ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی

همایش ملی
ایده های نو در کشاورزی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

کنترل بیولوژیکی بلاست برنج توسط *Streptomyces erythraea* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

الهه امینی [۱]*، محمد علی تاجیک قنبری[۲] و نادر حسن زاده [۱]

۱-دانشجو کارشناسی ارشد و دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- استادیارگروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*نویسنده مسئول: الهه امینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

گروه بیماری‌شناسی گیاهی

Elaheamini1389@gmail.com

چکیده

بلاست برنج، به علت انتشار جهانی و خسارت سالانه زیاد ، مهم‌ترین بیماری قارچی برنج است. کنترل بیولوژیکی انتخابی برجسته برای کنترل بیماری‌های گیاهی مختلف می‌باشد. بلاست برنج نیز یکی از بیماری‌هایی است که تا حدودی توسط کنترل بیولوژیکی کنترل می‌شود. در این تحقیق اثرات ضد قارچی *Saccharopolyspora erythraea* علیه *Pyricularia grisea* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. *S.erythraea* در روش‌های دیسک- آگار و نشت از چاهک در آگار و کشت متقابل با تولید متابولیت‌های ضدقارچی مترشحه توان بیوکنترلی بالایی از خود نشان داد. ماده فعال در عصاره خشک *S.erythraea* در حلال قطبی و غیرقطبی قابل حل بوده و حداقل غلظت بازدارنده از رشد با استفاده از حلالیت ماده خشک عصاره فعال در حلال دی متیل سولفوکساید و متانول ۱,۵۶۲mg/ml مشخص گردید. ماندگاری ماده موثر در دمای محیط ۳۰ – ۱۵ درجه سانتیگراد ، در حالت محلول در آب مقطر استریل حدود ۳ ماه تعیین شد. عصاره خام تا دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد فعال بوده و در درجه حرارت‌های بالاتر فعالیت بازدارندگی علیه قارچ مذکور کاهش می‌یابد. آزمایشات گلخانه‌ای نیز موید فعالیت بیوکنترلی بالای *S. erythraea* علیه بیمارگر مورد بررسی می‌باشد.

واژگان کلیدی: حداقل غلظت بازدارنده از رشد، کنترل بیولوژیک، متابولیت‌های ضدقارچی، *Streptomyces erythraea*، *Pyricularia grisea*.

مقدمه

قارچ عامل بیماری بلاست برنج *Magnaporthe grisea* با مرحله غیر جنسی *Pyricularia grisea* می‌باشد. قارچ در طوقه، غلاف گره، دم خوشه، دانه و برگ لکه‌های خاکستری به وجود آمده که حاشیه کشیده دارند. روش متداول کنترل بیماری بلاست استفاده از سموم شیمیایی است. علاوه بر آلودگی‌های زیست محیطی و مشکلات اقتصادی ناشی از کاربرد سموم شیمیایی، این بیماری به طور کامل کنترل نشده و به صورت یکی از مشکلات عمده در مزارع برنج ایران مطرح است. توسعه سیستم‌های بیوکنترلی، روشی موثر جهت کاهش آلودگی محیط زیست و خطر ایجاد مقاومت ناشی از قارچ کش‌های شیمیایی محسوب می‌شود (Rizk *et al.*, 2007). گزارش‌های زیادی از کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به ویژه اکتینومایست‌ها به چاپ رسیده است. اکتینومایست‌ها یکی از جاذب‌ترین منابع تولید فرآورده‌های زیستی هستند؛ از آن‌جمله می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌ها، عوامل تحریک کننده رشد گیاهی، سیدروفور، آنزیم‌ها، ممانعت کننده آنزیم‌ها اشاره نمود.هدف از این تحقیق، ارزیابی فعالیت بیوکنترلی *S. erythraea* جهت استفاده از آن در کنترل بیولوژیک بیماری بلاست مزارع برنج می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱ – تهیه ایزوله قارچ عامل بیماری و *S. erythraea* و ارزیابی فعالیت ضد قارچی

نمونه‌هایی از بیماری بلاست برگ و گردن خوشه از مزارع برنج مناطق مختلف استان مازندران جمع‌آوری شد و پس از کشت در پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب به روش تک هاگ جدایه‌هایی از قارچ عامل بلاست جداسازی شد. ایزوله (DSM 40517) *S. erythraea* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری و جهت کشت و تکثیر از محیط کشت اختصاصی GYM Streptomyces Medium استفاده شد. قطعه ای از پرگنه همراه با محیط کشت را جدا نموده و روی کشت تازه قارچ قرار داده و قطر ناحیه ممانعت از رشد اندازه‌گیری شد. جهت بررسی غلظت ماده ضد قارچی، *S.erythraea* ، در محیط مایع GYM تلقیح و روی شیکر با دورrpm ۱۳۰ در محیط آزمایشگاه ۳۰روز متوالی نمونه‌برداری انجام شد.

۲ – تعیین میزان حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی وتعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر

۲ میلی‌لیتر حلال به ۵۰ میلی‌گرم عصاره خام اضافه و توسط ورتکس مخلوط و در سانتریفیوژ به مدت ۱۰دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm قرار داده شد. محلول رویی را با Rotary evaporator تبخیرکردیم. لوله آزمایش اخیر و لوله آزمایش حاوی رسوب حاصل از سانتریفیوژ به دسیکاتور منتقل شد تا حلال خارج شود. به لوله‌های آزمایش دی‌متیل سولفوکساید و متانول (v.v:۱,۱) اضافه و آزمون زیستی به روش چاهک علیه قارچ انجام شد. در۱۰ لوله غلظت mg/ml ۲۵ عصاره خام را در آب مقطر استریل ریخته و لوله ها را درون ظرف آب با حرارت قابل تنظیم (دمای ثابت از ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار دادیم و بلافاصله سرد کرده و برای محتویات لوله ها، آزمون زیستی به روش چاهک انجام دادیم.

۳ – تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد و پایداری ماده مؤثر در محیط

غلظت mg/ml ۵۰ عصاره خام را در آب مقطر حل کرده و با سانتریفیوژ با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه محلول رویی و رسوب را از هم جدا کرده وبا Rotary evaporator خشک کردیم. به هر لوله دی‌متیل سولفوکساید و متانول (v.v :۱.۱) افزوده و ۷ سری رقت متوالی ۵۰، ۲۵، ۱۲,۵، ۶,۲۵، ۳,۱۲۵، ۱,۵۶۲ و mg/ml ۰,۷۸۱ از آن تهیه کرده و آزمون زیستی به روش چاهک انجام گرفت. جهت تعیین پایداری ماده مؤثر در محیط غلظت mg/ml ۲۰ از ماده موثر در آب مقطر استریل حل کرده و هفته‌ای ۲ مرتبه آزمون زیستی دیسک- آگار علیه قارچ انجام شد.

۴ – مطالعات گلخانه‌ای

در ردیف اول، گیاهان تیمارشده با سوسپانسیون اسپور قارچ بیماری‌زا و در ردیف دوم، گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون اسپور *S. erythraea* ، در ردیف سوم گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون مخلوطی از اسپورهای قارچ بیماری‌زا به همراه *S. erythraea* و در ردیف چهارم گیاهان شاهد را قرار می‌دهیم. پس از گذشت ۴روز اثرات بازدارندگی و میزان این اثر را مشاهده و ثبت نمودیم.

نتایج وبحث

با روش کشت متقابل بین بیمارگر *S. erythraea* و اندازه گیری قطر ناحیه ممانعت از رشد معین شد آنتاگونیست فعالیت بیوکنترلی بالایی روی بیمارگر دارد. نتایج میزان حلالیت ماده موثر در حلال‌های آلی نشان می‌دهد، محتویات لوله آزمایش حاوی محلول رویی در حلال‌های قطبی (آب مقطر و متانول) و حلال غیرقطبی (کلروفرم و هگزان) در آزمون زیستی هاله ممانعت از رشد ایجاد کردند. در تحقیقی نیز فعالیت آنتاگونیستی۱۶۰ ایزوله اکتینومایست بومی خاکزی و دریازی علیه عامل بیماری بلاست بررسی شد ماده موثر

آنها نیز در حلال‌های قطبی و غیر قطبی محلولند (Kathiresan *et al*,. 2005). با انجام آزمون زیستی به روش چاهک حداقل غلظت بازدارنده از رشد علیه بیمارگر ۱,۵۶۲ mg/ml و پایداری ماده موثر در آب مقطر در دمای اتاق ۳ ماه ارزیابی شد. فعالیت زیستی ماده موثر *S. erythraea* در دمای بالاتر از۹۰ درجه سانتی‌گراد کاهش پیدا می‌کند. *Streptomyces sindeneusis* نیز دارای حداقل غلظت بازدارنده از رشد روی عامل بلاست به‌میزان ۱,۵۶۲mg/ml می‌باشد و ماده موثر آن در دمای اتاق ۳ ماه پایداری علیه بیمارگر دارد (Ebrahim zarandi *et al*., 2009). بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد، *S. erythraea* اثر قابل توجهی در کنترل عامل بلاست داشته و از میزان علائم بیماری به‌طور قابل توجهی می‌کاهد.

نمودار۱. نتایج آزمون زیستی *S. erythraea* علیه *P. grisea* در محیط کشت مایع و بررسی قطر ناحیه بازدارنده از رشد در ۳۰روز متوالی

نتیجه گیری کلی

هدف از انجام این تحقیق دستیابی به روش سالم و غیر شیمیایی مبارزه با بیماری‌های گیاهی به‌خصوص کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست برنج با استفاده از باکتری آنتاگونیست *S. eryhthraea* و مطالعه تولید متابولیت‌های ضد قارچی آن بود.

منابع

1- Ebrahimi zarandi M, Shahidi Bonjar GH, Padasht Dehkaei F, Ayatollahi Moosavi SA, Rashid Farokhi P, and Aghighi S. 2009. Biological control of Rice blast by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. American Journal of Applied Sciences, 6(1): 194-199

2- Kathiresan K, Balagurunathan R, and Masilamani Selvam M. 2005. Fungicidal activity of marine Actinomycetes against phytopathogenic fungi . Indian Journal of Biotechnology . 4 : 271 – 276

3- Rizk M, Abdel – Rahman T, and Metwally H. 2007. Screening of antagonistic activity in different *Streptomyces* species against some pathogenic microorganisms . Journal of Biological Sciences . 7: 1418 – 1423

Biological Control of Rice Blast by use of *Streptomyces erythraea* on invitro and Greenhouse

Elahe Amini[1]*, Mohammad Ali Tajick Ghanbari[2], Nader Hasanzade[1]

1- Department of Plant Pathology,Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran-Iran

2- Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari-Iran

***Corresponding auther: Elaheamini1389@gmail.com**

Abstract

Rice blast, is the most important disease of rice because of its world-wide distribution and the resulting severe yield loss. Biological control has also become a prominent option for controlling various plant diseases. Rice blast is a plant disease which have been controlled by biological control approachs. In this research, antifungal effects of *Saccharopolyspora erythraea* was investigated against *Pyricularia grisea* in vitro and greenhouse. *S. erythraea* showed strong antagonistic activity against pathogen in Agar disk, Well- diffusion ad Dual culture methods by producing extra cellular antifungal metabolites.The active metabolite of *S. erythraea* was polar and nonpolar. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the crude in DM solvent was determined as 1.562 mg/ml. Stability of the active crude in distilled water at room temperature 15 - 30°C was about 3 months. Thermal inactivation point (TIP) of active crude extracts was determined at 90°C with a decrease in its biological activity in higher temperatures. Pot and greenhouse tests showed high biocontrol properties against treated pathogen too.

Keywords : Minimum Inhibitory Concentration, Biological Control, Thermal inactivation point, Antifungal metabolites, *Saccharopolyspora erythraea* , *Pyricularia grisea* .