کنترل بیولوژیکی *Bipolaris victoriae* عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج با استفاده از گونه‌های *Alternaria* در استان گیلان

محمدرضا صفری مطلق*

***نویسنده مسوول:** دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (ssafarimotlagh@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۲۵

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای برنج که توسط گونه‌های مختلف قارچ *Bipolaris* ایجاد می‌شود یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در ایران و جهان است. در این تحقیق، از مجموع ۲۵۶ نمونه آلوده جمع‌آوری شده از مزارع برنج استان گیلان، ۱۳۵ جدایه قارچی جداسازی گردید. اساس شناسایی، خصوصیات مورفولوژیکی قارچ‌ها بود. بر اساس نتایج، قارچ‌های جدا شده به *Bipolaris oryzae*، *Bipolaris victoriae*، *Alternaria tenuissima*، *Alternaria infectoria*، *Alternaria citri*، *Alternaria alternata*، *Alternaria franseriae* و *Alternaria pellucida* تعلق داشتند. آزمایش بیماری‌زایی نشان داد که همه جدایه‌های *Bipolaris victoriae* بیماری‌زا بودند. در مطالعات آزمایشگاهی از روش‌های مختلفی مثل کشت متقابل، مطالعه بازدارندگی رشد *B. victoriae* با استفاده از عصاره کشت، کشت متقابل قارچ‌های آنتاگونیست مورد نظر و *B. victoriae* به روش کشت اسلاید و اثر متابولیت‌های فرار در بازدارندگی رشد این قارچ استفاده گردید. براساس نتایج از میان جدایه‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب جدایه‌های *A. pellucida*، *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. tenuissima*، *A. infectoria* و *A. citri* دارای بیشترین درصد مهار میسلیومی در مقابل قارچ عامل بیماری بودند. در مطالعات گلخانه‌ای، این قارچ‌ها روی برنج مایه‌زنی شدند. همه جدایه‌ها به استثنای *A. tenuissima* به‌طور مؤثری شدت بیماری را کاهش دادند و *A. pellucida* با ۳۸/۷۶ درصد کاهش در شدت بیماری مؤثرترین آنتاگونیست در مطالعات گلخانه‌ای بود. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های غیربیماری‌زایی از گونه‌های آلترناریا وجود دارند که می‌توانند به‌عنوان آنتاگونیست‌های بالقوه برای کنترل بیماری لکه قهوه‌ای برنج معرفی گردند.

کلید واژه‌ها: بیماری لکه قهوه‌ای برنج، کنترل بیولوژیکی، گونه‌های آلترناریا

مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذرزاد برنج است، در سال‌های اخیر دارای اهمیت بیشتری شده و به‌ویژه در برنج‌کاری‌های استان گیلان در شرایط مساعد، خسارت وسیعی را به کمیت و کیفیت محصول برنج وارد نموده است (Safari Motlagh et al., 2005). لکه قهوه‌ای برنج روی برنج‌های زمین‌های مرتفع (فرابوم) و تالابی در تمام مناطق عمده برنج‌کاری جهان رخ می‌دهد. اپیدمی این بیماری در سال ۱۹۴۲ در بنگال، محصول را به میزان ۴۰ تا ۹۰ درصد کاهش داد و تا حدودی مسئول قحطی سال ۱۹۴۲ در این کشور بود (Padmanabhan, 1973). علائم این بیماری ممکن است به شکل سوختگی گیاهچه یا به شکل بیماری برگ و گلوم در گیاهان بالغ ظاهر شود. قارچ روی گیاهچه‌های میزبان، لکه‌های قهوه‌ای مدور و کوچکی تولید می‌کند که ممکن است کاملاً دور کولئوپتیل را بگیرند و سبب بدشکلی برگ‌های اولیه و ثانویه گردند. در مواردی، قارچ ممکن است ریشه را نیز آلوده و آن‌ها را سیاه کند که در

نتیجه گیاهچه‌های آلوده از رشد باز می‌مانند یا از بین می‌روند (Safari Motlagh et al., 2005). قارچ روی برگ گیاهان پیرتر لکه‌های گرد تا بیضی تولید می‌کند که دارای مرکز قهوه‌ای روشن یا خاکستری هستند و با یک حاشیه قهوه‌ای مایل به قرمز احاطه می‌شوند. وقتی آلودگی شدید باشد لکه‌ها ممکن است به هم متصل شوند و قسمت‌های وسیعی از برگ‌های آلوده را از بین ببرند. قارچ همچنین ممکن است روی گلوم‌ها، لکه‌های بیضی قهوه‌ای تیره تا سیاه ایجاد کند. علاوه بر آن ممکن است دانه را آلوده کند و سبب سیاه شدن آن‌ها شود. آلودگی، تعداد دانه‌های موجود در هر خوشه و وزن هر دانه برنج را کاهش می‌دهد (Ou, 1985). این بیماری دارای گسترش جهانی بوده و از بیشتر کشورهای کشت‌کننده برنج گزارش شده است (Ou, 1985).

در ایران این بیماری علاوه بر مناطق برنج‌کاری گیلان، مازندران و گلستان از دیگر مناطق کاشت برنج از جمله لنجان اصفهان و شهرکرد نیز گزارش شده و گونه‌های مختلفی از *Bipolaris* به‌عنوان عامل بیماری معرفی شده‌اند که عبارت‌اند از: *Bipolaris oryzae*، *B. sorgichola*، *B. victoriae*، *B. bicolor* و *B. indica* (Safari Motlagh and Kaviani, 2008). *B. victoriae* با حدود ۸۵ درصد از بیشترین فراوانی در بین گونه‌های قارچ مزبور در استان گیلان برخوردار بوده است (Safari Motlagh and Kaviani, 2008). میزان خسارت این بیماری در مزارع برنج روی برخی ارقام هم‌چون نعمت به‌ویژه در خزانه گاهی تا ۹۰ درصد برآورد شده است (Safari Motlagh et al., 2005).

به علت اهمیت فراوان حفظ منابع طبیعی و لزوم کاهش آلودگی‌های آب، خاک و هوا، اهمیت کنترل بیولوژیکی همواره افزایش یافته است. اگرچه کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی، تا حدی کند است ولی دارای اثرات طولانی مدت، ارزان و بدون ضرر برای محیط‌زیست بوده و می تواند یک روش جایگزین مناسب برای کاربرد مواد شیمیایی باشد (McSpadden and Fravel, 2002). قارچ‌های آنتاگونیست از مهم‌ترین عواملی هستند که در کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (McSpadden and Fravel, 2002).

گونه‌های آلترناریا عموماً به‌عنوان قارچ‌های ساپروفیت شناخته می‌شوند، اگرچه برخی از آن‌ها در بعضی از گیاهان بیماری‌زا هستند (Guo et al., 2004؛ Thomma, 2003). برخی از گونه‌های آلترناریا، بیشتر خواص آنتاگونیستی دارند و تعدادی از آن‌ها به محصولات زراعی آسیب وارد می‌کنند (Hammed et al., 2002). درکنار ماهیت بیماری‌زایی این قارچ‌ها، برخی از آن‌ها در گیاهان اندوفیت هستند (Sing et al., 2014). برخی از گونه‌های آلترناریا به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی علف‌های هرز معرفی شده‌اند، چنان‌که *A. pellucida*، به‌عنوان عامل کنترل زیستی در علف‌های هرزی هم‌چون تیرکمان آبی، سوروف و قاشق‌واش معرفی شده است (Safari Motlagh, 2011).

گونه‌های مختلف آلترناریا متابولیت‌های ثانویه متعددی از جمله توکسین‌ها را تولید می‌کنند که ممکن است در بیوکنترل علف‌های هرز مؤثر باشند (Chen et al., 2005). برای مثال توکسین مترشحه از *A. alternata* f.sp. *lycopersici* برای کنترل علف هرز تاتوره (*Datura stramonium*) و تاج‌ریزی (*Solanum nigrum*) به‌کار رفت (Abbas et al., 1993).

در مطالعه‌ای تأثیر جدایه‌های بومی تریکودرمای جدا شده از مزارع برنج استان‌های گیلان و مازندران در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای برنج ایجاد شده به‌وسیله *B. oryzae* مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۴۵ جدایه متعلق به گونه‌های *T. atroviride*، *T. harzianum* و *T. virens* در مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای برای یافتن بهترین گونه بیوکنترلی مؤثر در کنترل *B. oryzae* غربال شدند. دو استرین متعلق به *T. harzianum* به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیماری را کنترل نموده و دو استرین متعلق به *T. atroviride* رشد جوانه را افزایش دادند (Khalili et al., 2012).

در یک مطالعه دیگر، کنترل بیولوژیکی *Bipolaris* spp. عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج با به‌کارگیری قارچ‌های آنتاگونیست در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که قارچ *Preussia* sp. مؤثرترین آنتاگونیست در کنترل بیماری بوده است (Mohammadian, 2013). همچنین کنترل زیستی *B. oryzae* با به‌کارگیری جدایه‌هایی از *Streptomyces* sp. در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه G فعالیت آنتاگونیستی بیشتری در مقابل قارچ عامل بیماری نشان می‌دهد (Soltani Nejad et al., 2014).

هدف از این تحقیق بررسی خواص آنتاگونیستی گونه‌های مختلف آلترناریا علیه *Bipolaris victoriae* (که گونه غالب عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در استان گیلان است) و معرفی گونه‌هایی از آلترناریا بود که بیشترین بازدارندگی را روی رشد و فعالیت قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در استان گیلان داشته باشند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

نمونه‌برداری از خزانه‌ها و مزارع آلوده و از نشا، برگ و خوشه برنج انجام گرفت. جداسازی قطعات آلوده از برگ و خوشه انجام شد. بدین معنی که پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در برگ و نیز بذرهای آلوده در خوشه، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و شستشو با آب مقطر انجام شد و پس از آبگیری، قطعات به‌ترتیب روی محیط‌های کشت مختلفی شامل PDA و WA، برای جداسازی و رشد پرگنه قارچ، خالص‌سازی و تک‌اسپور کردن و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی قرار داده شدند (Safari Motlagh et al., 2005). برای نگهداری جدایه‌های قارچی، از روش کاغذ صافی سترون استفاده شد (Safari Motlagh et al., 2005). پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها، خصوصیات ماکروسکوپی آن‌ها هم‌چون شکل و رنگ پرگنه و نحوه رشد روی محیط PDA مورد بررسی قرار گرفت. سپس خصوصیات میکروسکوپی آن‌ها با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی و استفاده از کلیدهای مختلف شناسایی بررسی شد.

آزمایش بیماری‌زایی

اثبات بیماری‌زایی قارچ‌های جدا شده 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 (۲ 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 هیپوکلریت سدیم ۳۰ درصد 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 به‌عنوان شاهد انجام شد که در هر دسیکاتور از دو تشتک پتری استفاده گردید. به هر تشتک پتری مقداری آب مقطر سترون اضافه شد، به‌طوری‌که 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 (Khalili et al., 2012). در تمامی آزمایش‌ها از سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون استفاده شد که برای شمارش آن‌ها لام گلبول‌شمار به‌کار رفت. علاوه بر آن برای افزایش جذب سطحی از توئین-۲۰ استفاده شد که به نسبت ۱ درصد به‌کار رفت. لازم به ذکر است که دسیکاتورها در طول آزمایش در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۹۰ درصد (رطوبت اشباع) و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داشتند (Safari Motlagh et al., 2005).

مطالعات کنترل بیولوژیک

روش کشت دوتایی (کشت متقابل)

روش Sivakumar et al. (2000) مورد استفاده قرار گرفت. یک دیسک میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر که

از قسمت‌های حاشیه‌ای کشت ۷-۵ روزه *B. victoriae* گرفته شده بود در زیر هود سترون درون یک تشتک پتری ۸ سانتی‌متری حاوی PDA به فاصله ۲ سانتی‌متری از دیواره تشتک پتری قرار داده شد. سپس تشتک پتری به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا قارچ موردنظر رشدش را آغاز نماید. آن‌گاه یک دیسک میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر که از کناره‌های کشت ۷-۵ روزه گونه‌های مختلف آلترناریا گرفته شده بود، در فاصله ۳ سانتی‌متری از قارچ بیماری‌زا قرار گرفت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و ارزیابی ۱۰-۷ روز بعد، انجام گرفت (Sivakumar et al., 2000). در شاهدها، یک دیسک میسلیومی از کناره‌های کشت ۷-۵ روزه *B. victoriae* در مرکز یک تشتک پتری ۸ سانتی‌متری قرار گرفت. تشتک‌های پتری شاهد نیز در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در پایان دوره انکوباسیون، رشد قطری *B. victoriae* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری گردید.

کاهش رشد قطری بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{مهار رشد میسلیومی}\% = \frac{C-T}{C} \times 100$$

که C میزان رشد قطری *B. victoriae* در تشتک‌های پتری شاهد و T رشد قطری *B. victoriae* در حضور گونه‌های آلترناریا بود (Sivakumar et al., 2000). آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت.

مطالعه بازدارندگی رشد *B. victoriae* با استفاده از عصاره کشت

برای انجام این آزمایش از روش Dennis and Webster (1971a) استفاده گردید. برای این منظور در داخل ظرف‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت Potato dextrose broth (PDB)، جدایه‌هایی از گونه‌های مختلف آلترناریا، کشت داده شدند و به‌مدت ۱۰ روز روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس با استفاده از صافی‌های بیولوژیکی و پمپ خلاء، عصاره‌گیری انجام شد. سپس این عصاره (به نسبت ۲۵ 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 *B. victoriae* در مرکز تشتک‌های پتری تیمار و شاهد قرار گرفت. پس از ۱۰ روز قرارگیری در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد، رشد قطری *B. victoriae* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری گردید (Sivakumar et al., 2000).

مطالعه کشت متقابل گونه‌های مختلف آلترناریا و *B. victoriae* به‌روش کشت اسلاید

برای انجام این آزمایش از روش Sivakumar et al. (2000) استفاده گردید. یک لام آزمایشگاهی (اسلاید) تمیز روی دو میله شیشه‌ای L شکل در درون یک تشتک پتری 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 موردنظر و *B. victoriae* در فاصله ۲ سانتی‌متری 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 سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۷ روز اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفتند و ویژگی‌هایی هم‌چون رسیدن ریسه‌های قارچی به یکدیگر و تأثیر متقابل آن‌ها روی یکدیگر مطالعه گردید.

مطالعه اثر متابولیت‌های فرار در بازدارندگی رشد *B. victoriae*

یک دیسک میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه *B. victoriae* در مرکز یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفت. ۴۸ ساعت بعد دیسکی به قطر پنج میلی‌متر از کشت سه روزه قارچ‌های مورد آزمایش در مرکز یک تشتک پتری دیگر

حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس درپوش‌های این تشتک‌های پتری در زیر هود سترون برداشته شده و تشتک حاوی *B. victoriae* به‌صورت وارونه روی تشتک پتری قارچ‌های مورد آزمایش گذاشته شد. در شاهد، دیسکی از محیط کشت PDA جای‌گزین قارچ‌های مورد آزمایش شد. درصد بازدارندگی پس از ۱۰ روز محاسبه گردید (Dennis and Webster, 1971b؛ Sivakumar et al., 2000).

لازم به ذکر است که در تمامی آزمایش‌های فوق *Alternaria tenuissima*، *Alternaria infectoria*، *Alternaria citri*، *Alternaria alternata*، *Alternaria franseriae* و *Alternaria pellucida* به‌عنوان قارچ‌های آنتاگونیست مورد استفاده قرار گرفتند.

مطالعات گلخانه‌ای

مقداری بذر رقم هاشمی به مدت یک ساعت در کلراکس ۳۰ درصد ضدعفونی گردید و سپس با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شد. سپس تعداد ۵۴ گلدان پلاستیکی با دهانه ۱۱ سانتی‌متری، از خاک مزرعه برنج پر گردید.

تعداد ۱۰ عدد بذر داخل هر گلدان کاشته شد و گلدان‌ها آبیاری شدند و داخل گلخانه قرار داده شدند. درجه حرارت گلخانه در زمان رشد و نمو گیاهچه‌ها بین ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۰-۱۷ درجه سانتی‌گراد در شب و رطوبت نسبی بین ۱۰۰-۸۰ درصد در نوسان بود (Safari Motlagh et al., 2005). گیاهچه‌ها از زمان کاشت تا مرحله ۶-۴ برگی در این شرایط و در معرض نور خورشید نگه‌داری شدند. در این مدت آبیاری به‌صورت معمول انجام می‌گرفت، به‌طوری‌که گلدان‌ها به‌طور دائم حالت غرقابی داشتند. زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ۶-۴ برگی رسیدند، مایه‌زنی اسپور روی آن‌ها صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا روی همه نشاها به وسیله افشانه‌های دستی، آب مقطر سترون پاشیده شد. سپس سوسپانسیون اسپور لازم برای تلقیح فراهم گردید و روی نشاها پاشیده شد. برای شمارش اسپورها از لام گلبول‌شمار استفاده شد. برای مایه‌زنی از سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۴} (اسپور + میسلیوم) در لیتر آب مقطر سترون استفاده شد. علاوه بر آن افزایش جذب سطحی با استفاده از توئین ۲۰ انجام شد که به نسبت ۱ درصد به‌کار رفت. قبل از اسپورپاشی زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ۶-۴ برگی رسیدند، تعداد نشاها با تنک کردن، به ۳ عدد در هر گلدان کاهش یافت (Safari Motlagh et al., 2005). از آن‌جایی که گونه غالب عامل بیماری لکه قهوه‌ای در این مطالعه، *Bipolaris victoriae* بود در مطالعات کنترل زیستی از این گونه و جدایه Bi-309 استفاده شد.

آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. به ازای هر قارچ آنتاگونیست یک مجموعه گلدان در نظر گرفته شد. در هر مجموعه یک سری گیاهان شاهد وجود داشت که فقط با آب مقطر مایه‌زنی شدند. سری دیگر شامل گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با *B. victoriae* بود و یک سری گیاهان مایه‌زنی شده با *B. victoriae* و آنتاگونیست موردنظر یعنی گونه‌های مختلف *Alternaria* نیز در نظر گرفته شد. قبل از شروع اسپورپاشی، گیاهچه‌های هر قسمت به وسیله پلاستیک شفاف از بقیه گلدان‌ها مجزا شدند. بعد از اسپورپاشی نیز روی گلدان‌ها به‌وسیله کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شد و با گونی‌های کنفی که به‌طور مداوم به‌وسیله شیلنگ متصل به شیر آب خیس می‌شدند، رطوبت نسبی بالاتر از ۹۵ درصد نگه داشته شد. بعد از مایه‌زنی، رطوبت نسبی حدود ۱۰۰- ۹۵ درصد و میزان حرارت در روز ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و در شب ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد نوسان داشت. دمای مورد نیاز توسط دستگاه‌های حرارتی تنظیم و تعدیل گردید.

تغییرات ایجاد شده روی گیاهان به‌صورت روزانه به مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان معین و ظهور علائم، علائم مورد بررسی قرار گرفت و پاتوژن‌های جدا شده در این مرحله با پاتوژن اولیه مطابقت داده شدند (Khalili et al., 2012).

پس از تأیید از مقیاس هورسفال- بارت (Horsfall and Barratt, 1945)، برای اندازه‌گیری شدت بیماری استفاده شد. اساس اندازه‌گیری مبتنی بر مشاهدات بصری از علائم ایجاد شده بود و توصیف علائم و درجه‌بندی بدین ترتیب انجام گرفت: ۱: برگ سالم بود و هیچ لکه‌ای وجود نداشت؛۲: تعداد لکه‌ها ۱۰-۱ و برگ سالم؛ ۳: تعداد لکه‌ها ۲۵-۱۰، لکه‌ها بسیار ریز و توسعه‌نیافته و برگ بسیار مقاوم؛ ۴: تعداد لکه‌ها ۴۰-۲۵، لکه‌ها تا حدودی توسعه یافته و برگ مقاوم؛ ۵: تعداد لکه‌ها ۶۰-۴۰، لکه‌ها متوسط و توسعه‌یافته و برگ با مقاومت متوسط؛ ۶: تعداد لکه‌ها ۸۰-۶۰، لکه‌ها متوسط و توسعه‌یافته، برگ با مقاومت کم و دارای سوختگی‌های جزئی؛ ۷: تعداد لکه‌ها ۱۰۰-۸۰، لکه‌ها متوسط تا بزرگ و توسعه‌یافته، برگ حساس و دارای سوختگی‌های جزئی و گاهی سوختگی‌های وسیع؛ ۸: تعداد لکه‌ها ۱۵۰-۱۰۰، لکه‌ها بزرگ و توسعه‌یافته، برگ بسیار حساس و دارای سوختگی‌های جزئی فراوان و گاهی سوختگی‌های وسیع؛ ۹: تعداد لکه‌ها ۲۰۰-۱۵۰، برگ‌ها دارای ضایعه‌ها و سوختگی‌های وسیع و فراوان؛ ۱۰: برگ کاملاً سوخته و مرده (Horsfall and Barratt, 1945).

سپس میزان شدت (درجه) بیماری با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

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

که N در این‌جا، برگ در هر یک از درجات بیماری بود(Bertrand and Gottwald, 1997).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های قارچی بر اساس صفات مورفولوژیکی

پس از شناسایی مقدماتی همه جدایه‌های قارچی به‌دست آمده در سطح جنس، تعداد ۲۰ جدایه قارچی برای مطالعات بیماری‌زایی و مطالعات کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه انتخاب و از میان این جدایه‌ها، ۵ جدایه برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب گردیدند و مورد ارزیابی بیشتر و شناسایی در سطح گونه قرار گرفتند. اساس شناسایی آن‌ها مبتنی بر صفات مورفولوژیکی هم‌چون شکل پرگنه، رنگ پرگنه، نحوه رشد میسلیوم، منفرد یا گروهی‌بودن کنیدیوفور، ابعاد و رنگ کنیدیوفور، طول و عرض کنیدی و تعداد دیواره‌های عرضی کنیدی‌ها و ... بود. بر اساس صفات فوق، هشت گروه قارچی شناسایی شدند که عبارت بودند از:

گروه اول *Bipolaris oryzae*: پرگنه پخش یکنواخت، ریسه‌ها با رشد هوایی سریع، خاکستری تا خاکستری تیره. ریسه‌ها: منشعب، پنبه‌ای، قهوه‌ای روشن تا کم‌رنگ. کنیدیوفور منفرد یا در گروه‌های کوچک، راست تا مارپیچی، گاهی زانودار، قهوه‌ای تیره که به طرف نوک کم‌رنگ‌تر می‌گردید، با دیواره‌های عرضی به ابعاد ۷-۴ × ۵۸۰-۴۳۰ میکرومتر (متوسط ۵۰۰ × ۵ میکرومتر). کنیدیوم‌ها معمولاً خمیده، قایقی‌شکل، دوکی تا گرزی وارونه، گاهی اوقات استوان‌های، زرد کم‌رنگ تا قهوه‌ای تیره، صاف، ۱۲-۵ دیواره عرضی به ابعاد ۲۶-۱۰ × ۱۲۵-۴۶/۵ میکرومتر (متوسط۹۴ × ۵/ ۱۶ میکرومتر)، هیلوم[1] کوچک، تیره یا روشن، اغلب برآمده و به‌طور جزئی پاپیل‌دار بودند (شکل ۱-A و B). مشخصات این گروه از جدایه‌ها با گونه *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker مطابقت داشت (Sivanesan, 1987).

گروه دوم *Bipolaris victoriae*: پرگنه پخش یکنواخت، خاکستری تا خاکستری تیره. ریسه‌ها منشعب،

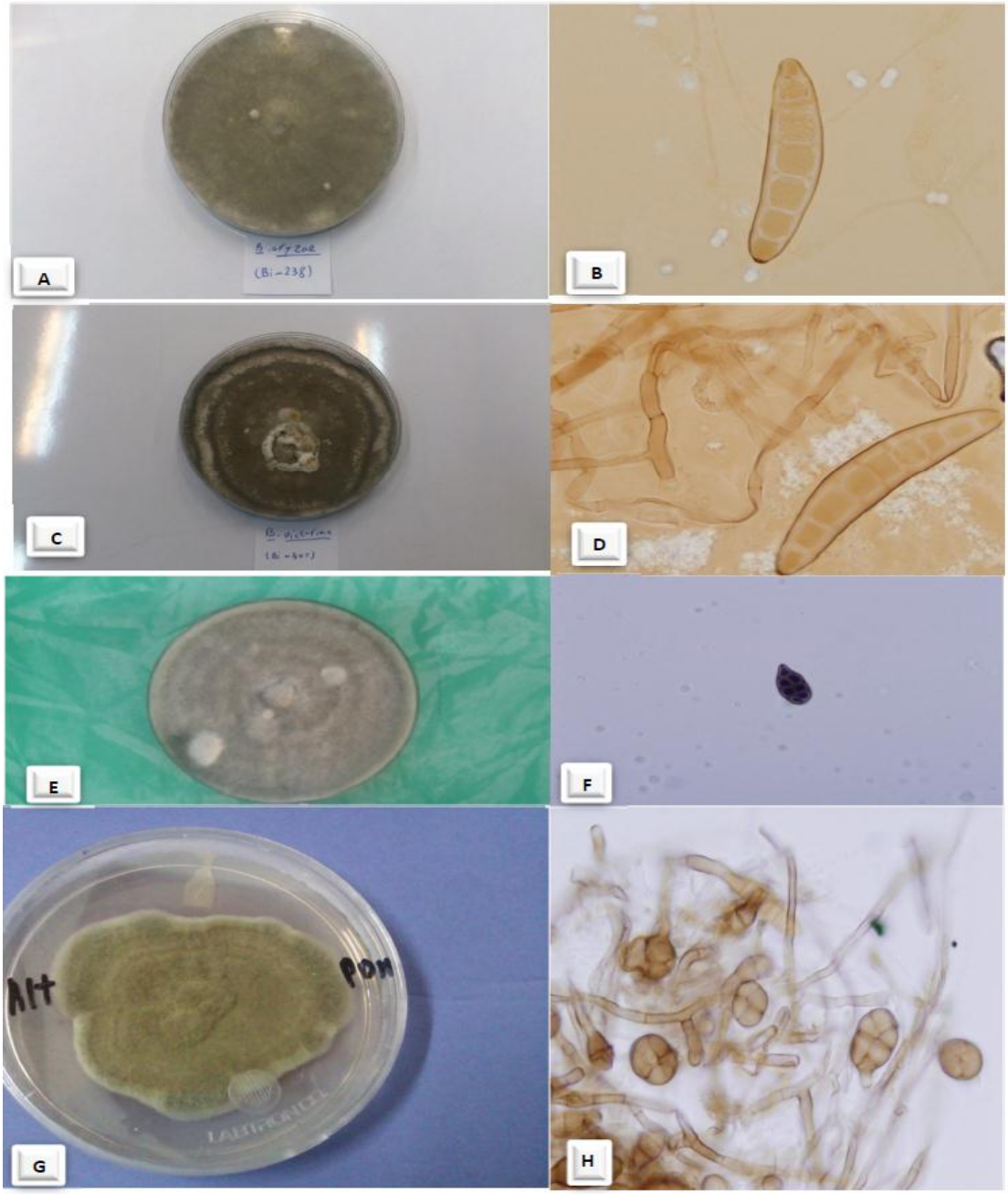
1- Hilum

زرد کم‌رنگ تا قهوه‌ای خیلی روشن. کنیدیوفور منفرد یا در گروه‌های کوچک، راست تا مارپیچی، گاهی در بالا زانودار، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، دیواره‌دار، به ابعاد ۹-۵ × ۳۴۰-۵۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها به‌طور جزئی خمیده، به‌طرز وسیع دوکی یا دوکی گرزی وارونه، قهوه‌ای روشن تا تیره، صاف، دارای ۱۳-۴ (اغلب ۱۰-۸) دیواره عرضی، به ابعاد ۲۴-۹ × ۱۴۳-۳۲ میکرومتر، هیلوم کوچک بوده ولی دارای برآمدگی یا پاپیل نبودند (شکل ۱-C و D). مشخصات این گروه از جدایه‌ها با گونه *Bipolaris victoriae* (Meehan and Murphy) Shoemaker مطابقت داشت (Sivanesan, 1987 ؛Ellis, 1971).

گروه سوم *Alternaria tenuissima*: پرگنه‌ها قهوه‌ای مایل به سیاه، مخملی با رشد سریع، کنیدیوفورها به‌طور منفرد یا در گروه‌های ساده یا منشعب، راست یا خمیده، کمابیش استوانه‌ای، دیواره‌دار، زرد کم‌رنگ یا قهوه‌ای روشن، صاف، با یک یا چند خار کنیدیایی، تا ۱۱۵ میکرومتر طول و ۶-۴ میکرومتر ضخامت دارند. کنیدی‌ها به‌طور منفرد یا در زنجیره‌های کوتاه، راست یا خمیده، دوکی خمیده یا با بدنه‌ای بیضوی شکل که به‌تدریج به سمت نوک باریک می‌گردید که تا نیمه طول کنیدیوم می‌رسید، اما غالباً در راس متورم بود، جایی که ممکن است چندین خار وجود داشته باشد، زرد کمرنگ تا قهوه‌ای طلایی، معمولاً صاف، گاهی زگیل‌دار، عموماً با ۷-۴ دیواره عرضی و چندین دیواره طولی. طول کنیدی‌ها ۹۵-۲۲ (با میانگین ۵۴) میکرومتر، ۱۹-۸ میکرومتر ضخامت در وسیع‌ترین بخش، ۴-۲ میکرومتر در نوک و در نوک متورم ۵-۴ میکرومتر ضخامت داشت (شکل ۱-E و F). خصوصیات این گروه از قارچ‌ها با گونه *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire مطابقت داشت (Ellis, 1971).

گروه چهارم *Alternaria citri*: پرگنه‌ها منتشر، زیتونی مایل به سیاه، در محیط کشت، خاکستری، قهوه‌ای زیتونی یا سیاه و گاهی غشادار بودند. کنیدیوفورها ساده یا منشعب، راست یا مارپیچ، دیواره‌دار، قهوه‌ای کم‌رنگ مایل به قهوه‌ای متوسط یا قهوه‌ای زیتونی، با طول بیش از ۳۰۰ میکرومتر، ضخامت ۵-۳ میکرومتر، با یک شکاف انتهایی و گاهی یک یا دو شکاف جانبی. کنیدی‌ها به‌صورت منفرد یا ساده یا در زنجیره‌های منشعب ۷-۲تایی، راست یا کمی خمیده، با اشکال متنوع اما عموماً کروی مایل به بیضی (تخم‌مرغی شکل)، اغلب دارای نوک (منقار)، قهوه‌ای روشن مایل به قهوه‌ای متوسط یا گاهی قهوه‌ای تیره یا قهوه‌ای زیتونی، صاف تا زگیل‌دار با بیش از ۸ دیواره عرضی و دیواره‌های طولی زیاد، به طول ۶۰-۸ میکرومتر و در عریض‌ترین قسمت ۲۴-۶ میکرومتر ضخامت داشتند (شکل ۱-G و H). خصوصیات این گروه از قارچ‌ها با گونه *Alternaria citri* (Ellis & Pierce) مطابقت داشت (Ellis, 1971).

گروه پنجم *Alternaria infectoria*: پرگنه‌ها به رنگ سفید مایل به خاکستری کم‌رنگ یا نارنجی زردآلویی یا یکی از این دو و عموماً بافت کرکی داشتند. پرزهای هیف‌های عقیم سفید (غیراسپورزا) در مرکز پرگنه نمایان می‌گردید. زیر سطوح پرگنه‌ها عموماً نارنجی یا نارنجی تیره بود. رنگدانه‌هایی به‌وسیله این جدایه‌ها تولید می‌گردید. جدایه‌های این گروه با تشکیل زنجیره‌های کنیدیایی با ۸-۲ کنیدی و ایجاد تعداد زیادی زنجیره‌های دیگر با ۴-۲ کنیدی مشخص می‌شدند. طول کنیدیوفورهای ثانویه اغلب یک سوم طول کنیدی‌ها بود. کنیدی‌ها به‌صورت تیپیک تخم‌مرغی شکل با تعداد زیادی کنیدی‌های توسعه‌یافته متمایز راسی و بعضی اوقات بزرگتر از طول تنه کنیدیوم بودند. طول کنیدیوم‌ها ۲۰ تا ۳۷ میکرومتر (میانگین ۲۷ میکرومتر) بود (شکل ۲-A و B). مشخصات این گروه از جدایه‌های قارچی با مشخصات گونه *Alternaria infectoria* Simmons منطبق بود (Simmons and Roberts, 1993).



شکل ۱- A: پرگنه *B. oryzae* روی محیط کشت PDA، B: کنیدیوم *B. oryzae* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر، C: پرگنه *B. victoriae* روی محیط کشت PDA، D: کنیدیوم و کنیدیوفورهای *B. victoriae* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر، E: پرگنه قارچ *A. tenuissima* روی محیط کشت PDA، F: کنیدیوم *A. tenuissima* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر، G: پرگنه *A. citri* روی محیط کشت PDA، H: کنیدیوم‌ها و کنیدیوفورهای *A. citri* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر

Figure 1. A: Colony of *B. oryzae* on PDA, B: Conidium of *B. oryzae* (× 1200), C: Colony of *B. victoriae* on PDA, D: Conidium and conidiophores of *B. victoriae* (× 1200), E: Colony of *A. tenuissima* on PDA, F: Conidium of *A. tenuissima* (× 1200), G: Colony of *A. citri* on PDA, H: Conidia and conidiophores of *A. citri* (× 1200)

گروه ششم *Alternaria franseriae*: پرگنه به رنگ خاکستری مایل به سفید، مخملی با رشد سریع کنیدیوفورها روی میزبان، ساده، با یک مکان کنیدی‌زایی راسی منفرد بودند و در حالت خمیدگی پرولیفریت بوده

که یک سوراخ کنیدی‌زایی و یک هیلوم انتهایی در هر توسعه کوتاه داشتند. ابعاد کنیدیوفورها ۵-۳ × ۶۰-۱۵ میکرومتر و هم‌رنگ کنیدی‌ها بودند. کنیدی‌ها عمدتاً تخم‌مرغی شکل و بیضوی کشیده با یک نوک کاملاً گرد، در برخی حالات بدون نوک، تقریباً تخم‌مرغی یا بیضوی و به رنگ قهوه‌ای طلایی، صاف و در هنگام بلوغ عمدتاً به ابعاد ۱۲-۸ × ۴۰-۳۰ میکرومتر با ۸-۵ دیواره عرضی و گاهی اریب بودند. کنیدیوفورهای ثانویه راسی روی بسیاری از کنیدی‌ها وجود داشت و نشانگر تشکیل زنجیره‌ای از سلول‌های باریک ۱ تا ۲ تایی به ابعاد ۴-۳ ×۱۰-۳ میکرومتر بود (شکل ۲-C و D). خصوصیات این گروه از قارچ‌ها با گونه *Alternaria franseriae* Simmons مطابقت داشت (Simmons, 2007).

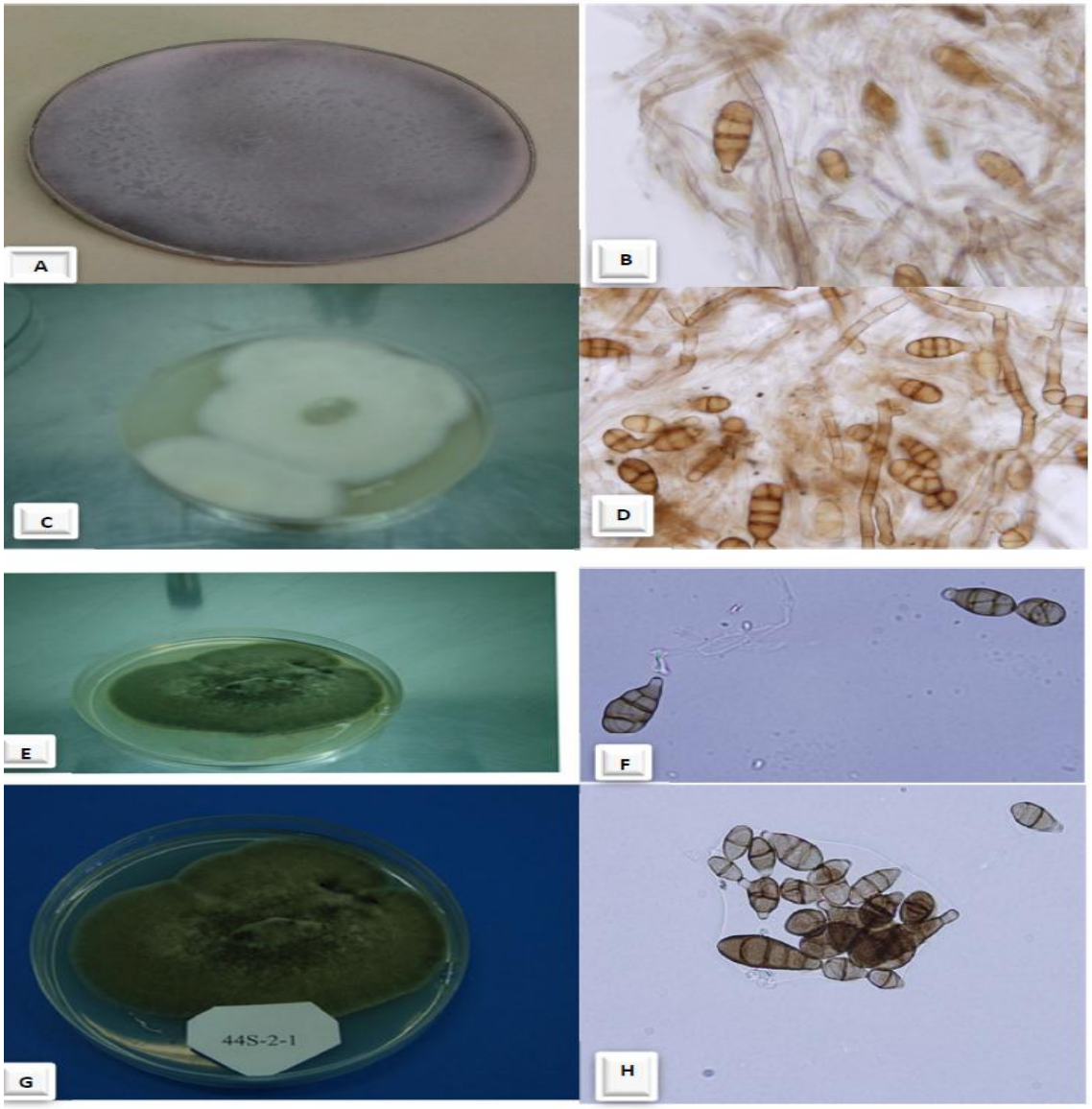
گروه هفتم *Alternaria alternata*: قطر پرگنه ۴ سانتی‌متر و به‌رنگ خاکستری مایل به سیاه بود و چهار جفت از حلقه‌های متحدالمرکز رشدی روی محیط کشت تشکیل شدند. زنجیره‌های منشعبی از کنیدی‌ها تشکیل شدند. بخش هوایی پرگنه‌ها فشردگی کمتری داشتند. زنجیره‌هایی از ۶-۴ کنیدی روی کنیدیوفورهای کوتاه به‌وجود آمدند. کنیدیوفورها نیمه‌مستقیم بودند و یک خوشه انتهایی از زنجیره‌های منشعب از کنیدی‌های کوچک به‌وسیله کنیدیوفورهای ثانویه کوتاه، مجزا شدند. کنیدیوفور اولیه به‌طور نسبی کوتاه و ابعاد آن ۴-۳ × ۷۰-۴۰ میکرومتر بود. این کنیدیوفور ساده باقی می‌ماند یا ۳-۱ انشعاب یافته و زانودار می‌شد. انشعاب در داخل زنجیره‌های اولیه زمانی آغاز می‌شد که تعداد کمی از کنیدیوفورهای ثانویه برخی از جایگاه‌های کنیدی‌زایی را توسعه دهند یا وقتی که کنیدیوفورهای ثانویه از سلول‌های بدنی[1] کنیدیوم، انشعاب یابند. زنجیره‌های منفرد کنیدیومی ممکن است در راس انشعاب ۲۰-۱۵ کنیدی داشته باشند. ۲-۱ کنیدی اولیه در یک زنجیره، بیضوی و بالغ بودند. کنیدی‌های بعدی در زنجیره، تخم‌مرغی شکل، بیضوی یا نیمه‌کروی بودند. ابعاد کنیدی‌های بیضوی اولیه ۹-۵ × ۳۰-۲۵ میکرومتر بود و ۷-۴ دیواره عرضی داشتند. اما تعداد کمی دیواره طولی هم داشتند. ابعاد کنیدی‌های بعدی ۱۲-۵ × ۲۵-۷ میکرومتر بود و ۷-۱ (به‌طور معمول ۳) دیواره عرضی داشته و تعداد کمی دیواره طولی هم داشتند. کنیدیوم‌ها زیتونی‌رنگ، خاکستری کمرنگ یا سبز، قهوه‌ای بودند (شکل ۲-E و F). خصوصیات این گروه از قارچ‌ها با گونه *Alternaria alternata* Keissiler, Beih (Fries) مطابقت داشت (Ellis, 1971؛ Simmons, 2007).

گروه هشتم *Alternaria pellucida*: قطرپرگنه ۶ سانتی‌متر و به‌رنگ خاکستری مایل به سیاه بود و پنج جفت از حلقه‌های متحدالمرکز رشدی روی محیط کشت تشکیل شدند. کنیدیوفورها ساده یا منشعب و هریک حامل یک زنجیره ساده از ۸ تا ۱۰ کنیدیوم بودند و ابعاد کنیدیوفورها ۴-۳ × ۷۰-۶۰ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها تخم‌مرغی شکل تا بیضوی شکل و اغلب فاقد نوک (منقار) بودند. سلول راسی کنیدیوم‌ها گرد یا مخروطی بود. هریک از کنیدیوم‌ها، یک مکان اسپورزایی راسی یا کنیدیوفور راسی کوتاهی تولید نمود. ابعاد کنیدیوم‌ها ۱۲-۱۰ × ۴۰-۳۰ میکرومتر بود. بزرگ‌ترین کنیدیوم‌ها ۷-۵ دیواره عرضی و ۲-۱ دیواره طولی داشتند (شکل ۲-G و H). مشخصات این گروه از قارچ‌ها با گونه *Alternaria pellucida* Simmons مطابقت داشت (Simmons, 2007).

مطالعات بیماری‌زایی

همه جدایه‌های قارچی پس از شناسایی مقدماتی در حد جنس، برای مطالعات بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند و بیماری‌زایی همه جدایه‌های *Bipolaris* spp. در گیاه برنج اثبات گردید. از میان جدایه‌های آلترناریا، جدایه‌هایی که روی برنج بیماری‌زا نبودند برای مطالعات کنترل بیولوژیک انتخاب گردیدند. لازم به ذکر است، بیماری‌زایی قارچ‌های شناسایی شده طبق اصول که به اثبات رسید و پاتوژن‌های جدا شده در این مرحله با پاتوژن‌های اولیه مطابقت داده شد و یکسان بودن آن‌ها به اثبات رسید.

1- Body cells



شکل ۲- A: پرگنه *A. infectoria* روی محیط کشت PDA، B: کنیدیوم‌ها و کنیدیوفورهای *A. infectoria* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر، C: پرگنه *A. franseriae* روی محیط کشت PDA، D: کنیدیوم‌ها و کنیدیوفورهای *A. franseriae* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر، E: پرگنه قارچ *A. alternata* روی محیط کشت PDA، F: کنیدیوم‌های *A. alternata* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر، G: پرگنه *A. pellucida* روی محیط کشت PDA، H: کنیدیوم‌های *A. pellucida* با بزرگنمایی ۱۲۰۰ برابر

Figure 2. A: Colony of *A. infectoria* on PDA, B: Conidia and conidiophores of *A. infectoria* (× 1200), C: Colony of *A. franseriae* on PDA, D: Conidia and conidiophores of *A. franseriae* (× 1200), E: Colony of *A. alternata* on PDA, F: Conidia of *A. alternata* (× 1200), G: Colony of *A. pellucida* on PDA, H: Conidia of *A. pellucida* (× 1200)

بررسی‌های کنترل بیولوژیکی

کشت دوتایی

میانگین رشد *B. victoriae* در غیاب *A. tenuissima*، ۷۸ میلی‌متر بود (در شاهد) در حالی که میانگین رشد آن در حضور *A. tenuissima*، ۳۷ میلی‌متر بود و بدین ترتیب *A. tenuissima* باعث کاهش رشد میسلیومی *B. victoriae* به‌میزان ۵۲/۴۶ درصد گردید. میانگین رشد *B. victoriae* در غیاب *A. citri*، ۷۸ میلی‌متر بود (در شاهد) در حالی که میانگین رشد این قارچ در حضور *A. citri*، ۴۴ میلی‌متر بود و در نتیجه *A.citri* باعث کاهش رشد

میسلیومی قارچ عامل بیماری به‌میزان ۴۳/۵۸ درصد شد. میانگین رشد *B. victoriae* در غیاب *A. infectoria*، ۷۸ میلی‌متر و در حضور این قارچ، ۴۲/۶۶ میلی‌متر بود و بنابراین *A. infectoria*، ۴۵/۲۹ درصد رشد میسلیومی *B. victoriae* را کاهش داده است. میانگین رشد *B. victoriae* در غیاب *A. franseriae*، ۷۸ میلی‌متر بود (در شاهد) در حالی‌که میانگین رشد این قارچ در حضور *A. franseriae*، ۳۶/۸ میلی‌متر بود و بر این اساس *A. franseriae* باعث کاهش رشد میسلیومی *B. victoriae* به‌میزان ۵۲/ ۷۷۳ درصد گردید. میانگین رشد *B. victoriae* در غیاب *A. pellucida*، ۷۸ میلی‌متر و در حضور آن ۳۲/۳ میلی‌متر بود و در نتیجه *A. pellucida* به‌میزان ۵۹/۸۲۳ درصد باعث کاهش رشد میسلیومی *B. victoriae* گردید. میانگین رشد *B. victoriae* در غیاب *A. alternata*، ۷۸ میلی‌متر و در حضور *A. alternata*، ۳۵/۴۱ میلی‌متر بود و بنابراین این گونه از آلترناریا باعث کاهش رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری به‌میزان ۵۴/۵۲ درصد گردید.

با توجه به نتایج حاصل از کشت دوتایی و درصد مهار محاسبه شده، از میان جدایه‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب جدایه‌های *A. pellucida*، *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. tenuissima*، *Alternaria infectoria* و *A. citri* دارای بیشترین درصد مهار میسلیومی در مقابل قارچ عامل بیماری بودند.

بر اساس جدول تجزیه واریانس درصد مهار در کشت دوتایی مشخص گردید که در سطح احتمال ۱درصد اختلاف معنی‌داری بین قارچ‌ها از نظر درصد مهار وجود داشت (جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های درصد مهار به روش حداکثر اختلاف معنی‌دار (LSD)، بیشترین مقدار درصد مهار مربوط به کنترل با *A. pellucida* بود که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین درصد مهار نیز مربوط به کنترل با *A. citri* بود که با تیمار *A. infectoria* اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین بین کنترل با این دو قارچ و کنترل با *A. alternata*، *A. franseriae* و *A. tenuissima* اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ اما بین سه قارچ اخیر از نظر کاهش رشد میسلیومی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین کنترل با دو قارچ *A. pellucida* و *A. alternata* بهترین نتایج را در برداشت و در مقایسه با سایر قارچ‌ها این دو قارچ کارآیی بهتری داشتند (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد مهار رشد میسلیومی

Table 1. Analysis of variance of inhibition percentage of mycelial growth

Source of variation	df	Squares of means
Treatment	5	109.26**
Error	12	3.016
Coefficient of variations	-	3.37

** Significant at P<0.01.

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های بازدارندگی رشد با استفاده از حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در روش کشت دوتایی

Table 2. Comparison of means of growth inhibition by Least Significant Difference (LSD) in dual culture method

Treatment	Growth inhibition (%)
A. pellucida	59.823±2.31[a]
A. alternata	54.523±2.54[b]
A. franseriae	52.773±2.89[b]
A. tenuissima	52.460±3.46[b]
A. infectoria	45.293±1.15[c]
A. citri	43.583±2.54[c]
LSD 5%	3.08

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P<0.05.

مطالعه بازدارندگی رشد *B. victoriae* با استفاده از عصاره کشت

بر اساس این روش آزمایشگاهی مشخص گردید که *A. pellucida* با ۶۱/۷ درصد بیشترین بازدارندگی در رشد پرگنه *B. victoriae* را نشان داد. پس از این قارچ به‌ترتیب *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. tenuissima*، *Alternaria infectoria* و *A. citri* در رتبه‌های بعدی کارآیی در کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج قرار گرفتند (جدول ۳).

مطالعه کشت متقابل گونه‌های مختلف آلترناریا و *B. victoriae* به روش کشت اسلاید

ریسه‌های هر شش گونه آلترناریای به‌کار رفته در این آزمایش، پس از رسیدن به ریسه‌های *B. victoriae* و نفوذ در آن‌ها، باعث ازهم‌گسیختگی ریسه‌های قارچ و تغییر شکل آن‌ها شدند که شدت این تغییرات در *A. pellucida*، بیشتر به نظر می‌رسید.

مطالعه اثر متابولیت‌های فرار در بازدارندگی رشد *B. victoriae*

بر اساس نتایج، *A. pellucida* با ۶۵/۶۳ درصد بیشترین بازدارندگی در رشد میسلیومی *B. victoriae* را نشان داد. پس از این قارچ به‌ترتیب جدایه‌های *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. tenuissima*، *Alternaria infectoria* و *A. citri* از نظر کاهش رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج، در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۴).

مطالعات گلخانه‌ای

در ارزیابی خواص آنتاگونیستی گونه‌های مختلف آلترناریا در مقابل *B victoriae*، در گیاهان شاهدی که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. همچنین در همه گیاهانی که با *B. victoriae* به تنهایی و *B. victoriae* به همراه یکی از گونه‌های آلترناریای به‌کار رفته در این تحقیق، مایه‌زنی شده بودند اولین علائم ۴ روز پس از تلقیح ظاهر شدند و میانگین شدت بیماری در هنگام مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، بین ۵/۰۳ تا ۵/۸۴ بود.

در گیاهانی که با *B. victoriae* و *A. tenuissima* همراه با هم مایه‌زنی شده بودند، میانگین شدت بیماری ۶/۹ بود. با توجه به نتایج بالا مشخص گردید که استفاده از این قارچ نه تنها تأثیری در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای نداشته بلکه باعث افزایش شدت بیماری به میزان ۱۸/۱۵ درصد نسبت به شاهد نیز شده است. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *A. citri* همراه با هم مایه‌زنی شده بودند، میانگین شدت بیماری ۴/۴۹ بود که نشان‌دهنده این مطلب بود که استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری ایجادشده به‌وسیله *B. victoriae* به میزان ۲۲/۸۵ درصد نسبت به شاهد شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های بازدارندگی رشد با استفاده از حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در روش عصاره کشت

Table 3. Comparison of means of growth inhibition by Least Significant Difference (LSD) in culture filtrate method

Treatment	Growth inhibition (%)
A. pellucida	61.723±2.75[a]
A. alternata	56.452±2.76[b]
A. franseriae	54.653±1.73[b]
A. tenuissima	54.230±1.15[b]
A. infectoria	47.539±1.54[c]
A. citri	45.628±2.49[c]
LSD 5%	4.26

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P<0.05.

جدول ٤- مقایسه میانگین‌های بازدارندگی رشد با استفاده از حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در روش متابولیت‌های فرار

Table 4. Comparison of means of growth inhibition by Least Significant Difference (LSD) in volatile metabolites method

Treatment	Growth inhibition (%)
A. pellucida	65.631±1.15[a]
A. alternata	60.329±1.73[b]
A. franseriae	58.627±2.31[b]
A. tenuissima	57.291±1.92[b]
A. infectoria	50.359±2.89[c]
A. citri	48.862±2.53[c]
LSD 5%	6.37

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P<0.05.

در گیاهانی که با *B. victoriae* و *A. infectoria* همراه با هم مایه‌زنی شده بودند، میانگین شدت بیماری ۴/۰۲ بود که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *B. victoriae* به میزان ۲۰/۰۸ درصد نسبت به شاهد شده است. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *A. franseriae* همراه با هم مایه‌زنی شده بودند، میانگین شدت بیماری ۳/۵۸ بود که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری به میزان ۲۸/۸۲ درصد نسبت به شاهد شده است.

در گیاهانی که با *B. victoriae* و *A. alternata* همراه با هم مایه‌زنی شده بودند میانگین شدت بیماری ۳/۴۱ بود که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *B. victoriae* به میزان ۳۲/۲۰ درصد نسبت به شاهد شده است. در گیاهانی که با *B. victoriae* و *A. pellucida* همراه با هم مایه‌زنی شده بودند میانگین شدت بیماری ۳/۰۸ بود که نشان می‌دهد استفاده از این قارچ باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *B. victoriae* به میزان ۳۸/۷۶ درصد نسبت به شاهد شده است.

بر اساس نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و محاسبه درصد کاهش شدت بیماری، مشخص گردید که از میان گونه‌های آلترناریای مورد مطالعه در این تحقیق، *A. pellucida* مؤثرترین گونه در کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *B. victoriae* بود و پس از آن به‌ترتیب جدایه‌های *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. citri* و *A. infectoria* قرار داشتند. اما جدایه *A. tenuissima* نه تنها تأثیری در کاهش شدت بیماری در گلخانه نداشت بلکه باعث افزایش شدت بیماری شد.

بر اساس جدول تجزیه واریانس شدت بیماری مشخص گردید که در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری بین قارچ‌ها از نظر شدت بیماری وجود داشت (جدول ۵).

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های شدت بیماری به روش حداکثر اختلاف معنی‌دار (LSD)، کمترین شدت بیماری ایجاد شده مربوط به کنترل با استفاده از *A. pellucida* بود که با تیمارهای *A. infectoria*، *A. franseriae* و *A. alternata* اختلاف معنی‌داری نداشت و بیشترین شدت بیماری ایجاد شده مربوط به کنترل با استفاده از *A. tenuissima* بود که با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. اما بین کنترل با استفاده از *A. infectoria*، *A. franseriae* و *A. alternata* اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین کنترل با استفاده از *A. Pellucida* بهترین نتایج را در برداشت و در مقایسه با سایر قارچ‌ها کارآیی آن بیشتر بود (جدول ۶).

در این تحقیق، از مجموع ۲۵۶ نمونه آلوده جمع‌آوری شده از مزارع برنج استان گیلان، ۱۳۵ جدایه قارچی جداسازی گردید و برای این منظور از محیط‌های کشت سیب‌زمینی، دکستروز-آگار و آب-آگار استفاده شد. اساس شناسایی، خصوصیات مورفولوژیکی هم‌چون شکل

پرگنه، رنگ پرگنه، رنگ و اندازه کنیدی‌ها و کنیدیوفورها، منفرد یا گروهی بودن کنیدیوفور، تعداد دیواره‌های عرضی کنیدی‌ها و دیگر مشخصات مورفولوژیکی بود. بر اساس نتایج، قارچ‌های جدا شده به *Bipolaris oryzae*، *Bipolaris victoriae*، *Alternaria tenuissima*، *Alternaria infectoria*، *Alternaria citri*، *Alternaria alternata*، *Alternaria franseriae* و *Alternaria pellucida* تعلق داشتند. در بین جدایه‌های قارچی مزبور *B. victoriae* با ۶۰ جدایه از بیشترین فراوانی برخوردار بود (۴/۴۴ درصد) و پس از آن به‌ترتیب *A. tenuissima*، با ۱۵ جدایه، *A. pellucida* با ۱۳ جدایه، *A. franseriae* با ۱۲ جدایه، *A. alternata* با ۱۱ جدایه، *B. oryzae* با ۱۰ جدایه، *A. infectoria*، با ۸ جدایه و *A. citri* با ۶ جدایه قرار داشتند. برای آزمایش‌های کنترل زیستی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج، از گونه *B. victoriae* که گونه غالب عامل بیماری در استان گیلان بود، استفاده شد.

در روش‌های آزمایشگاهی استفاده شده در این تحقیق، مؤثرترین قارچ‌های به‌کار رفته *A. pellucida* و *A. alternata* بودند پس از این دو گونه، به‌ترتیب گونه‌های *Alternaria franseriae*، *Alternaria tenuissima*، *Alternaria infectoria* و *Alternaria citri* قرارداشتند.

گونه‌های آلترناریای به‌کار رفته در روش‌های آزمایشگاهی، بیشترین بازدارندگی را در روش متابولیت‌های فرار از خود نشان دادند و پس از این روش، به‌ترتیب در دو روش عصاره کشت و کشت دوتایی کارآیی خود را نشان دادند.

در مطالعات آزمایشگاهی از روش کشت دوتایی استفاده گردید که براساس نتایج از میان جدایه‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب جدایه‌های *A. pellucida*، *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. tenuissima*، *Alternaria infectoria* و *A. citri* دارای بیشترین درصد مهار میسلیومی در مقابل جدایه‌های *B. victoriae* بودند که این امر با مطالعه Mohammadian (2013) مطابقت داشت که بر اساس آن، در میان گونه‌های مورد مطالعه آلترناریا، به‌ترتیب *A. tenuissima*، *Alternaria infectoria* و *A. citri* دارای بیشترین درصد بازدارندگی در رشد میسلیومی *Bipolaris* spp. بودند.

جدول ۵- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی شدت بیماری

Table 5. Analysis of variance of inhibition percentage of disease rating

Source of variation	df	Squares of means
Treatment	5	5.78**
Error	12	0.060
Coefficient of variations	-	18.31

** Significant at P<0.01

جدول ٦- مقایسه میانگین‌های شدت بیماری به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)

Table 6. Comparison of mean disease rating by Least Significant Difference (LSD)

Treatment	Disease rating
A. tenuissima	6.900±0.65[a]
A. citri	4.493±0.58[b]
A. infectoria	4.020±1.15[bc]
A. franseriae	3.583±0.76[bc]
A. alternata	3.416±1.43[bc]
A. pellucida	3.083±0.48[c]
LSD 5%	1.38

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P<0.05.

در این تحقیق بر اساس نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای و محاسبه درصد کاهش شدت بیماری، مشخص گردید که از میان گونه‌های آلترناریای مورد مطالعه، *A. pellucida* مؤثرترین گونه در کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *B. victoriae* بود و پس از آن به‌ترتیب جدایه‌های *A. alternata*، *A. franseriae*، *A. citri* و *A. infectoria* قرار داشتند؛ اما جدایه *A. tenuissima* نه تنها تأثیری در کاهش شدت بیماری در گلخانه نداشت بلکه باعث افزایش شدت بیماری شد که این ارزیابی هم با مطالعه Mohammadian (2013) مطابقت داشت که بر اساس تحقیق مزبور، جدایه‌های *A. citri* و *A. infectoria* در کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گلخانه مؤثر بودند اما *A. tenuissima* باعث افزایش شدت بیماری گردید.

بین مطالعات کشت دوتایی و گلخانه‌ای در مورد گونه‌های *A. pellucida*، *A. alternata* و *A. franseriae* همبستگی مشاهده گردید به این معنی که در مورد این گونه‌ها بین میزان درصد بازدارندگی در آزمایشگاه و کاهش شدت بیماری در گلخانه ارتباط مستقیم وجود داشت. اما در مورد گونه‌های *A. citri* و *A. infectoria* این همبستگی وجود نداشت به‌طوری‌که تأثیر *A. infectoria* در کاهش درصد بازدارندگی رشد میسلیومی و تأثیر *A. citri* در کاهش شدت بیماری بیشتر بود و این یافته نیز با نتایج بررسی Mohammadian (2013) منطبق بود.

گونه‌های آلترناریا عموماً به‌عنوان قارچ‌های ساپروفیت شناخته می‌شوند اگرچه برخی از آن‌ها در برخی از گیاهان بیماری‌زا هستند (Guo et al., 2004؛ Thomma, 2003) برخی از این قارچ‌ها در کنار ماهیت بیماری‌زایی، در گیاهان اندوفیت هستند (Sing et al., 2014). برخی از گونه‌های آلترناریا به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی علف‌های هرز معرفی شده‌اند، چنان‌که *A. pellucida*، به‌عنوان عامل کنترل زیستی در علف‌های هرزی هم‌چون تیرکمان آبی، سوروف و قاشق‌واش معرفی شده است (Safari Motlagh, 2011). نتایج تحقیق مزبور نشان داد که *A. pellucida*، کاهش معنی‌داری در ارتفاع، وزن خشک و وزن تر این علف‌های هرز ایجاد کرده و نیز شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله این گونه از آلترناریا در این علف‌های هرز بالا بود در حالی‌که در برنج خسارت معنی‌داری ایجاد نکرد (Safari Motlagh, 2011).

گونه‌های مختلف آلترناریا متابولیت‌های ثانویه متعددی از جمله توکسین‌ها را تولید می‌کنند که ممکن است در بیوکنترل علف‌های هرز مؤثر باشند (Chen et al., 2005). برای مثال توکسین مترشحه از *A. alternata* f.sp. *lycopersici* برای کنترل علف هرز تاتوره (*Datura stramonium*) و تاج‌ریزی (*Solanum nigrum*) به‌کار رفت (Abbas *et al.*, 1993). به‌علاوه توکسین‌های آلترناریا برای غربال‌گری ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم به بیماری‌ها به‌کار رفته‌اند (Beresteskiy, 2008؛ Svabova and Lebeda, 2005).

خاصیت علف‌کشی توکسین‌های *A. alternata* در علف‌های هرز مختلفی مثل سوروف و تاج‌خروس به اثبات رسیده است (Qiang et al., 2010). توکسین‌های آلترناریا ممکن است در کنترل زیستی قارچ‌ها از توانایی خوبی برخوردار باشند (Chelkowski and Visconti, 1992).

در مطالعه دیگری مشخص گردید که تیمار قبلی گوجه فرنگی با استرین غیربیماری‌زایی از *A. alternata* یا تیمار با یک محرک به‌دست آمده از این استرین، علائم ایجاد شده به‌وسیله استرین بیماری‌زای این قارچ را کاهش داد (Egusa et al., 2008). در یک ارزیابی دیگر *A. alternata* به‌عنوان عامل مرگ بافت در علف هرز سنبل آبی معرفی گردید و مشخص شد که ظرفیت کلروفیل در برگ‌های آلوده در مقایسه با برگ‌های سالم کاهش یافت (El-Morsy, 2004).

در مطالعات دیگری گونه‌های مختلف آلترناریا به‌عنوان عامل بیوکنترل در علف‌های هرزی هم‌چون *Anoda cristata* (Walker and Sciumbato, 1979)،

Crassia obtusifolia (Van Dyke and Trigiano, 1987؛ Walker and Boyette, 1985؛ Walker and Joe, 1982) و *Eichhornia crassipes* (Shabana et al., 1997) معرفی شده‌اند.

مطالعه دیگری نشان داد که گونه‌هایی از آلترناریا به‌ویژه *A. alternata* می‌توانند در کنترل زیستی حشراتی هم‌چون *Zyginidia pullula* مؤثر باشند (Ozino, 1982). در یک ارزیابی دیگر مشخص گردید که *A. infectoria* یک عامل بالقوه در کنترل بیولوژیکی حشره *Ceroplastes rusci* است و باعث مرگ و میر تخم‌ها، پوره‌ها و حشرات بالغ گردید (Shabana and Ragab, 1997).

در تحقیق دیگری، غربال‌گری، شناسایی و ارزیابی پتانسیل کنترل زیستی قارچ‌هایی هم‌چون *Alternaria longipes*، *Epicoccum nigrum*، *Phomopsis* sp. و *Trichoderma atroviride* در مقابل *Rhizoctonia solani* انجام شد و مشخص گردید که بالاترین بازدارندگی با به‌کارگیری *T. atroviride* به‌دست آمد و *A. longipes* متابولیت‌های ثانویه تولید کرد (Lahlali and Hijri, 2010). نتایج تحقیق فوق همچنین نشانگر بازدارندگی در رشد *R. solani* در کشت دوتایی از طریق به کارگیری *A. longipes* بود و در مطالعات گلخانه‌ای نیز مشخص گردید که *A. longipes* باعث کاهش شاخص بیماری روی غده‌های سیب‌زمینی گردید (Lahlali and Hijri, 2010) که این امر با نتایج این تحقیق در مورد توانایی گونه‌های غیربیماری‌زای آلترناریا در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری‌زا و کاهش شدت بیماری آن در گلخانه در انطباق است. همچنین در مطالعه دیگری مشخص گردید که توکسین تولیدی به‌وسیله *A. alternata* باعث القای مقاومت در گیاه رز نسبت به شته‌ها گردید (Yang et al., 2012).

دما و pH دو عامل کلیدی مؤثر در رشد، اسپورزایی، توانایی ساپروفیتی، تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار، رقابت برای غذا، مایکوپارازیتیسم و تولید آنزیم‌های خارج سلولی متلاشی‌کننده دیواره قارچ‌ها هستند (Kredics et al., 2003). اثبات شده است 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 نیز علاوه بر فاکتورهای دیگر مانند روش و زمان استفاده ممکن است روی کارآیی کنترل بیولوژیک جدایه‌های قارچی آنتاگونیست تأثیر بگذارند (Akrami et al., 2011). درجه مؤثر بودن بر اساس ماهیت، کیفیت، میزان آنتی‌بیوتیک و میزان مواد مهارکننده ترشح‌شده به‌وسیله آنتاگونیست‌ها، متفاوت است (Dennis and Webster, 1971c؛ Skidmore and Dickinson, 1976). از این‌رو این عوامل می‌توانند روی درجه فعالیت آنتاگونیستی گونه‌های مختلف آلترناریا تأثیر بگذارند و یکی از دلایلی که گونه‌هایی مانند *A. tenuissima* در شرایط آزمایشگاهی در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج مؤثر بود اما در کاهش شدت بیماری در گلخانه تأثیری نداشت می‌تواند به‌دلیل همین تأثیر عوامل محیطی مختلف بر فعالیت بیولوژیکی قارچ‌های آنتاگونیست باشد.

همچنین نوع مایه تلقیح و غلظت آن نیز در فعالیت آنتاگونیستی قارچ‌ها مؤثر است، چنان‌که Verma et al. (2007) گزارش نمودند که گونه‌هایی از *Trichoderma* وقتی به‌صورت اسپور به کار برده شوند که به شرایط ناسازگار محیطی در مزرعه مقاومند، بسیار مؤثرترند تا زمانی که به‌صورت فرم‌های میسلیومی و کلامیدوسپور به‌عنوان پروپاگول (زادمایه) به کار برده شوند. در تحقیق حاضر هم افزایش غلظت اسپورهای قارچ‌های به‌کار رفته در بررسی‌های آنتاگونیستی ممکن است در فعالیت بیولوژیکی آن‌ها مؤثر باشد.

Balkeman and Fokkema (1982) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که سطوح بخش‌های هوایی گیاهان، زیستگاهی برای میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت فراهم می‌کند که بسیاری از آن‌ها قادرند رشد پاتوژن‌ها

را تحت تأثیر قرار دهند که این امر با یافته‌های تحقیق حاضر سازگار است.

همچنین کارآیی گونه‌های آلترناریا در کنترل بیماری فوزاریومی خوشه گندم در مطالعه انجام شده به‌وسیله Musyimi et al. (2012) ثابت شده که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. این محققان به این نتیجه رسیدند که جدایه‌هایی از گونه‌های مختلف آلترناریا در مقابل قارچ عامل بیماری سوختگی خوشه گندم یعنی *Fusarium graminearum* خواص آنتاگونیستی از خود نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق در دو بخش آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشانگر این مطلب بود که *A. pellucida* مؤثرترین گونه آلترناریا در کنترل بیولوژیکی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج بود و پس از آن به‌ترتیب جدایه‌های *A. alternata* و *A. franseriae* قرار گرفتند.

مطالعه حاضر نشان داد که قارچ‌هایی مانند گونه‌های مختلف آلترناریا در فلور طبیعی گیاه برنج وجود دارند که خواص بالقوه‌ای برای کنترل بیولوژیکی قارچ عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج از خود نشان می‌دهند. شناسایی این قارچ‌ها و مطالعه آن‌ها در سطوح مختلف آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌تواند نویدبخش یافتن روش‌های جدیدی در مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای برنج باشد.

سپاس‌گزاری

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

REFERENCES

Abbas, H.K., Vesonder, R.F., Boyette, C.D., and Peterson, S.W. 1993. Phytotoxicity of AAL-toxin and other compounds produced by *Alternaria alternata* to jimsonweed (*Datura stramonium*). Canadian Journal of Botany, 71: 155-160.

Akrami, M., Golzary, H., and Ahmadzadeh, M. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. African Journal of Biotechnology, 10: 2653-2658.

Balkeman, J.P., and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology, 20: 167-192.

Berestetskiy, A.O. 2008. A review of fungal phytotoxins from basic studies to practical use. Applied Biochemistry and Microbiology, 44: 453-465.

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

Chelkowski, J., and Visconti, A. 1992. *Alternaria:* Biology, Plant Diseases and Metabolites. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

Chen, S., Dai, X., Qiang, S., and Tang, Y. 2005. Effect of a nonhost-selective toxin from *Alternaria alternata* on chloroplast-electron transfer activity in *Eupatorium adenophorum*. Plant Pathology, 54: 671-677.

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

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

Dennis, C., and Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society, 57: 363-369.

Egusa, M., Akamatsu, H., Tsuge, T., Otani, H., and Kodama, M. 2008. Induced resistance in tomato plants to the toxin-dependent necrotrophic pathogen *Alternaria alternata*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 73: 67-77.

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

El-Morsy, E.M. 2004. Evaluation of microfungi for the biological control of water hyacinth in Egypt. Fungal Diversity, 16: 35-51.

Guo, L.D., Xu, L., Zheng W.H., and Hyde, K.D. 2004. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). Fungal Diversity, 16: 53-65.

Hammed, K.M., Sadoun I.M., and Alshya, B.Z. 2002. Potential biological control of Orbanche by fungi. Plant Pathology, 4: 189-195.

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

Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S., and Khosravi, V. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. Brazilian Journal of Microbiology, 43: 297-305.

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

Lahlali, R., and Hijri, M. 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. FEMS Microbiology Letter, 311(2): 152-159.

McSpadden, G.B.B., and Fravel, D.R. 2002. Biological control of plant pathogens, Reaearch, Commercialization and Application in the USA. Plant Health Progress.

Mohammadian, S. 2013. Biological control of *Bipolaris* spp., the causal agent of brown spot disease of rice by some antagonistic fungi in Guilan province. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Guilan, Rasht, Iran.

Musyimi, S.L., Muthomi, J.W., Narla, R.D., and Wagacha, J.M. 2012. Efficacy of biological control and cultivar resistance on *Fusarium* head blight and T-2 toxin contamination in wheat. American Journal of Plant Sciences, 3: 599-607.

Ou, S.H. 1985. Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute, (2nd ed). Commonwealth Mycological Institute, Kew. P. 380.

Ozino, M. 1982. Preliminary researches on Hyphomycetes isolated from *Zyginidia pullula*. Allionia (Turin), 25: 101-104.

Padmanabhan, S.Y. 1973. The great Bengal famine. Annual Review of Phytopathology, 11: 11-24.

Qiang, S., Wang, L., Wei, R., Zhou, B., Chen, S., Zhu, Y., Dong, Y., and An, C. 2010. Bioassay of the herbicidal activity of AAC-toxin produced by *Alternaria alternata* isolated from *Ageratina adenophora*. Weed Technology, 24: 197-201.

Safari Motlagh, M.R. 2011. Reaction of major weeds and some rice cultivars to *Alternaria pellucida*, a potential biocontrol agent. Plant Omics, 4: 163-168.

Safari Motlagh, M.R., and Kaviani, B. 2008. Characterization of new *Bipolaris* species: the causal agent of rice brown spot disease in the north of Iran. International Journal of Agriculture and Biology, 10: 638-642.

Safari Motlagh, M.R., Padasht Dehkaee, F., and 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: 171-182. (In Farsi with English abstract).

Shabana, Y.M., and Ragab, M.E. 1997. *Alternaria infectoria*, a promising biological control agent for the fig wax scale, *Ceroplastes rusci* (Homoptera: Coccidae) in Egypt. Biocontrol Science and Technology, 7: 553-564.

Shabana, Y.M., Baka, Z.A.M., and Abdel-Fattah, G.M. 1997. *Alternaria eichhorniae*, a biological control agent for waterhyacinth: mycoherbicidal formulation and physiological and ultrastructural host responses. European Journal of Plant Pathology, 103: 99-111.

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

Simmons, E.G., and Roberts, R.G. 1993. *Altrnaria* themes and variations. Mycotaxon, 48: 109-140.

Singh, B., Bhagat, J., Chadha B.S., and Kaur, A. 2014. Cholinesterase inhibitory potential of different *Alternaria* spp. and their phylogenetic relationships. Biologia, 69: 10-14.

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R.S., Wijesundera, R.L.C., Marikar, F.M.T., and Abeyesekere, M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of Rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica, 28: 240-247.

Sivanesan, A. 1987. Gramainicolous species of *Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum* and their telemorphs. CAB International Mycological Institute, 158: 1-261.

Skidmore, A.M., and Dickinson, C.H. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society, 66: 57-64.

Soltani Nejad, M., Shahidi Bonjar, G.H., and Padasht Dehkaei, F. 2014. Control of *Bipolaris oryzae*, the causal agent of rice brown spot disease via soil *Streptomyces* sp.

isolate G. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 4: 310-317.

Svabova, L., and Lebeda, A. 2005. In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. Journal of Phytopathology, 153: 52-64.

Thomma, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology, 4: 225-236.

Van Dyke, C.G., and Trigiano, R.N. 1987. Light and scanning electron microscopy of the interaction of the biocontrol fungus *Alternaria cassiae* with sicklepod (*Cassia obtusifolia*). Canadian Journal of Plant Pathology, 9: 230-235.

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

Walker, H.L., and Boyette, C.D. 1985. Biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) in soybeans (*Glycine max*) with *Alternaria cassiae*. Weed Science, 33: 212-215.

Walker, H.L., and Joe, A. 1982. Evaluation of *Alternaria cassiae* for the biocontrol of sicklepod (*Cassia obtusifolia*). Weed Science, 30: 651-654.

Walker, H.L., and Sciumbato, G.L. 1979. Evaluation of *Alternaria macrospora* as a potential biocontrol agent for spurred anoda (*Anoda cristata*): Host Range Studies. Weed Science, 27: 612-614.

Yang, F., Li, L., and Yang, B. 2012. *Alternaria* toxin-induced resistance against rose aphids and olfactory response of aphids to toxin-induced volatiles of rose plants. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology), 13: 126-135.

Biological control of *Bipolaris victoriae*, the causal agent of brown spot disease of rice by *Alternaria* spp. in Guilan province

M.R. Safari Motlagh*

***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (ssafarimotlagh@yahoo.com)

Received: 10 October 2016 Accepted: 15 September 2017

Abstract

The rice brown spot disease caused by *Bipolaris* spp., is one of the most important diseases in Iran and in the world. In this research, 135 fungal isolates were isolated from 256 collected samples in Guilan province fields. Identification was made based on morphological characteristics of fungi. According to the results, the fungal isolates belonged to: *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris victoriae*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria infectoria*, *Alternaria citri*, *Alternaria alternata*, *Alternaria franseriae* and *Alternaria pellucida*. The pathogenicity test revealed that all isolates of *B. victoriae* were pathogenic. In the laboratory, we used various methods such as dual culture, inhibition of *B. victoriae* growth by culture filtrate, dual culture of the studied antagonistic fungi and *B. victoriae* by slide culture method and effect of volatile metabolites on inhibition of growth of this fungus. Based on the results, *A. pellucida*, *A. alternata*, *A. franseriae*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* and *A. citri* had the highest percentage of mycelial growth inhibition of *B. victoriae*, respectively. In greenhouse studies, these fungi were inoculated on rice. All of the isolates, except *A. tenuissima*, effectively reduced disease rating of *B. victoriae*, and *A. pellucida* with 38.76% reduction in disease rating was the most effective antagonist in greenhouse studies. The results showed that there are avirulent isolates of *Alternaria* spp. that can be introduced as potential antagonists to control brown spot disease of rice.

Keywords: Rice Brown spot disease, Biological control, Alternaria spp.