مجله علمی-پژوهشی

علوم کشاورزی

سال دوازدهم، شماره (۴) ۱۳۸۵

تاثیر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* روی *Rhizoctonia solani* Kühn عامل بیماری سوختگی غلاف برنج

مصطفی نیک‌نژاد کاظم‌پور

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

Archive of SID

چکیده

در این تحقیق تاثیر تعدادی از جدایه‌های باکتریائی آنتاگونیست علیه *Rhizoctonia solani* عامل سوختگی غلاف برنج جداسازی شده مزارع آلوده برنج در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفتند و در مجموع ۲۸۸ جدایه باکتریائی از منطقه ریزوسفر برنج آلوده به قارچ فوق‌الذکر جداسازی گردیدند که ۸ جدایه از این باکتری‌ها با استفاده از روش کشت متقابل (Dual culture) در مقابل قارچ مذکور از خود خاصیت آنتاگونیستی بروز دادند. نتایج حاصل از آزمون‌های افتراقی جهت تشخیص جنس جدایه‌های آنتاگونیست نشان دادند که جدایه‌های B4، B6، B17، B18، B22، B24، B41 و B42 باکتری *Pseudomonas fluorescens* biovar 3 تشخیص داده شدند. در آزمایش تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست سودوموناس در بازداری از رشد *Rhizoctonia solani* مشخص گردید که کلیه جدایه‌ها قادر به جلوگیری از رشد قارچ مذکور بودند. ترشحات مایع برون یاخته‌ای و آنتی‌بیوتیک این جدایه‌ها نیز از رشد ریسه قارچ مذکور ممانعت بعمل آوردند. از سوی دیگر تمامی جدایه‌های *P. fluorescens* روی محیط کشت King B محتوی ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلریدآهن تولید سیدروفور نموده و از رشد قارچ *Geotrichum candidum* ممانعت به عمل آوردند. نتایج حاصل از تاثیر جدایه‌های آنتاگونیست سودوموناس روی جوانه‌زنی و لیز کردن اسکلروت‌های *R.solani* در محیط کشت King B و در خاک نشان داد که کلیه جدایه‌ها در ممانعت از جوانه‌زنی و لیز شدن اسکلروت‌های قارچ مؤثر هستند. جدایه B41 با ۶۶ و ۶۸ درصد بترتیب باعث مانع از جوانه‌زنی و لیز شدن اسکلروت گردید. نتایج حاصل از آزمایش کلنیزاسیون ریشه برنج نشان داد که جدایه‌های B42، B41 و B22 به ترتیب با اعداد لگاریتمی ۳/۶۷، ۲/۹۸ و ۲/۹۴ سبب افزایش سلول باکتری در هر گرم ریشه و قابلیت استقرار و تکثیر در روی ریشه برنج را داشتند.

واژه‌های کلیدی: برنج، سوختگی غلاف، *Rhizoctonia solani*، باکتری‌های آنتاگونیست، اسکلروت

تاریخ دریافت مقاله ۸۳/۸/۳ تاریخ دریافت نسخه نهایی ۸۴/۱۱/۱

www.SID.ir

مقدمه

بیماری سوختگی غلاف (sheath blight) برنج در اثر *Rhizoctonia solani* Kühn یکی از بیماری‌های مهم برنج در ایران و اکثر کشورهای برنج خیز جهان محسوب می‌شود و در شرایط مساعد روی ارقام پـر محـصول و حـساس بـرنج در اسـتان‌هـای گـیلان و مازندران می‌تواند آلودگی‌های نسبتا شدیدی ایجاد نموده و منجر به بروز خسارت شود. در بین ارقـام موجـود در ایـران رقـم مقـاوم وجود ندارد (۳). در سایر کشورهای برنج خیز دنیا تحقیقات برای بررسی مقاومت در برابر بیماری سوختگی غـلاف بـرنج تحقیقـات زیادی انجام شده است لیکن که از میان هزاران ژرم پلاسم بررسی شده تاکنون سطح مقاومت بالایی در برابر قارچ عامل بیماری بـه دست نیامده است. این بیماری بعد از بیماری بلاست برنج مهمترین بیماری از لحاظ اقتصادی در اکثر کشورهای برنج خیز آسـیایی محسوب می‌شود، به طوری که باعث کاهش میـزان محـصول در ایـن کـشورها از ۲۵ تـا ۵۰ درصـد شـده اسـت (۲۴). اسـتفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک و آنتی بیوتیک‌ها به صورت ضدعفونی بذر، ضد عفونی خاک و محلول پاشی روی گیاه به طور مـؤثر باعـث کنترل بیماری می‌شود. با این وجود، این روش‌ها گران و سبب آلودگی محیطی مـی‌گردنـد (۷). عوامـل بیـوکنترل مناسـب جهـت کنترل عوامل بیماری‌زای هوازی و خاکزی بایستی قادر به بقاء در منطقه ریزوسفر و فیلوسفر باشند. از میان انواع عوامل بیـوکنترل، سودوموناد‌های فلورسنت به خوبی قادرند در مناطق ریزوسفر و در فیلوسفر بقاء یابنـد (۲۶). بـرای برخـی جدایـه‌هـای سـودوموناد فعالیت آنتاگونیستی بر اساس تولید آنتی بیوتیک است در حالی که برای دیگر سودوموناس‌ها ماننـد *P.putida* جدایـه WCS358 فعالیت آنتاگونیستی بر اساس رقابت برای عنصر آهن می‌باشد (۳۵). اصلاحی و همکاران (۱) تاثیر آنتاگونیستی برخـی جدایـه‌هـای باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* را علیه عامل بیماری مرگ گیاهچه گزاذش کردنـد. آزاد دیـسفانی و همکـاران (۲) اثـر آنتاگونیستی برخی جدایه‌های *P. fluorescens* و *Bacillus* sp. از روی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پنبـه *Verticillium dahliae* بررسی کردند و بیان داشتند که این جدایه‌ها با تولید ترکیبات گازی و آنتی بیوتیک قادرند که از رشد ریسه‌ای قارچ عامل بیماری ممانعت نمایند. سجادی و همکاران (۴) تاثیر برخـی جدایـه‌هـای *P. fluorescens* را روی جوانـه‌زنـی بـذر بـرنج و تعـداد پنجه‌زنی بوته‌های برنج را مثبت ارزیابی نمودند. نیک‌نژاد کاظم‌پور و همکاران (۵) تاثیر چند قارچ‌کش و قـارچ‌هـای آنتاگونیـست را علیه سوختگی غلاف برنج در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که قارچ‌هـای آنتاگونیـست و قارچ‌کش بنومیل در شرایط گلخانه قادرند به ترتیب ۲۷/۵ و ۳۲/۵ درصد میزان بیماری را کاهش دهنـد. مطالعـات زیـادی در بـاره توسعه کاربرد فورمولاسیون‌های پودری تهیه شده از عوامل بیوکنترل جهت مبارزه با بیماری سوختگی غلاف در دنیا صورت گرفتـه است. مجموعه تجربیات فوق لزوم بررسی بیشتر روی سایر روش‌ها از جمله استفاده از ارقام مقاوم و روش‌های مفید دیگری که خطر کمتری برای محیط‌زیست داشته باشند را بیش از پیش آشکار ساخته است که از آن جمله می‌تـوان مبـارزه بیولوژیـک را نـام بـرد (۳۷). بکارگیری مبارزه بیولوژیک علیه عوامل بیماریزای خاکزی علاوه بر بی‌خطـر بـودن آنهـا بـرای محـیط زیـست (بـه خـصوص باکتری‌های آنتاگونیست) قادرند در خاک مزرعه مستقر شده و بقاء یابند و به عنوان عوامل بیوکنترل طبیعی عمل نمایند. بـا وجـود این، کنترل عوامل بیماریزای خاکزی به ویژه آنهایی که اینوکلوم آنها به صورت هوازی قادرند گیاه را آلـوده نماینـد از مـشکل‌تـرین موارد مبارزه با بیماری‌های گیاهی محسوب می‌گردند و علیرغم استفاده از روش‌های شیمیایی، فیزیکی، زراعی و غیره بـرای کنتـرل آنها در موارد متعدد خسارات قابل توجهی ایجاد نموده‌اند. استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به خـصوص عوامـل باکتریـایی زمینـه مناسبی برای مبارزه با قارچ *R.solani* می‌باشد. در این تحقیق به عملکرد تعدادی از جدایه‌های باکتریـایی آنتاگونیـست جداسـازی شده از منطقه ریزوسفر برنج‌های آلوده به*R.solani* جهت کنترل عامل بیماری سوختگی غلاف پرداخته شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

۱- جداسازی قارچ *R.solani*

گیاهان آلوده برنج آلوده از مزارع مختلف رشت جمع‌آوری گردیده، به آزمایشگاه انتقال داده شدند. بـه منظـور جداسـازی قـارچ مزبور ابتدا طوقه و غلاف آلوده به مدت ۵ دقیقه با جریان ملایم آب شسته شدند. سپس قطعاتی به طول یک سانتی‌متر از بافت‌های آلوده تهیه گردید. این قطعات به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شده و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در آب مقطر سترون شستشو داده شدند و بعد در تشتک‌های پتری به قطر ۹ سانتیمتر حـاوی محـیط کـشت PDA (عصاره سیب‌زمینی، قند و آگار) کشت گردیدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پرگنه‌های قارچی روی محیط کـشت آب آگار به روش نوک ریسه خالص‌سازی شدند.

۲- تکثیر *R.solani* و اثبات بیماریزایی آن روی رقم برنج خزر

برای این منظور ابتدا با استفاده از روش کریت لوو و همکاران (۱۸) ۳۰۰ گـرم بـذر جـو در فلاسـک‌هـای نـیم لیتـری سـترون گردیدند. سپس در هر یک از فلاسک‌ها یک قطعه از کشت ۵ روزه *R.solani* قرار داده شد. برای تیمار شاهد، جهت مخلوط نمودن با خاک تنها از بذر جو سترون استفاده گردید. فلاکس‌های تلقیح شده به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجـه سـانتی‌گـراد نگهـداری شدند پس از این مدت میسلیوم قارچ *R.solani* به خوبی روی دانه‌های جو رشد کرده و تولید اسکلروت و مایه تلقیح نمـود. جهـت اثبات بیماری‌زایی از روش سینگ و همکاران (۳۱) استفاده شد. بدین ترتیب ۰/۲ گرم از اسکلروت و میسلیوم قارچ در فـضای بـین غلاف و برگ قرار داده و سپس چند قطره آب در محل تلقیح ریخته شد.

۳- جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از خاک

۳-۱ - نمونه‌برداری خاک

نمونه‌های خاک از منطقه ریزوسفر گیاهان برنج سالم و آلوده از مناطق مختلف استان گیلان جمع‌آوری و بـه آزمایـشگاه انتقـال داده شد، نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از ۱۰ گیاه را با یکدیگر مخلوط کرده و از هر نمونه خاک مخلوط شده یک گـرم برداشـته شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون رقت‌های مختلف آن به طور سریال تهیه گردید.

۳-۲ - جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از خاک

یکصد میکرولیتر از هر رقت تهیه شده در بند ۳-۱ ، در محیط کشت آگار مغـذی (NA) کـشت گردیـد و در دمـای ۲۸ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. کلنی‌هائی که از نظر شکل و رنگ در محیط آگار مغـذی متفـاوت بودنـد انتخـاب و در درون لوله، خالص‌سازی گردیدند.

۴ - بررسی ایجاد هاله بازدارندگی توسط جدایه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتری به صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک‌ها و به فاصله یک سانتیمتر از حاشیه آنها در چهـار طـرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت NA+PDA به نسبت یک به یک (۱۲)، مایه‌زنی شدند. یک حلقه به قطـر پـنج میلـی‌متـر از کشت ۵ روزه قارچ *R.solani* در مرکز آنها قرار داده شد. در تشتک‌های پتری شاهد، فقـط از آب مقطـر سـترون اسـتفاده گردیـد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از ۱۲ روز که حاشیه پرگنه قارچ در تشتک‌های پتری شاهد به دیواره تشتک پتری برخورد نموده بود، فواصل بازدارندگی بین جدایه‌های باکتری و حاشیه پرگنه قارچ اندازه‌گیری گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

۵- آزمونهای افتراقی جهت تشخیص جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

جدایه‌های انتخاب شده در بررسی ایجاد هاله B4 ، B6 ، B17 ، B18 ، B22 ، B24 ، B41 و B42 طبق آزمونهای زیر مورد مقایسه قرار گرفتند.

واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت King B ، هیدرولیز نشاسته، ژلاتین، آرژنین و آرابینوز، آزمون استفاده از سیترات، آزمون کاتالاز، ایندول، لیسیتیناز، احیاء نیترات، تست فوق حساسیت ، رشد در نمک طعام، آزمون تولید لوان، لهانیدن سیب‌زمینی، آزمون اکسیداز، سیترات، هیدرولیز کازئین و ال- لیزین، استفاده از قندهای آرابینوز، اینوسیتول، تری هالوز، مالتوز، گالاکتوز و سوربیتول به روش شاد (۲۸) انجام شد.

۶- بررسی مکانیسم تأثیر جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی قارچ در شرایط آزمایشگاه

۶-۱ - بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضدقارچی

این آزمایش مطابق روش فیدامن و روزال (۱۳) به دو صورت زیر انجام شد.

۶-۲ - کشت همزمان جدایه‌های آنتاگونیست با قارچ R.solani

در این روش ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های باکتری با غلظت ۱×۱۰^{۸} در سطح محیط کشت NA پخش گردید و به طور همزمان حلقه‌هایی از حاشیه کشت چهار روزه قارچ *R.solani* در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA کشت گردیدند. سپس با رعایت شرایط سترون، تشتک‌های پتری حاوی قارچ بطور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های آنتاگونیست قرار داده شدند و لبه تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلم کاملا" مسدود گردید و در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت یک هفته نگهداری شدند. در تشتکهای پتری شاهد فقط حلقه‌ای از محیط کشت PDA حاوی قارچ *R.solani* در مقابل تشتک پتری حاوی NAبدون باکتری آنتاگونیست قرار داده شد.

۶-۳ - کشت جدایه‌های آنتاگونیست ۷۲ ساعت قبل از R.solani

این آزمایش نیزمانند آزمایش قبلی انجام گرفت با این تفاوت که باکتریهای آنتاگونیست ۷۲ ساعت قبل از بیمارگر کشت گردیدند. این آزمون درچهارچوب طرح کاملا" تصادفی در ۸ تیمار با ۳ تکرار انجام شد. رشد شعاعی ریسه قارچ اندازه‌گیری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت ودرصد بازدارندگی از رشد ریسه *R.solani* با استفاده از فرمول سیوان و همکاران (۳۲) محاسبه گردید.

۱۰۰ * قطر رشد پرگنه شاهد / (قطر رشد پرگنه تیمار - قطر رشد پرگنه شاهد) = درصد بازدارندگی از رشد

۶-۴ - بررسی تأثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

این آزمایش براساس روش سینگ و دوورال (۳۱) انجام شد. برای این منظور یک توده از هر جدایه‌آنتاگونیست در درون فلاسک‌های محتوی ۷۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع سترون (عصاره۲۵۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر) کشت داده شد. این فلاسک‌ها روی دستگاه تکان دهنده با ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرار گرفتند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در g × ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردید و هر یک جداگانه توسط صافی میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. عصاره سترون بدست آمده به نسبت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد به محیط کشت PDA سترون اضافه شد و در شرایط سترون به تشتک‌های پتری سترون انتقال داده شد. برای تیمار شاهد از محیط کشت مایع فاقد باکتری که از صافی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شده بود استفاده‌گردید.

پس از انعقاد محیط کشت، دیسکی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت ۵ روزه قارچ *R.solani* را برداشته، در مرکز تشتک‌پتری حاوی محیط غذائی، کشت داده شد. اندازه‌گیری قطر ریسه یک هفته بعد از کشت که کلنی قارچ تمام سطح تشتک‌پتری شاهد را

Archive of SID

www.SID.ir

پر کرده بود صورت گرفت. این آزمایش در چهارچوب فاکتوریل دو فاکتوره با طرح کاملا" تصادفی به اجرا درآمد. عامل اول جدایه آنتاگونیست در ۸ سطح و عامل دوم غلظت در ۳ سطح بود. برای هریک از غلظتها ۳ تکرار در نظر گرفته شد. قطر رشد ریسه در هر غلظت مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. درصد بازداری از رشد ریسه‌ای از رابطه ذکر شده در بند ۳ - ۶ محاسبه گردید.

۵-۶ - بررسی تولید آنتی‌بیوتیک

این آزمون مطابق روش کراس و لوپر (۱۵) انجام شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست با غلظت 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر و همچنین آب مقطر سترون بعنوان شاهد به محیط کشت NA+PDA اضافه گردیده، توسط میله شیشه‌ای در سطح محیط کشت پخش شدند. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از این مدت با استفاده از لام سترون، کلنی جدایه‌ها از سطح محیط کشت جمع‌آوری و تشتک‌های پتری بطور وارونه به مدت ۲۵ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس یک دیسک به قطر ۵میلی‌متر از حاشیه کشت پنج روزه قارچ *R.solani* برداشته و با رعایت شرایط سترون، در مرکز هر تشتک پتری کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری قطر رشد ریسه پس از ۷ روز انجام گردید. این بررسی در قالب طرح کاملا" تصادفی شامل ۸ تیمار با ۳ تکرار انجام شد و نتایج به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. درصد بازداری از رشد ریسه مطابق بند ۳- ۶ محاسبه گردید.

۶-۶ - بررسی تولید سیدروفور

این آزمون مطابق روش ویلر و کوک (۳۵) انجام شد برای این منظور جدایه‌های آنتاگونیست روی محیط کشت King B حاوی غلظتهای ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول کلریدآهن کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. سپس سوسپانسیون اسپور قارچ *Geotrichum candidum* روی محیط PDA مایع بر سطح تشتک پتری حاوی جدایه‌های آنتاگونیست افشانه شد. عدم رشد قارچ در اطراف باکتری، نشان‌دهنده تولید سیدروفور بوده است.

۷- بررسی تولید پروتئاز

با توجه به نقش تولید پروتئاز به عنوان یکی از مکانیسم های کنترل بیولوژیکی مطرح می باشد، این فاکتور بر اساس روش مارهوفر و همکاران (۲۲) بررسی شد. ابتدا محیط کشت Skim Milk Agar شامل پودر شیر ۱۵ گرم، آگار خونی ۴ گرم (Blood Agar base)، عصاره مخمر ۵ گرم و آگار باکتریولوژیک ۱۳/۵ گرم تهیه و اتوکلاو شد. تشتک های پتری حاوی SMA در ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شدند. تشکیل هاله بیرنگ در اطراف کلنی نشانه فعالیت پروتئاز می باشد.

۸- بررسی تأثیر جدایه‌های باکتریایی انتخابی روی جوانه‌زنی اسکلروت‌های قارچ *R.solani*

۱-۸ - تاثیر جدایه‌های باکتریائی روی جوانه‌زنی اسکلروتهای R. solani در محیط King B

برای این منظور ابتدا اسکلروت‌های قارچ عامل بیماری تهیه شده، روی بذور جو مطابق بند ۲ جمع‌آوری گردیدند. اسکلروت‌های تقریباً هم‌اندازه توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی سطحی شدند. سپس هر یک از جدایه‌های باکتری آنتاگونیست بطور جداگانه در فلاسک‌های محتوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشتKing B مایع (پروتئوز پپتون ۲۰ گرم، $MgSO_4$ ۴/۵ گرم، KH_2PO_4 ۴/۵ گرم، گلیسرول ۱۲ میلی‌لیتر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مایه زنی گردیدند. فلاسک‌های تلقیح شده، به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت مطابق روش تان و میو (۳۴) در هر یک از فلاسک‌ها ۴ عدد اسکلروت‌های قارچ عامل بیماری قرار داده شدند. فلاسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اسکلروت‌های تیمار

Archive of SID

www.SID.ir

شده با جدایه‌های باکتریائی به همراه اسکلروت‌های شاهد در ۵۰ میلی‌لیتر محیط King B مایع فاقد باکتری به فواصل مساوی از یکدیگر در ۴ طرف تشک‌های پتری محتوی محیط کشت PDA کشت گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند. پس از این مدت درصد جوانه‌زنی اسکلروت‌ها اندازه‌گیری گردید.

۸-۲ - بررسی تأثیر جدایه‌های باکتری آنتاگونیست روی جوانه‌زنی اسکلروت‌های R. solani در خاک تحت شرایط آزمایشگاه

این آزمایش بر اساس روش کنودسن و اسچن (۲۰) انجام شد. برای این منظور ۴/۵ کیلوگرم خاک زراعی به در شرایط اتوکلاو به مدت یک ساعت سترون گردید. ۹۰ گرم از خاک سترون شده، در ظرف پلاستیکی درب‌دار ۹ ×۹ ریخته شد و ۱۵ عدد اسکلروت قارچ *R.solani* روی آن پخش گردید. پس از آن ۲۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه باکتری با غلظت ۱×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر به هر ظرف اضافه گردیده وسطح آن نیز با ۳۰ گرم خاک پوشانده شد. پس از بستن درب ظرفها آنها را به مدت ۳ هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری کرده، پس از این مدت اسکلروت‌های قارچ خارج گردیدند. اسکلروت‌ها بعد از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، درتشتک‌های پتری محتوی PDA کشت داده شدند. تشتک‌های کشت داده شده، به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت تعداد اسکلروتهای جوانه‌زده ثبت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی باتیمار در ۳ تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایش (تعداد اسکلروتهای جوانه‌زده) مورد تجزیه و تحلیل‌آماری قرار گرفتند.

۸-۳ - بررسی تاثیر جدایه‌های باکتری انتخابی در لیز کردن (Lysis) اسکلروتهای قارچ R.solani تحت شرایط آزمایشگاه

این آزمایش بر اساس روش کنودسن و اسچن (۱۹) انجام شد. برای این منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست به کمک میله شیشه‌ای در سطح تشتک‌های پتری محتوی محیط آگار مغذی پخش گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از این مدت اسکلروتهای قارچ *R.solani* تهیه شده در روی بذور جو مطابق روش بند۲ جمع‌آوری گردیدند اسکلروت‌های تقریباً هم اندازه با محلول هیپوکلریدسدیم ۵ درصد طی ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی شده، ۱۵ عدد از آنها در هرتشتک پتری قرار داده شدند. در تشتک‌های پتری شاهد نیز به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک های پتری‌کشت داده شده به مدت ۶ هفته در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط آزمایشگاه نگهداری گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار در ۳ تکرار انجام شد و داده‌های بدست آمده از آزمایش (تعداد اسکلروتهای لیز شده) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

۹- بررسی کلنیزاسیون ریشه

این آزمایش مطابق روش شر و همکاران (۳۰) انجام شد. برای این منظور، سوسپانسیونی از جدایه‌های آنتاگونیست B4 ، B6 ، B17، B18، B22، B24، B41 و B42 به ترتیب با غلظت $۵/۶\times۱۰^{۶}$، $۴/۵\times۱۰^{۶}$ ، $۵/۵ \times ۱۰^{۶}$ ، $۳/۵ \times ۱۰^{۶}$ ، $۷/۵ \times ۱۰^{۶}$ ، $۲/۵\times۱۰^{۶}$، $۷/۸\times۱۰^{۶}$ و $۶/۶ \times ۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر صمغ عربی یک درصد تهیه گردید.سپس بذور سترون شده برنج رقم خزر به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون هر جدایه قرار داده شدند. پس از آن به وسیله کاغذ صافی سترون، رطوبت اضافی آنها گرفته شد.
سپس تا ارتفاع ۵ سانتیمتری لوله‌های آزمایش با ماسه ساحلی پر شده و روی آن با ۳ سانتیمتر از خاک مزرعه پوشانده شد. بعد از ریختن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به هر لوله و بستن درب آنها با پنبه و ورقه آلومینیومی، طی مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون گردیدند. درون هر لوله یک بذر آغشته به جدایه باکتریائی کشت گردید و سپس لوله‌ها به مدت ۵ هفته در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نگهداری شدند. برای هر جدایه ۲ بذر در درون ۳ لوله‌آزمایش کشت گردید. پس از ۶ هفته گیاهچه‌های برنج با دقت از داخل لوله‌ها بیرون کشیده شده، قطعات ریشه آنها در شرایط سترون با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون

Archive of SID

www.SID.ir

مخلوط گردیدند و به خوبی له شدند. جمعیت باکتریهای موجود در سوسپانسیون حاصل با تهیه سری رقت روی آگار مغذی و شمارش پرگنه‌ها (۲۱) محاسبه گردید و در نهایت جمعیت باکتریهای قرار گرفته روی ریشه برای هر جدایه بدست آمد.

نتایج

۱- تعیین بیماریزایی جدایه قارچ R.solani

بوته‌های برنج پس از ۸ هفته علائم سوختگی غلاف را بطور کامل نشان دادند. در آزمون کخ نیزخصوصیات میکروسکوپی قارچ جدا شده از بوته‌های آلوده، با قارچ تلقیح شده کاملاً یکسان بود.

۲- جداسازی باکتریها

در این بررسی در مجموع ۲۸۸ جدایه باکتریایی جداسازی گردید. نتایج نشان داد که از مجموعه جدایه‌های باکتری، ۸ جدایه بیشترین قدرت را در ایجاد هاله بازدارندگی داشتند که به عنوان جدایه‌های آنتاگونیست انتخاب شدند.

۳- خصوصیات افتراقی باکتریهای آنتاگونیست

بر اساس آزمون رنگ آمیزی گرم مشخص گردید که کلیه جدایه های آنتاگونیست انتخابی گرم منفی بودند که خصوصیات افتراقی آنها در جدول (۱) منعکس شده است.

جدول ۱ - خصوصیات افتراقی باکتریهای آنتاگونیست جداسازی شده از ریزوسفر گیاه برنج

آزمایش	جدایه							
	B4	B6	B17	B18	B22	B24	B41	B42
رنگ‌آمیزی گرم	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد بی‌هوازی	-	-	-	-	-	-	-	-
تولیدرنگدانه فلورسنت	+	+	+	+	+	+	+	+
فوق حساسیت	-	-	-	-	-	-	-	-
لهانیدن سیب‌زمینی	-	-	-	-	-	-	-	-
دی هیدرولیز آرژنین	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوان	+	+	+	+	+	+	+	+
احیاء نیترات	+	-	-	-	-	-	-	-
کاتالاز	-	-	-	-	-	-	-	-
استفاده از توئین ۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	-	-	-	-	-	-	-	-
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+	+	+	+	+
ایندول	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید H_2S	+	+	-	+	+	+	-	+
لیسیتیناز	+	+	+	+	+	+	-	-

Archive of SID

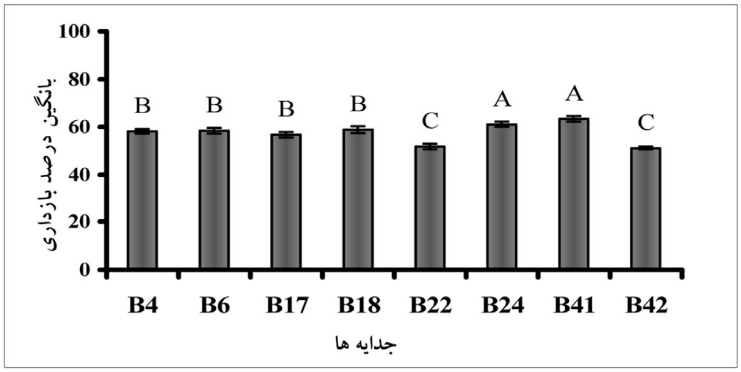
www.SID.ir

هیدرولیز کازئین	+	+	−	+	−	−	−	−
استفاده از ال- لیزین	+	+	+	+	+	+	+	+
سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+
تحمل نمک طعام (۵٪)	+	+	+	+	+	+	+	+
استفاده از آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+	+
اینوسیتول	+	+	+	+	+	+	+	+
تری هالوز	+	+	+	+	+	+	+	+
مالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	+	+	+	+	+	+	+	+
ساکاروز	+	+	+	+	+	+	+	+
مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+
رافینوز	+	+	+	+	+	+	+	+
زایلوز	+	+	+	+	+	+	+	+

براساس آزمون‌های فوق و کلید موجود در کتاب شاد (۲۹) کلیه جدایه‌ها *Pseudomonas fluorescens* biovar 3 شناسایی شدند.

۴-مکانیسم‌های بازدارندگی جدایه‌های باکتریائی آنتاگونیست

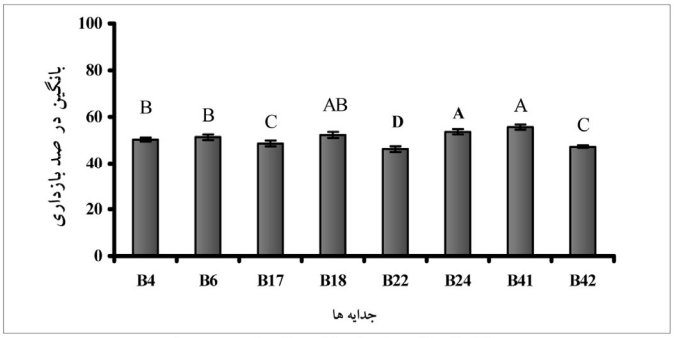
۱-۴- نتایج حاصل از تأثیر ترکیبات فرار ضدقارچی جدایه‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد ریسه‌ای *R.solani* در کشت همزمان و ۷۲ ساعته کلیه تیمارها در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری داشتند. براساس مقایسه میانگین‌ها کلیه ۸ جدایه آنتاگونیست نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ بودند. جدایه های B41 و B24 بترتیب با ۶۳/۳۳ و۶۱/۱۱ درصد دارای بیشترین و جدایه‌های B22 و B4 به ترتیب ۵۱/۸۵ و ۵۱/۱۵ درصد دارای کمترین تأثیر بازداری از رشد ریسه‌ای *R.solani* داشتند. در شرایطی که جدایه‌های باکتریائی آنتاگونیست ۷۲ ساعت قبل از قارچ کشت داده شده بودند، جدایه‌های B41 با ۵۵/۶۶ درصد دارای بیشترین و جدایهB22 با 33/46 درصد دارای کمترین تأثیر در جلوگیری از رشد ریسه‌ای *R.solani* بودند (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های سودوموناس در جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ *Rhizoctonia solani* در کشت همزمان

Archive of SID

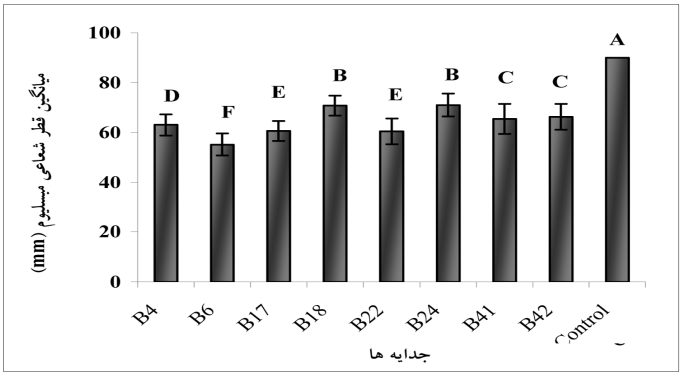
www.SID.ir



شکل ۲- تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های سودوموناس در جلوگیری از رشد *Rhizoctonia solani* در کشت ۷۲ ساعته باکتری‌ها

۵- تأثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای در جلوگیری از رشد ریسه‌ای R.solani

اختلاف بین جدایه های آنتاگونیست و غلظت هر عصاره و اثر متقابل این دو در بازداری از رشد ریسه ای *R. solani* در سطح یک در صد معنی دار بود. بر اساس مقایسه میانگین اثر متقابل ترشحات مایع برون سلولی ، جدایه های B18، B24، B41 و B42 بیشترین تاثیر را در بازداری از رشد ریسه ای *R.solani* داشته و درصد بازدارندگی در غلظت **۲۵٪** (حجم به حجم) بترتیب ۸۵/۷، ۸۸/۱۶، ۸۹/۶ و ۸۷/۵ و در غلظت **۱۵٪** (حجم به حجم) بترتیب ۷۰/۱، ۷۳/۵، ۷۹/۶۸ و ۷۸/۵۸ بود. از بین این دو غلظت جدایه‌های B6 وB17 از لحاظ درصد بازداری از رشد ریسه‌ای *R.solani* در گروه پایین‌تری نسبت به جدایه B42 قرار گرفته و در غلظت ۲۵٪، ۷۲/۷ درصد بازداری نسبت به شاهد داشتند (شکل ۳).

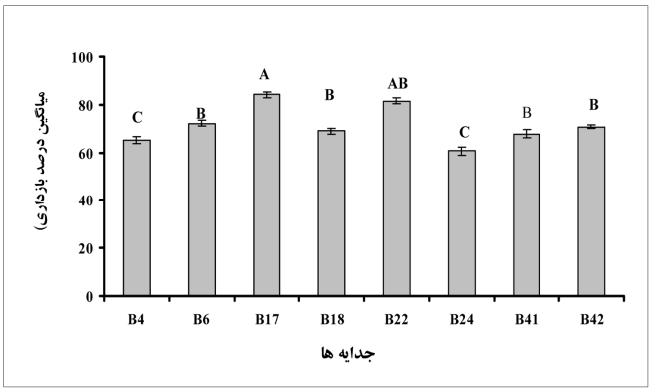


شکل ۳- تاثیر ترشحات برون یاخته‌ای جدایه‌های مختلف آنتاگونیست در بازداری از رشد ریسه‌ای *Rhizoctonia solani*

۶- نتایج حاصل از تولید آنتی‌بیوتیک

تمام جدایه های آنتاگونیست جداسازی شده قادر به تولید آنتی بیوتیک بودند. این جدایه ها تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ با شاهد داشتند. بر اساس مقایسه میانگین‌ها جدایه‌های B17 و B42 بترتیب ۸۴/۷ و ۷۰/۷۴ و جدایه B24 با ۶۰/۷۴ درصد بترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را در بازداری از رشد داشتند (شکل ۴).

www.SID.ir



شکل ۴- تاثیر آنتی‌بیوتیک جدایه‌های سودوموناس در جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ *Rhizoctonia solani*

۷- تولید سیدروفور

هر ۸ جدایه B4، B6، B17، B18، B22، B24، B41 و B42 در محیط King B محتوی ۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول‌کلرید آهن قادر به تولید سیدروفور بودند و در نتیجه از رشد میسلیومی *G. candidum* ممانعت بعمل آوردند. چنین بنظر می‌رسد که جدایه‌های آنتاگونیست جداسازی شده از مزارع برنج قادر به تولید سیدروفور می باشند.

۸- تولید پروتئاز

کلیه جدایه های آنتاگونیست مورد بررسی تولید پروتئاز کرده و روی محیط Skim milk agar تولید هاله بیرنگ کردند که از نظر قط هاله با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند.

۹- کلنیزاسیون ریشه

نتایج حاصل از میزان افزایش جمعیت جدایه‌های باکتریائی در روی ریشه گیاهچه‌های برنج شش هفته بعد از کشت بذور نشان داد که تراکم جمعیت سلولهای باکتری در روی بذور تقریباً در مورد اکثر جدایه‌ها تقریبا یکسان بود. جدایه B42 لگاریتم تعدادسلول متصل به بذر بلافاصله پس از تلقیح ۵/۵۵ ($۳/۵ \times ۱۰^{۴}$) بوده.و پس از ۶ هفته لگاریتم تعدادسلول در هر گرم ریشه برنج به ۸/۴۲ ($۲/۶ \times ۱۰^{۸}$) افزایش پیدا نمود که بیشترین تاثیر را در کلنیزه کردن ریشه گیاهچه های برنج داشت.

جدول ۲ـ میزان کلنیزاسیون ریشه برنج توسط جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست در آزمایشگاه

جدایه‌های باکتریائی	لگاریتم تعداد سلول باکتری متصل به بذر	*لگاریتم تعداد سلول باکتری* در هر گرم ریشه	لگاریتم افزایش تعداد سلول در هر گرم ریشه
B4	۵/۵۵	۸/۴۲	bc۲/۸۷
B6	۵/۵۲	۸/۱۵	c۲/۶۳
B17	۵/۴۵	۸/۳۵	bc۲/۷۷
B18	۵/۵۱	۸/۲۸	c۲/۷۷
B22	۵/۵۸	۸/۴۱	bc۲/۹۴
B24	۵/۴۷	۸/۲۵	c۲/۷۸
B41	۵/۵۷	۸/۵۵	b۲/۹۸
B42	۵/۴۸	۹/۱۵	a۳/۶۷

داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند.

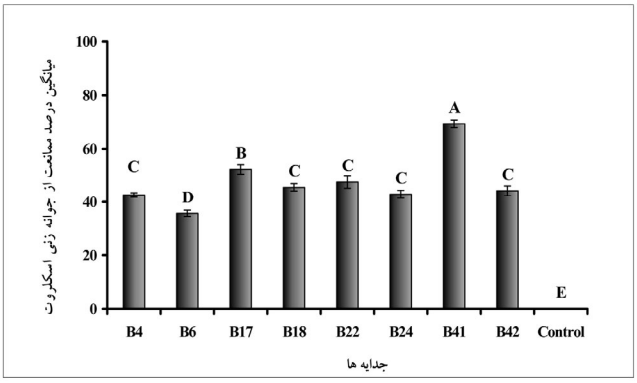
Archive of SID

www.SID.ir

۱۰- نتایج حاصل از تاثیر باکتریهای آنتاگونیست در جلوگیری از جوانه‌زنی اسکلروتهای R.solani

۱۰-۱ - ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروتهای قارچ *R.solani* پس از قرار دادن در محیط کشت King B محتوی باکتریهای آنتاگونیست

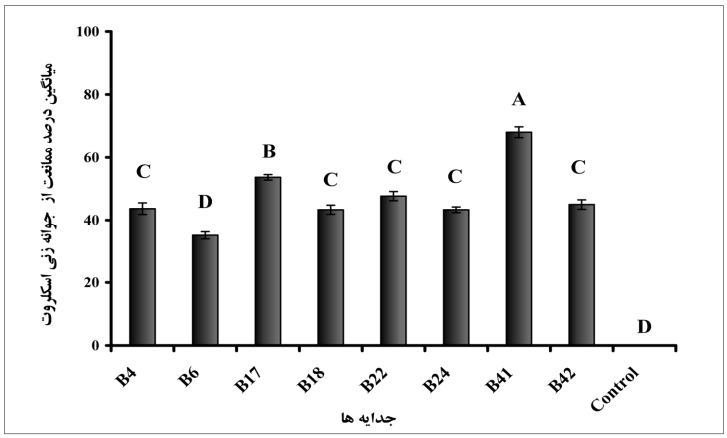
کلیهٔ تیمارها نسبت به شاهد در سطح ۱٪ دارای تفاوت معنی داری بودند. در این بررسی در بین سودوموناسهای آنتاگونیست جدایه B41 بیشترین تاثیر را در جلوگیری از جوانه‌زنی اسکلروت‌های قارچ عامل بیماری داشت (شکل ۵).



شکل ۵ - تاثیر جدایه سودوموناس در جلوگیری از جوانه زنی اسکلروتهای *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه

۱۰-۲- نتایج تاثیر جدایه‌های باکتریائی روی جوانه‌زنی اسکلروتهای قارچ عامل بیماری در خاک

کلیه جدایه‌های آنتاگونیست نسبت به شاهد در سطح ۱٪ دارای تفاوت معنی‌داری بودند. جدایهB6 با ۳۵ درصد کمترین تاثیر و جدایه B41 با ۶۸ درصد دارای بیشترین تاثیر را در ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروتهای *R.solani* داشتند (شکل ۶).

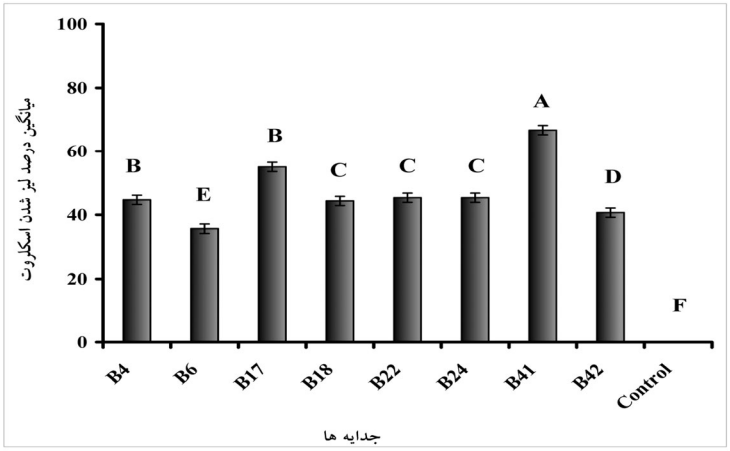


شکل ۶ - تاثیر جدایه سودوموناس در جلوگیری از جوانه زنی اسکلروتهای *Rhizoctonia solani* در خاک

۱۰-۳- نتایج تاثیر جدایه‌های باکتریائی انتخابی در لیز نمودن (Lysis) اسکلروتهای قارچ *R.solani* در آزمایشگاه

کلیه جدایه‌های آنتاگونیست نسبت به شاهد در سطح ۱٪ دارای تفاوت معنی‌داری بودند. جدایه B41 با ۶۶/۶۷ درصد دارای بیشترین تاثیر و جدایه B6 با ۳۵/۶۷ درصد دارای کمترین تاثیر در لیز کردن اسکلروتهای *R.solani* داشتند (شکل ۷).

www.SID.ir



شکل ۷ - میزان تاثیر جدایه‌های سودوموناس در لیز شدن اسکلروت‌های *Rhizoctonia solani*

بحث

در این تحقیق مجموعا" ۲۸۸ جدایه باکتریائی از منطقه ریزوسفر برنج آلوده جداسازی گردیدند که توانائی آنتاگونیستی ۸ جدایه از این باکتریها علیه قارچ عامل بیماری با استفاده از روش کشت متقابل (Dual culture) به اثبات رسید. هر چند که کلیه جدایه های آنتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* biovar 3 از منطقه ریزوسفر برنج جداسازی شده بودند ولی مشخص گردید که توانایی آنتاگونیستی متفاوتی با یکدیگر دارند. جدایه‌های آنتاگونیست در آزمونهای افتراقی از نظر احیاءنیترات، هیدرولیز کازئین، تولید H_2S، آزمون لیسیتیناز تفاوتهائی را با یکدیگر نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های افتراقی، همه ۸ جدایه B4، B6، B17، B18، B22، B24، B41 و B42 در جنس *P. fluorescens* قرار گرفتند. تاثیر ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه‌های آنتاگونیست روی رشد ریسه‌ای قارچ *R.solani* مورد مطالعه قرار گرفت و معلوم شد که کلیه این جدایه‌ها ترکیبات فراری را تولید می‌نمایند که تاثیر مطلوبی در بازداری از رشد ریسه‌ای قارچ *R.solani* دارد. از جمله ترکیبات فراری که توسط جدایه‌های *P. fluorescens* تولید می‌شود می‌تواند سیانید هیدروژن باشد که در بررسی‌های انجام شده توسط کاستریک و کاستریک (۹) تولید آن توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنس به اثبات رسید. در بررسی تاثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای جدایه‌های سودوموناس در بازداری از رشد ریسه‌ای قارچ *R.solani* در آزمایشگاه، مشخص گردید که تمامی جدایه‌ها ترشحاتی را تولید می‌کنند که در جلوگیری از رشد ریسه‌ای *R.solani* مؤثرند. تحقیقات مفصلی در مورد نوع ترکیبات موجود در ترشحات مایع برون یاخته‌ای جدایه‌های *P. fluorescens* صورت گرفته است و مشخص گردیده که یکی از ترکیبات مهم آنها آنتی‌بیوتیکهاست که انواعی از آنها از قبیل آنتی‌بیوتیکهای فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید، ۲ هیدروکسی- فنازین- ۱- کربوکسیلیک اسید، ۲- هیدروکسی- فنازین، ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوسینول، پیولوتئورین و پیرولینیترین توسط محققینی چون ساوچوک و همکاران (۲۸) و دلافوئنت و همکاران (۱۰) از جدایه‌های *P. fluorescens* گزارش گردیدند و اثرات آنها در بازداری از رشد ریسه‌ای قارچها، باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها به اثبات رسیده است. در آزمایش تاثیر آنتی‌بیوتیک جدایه‌های *P. fluorescens* در جلوگیری از رشد ریسه‌ای قارچ *R.solani* روی محیط کشت PDA مشخص گردید که آنتی‌بیوتیک تولید شده توسط این جدایه‌ها، باعث بازداری از رشد قارچ مذکور در مقایسه با شاهد می‌گردد. سیدروفورها کلاته‌کننده‌های قوی آهن فریک با وزن مولکولی کم بوده که تحت شرایط کمبود آهن تولید می‌شود و تولید آن بعنوان یکی از مکانیسم‌های مهم بیوکنترل گزارش گردیده است (۱۷). در بررسی‌های انجام شده پیرامون تولید سیدروفور توسط جدایه‌های *P. fluorescens* ، هر ۸ جدایه توانستند در محیط کشت King B محتوی ۵، ۵۰ و ۱۰ میکرومول کلریدآهن از رشد *Geotrichum candidum* جلوگیری نمایند. بیشتر جدایه های سودوموناس می توانند از رشد

Archive of SID

www.SID.ir

دیگر میکروارگانیسم ها در محیط با آهن کم جلوگیری نمایند و سیدروفورهای خالص شده آنها نیز اثرات آنتاگونیستی مشابهی دارند (۶). میرکادو- بلانکو و همکاران (۲۳) گزارش نمودند که جدایه *P. fluorescens* WCS374 تولید دو نوع سیدروفور به نامهای پزدوباکتین و پزدومونین می‌نمایند. کلونیزه کردن ریشه توسط آنتاگونیستهای باکتریائی، یک شرط مهم در توانائی آنها برای کنترل بیماریهای ریشه است. توانائی کلنیزه‌کردن ریشه بقدری مهم است که برخی از محققین آنرا مبنای انتخاب آنتاگونیست برتر در نظر می‌گیرند (۱۵ و ۱۸). در این تحقیق مشخص گردید که تمام جدایه‌های انتخابی قادر به افزایش جمعیت خود در شرایط آزمایشگاه روی ریشه برنج بودند که این توانائی در سه جدایه B42 ، B41 و B22 بارزتر بود. کلونیزه کردن ریشه و تغییرات جمعیت آنتاگونیستهای بکار گرفته شده تاکنون توسط محققین زیادی از جمله چاین-آ-ونگ و همکاران (۱۱)، بالیق و همکاران (۸) بررسی شده است.

در بررسی تاثیر جدایه‌های باکتری در ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت، ضریب همبستگی بین میزان ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌ها توسط جدایه‌های آنتاگونیست در محیط King B با ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌های قرار داده شده در خاک مثبت (r = ۰/۷۹) و در سطح ۱٪ معنی دار بود که نشان‌دهندهٔ ارتباط معنی‌دار بین این دو آزمایش می‌باشد لذا می توان برای تعیین نقش باکتری‌های آنتاگونیست در بازداری از جوانه‌زنی اسکلروت‌ها یکی از این دو روش را بکار برد. ضریب همبستگی بین تولید ترشحات مایع برون سلولی و میزان ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌ها در محیط King B مثبت (r = ۰/۶۳) و در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. میزان ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌های قرار گرفته در خاک که با سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست مایه زنی شده بودند با تولید ترشحات مایع برون یاخته‌ای توسط این جدایه‌ها نیز دارای ضریب همبستگی معنی‌دار و مثبت (r =۰/۷۲) در سطح ۱٪ بودند. این نتایج بیانگر احتمالا نقش متابولیت‌های ثانویهٔ موجود در ترشحات مایع برون یاخته‌ای جدایه‌های انتخابی می‌باشد که در ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌ها مؤثر هستند. ضریب همبستگی بین میزان ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌ها در محیط King B با تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌های آنتاگونیست مثبت (r۰/۸۱ =) و در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. از سوی دیگر میزان ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌های قرار گرفته در خاک با تولید آنتی‌بیوتیک توسط جدایه‌های انتخابی دارای ضریب همبستگی مثبت (r =۰/۸۶) و در سطح ۱٪ معنی‌دار بود که این بیانگر احتمالا نقش مؤثر آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط جدایه‌های آنتاگونیست در ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌های *R.solani* می‌باشد. میزان لیز شدن اسکلروت‌ها با تولید ترشحات مایع برون سلولی جدایه‌های آنتاگونیست انتخابی دارای ضریب همبستگی معنی‌دار ومثبت (r=۰/۸۲) در سطح ۱٪ بود. این ارتباط نشان دهندهٔ وجود ترکیبات آنزیمی لیز کنندهٔ دیوارهٔ سلولی اسکلروت‌ها در ترشحات مایع برون سلولی می‌باشد. نتایج بدست آمده از این دو آزمایش با نتایج بدست آمده توسط رامامورتی و همکاران (۲۷) و گابریئل و همکاران (۱۴) مطابقت داشت. از نتایج بدست آمده می‌توان چنین استنباط نمود که با توجه به اینکه اسکلروت‌های زمستانگذران *R.solani* در اپیدمی بیماری سوختگی غلاف نقش مهمی ایفاء می‌کنند، لذا با توجه به نقش موثر جدایه‌های سودوموناس آنتاگونیست در ممانعت از جوانه‌زنی اسکلروت‌ها و در لیز نمودن آنها ایفاء نموده‌اند می‌توان از این جدایه‌ها در کنترل بیماری استفاده نمود.

منابع و مآخذ:

۱. اصلاحی، م. ر. فرخی‌نژاد، ر. و م. شمس بخش. ۱۳۷۹. جداسازی تشخیص و مطالعه اثر آنتاگونیستی برخی از جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر روی بعضی از عوامل ایجاد کننده مرگ گیاهچه در خوزستان. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. ایران. صفحه ۱۸۰.

۲. آزاد دیسفانی، ف. ع. شریفی تهرانی، ق. حجارود، م. محمدی و ح. روحانی. ۱۳۷۹. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* روی قارچ *V.dahlia*، عامل پژمردگی پنبه، چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۵۷.

Archive of SID

www.SID.ir

۳. ایزدیار،م. ۱۳۶۴. بیماری سوختگی غلاف برنج و راه‌های مبارزه با آن. نشریه تحقیقاتی. شماره ۲۲۳. انتشارات سازمان ترویج کشاورزی. ۱۳ صفحه.
۴. سجادی، الف.، حسن‌زاده، ن، بهرامی، م. و و. خسروی. ۱۳۸۳. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی بیماری شیت بلایت، جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه برنج. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه تبریز. صفحه ۱۰۳.
۵. نیک‌نژاد کاظم‌پور، م. پدرام‌فر، ح. و س. ع. الهی‌نیا. ۱۳۸۱. بررسی اثر چند قارچکش و قارچ آنتاگونیست علیه عامل بیماری سوختگی غلاف برنج در اثر *Rhizoctonia solani* Kühn . مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی . جلد ششم . شماره چهارم . صفحه ۱۵۷-۱۵۱ .

6. Baker, PA., R. Van Peer and B. Schippers. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogen by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and prospect. In biotic interaction and soil born disease. Elsevier Sciences Publisher, USA – pp. 217-230.
7. Bonmann, T.M., G.S. Khush and R.J. Nelson. 1992. Breeding rice for resistance to pest. Ann. Rev. Phytopath. 30: 507-528.
8. Baligh, M., M.A. Delgado and K.E. Conway 1999. Evaluation of *Burkholderia cepacia* strains:Root colonization of *Catharanthus roseus* and *in vitro* inhibitation of selected soil-born fungal pathogens, Department of Entomology and Plant Pathology, oklahoma state university.
9. Castric, K. F. and P. Castric. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 45: 701-702.
10. Chin-A-Woeng, T. F. C., A.J.V. Priester and B.J.J. Lugtenberg. 1997. Description of colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain Wcs365, using scanning electron microscopy. MPMI Journal. 10:79-86.
11. De Lafuente, L., N. Bajsa, P. Bagnasco, L. Quagliotto, L. Thomashow and A. Arias. 2001, Antiobiotic production by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere.
12. Expert, J. M. 1995. Lutte biologique contxe les attaques précoces de *Sclerotinia sclerotiorum* du tournesol à l´aide de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Bacillus* spp. Thèse Université Claud Bernard- Lyon1. France. 130pp.
13. Fiddaman, P. J. and K. Rossall 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 76:395-405.
14. Gabriele, B., J. Frankowski and H. Bahl. 1998. Biocontrol of *Verticillium* wilt in oilseed rape by chitinolytic *Serratia plymuthica*. University of Rostock, Microbiology, Gertrudenstrasse 11a, D-18051 Rostock.
15. Kraus, J. and J.E. Loper. 1990, Biocontrol of *Pythium* damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf5: Mechanistic studies pp. 177. *In:* Keel, C. Koller, B. and Defago, G(eds.). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The Second International Workshop on plant growth promoting rhizobacteria, Interlaken, Switzerland.
16. Kloepper, J. M., J. Leong, M. Teintzte and M.N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. Current Microbiol. 4: 317-320.
17. Kloepper, J. W. 1991. Development of *in vivo* assay for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. Phytopathol. 81: 1006-1013.
18. Kreit Low, K. W. 1949. Agriculture Experiment Station. *In*: http. izaak. Unh. Edu/archives/guides /scicontributions. Htm-101k.
19. Kuiper, I., L.V., B. Kravchenko and B.J.J. Lugtenberg. 2002. *Pseudomonas putida* strain Pcl1444, selected for efficient root colonization naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components, MPMI Journal, 15:734-741.
20. Knudsen, G. R. and D.J. Eschen. 1991, Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. Plant. Dis. 15: 466-470.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Luisetti, J. and Paulin, J.P. 1972. Recherche de *Pseudomonas syringae* a la surface des organes aeriens du poirier et etudes de ses variations quantitatives. Ann. Rev. Phytopathol. 4 : 215-227.
22. Maurhofer, M., C. Keel, D. Haas and G. Defago. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. Plant Pathology, 44:40-50.
23. Mercado, B. J., C.M.G.M. Vanderdrift, P.E. Olsson, O.J.E. Thomas, L.C. Vanloon and P.A.H.M. Bakker. 2001, Analysis of the *Pms* CEAB Gene Cluster involved in Biosynthesis of Salicylic Acid and the siderophore Pseudomonine in biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Wcs374, Bacteriology, 183(6): 1909-1920.
24. Ou, S.H. 1985. Rice Disease. Commonwealth Mycological Institut, Key, Surrey.
25. Park, J.L., R.E. Rand and E.B. King. 1991. Biological control of pythium damping – off and Aphenomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P.fluorescens* to seed. Plant Disease. 75:987-992.
26. Rabindran, R.., and P. Vidhysaekaran. 1996. Development for formulation of Pseudomonas fluorescens PfALR2 for management of rice sheath blight. Crop Protection. Vol. 15. No.8. 715- 721.
27. Ramamoorthy, V., R. Viswanathan, T. Raguchander, V. Prakasam and R. Samiyappan. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection pp. 1-11.
28. Savchuk, S., W.G.D. Fernando and P.S. Park. 2001. Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. Can, J. Plant Pathol, 23:205.
29. Schaad, N. W., Jones, J.B., Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3 rd. APS. St. Paul. Minnesota, USA. 373 pp.
30. Scher, S. M., J.S. Ziegle and J.W. Kloepper. 1984. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. Can. J. Microbiol. 30: 151-157.
31. Singh, V. and B.J. Deverall. 1984. *Bacillus subtilis,* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Trans. Br. Mycol. Soc. 83(3):487-490.
32. Sivan, A., O. Ucko and I. Chet. 1987. Biological control of *Fusarium* crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field condition. Plant Disease. 71 : 587 - 595.
33. Tan, W. and T.W. Mew. 2001. Bacterial antagonistics against *Rhizoctonia solani* AG1 in irrigated rice ecosystems. In Exploiting biodiversity for sustainable pest management. pp. 113-137. IRRI, The Phillippines.
34. Vidhysaekaran , P., R. Rabindran, M. Muthamilan, K. Nayer, K. Rajappan N. Subramanian and K. Vasumathi. 1996. Devolopment of a powder formulation of Pseudomonas fluorescens for control of rice blast. Plant Pathology. 46 : 291-297.
35. Vidhysaekaran , P., and M. Muthamilan. 1999. Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. Biocontrol Science and Technology. 8 : 67-74.
36. Weller, D. M. and R.J. Cook. 1983. Suppression of wheat take-all of wheat by seed treatment with fluorescent Pseudomonads. Phytopathol. 73(3): 463-469.
37. Weert, S., H. Vermeiren, I.H.M. Mulders, I. Kuiper, N. Hendrickx, G.V. Bloemberg, J. Vanderleyden, R.D. Mot. and B.J.J. Lugtenberg. 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. MPMI Journal, 15:1173-1180.

Archive of SID

www.SID.ir

JOURNAL OF
AGRICULTURAL
SCIENCES
Islamic Azad University

Effect of *Pseudomonas fluorescens* Isolates on *Rhizoctonia solani* Kühn the Causal Agent of Sheath Blight on Rice

M. Niknejad Kazempour
Assistant Professor, Depatment of Plant pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University

Keywords: Sheath blight, Rice, *Rhizoctonia solani*, Antagonistics Bacteria.

Abstract
In this research, antifungal effects of some antagonistics bacteria were investigated against *Rhizoctonia solani* Kuhn, the causal agent of rice sheath blight, collected from infected rice field in Rasht, Lahijan, Foman, Talesh and Astara of Guilan province. Of 288 bacterial isolates, cultured from hizosphere of infected rice Plants, eight G-Ve strains were considered as antagonists demonstrated by dual culture method. According to results of biochemical and morphological test, all eight isolates encoded B4, B6, B17, B18, B22, B24, B41 and B42 were identified as *Pseudomonas fluorescens* biovar 3. In determining the effects of volatile metabolites produced by antagonistic bacteria, all strains, inhibited mycelial growth of *R. solani under in vitro* condition. Culture filtrates and antibiotics produced by these strains could inhibit the normal growth of the pathogen. All *P. fluorescens* strains produced siderophore on King's B containing 5, 50 and 100 µmol $FeCl_3$ which in turn inhibited growth of the *Geotrichum candidum* on the other hand, all *P. fluorescens* strains reduced the rate of fungal germination and caused lysis of *R.solani* sclerotia. The bacteria colonization experiment showed that the population density of strains B42, B41 and B22 were increased on rice root system to 3.67, 2.98 and 2.94 CFU logarithm, respectively.

Archive of SID

www.SID.ir