DOI: http://dx.doi.org/10.22092/bcpp.2016.108152

کنترل بیولوژیک بیماری لکه قهوه‌ای برنج ناشی از *Bipolaris victoriae* با استفاده از جدایه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

محمدرضا صفری مطلق، صابر محمدیان

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

مسئول مکاتبات: محمدرضا صفری مطلق، پست الکترونیک: ssafarimotlagh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۴/۲۱ ۴ (۱) ۱۱-۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای برنج که توسط گونه‌های مختلفی از *Bipolaris* ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در ایران و جهان است. در این تحقیق، از مجموع ۲۲۰ نمونه آلوده جمع‌آوری شده از مزارع برنج استان گیلان، با استفاده از محیط‌های کشت سیب‌زمینی، دکستروز آگار و آب آگار، ۸۰ جدایه قارچی جداسازی شد. برای شناسایی این قارچ‌ها، خصوصیات مورفولوژیکی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت و قارچ‌های شناسایی شده به گونه‌های *Bipolaris victoriae* (۲۴ جدایه)، *Bipolaris oryzae* (۱۲ جدایه)، *Alternaria tenuissima* (۱۱ جدایه)، *Preussia* sp. (۸ جدایه)، *Fusarium verticillioides* (۶ جدایه)، *Alternaria infectoria* (۷ جدایه)، *Alternaria citri* (۹ جدایه)، *Trichoderma harzianum* (یک جدایه) و *Trichoderma virens* (۲ جدایه) تعلق داشتند. بیماری‌زایی تمامی جدایه‌های *Bipolaris victoriae* و *Bipolaris oryzae* به اثبات رسید و از بین جدایه‌های قارچی متعلق به جنس‌های قارچی دیگر ۲۰ جدایه که در برنج ایجاد بیماری نکرده یا قدرت بیماری‌زایی آن‌ها بسیار کم بود برای بررسی‌های مهار زیستی انتخاب شدند. در آزمایشگاه از روش‌های مختلفی مانند مطالعه بازدارندگی رشد *B. victoriae* با استفاده از عصاره‌ی کشت، کشت متقابل قارچ‌های آنتاگونیست مورد نظر و *B. victoriae* به‌روش کشت اسلاید و اثر متابولیت‌های فرار در بازدارندگی رشد این قارچ استفاده شد. *T. harzianum* به‌عنوان مؤثرترین جدایه در مهار رشد میسلیومی عامل بیماری در آزمایشگاه شناخته شد. در گلخانه همه‌ی جدایه‌ها به استثنای *A. tenuissima* و *F. verticillioides* شدت بیماری لکه قهوه‌ای را کاهش دادند که در این بین، جدایه‌ی *Preussia* sp. با کاهش شدت بیماری به میزان ۳۳/۴٪ مؤثرترین آنتاگونیست در بررسی‌های گلخانه‌ای تشخیص داده شد و در رتبه‌های بعدی به‌ترتیب جدایه‌های *T. harzianum*، *A. citri*، *A. infectoria* و *T. virens* از بیشترین کارایی در کنترل بیماری برخوردار بودند. تجزیه‌ی واریانس و مقایسه‌ی میانگین صفات به‌روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، تفاوت معنی‌دار قارچ‌های مورد مطالعه را از نظر کارایی در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای برنج اثبات کرد.

واژه‌های کلیدی: قارچ آنتاگونیست، برنج، مهار زیستی، *Bipolaris*، گلخانه

مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای برنج یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج است که گونه‌های مختلفی از *Bipolaris* به‌عنوان عامل آن معرفی شده‌اند که این گونه‌ها اکثرا به گندم، برنج، جو و سایر غلات حمله می‌کنند (Sivanesan, 1987). در ایران این بیماری علاوه بر مناطق برنج‌کاری گیلان، مازندران و گلستان از دیگر مناطق کاشت برنج از جمله لنجان اصفهان و شهرکرد نیز گزارش شده و گونه‌های مختلفی از *Bipolaris* به‌عنوان عامل بیماری معرفی شده‌اند که عبارتند از: *Bipolaris oryzae*، *B. sorgichola*، *B. victoriae*، *B. bicolor* و *B. indica* (Safari Motlagh & Kaviani, 2008). گونه‌ی *B. victoriae* با حدود ۸۵٪ از بیشترین فراوانی در بین گونه‌های قارچ مزبور در استان گیلان برخوردار بوده است (Safari Motlagh & Kaviani, 2008). میزان خسارت این بیماری در مزارع و به‌ویژه در خزانه برنج روی برخی ارقام هم‌چون نعمت، در مواردی تا ۹۰٪ برآورد شده است. علائم این بیماری به‌صورت لکه‌های گرد تا بیضوی،

Archive of SID

www.SID.ir

گاهی کشیده و به‌رنگ قهوه‌ای روی برگ، خوشه، گلوم و گلومل ظاهر می‌شود (Safari Motlagh *et al.*, 2005). در نهایت و در آلودگی شدید، در خزانه نشاها سوخته و در مزرعه، خوشه‌ها پوک و سیاه می‌شوند. درصورت آلوده شدن دانه‌ها، کیفیت و وزن آن‌ها کاهش می‌یابد؛ هم‌چنین بیماری میزان جوانه زدن ساقه اصلی را کاهش داده و از طویل‌شدن ریشه و ساقه جلوگیری می‌کند. این بیماری دارای گسترش جهانی بوده و از بیشتر کشورهای تولیدکننده‌ی برنج گزارش شده و زیان سالیانه آن از سال ۱۹۶۵ کمتر از ۰/۵٪ از مجموع تولیدات نبوده است. در فیلیپین ۵۸-۱۰٪ و در پورتوریکو و ویتنام ۱۵٪ از مرگ و میر نشاها و در بنگال وقوع قحطی در سال ۱۹۴۲ را به‌دلیل وجود این بیماری می‌دانند (Safari Motlagh *et al.*, 2005). بیماری لکه قهوه‌ای برنج از خزانه تا مزرعه در مزارع برنج ایران دیده می‌شود و باعث سوختگی نشاها و پوکی دانه‌ها شده و خسارت‌های فراوانی به مزارع برنج وارد می‌کند. با توجه به این‌که روش‌های موجود برای مقابله با این بیماری مانند روش شیمیایی، نارسایی‌هایی هم‌چون مشکلات زیست محیطی و تهدید سلامتی انسان دارد، به‌نظر می‌رسد باید به دنبال راه‌کار تازه‌ای از جمله یافتن قارچ‌های آنتاگونیست برای مقابله با این بیماری بود (Safari Motlagh, 2011). قارچ‌های آنتاگونیست از مهم‌ترین عواملی هستند که در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (McSpadden & Fravel, 2002).

نقش کیتیناز تولیدی به‌وسیله‌ی *Stenotrophomonas maltophilia* در کنترل بیولوژیک *Bipolaris sorokiniana* در گیاه *Festuca arundinacea* مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که این آنزیم می‌تواند در کنترل بیولوژیک *B. sorokiniana* مؤثر باشد (Zhang & Yuen, 2000).

در مطالعه‌ای درخصوص مکانیسم‌های آنتاگونیستی *T. harzianum* روی *Bipolaris oryzae* مشخص شد که متابولیت‌های ضد قارچی *T. harzianum*، رشد خطی *B. oryzae* را کاملا مهار کردند. اسپورپاشی سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* با غلظت 10^8 اسپور به‌طور قابل توجهی میزان شدت بیماری و شیوع بیماری را در برگ‌های گیاهان کاهش و محصول را افزایش داد (Abdel-fattah *et al.*, 2007).

در بررسی همبستگی بین سنجش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای برای مهار زیستی *B. sorokiniana* عامل ایجاد سوختگی در نشاهای گندم، از بین باکتری‌ها، سویه‌هایی از *Bacillus cereus* و *Stenotrophomonas maltophilia* و نیز همه گونه‌های تریکودرمای به‌کار رفته در آزمایش، توانایی کاهش رشد میسلیومی و کاهش شدت بیماری را از خود نشان دادند (Monaco *et al.*, 2008).

در یک ارزیابی دیگر کنترل بیولوژیک *Bipolaris oryzae* عامل ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای برنج در هند مورد مطالعه قرار گرفت و توانایی مهار زیستی قارچ‌هایی مانند *Aspergillus niger*، *A. fumigatus*، *A. flavus*، *A. sulphureus*، *A. terreus*، *Penicillium chrysogenum*، *P. janthinellum*، *Trichoderma viride* و *T. harzianum* در مقابل آن مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که همه‌ی این قارچ‌ها به‌طور مؤثری رشد قارچ *B. oryzae* را کاهش می‌دهند (Manimegalai *et al.*, 2011).

در مطالعه‌ای دیگر، کنترل بیولوژیک *Bipolaris spicifera* عامل ایجاد پوسیدگی ریشه‌ی گندم به‌وسیله‌ی جدایه‌هایی از *Pseudomonas fluorescens* مورد ارزیابی قرارگرفت و مشخص شد که جدایه‌ی S5 از بیشترین توانایی برای بازدارندگی رشد میسلیومی و تولید آنتی‌بیوتیک برخوردار است و در آزمایش‌های گلخانه‌ای جدایه‌ی K16 در کنترل بیماری مؤثرتر از جدایه‌های دیگر بود (Behdani *et al.*, 2012).

در یک بررسی دیگر مهار زیستی *B. oryzae* با استفاده از باکتری‌هایی مانند *Pseudomonas synxantha* و *Bacillus* sp. مورد مطالعه قرارگرفت و مشخص شد که شدت آلودگی در بذور آلوده برنج تیمار شده با باکتری‌های فوق کاهش یافته است (Moura *et al.*, 2014).

صالح‌پور و همکاران (Salehpour *et al.*, 2005) مهار زیستی *B. sorokiniana* عامل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی گندم

Archive of SID

www.SID.ir

با استفاده از جدایه‌هایی از تریکودرما را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که *T. viride* بیشتر از دیگر گونه‌های تریکودرما قادر به کاهش آلودگی در گیاه و نیز افزایش ارتفاع، وزن خشک و وزن تر در گیاهان تیمار شده است.

خلیلی و همکاران (Khalili *et al.*, 2012) تأثیر جدایه‌های بومی تریکودرمای جدا شده از مزارع برنج استان‌های گلستان و مازندران در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای برنج ایجاد شده به‌وسیله‌ی *B. oryzae* را مورد بررسی قرار دادند. دو جدایه‌ی متعلق به *T. harzianum* به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیماری را کنترل نموده و دوجدایه متعلق به *T. atroviride* رشد بوته‌های برنج را افزایش دادند.

در مطالعه‌ای دیگر، تأثیر برخی قارچ‌ها روی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در آزمایشگاه مورد بررسی قرارگرفت و در کشت دوتایی جدایه‌ی *Trichoderma harzianum* با ۵۲/۸۷٪ مؤثرترین جدایه در مهار رشد میسلیومی *Bipolaris* spp. تشخیص داده شد (Mohammadian, 2013).

هم‌چنین مهار زیستی *B. oryzae* با به‌کارگیری جدایه‌هایی از *Streptomyces* sp. در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌ی G فعالیت آنتاگونیستی بیشتری در مقابل قارچ عامل بیماری نشان می‌دهد (Soltani Nejad *et al.*, 2014).

هدف کلی این تحقیق پیدا کردن قارچ یا قارچ‌هایی در فلور طبیعی شالیزار بود که با استفاده از آن‌ها بتوان قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج را در شرایط گلخانه‌ای مهار کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

نمونه‌برداری از خزانه‌ها و مزارع آلوده و از نشا، برگ و خوشه‌ی برنج انجام گرفت. جداسازی قطعات آلوده از برگ و خوشه انجام شد، بدین معنی که پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در برگ و نیز بذرهای آلوده در خوشه، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ و شستشو با آب مقطر انجام شد و پس از آبگیری، قطعات به‌ترتیب روی محیط‌های کشت مختلفی شامل PDA و WA، برای جداسازی و رشد پرگنه قارچ، خالص‌سازی و تک‌اسپور کردن و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی قرار داده شدند (Safari Motlagh *et al.*, 2005). برای نگهداری جدایه‌های قارچی، از روش کاغذ صافی سترون استفاده شد (Safari Motlagh *et al.*, 2005). پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها، خصوصیات ماکروسکوپی آن‌ها همچون شکل و رنگ پرگنه و نحوه‌ی رشد روی محیط PDA مورد بررسی قرار گرفت. سپس خصوصیات میکروسکوپی آن‌ها با تهیه‌ی اسلایدهای میکروسکوپی و استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر بررسی شد (Ellis, 1971؛ Sivanesan, 1987؛ Simmons & Roberts, 1993؛ Arenal *et al.*, 2007؛ Leslie & Summerell, 2006؛ Gams & Bissett, 1998).

آزمایش بیماری‌زایی

اثبات بیماری‌زایی قارچ‌های جدا شده در محیط دسیکاتور که شرایط کاملا قابل کنترل داشت انجام گرفت. برای این منظور مقداری خاک مزرعه در ظروف ارلن مایر ریخته و در دستگاه اتوکلاو سترون شد (۲ بار، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه) و سپس مقداری از این خاک به تشتک‌های پتری سترون انتقال داده شد. به‌دنبال آن مقداری بذر رقم هاشمی به‌مدت یک ساعت در کلراکس ۳۰٪ ضدعفونی شد و تعداد ۱۰ عدد بذر در داخل هر تشتک پتری در میان خاک سترون قرارگرفت. این عمل در دو دسیکاتور، یکی به‌عنوان تیمار و دیگری به‌عنوان شاهد انجام شد که در هر دسیکاتور از دو تشتک پتری استفاده شد. به هر تشتک پتری مقداری آب مقطر سترون اضافه شد، به‌طوری‌که در تمام مدت آزمایش تقریبا حالت غرقاب داشتند. پس از ۱۸-۱۶ روز که نشاهای داخل تشتک‌های پتری به مرحله‌ی دوبرگی رسیدند، مایه‌زنی اسپورها روی آن‌ها صورت‌گرفت. بدین‌ترتیب که ابتدا روی همه نشاها در دسیکاتورهای شاهد و تیمار، به‌وسیله‌ی افشانه‌های کوچک دستی، آب مقطر سترون پاشیده شد (تمام عملیات مزبور زیر هود سترون انجام گرفت) سپس سوسپانسیون اسپور لازم برای تلقیح فراهم شد (Safari Motlagh *et al.*, 2005). در تمامی آزمایش‌ها از

Archive of SID

www.SID.ir

سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون استفاده شد که برای شمارش آن‌ها لام گلبول شمار به‌کار رفت. علاوه بر آن برای افزایش جذب سطحی از توئین ۲۰ استفاده شد که به نسبت ۱٪ به کار رفت. لازم به ذکر است که دسیکاتورها در طول آزمایش در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت بیش از ۹۰ درصد (رطوبت اشباع) و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشتند (Safari Motlagh *et al.*, 2005).

بررسی جنبه‌های کنترل بیولوژیک

مطالعه‌ی بازدارندگی رشد *Bipolaris victoriae* با استفاده از عصاره‌ی کشت

برای انجام این آزمایش از روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster, 1971a) استفاده شد. برای این منظور در داخل ظرف‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت Potato dextrose broth (PDB)، جدایه‌هایی از قارچ‌های مورد آزمایش کشت داده شدند و به‌مدت ۱۰ روز روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. سپس با استفاده از صافی‌های بیولوژیکی و پمپ خلاء، عصاره‌گیری انجام شد. سپس این عصاره (به نسبت ۲۵ درصد) به محیط کشت PDA اضافه شد. در تشتک‌های پتری شاهد، عصاره‌ای که به‌محیط کشت PDA اضافه شده بود، فاقد هرگونه قارچی بود. یک دیسک میسلیومی از کشت سه روزه *B. victoriae* در مرکز تشتک‌های پتری تیمار و شاهد قرارگرفت. پس از ۱۰ روز قرارگیری در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس، رشد شعاعی *B. victoriae* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری شد. کاهش رشد شعاعی براساس فرمول $\text{درصد مهار رشد میسلیومی} = \frac{C-T}{C} \times 100$ محاسبه شد که در این فرمول، C میزان رشد شعاعی *B. victoriae* در تشتک‌های پتری شاهد و T رشد شعاعی *B. victoriae* در حضور قارچ‌های دیگر بود (Sivakumar *et al.*, 2000).

مطالعه کشت متقابل قارچ‌های آنتاگونیست مورد نظر و *B. victoriae* به‌روش کشت اسلاید

برای انجام این آزمایش از روش سیواکومار و همکاران (Sivakumar *et al.*, 2000) استفاده شد. یک لام آزمایشگاهی (اسلاید) تمیز روی دو میله شیشه‌ای L شکل در درون یک تشتک پتری ۱۲ سانتی‌متری قرار داده و سترون شد. سپس مقداری از محیط کشت آب آگار ۲٪ مذاب روی اسلاید ریخته شد تا یک لایه نازک آگار روی آن تشکیل شود. دیسک‌های میسلیومی کوچکی از قارچ آنتاگونیست مورد نظر و *B. victoriae* در فاصله‌ی ۲ سانتی‌متری از یکدیگر روی اسلاید قرار داده شدند. برای جلوگیری از خشک شدن آن چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک پتری اضافه شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۷ روز اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفتند و ویژگی‌هایی هم‌چون رسیدن ریسه‌های قارچی به یکدیگر و تأثیر متقابل آن‌ها روی یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت.

مطالعه اثر متابولیت‌های فرار در بازدارندگی رشد *B. victoriae*

یک دیسک میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی کشت سه روزه *B. victoriae* در مرکز یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت دیسکی به قطر پنج میلی‌متر از کشت سه روزه قارچ‌های مورد آزمایش در مرکز یک تشتک پتری دیگر حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس درپوش‌های این تشتک‌های پتری در زیر هود استریل برداشته شده و تشتک حاوی *B. victoriae* به‌صورت وارونه روی تشتک پتری قارچ‌های مورد آزمایش قرار داده شد. در شاهد، دیسکی از محیط کشت PDA جایگزین قارچ‌های مورد آزمایش شد. درصد بازدارندگی پس از ۱۰ روز محاسبه گردید (Dennis & Webster, 1971b، Sivakumar *et al.*, 2000).

بررسی‌های گلخانه‌ای

بذور رقم هاشمی به مدت یک ساعت در کلراکس ۳۰٪ ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون شست و شو داده شد. ۶۳ عدد گلدان پلاستیکی با دهانه ۱۱ سانتی‌متری، با خاک مزرعه برنج پر شد. تعداد ۱۰ عدد بذر داخل

Archive of SID

www.SID.ir

هرگلدان کاشته شد و گلدان‌ها آبیاری شدند و داخل گلخانه‌ی موسسه تحقیقات برنج کشور قرار داده شدند. دمای گلخانه در زمان رشد و نمو گیاهچه‌ها بین ۳۰-۲۵ درجه‌ی سلسیوس در روز و ۲۰-۱۷ درجه در شب و رطوبت نسبی بین ۱۰۰-۸۰٪ در نوسان بود (Safari Motlagh *et al.*, 2005). گیاهچه‌ها از زمان کاشت تا مرحله‌ی چهار برگی در این شرایط و در معرض نور خورشید در داخل گلخانه نگه‌داری شدند. در این مدت آبیاری به‌صورت معمول انجام می‌شد، به‌طوری که گلدان‌ها به‌طور دائم حالت غرقابی داشتند. زمانی که نشاها به مرحله‌ی چهار برگی رسیدند مایه‌زنی قارچ‌ها روی آن‌ها صورت گرفت. از آن‌جایی که گونه غالب عامل بیماری لکه قهوه‌ای در این مطالعه، *Bipolaris victoriae* بود در مطالعات کنترل بیولوژیک از این گونه و جدایه Bi-309 استفاده شد. برای این منظور ابتدا روی همه‌ی گیاهان به‌وسیله‌ی افشانه‌های دستی، آب مقطر سترون پاشیده شد، سپس سوسپانسیون اسپور لازم برای تلقیح فراهم و روی گیاهان پاشیده شد. برای تهیه‌ی سوسپانسیون از مجموع اسپور و میسلیوم به‌عنوان مایه‌ی تلقیح استفاده شد. برای شمارش اسپور و میسلیوم‌ها، لام گلبول‌شمار و برای مایه‌زنی سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۴} (اسپور+ میسلیوم) در لیتر آب مقطر سترون برای *B. victoriae*، $۱۰^{۸}$ اسپور برای گونه‌های تریکودرما و $۱۰^{۵}$ اسپور برای دیگر قارچ‌های مورد بررسی در این آزمایش، مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر آن برای افزایش جذب سطحی، توئین ۲۰ به نسبت ۱٪ به‌کار رفت (Safari Motlagh *et al.*, 2005).

آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. به ازای هر قارچ یک مجموعه گلدان در نظر گرفته شد. در هر مجموعه یک سری گیاهان شاهد وجود داشت که فقط با آب مقطر مایه‌زنی شدند. سری دیگر شامل گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با *B. victoriae* بود و یک‌سری گیاهان مایه‌زنی شده با *B. victoriae* و قارچ مورد نظر نیز در نظر گرفته شد. قبل از شروع اسپورپاشی، گیاهچه‌های هر قسمت به‌وسیله‌ی پلاستیک‌های شفاف از بقیه‌ی گلدان‌ها مجزا شدند. بعد از اسپورپاشی نیز روی گلدان‌ها به‌وسیله‌ی کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شد و با گونی‌های کنفی که به‌طور مداوم به‌وسیله‌ی شیلنگ متصل به شیر آب خیس می‌شدند، رطوبت نسبی بالاتر از ۹۵٪ نگه‌داشته شد. بعد از مایه‌زنی، رطوبت نسبی حدود ۱۰۰- ۹۵٪ و میزان حرارت در روز ۳۰-۲۸ درجه‌ی سلسیوس و در شب ۲۲-۲۰ درجه نوسان داشت. دمای مورد نیاز توسط دستگاه‌های حرارتی تنظیم و تعدیل شد. تغییرات ایجاد شده روی گیاهان به‌صورت روزانه به‌مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. علائم پس از ۱۰ روز بررسی و بیمارگرهای جدا شده در این مرحله با بیمارگر اولیه مطابقت داده شد. پس از تأیید، از مقیاس هورسفال- بارت (Horsfall & Barrett, 1945)، برای اندازه‌گیری شدت بیماری استفاده شد. اساس اندازه‌گیری مبتنی بر مشاهدات بصری علائم ایجاد شده بود و توصیف علائم و درجه‌بندی بدین‌ترتیب انجام گرفت: درجه ۱: برگ سالم بود و هیچ لکه‌ای وجود نداشت؛ درجه ۲: تعداد لکه‌ها ۱۰-۱؛ درجه ۳: تعداد لکه‌ها ۲۵-۱۰، لکه‌ها بسیار ریز و توسعه نیافته و برگ بسیار مقاوم؛ درجه ۴: تعداد لکه‌ها ۴۰-۲۵، لکه‌ها تا حدودی توسعه یافته و برگ مقاوم؛ درجه ۵: تعداد لکه‌ها ۶۰-۴۰، لکه‌ها متوسط و توسعه‌یافته و برگ با مقاومت متوسط؛ درجه ۶: تعداد لکه‌ها ۸۰-۶۰، لکه‌ها متوسط و توسعه-یافته، برگ با مقاومت کم و دارای سوختگی‌های جزئی؛ درجه ۷: تعداد لکه‌ها ۱۰۰-۸۰، لکه‌ها متوسط تا بزرگ و توسعه‌یافته، برگ حساس و دارای سوختگی‌های جزئی و گاهی سوختگی‌های وسیع؛ درجه ۸: تعداد لکه‌ها ۱۵۰-۱۰۰، لکه‌ها بزرگ و توسعه یافته، برگ بسیار حساس و دارای سوختگی-های جزئی فراوان و گاهی سوختگی‌های وسیع؛ درجه ۹: تعداد لکه‌ها ۲۰۰-۱۵۰، برگ‌ها دارای ضایعه‌ها و سوختگی‌های وسیع و فراوان و درجه ۱۰: برگ کاملا سوخته و مرده (Horsfall & Barrett, 1945). سپس

Archive of SID

www.SID.ir

شدت (درجه) بیماری با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$$\text{درجه بیماری (Disease rating)} = \frac{[(N_1 \times 1)+(N_2 \times 2)+\cdots(N_t \times t)]}{N_1+N_2+\cdots N_t}$$

که N در این‌جا، برگ در هر درجه از بیماری است (Bertrand & Gottwald, 1997).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با هفت تیمار و سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه‌ی میانگین صفات به‌روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و رسم نمودارها به‌کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

پس از شناسایی مقدماتی همه‌ی جدایه‌های قارچی به‌دست آمده در سطح جنس، تعداد ۲۰ جدایه قارچی برای بررسی بیماری‌زایی و مطالعه کنترل بیولوژیک در گلخانه انتخاب شد و مورد ارزیابی بیشتر و شناسایی در سطح گونه قرارگرفت. براین اساس گروه‌های قارچی شناسایی شده عبارت بودند از:

Bipolaris victoriae (F. Meehan & H.C. Murphy) Shoemaker (با ۳۰٪ فراوانی) و *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker (با ۱۵٪ فراوانی)، *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire (با ۱۳/۷۵٪ فراوانی)، *Alternaria citri* (Penz.) Mussat (با ۱۰٪ فراوانی)، *Alternaria infectoria* Simmons (با ۷/۵٪ فراوانی)، *Preussia* sp. Arenal (با ۸/۷۵٪ فراوانی)، *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (با ۱۱/۲۵٪ فراوانی)، *Trichoderma harzianum* Rifai (با ۱/۲۵٪ فراوانی) و *Trichoderma virens*(Miller, Giddens & Foster) von Arx (با ۲/۵٪ فراوانی).

بررسی بیماری‌زایی و کنترل بیولوژیک

همه‌ی جدایه‌های قارچی پس از شناسایی مقدماتی در حد جنس، برای مطالعه بیماری‌زایی مورد استفاده قرارگرفتند و بیماری‌زایی همه‌ی جدایه‌های *Bipolaris* spp. در گیاه برنج اثبات شد. از میان جدایه‌های قارچی که مربوط به قارچ‌های دیگر به‌جز *Bipolaris* بودند، ۲۰ جدایه که بیماری‌زا نبودند یا شدت بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها روی برنج، بسیار ناچیز بود برای مطالعات کنترل بیولوژیک انتخاب شدند.

ارزیابی بازدارندگی رشد *B. victoriae* با استفاده از عصاره‌ی کشت

براساس این روش آزمایشگاهی مشخص شد که *T. harzianum* با ۶۶/۸۸٪ بیشترین بازدارندگی در رشد پرگنه *B. victoriae* را نشان می‌دهد. پس از این قارچ به‌ترتیب جدایه‌های *T. virens*، *A. tenuissima*، *Preussia* sp.، *F. verticillioides*، *A. infectoria* و *A. citri* در رتبه‌های بعدی کارایی در کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه‌ی میانگین‌های بازدارندگی رشد به‌روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در روش عصاره‌ی کشت.

Table 1. Comparison of means of growth inhibition by Least Significant Difference (LSD) in culture filtrate method.

Fungal isolates	Growth inhibition (mm)
F. verticillioides	43.52 bc
A. tenuissima	51.67 b
T. harzianum	66.88 a
T. virens	65.53 a
A. citri	41.54 c
A. infectoria	43.33 bc
Preussia sp.	47.31 bc
LSD 5%	9.441

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P=0.05.

براساس جدول تجزیه‌ی واریانس بازدارندگی رشد در این روش، در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری بین قارچ‌های مورد آزمایش وجود داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین‌های بازدارندگی رشد به‌روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، نتایج زیر حاصل شد:

Archive of SID

www.SID.ir

بیش‌ترین میزان بازدارندگی رشد در هنگام استفاده از *T. harzianum* و *T. virens* به‌دست آمد. بین این قارچ‌ها و تیمارهای *F. verticillioides*، *A. tenuissima*، *A. citri*، *A. infectoria* و *Preussia* sp. اختلاف معنی‌داری وجود داشت و کمترین بازدارندگی رشد نیز مربوط به کنترل با استفاده از *A. citri* بود که با تیمارهای *F. verticillioides*، *A. infectoria* و *Preussia* sp. اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱). بنابراین کنترل بیماری لکه قهوه‌ای برنج با استفاده از دو قارچ *T. harzianum* و *T. virens* بهترین نتایج را در برداشت و در مقایسه با سایر قارچ‌ها این دو قارچ کارایی بهتری داشتند.

ارزیابی کشت متقابل قارچ‌های آنتاگونیست مورد نظر و *B. victoriae* به‌روش کشت اسلاید

ریسه‌های گونه‌های تریکودرمای مورد استفاده در این آزمایش پیچشی در اطراف ریسه‌های قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج نداشتند و قادر به نفوذ به ریسه‌های آن نشدند. ریسه‌های جدایه‌های *Preussia* sp. و *F. verticillioides* به ریسه‌های *B. victoriae* نفوذ کرده اما قادر به تغییرشکل در ریسه‌های آن نشدند. ریسه‌های هر سه گونه *Alternaria* به‌کار رفته در این آزمایش، پس از رسیدن به ریسه‌های *B. victoriae* و نفوذ در آن‌ها، باعث ازهم‌گسیختگی ریسه‌های قارچ و تغییرشکل آن‌ها شدند.

ارزیابی اثر متابولیت‌های فرار در بازدارندگی رشد *B. victoriae*

براساس نتایج، *T. harzianum* با ۸۳/۲۵٪ بیشترین بازدارندگی در رشد میسلیومی *B. victoriae* را نشان داد. پس از این قارچ به‌ترتیب جدایه‌های *T. virens*، *A. tenuissima*، *A. infectoria*، *A. citri*، *Preussia* sp. و *F. verticillioides*، از نظر کاهش رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۲).

لازم به ذکر است که قطر پرگنه *B. victoriae* در تشتک‌های پتری شاهد در روش‌های آزمایشگاهی به‌کار رفته، ۷۸ میلی‌متر بود.

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین‌های بازدارندگی رشد به‌روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در روش متابولیت‌های فرار.

Table 2. Comparison of means of growth inhibition by Least Significant Difference (LSD) in volatile metabolites method.

Fungal isolates	Growth inhibition (mm)
F. verticillioides	42.78 e
A. tenuissima	61.23 c
T. harzianum	83.25 a
T. virens	76.53. b
A. citri	50.23 d
A. infectoria	53.91 d
Preussia sp.	45.29 e
LSD 5%	4.580

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P=0.05.

مقایسه‌ی میانگین رشد پرگنه *B. victoriae* در دو روش استفاده از عصاره‌های کشت و متابولیت‌های فرار نشان داد که همه‌ی جدایه‌های قارچی به‌کار رفته در این تحقیق به استثنای *Preussia* sp. و *F. verticillioides* در روش استفاده از متابولیت‌های فرار، توانایی بیشتری در کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری لکه‌قهوه‌ای برنج نشان دادند اما دو جدایه‌ی فوق در روش استفاده از عصاره‌های کشت کارایی بالاتری در بازدارندگی رشد میسلیومی *B. victoriae* بروز دادند (جدول ۳).

بررسی‌های گلخانه‌ای

در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *Alternaria tenuissima* (جدایه 85S) در مقابل *Bipolaris victoriae*، در گیاهان شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. در بوته‌های برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت نقاط سرسنجاقی ظاهر شدند که در روزهای بعد این نقاط به‌تدریج گسترش یافته و به‌صورت لکه‌های نکروتیک بیضوی شکل با هاله زردرنگ، درآمدند که ممکن بود به یکدیگر بپیوندند. در برخی موارد لکه‌های قهوه‌ای تیره یا قهوه‌ای متمایل به سیاه نیز

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده‌شد. در این گیاهان میانگین شدت بیماری ۵/۸۴ بود، یعنی به‌طور میانگین ۶۰-۴۰ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *Alternaria tenuissima* همراه با هم مایه‌زنی شده‌بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای همراه با لکه‌های سفید ظاهر شد. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای گسترش یافته و به‌صورت لکه‌های نکروتیک بیضوی شکل درآمدند که به‌هم پیوسته و در برگ‌ها ایجاد سوختگی‌های جزئی و گاهی سوختگی‌های وسیع نمودند؛ همچنین لکه‌های سفید نیز توسعه یافتند. در این تیمارها میانگین شدت بیماری ۷/۰۵ بود یعنی روی هر برگ به‌طور متوسط ۱۰۰-۸۰ لکه وجود داشت. باتوجه به نتایج بالا مشخص شد که استفاده از این قارچ نه تنها تأثیری در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای نداشت بلکه باعث افزایش شدت بیماری به‌میزان ۲۰/۷۲٪ نسبت به شاهدهای بیماری نیز شده است.

جدول ۳- مقایسه‌ی میانگین‌های رشد پرگنه *B. victoriae* در دو روش تأثیر عصاره‌های کشت و متابولیت‌های فرار جدایه‌های قارچی.

Table 3. Comparison of means of colonial growth of *B. victoriae* in two methods of culture filtrates and volatile metabolites effects of fungal isolates.

Fungal isolates	Culture filtrates (mm)	Volatile metabolites (mm)
T. harzianum	26	13
T. virens	27	18
A. tenuissima	37.5	30
A. infectoria	44	36
A. citri	45.5	39
Preussia sp.	41	43
F. verticillioides	43.5	45

در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *Alternaria citri* (جدایه 19F) در مقابل *Bipolaris victoriae*، بروز علائم در گیاهان شاهد و در گیاهان برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند مشابه حالت قبل بود. در این گیاهان، میانگین شدت بیماری۵/۸۲ بود، یعنی به‌طور میانگین ۶۰-۴۰ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *Alternaria citri* همراه با هم مایه‌زنی شده‌بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای، عموماً در نوک برگ‌ها ظاهر شد. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای گسترش یافته و به‌صورت لکه‌های نکروتیک بیضوی‌شکل درآمدند که به‌هم پیوستند و تا حدودی توسعه یافتند. در این تیمارها میانگین شدت بیماری ۴/۴۹ بود یعنی روی هر برگ به طور متوسط ۴۰-۲۵ لکه وجود داشت که نشان‌دهنده این بود که استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری به‌میزان ۲۲/۸۵٪ نسبت به گیاهان شاهد شده است.

در بررسی خواص آنتاگونیستی *Alternaria infectoria* (جدایه S-1-1-36) در مقابل *Bipolaris victoriae*، بروز علائم در گیاهان شاهد و در بوته‌های برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند مشابه حالت قبل بود. در این گیاهان، میانگین شدت بیماری ۵/۰۳ بود، یعنی به‌طور میانگین ۶۰-۴۰ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با هر دو قارچ فوق مایه‌زنی شده بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای و نیز لکه‌های سفید ظاهر شد. میزان این لکه‌های سفید بسیار کم بود. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای اندکی گسترش یافتند اما لکه‌های سفید گسترش چندانی نیافتند. در این تیمارها میانگین شدت بیماری ۴/۰۲ بود یعنی روی هر برگ به‌طور متوسط ۴۰-۲۵ لکه وجود داشت که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای به‌میزان ۲۰/۰۸٪ نسبت به گیاهان شاهد شده است.

در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *Fusarium verticillioides* (جدایه F-2-1-84) در مقابل *Bipolaris victoriae*، علائم در گیاهان شاهد و گیاهان برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند مشابه حالت قبل بود. در این گیاهان، میانگین شدت بیماری ۴/۶۶ بود، یعنی به‌طور میانگین ۴۰-۲۵ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با هر دو قارچ فوق مایه‌زنی شده بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای و نیز تعدادی از لکه‌های سفید ظاهر شد که در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای گسترش یافته و به‌صورت لکه‌های نکروتیک بیضوی‌شکل درآمدند. لکه‌های سفید نیز گسترش یافته و تعدادشان افزایش یافت. در این تیمارها میانگین

Archive of SID

www.SID.ir

شدت بیماری ۵/۴۸ بود یعنی روی هر برگ به‌طور متوسط ۶۰-۴۵ لکه وجود داشت که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ نه‌تنها تأثیری در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای نداشته بلکه باعث افزایش شدت بیماری به‌میزان ۱۷/۶۰٪ نسبت‌به گیاهان شاهد نیز شده است.

در مطالعه خواص آنتاگونیستی *Preussia* sp. (جدایه F-73) در مقابل *Bipolaris victoriae*، بروز علائم در گیاهان شاهد و در بوته‌های برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند مشابه حالت قبل بود. در این گیاهان، میانگین شدت بیماری ۵/۳۳ بود، یعنی به‌طور میانگین ۶۰-۴۰ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *Preussia* sp. همراه با هم مایه‌زنی شده بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت لکه‌های سفید و نیز نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای در نوک، وسط برگ‌ها و نزدیک دمبرگ ظاهر شد که میزان این لکه‌های قهوه‌ای به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به لکه‌های قهوه‌ای ایجاد شده در تیمارهایی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند کمتر بود. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای و نیز لکه‌های سفید گسترش چندانی پیدا نکردند. در این تیمارها میانگین شدت بیماری ۳/۵۰ بود یعنی روی هر برگ به‌طور متوسط ۲۵-۱۰ لکه وجود داشت که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری ایجادشده به‌وسیله‌ی *B. victoriae* به‌میزان ۳۳/۴٪ نسبت به گیاهان شاهد شده است.

در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *Trichoderma harzianum* (جدایه F-2-1-1) در مقابل *Bipolaris victoriae*، بروز علائم در گیاهان شاهد و در گیاهان برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند مشابه حالت قبل بود. در این گیاهان، میانگین شدت بیماری ۵/۵۶ بود، یعنی به‌طور میانگین ۶۰-۴۰ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با هر دو قارچ فوق مایه‌زنی شده بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت لکه‌های سفید و نیز نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای ظاهر شد که میزان این لکه‌های قهوه‌ای به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به لکه‌های قهوه‌ای ایجاد شده در تیمارهایی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند کمتر بود. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای و لکه‌های سفید گسترش چندانی پیدا نکردند. در این تیمارها میانگین شدت بیماری ۴/۲۸ بود که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری ایجادشده به‌وسیله‌ی *B. victoriae* به‌میزان ۲۳/۰۲٪ نسبت به گیاهان شاهد شده است.

در بررسی خواص آنتاگونیستی *Trichoderma virens* (جدایه S-4-1-62) در مقابل *Bipolaris victoriae*، بروز علائم در گیاهان شاهد و در گیاهان برنجی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند مشابه حالت قبل بود. در این گیاهان، میانگین شدت بیماری ۴/۸۸ بود، یعنی به‌طور میانگین ۴۰-۲۵ لکه روی هر برگ وجود داشت. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *Trichoderma virens* همراه با هم مایه‌زنی شده‌بودند، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت لکه‌های سفید و نیز نقاط سرسنجاقی قهوه‌ای ظاهر شد که میزان این لکه‌های قهوه‌ای به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به لکه‌های قهوه‌ای ایجادشده در تیمارهایی که با *B. victoriae* مایه‌زنی شده بودند، کمتر بود. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای گسترش زیادی نیافته اما لکه‌های سفید توسعه یافتند. در این تیمارها میانگین شدت بیماری ۴/۶۳ بود یعنی روی هر برگ به‌طور متوسط ۴۰-۲۵ لکه وجود داشت که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای به‌میزان ۵/۱۲٪ نسبت به گیاهان شاهد شده است.

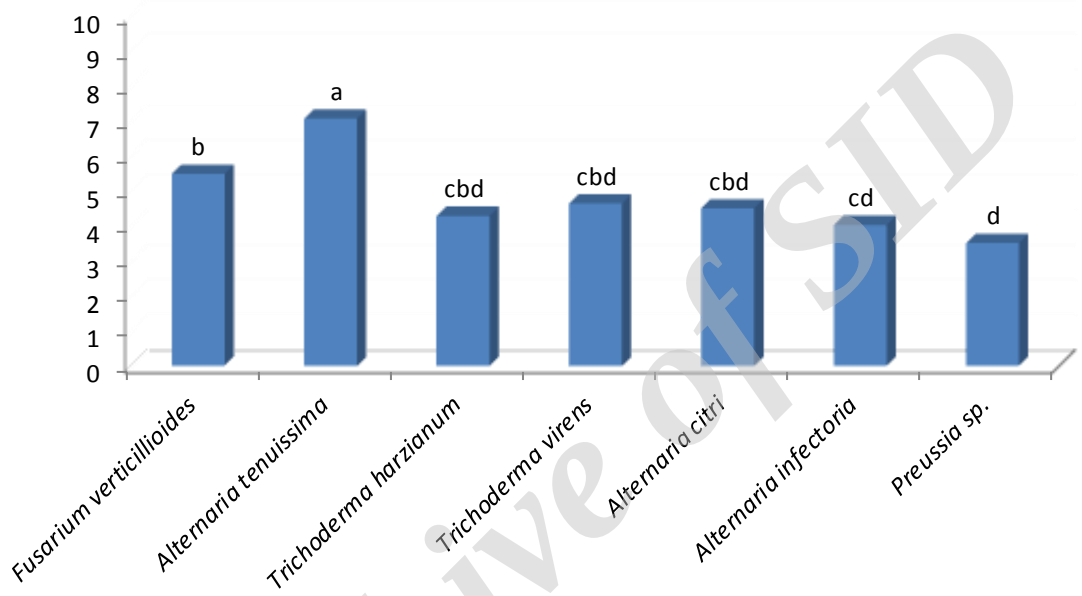
با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های گلخانه‌ای، همه جدایه‌ها به استثنای *F. verticillioides* و *A. tenuissima* قادر به کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای بودند که قارچ *Preussia* sp. با کاهش میانگین شدت بیماری لکه قهوه‌ای برنج به ۳/۵ (۳۳/۴۰٪ کاهش در میانگین شدت بیماری)، مؤثرترین جدایه در کنترل بیماری شناخته شد. بعد از این جدایه، به‌ترتیب جدایه‌های *T. harzianum*، *A. citri*، *A. infectoria* و *T. virens* در رتبه‌های بعدی سودمندی در کاهش میانگین شدت بیماری لکه قهوه‌ای قرار گرفتند (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

براساس تجزیه‌ی واریانس شدت بیماری، در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایش وجود داشت. براساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین شدت بیماری به‌روش حداکثر اختلاف معنی‌دار (LSD) نتایج زیر بدست آمد:

کمترین شدت بیماری ایجاد شده مربوط به کنترل با *Preussia* sp. بود که با تیمارهای *Fusarium verticillioides* و *Alternaria tenuissima* اختلاف معنی‌داری داشت و بیشترین شدت بیماری ایجاد شده مربوط به کنترل با استفاده از *Alternaria tenuissima* بود که با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. بین تیمارهای بعدی یعنی کنترل با قارچ‌های *T. harzianum*، *T. virens* و *A. citri*، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین استفاده از *Preussia* sp. بهترین نتایج را در کنترل قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج داشت و در مقایسه با سایر قارچ‌ها کارایی آن بهتر بود (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین شدت بیماری با به‌کارگیری قارچ‌های مختلف.

Fig. 1. Comparison of mean disease rating by using different fungi.

بحث

در پژوهش حاضر قارچ‌های *Bipolaris* spp.، *Fusarium* spp.، *Nigrospora* spp.، *Alternaria* spp.، *Trichoderma* spp. و *Preussia* sp. از بوته‌های برنج بیمار، جمع‌آوری‌شده از مزارع برنج استان گیلان، جدا شد. برای آزمایش‌های کنترل بیولوژیک قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج، از گونه *B. victoriae* که گونه غالب عامل بیماری در استان گیلان بود، استفاده شد. از میان جدایه‌های قارچی به‌کار رفته درآزمایش بیماری‌زایی، هفت جدایه از *Fusarium verticillioides*، *Alternaria tenuissima*، *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma virens*، *Alternaria citri*، *Alternaria infectoria* و *Preussia* sp.، که شدت بیماری آنها روی برنج کم بود یا بیماری‌زا نبودند برای مطالعات آنتاگونیستی مورد استفاده قرار گرفتند.

مؤثرترین قارچ‌های به‌کار رفته در روش‌های آزمایشگاهی *T. harzianum* و *T. virens* بودند که البته در روش تأثیر متابولیت‌های فرار سودمندی بیشتری از خود نشان دادند و پس از این دو جدایه، *A. tenuissima*، قرار داشت، اما کارایی جدایه‌های دیگر در روش‌های مختلف متفاوت بود، به‌طوری که *A. infectoria* و *A. citri*، در روش متابولیت‌های فرار کارایی بیشتری نشان دادند.

Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط گلخانه‌ای مؤثرترین جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای به‌ترتیب *Preussia* sp. و *T. harzianum* بودند. با مقایسه کارایی جدایه‌های قارچی به‌کار رفته در مهار زیستی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در آزمایشگاه و گلخانه *T. harzianum* که در روش‌های آزمایشگاهی مؤثرترین آنتاگونیست و در بررسی‌های گلخانه‌ای دومین جدایه مؤثر در کاهش شدت بیماری بود، می‌تواند به‌عنوان مؤثرترین عامل بیوکنترل علیه این قارچ بیماری‌زا شناخته شود که این یافته با تحقیق محمدیان (Mohammadian, 2013)، مطابقت داشت.

جدایه قارچی *Preussia* sp. در شرایط گلخانه‌ای به‌میزان قابل توجهی قادر به کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای شد. تأثیر این آنتاگونیست در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای حتی از تأثیر بیوکنترلی *T. harzianum* نیز بیشتر بود و این امر می‌تواند نویدبخش ظهور عوامل جدید بیوکنترل بیماری‌های گیاهی باشد. در این تحقیق، قارچ *Preussia* sp. با کاهش شدت بیماری به میزان ۳۳/۴٪ مؤثرترین جدایه در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گلخانه بود و این در حالی بود که این قارچ در شرایط آزمایشگاهی در روش‌های استفاده از عصاره کشت و متابولیت‌های فرار، به‌ترتیب در رتبه‌های چهارم و ششم در کاهش رشد میسلیومی *B. victoriae* قرار گرفته بود.

قارچ‌های دیگری که در شرایط گلخانه‌ای تأثیر قابل توجهی در کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای داشتند جدایه‌های *T. harzianum* با کاهش شدت بیماری به‌میزان ۲۳/۰۲٪ و *A. citri* با کاهش شدت بیماری به‌میزان ۲۲/۸۵٪ بودند. جدایه *T. harzianum* که در بررسی‌های آزمایشگاهی به‌میزان قابل توجهی رشد میسلیومی قارچ بیماری‌زا را مهار کرده بود در شرایط گلخانه‌ای نیز به‌خوبی شدت بیماری لکه قهوه‌ای برنج را کاهش داد و این امر با یافته‌های خلیلی و همکاران (Khalili *et al.*, 2012) که فعالیت آنتاگونیستی *T. harzianum* علیه *B. oryzae* را در آزمایشگاه و گلخانه اثبات نمودند و بررسی (Manimegalai *et al.*, 2011) که توانایی زیاد جدایه‌های *T. harzianum* در کنترل *B. oryzae* را نشان دادند، و نیز مطالعه محمدیان (Mohammadian, 2013) که کارایی بالای این قارچ در کشت دوتایی را ذکر نمود، مطابقت داشت.

جدایه‌ی *T. virens* در بررسی‌های آزمایشگاهی در رتبه دوم سودمندی در بازدارندگی رشد میسلیومی قرار گرفته بود و این یافته با مطالعه محمدیان Mohammadian, (2013)، مطابقت داشت که براساس تحقیق او *T. virens* در شرایط آزمایشگاهی به‌میزان قابل توجهی (۵۱/۶۳٪) رشد میسلیومی *Bipolaris* spp. را مهار کرده بود اما در شرایط گلخانه‌ای، این جدایه فقط به‌میزان ۵/۱۳٪ شدت بیماری را کاهش داد و در میان قارچ‌های مؤثر در کاهش شدت بیماری، ضعیف‌ترین آنتاگونیست مورد استفاده در شرایط گلخانه بود. عدم موفقیت مورد انتظار جدایه *T. virens* در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای، در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد از جمله این‌که در گلخانه امکان تنظیم و کنترل شرایط محیطی به‌میزانی که در آزمایشگاه در دسترس است وجود ندارد. همچنین ممکن است غلظت اسپورهای موجود در سوسپانسیون اسپور مورد استفاده برای اسپورپاشی روی گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای به میزان کافی نبوده باشد؛ به‌نحوی که با استفاده از سوسپانسیون اسپوری با غلظت بیش‌تر، نتایج بهتری بدست آید. اثرات عوامل بیوکنترل در شرایط طبیعی پیچیده بوده و بستگی زیادی به واکنش‌های مختلف گیاه، بیمارگر، آنتاگونیست و شرایط محیطی دارد (Kazemzadeh Chakoosari, 2003).

استفاده از جدایه‌های *F. verticillioides* و *A. tenuissima* نه تنها تاثیری در کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای و کنترل آن نداشت، بلکه افزایش شدت بیماری و شدت خسارت وارد شده به گیاهان برنج تیمار شده را موجب شد. عدم موفقیت استفاده از این دو جدایه در کنترل بیماری در شرایط گلخانه ممکن است به عوامل مختلفی از جمله فراهم نبودن شرایط مساعد در گلخانه، روش و زمان استفاده از این آنتاگونیست‌ها و رقم گیاه مرتبط باشد.

تأثیر بیوکنترلی *T. harzianum* در شرایط گلخانه‌ای کمتر از تأثیر آن در مهار درصد بازدارندگی میسلیومی در آزمایشگاه بود، این امر می‌تواند دلایل گوناگونی داشته

Archive of SID

www.SID.ir

باشد از جمله این که عوامل مؤثر در رشد سویه‌های مختلف *Trichoderma* متفاوت است (Kredicks *et al.*, 2003). دما و pH دو پارامتر کلیدی مؤثر در رشد، اسپورزایی، توانایی ساپروفیتیکی، تولید متابولیت‌های فرّار و غیرفرّار، رقابت برای غذا، مایکوپارازیتیسم و تولید آنزیم‌های خارج سلولی متلاشی‌کننده دیواره قارچ‌ها است (Kredics *et al.*, 2003). اثبات شده که پارامترهای محیطی غیرزنده مانند نوع خاک، دمای خاک و پتانسیل آب و نیز پارامترهای محیطی زنده مانند گونه‌های گیاهی، تنوع و فعالیت میکروبی خاک نیز علاوه بر فاکتورهای دیگر مانند روش و زمان استفاده ممکن است روی کارایی کنترل بیولوژیک جدایه‌های *Trichoderma* تأثیر بگذارند (Akrami *et al.*, 2011). درجه موثر بودن یک آنتاگونیست بر اساس ماهیت، کیفیت، میزان آنتی‌بیوتیک و میزان مواد مهارکننده ترشح شده به‌وسیله‌ی آن، متفاوت است (Dennis & Webster, 1971c; Skidmore & Dickinson, 1976).

با توجه به نتایج این مطالعه و تحقیق محمدیان (Mohammadian, 2013)، *T. harzianum* مؤثرترین قارچ در کنترل قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج بوده و این امر با نتایج مطالعه نعیمی و همکاران (Naeimi *et al.*, 2010) مطابقت داشت که بیان نمودند که از میان گونه‌های *Trichoderma* آزمایش شده، *T. harzianum* برای مطالعه به‌عنوان یک عامل بیوکنترل بالقوه برای کنترل *R. solani* و دیگر بیمارگرهای برنج در ایران مناسب‌تر است.

خلیلی و همکاران (Khalili *et al.*, 2012)، خاصیت آنتاگونیستی *T. harzianum* در مقابل *Bipolaris oryzae* را بررسی نمودند. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که جدایه‌های بومی *Trichoderma* spp. به‌طور قابل توجهی رشد میسلیومی *B. oryzae* را به روش‌های مختلف مهار می‌کنند. جدایه‌های *Trichoderma* با توانایی رشد سریع‌تر نسبت به قارچ بیماری‌زا و نیز رقابت سزاوارانه برای فضا و مواد مغذی، رشد ارگانیسم‌های هدف را مهار کردند. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که بین جدایه‌های *Trichoderma* و *B. oryzae* مایکوپارازیتیسم وجود نداشت که این یافته خلیلی و همکاران با یافته‌های تحقیق حاضر در انطباق بود. نتایج حاصل از تیمار بذر و محلول‌پاشی برگ با *T. harzianum* نشان داد که شدت بیماری به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد.

تساهوریدو و تاناسولوپولوش (Tsahouridou & Thanassoulopuolosh, 2002) بیان نمودند که مایه‌زنی گیاه برنج با سوسپانسیون اسپوری از جدایه‌های *Trichoderma* به‌طور قابل توجهی جوانه‌زنی اسپور *B. oryzae* را روی جوانه گیاه کاهش می‌دهد. مقادیر بالایی از مواد غذایی در ریزوسفر وجود داشت و عامل بیماری‌زا و عامل بیوکنترل، برای فضا و مواد غذایی رقابت می‌کنند. همچنین گزارش شده که متابولیت‌های ضد قارچی *T. harzianum* رشد خطی *B. oryzae* را مهار نموده است (Gray *et al.*, 2001).

پژوهش حاضر نشان داد که قارچ‌هایی در فلور طبیعی گیاه برنج وجود دارند که خواص آنتاگونیستی بالقوه‌ای برای کنترل بیولوژیک قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج دارا هستند. شناسایی این قارچ‌ها و مطالعه آن‌ها در سطوح مختلف آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌تواند نویدبخش کارایی روش‌های کنترل بیولوژیک در مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای برنج باشد.

سپاس‌گزاری

از مساعدت و همکاری جناب آقای دکتر عبادی عضو محترم هیات علمی موسسه تحقیقات برنج کشور و نیز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت سپاس‌گزاری می‌شود.

References

Abdel-Fattah, G.M., Shabana, Y.M., Ismail, A.E. & Rashad, Y.M. 2007. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia, 164: 81-99.

Akrami, M., Golzary, H. & Ahmadzadeh, M. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species

Archive of SID

www.SID.ir

for controlling *Fusarium* rot of lentil. African Journal of Biotechnology, 10(14): 2653-2658.

Arenal, F., Platas, G. & Pelaez, F. 2007. A new endophytic species of *Preussia* (*Sporomiaceae*) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. Fungal Diversity, 25: 1-17.

Behdani, M., Etebarian, H.R., Khodakaramian, G. & Mohammadifar, M. 2012. Biological control of *Bipolaris spicifera*, the causal agent of wheat root rot by *Pseudomonas fluorescens* isolates. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4 (8): 483-488.

Bertrand, P.F. & Gottwald, T.R. 1997. Evaluating fungicides for pecan disease control. pp. 149-164. In: Hickey, K.D. (ed.), Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. Oxford and IHB Pub., Calcatte.

Dennis, C. & Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25-39.

Dennis, C. & Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 41-48.

Dennis, C. & Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society, 57: 363-369.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, England, 608 pp.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-34, In: Kubicek, C. P., Harman, G. E. (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor and Francis Ltd., London.

Gray, A., Dirkse, E., Sears, J. & Markworth, C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology, 147: 2943–2950.

Horsfall, J.G. & Barrett, R.W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. Phytopathology, 35: 655.

Kazemzadeh Chakoosari, M. 2003. The possibility of biological control of rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*) by some bacterial biocontrol agents. Master's thesis in Plant Pathology. Tehran University. 167 pp. (In Persian with English summary).

Khalili,E., Sadravi, M., Naeimi, S. & Khosravi, V. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. Brazilian Journal of Microbiology, 43(1): 297-305.

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. & Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology, 41: 37-42.

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium*, laboratory manual. Blackwell Publishing, 389 pp.

Manimegalai, V., Ambikapathy, V. & Panneerselvam. A. 2011. Biological control of paddy brown spot caused by *Bipolaris oryzae*. European Journal of Experimental Biology, 1 (4):24-28.

McSpadden, G.B.B. & Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, Commercialization and Application in the USA. Plant Health Progress, 10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.

Mohammadian, S. 2013. Biological control of *Bipolaris* spp., the causal agent of brown spot disease of rice by some antagonistic fungi in Guilan province. Master's thesis in Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Guilan. 122 pp. (In Persian with English summary).

Archive of SID

www.SID.ir

Monaco, C.I., Sisterna, M.N. & Nico, A.I. 2008. Relationship between an *in Vitro* and greenhouse assay for biological control of *Bipolaris sorokiniana*-induced seedling blight of wheat. Biological Agriculture & Horticulture, 26(2): 103-119.

Moura, A.T., Ludwig, J., Santos, A.G., Schafer, J.T., Soares, V.N. & Correa, B.O. 2014. Biocontrol and seed transmission of *Bipolaris oryzae* and *Gerlachia oryzae* to rice seedlings. Journal of Seed Science, 36(9): 407-412.

Naeimi, S., Okhovvat, S.M., Javan- Nikkhah, M., Vagvolgyi, C., Khosravi, V. & Kredicks, L. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1, the causal agent of rice sheath blight with *Trichoderma* strains. Phytopathologia Mediterranea, 49: 287-300.

Safari Motlagh, M.R. 2011. *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo, as biological control agent of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* L.) in rice fields. Journal of Food, Agriculture & Environment, 9: 310-313.

Safari Motlagh, M. R. & Kaviani, B. 2008. Characterization of new *Bipolaris* species: the causal agent of rice brown spot disease in the north of Iran. International Journal of Agriculture and Biology, 10(6): 638-642.

Safari Motlagh, M.R., Padasht Dehkaee, F., & Hedjaroud, G.A. 2005. Rice brown spot disease and evaluation of the response of some rice cultivars to it. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 9(2): 171-182. (In Persian with English summary).

Salehpour, M., Etebarian, H.R., Roustaei, A., Khodakaramian, G. & Aminian, H. 2005. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* isolates. Plant Pathology Journal, 4(1): 85-90.

Simmons, E.G. & Roberts, R.G. 1993. *Alternaria* themes and variations (73). Mycotaxon, 48: 109-140.

Sivakumar D., Wilson Wijeratnam R.S., Wijesunderan R.L.C., Marikar, F.M.T. & Abeyesekere, M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of Rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica, 28(3): 240-247.

Sivanesan, A. 1987. Gramainicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. CAB International Mycological Institute, 261 pp.

Skidmore, A.M. & Dickinson, C.H. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society, 66: 57-64.

Soltani Nejad, M., Shahidi Bonjar, G.H. & Padasht Dehkaei, F. 2014. Control of *Bipolaris oryzae* the causal agent of rice brown spot disease via soil *Streptomyces* sp. isolate G. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 4(2): 310-317.

Tsahouridou, P.C. & Thanassoulopoulosh, C.C. 2002. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping off by *Sclerotium rolfsii*. Soil Biology and Biochemistry, 34: 767-776.

Zhang, Z. & Yuen, G. Y. 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. Phytopathology, 90:384-389.

Archive of SID

www.SID.ir

Biological control of rice brown spot disease caused by *Bipolaris victoriae* by some fungal isolates in the greenhouse and *in vitro* conditions

Mohammad Reza Safari Motlagh, Saber Mohammadian

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Corresponding author: Mohammad Reza Safari Motlagh, email: ssafarimotlagh@yahoo.com

Received: July, 12, 2015 4 (1) 11-25 Accepted: Feb., 13, 2016

Abstract

The rice brown spot disease caused by *Bipolaris* spp., is one of the most important diseases of rice in Iran and world. Eighty fungal isolates were isolated from 220 collected samples in Guilan province fields using PDA and WA. Morphological characteristics were used for identification of these fungi. Identified fungal species belonged to *Bipolaris victoriae* (24 isolates), *Bipolaris oryzae* (12 isolates), *Alternaria tenuissima* (11 isolates), *Preussia* sp. (8 isolates), *Fusarium verticillioides* (6 isolates), *Alternaria infectoria* (7 isolates), *Alternaria citri* (9 isolates), *Trichoderma harzianum* (one isolate) and *Trichoderma virens* (two isolates). Pathogenicity of all isolates of *Bipolaris* spp. was proved and among fungal isolates belonged to other fungal genera, 20 isolates which did not cause disease on rice or their pathogenicity was low were selected for biocontrol studies. In the laboratory, various methods were used such as inhibition of *B. victoriae* using culture filtrate, dual culture of the studied antagonistic fungi and *B. victoriae* by slide culture and effect of volatile metabolites on the inhibition of growth of this fungus. *T. harzianum* had been recognized as the most effective isolate in mycelial growth inhibition of the causal agent *in vitro*. In the greenhouse experiment, all isolates, except *A. tenussima* and *F. verticilliodes*, reduced disease rating of brown spot.The *Preussia* sp. isolate with 33.4% reduction in disease rating was the most effective antagonist followed by *T. harzianum*, *A. citri*, *A. infectoria* and *T. virens* which had the highest effect in control of disease, respectively. Analyze of variance and comparing the average characters in LSD method showed significant difference in terms of efficiency in disease control among studied fungi.

Keywords: antagonistic fungi, biological control, *Bipolaris*, greenhouse conditions, rice

Archive of SID

www.SID.ir