

## اثرات آنتی‌بیوزیس باکتری‌های آنتاگونیست سواسازی شده از مزارع برنج استان گیلان روی قارچ (*Rhizoctonia solani*) عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج

محمد کاظم‌زاده<sup>۱</sup>، فریدون پاداشت<sup>۲</sup>، غلام خداکرمیان<sup>۳</sup> و علی روستایی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>مدیریت جهاد کشاورزی آستانه اشرفیه، گیلان، <sup>۲</sup>مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، <sup>۳</sup>گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس  
تاریخ دریافت: ۸۲/۸/۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۲۴

### چکیده

اثرات آنتی‌بیوزیس ۳۷ باکتری آنتاگونیست جداسازی شده از مزارع برنج استان گیلان در بازداری از رشد رویشی قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید. باکتری‌های آنتاگونیست تغییرات زیادی در بیمارگر از قبیل لیز و قطعه‌قطعه شدن، واکوئله شدن، چروکیدگی و تورم انتهایی هیف در آزمون کشت متقابل در محیط کشت PDA ایجاد کردند. در آزمایش تولید مواد فرار ضد قارچی اثر باکتری ۱۵R (*Pseudomonas fluorescense* bv. 5) نسبت به بقیه در بازداری از رشد رویشی بیمارگر (۷۷/۱۶ درصد) بالاتر از بقیه بود. در آزمایش تولید مواد سیدروفور هیچ یک از استرین‌های آنتاگونیست سبب کاهش اندازه منطقه بازدارندگی در غلظت‌های مختلف آهن اضافه شده به محیط کشت King's B نشدند ولی در میان هشت استرین آنتاگونیست انتخابی پس از حذف باکتری‌ها و نگهداری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، رشد رویشی بیمارگر در محیط کشت King's B حاوی آهن افزایش یافت. در آزمایش ترشحات خارج سلولی استرین‌های آنتاگونیست انتخابی و در غلظت‌های مختلف این ترشحات، باکتری ۱۳۳ (*P. fluorescense* bv. 5) در غلظت ۲۵ درصد نسبت به بقیه در بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری (۴۷/۵ درصد) بالاتر بود. سترون نمودن ترشحات خارج سلولی استرین‌های انتخابی در غلظت ۲۵ درصد اثر زیادی روی آنها گذاشت ولی این تأثیر بر روی میزان بازداری ناشی از ترشحات خارج سلولی استرین ۲۳ R (*P. fluorescens* bv. 5) کم بود.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌بیوزیس، برنج، سیدروفور، *Rhizoctonia solani*، *Pseudomonas*

### مقدمه

باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروفلور موجود در خاک بوده که دارای جمعیت متوسط  $10^8 \times 6$  سلول باکتریایی در هر گرم خاک و وزن نزدیک به ۱۰۰۰۰ کیلوگرم در هر هکتار خاک هستند، بنابراین آنها پنج درصد وزن خشک مواد آلی خاک را تشکیل می‌دهند (کیلیان و همکاران، ۲۰۰۰). سودوموناس‌های فلورسنت غالبترین میکروفلور هوازی ریزوسفر در بسیاری از گیاهان هستند (ژیل و وارن،

۱۹۸۸). آنها علاوه بر دارا بودن پتانسیل آنتاگونیستی، رشد گیاه را افزایش داده، دارای تحرک هستند و به سرعت تکثیر می‌شوند (ژیلز و شیپرز، ۱۹۸۳). کاربرد سودوموناس‌های فلورسنت به‌صورت تیمار ریشه نیز در کنترل بیماری‌های شاخ و برگ مؤثر بوده است (ماوروفر و همکاران، ۱۹۹۲). حرکت سودوموناس‌ها از ریشه به شاخ و برگ و همچنین تکثیر آنها بعد از کاربرد گزارش شده است (بلویمبرگ و لوگنبرگ، ۲۰۰۱).

## روش بررسی

**قارچ عامل بیماری:** بدین منظور جدایه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج از مؤسسه تحقیقات برنج کشور - رشت (آقای مهندس فریدون پاداشت) تهیه گردید و جهت حفظ خصوصیات بیماری‌زایی آن در مخلوط پوسته برنج و دانه برنج (میو و روزالز، ۱۹۸۶) کشت و نگهداری گردید.

**عوامل بیوکنترل باکتریایی:** تعداد ۳۷ استرین از عوامل باکتریایی مزارع برنج استان گیلان که قبلاً توسط نگارنده جداسازی و در آزمون کشت متقابل<sup>۱</sup> به‌عنوان آنتاگونیست قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ تعیین شده (کاظم‌زاده و همکاران، ۱۳۷۲) و در آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مؤسسه تحقیقات برنج کشور - رشت حفظ و نگهداری می‌شدند جهت مطالعه خاصیت آنتی‌بیوزیس آنها در مقابل بیمارگر مذکور انتخاب شدند. تعداد هشت استرین از آنتاگونیست‌های مذکور تحت عنوان آنتاگونیست‌های انتخابی به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی (شاد، ۱۹۸۸) با نام‌های *P. fluorescense* bv. 3، *P. fluorescense* bv. 5، *Bacillus aeruginosa* ۲۱R2، *P. fluorescense* bv. 5، *P. fluorescense* licheniformis ۲۳R، *P. fluorescense* bv. 5، *P. fluorescense* ۲۹R، *P. fluorescense* bv. 5) شناسایی شده و جهت ادامه آزمایش‌ها در آب مقطر استریل و محلول شیر بدون چربی<sup>۲</sup> نگهداری گردیدند (کاظم‌زاده و همکاران، ۱۳۷۲).

### ویژگی‌های آنتی‌بیوزیس عوامل بیوکنترل باکتریایی

تولید مواد فرار ضد قارچی: مطابق روش فیدامن و روزال (۱۹۹۳) تعداد ۳۷ استرین باکتری آنتاگونیست به‌طور مجزا به‌صورت چمنی در محیط آگار غذایی N.A کشت و همزمان یک قرص پنج میلی‌متری از کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری در محیط P.D.A کشت داده شد. سپس در شرایط استریل تشتک حاوی کشت قارچ عامل بیماری به‌صورت وارونه بر روی تشتک حاوی

سودوموناس‌های فلورسنت به‌عنوان احاطه‌کننده بذر جهت کنترل بیولوژیکی چندین عامل بیمارگر گیاهی از جمله عوامل بیماری‌زایی برنج تحت شرایط غرقابی شناخته شده‌اند (ساکتیول و گنانامانیکام، ۱۹۸۷)، از جمله آنها می‌توان به کنترل بیماری سوختگی غلاف برگ اشاره نمود (میو و روزالز، ۱۹۸۶). مطالعات فراوانی درباره انتخاب و ارزیابی عوامل بیوکنترل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ در دنیا صورت گرفته است (میو و روزالز، ۱۹۸۶؛ روزالز و همکاران، ۱۹۸۶؛ ساکتیول و گنانامانیکام، ۱۹۸۷؛ گنانامانیکام و میو، ۱۹۸۹). در میان استرین‌های مؤثر علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ در شرایط آزمایشگاهی، باکتری‌های سودوموناس، باسیلوس و اینتروباکتر در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای سبب کنترل معنی‌دار بیماری سوختگی غلاف برگ شده‌اند (گنانامانیکام و همکاران، ۱۹۹۲). در میان باکتری‌های آنتاگونیست فلورسنت و غیرفلورسنت جلوگیری‌کننده از رشد قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ، *Pseudomonas fluorescense* و *P. putide* به‌ترتیب سبب کاهش ۶۸ و ۵۲ درصدی بیماری سوختگی غلاف برگ در مزارع آزمایشی شدند (تارا و گنانامانیکام، ۱۹۹۴). سودوموناس‌های فلورسنت دارای منطقه بازدارندگی ۲ تا ۳۱ میلی‌متر در آزمون کشت متقابل علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ بود و در مزارع آزمایشی نیز بهتر از قارچ‌کش والیدامایسین در کنترل بیماری سوختگی غلاف برگ عمل نمودند (گنانامانیکام و میو، ۱۹۹۲). همچنین مطالعات زیادی درباره توسعه کاربرد فورمولاسیون‌های پودری تهیه شده از عوامل بیوکنترل این بیماری در دنیا صورت گرفته است (ویدیهاسکاران و موتامیلان، ۱۹۹۹؛ رابیندران و ویدیهاسکاران، ۱۹۹۶). بررسی ویژگی‌های آنتی‌بیوزیس عوامل بیوکنترل باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج *Rhizoctonia solani* kuhn از اهداف مهم این

بررسی می‌باشد.

1- Dual culture  
2- Skim milk

مرکز هر محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سرانجام در هر استرین میزان رشد قطری بیمارگر در محیط کشت King's B حاوی ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید آهن III با شاهد که در آن کشت قارچ در محیط King's B بدون افزودن آهن صورت گرفته بود، مقایسه گردید.

**ترشحات خارج سلولی:** مطابق روش سینگ و دورال (۱۹۸۴) یک حلقه کامل از کشت فعال هر یک از استرین‌های آنتاگونیست انتخابی به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مغذی استریل<sup>۱</sup> توسط میله انتقال اضافه شد و سپس فلاسک‌ها به مدت چهار روز با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در دمای محیط تکان داده شدند. پس از عبور این محیط کشت از کاغذ صافی واتمن شماره یک و سانتریفیوژ ۵۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، توسط دستگاه پمپ خلاء و صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲ میکرونی صاف گردیدند و غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد از عصاره‌های حاصل از هر یک از استرین‌های آنتاگونیست به لوله حاوی محیط کشت P.D.A در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط استریل افزوده شد و پس از اختلاط کامل به تشتک‌های پتری استریل منتقل گردید. پس از انجماد محیط کشت در مرکز آن یک قرص پنج میلی‌متری از کشت فعال قارچ عامل بیماری قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد رویشی بیمارگر اندازه‌گیری گردید. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب طرح کرت‌های خرد شده در سه تکرار انجام شد. در ادامه عصاره‌های حاصل از هر یک از استرین‌های آنتاگونیست به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردیده و همانند قبل غلظت ۲۵ درصد از عصاره‌های سترون شده هر یک از استرین‌های آنتاگونیست انتخابی در سه تکرار تهیه شد و کشت قارچ بر روی محیط کشت مخلوط شده با این عصاره‌ها صورت گرفت و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه

کشت باکتری قرار گرفته و محل اتصال لبه‌های دو تشتک با پارافیلیم کاملاً مسدود شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت نگهداری در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد قطری بیمارگر اندازه‌گیری شد و در هر تیمار بر اساس درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر نسبت به شاهد که در اینجا میزان رشد قطری بیمارگر در تشتک حاوی کشت قارچ بر روی تشتک حاوی محیط N.A بدون کشت باکتری بود در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی محاسبه گردید.

**تولید سیدروفور:** بررسی قدرت تولید سیدروفور در ۳۷ استرین آنتاگونیست به دو روش صورت گرفت. در آزمون اول مطابق روش ژیلز و شیپرز (۱۹۸۳) غلظت‌های مختلف از آهن (صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن III) در محیط کشت King's B تهیه شد و هر استرین در سه نقطه از فاصله یک سانتی‌متری حاشیه ظرف پتری در فواصل مساوی به صورت لکه‌ای کشت و به صورت همزمان یک قرص پنج میلی‌متری از کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری رشد یافته در محیط PDA در مرکز این محیط کشت قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در هر استرین اندازه منطقه بازدارندگی در غلظت‌های مختلف آهن با یکدیگر مقایسه گردید.

در آزمون دوم قدرت تولید سیدروفور هشت استرین آنتاگونیست انتخابی در محیط کشت King's B حاوی ۱۰۰۰ میکرومولار کلرید آهن III و محیط کشت King's B بدون اضافه کردن آهن در سه نقطه همانند قبل به صورت لکه‌ای کشت داده شد و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس پرگنه باکتری‌های رشد یافته به کمک پنبه و آب مقطر استریل از روی سطح محیط کشت حذف شدند و توسط بخار کلروفرم سلول‌های باکتریایی باقیمانده تقریباً نابود شدند. سپس تشتک‌های مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و یک قرص پنج میلی‌متری از کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری در

1- Nutrient Broth

سیدروفور توسط آهن جلوگیری شده و در عوض تولید آنتی‌بیوزیس توسط آهن در محیط King's B تحریک شده است (شکل ۱). ولر و همکاران (۱۹۸۸) دریافتند که اندازه منطقه بازدارندگی سودوموناس‌های فلورسنت علیه قارچ *Gaeumannomyces graminis var. tritici* در محیط King's B با اضافه کردن تا ۱۰ میکرومولار کلرید آهن سه ظرفیتی کاهش می‌یابد ولی با اضافه کردن غلظت‌های بالاتر آهن اندازه منطقه بازدارندگی افزایش یافت با وجود آنکه هیچ‌گونه رنگدانه فلورسنتی تولید نگردید. در آزمون دوم تولید سیدروفور در میان استرین‌های آنتاگونیست انتخابی پس از حذف پرگنه باکتری‌ها و نگهداری در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد، بیشترین افزایش رشد رویشی قارچ عامل بیماری در محیط حاوی آهن نسبت به محیط بدون اضافه شدن آهن مشاهده شد. به نظر می‌رسد حرارت نقش سایر آنتی‌بیوزیس غیر از سیدروفور را خنثی نموده و آهن اضافه شده به محیط King's B نقش بازدارندگی سیدروفور تولید شده توسط استرین‌های آنتاگونیست را خنثی می‌سازد و بدین ترتیب در محیط King's B + ۱۰۰۰ میکرو مولار کلرید آهن III افزایش رشد رویشی قارچ عامل بیماری مشاهده می‌گردد.

در بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی آنتاگونیست‌های انتخابی بر روی رشد رویشی قارچ عامل بیماری با افزایش غلظت مایع خارج سلولی، میزان بازداری از رشد رویشی بیمارگر افزایش یافت و اثر باکتری ۱۳۳ (*P. fluorescense* bv.5) در غلظت ۲۵ درصد نسبت به بقیه در بازداری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری (۴۷/۵ درصد) بالاتر بود (جدول ۲). از مقایسه میزان بازداری از رشد رویشی عامل بیماری در غلظت ۲۵ درصد مواد خارج سلولی سترون شده با سترون نشده مشخص شد که اثر دما به میزان زیاد، بر روی مواد خارج سلولی اثر گذاشته است ولی این تأثیر در استرین ۲۳ R (*P. fluorescens* bv. 5) چندان نبود (شکل ۲).

سانتی‌گراد، رشد رویشی بیمارگر با شاهد در سه تکرار مقایسه شد.

**تغییرات سلولی بیمارگر:** با استفاده از بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری تغییرات ایجاد شده در میسیلیوم بیمارگر (*Rhizoctonia solani*) در منطقه واکنش استرین‌های آنتاگونیست با میسیلیوم رویشی بیمارگر در آزمون کشت متقابل در محیط کشت P.D.A مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج و بحث

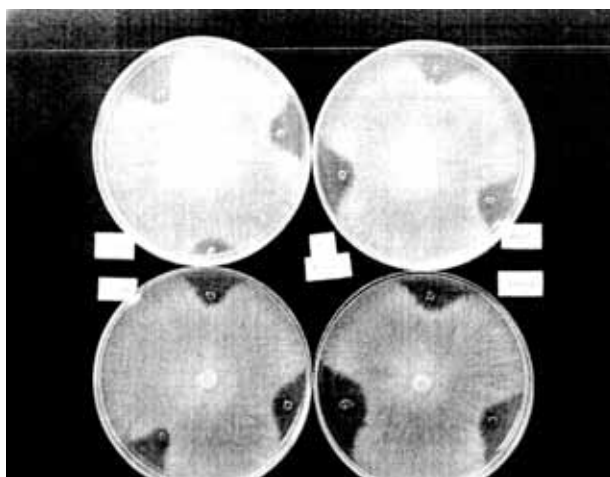
نتایج حاصله از بررسی اثرات آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل باکتریایی جداسازی شده از مزارع برنج استان گیلان نشان داد که آنها از قدرت تولید آنتی‌بیوزیس بالایی در شرایط آزمایشگاهی برخوردار هستند. تولید مواد فرار ضدقارچی یکی از مکانیزم‌های بیوکنترل عوامل باکتریایی محسوب شده که می‌تواند سرعت رشد میسیلیومی و فعالیت آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهد (فیدامن و روزال، ۱۹۹۳). استرین‌های باکتریایی آنتاگونیست قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در آزمون تولید مواد فرار ضدقارچی در محیط کشت P.D.A به میزان زیادی رشد رویشی قارچ را کاهش دادند و در میان آنها اثر باکتری ۱۵R (*P. fluorescense* bv.5) نسبت به بقیه در بازداری از رشد رویشی بیمارگر (۷۷/۱۶ درصد) بالاتر بود (جدول ۱).

در آزمون اول تولید سیدروفور در هیچ‌یک از ۳۷ استرین آنتاگونیست در غلظت‌های مختلف آهن اضافه شده به محیط King's B تغییری در اندازه منطقه بازدارندگی مشاهده نگردید و حتی در پاره‌ای موارد در غلظت‌های بالای آهن اضافه شده به این محیط کشت، افزایش جزئی در اندازه منطقه بازدارندگی وجود داشت، در نتیجه به نظر می‌رسد که در ایجاد منطقه بازدارندگی فقط ویژگی تولید سیدروفور دخالت نداشته، بلکه مکانیزم‌های دیگری نیز دخالت دارند. افزایش جزئی اندازه منطقه بازدارندگی در غلظت‌های بالای آهن اضافه شده به محیط King's B شاید به دلیل آن باشد که آهن سبب تحریک مکانیزم‌های آنتی‌بیوزیس استرین‌ها می‌گردد (ولر و همکاران، ۱۹۸۸). این نتایج نشان داد که از تولید

جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات متابولیت‌های فرار استرین‌های باکتریایی روی رشد رویشی بیمارگر (*Rhizoctonia solani*).

شماره استرین (تیمار)	میانگین بازداری از رشد (%)	ادامه تیمار	میانگین بازداری از رشد (%)	ادامه تیمار	میانگین بازداری از رشد (%)
۳R <sub>1</sub>	۴۸/۵ e-k*	۱۹R <sub>2</sub>	۳۰/۵ j-o	۳w	۴۷/۱۶ e-k
۳R <sub>2</sub>	۴۰/۵ g-n	۲۰R	۲۳/۸۳ l-o	۱۰w	۴۴/۵ f-l
۴R <sub>1</sub>	۱۹/۸۳ no	۲۱R <sub>1</sub>	۴۴/۵ f-l	۱۲w	۱۹/۱۶ o
۴R <sub>2</sub>	۳۷/۸۳ g-o	۲۱R <sub>2</sub>	۵۲/۵ d-i	۱۳w	۷۵/۸۳ ab
۵R <sub>1</sub>	۳۱/۸۳ i-o	۲۲R	۷۱/۱۶ a-d	۷S	۵۰/۵ e-j
۵R <sub>2</sub>	۲۷/۱۶ k-o	۲۳R	۴۲/۵ f-m	۸S	۳۷/۸۳ g-o
۱۲R <sub>1</sub>	۵۴/۸۳ c-h	۲۶R	۶۲/۵ a-f	۹S	۳۷/۱۶ g-o
۱۲R <sub>2</sub>	۴۰/۵ g-n	۲۸R <sub>1</sub>	۶۷/۵ a-e	۱۰۰	۲۲/۸۳ m-o
۱۵R	۷۷/۱۶ a	۲۸R <sub>2</sub>	۲۳/۸۳ l-o	۱۱۷	۳۴/۱۶ h-o
۱۶R <sub>1</sub>	۵۰/۸۳ e-j	۲۹R	۳۹/۱۶ g-o	۱۱۸	۲۰/۵ no
۱۶R <sub>2</sub>	۳۷/۱۶ g-o	۳۱R	۴۱/۱۶ g-n	۱۳۳	۵۶/۱۶ b-g
۱۹R <sub>1</sub>	۷۲/۵ a-c	۱w	۴۹/۸۳ e-j	۱۵۲	۴۰/۸۳ g-n
				۱۶۰	۳۴/۵ h-o

\* تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (DMRT 5%).



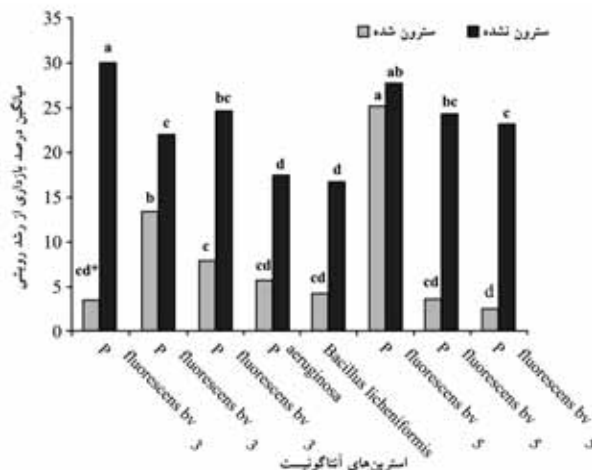
شکل ۱- اثر سیدروفور استرین‌های آنتاگونیست روی بیمارگر (*Rhizoctonia solani*) (تحت سطوح مختلف آهن اضافه شده به محیط کشت King's B) از چپ به راست به ترتیب، بالا: صفر و ۱۰ میکرومولار پایین: ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات آنتاگونیستی ترشحات خارج سلولی استرین‌های آنتاگونیست انتخابی روی رشد رویشی بیمارگر

میانگین بازداری از رشد (%)	غلظت ترشحات خارج سلولی (% پلات اصلی)			میانگین بازداری از رشد (%)
	۲۵	۱۵	۵	
۱۹/۴۶c	۳۹/۷۶b	۱۱/۹b	۶/۷۳b	۷S
۱۸/۷۸c	۲۸/۹۶cd**	۱۹/۶۶a	۷/۷۳b	۹S
۲۴/۵۳b	۴۷/۵a	۱۸/۶۳a	۷/۴۶b	۱۳۳
۱۷/۴۷c	۲۹/۱۶cd	۱۳/۲۶b	۱۰b	۱۵۲
۱۶/۶c	۳۱c	۱۱/۸۶b	۶/۹۳b	۲۱R <sub>2</sub>
۲۷/۵a	۴۲/۶ab	۲۴/۳۶a	۱۵/۷a	۲۳R
۱۸/۸۶c	۲۸/۷cd	۱۹/۹۳a	۷/۹۶b	۱۵R
۱۷/۶۷c	۲۳/۳d	۱۹/۶a	۱۰/۶b	۲۹R
۲۰/۱۲	۳۳/۱۷	۱۷/۳۵	۹/۴	میانگین پلات اصلی

\* میانگین پلات فرعی به صورت میانگین بازداری از رشد رویشی است.

\*\* تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند فرق معنی‌داری با همدیگر ندارند (DMRT 5%).



شکل ۲- مقایسه تاثیر ترشحات خارج سلولی سترون شده و سترون نشده استرین‌های آنتاگونیست انتخابی روی رشد ریشی بیمارگر (*Rhizoctonia solani*) (غلظت=۲۵ درصد) \*بیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند تفاوت معنی داری با همدیگر ندارند (DMRT 5%).

سبب لیز شدن و تغییر شکل آنها می‌گردند اما به هرحال دخالت مستقیم این متابولیت‌ها در آنتاگونیسم مشاهده نگردید.

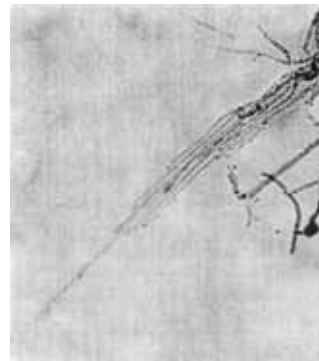
با توجه به نتایج به دست آمده در شرایط آزمایشگاهی که نشان‌دهنده قدرت بالای تولید آنتی‌بیوزیس اکثر استرین‌های آنتاگونیست بود، تلاش برای ادامه آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای و کاربرد مواد استخراج یافته استرین‌های آنتاگونیست جهت کنترل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج توصیه می‌گردد. علاوه بر این از آنجائیکه تاثیر آنتی‌بیوزیس استرین‌های آنتاگونیست معمولاً غیراختصاصی می‌باشد، بنابراین بررسی تاثیر مواد آنتی‌بیوزیس این استرین‌ها بر روی سایر عوامل بیماری‌زای برنج و حتی سایر محصولات توصیه می‌گردد. با توجه به گسترش تحقیقات درباره عوامل کنترل بیولوژیک در مناطق مختلف دنیا و همچنین تحقیقات روز افزون درباره کاربردی نمودن این عوامل به شکل راحت‌تر، دوام بیشتر، حمل و نقل و انبارداری بهتر، جای امیدواری است که بتوان در آینده‌ای نزدیک استفاده عملی بیشتری از این عوامل بیولوژیک نمود.

ویژگی آنتاگونیستی باکتری‌ها جهت بیوکنترل ممکن است توسط آنتی‌بیوزیس، رقابت یا پارازیتسم فراهم گردد (چت و همکاران، ۱۹۹۰). عوامل بیوکنترل باکتریایی با تولید یک سری متابولیت‌های خارج سلولی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها (فنازین‌ها، پیروول‌ها، باکتوبولین‌ها) و تولید سیدروفورها سبب بیوکنترل می‌شوند که در این میان آنتی‌بیوزیس اغلب یک نقش اساسی را ایفاء می‌کند (فراول، ۱۹۸۸). استرین‌های آنتاگونیست دارای قدرت تولید آنتی‌بیوزیس در محیط P.D.A بوده و میسلیم قارچ عامل بیماری در محدوده منطقه بازندارندگی در آزمون کشت متقابل در محیط غذایی P.D.A دچار تغییرات زیادی گردید. تغییرات میسلیمی شامل گرانوله شدن، شاخه شاخه شدن (درختچه‌ای شدن)، از بین رفتن دیواره و قطعه قطعه شدن دیواره هیف و تورم انتهایی آن بود (شکل ۳). اثرات نکروتروفیک آنتی‌بیوزیس‌های به دست آمده از سودوموناس GRC<sub>2</sub> علیه دو قارچ بیماری‌زای گیاهی به نام‌های *Macrophomina phaseolina* و *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاهی توسط گوپتا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شده است. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی از منطقه واکنش آنها عدم تجمع اسکروت، چروکیدگی هیف، تغییر شکل و لیز شدن میسلیم و اسکروت را در *M. phaseolina* نشان داده است. آنها همچنین مشاهده کردند که سلول‌های باکتریایی به هیف *Fusarium oxysporum* و *R. solani* چسبیده و بداخل آن نفوذ نموده و در نتیجه

شکل ۳- تغییرات میسلیموم بیمارگر (*Rhizoctonia solani*) در منطقه واکنش در آزمون کشت متقابل با استرین های آنتاگونیست.

### سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه همه کارکنان موسسه تحقیقات برنج کشور - رشت به خصوص آقایان مهندس پاداشت، دودابی نژاد و پورفرهنگ، خانم ها مهندس موسی نژاد و بخشی زاد تشکر و قدردانی می شود.



### منابع

۱. کاظم زاده چکوسری، م. ۱۳۷۲. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری سوختگی غلاف برگ برنج (*Rhizoctonia solani*) توسط برخی عوامل بیوکنترل باکتریایی. پایان نامه تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی، مجتمع آموزش عالی ابوریحان، دانشگاه تهران.
2. Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B.J.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by Rhizobacteria. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4: 343 – 350.
3. Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R., and Oppenheim, A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil* 129: 85-92.
4. Fiddaman, P.J., and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 119-126
5. Fiddaman, P.J., and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 395- 405.
6. Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:75-91
7. Geels, F.P., and Schippers, B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopathl. Z.*, 108, 193-206.
8. Gill, P.R., and Warren, G.J. 1988. An iron –antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. *J. Bacteriol.* 170: 163-170.
9. Gupta, C.P., Dubey, R.C., Kang, S.C., and Maheshwari, D.K. 2001. Antibiosis-mediated necrotrophic effect of pseudomonas GRC2 against two fungal plant pathogens. *Cur. Sci.* 18, 91-94.
10. Hamadan, H., Weller, D.M., and Thomashow, L.S. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4.8 =80R. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3270-3277.
11. Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Tunge, H., Schmiedeknecht, G., and Hain, R. FZB24® *Bacillus subtilis*- Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer* 1: 72-93.
12. Maurhofer, M., Keel, C., Schneider, V., Voisard, C., Hass, D., and Defago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathol.* 82, 190 – 195.
13. Mew, T.W., and Rosales, A.M. 1986. Bacterization of rice plants for the control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* 76: 1260-1264.
14. Rabindran, R., and Vidhyasekaran, P. 1996. Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR<sub>2</sub> for management of rice sheath blight. *Crop Protect.* 15, 715-7.
15. Rosales, A.M., Nogue, F.L., and Mew, T.W. 1986. Biological control of bakanae disease of rice with antagonistic bacteria. *Philippine Phytopathol.* 22, 29-35.
16. Sakthivel, N., and Gnanamanickam, S.S. 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of Sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice (*Oriza sativa* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2056-2059.
17. Singh, V., and Devrall. 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 83: 487- 490.
18. Vidhyasekaran, P., and Muthamilan, M. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. *Bioc. Scie. and Technol.* 8: 67-74.

19. Wegger, L.A.D., Van der Vlugt, C.I.M., Wijffes, A.H.M., Bakker, P.A.H.M., Schippers, B., and Lugtenberg, B.J.J. 1987. Flagella of a plant growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.* 169: 2769-2773.
20. Weller, D.M. 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
21. Weller, D.M., Howie, W.J., and Cook, R.J. 1988. Relationship between *in vitro* inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of Take-all of wheat by fluorescent pseudomonas. *Phytopathol.* 78: 1094-1100.

*J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(6), Feb - Mar 2006*  
[www.magiran.com/jasnr](http://www.magiran.com/jasnr)

---

## Effects of antibiosis antagonistic bacterial isolated from rice paddy of the Guilan province on the *Rhizoctonia solani* causal agent of rice sheath

M. Kazem zadeh<sup>1</sup>, F. Padasht<sup>2</sup>, G.K. Khodakaramian<sup>3</sup> and A. Rostai<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dept., of Jihad Agricultural management, Astuneh-Ashrafieh, <sup>2</sup>Rice Research Institute, Dept., of Plant protection Rasht, <sup>3</sup>Plant protection Dept., Faculty of Agriculture Tarbiat Modarres Univ., <sup>4</sup>Dept., of plant protection, Aborihan Complex, Tehran Univ., Pakdasht

---

### Abstract

Antibiosis effects of 37 bacterial antagonistic isolated from rice paddy of the Guilan province were surveyed *in vitro* in prevention of the vegetative growth of the causal agent rice sheath blight (*Rhizoctonia solani*). Antagonistic strains caused a large changes on the pathogen include lysis and fragmentation, vacuolation, shriveling and swelling hyphal tip in the dual culture on PDA medium. In the test of production of antifungal volatile metabolites, effect of 15R (*Pseudomonas fluorescense* bv. 5) strain was the best than other (%77.16) in prevention of vegetative growth of the causal agent. None of the 37 antagonistic strains reduced inhibition zone in the test of production of siderophore in the different concentrations of iron added to King's B medium but among eight selective antagonistic strains, some strains increased the vegetative growth of the causal agent after removing bacteria and incubation in 60°C temperature on the King's B medium contained iron. In the test of extracellular exudates selective antagonistic strains in the different concentrations, effect of 133 (*P. fluorescense* bv. 5) strains in the %25 concentration was the best than other (47.50) in prevention of vegetative growth of the causal agent. Autoclaving (121°C, 1 at.) extracellular exudates of selective antagonistic strains in the %25 concentration influenced on the their effects but this effect was little in prevention of vegetative growth of the causal agent by the extracellular exudates 23R (*P. fluorescense* bv. 5) strain.

**Keywords:** Antibiosis; *Pseudomonas*; *Rhizoctonia solani*; Rice; Siderophore