

تأثیر میکروارگانسیم‌های آنتاگونیست خاک‌های شالیزار گیلان روی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج

فریدون پاداشت دهکایی^۱، شهناز منصوری جاجایی^۲ و حمید روحانی^۳

چکیده

یک صد و دو جدایه میکروارگانسیم از ۸۵ نمونه خاک شالیزارهای نقاط مختلف استان گیلان سواسازی شدند. پس از بررسی آثار آنتاگونیستی آنها در مقابل قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج (*Gibberella fujikuroi*) در محیط غذایی PDA، بیست و یک جدایه برای آغشتن بذر در محیط مرطوب انتخاب شدند. هفت جدایه که تأثیر خوبی در کاهش تشکیل پرگنه بیمارگر روی بذر و گیاهچه داشتند، اثرشان در کنترل بیماری در یک آزمایش گلخانه‌ای و به صورت اسپلیت پلات بررسی شدند. این جدایه‌ها شامل *Bacillus subtilis*، *B. circulans*، *Bacillus sp.*، *Trichoderma harzianum*، *T. virens* (دو جدایه) و F. 23 (شناسایی نشده) بودند. نتایج نشان داد که همه آنتاگونیست‌ها در مقایسه با شاهد در کاهش بیماری در خاک سترون مؤثر بودند ولی تأثیر کلی *B. circulans*، *T. harzianum* و *T. virens* بهتر از بقیه آنتاگونیست‌ها و کمتر از تیمار قارچ‌کش (تیوفانات متیل تیرام، ۲ گرم در لیتر) بود. همچنین مشخص شد که آغشتن بذر با آنتاگونیست‌ها قبل از آلوده‌سازی به بیمارگر تأثیر معنی‌داری در کاهش آلودگی نسبت به تأخر به کارگیری آنتاگونیست‌ها بعد از آلوده‌سازی به بیمارگر داشته است.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیماری‌ها، کنترل بیولوژیک، پوسیدگی طوقه، میکروارگانسیم‌های آنتاگونیست

مقدمه

بیماری نیز با نام *Gibberella fujikuroi* Wollenw (Saw.) برای نخستین بار از ایران در مزارع شهرستان فومن جمع‌آوری و گزارش گردید (۳). این بیماری عموماً به عنوان بیماری بذرزاد شناخته شده است ولی عامل این بیماری علاوه بر بذر، در خاک نیز قادر به ادامه حیات است ولی در مناطق گرمسیری نمی‌تواند مدت زیادی در خاک دوام داشته باشد (۱۷). بررسی‌های انجام

بیماری پوسیدگی طوقه برنج یکی از بیماری‌های مهم برنج است که از مرحله جوانه‌زنی، خزانه تا شالیزار روی برنج دیده می‌شود (۱۶) در ایران نخستین بار ابراهیم نسبت (۱) این بیماری را از شالگوراب فومن گزارش کرد و عامل آن را *Fusarium moniliforme* تعیین کرد. فرم جنسی عامل این

۱. استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

۲. مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، کرج

۳. دانشیار گیاه‌پزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

فلورسنت بیشتر از فلورسنت‌ها بودند و ۱۲ جدایه از هر دو گروه قادر به جلوگیری از رشد رویشی قارچ‌های عامل بیماری بلاست، سوختگی غلاف و پوسیدگی طوقه برنج بوده‌اند (۱۳). روزالز و همکاران (۱۹) تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده از مزارع را که علاوه بر خاصیت آنتاگونیستی در مقابل قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف برگ (*Rhizoctonia solani*)، خاصیت مشابهی نیز در مقابل عامل پوسیدگی طوقه برنج داشتند شناسایی کردند. این باکتری‌ها شامل *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *B. pumilus*، *B. laterosporus* و *Serratia marcescens*، *Erwinia herbicola-like* و *P. Putida* پسودوموناس‌های ساپروفیت روی بذر شامل *P. cepacia* بودند. روزالز و میو (۲۰) گزارش کردند که از ۴۴۱ جدایه باکتری سواسازی شده از مزارع برنج ۱۱۳ جدایه از رشد رویشی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه جلوگیری کردند. تأثیر این باکتری‌ها در جلوگیری از بروز بیماری در خزانه به صورت غوطه‌ور کردن بذر با آلودگی طبیعی در سوسپانسیون باکتری‌ها، ۷۱/۷ الی ۹۳/۶ درصد بود. در این بررسی اثر آنتاگونیستی میکروارگانیزم‌های سواسازی شده از خاک مزارع برنج استان گیلان روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج و شناسایی آنها مورد مطالعه قرار می‌گیرد. در این ارتباط تاکنون پژوهش دیگری در ایران صورت نگرفته است ولی گزارش‌هایی در رابطه با کنترل بیولوژیک بیماری‌های سوختگی غلاف و بلاست برنج منتشر شده است (۲ و ۶).

مواد و روش‌ها

۱. تهیه نمونه‌های خاک

با شروع فصل زراعی از خزانه و مزارعی که بیماری پوسیدگی طوقه برنج در آنها کم و یا قابل رویت نبود و هم‌چنین خارج از فصل، نمونه‌های خاک از ۸۵ مزرعه از نقاط مختلف استان گیلان تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. در هر مزرعه از پنج نقطه نمونه‌هایی با ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر تهیه و سپس با هم مخلوط

شده در گیلان نشان داد که عامل بیماری در بقایای گیاهی تا فصل زراعی بعد در مزرعه زنده می‌ماند (۵). برای کنترل این بیماری بهترین راه توصیه شده ضد عفونی بذور می‌باشد که در گیلان نیز قارچ کش‌های بنومیل تیرام (40% W. P.) و تیوفانات متیل تیرام (80% W. P.) برای این منظور معرفی شده‌اند (۴). سموم شیمیایی در پایداری تولید و نگهداری غذای بشر نقش انکارناپذیری دارند ولی به عنوان آلاینده محیطی نگرانی‌ها و مشکلات زیادی را در سرتاسر جهان امروز به وجود آورده‌اند چنانچه راجوت (۱۸) مخاطرات آنها را جز چند مسئله فوری از مسائل دشوار کشاورزی ذکر کرده است. با مشخص شدن تأثیر سوء سموم بر محیط زیست و سلامتی انسان، دست‌یابی به روش‌های سالم جایگزین، یکی از اهداف مهم در کنترل عوامل خسارت‌زای زنده به محصولات در کشاورزی شده است. کنترل بیولوژیک یکی از روش‌هایی است که امروزه سرمایه‌گذاری گسترده‌ای در دنیا به این امر اختصاص یافته است. هر چند که این روش در بسیاری از محصولات به صورت عملی در مزارع به اجرا در نیامده است ولی تاریخچه علوم نشان می‌دهد که پیگیری در تداوم پژوهش‌ها، در نهایت به دست آورده‌های عملی و گسترش دانش در آن عرصه‌ها منجر شده است.

برنج در زمره محصولات است که تحقیقات نسبتاً خوبی به‌منظور شناسایی عوامل کنترل‌کننده بیولوژیک بیماری‌های پوسیدگی طوقه، لکه قهوه‌ای، بلاست و مخصوصاً سوختگی غلاف برگ (Sheath blight) روی آن صورت گرفته است. در مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج نشان داده شد که باکتری‌هایی سواسازی شده از مزارع برنج علاوه بر متوقف کردن بیماری سوختگی غلاف برنج، از رشد رویشی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه نیز جلوگیری کردند و تیمار کردن بذرهای آلوده با باکتری‌های نام برده سبب افزایش جوانه‌زنی آنها و کاهش آلودگی پهنجه‌ها شد (۱۲). در کره از ۱۶۷ باکتری سواسازی شده از آب، خاک و بافت‌های آلوده و سالم گیاه برنج، تعداد باکتری‌های غیر

گردید. هر نمونه مخلوط معرف یک نمونه از یک مزرعه یا محل تلقی شد.

۲. جداسازی میکروارگانیزم‌ها

قارچ عامل بیماری را در شیشه‌های درب‌دار حاوی آب آگار کشت داده، پس از این‌که قطر کلنی آن حدود ۲ سانتی‌متر شد از هر نمونه خاک به ارتفاع ۲ سانتی‌متر روی کلنی بیمارگر به طور جداگانه قرار داده شدند (هر نمونه خاک در ۳ شیشه). این شیشه‌ها به مدت یک ماه در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با نور متناوب ۱۲ ساعته نگهداری شدند. سپس در هر شیشه قرصی به قطر ۶ میلی‌متر از محیط غذایی PDA (حاوی ۲۰ گرم آگار در لیتر) روی خاک قرار داده، یک هفته بعد از نگهداری در همان شرایط، قرص‌های PDA را برداشته و روی محیط غذایی PDA در تشک پتری کشت داده شدند. هفت تا ۱۰ روز بعد کلنیزه شده قرص‌های مذکور توسط قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفتند (۹). در هر نمونه، از قرص‌های PDA کشت شده که فقط توسط میکروارگانیزم‌های خاک کلنیزه شده و قارچ عامل بیماری از روی آنها قابل مشاهده و ردیابی نبود، به روش تک اسپورسازی و تک کلنی میکروارگانیزم‌های رشد یافته جداسازی شدند.

۳. بررسی خاصیت آنتاگونیستی میکروارگانیزم‌های سواسازی شده

الف) کشت متقابل

قرصی به قطر ۶ میلی‌متر از هر جدایه قارچ و یا یک لوپ از سوسپانسیون باکتری‌های سواسازی شده، در شاهد یک قرص PDA و یا یک لوپ از آب مقطر استریل را در مرکز تشک پتری و چهار قرص از بیمارگر به فاصله ۳ سانتی‌متر در چهار طرف آن روی محیط PDA کشت شدند (۲۴). تشک‌های پتری را در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با نور متناوب ۱۲ ساعته قرار داده، پس از ۴ و ۷ روز شعاع رشد بیمارگر اندازه‌گیری شد. به علاوه تغییرات مرفولوژیکی میسیلوم‌های بیمارگر در مقایسه با شاهد مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

ب) ترشحات فرار

قرصی از کشت تازه بیمارگر و قارچ‌های سواسازی شده و یا یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های جداسازی شده را روی محیط غذایی PDA کشت داده (هر میکروارگانیزم مورد آزمایش در ۳ تکرار)، تشک‌های پتری حاوی بیمارگر را به طور وارونه روی تشک‌های حاوی قارچ‌ها و باکتری‌های مورد آزمایش قرار داده، محل اتصال لبه تشک‌ها با پارافیلیم مسدود شدند. در شاهد تشک‌های حاوی قرص بیمارگر روی تشک‌های حاوی محیط کشت PDA که روی آن یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل پخش شده یا قرصی از PDA در مرکز آن گذاشته شده بود به طور وارونه قرار داده شد. تشک‌ها را در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با نور متناوب ۱۲ ساعته قرار داده و پس از هفت روز قطر پرگنه بیمارگر اندازه‌گیری و درصد بازداری از رشد بیمارگر تعیین شد.

۴. ارزیابی اثر آنتاگونیست‌ها به صورت آغشته نمودن بذر

در کلیه آزمایش‌های زیر بذر برنج مورد استفاده از رقم حساس خزر بوده که نخست به مدت ۱۵ دقیقه با آب جاری (آب لوله‌کشی شهری) شستشو شده و سپس ۱۵ دقیقه در آب مقطر در حرارت ۵۷-۵۲ درجه سانتی‌گراد ضد عفونی سطحی گردید.

آلوده‌سازی بذر به قارچ عامل بیماری (*Fusarium fujikuroi* Syn. *F. moniliforme*) به روش وادا و همکاران (۲۳) انجام شد که به ازای هر ۵۰ گرم بذر ۹ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به نسبت یک میلیون اسپور در هر میلی‌لیتر به آن اضافه و به خوبی مخلوط شد.

برای تیمار کردن بذر به آنتاگونیست‌ها، غلظت اسپور قارچ‌های آنتاگونیست ۱۰ میلیون اسپور در هر میلی‌لیتر و باکتری‌ها با کدورت مناسب (حدوداً 10^8 cfu) در محلول ژلاتین ۲/۵ گرم در لیتر بوده است.

الف) در محیط مرطوب

یازده جدایه باکتری و ده جدایه قارچ آنتاگونیست انتخابی به طور جداگانه و به دو روش مورد ارزیابی قرار گرفتند.

پلات فرعی (S) در ۹ سطح، شامل ۷ میکروارگانیزم آنتاگونیست انتخابی از آزمایش‌های بند الف به شماره جدایه‌های B.84 و B.58، B.11، F.23، F.42، F.64، F.90 به اضافه شاهد آلوده و تیمار قارچ‌کش بودند. قارچ‌کش مورد استفاده سم تیوفانات متیل تیرام (پودر و تابل ۸۰٪) به نسبت دو در هزار بود که در حال حاضر برای کنترل این بیماری توصیه شده و در شمال کشور استفاده می‌شود (۴).

بذرهای تیمار شده در ظرف‌های پلاستیکی یک بار مصرف به ابعاد ۱۹×۱۳×۵ سانتی‌متر حاوی خاک سترون کشت شدند. در هر تشتک ۲۰۰ عدد بذر کشت شدند که به عنوان یک تکرار منظور گردیدند. کلیه تشتک‌ها در گلخانه نگهداری شده و برای آبیاری از آب مقطر استفاده شد. پس از یک ماه در هر تیمار نشاهای سالم و مرده شمارش شده، بر اساس درصد نشاهای مرده و پس از تبدیل جذری $(\sqrt{X} + \frac{1}{2})$ (۷) به کمک نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

یک‌صدو دو جدایه قارچ و باکتری از نمونه‌های خاک شالیزارهای استان گیلان سوسازی شدند که اثر همه آنها روی رشد رویشی بیمارگر در محیط کشت PDA به روش کشت متقابل بررسی شد. براساس بررسی‌های میکروسکوپی از کل میکروارگانیزم‌های مورد آزمایش ۳۰ جدایه سبب تغییرات مرفولوژیک در میسلیم‌های بیمارگر شدند که این علایم شامل شاخه شاخه شدن، به هم پیچیدن، ضخیم شدن میسلیم‌ها همراه با گلوله‌ای تا لیمویی شکل شدن نوک میسلیم‌ها و گاهی تسبیحی تا زیگزاگ شدن میسلیم‌های انتهایی بوده است. به علاوه واکنش، قطعه قطعه و لیز شدن نیز در میسلیم‌های بیمارگر مشاهده گردید. انتخاب میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست برای آزمایش‌های بعدی براساس درصد بازداری از رشد رویشی بیمارگر، در کشت متقابل و در اثر ترشحات فرار آنها و فاصله زمانی ایجاد تغییرات مرفولوژیکی در بیمارگر پس از کشت در مقابل هم، صورت گرفت. در جدول‌های ۱ و ۲ نتایج

۱- آغشته کردن بذرها به آنتاگونیست‌ها و سپس آلوده‌سازی به بیمارگر (محافظة): بذر برنج را در سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها و در تیمار شاهد در محلول ژلاتین غوطه‌ور نموده، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری آلوده شده و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت گردیدند. ۲. آلوده‌سازی بذرها به بیمارگر و سپس آغشته کردن آنها به آنتاگونیست‌ها (معالجه): این قسمت همانند قسمت قبل انجام شد با این تفاوت که نخست بذور با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری آلوده‌سازی شده و پس از ۲۴ ساعت نگهداری آنها در انکوباتور، با سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها آغشته و کشت شدند. برای هر تیمار ۴۰۰ عدد بذر (در هر تکرار ۱۰۰ بذر) کشت شدند.

برای ارزیابی، ۱۵ روز پس از نگهداری تشتک‌های پتری حاوی بذور تیمار شده در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد، درصد گیاهچه‌هایی که در این مدت پرگنه بیمارگر روی آنها تشکیل شد، تعیین شده، پس از تبدیل جذری $(\sqrt{X} + \frac{1}{2})$ (۷) به کمک نرم‌افزار IRRISTAT version 92-1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

ب) اثر آنتاگونیست‌های انتخابی در کنترل بیماری در گلخانه
این آزمایش در قالب اسپلیت پلات و به صورت طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شد. پلات اصلی (M)، زمان به‌کاری گیری آنتاگونیست‌ها بود که در دو سطح اجرا شد: m1 - نخست بذرها را به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها غوطه‌ور نموده، سپس با سوسپانسیون قارچ عامل بیماری آلوده‌سازی شده، ۲۴ ساعت در انکوباتور در حرارت ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (محافظة). m2 - نخست بذرها با سوسپانسیون قارچ عامل بیماری آلوده شده و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در انکوباتور، ۲۴ ساعت دیگر در سوسپانسیون آنتاگونیست‌ها غوطه‌ور شدند (معالجه).

اثر یازده جدایه باکتری و ده جدایه قارچ آنتاگونیست انتخابی در جلوگیری از رشد رویش قارچ عامل بیماری روی بذر مصنوعاً آلوده شده، به صورت ضد عفونی بذر در محیط کاغذ صافی مرطوب آمده است. نتیجه اولیه از جدول تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از این بررسی که به صورت دو آزمایش جداگانه برای باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست و به دو روش انجام شد، نشان داد که اثر تیمارها در سطح یک درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین اثر باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست با همدیگر و شاهد در محیط مرطوب براساس درصد گیاهچه‌هایی که پرگنه بیمارگر روی آنها تشکیل گردید، در جدول‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که باکتری‌های B.58، B.84 و قارچ‌های F.23، F.42، F.90 و F.64 در هر دو روش ارزیابی شده تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد با شاهد داشتند. هم‌چنین چهار جدایه قارچ مذکور سبب بالاترین درصد بازداری از رشد رویشی بیمارگر در کشت متقابل شدند ولی تأثیر ترشحات قرار جدایه F.23 بسیار کمتر از ۳ جدایه دیگر بود. از باکتری‌های مورد آزمایش ترشحات فرار باکتری B.84 دارای بیشترین درصد بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر بوده و به همراه باکتری B.11 دارای بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد بیمارگر در کشت متقابل بوده‌اند.

براساس آنچه که ذکر شد و به صورت کمی نیز در جداول ۱ و ۲ آمده است، هفت جدایه قارچ و باکتری F.64، F.90، F.42، F.23، B.84، B.58، B.11 برای ادامه بررسی در گلخانه انتخاب شدند، این میکروارگانیزم‌ها به ترتیب دو جدایه اول تحت عنوان *Trichoderma virens* و جدایه سوم به نام *T. harzianum* شناسایی شدند و جدایه F.23 نیز شناسایی نشده باقی ماند. سه جدایه آخری نیز که از باکتری بودند براساس روش‌های استاندارد بیوشیمیایی (۱۱ و ۲۱) به ترتیب تحت عناوین *Bacillus subtilis* sp، *B. circulans* و *B. subtilis* شناسایی شدند. جدول تجزیه واریانس اثر میکروارگانیزم‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گلخانه نشان می‌دهد که پلات اصلی یعنی روش به کارگیری میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست و یا به

عبارت دیگر تقدم و تأخر به کارگیری آنتاگونیست‌ها در تیمار بذر تأثیر معنی‌داری در میزان آلودگی بعدی دارد. این موضوع در جدول ۳ به وضوح نشان داده شده است. همانطور که در این جدول آمده است درصد نشاهای مرده در همه تیمارها (به جز تیمار قارچ کش) در پلات m1 به‌طور معنی‌داری کمتر از پلات m2 بود. یعنی آغشته کردن بذرها با آنتاگونیست‌ها قبل از آلوده‌سازی به بیمارگر، میزان بیماری بعدی را نسبت به حالتی که عمل آغشته کردن با آنتاگونیست‌ها بعد از آلوده‌سازی بیمارگر انجام شد، بیشتر کاهش داده است. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف پلات فرعی در جدول ۳ نشان می‌دهد که قارچ‌کش تیوفانات متیل تیرام (پودر و تابل ۸۰٪) در هر دو روش ضد عفونی بذور (m1 و m2) با بیشترین تأثیر در جلوگیری از بروز پوسیدگی طوقه (با کمترین درصد نشای مرده) در گروه اول (a) قرار دارد ولی بقیه تیمارها هر چند که در هر دو روش مورد آزمایش در کاهش بیماری مؤثر بودند ولی جایگاه بعضی از آنها در گروه‌بندی بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ در دو روش (m1 و m2) متغیر بود. در روش اول (m1) پس از تیمار قارچ‌کش به ترتیب تیمارهای F.90 (*T. virens*)، F.42 (*T. harzianum*)، F.64 (*T. virens*) و B.84 *subtilis*. در رده‌های ۲ الی ۵ قرار گرفتند ضمن این که هر چهار آنتاگونیست مذکور با همدیگر و با تیمار قارچ‌کش از نظر گروه‌بندی وجه اشتراک دارند ولی در روش بعدی آغشته کردن بذر (m2) یعنی در شرایطی که نخست بذر با بیمارگر آغشته شده و ۲۴ ساعت بعد با آنتاگونیست‌ها تیمار گردید اثر آنتاگونیست‌های مذکور نسبت به تیمار قارچ‌کش کاهش بیشتری یافت. همان‌طور که در گروه‌بندی آنها دیده می‌شود در این روش تیمار قارچ‌کش به تنهایی در گروه اول (a) قرار گرفت. بنابراین تقدم مصرف آنتاگونیست‌ها نسبت به بیمارگر در آغشته نمودن بذر به منظور حفاظت آنها در کاهش بیماری تأثیر بهتری را نشان داده است. این موضوع را می‌بایست ناشی از استقرار و اشغال سطح بذر توسط هر یک از آنتاگونیست‌ها یا بیمارگر قبل از به کارگیری

جدول ۱. مقایسه اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در محیط کشت و ضدعفونی بذرهای آلوده در محیط مرطوب

درصد آلودگی بذر در محیط مرطوب*		درصد بازدارندگی از رشد		تشخیص	شماره جدایه
میانگین***	میانگین**	ترشحات فرار	متقابل		
۶۸/۶ ^{de}	۲۳/۹ ^{ab***}	۷/۱ ^{de}	۵۵/۲ ^a	<i>Bacillus circulans</i>	B.11
۲۸/۲ ^a	۳۲/۷ ^{cde}	۳/۳ ^f	۴۷/۴ ^b	<i>B. circulans</i>	B.28
۳۷/۷ ^{abc}	۳۶/۶ ^{de}	۲۰/۷ ^b	۲۶/۹ ^d	<i>B. circulans</i>	B.29
۵۲/۸ ^{cd}	۲۸/۹ ^{a-d}	۱۴/۸ ^c	۲۹/۴ ^{cd}	<i>B.sp</i>	B.48
۳۵/۲ ^{ab}	۲۲/۹ ^{ab}	۱۴/۴ ^c	۲۰ ^e	<i>B.sp.</i>	B.58
۶۷/۲ ^{de}	۲۹/۷ ^{bcd}	۱۵/۶ ^c	۴۸/۳ ^b	<i>B.sp.</i>	B.71
۶۴ ^{de}	۲۵/۱ ^{abc}	۴/۸ ^{ef}	۲۶/۳ ^d	<i>B.megaterium</i>	B.79
۲۸/۵ ^a	۳۰/۲ ^{b-e}	۴/۶ ^{ef}	۳۴/۵ ^c	<i>B.megaterium</i>	B.83
۳۹/۹ ^{abc}	۲۱/۸ ^a	۲۶/۲ ^a	۵۲/۱ ^{ab}	<i>B.subtilis</i>	B.84
۳۹/۴ ^{abc}	۲۸/۴ ^{a-d}	۸/۲ ^d	۳۱/۶ ^{cd}	<i>B. circulans</i>	B.93
۴۵/۶ ^{bc}	۳۶/۷ ^{de}	۲/۸ ^f	۲۶/۳ ^d	<i>B.sp.</i>	B.94
۷۸/۱ ^e	۳۸/۷ ^e	-	-	شاهد	

*: در هر تکرار تعداد گیاهچه‌هایی که دارای پرگنه یا رشد رویشی قابل رؤیت قارچ عامل بیماری روی طوقه یا بذر متصل به آن بود، شمارش شدند.
 **: بذر ابتدا با آنتاگونیست‌ها آغشته شده، پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با بیمارگر آلوده‌سازی گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.
 ***: بذر ابتدا با بیمارگر آلوده‌سازی شده، پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با آنتاگونیست‌ها آغشته گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.
 ****: در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند فرق معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند (DMRT).

m1 افزایش یابد (جدول ۳). موضوع خوب تثبیت شدن و توانایی کلنیزه کردن بافت گیاهی توسط یک بیمارگر یا یک آنتاگونیست مورد تأکید آندروز (۸) نیز هست و او این موضوع را بزرگ‌ترین اختلاف مابین استرین‌های یک عامل بیوکترول می‌داند. بلاک‌من و فوک‌ما (۱۰) نیز بیان داشته‌اند که سطوح اندام‌های گیاهی جای طبیعی میکروارگانیزم‌ها هست که بسیاری از آنها قادرند رشد پاتوژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند و یک قسمت مهم از کاهش بروز بیماری در گیاهان زراعی در مزرعه در اثر میکروارگانیزم‌های ساپروفیت است و هر گونه تغییر در فاکتورهای محیطی می‌تواند در توازن بین ساپروفیت‌ها و پاتوژن‌ها مؤثر باشد.
 بعضی از میکروارگانیزم‌ها به دلیل تکثیر سریع و سرعت در

دیگری دانست. کاهش میزان آلودگی در تیمار شاهد در روش m1 نسبت به روش m2 را نیز شاید بتوان بر همین اساس توجیه نمود. یعنی مدتی که بذر در تیمار شاهد در آب مقطر قرار می‌گیرد فرصتی را فراهم می‌سازد که علی‌رغم ضدعفونی اولیه آن با آب گرم، باقی مانده فلور طبیعی آن فعال شده و با افزایش مجدد جمعیت و تثبیت شدن روی بذر آن را در برابر آلوده‌سازی بعدی به بیمارگر به طور طبیعی تا حدودی حفظ می‌نماید در حالی که در روش m2 آلوده‌سازی بذر به بیمارگر بلافاصله پس از ضدعفونی آن با آب گرم سبب می‌شود که قارچ عامل بیماری به سرعت سطح بذر را اشغال کرده و روی آن تثبیت شود و میانگین آلودگی در تیمار شاهد و هم‌چنین در بقیه تیمارها به جز تیمار قارچ‌کش نسبت به روش

جدول ۲. مقایسه اثر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در محیط کشت و ضد عفونی بذرها در محیط مرطوب

شماره جدایه	تشخیص	درصد بازدارندگی از رشد		درصد آلودگی بذر در محیط مرطوب*	
		ترشحات فرار	متقابل	میانگین** (محافظت)	میانگین*** (معالجه)
F.20	-	۱۷/۲ ^d	۲۱/۵ ^d	۳۶ ^{ef***}	۳۷/۴ ^b
F.23	-	۲/۵ ^{fg}	۴۴ ^b	۷/۷ ^a	۱۰/۸ ^a
F.24	<i>Trichoderma harzianum</i>	۱/۴ ^g	۲۳/۹ ^{cd}	۲۹/۹ ^{de}	۴۶/۲ ^{bc}
F.30	-	۳/۷ ^{ef}	۹/۶ ^{cd}	۳۶/۶ ^{ef}	۴۷/۵ ^{bc}
F.42	<i>T. harzianum.</i>	۲۹/۳ ^b	۶۰ ^a	۲۱/۱ ^{bc}	۳۸/۱ ^b
F.47	-	۳۱/۸ ^b	۱۲/۱ ^e	۳۸/۲ ^{ef}	۴۸/۴ ^{bc}
F.64	<i>T. virens</i>	۴۷/۳ ^a	۳۶/۹ ^b	۲۳/۹ ^{cd}	۳۵/۳ ^b
F.80	-	۵/۶ ^e	۳۰/۱ ^c	۴۱/۴ ^f	۳۸ ^b
F.85	-	۲۳/۲ ^c	۲۳/۱ ^d	۳۱/۷ ^e	۴۷/۵ ^{bc}
F.90	<i>T. virens</i>	۴۱/۷ ^a	۳۸/۵ ^b	۱۵/۹ ^b	۳۷/۱ ^b
شاهد	-	-	-	۴۳/۲ ^f	۶۱/۶ ^c

*: در هر تکرار تعداد گیاهچه‌هایی که دارای پرگنه یا رشد رویشی قابل رؤیت قارچ عامل بیماری روی طوقه یا بذر متصل به آن بود، شمارش شدند.

** بذر ابتدا با آنتاگونیست‌ها آغشته شده و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با بیمارگر آلوده‌سازی گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.

*** بذر ابتدا با بیمارگر آلوده‌سازی شده و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با آنتاگونیست‌ها آغشته گردید و در محیط مرطوب روی کاغذ صافی کشت شد.

****: در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند فرق معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند (DMRT).

جدول ۳. مقایسه اثر میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست در دو روش آغشتن بذور برنج براساس میانگین درصد نشاهای مرده در گلخانه (داده‌های اصلی)

میانگین پلات فرعی	پلات اصلی (M)		پلات فرعی (S)
	m2 (معالجه)	m1 (محافظت)	
۱۰/۲۶۹ ^d	۱۸/۷۳۳ ^d	۱/۷۶ ^a	F.90= <i>Trichoderma virens</i>
۸/۳۵۸ ^{bcd}	۱۳/۶۷۰ ^c	۳/۰۴۵ ^a	F.64= <i>T. virens</i>
۶/۴۳۵ ^b	۹/۲۴۰ ^b	۳/۶۳۰ ^{ab}	B.84= <i>Bacillus subtilis</i>
۹/۴۹۹ ^{bcd}	۱۳/۸۲۳ ^c	۵/۱۷۵ ^{ab}	B.11= <i>B. circulans</i>
۱۱/۲۴۱ ^d	۱۴/۸۰۳ ^{cd}	۷/۶۸۰ ^{bc}	B.58= <i>B. sp.</i>
۹/۹۳۴ ^{cd}	۱۵/۰۸۸ ^{cd}	۴/۷۸۰ ^{ab}	F.23 (شناسایی نشد)
۶/۹۳۵ ^{bc}	۱۱/۴۰۵ ^{bc}	۲/۴۶۵ ^a	F.42= <i>T. harzianum</i>
۰/۷۶۹ ^a	۰/۵۰۵ ^a	۱/۰۳۳ ^a	قارچ کش (تیوفانات متیل تیرام)
۱۹/۱۰۸ ^e	۲۶/۸۱۸ ^e	۱۱/۳۹۸ ^c	شاهد

در هر ستون تیمارهایی که دارای حروف مشترکی هستند فرق معنی‌داری در سطح ۵٪ با هم ندارند (DMRT).

گونه آنتاگونیست نام برده عموماً به عنوان آنتاگونیست بسیاری از عوامل بیماری‌زا گزارش شده‌اند (۲۲، ۲۵ و ۱۴) و در ایران نیز برای نخستین بار به عنوان آنتاگونیست‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج گزارش می‌گردند. ولی جدایه F.23 که در محیط مرطوب در جلوگیری از تشکیل کلنی بیمارگر روی بذور و گیاهچه در هر دو روش ضد عفونی بذر در گروه اول قرار داشت (جدول ۳) ولی تأثیر آن در شرایط خاک (در گلخانه) کاهش یافته و به ترتیب در رتبه‌های ۶ و ۷ قرار گرفت (جدول ۳). البته انتظار بر این نیست که هر نتیجه‌ای که از بررسی‌های آزمایشگاهی به دست آمده است عیناً در شرایط گلخانه یا مزرعه نیز صادق باشد. این موضوع توسط سایر محققان چنین مطرح شده است که صفات زیادی از یک آنتاگونیست در موفقیت آن دخیل هستند و بیوکنترل نتیجه یک سری از رویدادهاست و غربال کردن ممکن است فقط در همان شرایطی که انجام شده است معتبر باشد. بنابراین تغییر در هر یک از متغیرها مانند محیط کشت یا حرارت در آزمایشگاه و یا زمان یا مکان ارزیابی مزرعه‌ای ممکن است به نتایج متفاوتی منجر شود (۸).

سپاسگزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات برنج کشور که هزینه‌های اجرایی این پژوهش را تأمین نموده است قدردانی و تشکر می‌نمایم. همکاری بی دریغ آقایان ابراهیم دودابی نژاد و حسن پورفرهنگ نیز شایسته تقدیر است. هم چنین از خانم پیشداد که تایپ کامپیوتری این مقاله را انجام داده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

مصرف مواد غذایی و اشغال محیط، در رقابت با گروه دیگری می‌باشند بدون این‌که دارای فعالیت‌های متابولیتی علیه آنها باشند. این موضوع در آزمایش‌های کشت متقابل در محیط کشت نیز دیده شده است به طوری که بعضی از قارچ‌ها در مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت به سرعت رشد نموده، کل محیط کشت در تشتک پتری را اشغال کرده و فرصت رشد به بیمارگر را نداده‌اند. لیندمان و ساس لو (۱۰) عقیده دارند که آنتاگونیست‌هایی که به عنوان رقیب غذایی عمل می‌کنند در مقابل بیمارگرهایی که قبل از نفوذ در میزبان یک دوره رشد ساپروفیتی با استفاده از مواد غذایی خارج سلولی گیاهی دارند، مؤثر هستند و چنین آنتاگونیست‌هایی فقط برای پیشگیری قابل استفاده هستند. در این آزمایش نیز چنانکه در جدول ۱ و ۲ ملاحظه می‌شود بعضی از قارچ‌ها و باکتری‌ها علی‌رغم این که سرعت رشد آنها در محیط کشت در مقابل بیمارگر خوب بوده است (براساس درصد بازداری از رشد بیمارگر در جدول‌های مذکور است) ولی عملاً در ضد عفونی بذر در محیط مرطوب قادر به جلوگیری از تشکیل پرگنه بیماری روی بذور و گیاهچه نبوده‌اند. بعضی جدایه‌ها مانند F.80 با وجود ایجاد محدوده بازداری و سرعت رشد مناسب فقط در یک مرحله از آزمایش در ضد عفونی بذر تأثیر معنی‌داری نسبت به شاهد داشته است. در حالی که جدایه‌های F.64 و (T. virens)F.90، (T. harzianum)F.42 و (B. subtilis)B.84 ضمن سرعت رشد مناسب و بالا، ترشحات فرار آنها نیز دارای تأثیرات مناسبی در جلوگیری از رشد رویشی بیمارگر بوده و در ضد عفونی بذر در محیط مرطوب و سپس در خاک و در گلخانه اثرهای نسبتاً یکنواختی در کنترل بیماری داشته‌اند. سه

منابع مورد استفاده

۱. ابراهیم نسبت، فیروز. ۱۳۴۳. پوسیدگی طوقه برنج. نشریه شماره ۳، انستیتو بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران.
۲. ایزدیار، منوچهر. ۱. پوپوشوی، ف. پاداشت و م. بهرامی، ۱۳۷۹. کنترل بیولوژیک بیماری سوختگی غلاف برگ برنج در شمال ایران. خلاصه مقالات دومین همایش ملی استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی، کرج.

۳. پاداشت دهکایی، ف.، ق.ع. حجاورد، م. ایزدیار، ع. شریفی تهرانی و م. اخوت. ۱۳۷۲. مطالعه فرم جنسی و غیر جنسی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، رشت.
۴. پاداشت دهکایی، ف.، ع. شریفی تهرانی، ق.ع. حجاورد، م. ایزدیار و م. اخوت. ۱۳۷۵. بررسی اثر چند قارچ‌کش در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گیلان. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۲:۲۶۸-۲۷۷.
۵. پاداشت دهکایی، ف. و ق.ع. حجاورد. ۱۳۷۷. چرخه زندگی بیماری پوسیدگی طوقه برنج ناشی از *Gibberella fujikuroi* در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج.
۶. پاداشت دهکایی، ف.، ش. منصوری، ا. پوپوشوی، م. ایزدیار و ب. قره‌یاضی. ۱۳۸۰. انتخاب باکتری‌های آنتاگونیست قارچ *Pyricularia grisea* Sacc. از مزارع برنج. مجموعه مقالات دومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، ۱۷ تا ۱۹ شهریور، مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج.
۷. یزدی صمدی، ب.، ع. ا. رضایی و م. ولی‌زاده. ۱۳۷۶. طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران.
8. Andrews. J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30:603-635.
9. Baker. K. F., N. T. Flenje, C. M. Olsen and H. M. Stretton. 1967. Effects of antagonists on growth and survival of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathol.* 57:591-597.
10. Blakeman. J. P. and N. J. Fokkema. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:167-192.
11. Holt. J. G., P. H. A. Sneath, N. S. Mair and M. E. Sharp. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2, Williams and Wilkins Publishing Co, London.
12. IRRI (International Rice Research Institute). 1986. Biological control. *Ann. Report for 1985. FRRRI The Philippines.* 144-146.
13. IRRI (International Rice Research Institute). 1987. Biological control. *Ann. Report for 1986. IRRI, The Philippines.*
14. Lazzarctti, E. and W. Bettiol. 1997. Treatment of rice, bean, Wheat and soybean with a product consisting of cells metabolites of *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricola* 54:89-96.
15. Lindcman, J. and T. V. Suslow. 1987. Competition between ice nucleation-active wild type and ice nucleation-deficient deletion mutant strains of *Pseudomonas syringae* and *P. fluorescens* biovar I and biological control of frost injury on strawberry blossoms. *Phytopathol.* 77:882-886.
16. Ogwana, K. 1988. Damage by bakanae disease and its chemical control. *Jpn. Pestic. Inf.* 52:13-15.
17. Ou, S. H. 1985. *Rice diseases*. 2nd ed. Commonwealth Mycol Inst., Kew, England, 380p.
18. Rojotte, E. G. 1993. From profitability to food safety and the environment: Shifting the objectives of IPM. *Plant Dis.* 77:296-299.
19. Rosales, A. M., L. Thomashow, R. J. Cook and T. W. Mew. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas spp.* *Phytopathol.* 85:1028-1032.
20. Rosales, A. M. and T. W. Mew. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by associated antagonistic bacteria. *Plant Dis.* 81:49-51.
21. Schaad, N. W. 1988. *Laboratory guide for identification of Plant pathogenic bacteria*. 2nd ed., APS Press.
22. Sy, A., A. Albertini and M. Moletti. 1994. Biological control of rice blast. pp:521-527. *In: Zeigler, R. S., S. A. Leong and P. S. Teng. Rice Blast Disease. IRRI, The Philippines.*
23. Wada, T., S. Kuzuma and M. Takinaka. 1990. Sensitivity of *Fusarium moniliforme* isolates to Pefurazoat. *Ann. of the Phytopathol. Soc. of Jpn.* 4:446-456.
24. Wood, R. K. S. 1951. The control of diseases of lettuce by use of antagonistic organisms, I: The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Ann. Appl. Biol.* 38-203.
25. Yamada, S., Y. Takayama, M. Yomanaka, K. Ko and I. Yamaguchi. 1990. Biological activity of antifungal substances produced by *Bacillus subtilis*. *J. Pestic. Sci.* 15:95-96.