مقاله تحقیقی

مهار زیستی بیماری بلاست برنج با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

محمدرضا صفری مطلق

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

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

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۱/۱۲ ۸(۲) ۱۹-۳۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۱

چکیده

بیماری بلاست برنج با عامل *Pyricularia oryzae* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی برنج در ایران و جهان است. از ۱۵۰ نمونه نشاء، برگ و خوشه سالم و آلوده برنج جمع‌آوری شده از مزارع برنج استان گیلان، ۶۸ جدایه قارچی به‌دست آمد. ۱۱ جدایه قارچی شناسایی‌شده بر مبنای روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شامل *Ulocladium alternariae*، *Ulocladium* cf. *alternariae*، *Ulocladium* sp.، *Curvularia pallescens*، *Preussia* sp.، *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma virens*، *Trichoderma viride*، *Alternaria citri* و *Epicoccum* sp. که در آزمون بیماری‌زایی قادر به ایجاد بیماری روی برنج نبودند، برای مطالعات مهار زیستی بیماری بلاست برنج انتخاب شدند. در آزمایشگاه از آزمون‌های کشت متقابل، کشت روی اسلاید، متابولیت‌های فرار و عصاره کشت استفاده شد و براساس نتایج به دست آمده، جدایه‌های *T. harzianum*، *T. virens*، *T. viride*، *A. citri* و *U.* cf. *consortiale* به‌ترتیب بیشترین درصد مهار رشد میسلیومی بیمارگر را نشان دادند. این جدایه‌های قارچی در مرحلهٔ چهار برگی روی گیاه برنج رقم هاشمی در شرایط گلخانه مایه‌زنی شدند. تمامی جدایه‌ها به استثنای *U.* cf. *alternariae* قادر به کاهش شدت بیماری بلاست برگ شدند که *T. harzianum* با کاهش شدت بیماری به‌میزان ۲۷/۳۶ درصد مؤثرترین آنتاگونیست در بررسی‌های گلخانه‌ای بود و پس از آن جدایه‌های *T. virens*، *T. viride* و *A. citri* قرار داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) نشان داد که بین قارچ‌های بیوکنترل *T. harzianum*، *U.* cf. *alternariae* و *Preussia* sp. اختلاف معنی‌داری از نظر کارآیی در کنترل بیماری بلاست برنج وجود دارد. همچنین از لحاظ آماری بین قارچ‌ها در مورد تاثیر بر ارتفاع، وزن تر و وزن خشک بوته‌های برنج در گلخانه اختلاف معنی‌داری وجود داشت و در میان آن‌ها، *T. harzianum* بیشترین کارآیی را در بهبود این صفات نشان داد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قارچ‌های مختلفی در میکروفلور گیاه برنج وجود دارند که به‌طور بالقوه توانایی مهار زیستی بیماری بلاست برنج را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیسم، برنج، شدت بیماری، *Trichoderma* spp.

مقدمه

برنج پس از گندم مهم‌ترین محصول کشاورزی بوده و نقش زیادی در تغذیه مردم جهان دارد. این محصول پس از گندم بیش‌ترین سطح زیرکشت را در جهان به خود اختصاص داده است (Safari Motlagh *et al.*, 2005). بیماری بلاست که عامل آن قارچ *Pyricularia oryzae* Cavara است به‌عنوان مهم‌ترین بیماری برنج در بیشتر کشورهای برنج‌خیز دنیا به‌شمار می‌رود (Zakaria & Misman, 2018). بیماری بلاست تاکنون از ۸۵ کشور جهان گزارش شده است و می‌توان گفت هر جایی که برنج به‌صورت تجاری و در سطح وسیع کشت می‌شود این بیماری نیز در آنجا وجود دارد (Ou, 1985). بنابراین، بلاست برنج می‌تواند به‌طور جدی بر امنیت غذایی تأثیر بگذارد، به‌ویژه در کشورهای آسیایی که ۵۵ درصد از

جمعیت جهان زندگی می‌کنند و ۹۲ درصد از برنج کشت و مصرف می‌شود (Wilson & Talbot, 2009). در ایران خسارت آن در اپیدمی سال ۱۳۵۳ تقریباً ۱۰ درصد کل محصول برنج گیلان برآورد شده است (Izadyar, 1998). به همین دلیل تحقیقات گسترده‌ای برای کنترل آن از جنبه‌های مختلف از جمله تهیه و مصرف انواع قارچ‌کش‌ها، شناسایی منابع ژنی مقاومت و تهیه ارقام اصلاح شده مقاوم، تهیه سیستم‌های پیش‌آگاهی، بررسی عوامل اثرگذار در شدت و کاهش بیماری همانند عناصرغذایی، رطوبت و غیره انجام شده است (Padasht Dehkaei, 2001). در مبارزه با بیماری بلاست علاوه بر این‌که بایستی اصول زراعی مناسبی رعایت شود، به علت تنوع ارقام محلی و زودرس یا دیررس بودن آن‌ها و همچنین شرایط جوی گوناگون در سال‌های زراعی و نقاط مختلف، مبارزه با این بیماری بدون در نظرگرفتن عملیات پیش‌آگاهی بسیار مشکل و در بسیاری موارد ناموفق بوده است (Javan-Nikkhah, 2001). از طرف دیگر خطرات ناشی از مصرف آفت‌کش‌های شیمیایی برهمگان مسلم گشته لذا سعی در ارائه روش‌های جایگزین مناسب برای مواد شیمیایی، سبب پیشرفت‌های بسیاری در این باره شده است، به‌طوری که امروزه مهار زیستی این بیماری نیز موضوع مورد مطالعه بسیاری از محققان شده است.

میکروارگانیسم‌های مفید برای مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی در میان قارچ‌ها و باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. در بررسی عوامل قارچی و باکتریایی مشخص شد، بین یک تا ۱۰ درصد آن‌ها دارای توانایی جلوگیری از رشد بیمارگرها در شرایط آزمایشگاهی بودند ولی تعداد کمی از آن‌ها بیماری‌های گیاهی را در شرایط رشدی مختلف کاهش داده و تعداد کمی از آنها دارای طیف وسیع فعالیت کنترلی علیه چندین بیمارگر مختلف هستند (McSpadden & Fravel, 2002). در پژوهشی مشخص شد که *Trichoderma harzianum* و *Chaetomium globosum* قادرند ۷۰ تا۸۰ درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی و جوانه زدن کنیدیومی *P. grisea* را سبب شوند (Gouramanis, 1997). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که کاربرد جدایه‌های مختلف *Trichoderma* باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده به وسیله قارچ عامل بیماری بلاست برنج می‌گردد (Ouazzani *et al*., 1998).

در مطالعه توانایی ۲۰ میکروارگانیزم آنتاگونیست در جلوگیری از توسعه بیماری بلاست برگ مشخص شد که *C. globosum*، *Micromonospora* sp. و *T. harzianum* از مؤثرترین آنتاگونیست‌ها هستند (Padasht Dehkaei *et al.*, 2002). همچنین استفاده از جدایه‌های *Exserohilum monoceras* که در علف هرز سوروف بیماری‌زا است در کاهش توسعه بلاست برگ موثر بود (Ohtaka *et al*., 2008). در ارزیابی مهار زیستی *P. grisea* به‌وسیله قارچ‌های آنتاگونیست بیشترین بازدارندگی در رشد میسلیومی این قارچ توسط *Paecilomyces lilacinus* و گونه‌هایی از تریکودرما مانند *T. harzianum* و *T. polysporum* به‌دست آمد (Hajano *et al*., 2012). در بررسی اثرات ضدقارچی *Saccharopolyspora erythraea* روی *P. grisea* درشرایط آزمایشگاهی و گلخانه، *S. erythraea* در آزمون‌های دیسک– آگار، نشت از چاهک در آگار و کشت متقابل با تولید متابولیت‌های ضدقارچی توان بیوکنترلی بالایی از خود نشان داد (Amini *et al*., 2012).

گونه‌های مختلف تریکودرما از موثرترین قارچ‌ها در زمینه مهار زیستی بیماری‌های گیاهی بوده و با مکانیسم‌های مختلفی هم‌چون آنتی‌بیوز، رقابت و مایکوپارازیتیسم عمل می‌کنند (Singh *et al*., 2012). با ارزیابی سه فرآورده تجاری به‌دست آمده از جدایه‌های تریکودرما برای کنترل بیماری بلاست برنج در مزرعه، این نتیجه حاصل شد که این ترکیبات باعث افزایش عملکرد برنج و کاهش شدت بیماری می‌شوند (Khosravi *et al*., 2011). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که 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 هستند (Rostami *et al*., 2012). در یک آزمایش خاصیت آنتاگونیستی *Epicoccum* sp. در مقابل قارچ‌های بیماری‌زای برنج مانند *Magnaporthe oryzae*، *Rhizoctonia solani*، *Sarocladium oryzae*،

Monographella albescens و *Cochliobolus miyabeanus* در کشت دوتایی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که *Epicoccum* sp. در برابر بلاست برگ، توانایی آنتاگونیستی از خود نشان می‌دهد (Sena *et al*., 2013).

در کنترل بیولوژیک بیماری بلاست برنج با استفاده از جدایه‌های بومی *Trichoderma* در استان مازندران مشخص شد که در آزمون کشت متقابل بیش از ۹۰ درصد جدایه‌های *Trichoderma* موجب بازدارندگی رشد پرگنهٔ قارچ بیمارگر شده و در آزمایش‌های گلخانه‌ای جدایه‌های تریکودرمای RP1–6 و RP4–2 موثرترین جدایه‌های تریکودرما در کاهش شدت بیماری بودند (Javadi *et al*., 2014). در ارزیابی مهار زیستی بیماری بلاست برنج با استفاده از عوامل مختلف زیستی مشخص شد که *T. viride* دارای بهترین عملکرد بود و پس از آن *T. harzianum* قرار گرفت (Kumar *et al*., 2017).

غربال نمودن عوامل مهارزیستی یک مرحله حیاتی در توسعه این عوامل بوده و موفقیت همه مراحل مهار زیستی موفق، به مراحل غربال صحیح برای شناسایی یک نماینده مناسب بستگی دارد (McSpadden & Fravel, 2002). اثرات عوامل بیوکنترل در شرایط طبیعی پیچیده بوده و بستگی به واکنش‌های مختلف گیاه، بیمارگر، آنتاگونیست و شرایط محیطی دارد. به نظر می‌رسد پرداختن به کلیه عوامل مهار زیستی بومی هر منطقه در هر اکوسیستم زراعی، یکی از مهم‌ترین مراحل کاربردی نمودن این روش باشد (Kazemzadeh Chakoosari, 2003)، به همین دلیل در این پژوهش جداسازی، شناسایی و ارزیابی توانایی جدایه‌های قارچی فلور طبیعی گیاه برنج در استان گیلان که یکی از مهم‌ترین مناطق کشت برنج در ایران است در مهار زیستی عامل بیماری بلاست (*P. oryzae*) در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از ۵۷ مزرعه برنج استان گیلان و از نشاء، برگ و خوشه این گیاه که دارای علائم بیماری بلاست بودند، انجام شد. برای این منظور، پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در برگ و نیز بذرهای آلوده در خوشه، ضدعفونی سطحی (برای جداسازی بیمارگر) با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه و شستشو با آب مقطر به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و پس از آبگیری، قطعات به‌ترتیب روی محیط‌های کشت مختلفی شامل PDA و WA برای جداسازی و رشد پرگنه قارچ، خالص‌سازی و شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچی بیماری‌زا و آنتاگونیست قرار داده شدند. برای نگهداری جدایه‌های قارچی، از روش کاغذ صافی سترون استفاده شد.

پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها، خصوصیات ماکروسکوپی آن‌ها همچون شکل و رنگ پرگنه و نحوه رشد روی محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت. سپس خصوصیات میکروسکوپی آنها با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی و استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی بررسی شد (Simmons, 1967; Ellis, 1971; Sivanesan, 1987; Sutton ;Gams & Bissett, 1998; Arenal *et al*., 2007; *et al*., 1998; Simmons, 2007) و پس از شناسایی ریخت‌شناسی، شناسایی مولکولی انجام شد. برای این کار، ابتدا DNA ژنومی براساس روش Zhong & Steffenson (2001) استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از جفت آغازگر ITS1/ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS–rDNA توسط دستگاه ترموسایکلر انجام شد (White *et al*., 1990). برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر ناحیه ژنومی rDNA–ITS، بر اساس روش White *et al*. (1990) به‌کار رفت و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. محصولات تکثیر شده، برای خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر در کره جنوبی فرستاده شدند. ارزیابی تشابه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) با استفاده از ابزار جستجوی BLAST انجام شد و توالی‌ها با نرم‌افزار BankIt در بانک ژن ذخیره شدند.

آزمایش بیماری‌زایی

بررسی بیماری‌زایی ۶۸ جدایه قارچی به‌دست آمده در محیط دسیکاتور که شرایط کاملاً قابل کنترل داشت انجام گرفت. برای این منظور مقداری خاک مزرعه در ظروف ارلن مایر ریخته شد و در دستگاه اتوکلاو سترون گردید (دو بار، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه) و سپس مقداری از این خاک به تشتک‌های پتری سترون انتقال داده شد. به دنبال آن مقداری بذر رقم هاشمی به مدت یک ساعت در کلراکس ۳۰٪ ضدعفونی شد و تعداد ۱۰ عدد بذر در داخل هر تشتک پتری در میان خاک سترون قرار گرفت. این عمل در دو دسیکاتور، یکی به‌عنوان تیمار و دیگری به عنوان شاهد انجام شد که در هر دسیکاتور از دو تشتک پتری استفاده گردید. به هر تشتک پتری مقداری آب مقطر سترون اضافه شد، به طوری‌که در تمام مدت آزمایش تقریباً حالت غرقاب داشتند. پس از ۱۸-۱۶ روز که نشاهای داخل تشتک‌های پتری به مرحله دوبرگی رسیدند، مایه‌زنی اسپورها روی آن‌ها صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا روی همه نشاها در دسیکاتورهای شاهد و تیمار، به وسیله افشانه‌های کوچک دستی، آب مقطر سترون پاشیده شد (تمام عملیات فوق زیر هود سترون انجام گرفت). سپس سوسپانسیون اسپور به نسبت ۴×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون از هر یک از قارچ‌های مذکور تهیه شد و پس از اضافه کردن توئین ۲۰ به نسبت ۱٪، روی نشاها مایه زنی شد. لازم به ذکر است که دسیکاتورها در طول آزمایش در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت بیش از ۹۰ درصد (رطوبت اشباع) و تناوب نوری ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشتند (Safari Motlagh *et al*., 2005).

مطالعات مهار زیستی

کشت متقابل (Dual culture)

برای انجام آزمایش از روش سیواکومار و همکاران (Sivakumar *et al*., 2000) استفاده گردید. برای این منظور یک قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر که از قسمت‌های حاشیه‌ای کشت ۷-۵ روزه *P. oryzae* گرفته شده بود در زیر هود سترون درون یک تشتک پتری با قطر ۱۲سانتی‌متر حاوی PDA، به فاصله دو سانتی‌متری از دیواره تشتک پتری قرار داده شد. سپس تشتک پتری به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شد تا رشد قارچ مورد نظر آغاز شود. آن‌گاه یک قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر که از کناره‌های کشت ۷-۵ روزه قارچ‌های دیگر گرفته شده بود، در فاصله دو سانتی‌متری از دیواره تشتک پتری در طرف مقابل قرار گرفت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار داده شدند و ارزیابی ۱۰-۷ روز بعد، انجام گرفت. درتشتک‌های پتری شاهد نیز یک عملیات فوق بدون استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست تکرار گردید. در پایان دوره انکوباسیون، رشد شعاعی *P. oryzae* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری گردید.کاهش رشد شعاعی در ارتباط با شاهدها بر اساس فرمول $\text{درصد مهاررشد میسلیومی} = \frac{C-T}{C} \times 100$ محاسبه شد که C میزان رشد شعاعی *P. oryzae* در تشتک‌های پتری شاهد و T رشد شعاعی این بیمارگر در حضور قارچ‌های دیگر بود (Sivakumar *et al*., 2000).

عصاره کشت

برای انجام آزمایش از روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster, 1971a) استفاده گردید. برای این منظور در داخل ظرف‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت Potato dextrose broth (PDB)، جدایه‌هایی از قارچ‌های مورد آزمایش کشت داده شدند و به‌مدت ۱۰ روز روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس با استفاده از صافی‌های بیولوژیکی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (میلی‌پور) و پمپ خلاء، عصاره‌گیری انجام شد. آن‌گاه این عصاره (به نسبت ۲۰ درصد) به محیط کشت PDA اضافه شد. در تشتک‌های پتری شاهد، عصاره‌ای که به محیط کشت PDA اضافه شده بود، فاقد هرگونه قارچی بود. یک دیسک میسلیومی از کشت سه روزه *P. oryzae* در مرکز تشتک‌های پتری تیمار و شاهد قرار گرفت. پس از ۱۰ روز

قرارگیری در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس، رشد شعاعی *P. oryzae* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری شد.

کشت روی اسلاید

برای انجام آزمایش از روش سیواکومار و همکاران (Sivakumar *et al.*, 2000) استفاده گردید. یک لام آزمایشگاهی (اسلاید) تمیز روی دو میله شیشه‌ای L شکل در درون یک تشتک پتری با قطر ۱۲ سانتی‌متری قرار داده شد و سترون گردید. سپس مقداری از محیط کشت آب–آگار ۲ درصد مذاب روی اسلاید ریخته شد تا یک لایه نازک آگار روی آن تشکیل گردد. دیسک‌های میسلیومی کوچکی از قارچ آنتاگونیست مورد نظر و *P. oryzae* در فاصله دوسانتی‌متری از یکدیگر روی اسلاید قرار داده شدند. برای جلوگیری از خشک شدن، چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک پتری اضافه گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند و از روز سوم به بعد اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفتند و ویژگی‌هایی هم‌چون رسیدن ریسه‌های قارچی به یکدیگر و تاثیر متقابل آنها روی یکدیگر مطالعه شد.

متابولیت‌های فرار

یک قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه *P. oryzae* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفت. ۴۸ ساعت بعد قرصی به قطر پنج میلی‌متر از کشت سه روزه هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست به‌صورت جداگانه در مرکز تشتک پتری دیگر حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس درپوش‌های این تشتک‌های پتری در زیر هود سترون برداشته شده و تشتک حاوی *P. oryzae* به‌صورت وارونه روی تشتک پتری قارچ‌های مورد آزمایش گذاشته شد. در شاهد، قرصی از محیط کشت PDA جایگزین قارچ‌های مورد آزمایش شد. درصد بازدارندگی پس از ۱۰ روز محاسبه شد (Dennis Sivakumar *et al.*, 2000; & Webster, 1971b).

بررسی‌های گلخانه‌ای

بذور رقم هاشمی به‌مدت ۶۰ دقیقه در کلراکس ۳۰ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شدند. ۷۲ عدد گلدان پلاستیکی با دهانه ۱۱ سانتی‌متری با خاک مزرعه برنج پر شدند. تعداد ۱۰ عدد بذر داخل هرگلدان کاشته شد و گلدان‌ها آبیاری و داخل گلخانه قرار داده شدند. درجه حرارت گلخانه در زمان رشد و نمو گیاهچه‌ها بین ۳۴–۲۷ درجه سلسیوس در روز و ۲۰–۱۷ درجه سلسیوس در شب و رطوبت نسبی ۱۰۰–۸۰ درصد در نوسان بود. در این مدت آبیاری به‌صورت معمول انجام می‌گرفت، به‌طوری که گلدان‌ها به‌طور دائم حالت غرقابی داشتند. زمانی که نشاها به مرحله چهاربرگی رسیدند مایه‌زنی اسپورهای قارچ‌های بیمارگر و آنتاگونیست روی آنها صورت گرفت. برای شمارش اسپور از لام گلبول‌شمار و برای مایه‌زنی از سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۵} اسپور در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون برای *P. oryzae*، $۱۰^{۸}$ اسپور برای *Trichoderma* spp. و $۲/۵\times۱۰^{۵}$ اسپور برای دیگر قارچ‌های آنتاگونیست به‌کار رفته در این آزمایش، استفاده شد. علاوه بر آن برای افزایش جذب سطحی، توئین–۲۰ به‌نسبت یک درصد به‌کار رفت (Safari Motlagh *et al.*, 2005). در این آزمایش چهار سری گلدان در نظر گرفته شد که با آب مقطر، *P. oryzae*، قارچ‌های آنتاگونیست به‌تنهایی و *P. oryzae* و قارچ مورد نظر مایه‌زنی شدند که دارای سه تکرار بودند. لازم به ذکر است که مایه‌زنی قارچ‌های مورد مطالعه بلافاصله پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام شد. بعد از مایه‌زنی، رطوبت نسبی حدود ۱۰۰-۹۵ درصد و میزان حرارت در روز ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس و در شب ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس نوسان داشت. دمای مورد نیاز توسط دستگاه‌های حرارتی تنظیم و تعدیل شد. تغییرات ایجاد شده روی گیاهان به صورت روزانه به‌مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت و درجه بیماری بلاست بر اساس سیستم ارزیابی استاندارد ارائه شده توسط مؤسسه بین المللی تحقیقات برنج مبتنی بر مقیاس ۹-۰ تعیین شد (IRRI, 2013). سپس شدت بیماری با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{شدت بیماری} = \frac{[(N_1\times1)+(N_2\times2)+\cdots(N_t\times t)]}{N_1+N_2+\cdots N_t}$$

(Disease rating)

که N در این رابطه، تعداد برگ در هر یک از مقیاس‌های شدت بیماری بود (Bertrand & Gottwald, 1986). در مرحله آخر صفات ارتفاع، وزن تر و وزن خشک گیاه برنج تحت تاثیر قارچ عامل بیماری و قارچ‌های آنتاگونیست به‌تنهایی و همراه با قارچ‌های مورد آزمایش در روز دهم اندازه‌گیری شدند (Ghorbani *et al.*, 2000).

تجزیه آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد.

نتایج

همه جدایه‌های قارچی سواسازی شده در سطح جنس شناسایی شدند و تعداد ۳۵ جدایه قارچی (به غیر از قارچ عامل بیماری بلاست برنج) که روی برنج غیربیماری‌زا بود ند برپایه شاخص‌های ریخت‌شناسی و مولکولی در سطح گونه شناسایی شدند. این گونه‌ها عبارت بودند از: ۳) *Ulocladium alternariae* (Cooke) Simmons جدایه)، ۴) *Ulocladium* cf. *alternariae* Simmons جدایه)، *Ulocladium* cf. *consortiale* (Thum) Simmons (۳ جدایه)، ۳) *Ulocladium* sp. Preuss جدایه)، *Curvularia pallescens* Boedijn (۲ جدایه)، *Preussia* sp. Arenal (۳ جدایه)، *Trichoderma harzianum* Rifai (۴ جدایه) و *Epicoccum* Link ex Fr. sp. (۲ جدایه)، (J. Miller, Giddens & Foster) *Trichoderma virens* (۴ جدایه)، *Trichoderma viride* Pers. (۴ جدایه) و *Alternaria citri* (Penz.) Mussat (۳ جدایه).

مطالعات بیماری‌زایی و مهار زیستی

جدایه‌های به‌کار رفته عبارت بودند از: جدایه 102S–1 از *U. alternariae*، جدایه 86S–2–1 از *U.* cf. *alternariae*، جدایه 68–2–3–S´ از *T. harzianum*، جدایه 127S–1 از *C. pallescens*، جدایه 65S–1–2 از *U.* cf. *consortiale*، جدایه 152S از *Ulocladium* sp.، جدایه F–73 از *Preussia* sp.، جدایه 80S–1 از *Epicoccum* sp.، جدایه S–3–2 از *T. virens*، جدایه S–3–1 از *T. viride*، جدایه A–3–27 از *A. citri* و جدایه P–729 از *P. oryzae*.

روش کشت متقابل

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس بین قارچ‌های آنتاگونیست در مهار رشد میسلیومی بیمارگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بر پایه مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی در روش حداقل اختلاف معنی‌دار پس از *T. harzianum* که بیشترین درصد مهار میسلیومی *P. oryzae* را از خود نشان داد، *T. virens*، *T. viride*، *A. citri*، *U.*cf. *consortiale*، *Ulocladium* sp.، *Epicoccum* sp.، *Preussia* sp.، *C. pallescens*، *U. alternariae* و *U.* cf. *alternariae* به‌ترتیب در رتبه‌های بعدی تاثیر در کاهش رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری بلاست برنج قرار گرفتند (جدول ۱).

روش عصاره کشت

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس بین قارچ‌های آنتاگونیست در مهار رشد میسلیومی بیمارگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. بر پایه مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی در روش حداقل اختلاف معنی‌دار پس از *T. harzianum* که بیشترین درصد مهار میسلیومی *P. oryzae* را از خود نشان داد *T. virens*، *T. viride*، *A. citri*، *U.*cf. *consortiale*، *Ulocladium* sp.، *Epicoccum* sp.، *C. pallescens*، *Preussia* sp.، *U. alternariae* و *U.* cf. *alternariae* به ترتیب در رتبه‌های بعدی کارایی در کاهش رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری بلاست برنج قرار گرفتند (جدول ۱).

روش کشت روی اسلاید

ریسه‌های گونه‌های *Trichoderma* مورد استفاده در این آزمایش پیچشی در اطراف ریسه‌های قارچ عامل بیماری بلاست برنج نداشتند و قادر به نفوذ به ریسه‌های آن نشدند. ریسه‌های جدایه‌های *Preussia* sp.، *C. pallescens* و *Epicoccum* sp. به ریسه‌های *P. oryzae* نفوذ کرده ولی قادر به تغییرشکل در ریسه‌های آن نشدند. ریسه‌های *Ulocladium* spp. و *A. citri* پس از رسیدن به ریسه‌های *P. oryzae* و نفوذ در آنها، باعث ازهم‌گسیختگی ریسه‌های قارچ و تغییرشکل آن‌ها شدند.

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس بین قارچ‌های آنتاگونیست در مهار رشد میسلیومی بیمارگر تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. با محاسبه میانگین درصد مهار در روش حداقل اختلاف معنی‌دار، پس از *T. harzianum* که بیشترین درصد مهار میسلیومی *P. oryzae* را از خود نشان داد *T. virens*، *T. viride*، *A. citri*، *Ulocladium* sp.، *U.*cf. *consortiale*، *U.* cf. *alternariae* و *U. alternariae* به‌ترتیب در رتبه‌های بعدی تاثیر در کاهش رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری بلاست برنج قرار گرفتند (جدول ۱).

روش متابولیت‌های فرار

جدول ۱– مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی *Pyricularia oryzae* در آزمون‌های کشت متقابل، عصاره کشت و متابولیت‌های فرار

Table 1. The mean comparison of mycelium growth inhibition of *Pyricularia oryzae* in dual culture, culture filtrate and volatile metabolites tests

Fungal isolates	Growth inhibition (%) ± SE (dual culture)	Growth inhibition (%) ± SE (culture filtrate)	Growth inhibition (%) ± SE (volatile metabolites)
U. alternariae	37.31 ± 0.47 c	40.00 ± 0.56 bc	40.13 ± 0.54 cd
U. cf. *alternariae*	34.64 ± 0.47 cd	37.47 ± 0.52 c	40.48 ± 0.52 cd
U. cf. *consortiale*	43.16 ± 0.52 b	44.76 ± 0.55 b	47.54 ± 0.34 b
Ulocladium sp.	42.50 ± 0.55 b	44.75 ± 0.52 b	47.02 ± 0.54 b
C. pallescens	37.60 ± 0.57 c	41.02 ± 0.52 b	43.58 ± 0.54 c
Preussia sp.	38.33 ± 0.45 c	40.25 ± 0.52 bc	43.50 ± 0.54 c
T. harzianum	51.25 ± 0.58 a	53.75 ± 0.56 a	56.25 ± 0.54 a
Epicoccum sp.	40.16 ± 0.57 b	43.29 ± 0.52 b	46.01 ± 0.55 bc
T. virens	47.50 ± 0.47 ab	50.02 ± 0.51 a	52.25 ± 0.54 a
T. viride	45.00 ± 0.55 b	47.60 ± 0.47 ab	50.27 ± 0.74 a
A. citri	43.42 ± 0.55 b	45.96 ± 0.45 b	48.31 ± 0.44 b

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون LSD ندارند (هر عدد در جدول میانگین سه تکرار است).

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference in the LSD test at $P<0.05$, (data are the means of three replications).

مطالعات گلخانه‌ای

در همه موارد در گیاهان شاهدی که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. در تیمارهایی که با *P. oryzae* مایه‌زنی شده بودند اولین علائم سه روز پس ازمایه‌زنی به‌صورت نقاط سرسنجاقی ظاهر شدند که در روزهای بعدی این نقاط به تدریج گسترش یافته و به‌صورت لکه‌های نکروتیک دوکی‌شکل که در وسط به رنگ خاکستری یا سفید و در حاشیه به رنگ قهوه‌ای بود، درآمدند. در برخی موارد لکه‌های بزرگتری در طول برگ مشاهده شدند. در گیاهان برنجی که با *P. oryzae* و یکی از قارچ‌های آنتاگونیست، مایه‌زنی شده بودند اولین علائم پنج روز پس از مایه‌زنی،

به‌صورت لکه‌های سفید و نقاط سرسنجاقی خاکستری تا قهوه‌ای در سطح برگ ظاهر شدند. تعداد این لکه‌های خاکستری مایل به قهوه‌ای نسبت به لکه‌های ایجاد شده در گیاهانی که تنها با *P. oryzae* مایه‌زنی شده بودند کمتر بود. در روزهای بعد لکه‌های قهوه‌ای در همه تیمارها به استثنای *U. cf. alternariae* گسترش چندانی پیدا نکردند.

بر اساس نتایج جداول تجزیه واریانس، بین تیمارهای آزمایش تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در خصوص شاخص کاهش شدت بیماری وجود نداشت اما از نظر صفاتی هم‌چون ارتفاع، وزن تر و وزن خشک تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده گردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های گلخانه‌ای و مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، همه جدایه‌ها به استثنای *U. cf. alternariae* قادر به کاهش شدت بیماری بلاست شدند که *T. harzianum* با کاهش میانگین شدت بیماری بلاست برنج به ۳/۸۵ (۲۷/۳۶٪ کاهش میانگین شدت بیماری) مؤثرترین قارچ در کاهش شدت بیماری شناخته شد. بعد از این قارچ به‌ترتیب *T. virens*، *T. viride*، *A. citri*، *U. cf. consortiale*، *U. alternariae*، *C. pallescens*، *Epicoccum* sp.، *Preussia* sp. و *Ulocladium* sp. در رتبه‌های بعدی کاهش شدت بیماری بلاست قرار گرفتند اما جدایه *U. cf. alternariae* نه تنها شدت بیماری را کاهش نداد بلکه در مقایسه با نمونه شاهد بیمارگر، باعث افزایش شدت بیماری گردید (جدول ۲).

در مقایسه میانگین ارتفاع به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) نتایج زیر حاصل گردید: بیشترین ارتفاع برنج مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست برنج مربوط به تیمار برنج تلقیح شده با *T. harzianum* بود که با تیمارهای *U. cf. alternariae*، *C. pallescens*، *Preussia* sp.، *Ulocladium* sp. و *Epicoccum* sp. اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین ارتفاع مربوط به تیمار برنج تلقیح شده با *U. cf. alternariae* بود که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳). بر اساس مقایسه میانگین ارتفاع گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ‌های مورد آزمایش با ارتفاع گیاهان شاهد (مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری بلاست به‌تنهایی) مشخص گردید که همه قارچ‌های مورد مطالعه به استثنای *U. cf. alternariae* قادر به افزایش ارتفاع گیاه بودند اما در مقایسه با شاهد آب مقطر و همچنین شاهد آنتاگونیست اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید البته در این مورد هم *U.* cf. *alternariae* اختلاف معنی‌داری با این شاهدها از خود نشان داد.

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین وزن تر به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، بیشترین وزن تر برنج مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست برنج، مربوط به تیمار برنج تلقیح شده با *T. harzianum* بود که با تیمارهای *U.* cf. *consortiale*، *U. alternariae*، *T. virens*، *T. viride* و *A. citri* اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین وزن تر مربوط به تیمار برنج تلقیح شده با *U. cf. alternariae* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳). بر اساس مقایسه میانگین وزن تر گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ‌های مورد آزمایش با وزن تر گیاهان شاهد (مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری بلاست به‌تنهایی) مشخص گردید که همه قارچ‌های مورد مطالعه به استثنای *U. cf. alternariae* قادر به افزایش وزن تر گیاه بودند اما در مقایسه با شاهد آب مقطر و همچنین شاهد آنتاگونیست اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید البته در این مورد هم *U. cf. alternariae* اختلاف معنی‌داری با این شاهدها از خود نشان داد.

جدول ۲– مقایسه میانگین درصد کاهش شدت بیماری *Pyricularia oryzae* در شرایط گلخانه

Table 2. Mean comparison of percentage of reduction in disease severity of *Pyricularia oryzae* under greenhouse conditions

Fungal isolates	Reduction of disease SE±rating (%)
U. alternariae	7.96 ± 0.44 de
U. cf. *alternariae*	3.41 ± 0.42 g–
U. cf. *consortiale*	9.19 ± 0.52 d
Ulocladium sp.	3.60 ± 0.53 ef
C. pallescens	5.57 ± 0. 51 e
Preussia sp.	3.64 ± 0.52 ef
T. harzianum	27.36 ± 0.45
Epicoccum sp.	4.49 ± 0.45 e
T. virens	20.75 ± 0.45 b
T. viride	17.92 ± 0.56 bc
A. citri	15.60 ± 0.56 bc

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون LSD ندارند (هر عدد در جدول میانگین سه تکرار است).

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference in the LSD test at $P<0.05$, (data are the means of three replications).

جدول ۳– مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه، تحت تاثیر کاربرد قارچ‌های آنتاگونیست در برنج با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار

Table 3. Comparison of means of the studied traits affected by antagonistic fungi by least significant difference (LSD)

Fungal isolates	Height (cm) ± SE (only antagonist)	Height (cm) ± SE	Fresh weight (g) ± SE (only antagonist)	Fresh weight (g) ± SE	Dry weight (g) ± SE (only antagonist)	Dry weight (g) ± SE
U. alternariae	52.33 ± 1.24 a	51.32 ± 1.24 a	11.22 ± 0.52 a	11.13 ± 0.52 a	2.22 ± 0.30 a	2.01 ± 0.30 a
U. cf. *alternariae*	50.12 ± 0.55 a	39.24 ± 1.20 c	10.22 ± 0.50 a	7.11 ± 0.52 c	1.98 ± 0.40 a	0.99 ± 0.30 c
U. cf. *consortiale*	52.35 ±0.55 a	53.23 ± 0.67 a	11.22 ± 0.52 a	11.25 ± 0.39 a	2.12 ± 0.30 a	2.03 ± 0.42 a
Ulocladium sp.	51.45 ± 0.56 a	44.51 ± 1.25 b	11.22 ± 0.50 a	9.01 ± 0.52 ab	2.10 ± 0.35 a	1.26 ± 0.31 b
C. pallescens	50.48± 1.55 a	49.57 ± 1.25 b	11.22 ± 0.52 a	10.29 ± 0.52 b	2.22 ± 1.30 a	1.92 ± 0.52 b
Preussia sp.	52.45 ± 0.45 a	45.41 ± 1.25 b	11.32 ± 0.48 a	9.31 ± 0.42 ab	2.22 ± 0.30 a	1.42 ± 0.52 b
T. harzianum	52.45 ± 0.35 a	55.67 ± 1.20 a	11.32 ± 0.52 a	11.75 ± 0.52 a	2.32 ± 0.22 a	2.05 ± 0.32 a
Epicoccum sp.	50.45 ± 0.50 a	47.28 ± 1.10 b	11.22 ± 1.52 a	9.51 ± 0.51 ab	2.25 ± 0.30 a	1.63 ± 0.42 b
T. virens	51.48 ± 0.35 a	54.36 ± 1.25 a	11.30 ± 1.22 a	11.23 ± 0.50 a	2.30 ± 0.30 a	2.02 ± 0.42 a
T. viride	51.45 ± 0.54 a	53. 54 ± 0.55 a	11.27 ± 0.52 a	11.08 ± 0.51 a	2.25 ± 0.45 a	2.01 ± 0.32 a
A. citri	50.35 ± 0.55 a	52.99 ± 1.25 a	11.22 ± 0.52 a	11.02 ± 0.52 a	2.22 ± 0.30 a	1.99 ± 0.22 b
Inoculated control (with *P. oryzae*)	–	39.99 ± 1.22 c	–	7.08 ± 0.52 c	–	0.99 ± 0.32 c
Distilled water (control)	–	50.55 ± 0.79 a	–	11.25 ± 0.50 a	–	2.25 ± 0.32 a
LSD 5%		9.27		4.77		2.23

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ در آزمون LSD ندارند (هر عدد در جدول میانگین سه تکرار است).

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference in the LSD test at $P<0.05$, (data are the means of three replications).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین وزن خشک به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، بیشترین وزن خشک برنج مایه‌زنی شده با قارچ عامل بلاست برنج مربوط به تیمار برنج با استفاده از *T. harzianum* بود که با تیمارهای *U.* cf. *consortiale*، *T. virens*، *T. viride* و *U. alternariae* اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین وزن خشک مربوط به تیمار برنج با *U.* cf. *alternariae* بود که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳). بر اساس مقایسه میاتگین وزن خشک گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ‌های مورد آزمایش با وزن خشک گیاهان شاهد (مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری بلاست به‌تنهایی) مشخص گردید که کلیه قارچ‌های مورد مطالعه به استثنای *U.* cf. *alternariae* قادر به افزایش وزن خشک گیاه بودند اما در مقایسه با شاهد آب مقطر و همچنین شاهد آنتاگونیست اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید البته در این مورد هم *U.* cf. *alternariae* استثنا بود.

بحث

در پژوهش حاضر ۱۵۰ جدایه قارچی از گیاهان برنج جمع‌آوری‌شده از مزارع برنج استان گیلان جدا گردید که قارچ‌های شناسایی شده عبارت بودند از: *Pyricularia oryzae*، *U.* cf. *alternariae*، *Ulocladium alternariae*، *U.* cf. *consortiale*، *Ulocladium* sp.، *Curvularia pallescens*، *Preussia* sp.، *Trichoderma harzianum*، *Epicoccum* sp.، *T. virens*، *T. viride* و *Alternaria citri*. ۶۸ جدایه پس از شناسایی مقدماتی در حد جنس، برای مطالعات بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند و بیماری‌زایی همه جدایه‌های *P. oryzae* (۳۳ جدایه) در گیاه برنج اثبات گردید. از میان جدایه‌های قارچی مورد استفاده در آزمایشگاه، جدایه‌های *T. harzianum*، *T. virens*، *T. viride* و *A. citri* به میزان بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها رشد میسلیومی *P. oryzae* را روی محیط کشت PDA مهار نمودند. در هر سه روش به‌کار رفته در آزمایشگاه یعنی کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و عصاره کشت، *T. harzianum* موثرترین قارچ در بازدارندگی میسلیومی عامل بیماری بلاست برنج بود که این یافته با یافته‌های Javadi *et al*., 2014) که بیان نمودند *T. harzianum* به‌طور قابل توجهی رشد میسلیومی *P. oryzae* را در آزمایشگاه مهار می‌کند، سازگار است.

جدایه‌های به‌کار رفته در هر سه روش فوق به‌جز *Preussia* sp. و *C. pallescens* از نظر ترتیب کارآیی در مهار زیستی قارچ عامل بیماری بلاست برنج یکسان عمل کردند و از این نظر تفاوتی بین آن‌ها وجود نداشت. جدایه *Preussia* sp. در روش کشت متقابل در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری بهتر از جدایه *C. pallescens* عمل نمود در حالی‌که کارآیی *C. pallescens* در دو روش عصاره کشت و متابولیت‌های فرار بیشتر بود؛ اگرچه سودمندی همه جدایه‌های به‌کار رفته در این تحقیق، در روش متابولیت‌های فرار بیشتر بود که این نتیجه با یافته‌های Safari Motlagh & Mohammadian (2016) انطباق داشت. آن‌ها در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که کارآیی جدایه‌هایی هم‌چون *T. harzianum* و *T. virens* در کنترل بیولوژیکی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در روش متابولیت‌های فرار بیشتر از روش‌های دیگر یعنی کشت متقابل و عصاره کشت است که این امر می‌تواند به‌دلیل ترشح بیشتر ترکیبات فرار گازی توسط جدایه‌های قارچی مذکور باشد (Kredics *et al*., 2003).

در مطالعه حاضر ریسه‌های سه گونه *Trichoderma* مورد استفاده در این تحقیق پیچشی در اطراف ریسه‌های قارچ عامل بیماری بلاست برنج نداشتند و قادر به نفوذ به ریسه‌های آن نشدند که این موضوع با تحقیق دیگری (Javadi *et al*., 2014) مبنی بر عدم پیچش ریسه‌های گونه‌های *Trichoderma* مطابقت داشت. از طرفی، دیگر قارچ‌های به‌کار رفته در این مطالعه به‌ویژه گونه‌های *Ulocladium* و *A. citri* به ریسه‌های عامل بیماری رسیده و در آن‌ها تغییرشکل ایجاد کردند که این یافته با نتیجه تحقیق Hajano *et al.* (2012) سازگاری داشت.

در شرایط گلخانه‌ای *T. harzianum* با کاهش شدت بیماری به میزان ۲۷/۳۶درصد موثرترین جدایه در کاهش شدت بیماری بلاست بود که این یافته با نتایج مطالعات قبلی

(Padasht Dehkaei *et al*., 2002; Javadi *et al*., 2014) مطابقت داشت که نشان می‌داد *T. harzianum* موثرترین گونه از *Trichoderma* در کاهش شدت بیماری بلاست در شرایط گلخانه‌ای است.

با مقایسه بررسی‌های مهار زیستی در دو مرحله آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* در هر دو مرحله کارایی یکسانی از خود نشان دادند و در رتبه اول و دوم فعالیت‌های بیوکنترلی جای گرفتند. جدایه‌های *U. cf. alternariae*، در این مطالعه، در پایین‌ترین رتبه سودمندی در کنترل بیماری بلاست قرار داشتند. ترتیب سودمندی دیگر جدایه‌های به‌کار رفته در این تحقیق در آزمایشگاه و گلخانه به‌جز جدایه‌های *C. pallescens* در روش کشت متقابل، یکسان بود.

استفاده از جدایه *U. cf. alternariae* نه تنها تأثیری در کاهش شدت بیماری بلاست و کنترل آن در شرایط گلخانه‌ای نداشت بلکه باعث افزایش شدت بیماری و خسارت وارد شده به گیاهان برنج گردید. عدم موفقیت این جدایه در کنترل بیماری در شرایط گلخانه ممکن است به عوامل مختلفی از جمله فراهم نبودن شرایط مساعد در گلخانه، روش و زمان استفاده از این قارچ‌ها، رقم گیاه و ... مرتبط باشد و این در حالی است که جدایه‌های بسیار مشابه با آن‌ها مانند *U. alternariae* باعث کاهش شدت بیماری بلاست شدند که این امر ممکن است ناشی از تفاوت در شدت بیماری‌زایی این دو دسته از جدایه‌های قارچی باشد؛ هم‌چنان‌که اثبات شده بود که پارامترهای محیطی غیرزنده مانند نوع خاک، دمای خاک و پتانسیل آب و نیز پارامترهای محیطی زنده مانند گونه‌های گیاهی، تنوع و فعالیت میکروبی خاک، علاوه بر فاکتورهای دیگر مانند روش و زمان استفاده ممکن است روی کارآیی کنترل بیولوژیکی جدایه‌های قارچی تأثیر بگذارد (Akrami *et al*., 2011) ؛ علاوه بر آن مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نوع مایه تلقیح نیز روی توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی تاثیرگذار هستند، چنان‌که Verma *et al*. (2007) گزارش نمودند که گونه‌هایی از *Trichoderma* وقتی به‌صورت اسپور (به‌ویژه کنیدی) که به شرایط ناسازگار محیطی در مزرعه مقاومند، به‌کار برده شوند بسیار مؤثرتر هستند تا زمانی که به‌صورت فرم‌های میسلیومی به‌عنوان پروپاگول (زادمایه) به‌کار برده شوند. القای مقاومت القایی دلیل عمده در استفاده از جدایه های قارچی است که به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی علیه بیمارگر بلاست و برای بازداشتن بیماری استفاده می‌شود (Gnanamanickam, 2009).

در تحقیق حاضر *A. citri* هم در آزمایشگاه و هم در گلخانه توانایی خوبی در کنترل قارچ عامل بیماری بلاست برنج از خود نشان داد که این نتیجه با یافته‌های (Safari Motlagh & Mohammadian, 2016) مطابقت داشت. این محققان توانایی قارچ فوق در کنترل زیستی *Bipolaris victoriae* عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در آزمایشگاه و گلخانه را گزارش کرده بودند.

در مطالعه‌ای مهار زیستی *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از هشت جدایه از *Tricholerma* spp. و یک جدایه از *Ulocladium atrum* بررسی گردید. به استثنای *U. atrum* همه جدایه‌های *Trichoderma* پتانسیل آنتاگونیستی خوبی در مقابل قارچ عامل بیماری نشان دادند که جدایه ۳۶۰۱ بیش‌ترین تأثیر را داشت (De Figueirêdo *et al*., 2010) که این امر با یافته‌های این تحقیق از نظر مقایسه تاثیر و کارآمدی جدایه‌های *Trichoderma* و *Ulocladium* در تطابق بود.

در یک مطالعهٔ دیگر، اثر آنتاگونیستی *Epicoccum* sp. در مقابل عوامل بیمارگر برنج شامل *Magnaporthe oryzae*، *Rhizoctonia solani*، *Sarocladium oryzae*، *Monographella albescens* و *Cochliobolus miyabeanus* در کشت دوتایی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. در کشت دوتایی *Epicoccum* sp. رشد پرگنه *M. oryzae* را مهارکرد و در گلخانه شدت بیماری بلاست را کاهش داد. براساس تحقیق مذکور *Epicoccum* sp. توانایی آنتاگونیستی و افزایش مقاومت در گیاه در برابر بیماری بلاست برگ از خود نشان داد (Sena *et al*., 2013). که با یافته‌های این تحقیق در تطابق بود بدین معنی که در مطالعه حاضر *Epicoccum* sp. هم در آزمایشگاه و هم در

گلخانه در بازدارندگی رشد میسلیومی و کاهش شدت بیماری بلاست موثر بود.

در بررسی صفاتی مانند ارتفاع، وزن تر و وزن خشک برنج، کلیه قارچ‌های مورد استفاده به استثنای *U.* cf. *alternariae* این توانایی را داشتند که باعث افزایش عملکرد گیاه در مقایسه با گیاه آلوده به قارچ عامل بیماری بلاست شوند که این امر می‌تواند به‌دلیل توانایی این قارچ‌ها در تقویت و تحریک گیاه به رشد بیشتر باشد و این امر با نتایج تحقیقات پیشین در تطابق است که براساس آن‌ها، گونه‌های مختلف قارچ‌هایی مانند *Trichoderma* باعث تحریک سیستم دفاعی گیاه و رشد آن می‌گردند (Dennis & Webster, 1971c). این صفات ممکن است علاوه بر تاثیر قارچ تحت اثر شرایط محیطی هم واقع شوند به‌طوری که مطالعات پیشین نشانگر ارتباط نزدیک بین اثر قارچ عامل بیماری بلاست برنج و توسعه بیماری روی عملکرد گیاه با عوامل محیطی بود (Lai *et al*., 1999).

واکنش مشابه در مورد صفاتی مانند ارتفاع، وزن تر و وزن خشک برنج نسبت به قارچ‌های مورد مطالعه در این تحقیق ممکن است با وجود ژن‌های مشترکی که این صفات را کنترل می‌کنند در ارتباط باشد، چنان‌که تحقیقات Kim *et al*. (2000) در بررسی واکنش برخی ارقام سویا نسبت به بیماری پوسیدگی ساقه نشان داد که صفات مورد بررسی مانند وزن خشک و طول خوشه نسبت به اثر قارچ، در شرایط آزمایشگاه و مزرعه، پاسخ‌های مشابهی دارند که این امر به دلیل وجود ژن‌های کنترل‌کننده مشابه در توالی ژنی صفات بود.

با توجه به نتایج تحقیق حاضر، *T. harzianum* و *T. virens* به‌عنوان موثرترین جدایه‌های قارچی در کنترل قارچ عامل بیماری بلاست برنج گزارش می‌گردند که توانایی معرفی به‌عنوان قارچ‌های آنتاگونیست را دارا هستند.

پژوهش حاضر نشان داد که جداسازی و شناسایی قارچ‌های موجود در فلور طبیعی گیاه برنج و مطالعه اثرات آنتاگونیستی آن‌ها در کنترل بیماری بلاست برنج می‌تواند یکی از راه‌کارهای موثر در مهاراین بیماری مهم باشد.

سپاسگزاری

از مساعدت و همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت سپاسگزاری می‌گردد.

References

Akrami, M., Golzary H. & Ahmadzadeh, M. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. African Journal of Biotechnology, 10(14): 2653–2658.

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 the 6th National Conference New Ideas in Agriculture, 29–30 February, Khorasgan, Iran. (In Persian with English summary)

Arenal, F., Platas, G. & Pelaez, F. 2007. A new endophytic species of *Preussia* (*Sporomiaceae*) inferred from morphological observations and molecular phylogenetic analysis. Fungal Diversity, 25:1–17.

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.

De Figueirêdo, G.S., De Figueirêdo, L.C., Cavalcanti, F.C.N., Dos Santos, A.C., Da Costa, A.F. & De Oliveira, N.T. 2010. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53(1):1–9.

Dennis, C. & Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species–groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25–39.

Dennis, C. & Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species–groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 41–48.

Dennis, C. & Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society, 57 (1): 363–369.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes, CMI, Kew, England.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3–34. *In*: Kubicek, C.P. & Harman, G.E. (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor and Francis Ltd., London. England.

Ghorbani, R., Seel, W., Litterick, A. & Leifert, C. 2000. Evaluation of *Alternaria alternata* for biological control of *Amaranthus retroflexus*. Weed Science, 48:474–480.

Gnanamanickam, S.S. 2009. Biological control of rice diseases. Springer Nature Springer Netherlands.

Gouramanis, G. 1997. Biological and chemical control of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) in Northern Greece. Cahiers Options Méditerranéennes, 15(3): 61–68.

Hajano, J.U.D., Lodhi, A.M., Pathan, M.A., Khanzada, M.A. & Serwar Shah, G. 2012. *In vitro* evaluation of fungicides, plant extracts and biocontrol agents against rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. Pakistan Journal of Botany, 44: 1775–1778.

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

Izadyar, M. 1998. Rice blast disease. Agricultural Research, Education and Extension Organization Publications. (In Persian with English summary)

Javadi, L., Naeimi, Sh., Rezaee, S. & Khosravi, V. 2014. Biological control of rice blast disease with native *Trichoderma* isolates in Mazandaran province. Biocontrol in Plant Protection, 2 (1): 1–15. (In Persian with English summary)

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)

Khosravi, V., Naeimi, S., Rostami, M., Omrani, M. & Bahramei, M. 2011. Evaluation of three commercial biological products on the rice blast disease in Mazandaran. Proceeding of the 19th Iranian Plant Protection Congress, 31–3 July– August, Tehran, Iran. (In Persian with English summary)

Kim, H.S., Hartman, G.L., Manandhar, J.B., Steadman, J.R. & Diers, B.W. 2000. Reaction of soybean to Sclerotina stem rot in field green house and laboratory evaluations. Crop Science, 40: 665–669.

Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. & Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology, 41: 37–42.

Kumar, V., Kumar, A., Singh, V.P. & Tomar, A. 2017. Effectiveness Measurement of Bio–agents and Botanicals against *Pyricularia oryzae*. Journal of Pure and Applied Microbiology, 11(1): 585–592.

Lai, H.X., Marchettiy, M.A. & Pterson, H.D. 1999. Comparative slow blasting grow under upland and flooded blast nursery culture. Plant Disease, 83:681–684.

McSpadden, G.B.B. & Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens: Research, Commercialization and Application in the USA. Plant Health Progress, 10.1094/PHP–2002–0510–01–RV.

Ou, S.H. 1985. Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute. England.

Ohtaka, N., Kawamata, H. & Narisawa, K. 2008. Suppression of rice blast fungus using freeze–killed mycelia of biocontrol fungus candidate MKP5111B. Journal of General Plant Pathology, 74: 101–108.

Ouazzani Touhami, A., Mouria, A., Douira, A., Benkirane, R., Mlaiki, A. & El–Yachioui, M. 1998. *In vitro* effect of pH and temperature on the ability of *Trichoderma* spp. to reduce the growth of *Pyricularia oryzae*. Al Awania, 96: 19–24.

Padasht Dehkaei, F. 2001. The final report identifying biological factors controlling rice blast disease, Rice Research Institute of Iran. (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 the 3th International Rice Blast Conference. 11–14 Sept., Tsukuba, Ibaraki, Japan. 73.

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 the 20th Iranian Plant Protection Congress. 25–29 August, Shiraz, Iran. 221–225. (In Persian with English summary)

Safari Motlagh, M.R. & Mohammadian, S. 2016. Biological control of rice brown spot disease caused by *Bipolaris victoriae* by some fungal isolates in the greenhouse and *in vitro* conditions. Biocontrol in Plant Protection, 4(1): 11–25. (In Persian with English summary)

Safari Motlagh, M.R., Padasht Dehkaei, 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)

Sena, A.P.A., Chaibub, A.A., Côrtes, M.V.C.B., Silva, G.B., Silva–Lobo, V.L., Prabhu, A.S., Filippi, M.C.C. & Araújo, L.G. 2013. Increased enzymatic activity in rice leaf blast suppression by crude extract of *Epicoccum* sp. Tropical Plant Pathology, 38(5):387–397.

Simmons, E.G. 1967. Typification of *Alternaria, Stemphylium*, and *Ulocladium*. Mycologia, 59(1): 67–92.

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria*, an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, the Netherlands.

Singh, P.K., Singh, A.K., Singh, H.B. & Dhakad, B.K. 2012. Biological control of rice blast disease with *Trichoderma harzianum* in direct seeded rice under medium low land rainfed conditions. Journal Environment and Ecology, 30: 834–837.

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R.S., 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.

Sivanesan, A. 1987. Gramainicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs, CAB International Mycological Institute.

Sutton, D.A., Fothergill, A.W. & Rinaldi, M.G. 1998. Guide to clinically significant fungi .Williams & Wilkins Publishing, Baltimore.

Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. & Valero, J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37:1–20.

Wilson, R.A. & Talbot, N.J. 2009. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. Nature Review Microbiology, 7(3):185–95.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.V. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315–322. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, New York.

Zakaria, L. & Misman, N. 2018. The pathogen and control management of rice blast disease. Malaysian Journal of Microbiology, 14 (7): 705–714.

Zhong, S. & Steffenson, B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology, 91(5): 469–476.

Biological control of rice blast disease by antagonistic fungi *in vitro* and under greenhouse conditions

Mohammad Reza Safari Motlagh

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
Corresponding author: Mohammad Reza Safari Motlagh, email: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

Received: Apr., 01, 2021 8(2) 19–33 Accepted: June, 22, 2021

Abstract

The rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* is one of the most important fungal diseases in Iran and worldwide. From 150 samples of healthy and infected rice seedlings, leaves and spikes collected from paddy fields of Guilan province, 68 fungal isolates were obtained. Eleven isolates identified based on morphological and molecular methods that were not able to cause disease on rice in pathogenicity test including *Ulocladium alternariae*, *Ulocladium* cf. *alternariae*, *Ulocladium* cf. *consortiale*, *Ulocladium* sp., *Curvularia pallescens*, *Preussia* sp., *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*, *Alternaria citri* and *Epicoccum* sp. were selected for rice blast disease biocontrol studies. In the laboratory, we used dual culture, culture filtrate, slide culture and volatile metabolites methods and based on results, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. viride*, *A. citri* and *U.* cf. *consortiale* isolates had highest percentage of mycelial growth inhibition of *P. oryzae*. These fungal isolates were inoculated in a four–leaf stage on rice plant of Hashemi cultivar under greenhouse conditions. All inoculated fungi except *U.* cf. *alternariae*, reduced leaf blast disease rating, among them *T. harzianum* with 27.36% reduction in disease rating was the most effective antagonist in greenhouse studies followed by *T. virens*, *T. viride* and *A. citri*. Comparison of data average in least significant difference (LSD) method showed that there was significant difference between biocontrol fungi (*T. harzianum*, *U.* cf. *alternariae* and *Preussia* sp.) in terms of efficiency in rice blast control. Also, there was a statistically significant difference between the fungi in terms of effect on height, fresh weight and dry weight of rice plants in the greenhouse and among these fungi, *T. harzianum* showed the highest efficiency in improving these traits. The results of the present study showed that there are different fungi in microflora of rice plants which are considered as potential biological control of rice blast disease.

Keywords: antagonism, disease rating, rice, *Trichoderma* spp.