌ها(معالجه): این قسمت همانند قسمت قبل انجام شد با این تفاوت که نخست بذور با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری آلوده‌سازی شده و پس از ۲٤ ساعت نگه‌داری آنها در انکوباتور، با سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها آغشته و کشت شدند. برای هر تیمار٤۰۰ عدد بذر (در هر تکرار ۱۰۰ بذر) کشت شدند.

برای ارزیابی، ۱۵ روز پس از نگه‌داری تشتک‌های پتری حاوی بذور تیمار شده در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد، درصد گیاهچه‌هایی که در این مدت پرگنه بیمارگر روی آنها تشکیل شد، تعیین شده، پی از تبدیل جذری $(\sqrt{X}+\frac{1}{2})$ (۷) به کمک نرم‌افزار IRRISTAT version 92-1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

ب) اثر آنتاگونیست‌های انتخابی در کنترل بیماری در گلخانه

این آزمایش در قالب اسپلیت پلات و به صورت طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شد. پلات اصلی(M)، زمان به‌کاری گیری آنتاگونیست‌ها بود که در دو سطح اجرا شد: **m1** ـ نخست بذرها را به مدت ۲٤ ساعت در سوسپانسیون آنتاگویست‌ها غوطه‌ور نموده، سپس با سوسپانسیون قارچ عامل بیماری آلوده‌سازی شده، ۲٤ ساعت در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند(محافظت). **m2** ـ نخست بذرها با سوسپانسیون قارچ عامل بیماری آلوده شده و پس از ۲٤ ساعت نگه‌داری در انکوباتور، ۲٤ ساعت دیگر در سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها غوطه‌ور شدند(معالجه).

پلات فرعی(S) در ۹ سطح، شامل ۷ میکروارگانیزم آنتاگونیست انتخابی از آزمایش‌های بند الف به شماره جدایه‌های F-90، F.64 ، F.42 ، F.23 ، B.11 ، B.58 و B.84 به اضافه شاهد آلوده و تیمار قارچ‌کش بودند. قارچ‌کش مورد استفاده سم تیوفانات متیل تیرام(پودر و تابل ۸۰٪) به نسبت دو در هزار بود که در حال حاضر برای کنترل این بیماری توصیه شده و در شمال کشور استفاده می‌شود(٤).

بذرهای تیمار شده در ظرف‌های پلاستیکی یک بار مصرف به ابعاد ۵×۱۳×۱۹ سانتی‌متر حاوی خاک سترون کشت شدند. در هر تشتک۲۰۰ عدد بذر کشت شدند که به عنوان یک تکرار منظور گردیدند. کلیه تشتک‌ها در گلخانه نگه‌داری شده و برای آبیاری از آب مقطر استفاده شد. پس از یک ماه در هر تیمار نشاهای سالم و مرده شمارش شده، بر اساس درصد نشاهای مرده و پس از تبدیل جذری $(\sqrt{X}+\frac{1}{2})$ (۷) به کمک نرم‌افزار MSTATC مورد تجریه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

یک‌صدو دو جدایه قارچ و باکتری از نمونه‌های خاک شالیزارهای استان گیلان سواسازی شدند که اثر همه آنها روی رشد رویشی بیمارگر در محیط کشتPDA به روش کشت متقابل بررسی شد. براساس بررسی‌های میکروسکوپی از کل میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش ۳۰ جدایه سبب تغییرات مرفولوژیک در میسلیوم‌های بیمارگر شدند که این علایم شامل شاخه شاخه شدن، به هم پیچیدن، ضخیم شدن میسلیوم‌ها همراه با گلوله‌ای تا لیمویی شکل شدن نوک میسلیوم‌ها و گاهی تسبیحی تا زیگزاگ شدن میسلیوم‌های انتهایی بوده است. به علاوه واکوئله، قطعه قطعه و لیز شدن نیز در میسلیوم‌های بیمارگر مشاهده گردید. انتخاب میکروارگامیزم‌های آنتاگونیست برای آزمایش‌های بعدی براساس درصد بازداری از رشد رویشی بیمارگر، در کشت متقابل و در اثر ترشحات فرار آنها و فاصله زمانی ایجاد تغییرات مرفولوژیکی در بیمارگر پس از کشت در مقابل هم، صورت گرفت. در جدول‌های۱ و ۲ نتایج

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

اثـر یـازده جدایـه باکتری و ده جدایه قارچ آنتاگونیست انتخابی در جلوگیـری از رشـد رویـش قـارچ عامـل بـیماری روی بذر مصـنوعاً آلـوده شده، به صورت ضد عفونی بذر در محیط کاغذ صافی مرطوب آمده است. نتیجه اولیه از جدول تجزیه واریانس داده‌هـای به دست آمده از این بررسی که به صورت دو آزمایش جداگانـه برای باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست و به دو روش انجام شد، نشان داد که اثر تیمارها در سطح یک درصد معنی‌دار اسـت. مقایسـه میانگین اثر باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست با همدیگـر و شـاهد در محـیط مـرطوب براسـاس درصـد گـیاهچه‌هایـی کـه پـرگنه بیمارگـر روی آنها تشکیل گردید، در جـدول‌هـای ۱ و ۲ نشـان می‌دهد که باکتری‌هایB.84 ،B.58 و قـارچ‌هـای F.23 ، F.42 ، F.90 وF.64 در هر دو روش ارزیابی شـده تفـاوت معنـی‌داری در سـطح یک درصد با شاهد داشتند. هـم‌چنـین چهـار جدایـه قـارچ مذکـور سـبب بالاتـرین درصد بـازداری از رشـد رویشـی بیمارگـر در کشت متقابل شدند ولی تأثیـر ترشـحات قـرار جدایـهF.23 بسیار کمتر از ۳ جدایه دیگر بـود. از باکتـری‌های مورد آزمایش ترشحات فرار باکتری B.84 دارای بیشـترین درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر بوده و بـه همـراه باکتری B.11 دارای بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد بیمارگر در کشت متقابل بوده‌اند.

براسـاس آنچـه که ذکر شد و به صورت کمّی نیز در جداول ۱و ۲ آمـده اسـت، هفـت جدایـه قـارچ و باکتری F.90، F.64، F.42 ، F.23 ، B.84 ، B.58 ، B.11 بـرای ادامـه بررسـی در گلخانـه انتخاب شدند، این میکروارگانیزم‌ها به ترتیب دو جدایه اول تحـت عـنوان *Trichoderma virens* و جدایـه سـوم به نام *T. harzianum* شناسایی شدند و جدایهF.23 نیز شناسایی نشده باقـی مانـد. سـه جدایـه آخری نیز که از باکتری بودند براساس روش‌هـای اسـتاندارد بیوشـیمیایی (۱۱ و ۲۱) بـه ترتیب تحت عناوین*Bacillus subtilis* ، *B. sp* و*B. circulans* شناسایی شدند. جـدول تجـزیه واریـانس اثر میکروارگانیزم‌ها در کنترل بیماری پوسـیدگی طـوقه برنج در گلخانه نشان می‌دهد که پلات اصلی یعنـی روش به کارگیری میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست و یا به عـبارت دیگـر تقدم و تأخر به کارگیری آنتاگونیست‌ها در تیمار بـذر تأثیـر معنی‌داری در میزان آلودگی بعدی دارد. این موضوع در جـدول ۳ بـه وضـوح نشان داده شده است. همانطور که در ایـن جـدول آمده است درصد نشاهای مرده در همه تیمارها(به جـز تـیمار قـارچ کـش) در پلاتm1 به‌طور معنی‌داری کمتر از پـلاتm2 بود. یعنی آغشته کردن بذرها با آنتاگونیست‌ها قبل از آلـوده‌سـازی به بیمارگر، میزان بیماری بعدی را نسبت به حالتی کـه عمـل آغشـته کـردن بـا آنتاگونیسـت‌هـا بعد از آلوده‌سازی بیمارگـر انجـام شد، بیشتر کاهش داده است. مقایسه میانگین اثر تـیمارهای مخـتلف پـلات فرعـی در جدول۳ نشان می‌دهد که قـارچ‌کـش تـیوفانات متـیل تیـرام(پودر و تابل ۸۰٪) در هر دو روش ضـد عفونـی بـذور(m1 وm2) بـا بیشـترین تأثیـر در جلوگیـری از بـروز پوسـیدگی طـوقه(بـا کمتـرین درصد نشای مرده) در گروه اول(a) قرار دارد ولی بقیه تیمارها هر چند که در هـر دو روش مـورد آزمایش در کاهش بیماری مؤثر بودند ولی جایگـاه بعضـی از آنها در گروه‌بندی بر اساس آزمون دانکن در سـطح ۵٪ در دو روش (m1 وm2) متغیـر بـود. در روش اول (m1) پـس از تـیمار قـارچ‌کـش بـه تـرتیب تـیمـارهـای F.90(*T.virens*)، F.42 (*T.harzianum*)، F.64(*T.virens*)، و *B. subtilis*) B.84 . در رده‌هـای ۲ الـی ۵ قرار گرفتند ضمن این‌که هـر چهـار آنتاگونیسـت مذکـور با همدیگر و با تیمار قارچ‌کش از نظـر گـروه‌بـندی وجـه اشـتراک دارنـد ولـی در روش بعـدی آغشـته کـردن بـذر (m2) یعنـی در شـرایطی کـه نخسـت بـذر بـا بیمارگـر آغشـته شـده و ۲٤ سـاعت بعـد بـا آنتاگونیسـت‌ها تیمار گردید اثر آنتاگونیست‌های مذکور نسـبت به تیـمار قارچ‌کش کاهـش بیشتـری یافت. همـان‌طور که در گروه‌بندی آنها دیده می‌شود در این روش تیمار قارچ‌کش بـه تنهایـی در گـروه اول(a) قـرار گرفت. بنابراین تقدم مصرف آنتاگونیسـت‌ها نسبت به بیمارگر در آغشته نمودن بذر به منظور حفاظـت آنهـا در کاهش بیماری تأثیر بهتری را نشان داده است. ایـن موضـوع را مـی‌بایست ناشی از استقرار و اشغال سطح بذر توسط هر یک از آنـتاگونیست‌ها یا بیمارگر قبل از به کارگیـری

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

جدول۱. مقایسه اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در محیط کشت و ضدعفونی بذرهای آلوده در محیط مرطوب

شماره جدایه	تشخیص	درصد بازدارندگی از رشد		درصد آلودگی بذر در محیط مرطوب*	
		متقابل	ترشحات فرار	میانگین**	میانگین***
B.11	*Bacillus circulans*	۵۵/۲^{a}	۷/۱^{de}	۲۳/۹^{ab****}	٦۸/٦^{de}
B.28	*B. circulans*	٤۷/٤^{b}	۳/۳^{f}	۳۲/۷^{cdc}	۲۸/۲^{a}
B.29	*B. circulans*	۲٦/۹^{d}	۲۰/۷^{b}	۳٦/٦^{de}	۳۷/۷^{abc}
B.48	*B.sp*	۲۹/٤^{cd}	۱٤/۸^{c}	۲۸/۹$^{a-d}$	۵۲/۸^{cd}
B.58	*B.sp.*	۲۰^{e}	۱٤/٤^{c}	۲۲/۹^{ab}	۳۵/۲^{ab}
B.71	*B.sp.*	٤۸/۳^{b}	۱۵/٦^{c}	۲۹/۷^{bcd}	٦۷/۲^{de}
B.79	*B.megaterium*	۲٦/۳^{d}	٤/۸^{ef}	۲۵/۱^{abc}	٦٤^{de}
B.83	*B.megaterium*	۳٤/۵^{c}	٤/٦^{ef}	۳۰/۲$^{b-e}$	۲۸/۵^{a}
B.84	*B.subtilis*	۵۲/۱^{ab}	۲٦/۲^{a}	۲۱/۸^{a}	۳۹/۹^{abc}
B.93	*B. circulans*	۳۱/٦^{cd}	۸/۲^{d}	۲۸/٤$^{a-d}$	۳۹/٤^{abc}
B.94	*B.sp.*	۲٦/۳^{d}	۲/۸^{f}	۳٦/۷^{de}	٤۵/٦^{bc}
	شاهد	–	–	۳۸/۷^{e}	۷۸/۱^{e}

*: در هر تکرار تعداد گیاهچه‌هایی که دارای پرگنه یا رشد رویشی قابل رؤیت قارچ عامل بیماری روی طوقه یا بذر متصل به آن بود، شمارش شدند.

**: بذر ابتدا با آنتاگونیست‌ها آغشته شده، پس از ٢٤ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با بیمارگر آلوده‌سازی گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.

***: بذر ابتدا با بیمارگر آلوده‌سازی شده، پس از ٢٤ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با آنتاگونیست‌ها آغشته گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.

****: در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند فرق معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند(DMRT).

دیگری دانست. کاهش میزان آلودگی در تیمار شاهد در روش m1 نسبت به روش m2 را نیز شاید بتوان بر همین اساس توجیه نمود. یعنی مدتی که بذر در تیمار شاهد در آب مقطر قرار می‌گیرد فرصتی را فراهم می‌سازد که علی‌رغم ضدعفونی اولیه آن با آب گرم، باقی مانده فلور طبیعی آن فعال شده و با افزایش مجدد جمعیت و تثبیت شدن روی بذر آن را در برابر آلوده‌سازی بعدی به بیمارگر به طور طبیعی تا حدودی حفظ می‌نماید در حالی که در روش m2 آلوده‌سازی بذر به بیمارگر بلافاصله پس از ضدعفونی آن با آب گرم سبب می‌شود که قارچ عامل بیماری به سرعت سطح بذر را اشغال کرده و روی آن تثبیت شود و میانگین آلودگی در تیمار شاهد و هم‌چنین در بقیه تیمارها به جز تیمار قارچ‌کش نسبت به روش m1 افزایش یابد(جدول۳). موضوع خوب تثبیت شدن و توانایی کلنیزه کردن بافت گیاهی توسط یک بیمارگر یا یک آنتاگونیست مورد تأکید آندروز(۸) نیز هست و او این موضوع را بزرگ‌ترین اختلاف مابین استرین‌های یک عامل بیوکنترل می‌داند. بلاک‌من و فوک‌ما(۱۰) نیز بیان داشته‌اند که سطوح اندام‌های گیاهی جای طبیعی میکروارگانیزم‌ها هست که بسیاری از آنها قادرند رشد پاتوژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند و یک قسمت مهم از کاهش بروز بیماری در گیاهان زراعی در مزرعه در اثر میکروارگانیزم‌های ساپروفیت است و هر گونه تغییر در فاکتورهای محیطی می‌تواند در توازن بین ساپروفیت‌ها و پاتوژن‌ها مؤثر باشد.

بعضی از میکروارگانیزم‌ها به دلیل تکثیر سریع و سرعت در

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

جدول۲. مقایسه اثر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در محیط کشت و ضد عفونی بذرها در محیط مرطوب

شماره جدایه	تشخیص	درصد بازدارندگی از رشد		درصد آلودگی بذر در محیط مرطوب*	
		متقابل	ترشحات فرار	میانگین**(محافظت)	میانگین***(معالجه)
F.20	-	۲۱/۵ d	۱۷/۲d	۳٦ ef****	۳۷/٤b
F.23	-	٤٤ b	۲/۵fg	۷/۷a	۱۰/۸a
F.24	*Trichoderma harzianum*	۲۳/۹cd	۱/٤g	۲۹/۹de	٤٦/۲bc
F.30	-	۹/٦cd	۳/۷ef	۳٦/٦ef	٤۷/۵bc
F.42	*T. harzianum.*	٦۰a	۲۹/۳b	۲۱/۱bc	۳۸/۱b
F.47	-	۱۲/۱e	۳۱/۸b	۳۸/۲ef	٤۸/٤bc
F.64	*T. virens*	۳٦/۹b	٤۷/۳a	۲۳/۹cd	۳۵/۳b
F.80	-	۳۰/۱c	۵/٦e	٤۱/٤f	۳۸b
F.85	-	۲۳/۱d	۲۳/۲c	۳۱/۷e	٤۷/۵bc
F.90	*T. virens*	۳۸/۵b	٤۱/۷a	۱۵/۹b	۳۷/۱b
شاهد		–	–	٤۳/۲f	٦۱/٦c

* : در هر تکرار تعداد گیاهچه‌هایی که دارای پرگنه یا رشد رویشی قابل رؤیت قارچ عامل بیماری روی طوقه یا بذر متصل به آن بود، شمارش شدند.

** : بذر ابتدا با آنتاگونیست‌ها آغشته شده و پس از ٢٤ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با بیمارگر آلوده‌سازی گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.

*** : بذر ابتدا با بیمارگر آلوده‌سازی شده و پس از ٢٤ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با آنتاگونیست‌ها آغشته گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.

**** : در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند فرق معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند(DMRT).

جدول۳. مقایسه اثر میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست در دو روش آغشتن بذور برنج براساس میانگین درصد نشاهای مرده در گلخانه(داده‌های اصلی)

پلات فرعی(**S**)	پلات اصلی(**M**)		میانگین پلات فرعی
	m1(محافظت)	**m2**(معالجه)	
F.90=*Trichoderma virens*	۱/۷٦ a	۱۸/۷۳۳ d	۱۰/۲٦۹ d
F.64=T. *virens*	۳/۰٤۵ a	۱۳/٦۷۰ c	۸/۳۵۸ bcd
B.84=*Bacillus subtilis*	۳/٦۳۰ ab	۹/۲٤۰ b	٦/٤۳۵ b
B.11=*B. circulans*	۵/۱۷۵ ab	۱۳/۸۲۳ c	۹/٤۹۹ bcd
B.58=*B. sp.*	۷/٦۸۰ bc	۱٤/۸۰۳ cd	۱۱/۲٤۱ d
F.23 (شناسایی نشد)	٤/۷۸۰ ab	۱۵/۰۸۸ cd	۹/۹۳٤ cd
F.42=*T. harzianum*	۲/٤٦۵ a	۱۱/٤۰۵ bc	٦/۹۳۵ bc
قارچ کش(تیوفانات متیل تیرام)	۱/۰۳۳ a	۰/۵۰۵ a	۰/۷٦۹ a
شاهد	۱۱/۳۹۸ c	۲٦/۸۱۸ e	۱۹/۱۰۸ e

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند فرق معنی داری در سطح ۵٪ با هم ندارند (DMRT).

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

مصـــرف مـواد غـذایـی و اشغـال محیـط، در رقـابت با گـروه دیگـری مـی‌باشند بدون این‌که دارای فعالیت‌های متابولیتی علیه آنهـا باشند. این موضوع در آزمایش‌های کشت متقابل در محیط کشـت نیـز دیـده شـده است به طوری که بعضی از قارچ‌ها در مـدت ٢٤ یا ٤٨ ساعت به سرعت رشد نموده، کل محیط کشت در تشـتک پتـری را اشـغال کـرده و فرصت رشد به بیمارگر را نـــداده‌انـــد. لیـــندمان و ســـاس لـــو(١٠) عقـــیده دارنـــد کـــه آنتاگونیسـت‌هایـی کـه بـه عنوان رقیب غذایی عمل می‌کنند در مقابـل بیمارگرهایـی کـه قـبل از نفوذ در میزبان یک دورهٔ رشد سـاپروفیتی با استفاده از مواد غذایی خارج سلولی گیاهی دارند، مؤثـر هستند و چنین آنتاگونیست‌هایی فقط برای پیشگیری قابل اسـتفاده هسـتند. در ایـن آزمـایش نیـز چنانکه در جداول ١و ٢ ملاحظـه می‌شود بعضی از قارچ‌ها و باکتری‌ها علی رغم این که سـرعت رشد آنها در محیط کشت در مقابل بیمارگر خوب بوده اسـت (براسـاس درصد بازداری از رشد بیمارگر در جدول‌های مذکـور اسـت) ولی عملاً در ضد عفونی بذر در محیط مرطوب قادر به جلوگیری از تشکیل پرگنه بیماری روی بذور و گیاهچه نـبوده‌انـد. بعضـی جدایـه‌ها مانند F.80 با وجود ایجاد محدوده بازدارندگـی و سـرعت رشـد مناسـب فقـط در یـک مـرحله از آزمـایش در ضـد عفونـــی بـذور تأثیـر معنـی‌داری نسـبت بـه شـــاهـــد داشـــتـــه اسـت. در حـــالـی که جـدایه‌هـای F.64 و F.90(*T. virens*) ، F.42(*T. harzianum*) وB.84(*B.subtilis*) ضـمن سرعت رشد مناسب و بالا، ترشحات فرار آنها نیز دارای تأثیرات مناسبی در جلوگیری از رشد رویشی بیمارگر بوده و در ضـد عفونـی بـذر در محیـط مـرطوب و سـپس در خاک و در گلخانـه اثـرهای نسبتاً یکنواختی در کنترل بیماری داشته‌اند. سه گـونه آنتاگونیسـت نام‌برده عموماً به عنوان آنتاگونیست بسیاری از عـوامل بـیماری‌زا گـزارش شده‌اند(٢٢، ٢٥ و ١٤) و در ایران نیـز بـرای نخسـتین بـار بـه عـنوان آنتاگونیست‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج گزارش می‌گردند. ولی جدایهF.23 کـه در محـیط مـرطوب در جلوگیـری از تشکیل کلنی بیمارگر روی بـذور و گیاهچه در هر دو روش ضد عفونی بذر در گروه اول قـرار داشـت(جـدول٣) ولـی تأثیـر آن در شرایط خاک(در گلخانـه) کـاهش یافـته و بـه تـرتیب در رتـبه‌هـای ٦و ٧ قـرار گـرفت(جدول٣). البته انتظار بر این نیست که هر نتیجه‌ای که از بررسـی‌هـای آزمایشـگاهی بـه دست آمده است عیناً در شرایط گلخانـه یـا مـزرعه نیـز صـادق باشـد. این موضوع توسط سایر محققـان چنـین مطـرح شـده اسـت کـه صـفات زیادی از یک آنتاگونیسـت در موفقیت آن دخیل هستند و بیوکنترل نتیجه یک سری از رویدادهاست و غربال کردن ممکن است فقط در همان شـرایطی کـه انجـام شده است معتبر باشد. بنابراین تغییر در هر یـک از متغیرها مانند محیط کشت یا حرارت در آزمایشگاه و یا زمـان یـا مکـان ارزیابی مزرعه‌ای ممکن است به نتایج متفاوتی منجر شود(٨).

سپاسگزاری

بـدین وسـیله از مؤسسـه تحقـیقات بـرنج کشـور که هزینه‌های اجرایـی ایـن پـژوهش را تأمـین نمـوده است قدردانی و تشکر مـی‌نمایم. همکاری بی دریغ آقایان ابراهیم دودابی نژاد و حسن پورفرهنگ نیز شایسته تقدیر است. هم چنین از خانم پیشداد که تایـپ کامپیوتـری ایـن مقالـه را انجام داده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

١. ابراهیم نسبت، فیروز.١٣٤٣. پوسیدگی طوقه برنج. نشریه شماره٣، انستیتو بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران.
٢. ایـزدیار، منوچهـر. ا. پوپوشـوی، ف. پاداشـت و م. بهرامـی، ١٣٧٩. کنتـرل بیولوژیک بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در شمال ایران. خلاصه مقالات دومین همایش ملی استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی، کرج.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]

۳. پاداشت دهکایی، ف.، ق.ع. حجاورد، م. ایزدیار، ع. شریفی تهرانی و م. اخوت. ۱۳۷۲. مطالعه فرم جنسی و غیر جنسی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، رشت.

٤. پاداشت دهکایی، ف.، ع. شریفی تهرانی، ق.ع. حجاورد، م. ایزدیار و م. اخوت. ۱۳۷۵. بررسی اثر چند قارچ‌کش در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گیلان. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۲:۲٦۸-۲۷۷.

٥. پاداشت دهکایی، ف. و ق.ع. حجاورد.۱۳۷۷. چرخه زندگی بیماری پوسیدگی طوقه برنج ناشی از *Gibberella fujikuroi* در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج.

٦. پاداشت دهکایی، ف.، ش. منصوری، ا. پوپوشوی، م. ایزدیار و ب. قره‌یاضی.۱۳۸۰. انتخاب باکتری‌های آنتاگونیست قارچ *Pyricularia grisea* Sacc. از مزارع برنج. مجموعه مقالات دومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، ۱۷ تا ۱۹ شهریور، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج.

۷. یزدی صمدی، ب.، ع. ا. رضایی و م. ولی‌زاده. ۱۳۷٦. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران.

8. Andrews. J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Ann. Rev. Phytopathol. 30:603-635.
9. Baker. K. F., N. T. Flenje, C. M. Olsen and H. M. Stretton. 1967. Effects of antagonists on growth and survival of *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathol. 57:591-597.
10. Blakeman. J. P. and N. J. Fokkema. 1982. Petential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann. Rev. Phytopathol. 20:167-192.
11. Holt. J. G., P. H. A. Sneath, N. S. Mair and M. E. Sharp. 1984. Bergys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins Publishing Co, London.
12. IRRI (International Rice Research Institute). 1986. Biologocal control. Ann. Report for 1985. FRRI The Philippines. 144-146.
13. IRRI (International Rice Research Institute). 1987. Biological control. Ann. Report for1986. IRRI, The Philippines.
14. Lazzarctti, E. and W. Bettiol. 1997. Treatment of rice, bean, Wheat and soyabean with a product consisting of cells metabolites of *Bacillus subtilis*. Scientia Agricola 54:89-96.
15. Lindcman, J. and T. V. Suslow. 1987. Competition between ice nucleation-active wild type and ice nucleation-deficient deletion mutant strains of *Pseudomonas syringae and P.fluorescens* biovar I and biological control of frost injury on strawberry blossoms. Phytopathol. 77:882-886.
16. Ogwana, K. 1988. Damage by bakanae disease and its chemical control. Jpn. Pestic. Inf. 52:13-15.
17. Ou, S. H. 1985. Rice diseaes. 2nd ed. Commonwealth Mycol Inst., Kew, England, 380p.
18. Rojotte, E. G. 1993. From profitability to food safety and the environment: Shifiting the objectives of IPM. Plant Dis. 77:296-299.
19. Rosales, A. M., L. Thomashow, R. J. Cook and T. W. Mew. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas spp*. Phytopathol. 85:1028-1032.
20. Rosales, A. M. and T. W. Mew. 1997. Supperssion of *Fusarium moniliforme* in rice by associated antagonistic bacteria. Plant Dis. 81:49-51.
21. Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for indentification of Plant pathogenic bacteria. 2nd ed., APS Press.
22. Sy, A., A. Albertini and M. Moletti. 1994. Biological control of rice blast. pp:521-527. *In*: Zeigler, R. S., S. A. Leong and P. S. Teng. Rice Blast Disease. IRRI, The Philippines.
23. Wada, T., S. Kuzuma and M. Takinaka. 1990. Sensitivity of *Fusarium moniliforme* isolates to Pefurazoat. Ann. of the Phytopathol. Soc. of Jpn. 4:446-456.
24. Wood, R. K. S. 1951. The control of disesses of lettuce by use of antagonistic organisms, I: The control of *Botrytis cinerea* Pers. Ann. Appl. Biol. 38-203.
25. Yamada, S., Y. Takayama, M. Yomanaka, K. Ko and I. Yamaguchi. 1990. Biological activity of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis*. J. Pestic. Sci. 15:95-96.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-20]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1383.8.1.18.9]