Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم، شماره ششم، بهمن- اسفند ۱۳۸۴
www.magiran.com/jasnr

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

محمد کاظم‌زاده[۱]، فریدون پاداشت[۲]، غلام خداکرمیان[۳] و علی روستایی[۱]
[۱]مدیریت جهاد کشاورزی آستانه اشرفیه، گیلان، [۲]مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، [۳]گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۸۲/۸/٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٤/۳/۲٤

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 (۷۷/۱٦ 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 ٦۰ 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 (٤۷/۵ 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 R ۲۳ (*P. fluorescens* bv. 5) کم بود.

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

مقدمه

باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروفلور موجود در خاک بوده که دارای جمعیت متوسط ٦×١٠^{٨} 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 برگی 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 لوگتنبرگ، ۲۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID

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 برنج اشاره نمود (میو و روزالز، ۱۹۸٦). مطالعات فراوانی درباره انتخاب و ارزیابی عوامل بیوکنترل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در دنیا صورت گرفته است (میو و روزالز، ۱۹۸٦؛ روزالز و همکاران، ۱۹۸٦؛ ساکتیول و گنانامانیکام، ۱۹۸۷؛ گنانامانیکام و میو، ۱۹۸۹). در میان استرین‌های مؤثر علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاهی، باکتری‌های سودوموناس، باسیلوس و اینتروباکتر در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای سبب کنترل معنی‌دار بیماری سوختگی غلاف برنج شده‌اند (گنانامانیکام و همکاران، ۱۹۹۲). در میان باکتری‌های آنتاگونیست فلورسنت و غیرفلورسنت جلوگیری کننده از رشد قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج، *Pseudomonas fluorescense* و *P. putide* به‌ترتیب سبب کاهش ٦۸ و ۵۲ درصدی بیماری سوختگی غلاف برنج در مزارع آزمایشی شدند (تارا و گنانامانیکام، ۱۹۹٤). سودوموناس‌های فلورسنت دارای منطقه بازدارندگی ۲ تا ۳۱ میلی‌متر در آزمون کشت متقابل علیه قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج بود و در مزارع آزمایشی نیز بهتر از قارچ‌کش والیدامایسین در کنترل بیماری سوختگی غلاف برنج 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 (ویدهیاسکاران و موتامیلان، ۱۹۹۹؛ رابیندران و ویدهیاسکاران، ۱۹۹٦). 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.

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 وروزالز، ۱۹۸٦) 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[1] به‌عنوان آنتاگونیست قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برنج تعیین شده (کاظم‌زاده و همکاران، ۱۳۷۲) و در آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مؤسسه تحقیقات برنج کشور ـ 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 ۷S (*P. fluorescense* bv. 3)، ۹S (*P. fluorescense* bv. 3)، ۱۳۳ (*P. fluorescense* bv.5)، ۱۵۲ (*P. aeruginosa*)، ۲۱R2 (*Bacillus licheniformis*)، ۲۳R (*P. fluorescense* bv. 5)، ۱۵R (*P. fluorescense* bv. 5)، ۲۹R (*P. fluorescense* bv. 5) شناسایی شده و جهت ادامه آزمایش‌ها در آب مقطر استریل و محلول شیر بدون چربی[2] نگهداری گردیدند (کاظم‌زاده و همکاران، ۱۳۷۲).

ویژگی‌های آنتی‌بیوزیس عوامل بیوکنترل باکتریایی

تولید مواد 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

1- Dual culture
2- Skim milk

www.SID.ir

Archive of SID

کشت باکتری قرار گرفته و محل اتصال لبه‌های دو تشتک با پارافیلم کاملاً مسدود شد. پس از گذشت ۲٤ 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 به‌صورت لکه‌ای کشت و به‌صورت 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 ٤۸ 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 به‌صورت لکه‌ای کشت داده شد و به‌مدت ٤۸ 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 ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و یک قرص پنج میلی‌متری از کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری در مرکز هر محیط کشت قرار داده شد و به‌مدت ۲٤ 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 (۱۹۸٤) یک حلقه کامل از کشت فعال هر یک از استرین‌های آنتاگونیست انتخابی به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مغذی استریل[1] توسط میله انتقال اضافه شد و سپس فلاسک‌ها به‌مدت 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 سانتریفوژ ۵۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت 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 ٤۵ 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 ۲٤ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد رویشی بیمارگر اندازه‌گیری گردید. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب طرح کرت‌های خرد شده در سه تکرار انجام شد. در ادامه عصاره‌های حاصل از هر یک استرین‌های آنتاگونیست به‌مدت 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 ۲٤ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه

1- Nutrient Broth

www.SID.ir

Archive of SID

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 میسلیوم 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 میسلیومی و فعالیت آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهد (فیدامن و روزال، ۱۹۹۳). استرین های 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 (جدول۱).

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 به‌نظر 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 به‌دلیل آن باشد که آهن سبب تحریک مکانیزم‌های آنتی‌بیوزیس استرین‌ها می‌گردد (ولر و همکاران، ۱۹۸۸). این نتایج نشان داد که از تولید 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. به‌نظر 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 آنتگونیست‌های انتخابی بر روی رشد رویشی قارچ عامل بیماری با افزایش غلظت مایع خارج سلولی، میزان بازداری از رشد رویشی بیمارگر افزایش یافت و اثر باکتری۱۳۳ (*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 به‌میزان زیاد، بر روی مواد خارج سلولی اثر گذاشته است ولی این تأثیر در استرین R ۲۳ (*P. fluorescens* bv. 5) چندان نبود (شکل ۲).

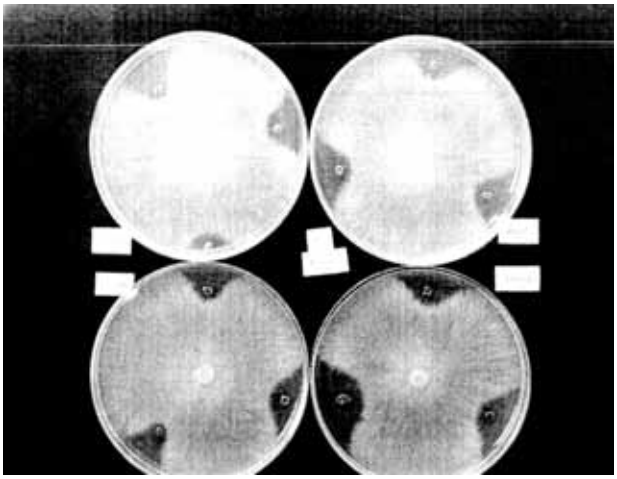
www.SID.ir

Archive of SID

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_1	٤٨/٥ e-k*	۱۹ R_2	۳۰/٥ j-o	۳w	٤٧/١٦ e-k
۳ R_2	٤٠/٥ g-n	۲۰ R	۲۳/۸۳ l-o	۱۰ w	٤٤/٥ f-l
٤ R_1	۱۹/۸۳ no	۲۱ R_1	٤٤/٥ f-l	۱۲w	۱۹/۱٦ o
٤ R_2	۳۷/۸۳ g-o	۲۱ R_2	٥۲/٥ d-i	۱۳w	۷٥/۸۳ ab
٥ R_1	۳۱/۸۳ i-o	۲۲ R	۷۱/۱٦ a-d	۷S	٥۰/٥ e-j
٥ R_2	۲۷/۱٦ k-o	۲۳ R	٤۲/٥ f-m	۸S	۳۷/۸۳ g-o
۱۲ R_1	٥٤/۸۳ c-h	۲٦ R	٦۲/٥ a-f	۹S	۳۷/۱٦ g-o
۱۲ R_2	٤٠/٥ g-n	۲۸ R_1	٦۷/٥ a-e	۱۰۰	۲۲/۸۳ m-o
۱٥ R	۷۷/۱٦ a	۲۸ R_2	۲۳/۸۳ l-o	۱۱۷	۳٤/۱٦ h-o
۱٦ R_1	٥۰/۸۳ e-j	۲۹ R	۳۹/۱٦ g-o	۱۱۸	۲۰/٥ no
۱٦ R_2	۳۷/۱٦ g-o	۳۱R	٤۱/۱٦ g-n	۱۳۳	٥٦/۱٦ b-g
۱۹R_1	۷۲/٥ a-c	۱w	٤۹/۸۳ e-j	۱٥۲	٤۰/۸۳ g-n
				۱٦۰	۳٤/٥ 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 به‌ترتیب، بالا: صفر و ۱۰ میکرومولار پایین : ٥۰ و ۱۰۰ میکرومولار.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات آنتاگونیستی ترشحات خارج سلولی استرین‌های آنتاگونیست انتخابی روی رشد رویشی بیمارگر (*Rhizoctonia solani*).

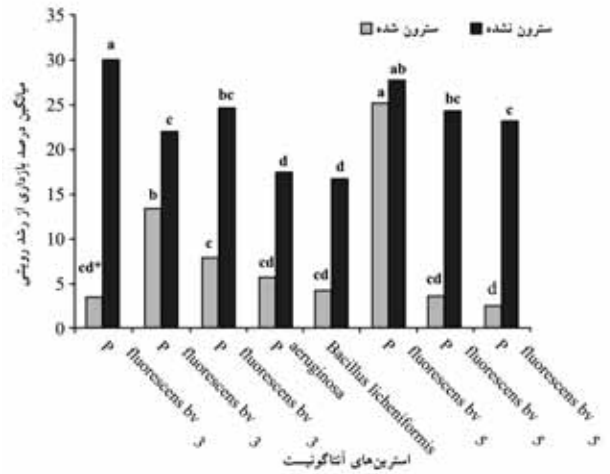
استرین آنتاگونیست (پلات فرعی)	غلظت ترشحات خارج سلولی٪ (پلات اصلی)			میانگین پلات فرعی *
	٥	۱٥	۲٥	
۷S	٦/۷۳b	۱۱/۹b	۳۹/۷٦b	۱۹/٤٦c
۹S	۷/۷۳b	۱۹/٦٦a	۲۸/۹٦cd**	۱۸/۷۸c
۱۳۳	۷/٤٦b	۱۸/٦۳a	٤۷/٥a	۲٤/٥۳b
۱٥۲	۱۰b	۱۳/۲٦b	۲۹/۱٦cd	۱۷/٤۷c
۲۱ R_2	٦/۹۳b	۱۱/۸٦b	۳۱c	۱٦/٦c
۲۳R	۱٥/۷a	۲٤/۳٦a	٤۲/٦ab	۲۷/٥a
۱٥R	۷/۹٦b	۱۹/۹۳a	۲۸/۷cd	۱۸/۸٦c
۲۹R	۱۰/٦b	۱۹/٦a	۲۳/۳d	۱۷/٦۷c
میانگین پلات اصلی	۹/٤	۱۷/۳٥	۳۳/۱۷	۲۰/۱۲

* میانگین پلات فرعی به‌صورت میانگین بازداری از رشد رویشی است.

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

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲– مقایسه تاثیر ترشحات خارج سلولی سترون شده و سترون نشده استرین‌های آنتاگونیست انتخابی روی رشد رویشی بیمارگر (*Rhizoctonia solani*) (غلظت=۲۵درصد) *تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند تفاوت معنی‌داری با همدیگر ندارند (DMRT 5%).

ویژگی آنتاگونیستی باکتری‌ها جهت بیوکنترل ممکن است توسط آنتی‌بیوزیس، رقابت یا پارازیتیسم فراهم گردد (چت و همکاران، ۱۹۹۰). عوامل بیوکنترل باکتریایی با تولید یک سری متابولیت‌های خارج سلولی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها (فنازین‌ها، پیرول‌ها، 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 میسلیوم قارچ عامل بیماری در محدودهٔ منطقه بازدارندگی در آزمون کشت متقابل در محیط غذایی P.D.A دچار تغییرات زیادی گردید. تغییرات میسلیومی 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 آنتی بیوزیس‌های به‌دست آمده از سودوموناس GRC_2 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 اسکلروت، چروکیدگی هیف، تغییر شکل و لیز شدن میسلیوم و اسکلروت را در *M. phaseolina* را 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 سبب لیز شدن و تغییر شکل آنها می‌گردند اما به هرحال دخالت مستقیم این متابولیت‌ها در آنتاگونیسم مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در شرایط آزمایشگاهی که نشان‌دهندهٔ 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 آسترین‌های 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 دربارهٔ عوامل کنترل بیولوژیک در مناطق مختلف دنیا و همچنین تحقیقات روز افزون دربارهٔ 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.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳- تغییرات میسلیوم بیمارگر (*Rhizoctonia solani*) در منطقه واکنش در آزمون کشت متقابل با استرین‌های آنتاگونیست.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه همه کارکنان موسسه تحقیقات برنج کشور ـ رشت به‌خصوص آقایان مهندس پاداشت، دودابی‌نژاد و پورفرهنگ، خانم‌ها مهندس موسی‌نژاد و بخشی‌زاد تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱.کاظم‌زاده‌چکوسری، م. ۱۳۷۲. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی بیماری سوختگی غلاف برگ برنج (*Rhizoctonia solani*) توسط برخی عوامل بیوکنترل باکتریایی. پایان‌نامه تحصیلی کارشناسی‌ارشد در رشته بیماری‌شناسی 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 flourescent Pseuodomonas 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 *Gauemannomyces 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. Devolopment of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* $PfALR_2$ for management of rice sheath blight. Crop Protect. 15, 715-7.

15.Rosales, A.M., Nugue, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Wegger, L.A.D., Van der Vlught, C.I.M., Wijfjes, 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 flourescent pseudomonas. Phytopathol. 78: 1094-1100.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(6), Feb - Mar 2006
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[1], F.Padasht[2], GK. Khodakaramian[3] and A. Rostai[4]
[1]Dept., of Jehad Agricultural management, Astuneh-Ashrafieh, [2]Rice Research Institute, Dept., of Plant protection Rasht, [3]Plant protection Dept., Faculty of A griculture Tarbiat Modarres Univ., [4]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 preventation 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

www.SID.ir