مقاله تحقیقی

ارزیابی کارآیی برخی جدایه‌های باکتریایی در مهار زیستی بیماری بلاست برنج

محمدرضا صفری مطلق[۱]، محمد یزدانی[۲]

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

۲- گروه گیاه‌پزشکی، مؤسسه آموزش عالی دیلمان، لاهیجان، ایران

مسئول مکاتبات: محمدرضا صفری مطلق، ایمیل: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۹/۰۴/۲۹ ۸(۱)۷۳-۸۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۰

چکیده

بیماری بلاست برنج که توسط *Pyricularia oryzae* ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در جهان است. در این تحقیق، از مجموع ۱۵۰ نمونه آلوده جمع‌آوری شده از مزارع برنج استان گیلان، ۲۰ جدایه قارچی و ۳۰ جدایه باکتریایی جداسازی شد. براساس نتایج این تحقیق، باکتری‌های جداشده *Pseudomonas aeruginosa*، *Enterobacter* sp.، *Enterobacter cloacae* و *Bacillus subtilis* بودند. در آزمایشگاه از دو روش کشت متقابل و تولید متابولیت‌های فرّار ضدقارچی به منظور مطالعات مهار زیستی استفاده شد. در کشت متقابل، جدایه Y–25–3 از *P. aeruginosa* با ۶۱/۱۱ درصد و در متابولیت فرّار جدایه W *B. subtilis* با ۶۰/۵۱ درصد مؤثرترین جدایه‌ها در مهار رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری بودند. در بررسی‌های گلخانه‌ای این شش جدایه باکتریایی و بیمارگر *P. oryzae* پس از ۱۲ روز روی گیاه برنج (رقم هاشمی) مایه‌زنی شدند. تمامی جدایه‌ها به‌طور مؤثری قادر به کاهش شاخص بیماری *P. oryzae* شدند و جدایه Y–25–3 از *P. aeruginosa* با کاهش شاخص بیماری به میزان ۷۰/۵۳ درصد مؤثرترین جدایه باکتری در بررسی‌های گلخانه‌ای بود. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن و روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) و بر اساس طرح کاملاً تصادفی نشان داد بین باکتری‌ها از نظر درصد مهار میسلیومی در کشت متقابل و متابولیت فرّار اختلاف معنی‌داری وجود داشت. هم‌چنین در گلخانه بین تیمارهای مختلف از نظر صفات شاخص بیماری، ارتفاع بوته و وزن تر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، در حالی که از نظر صفت وزن خشک بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوکنترل در آزمایشگاه و گلخانه، جدایه *P. aeruginosa* به عنوان مؤثرترین باکتری در کنترل بیماری بلاست برنج معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیسم، باکتری‌ها، برنج، مهار زیستی، *Pyricularia oryzae*

مقدمه

بیماری بلاست برنج با عامل *Pyricularia oryzae* Cavara به‌عنوان مهم‌ترین بیماری برنج در اکثر کشورهای برنج‌خیز دنیا از جمله ایران به‌شمار می‌رود (Ou, 1985). اولین علائم بیماری روی برگ میزبان به صورت لکه‌های دوکی‌شکل ظاهر می‌شوند که در وسط به رنگ خاکستری یا سفید و در حاشیه به رنگ قهوه‌ای با هاله زرد هستند. اگر عامل بیماری‌زا در مرحلهٔ گلدهی به گیاه حمله کند مانع از به وجود آمدن دانه در خوشه می‌شود و زمانی که گردن خوشه را آلوده کند در اثر از بین‌رفتن بافت، رابطهٔ غذایی بین قسمت پایین و قسمت بالایی گیاه قطع شده و خوشه به رنگ سفید خاکستری درمی‌آید. این بیماری تاکنون از ۸۵ کشور جهان گزارش شده و هر جایی که برنج به‌صورت تجاری و در سطح وسیع کشت شود بلاست ممکن است در

آن‌جا وجود داشته باشد. در ایران، بلاست علاوه بر استان‌های شمالی از بسیاری از مزارع برنج مناطق دیگر از جمله فارس، خوزستان و کهگیلویه و بویراحمد گزارش شده و در برخی از سال‌ها، با فراهم شدن شرایط مساعد، به‌صورت اپیدمی درآمده و سبب کاهش محصول می‌شود و سازگاری عامل این بیماری با شرایط محیطی مختلف قابل توجه است (Khodaparast & Sahragard, 2004). در ایران خسارت آن در سال ۱۳۵۳ تقریباً ۱۰ درصد کل محصول برنج گیلان برآورد گردید و از آن سال به بعد هر ساله سبب کاهش محصول در ارقام محلی می‌شود و در بعضی از سال‌ها به علت تداوم بارندگی و کاهش دما در تابستان خسارت شدیدی در ارقام زودرس و زودکاشت، مخصوصاً در شرق گیلان به بار آورده است؛ به‌طوری‌که محصول بعضی مزارع و حتی بعضی روستاها قابل برداشت نبود (Javan Nikkhah, 2001). به دلیل اهمیت بیماری بلاست تحقیقات گسترده‌ای برای کنترل آن از جنبه‌های مختلف صورت گرفته و با توجه به این‌که برخی از روش‌های موجود برای مقابله با این بیماری از کارآیی لازم برخوردار نیستند و برخی دیگر مثل روش‌های شیمیایی اثرات سوء زیست محیطی دارند به‌نظر می‌رسد باید به دنبال راه‌کارهای تازه‌ای برای مقابله با این بیماری بود. از این‌رو روش کنترل بیولوژیکی که دارای اثرات طولانی‌مدت، ارزان و بدون ضرر برای محیط زیست است می‌تواند یک روش جایگزین مناسب برای کاربرد مواد شیمیایی باشد.

در مطالعه‌ای، ۴۰۰ جدایه باکتریایی از مزارع برنج ایری (IRRI) جداسازی و در آزمایشگاه براساس خاصیت آنتاگونیستی در مقابل قارچ‌های عامل بیماری‌های بلاست و سوختگی غلاف با عامل *Rhizoctonia solani* غربال‌گری شدند. در این بررسی نه باکتری شامل سه جدایه از *Pseudomonas fluorescens*، پنج جدایه از *Bacillus* spp. و یک جدایه از *Enterobacter* sp. شناسایی و سپس در مزرعه ارزیابی گردیدند و تیمار بذور با این باکتری‌ها یا مایه‌زنی آن‌ها در مرحلهٔ برگی منجر به کاهش ۳۰ تا ۸۰ درصدی شدت بیماری بلاست در ارقام مختلف برنج شد (IRRI, 1989).

نمونه‌های آلوده به بلاست از دو منطقه جغرافیایی در فیلیپین در مراحل نشاء و پنجه‌زنی جمع‌آوری و اثر پادزیستی باکتری‌های جدا شده در مقابل *P. grisea* مورد بررسی قرار گرفت. در این مناطق، جمعیت *Bacillus*ها در مرحلهٔ پنجه‌زنی بیشتر از مرحلهٔ نشا و هم‌چنین در لکه‌های بزرگتر و یا مسن بیشتر از لکه‌های کوچک و جوان بود ولی جمعیت *Pseudomonas*ها در مرحلهٔ نشا بیشتر بود. به‌علاوه بیشتر این باکتری‌ها برخلاف باسیلوس‌ها با نمونه‌های برگ سالم همراه بودند. هم‌چنین مشخص گردید که اکثر باکتری‌های آنتاگونیست همراه لکه‌ها بودند و نمونه‌های برگ سالم کمترین باکتری‌های آنتاگونیست را داشتند (IRRI, 1989).

با ارزیابی ۸۹ جدایه باکتریایی جداسازی شده از مزارع برنج گیلان در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست برنج در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که دو گونهٔ *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* باعث کاهش رشد رویشی و جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر شده و با مایه‌زنی این باکتری‌ها روی برگ‌های رقم حساس بینام در شرایط گلخانه، کلیه باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بیماری شدند، اما برخلاف نتایج آزمایشگاهی، اثر باسیلوس‌ها بهتر از سودوموناس‌ها بود (Padasht Dehkaei *et al*., 2002). با انتخاب ۱۲ جدایه از باکتری‌ها شامل *B. circulans*، *B. subtilis*، *B. megaterium*، *Bacillus* sp. و *P. fluorescens* براساس خاصیت آنتاگونیستی در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست، نتایج نشان داد که تعدادی از باکتری‌ها در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بیماری می‌شوند اما تأثیرشان همیشه کمتر از تیمار قارچ‌کش بوده است (Padasht Dehkaei & Izadyar, 2007).

در پژوهشی تأثیر بیوکنترلی چندین جدایه اکتینومایست که از زیستگاه‌های مختلف در مانیپور هند به‌دست آمده بودند روی بیمارگرهای مهم برنج نظیر *Curvularia oryzae*، *P. oryzae*، *Bipolaris oryzae* و *Fusarium oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۳۳ جدایه اکتینومایست بومی، جدایه LSCH–10C که از دریاچهٔ لکتاک جدا شده بود به‌عنوان یک عامل بیوکنترل نویدبخش شناخته شد (Ningthoujam *et al*., 2009). در

ارزیابی اثرات ضدقارچی *Saccharopolyspora erythraea* روی *P. grisea* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه مشخص شد که این باکتری در روش‌های دیسک– آگار، نشت از چاهک در آگار و کشت متقابل با تولید متابولیت‌های ضدقارچی توان بیوکنترلی بالایی از خود نشان می‌دهد (Amini *et al*., 2012).

جدایه‌های *Pseudomonas* spp. و *Bacillus* sp. در شرایط گلخانه‌ای در کنترل قارچ عامل بیماری بلاست ازکارآیی بیشتری در مقایسه با *Streptomyces* sp. و *Seratia* sp. برخوردار بودند (Rostami *et al*., 2012). هم‌چنین کاربرد جدایه‌هایی از تریکودرما و *B. subtilis* همراه با هم بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری بلاست برنج داشت (Ali & Nadarajah, 2014). به‌علاوه کارآیی جدایه‌های باکتریایی *B. amyloliquefaciens* و *B. cereus* در مهار زیستی *P. grisea* عامل بیماری لکه خاکستری گیاه لولیوم در آزمایشگاه و گلخانه به اثبات رسید (Dammie, 2017).

بر این اساس و با توجه به کارآیی جدایه‌های باکتریایی به‌عنوان یکی از عوامل بالقوه کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا، هدف این تحقیق شکل گرفت که شامل ارزیابی فعالیت باکتری‌هایی است که در فلور طبیعی گیاه برنج، وجود داشته و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان عوامل مهار زیستی برای کنترل *P. oryzae* استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، کشت، جداسازی، خالص‌سازی، نگهداری و شناسایی جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری از شالیزارهای مناطق مختلف استان گیلان در سال‌های ۹۴ و ۹۵ از نشاء، برگ و خوشه برنج انجام گرفت. در ابتدا پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در اندام‌های آلوده، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (محلول ۵ درصد از وایتکس تجاری) و شستشو با آب مقطر به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و قطعات پس از آبگیری، به‌ترتیب روی محیط‌های کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و آب آگار (WA) قرار داده شدند تا جداسازی و رشد پرگنه‌ها و در مراحل بعدی خالص‌سازی و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی انجام شود (Safari Motlagh *et al*., 2005). برای نگهداری این جدایه‌ها از لوله‌های آزمایش مورب حاوی محیط کشت PDA استفاده شد (Javan Nikkhah, 2001). پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها، خصوصیات ماکروسکوپی آن‌ها هم‌چون شکل، رنگ پرگنه و نحوه رشد روی محیط PDA مورد بررسی قرار گرفت. سپس خصوصیات میکروسکوپی آن‌ها با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی مطالعه شد.

کشت، جداسازی، خالص‌سازی، نگهداری و شناسایی جدایه‌های باکتریایی

جداسازی جدایه‌های باکتریایی با استفاده از محیط‌های کشتی هم‌چون King's B و Nutrient Agar انجام شد (Dhingra & Sinclair, 1995). برای این منظور ابتدا برش‌های چند میلی‌متری از بافت سالم و آلوده برگ برنج تهیه شد و قطعات به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در داخل بشر منتقل و توسط ورق آلومینیومی پوشانده شدند و در شیکر به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه در حرارت ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. یک لوپ از سوسپانسیون حاصل به محیط‌های کشت King's B و NA به روش چمنی منتقل و به مدت دو روز در حرارت ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های متفاوت از لحاظ مشخصات پرگنه به روش کشت خطی در محیط NA انجام شد (Kazemzadeh Chakoosari, 2003).

هم‌چنین یک گرم از خاک ریزوسفر برنج به‌همراه قطعات ریشه برنج از نمونه‌های ریزوسفر جمع‌آوری شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول $MgSO_4, 7H_2O$ ۰/۱ مولار، در داخل بشر مخلوط گردید و در نهایت جداسازی و خالص‌سازی استرین‌های باکتریایی رشدیافته انجام شد. در روش بعدی، سوسپانسیونی از مخلوط یک گرم از هر نمونه خاک شالیزار در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول $MgSO_4, 7H_2O$ ۰/۱ مولار، تهیه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰ دور در

دقیقه در دمای اتاق در شیکر همگن شد. سپس با استفاده از لوله‌های سترون، رقت‌های مختلف از این سوسپانسیون‌ها تهیه شد. یک لوپ از رقت‌های 10^{-5} یا 10^{-6} در محیط‌های کشت King's B و NA، کشت داده شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری گردید. سپس جداسازی و خالص‌سازی پرگنه‌های باکتریایی متفاوت براساس مشخصات پرگنه رشدیافته انجام شد (Rosales & Mew, 1997).

به‌منظور نگهداری جدایه‌های باکتریایی دو روش نگهداری طولانی‌مدت و کوتاه‌مدت به‌کار رفت. در روش طولانی‌مدت باکتری‌ها در دیپ‌فریز (۵۰- تا ۷۰- درجهٔ سلسیوس) و یا در نیتروژن مایع نگهداری شدند. برای این منظور باکتری‌های مورد نظر روی محیط مغذی مانند TSA (Trypticase Soy Agar) حاوی ۵ درصد خون گوسفند کشت داده شدند. برای نگهداری کوتاه‌مدت نیز باکتری‌ها در سطح محیط TSA در لوله‌های درپیچ‌دار کشت داده شده و بعد از قرار گرفتن به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، لوله‌ها به یخچال منتقل گردید و هر ماه عملیات تجدید کشت انجام شد (Barraquio *et al*., 1983).

برای شناسایی باکتری‌های جداشده از آزمون‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مختلفی شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، رشد بی‌هوازی در محیط مایع گلوکز، تولید رنگیزه فلورسنت روی محیط کشت King's B، استفاده از سیترات، هیدرولیز نشاسته، تولید اسپور، آزمون فوق‌حساسیت در توتون، آزمون لهانیدن ورقه سیب‌زمینی، هیدرولیز ژلاتین، آزمون تحرک، استفاده از آرابینوز، استفاده از مانیتول، آزمون تولید رنگ زرد روی محیط YDC، آزمون تولید رنگ متالیک روی محیط EMB و آزمون تولید مواد احیاکننده از سوکروز استفاده شد (Schaad *et al*., 2001).

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی، اسیدنوکلئیک جدایه‌ها به روش فنل–کلروفرم با اندکی تغییر استخراج گردید (Sherafati *et al*., 2014). جدایه‌ها در محیط آگار مغذی کشت و به مدت ۴۸– ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. سوسپانسیونی از سلول‌های خالص باکتری (10^{10}cfu/ml) در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون تهیه و با افزودن سدیم دودسیل–سولفات (SDS) ۱۰ درصد تحت حرارت، تخریب سلولی صورت گرفت. پس از افزودن NaCl غلیظ (۲/۵ مولار)، محلول به‌دست‌آمده با تکان دست به‌خوبی مخلوط گردید. نمونه‌ها پس از افزودن یک حجم کلروفرم و مخلوط شدن، برای ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. فاز رویی به‌آرامی به لوله فالکن جدید منتقل شد و به آن یک حجم فنل–کلروفرم اضافه گردید. پس از مخلوط شدن، سانتریفیوژ تکرار شد و به لایهٔ رویی مجددا کلروفرم افزوده شد. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل شده و به آن ۰/۱ حجم استات‌سدیم با غلظت ۳/۵ مولار و اسیدیته حدود ۵/۲، به همراه یک حجم ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت یک شب در دمای ۲۰– درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. رسوب اسیدنوکلئیک با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌دست آمد و پس از شستشو با الکل ۷۵ درصد و تبخیر کامل آن، به هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون افزوده شد. نمونه‌های DNA ژنومی تهیه شده تا زمان استفاده، در دمای ۲۰– درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده، نمونه‌ها در ژل آگاروز ۰/۷ درصد بارگذاری شده و نیز با استفاده از اسپکتروفتومتر (نانودراپ) مورد سنجش قرار گرفتند. بر پایه این نتایج، غلظت‌های یکسانی از DNA برای انجام واکنش PCR مورداستفاده قرار گرفت. در ادامه بخشی از ژن 16SrDNAدر جدایه‌های منتخب، با استفاده از آغازگر 63f/1387r تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگر نامبرده و مخلوط واکنش آماده (Taq DNA Polymerase 2x Master mix RED) محصول شرکت (Amplicon) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده آماده شد. برنامهٔ دمایی مورد نیاز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت چهار دقیقه انجام شد و سپس ۳۶ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سلسیوس به مدت یک

دقیقه و اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۶۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحلهٔ گسترش در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت یک دقیقه و پایان مرحلهٔ گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Marchesi *et al.*, 1998). محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در ژل آگارز ۱ درصد به همراه نشانگر مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی (Fermentas # SM0323) الکتروفورز شدند. محصول PCR برای خالص‌سازی و تعیین توالی به شرکت دنازیست آسیا ارسال شد (http://denazist.ir). تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای مربوطه انجام شد و پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی، داده‌ها با استفاده از نرم افزار BioEdit اصلاح شدند و بررسی میزان شباهت توالی ژن‌ها با داده‌های موجود در پایگاه بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) و با استفاده از برنامه BLAST انجام پذیرفت (Thompson *et al.*, 1997).

لازم به ذکر است که در این مطالعه دو جدایه باکتریایی نیز از فلور طبیعی گیاهان کلزا و گندم به روش‌های ذکرشده در بالا به منظور بررسی تأثیر نوع گیاه میزبان در توان آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه، جداسازی شد.

مطالعات کنترل زیستی

کشت متقابل

به‌منظور مشخص شدن توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست برنج، آزمون کشت متقابل مطابق روش (Dhingra & Sinclair, 1995) انجام شد. بدین منظور یک قرص ۵ میلی‌متری از محیط کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری رشد یافته در محیط PDA در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و همزمان در سه نقطه از فاصله یک سانتی‌متری حاشیه محیط کشت اقدام به کشت نقطه‌ای جدایه‌های باکتریایی در فواصل مساوی در یک خط مدور گردید. سپس این تشتک‌ها در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند و درصد بازدارندگی پس از دو و هفت روز محاسبه گردید. هم‌چنین هاله بازدارندگی ایجاد شده به‌وسیله باکتری نیز پس از هفت روز محاسبه شد. درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ نسبت به شاهد با استفاده از فرمول $\text{درصد مهار رشد میسلیومی} = \frac{C-T}{C} \times 100$ محاسبه گردیدکه C میزان رشد قطری *P. oryzae* در تشتک‌های پتری شاهد و T رشد قطری بیمارگر در حضور باکتری‌های مورد مطالعه بود (Sivakumar *et al.*, 2000).

بررسی تولید متابولیت‌های فرار ضدقارچی

بدین منظور مطابق روش (Fiddaman & Rossal, 1993) جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست به صورت چمنی در محیط NA کشت و همزمان یک قرص پنج میلی‌متری از کشت فعال جدایه قارچ عامل بیماری در محیط PDA کشت داده شد. سپس تشتک پتری حاوی بیمارگر به‌صورت وارونه بر روی تشتک حاوی باکتری قرار گرفت و محل اتصال لبه‌های دو تشتک با پارافیلم کاملاً مسدود شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس، درصد بازدارندگی رشدی در تیمارها در مقایسه با شاهد پس از دو و هفت روز محاسبه گردید (Sivakumar *et al.*, 2000).

مطالعات گلخانه‌ای

بذور برنج رقم هاشمی بعد از قرار گرفتن به مدت ۳۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد و سپس شست‌وشو در آب مقطر در ۲۴ عدد گلدان پلاستیکی با دهانه ۲۰ سانتی‌متری که از خاک مزرعه برنج پر شده بودند کاشته شدند. تعداد ۱۰ بذر داخل هر گلدان قرار داده شد و به‌صورت مرتب آبیاری صورت گرفت. دمای گلخانه بین ۲۵–۳۰ درجهٔ سلسیوس در روز و در شب بین ۱۷–۲۰ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد در نوسان بود. گیاهچه‌ها از زمان کاشت تا مرحلهٔ دو برگی در این شرایط و در معرض نور خورشید نگهداری شدند. در این مدت آبیاری به‌صورت معمول انجام می‌شد، به طوری که گلدان‌ها به طور دائم حالت غرقابی داشتند. پس از ۱۲ روز که گیاهان به مرحلهٔ دو برگی رسیدند، مایه‌زنی اسپورهای

قارچ بیماری‌زا روی گیاه صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا روی همهٔ نشاها به وسیلهٔ افشانه‌های دستی، آب مقطر سترون پاشیده شد، سپس سوسپانسیون اسپور لازم برای تلقیح فراهم و روی نشاها پاشیده شد. برای شمارش اسپور و میسلیوم از لام گلبول‌شمار استفاده گردید. برای مایه‌زنی، سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون و برای افزایش جذب سطحی توئین ۲۰ یک درصد به‌کار رفت (Safari Motlagh, 2005). برای هر باکتری آنتاگونیست تعدادی گلدان در نظر گرفته شد؛ بدین معنی که در برخی گلدان‌ها یک سری گیاهان شاهد وجود داشت که فقط با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. سری دیگر شامل گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با عامل بیماری بلاست برنج و یک سری گیاهان مایه‌زنی شده با عامل بیماری و باکتری آنتاگونیست مورد نظر بودند. در این مورد، محلول‌پاشی گیاهان برنج با ۲۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۸}$ سلول باکتریایی در هر میلی‌لیتر مخلوط با محلول کربوکسی‌متیل‌سلولز یک درصد تهیه شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری با جذب نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (بعد از شمارش کلنی‌ها برای کالیبره کردن) انجام گرفت (Kazemzadeh Chakoosari, 2003). برای این منظور از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه در محیط کشتNutrient Agar استفاده شد و سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۸}$ سلول باکتریایی به روش رقیق کردن متوالی در آب مقطر سترون تهیه شد. لازم به ذکر است که مایه‌زنی باکتری‌های مورد مطالعه بلافاصله پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام شد و برای هر یک از موارد شاهد آب مقطر، شاهد بیمارگر و تیمار (مایه‌زنی‌شده با باکتری و قارچ بیمارگر) سه گلدان در نظر گرفته شد. بعد از مایه‌زنی، رطوبت نسبی حدود ۱۰۰ درصد و میزان دما ۲۸ تا ۳۰ درجهٔ سلسیوس در روز و ۱۸ تا ۲۰ درجهٔ سلسیوس در شب تنظیم شد. تغییرات ایجادشده روی گیاهان به صورت روزانه به مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرارگرفت. پس از ظهور علائم بیماری و بررسی آن‌ها، بیمارگرهای جداشده در این مرحله با بیمارگر اولیه مطابقت داده شدند. شدت بیماری بلاست بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد (Standard Evaluation System) ارائه شده توسط مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج مبتنی بر یک مقیاس ۰–۹ تعیین شد (Horsfall & Barratt, 1945; IRRI, 1996, 2013)

سپس شاخص بیماری با استفاده از رابطه $\text{شاخص بیماری (Disease index)} = \frac{[(N_1\times1)+(N_2\times2)+\cdots(N_t\times t)]}{N_1+N_2+\cdots N_t}$ محاسبه گردید که N تعداد برگ در هر یک از مقیاس‌های شدت بیماری بود (Bertrand & Gottwald, 1997). هم‌چنین ارتفاع بوته‌های برنج توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد و به منظور اندازه‌گیری وزن تر، بوته‌های برنج همراه با ریشه‌ها از خاک گلدان‌ها خارج شدند و به‌وسیله ترازوی آزمایشگاهی توزین شدند. سپس هرکدام از بوته‌ها به‌طور جداگانه و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۸۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. پس از خروج از آون، هر یک از بوته‌ها وزن شدند و این وزن به‌عنوان وزن خشک ثبت گردید.

آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با شش تیمار (شامل جدایه‌های باکتریایی به‌کار رفته) و سه تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن و حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) به کمک نرم‌افزار Statistical Analysis System نسخه ۹/۱ (SAS, 2005) انجام شد.

نتایج

پس از بررسی همه جدایه‌های قارچی به‌دست آمده، تعداد ۱۶ جدایه قارچی از *P. oryzae* مبتنی بر شدت بالای بیماری در آزمایش بیماری‌زایی برای مطالعات بیماری‌زایی و بررسی‌های کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه و از میان این جدایه‌ها، یک جدایه قارچی برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب گردید. مبنای شناسایی جدایه‌های بیمارگر، خصوصیات مورفولوژیک آن‌ها بود.

از میان ۳۰ باکتری جداشده، ۶ جدایه که از لحاظ خصوصیات مورفولوژیک با هم تفاوت داشتند مورد ارزیابی‌های بیشتر براساس آزمون‌های فیزیولوژیکی و مولکولی قرار گرفتند و بر این اساس، باکتری‌های زیر شناسایی شدند:

Pseudomonas aeruginosa (Schröter) Migula، *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn (جدایه‌های C، R و W، به‌ترتیب جداشده از کلزا، برنج و گندم)، *Enterobacter cloacae* Hormaeche & Edwards و *Enterobacter* sp. که ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های جدایه‌های آنتاگونیست با توالی‌های نوکلئوتیدی باکتری‌های ذخیره شده در بانک ژن نشان داد که با شباهت ۸۲ درصد جدایه Y–25–1متعلق به گونه *Enterobacter* sp.، جدایه Y–25–2با شباهت ۸۷ درصد متعلق به گونه *E. cloacae*، جدایه Y–25–3 با شباهت ۸۳ درصد متعلق به گونه *P. aeruginosa* و جدایه‌های Y–25–4، Y–25–5 و Y–25–6به‌ترتیب با ۸۷، ۸۶ و ۸۵ درصد شباهت به گونه *B. subtilis* تعلق دارند.

کشت متقابل

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در روش کشت متقابل پس از دو و هفت روز بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر درصد مهار رشد میسلیومی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی دار (LSD) بیشترین درصد مهار پس از دو روز مربوط به تیمار *P. aeruginosa* بود که با بقیه تیمارها به جز *B. subtilis* C اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی هم مربوط به تیمار *Enterobacter* sp. بود که با بقیه تیمارها به جز *B. subtilis* W اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) بیشترین درصد مهار پس از هفت روز مربوط به تیمار *P. aeruginosa* بود که با بقیه تیمارها به جز *B. subtilis* C اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی هم مربوط به تیمار *Enterobacter* sp. بود که با بقیه تیمارها به جز *B. subtilis* W اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین هاله بازدارندگی این جدایه‌های باکتریایی در جدول ۳ ذکر شده است.

تولید متابولیت‌های فرار ضدقارچی

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در روش متابولیت‌های فرار پس از دو و هفت روز بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر درصد مهار رشد میسلیومی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود نداشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی دار (*LSD*) بیشترین درصد مهار پس از دو روز مربوط به تیمار *B. subtilis W* بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی هم مربوط به تیمار *Enterobacter sp.* بود که با بقیه تیمارها به جز *B. subtilis W* اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (*LSD*) بیشترین درصد مهار پس از هفت روز مربوط به تیمار *B. subtilis R* بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیومی هم مربوط به تیمار *P. aeruginosa* بود که با بقیه تیمارها به جز *B. subtilis R* اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴).

مطالعات گلخانه‌ای

درگیاهان شاهدی که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. در گیاهان برنجی که با *P. oryzae* مایه‌زنی شده بودند اولین علائم سه روز پس از تلقیح به صورت نقاط سرسنجاقی ظاهر شدند که در روزهای بعدی این نقاط به‌تدریج گسترش یافته و به‌صورت لکه‌های نکروتیک دوکی‌شکل که در وسط به رنگ خاکستری یا سفید و در حاشیه به رنگ قهوه‌ای بودند، درآمدند و در مرحلهٔ بعد این لکه‌ها به یکدیگر پیوستند. در برخی موارد لکه‌های بزرگتری در طول برگ مشاهده شد. در این گیاهان میانگین شاخص بیماری ۷/۱۶ بود.

جدول ۱– مشخصات جدایه‌های باکتریایی شناسایی شده در آزمون‌های مختلف

Table 1. Characteristics of bacterial isolates identified in various tests

Types of test	***B. subtilis* W**	***Enterobacter* sp.**	***E. cloacae***	***B. subtilis* C**	***B. subtilis* R**	***P. aeruginosa***
Gram staining	+	–	–	+	+	–
Anaerobic growth	–	+	+	–	–	–
Oxidase	–	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pigments on King's B	–	–	–	–	–	+
Citrate consumption	+	–	–	+	+	–
Starch hydrolysis	+	–	–	+	+	–
Spore production	+	–	–	+	+	–
Hypersensitivity on tobacco	–	–	–	–	–	–
Potato rot	–	–	–	–	–	–
Gelatin hydrolysis	+	+	–	+	+	+
Mobility test	+	+	+	+	+	+
Use of arabinose	+	–	–	+	+	–
Use of mannitol	+	–	–	+	+	+
Yellow pigments on YDC	–	–	–	–	–	+
Metallic pigments on EMB	–	+	+	–	–	+
Reducing substances from sucrose	–	–	–	–	–	–

جدول ۲– مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* به‌وسیله باکتری‌های مورد مطالعه در روش کشت متقابل (دو و هفت روزه)

Table 2. The mean comparison of mycelium growth inhibition of *Pyricularia oryzae* isolates by bacteria in dual culture method (two and seven days)

Treatments	**Growth inhibition (%) after 2 days ± SE**	**Growth inhibition (%) after 7 days ± SE**
P. aeruginosa	61.11 ± 0.33 a	59.31 ± 0.32 a
B. subtilis C	50.00 ± 0.35 ab	50.22 ± 0.37 ab
E. cloacae	40.12 ± 0.37 bc	30.74 ± 0. 42 bc
B. subtilis R	34.57 ± 0.41 c	41.55 ± 0.42 bc
B. subtilis W	31.48 ± 0.47 cd	22.51 ± 0.45 de
Enterobacter sp.	16.66 ± 0.39 d	13.40 ± 0. 35 e

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند.

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$.

جدول ۳– مقایسه میانگین هاله بازدارنده ایجاد شده توسط باکتری‌ها در روش کشت متقابل

Table 3. The mean comparison of inhibition halo created by bacteria in dual culture method

Treatments	**Inhibition halo (mm) ± SE**
P. aeruginosa	9.00 ± 0.29
B. subtilis C	8.00 ± 0.29
E. cloacae	5.6 ± 0.73
B. subtilis R	7.2 ± 0.20
B. subtilis W	4.3 ± 0.15
Enterobacter sp.	3.2 ± 0.20

جدول ۴– مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی جدایه‌های *Pyricularia oryzae* در روش متابولیت‌های فرار (دو و هفت روزه)

Table 4. The means comparison of mycelium growth inhibition of *Pyricularia oryzae* isolates in volatile metabolites method (two and seven days)

Treatments	Growth inhibition (%) after 2 days ± SE	Growth inhibition (%) after 7 days ± SE
B. subtilis W	60.51 ± 0.58 a	29.33 ± 0.49 bc
B. subtilis R	49.05± 0.47 b	54.22 ± 0.45 a
E. cloacae	44.58 ± 0.43 bc	35.57 ± 0.45 b
B. subtilis C	43.33 ± 0.39 bc	27.12 ± 0.37 bc
P. aeruginosa	43.32 ± 0.41 bc	25.33 ± 0.43 bc
Enterobacter sp.	40.76 ± 0.42 bc	34.22 ± 0.41 b

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند.

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$

در گیاهانی که مایه‌زنی با *P. oryzae* و *B. subtilis* R به‌طورهم‌زمان انجام شده بود، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط سرسنجاقی خاکستری، قهوه‌ای و نیز لکه‌های سفید در نوک برگ‌ها ظاهر شدند. در روزهای بعد لکه‌های سفید و لکه‌های خاکستری مایل به قهوه‌ای گسترش یافتند و به صورت لکه‌های نکروتیک دوکی‌شکل که در وسط خاکستری و در حاشیه به رنگ قهوه‌ای بودند، درآمدند. در این تیمارها میانگین شاخص بیماری ۳/۸۳ بود و بنابراین استفاده از این باکتری باعث کاهش شاخص بیماری ایجاد شده به‌وسیله *P. oryzae* به میزان ۴۶/۵۰ درصد گردید. در تیمارهایی که مایه‌زنی با عامل بیماری‌زا و *Enterobacter* sp. به‌طور هم‌زمان انجام شده بود، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های سفید ظاهر شد و در روزهای بعد لکه‌ها به رنگ خاکستری یا سفید و در حاشیه به رنگ قهوه‌ای و به صورت لکه‌های نکروتیک دوکی‌شکل درآمدند. در این تیمارها میانگین شاخص بیماری ۴/۰۵ بود و ازاین‌رو باکتری شاخص بیماری را به میزان ۴۳/۴۳ درصد کاهش داد.

در تیمارهایی که مایه‌زنی با بیمارگر و *E. cloacae* به‌طور هم‌زمان انجام شده بود، اولین علائم پنج روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط بسیار ریز و قهوه‌ای‌رنگ در نوک و حاشیه برگ‌ها با تعداد کم ظاهر شدند. در این تیمارها میانگین شاخص بیماری ۳/۴۹ بود. بنابراین استفاده از این باکتری باعث کاهش شاخص بیماری به میزان ۵۱/۲۵ درصد شد. در گیاهان مایه‌زنی شده با *P. oryzae* و *B. subtilis* C، اولین علائم شش روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط بسیار ریز و قهوه‌ای رنگ در نوک و حاشیه برگ‌ها با تعداد کم ظاهر شدند. در این تیمارها میانگین شاخص بیماری ۲/۱۶ بود و در نتیجه استفاده از این باکتری باعث کاهش شاخص بیماری ایجاد شده به‌وسیله *P. oryzae* به میزان ۶۹/۸۳ درصد گردید.

در گیاهانی که مایه‌زنی با *P. oryzae* و *B. subtilis* W به‌طور هم‌زمان انجام شده بود، اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط قهوه‌ای‌رنگ ظاهر شدند. در روزهای بعد لکه‌های خاکستری مایل به قهوه‌ای گسترش یافته و به صورت لکه‌های نکروتیک درآمدند. در این تیمارها میانگین شاخص بیماری ۴/۳۸ بود و از این‌رو این باکتری شاخص بیماری را به میزان ۳۸/۸۲ درصد کاهش داد. در گیاهان مایه‌زنی شده با *P. oryzae* و *P. aeruginosa* ، اولین علائم شش روز پس از مایه‌زنی، به‌صورت نقاط بسیار ریز و قهوه‌ای‌رنگ در نوک و حاشیه برگ‌ها با تعداد کم ظاهر شدند. در این تیمارها میانگین شاخص بیماری ۲/۱۱ بود و بنابراین *P. aeruginosa* باعث کاهش شاخص بیماری ایجاد شده به‌وسیلهٔ قارچ بیمارگر به میزان ۷۰/۵۳ درصد شد.

براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در شرایط گلخانه، بین تیمارهای مختلف از نظر صفات شاخص بیماری، ارتفاع بوته و وزن تر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ مشاهده گردید، در حالی که از نظر صفت وزن خشک بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

در مورد شاخص بیماری و بر اساس روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، کمترین شاخص بیماری متعلق به تیمار *P. aeruginosa* بود که با تیمار *B. subtilis* C اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ولی با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. این جدایه باکتریایی به میزان ۷۰/۵۳ درصد باعث کاهش شاخص بیماری گردید. بیشترین شاخص بیماری متعلق به تیمار *B. subtilis* W بود که با تیمارهای *P. aeruginosa* و *B. subtilis* C اختلاف معنی‌داری داشت ولی با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این جدایه باکتریایی به میزان ۳۹/۳۸ درصد باعث کاهش شاخص بیماری گردید (جدول ۵).

در مورد صفت ارتفاع و بر اساس روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، بیشترین ارتفاع متعلق به تیمار *P. aeruginosa* بود که با سایر تیمارهای باکتریایی اختلاف معنی‌داری نداشت اما با شاهد بیمار اختلاف معنی‌داری داشت. این جدایه باکتریایی به میزان ۲۶/۹۴ درصد باعث افزایش ارتفاع در مقایسه با شاهد بیمار گردید. کمترین ارتفاع متعلق به تیمار *B. subtilis* W بود که با سایر تیمارهای باکتریایی اختلاف معنی‌داری نداشت اما با شاهد بیمار و شاهد آب مقطر اختلاف معنی‌داری داشت. این جدایه باکتریایی به میزان ۴/۲ درصد باعث افزایش ارتفاع در مقایسه با شاهد بیمار گردید (جدول ۵).

در مورد صفت وزن تر و بر اساس روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، بیشترین وزن تر متعلق به تیمارهای *P. aeruginosa* و *E. cloacae* بود که با شاهد بیمار اختلاف معنی‌داری داشتند اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند. این دو جدایه باکتریایی به میزان ۳۶/۳۶ درصد باعث افزایش وزن تر در مقایسه با شاهد بیمار گردیدند. کمترین وزن تر متعلق به تیمار *Enterobacter* sp. بودکه با شاهدهای بیمار و آب مقطر اختلاف معنی‌داری داشت. این جدایه باکتریایی به میزان ۱/۵۱ درصد باعث افزایش وزن تر در مقایسه با شاهد بیمار گردید (جدول ۵).

در مورد صفت وزن خشک و بر اساس روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، بیشترین وزن خشک متعلق به تیمارهای *P. aeruginosa* و *E. cloacae* بودکه با شاهد بیمار اختلاف معنی‌داری داشتند اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. این دو جدایه باکتریایی به میزان ۷۸/۶۵ درصد باعث افزایش وزن خشک در مقایسه با شاهد بیمار گردیدند. کمترین وزن خشک متعلق به تیمار *Enterobacter* sp. بود که با شاهدهای بیمار و آب مقطر اختلاف معنی‌داری داشت. این جدایه باکتریایی به میزان ۲۱/۴۲ درصد باعث افزایش وزن خشک در مقایسه با شاهد بیمار گردید (جدول ۵).

جدول ۵– مقایسه میانگین شاخص بیماری، ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک گیاه در شرایط گلخانه

Table 7. Comparison of mean of disease index, plant height, fresh and dry weight in greenhouse conditions

Treatments	Disease rating ± SE	Height (cm) ± SE	Fresh weight (g) ± SE	Dry weight (g) ± SE
P. aeruginosa	2.11 ± 0.09 c	35.33 ± 0.58 ab	0.90 ± 0.03 ab	0.25 ± 0.01 ab
B. subtilis C	2.16 ± 0.07 c	35.00 ± 0.40 ab	0.82 ± 0.02 ab	0.22 ± 0.01 ab
E. cloacae	3.49 ± 0.08 b	34.83 ± 0.39 ab	0.90 ± 0. 03 ab	0.25 ± 0.02 ab
B. subtilis R	3.83 ± 0.08 b	34.00 ± 0.38 b	0.73 ± 0. 05 b	0.18 ± 0.03 ab
Enterobacter sp.	4.05 ± 0.05 b	29.50 ± 0.37 b	0.67 ± 0.04 b	0.17 ± 0.02 b
B. subtilis W	4.38 ± 0.04 b	29.00 ± 0. 35 b	0.73 ± 0.03 b	0.18 ± 0.02 b
P. oryzae	7.16 ± 0.03 a	27.83 ± 0.35 c	0.66 ± 0. 04 c	0.14 ± 0.03 c
control				
Distilled water	0.00 ± 0.00 d	41.50 ± 0.33 a	1.03 ± 0.05 a	0.31 ±– 0.03 a
control				

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$

بحث

در این تحقیق از مجموع ۱۵۰ نمونه برنج جمع‌آوری شده از مزارع استان گیلان، ۲۰ جدایه قارچی و ۳۰ جدایه باکتریایی جداسازی شدند که از بین آن‌ها ۱۶جدایه قارچی از *P. oryzae* و شش جدایه باکتریایی از *Pseudomonas* sp.، *Bacillus* sp. و *Enterobacter* sp. مورد استفاده قرار گرفتند. در این مطالعه و در روش کشت متقابل، *P. aeruginosa* موثرترین جدایه باکتریایی در مهار رشد میسلیومی عامل بیماری بلاست بود. محققان دیگری نیز با ارزیابی۸۹ جدایه باکتریایی آنتاگونیستی در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست برنج در شرایط آزمایشگاهی دریافتند که دو گونه *P. fluorescens* 152 و *P. aeruginosa* 134 به‌ترتیب ۹۳/۲ درصد از رشد رویشی و ۱۰۰ درصد از جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر جلوگیری کردند و گونه‌های باسیلوس در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. آن‌ها هم‌چنین با مایه‌زنی هر یک از باکتری‌های فوق روی گیاه برنج در شرایط گلخانه نتیجه گرفتند که کلیه باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بیماری شدند اما برخلاف نتایج آزمایشگاهی اثر باسیلوس‌ها بهتر از سودوموناس‌ها بود. نتایج این محققان در بخش آزمایشگاهی با نتایج تحقیق حاضر در تطابق بود اما در شرایط گلخانه‌ای سازگاری نداشت (Padasht Dehkaei *et al*., 2002). به‌علاوه نتایج این تحقیق در روش کشت متقابل در کارآیی بیشتر گونه-های سودوموناس در مقایسه با باسیلوس‌ها با مطالعه دیگری (Gnanamanickam & Mew, 1992) مطابقت داشت.

در روش متابولیت‌های فرار، *P. aeruginosa* کارآیی خود را در کاهش رشد میسلیومی بیمارگر نشان داد که با مطالعه Manidipa *et al.* (2013) هم‌خوانی داشت. این محققان گزارش کردند که گونه‌های مختلف سودوموناس می‌توانند از طریق تولید متابولیت‌های فرار ضدقارچی در کاهش فعالیت قارچ عامل بیماری بلاست برنج مؤثر باشند.

در مقایسه بین جدایه‌های باکتریایی *B. subtilis*، سویه جداشده از فلور طبیعی برنج هم در آزمایشگاه و هم در گلخانه در رتبهٔ دوم قرار گرفت. در آزمایشگاه و در روش کشت متقابل سویه جداشده از کلزا مؤثرترین جدایه این گونه باکتریایی بود و در روش متابولیت‌های فرار، سویهٔ جداشده از فلور گندم بالاترین کارآیی را نشان داد که این امر نشان‌دهنده این مطلب بود که ارتباط مستقیمی بین فلور گیاه و فعالیت آنتاگونیستی باکتری جداشده وجود نداشت.

در هر دو روش آزمایشگاهی استفاده شده در این تحقیق با گذشت زمان در کارآیی جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه تغییر حاصل شد، بدین معنی که توانایی بازدارندگی آن‌ها در مهار رشد میسلیومی بیمارگر کاهش یافت و حتی در روش متابولیت‌های فرار، رتبه‌بندی جدایه‌ها دستخوش تغییر شد که این امر می‌تواند نشانگر این مطلب باشد که باکتری آنتاگونیست با گذشت زمان به‌تدریج کارآیی خود را از دست می‌دهد و از این‌رو کاربرد چندباره جدایه‌های باکتریایی روی گیاه برای کنترل مؤثر بیماری ضرورت دارد (Krishnamurthy & Gnanamanickam, 1998).

جدایه *P. aeruginosa* که در روش کشت متقابل در رتبه اول سودمندی قرار داشت در روش متابولیت فرار در رتبه‌های پایین جای گرفت که نشانگر توانایی ضعیف این جدایه در تولید مواد فرار در مقایسه با سایر جدایه‌های مورد مطالعه بود. در عین‌حال این جدایه باکتریایی در گلخانه باعث کاهش شاخص بیماری و افزایش ارتفاع برنج گردید که با یافته‌های محققان دیگر هم‌سو بود (Yasmin *et al*., 2017; Omoboye *et al*., 2019). بر اساس این مطالعات، این گونه باکتریایی منجر به ارتقای کیفیت صفاتی هم‌چون دانه برنج و القای فعالیت آنزیم‌های مرتبط با واکنش‌های دفاعی گیاه گردید. هم‌چنین جدایه‌های مختلف سودوموناس از طریق تولید عصاره‌های باکتریایی باعث کاهش فعالیت قارچ عامل بیماری بلاست در آزمایشگاه شدند و با القای مقاومت سیستمیک گیاه، شدت بیماری بلاست را کاهش دادند.

در این تحقیق جدایه‌های *Enterobacter* هم در آزمایشگاه و هم در گلخانه در کاهش رشد میسلیومی قارچ و شاخص بیماری ایجاد شده به‌وسیله آن موثر بودند که با مطالعه دیگری در این زمینه (IRRI, 1989) سازگار بود. به‌علاوه در مطالعه دیگری (Wiraswati *et al*., 2019)

مشخص گردید که *E. cloacae* در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست برنج خاصیت ضدقارچی نشان داده و موجب کاهش رشد میسلیومی بیمارگر شد که با یافته‌های مطالعه حاضر در انطباق بود.

در این تحقیق و در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص گردید که در بین باکتری‌های مورد بررسی، کمترین شاخص بیماری بعد از تیمار شاهد آب مقطر متعلق به باکتری *P. aeruginosa* بود. در تحقیقی دیگر (Kazemzadeh Chakoosari *et al.*, 2012)، تأثیر آنتاگونیستی ۶۱۰ جدایه باکتریایی جدا شده از مزارع استان گیلان روی *R. solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برنج مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت جدایه ۱۵۲ متعلق به *P. aeruginosa* به‌عنوان موثرترین جدایه در کاهش شدت بیماری شناخته شد که با نتایج تحقیق حاضر در مورد کارآیی *P. aeruginosa* در مهار زیستی بیمارگر مطابقت داشت. در پژوهشی دیگر (Spence *et al.*, 2014) با جداسازی باکتری‌های موجود در ریزوسفر برنج به این نتیجه رسیدند که جدایه‌های سودوموناس رشد اپرسوریومی عامل بیماری بلاست را بازمی‌دارد و نیز باعث کاهش شدت بیماری می‌گردد که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در پژوهش حاضر ارزیابی سه جدایه باکتریایی از *B. subtilis* در گلخانه نشانگر خاصیت آنتاگونیستی این باکتری‌ها علیه *P. oryzae* بود که این امر با یافته‌های محققان دیگری مطابقت داشت که ۱۲ جدایه از باکتری‌ها شامل *Bacillus circulans*، *B. subtilis*، *B. megaterium*، *Bacillus* sp. و *P. fluorescens* را انتخاب نمودند و براساس خاصیت آنتاگونیستی در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست جهت کنترل بیماری در شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار دادند (Padasht Dehkaei & Izadyar, 2007). نتایج نشان داد که این باکتری‌ها به‌ویژه *B. subtilis* در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بیماری می‌شوند. این نتایج هم‌چنین با یافته‌های Mu *et al.* (2007) منطبق بود. به‌علاوه جدایه‌های یادشده در افزایش کیفی صفات گیاهی یعنی ارتفاع، وزن تر و خشک مؤثر بودند که با مطالعات پیشین در مورد تأثیر این باکتری‌ها در افزایش رشد تعدادی از گونه‌های گیاهی سازگاری داشت (Broadbent *et al.*, 1977).

در بررسی دیگری در فیلیپین، اثر پادزیستی باکتری‌های جداشده در مقابل *P. grisea* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که گونه‌های مختلف سودوموناس و باسیلوس در کاهش بیماری نقش دارند. هم‌چنین مشخص گردید که اکثر باکتری‌های آنتاگونیست همراه لکه‌ها بودند و نمونه‌های برگ سالم کمترین باکتری‌های آنتاگونیست را داشتند (IRRI, 1989) که با نتایج تحقیق حاضر سازگار است.

در مطالعه‌ای تعدادی از باکتری‌های جدا شده از مزارع برنج شامل *B. subtilis*، *P. aeruginosa*، *B. pumilus*، *Erwinia herbicola–like* و *Serratia marcesces* شناسایی شدندکه علاوه بر خاصیت آنتاگونیستی در مقابل قارچ عامل سوختگی غلاف خاصیت مشابهی نیز در مقابل عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج داشتند (Rosales *et al.*, 1995) که با نتایج تحقیق حاضر در مورد کارآیی جدایه‌های *B. subtilis* و *P. aeruginosa* مطابقت داشت. در مطالعه انجام‌شده توسط Sha *et al.* (2016) مشخص شد که جدایه‌های *B. subtilis* نه تنها جوانه‌زنی اسپورها، رشد لوله تندشی و تشکیل اپرسوریوم‌ها را باز می‌دارد بلکه تغییراتی در ساختمان ریسه‌ها و کنیدیوم‌ها هم ایجاد می‌کند که با نتایج این تحقیق در کارآیی جدایه‌های باکتریایی فوق منطبق بود.

در یک نتیجه‌گیری کلی، در شرایط آزمایشگاهی، در روش کشت متقابل جدایه‌های *P. aeruginosa* و *B. subtilis C* و در روش متابولیت‌های فرار، جدایه‌های *B. subtilis R* و W موثرترین باکتری‌ها در مهار رشد میسلیومی *P. oryzae* بودند. در شرایط گلخانه‌ای مؤثرترین باکتری در کاهش شاخص بیماری بلاست برنج، *P. aeruginosa* بود که در افزایش بازدهی گیاه هم بالاترین کارآیی را نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، تمامی جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی در این تحقیق توانستند در مهار زیستی *P. oryzae* سودمند باشند. اما با توجه به این نکته که جدایه‌هایی از *P. aeruginosa* ممکن است در

انسان بیماری‌زا باشند در معرفی آن به‌عنوان یک عامل بیوکنترل باید ملاحظات زیست–ایمنی را در نظر گرفت و اطمینان حاصل کرد که جدایه‌های معرفی‌شده در انسان بیماری‌زا نیستند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت و مؤسسه غیرانتفاعی دیلمان لاهیجان برای حمایت‌های لازم از این تحقیق قدردانی می‌گردد.

References

Ali, H. & Nadarajah, K. 2014. Evaluating the efficacy of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Magnaporthe grisea* in rice. Australian Journal of Crop Science, 8: 1324–1335.

Amini, E., Tajik Ghanbari, M.A. & Hasanzadeh, N. 2012. Biological control of rice blast disease by *Streptomyces erythraea in vitro* and greenhouse conditions. Proceeding of 6th National Conference New Ideas in Agriculture, 29–30 February, Khorasgan, Iran.

Barraquio, W.L., Ladha, J.K. & Watanabe, I. 1983. Isolation and identification of N2–fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. Canadian Journal of Microbiology, 29(8): 867–873.

Bertrand, P.F. & Gottwald, T.R. 1997. Evaluation of fungicides for pecan disease control. pp. 179–181. In: Hickey, K. D., (ed). Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. Oxford and IHB Publisher, Calcatte, India.

Broadbent, P., Baker, K.F., Franks, N. & Holand, J. 1977. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in non–treated soli. Phytopathology, 67: 1027–1034.

Dammie, N. 2017. Biological control of gray leaf spot (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) of ryegrass. M. Sc. Thesis, University of KwaZulu–Nata. South Africa.

Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. 1995. Basic plant pathology methods. CRC Press, Florida.

Fiddaman, P.J. & Rossal, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, 74(2): 119–126.

Gnanamanickam, S.S. & Mew, T.W. 1992. Biological control of blast disease of rice (*Oryza sativa* L.) with antagonistic bacteria and its Mediation by a *Pseudomonas* antibiotic. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 58: 350–358.

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

IRRI, 1989. Biological control; Blast control. International Rice Research Institute (IRRI), Annual Report for 1988. The Philippines, 231–232.

IRRI. 2013. Standard Evaluation System for Rice. 5th edition. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Javan Nikkhah, M. 2001. Study on the genetic diversity of *Magnaporthe grisea,* rice blast pathogen by using molecular, pathogenicity and vegetative compatibility characters in Guilan province. Ph. D. Thesis, University of Tehran. Iran. (In Persian with English summary).

Kazemzadeh Chakoosari, M. 2003. The possibility of biological control of rice sheath blight *(Rhizoctonia solani)* by some bacterial biocontrol agents. M.Sc. Thesis, Tehran University. Iran. (In Persian with English summary).

Kazemzadeh Chakoosari, M., Rostaei, A., Padasht Dehkaee, F. & Khodakaramian, Q. 2012. Biocontrol of rice sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* fungus using certain antagonistic bacteria in the province of Guilan. Journal of Plant Protection, 26: 44–54. (In Persian with English summary).

Khodaparast, S.A. & Sahragard, A. 2004. Rice diseases. The University of Guilan Press. (In Persian with English summary).

Krishnamurthy, K. & Gnanamanickam, S.S. 1998. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7–14: Evaluation of a marker gene and formulations. Biological Control, 13(3): 158–165.

Manidipa, R., Gauri Dutta, S. & Venkata, R.C. 2013. Pseudomonads: Potential biocontrol agents of rice diseases. Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences, 1(9): 19–25.

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. & Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful Bacterium–specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 64: 795–799.

Mu, C., Liu, X., Lu, Q., Jiang, X. & Zhu, C. 2007. Biological control of rice blast by *Bacillus subtilis* B–332 strain. Acta Phytophylacica Sinica, 34(2): 123–128.

Ningthoujam, D.S., Sanasam, S., Tamreihao, K. & Nimaichand, S. 2009. Antagonistic activities of local actinomycete isolates against rice fungal pathogen. African Journal of Microbiology Research, 3(11):737–742.

Omoboye, O.O., Oni1, F.E., Batool, H., Yimer, H.Z., De Mot, R. & Höfte1, M. 2019. Pseudomonas cyclic Lipopeptides suppress the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* by induced resistance and direct antagonism. Frontiers in Plant Science, 10: 1–17.

Ou, S.H. 1985. Rice diseases. 2th ed. Commonwealth Mycological Institute.

Padasht Dehkaei, F. & Izadyar, M. 2007. Study on the biological control of rice blast disease in the field conditions. Journal of Agriculture Sciences and Natural Resources, 13: 84–92. (In Persian with English summary).

Padasht Dehkaei, F., Popushoi, I., Izadyar, M., Khodakarmian, G. & Gharyazei, B. 2002. Effects of selected antagonistic bacteria in controlling of rice blast disease. Proceeding of 3th International Rice Blast Conference. 11–14 Sept., Tsukuba, Ibaraki, Japan,

Rosales A.M. & Mew T.W. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice–associated antagonistic bacteria. Plant Disease, 81 (1): 49–52.

Rosales, A.M., Mew, T.W. & Nuque, F.L. 1986. Biological control of bakanae disease of rice [*Oryza sativa*] by antagonistic bacteria [Philippines]. 17th Anniversary and Annual Convention of the Pest Control Council of the Philippines, 8–10 May, Iloilo City, Philippines (abstract).

Rostami, M., Momeni, A., Khosravi, V., Zare, L., Darvishzadeh, N., Omran, M. & Ghalandari, M. 2012. Identification and investigation of effects of antagonistic bacterial agents on rice blast control. Proceeding of 20th Iranian Plant Protection Congress, 25–29 August, Shiraz, Iran.

Safari Motlagh M.R. 2005. Morphological study of Bipolaris species, the causal agent of rice brown spot disease and determination of their genetic variation based on molecular methods, RAPD–PCR and PCR–RFLP in Guilan province. Ph. D. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran. (In Persian with English summary).

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).

SAS. 2005. SAS/STAT User's Guide Version 9.1. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Sha, Y., Wang, Q. & Li1, Y. 2016. Suppression of *Magnaporthe oryzae* and interaction between *Bacillus subtilis* and rice plants in the control of rice blast. SpringerPlus, 5:1238–1251.

Schaad, N.W., Jonse, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.3rd edition, APS Press.

Sherafati, F., Khodaygan, P., Azadvar, M., Sedaghati, E., Saberi–Riseh, R. & Baghaee–Ravari, S. 2014. Association *of Pantoea agglomerans* with the citrus bacterial canker disease in Iran. Journal of Crop Protection, 3: 345–355.

Sivakumar, D., Wijeratnam, R.W., Wijesundera, 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.

Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundaresan, V. & Bais, H. 2014. Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. BMC Plant Biology, 14:130–147.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25: 4876–4882.

Wiraswati, S.M., Rusmana, I, Nawangsih, A.A. & Wahyudi, A. T. 2019. Antifungal activities of bacteria producing bioactive compounds isolated from rice phyllosphere against *Pyricularia oryzae*. Journal of Plant Protection Research, 59(1): 86–94.

Yasmin, S., Hafeez, F.Y., Mirza, M.S., Rasul, M., Arshad, H.M. I., Zubair, M. & Mazhar, I. 2017. Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. Frontiers in Microbiology, 8: 1–23.

Evaluation of the effectiveness of some bacterial isolates in biological control of rice blast disease

Mohammad Reza Safari Motlagh[1], Mohammad Yazdani[2]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Department of Plant Protection, Deylaman Institute for High Education, Lahijan, Iran

Corresponding author: Mohammad Reza Safari Motlagh, email: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

Received: July, 19, 2020 8(1) 73-87 Accepted: Mar., 10, 2021

Abstract

Rice blast disease, which is caused by *Pyricularia oryzae*, is one of the most important diseases of rice in the world. In this research, out of 150 infected samples collected from rice farms of Guilan province, 20 fungal isolates and 30 bacterial isolates were collected. The isolated bacteria were belonged to *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp., *Enterobacter cloacae* and *Bacillus subtilis*. Two methods of dual culture and the production of volatile antifungal metabolites were used in the laboratory in order to study biological control. In the greenhouse trial, rice plants (cv Hashemi) were inoculated with the six bacterial isolates as well as *P. oryzae* pathogen after 12 days. According to the results of this research, in the dual culture method, *P. aeruginosa* Y–25–3 with 61.11% and in the volatile metabolite method, *B. subtilis* W with 60.51% were found to be most effective in suppressing mycelial growth of the pathogenic fungus. All isolates significantly alleviated the severity of the *P. oryzae*–induced disease in greenhouse, but the most effective was *P. aeruginosa*, which reduced the disease index by 70.53%. Analysis of variance and comparing the characters average in Duncan test and Least Significant Difference (LSD) and based on a completely randomized design revealed significant differences among the bacteria in terms of mycelial inhibition in the dual culture and volatile metabolite methods. Furthermore, in greenhouse trials there were significant differences in the disease index, plant height and fresh weight among the treatments, whereas the treatments did not exhibit any significant differences in dry weight. Based on the results of biocontrol assays in the laboratory and greenhouse, *P. aeruginosa* Y–25–3 was recognized as the most effective bacterial isolate in the control of rice blast disease.

Keywords: antagonism, bacteria, biological control, *Pyricularia oryzae*, rice