



## بررسی اثرات کشندگی و دورکنندگی اسانس برگ بو، *Laurus nobilis* و اکالیپتوس، *Eucalyptus camaldulensis* روی شته‌ی مومی کلم، *Brevicoryne brassicae*

سیده بنت الهدی حسینی امین<sup>۱</sup>، شهرام شاهرخی<sup>۲</sup>، فرامرز علی نیا<sup>۱</sup>، محمود خسروشاهلی<sup>۱</sup>

۱- دانشکده‌ی کشاورزی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۲- موسسه‌ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: سیده بنت الهدی حسینی امین، amin\_hoda@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۰

۱-۱۱ (۱)

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۹

### چکیده

شته‌ی مومی کلم (*Brevicoryne brassicae*) از آفات مهم گیاهان خانواده‌ی چلیپاییان از جمله انواع کلم و کلزا می‌باشد. در این تحقیق، به منظور بررسی میزان تاثیر اسانس‌های گیاهی در کنترل این شته، اثر اسانس برگ دو گیاه دارویی اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) و برگ بو (*Laurus nobilis*) روی فرم بی‌بال حشرات کامل شته‌ی مذکور مورد مطالعه قرار گرفت. برای تعیین  $LC_{50}$ ، از غلظت‌های کشنده ۸۰-۲۰ درصد اسانس‌ها به روش قطره‌گذاری استفاده شد. برای این منظور، آزمایش زیست‌سنجی در پنج تکرار در شرایط دمایی  $25 \pm 1$  درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی  $60 \pm 5$  درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام شد. در هر تکرار تعداد ۱۰ حشره‌ی کامل شته‌ی مومی کلم روی یک دیسک برگ‌ی کلم درون پتری‌دیش قرار داده شد. نتایج به‌دست آمده، اثر تماسی اسانس هر دو گیاه را روی حشرات کامل شته‌ی مومی کلم نشان داد. مقدار  $LC_{50}$  جمعیت شته، برای اسانس‌های برگ بو و اکالیپتوس به ترتیب ۱۱۵۶۳ و ۱۶۸۳۵ پی‌پی‌ام به‌دست آمد که تاثیر بیشتر اسانس برگ بو را نسبت به اسانس اکالیپتوس نشان داد. اسانس این دو گیاه باعث کاهش باروری و طول عمر حشرات کامل شته‌ی مومی کلم نسبت به تیمار شاهد شدند. اسانس برگ بو در مقایسه با اسانس اکالیپتوس در کاهش صفات مذکور تاثیر بیشتری داشت. اسانس برگ بو، باروری و طول عمر حشرات کامل شته‌ی مومی کلم را به ترتیب ۴۵/۴۷ و ۳۲/۷۸ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. همچنین بررسی میزان دورکنندگی اسانس برگ بو و اکالیپتوس با استفاده از دستگاه بویایی‌سنج نشان داد که با افزایش غلظت، درصد دورکنندگی اسانس هر دو گیاه مذکور روی شته‌ی مومی کلم افزایش یافت، ولی میزان دورکنندگی اسانس برگ بو بیشتر از اسانس اکالیپتوس بود. به‌طوری که میزان دورکنندگی اسانس برگ بو ۸۶/۶۷٪ و اسانس اکالیپتوس ۱۰٪ به‌دست آمد. استخراج اسانس دو گیاه دارویی برگ بو و اکالیپتوس به‌روش تقطیر با آب و شناسایی ترکیبات آن با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی-مس اسپکترومتری (GC-MS) نیز نشان داد که 1,8-cineole (یکی از ترکیبات دارای خاصیت حشره‌کشی) بیشترین درصد ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس هر دو گیاه دارویی را تشکیل داده، به‌طوری که ۲۵/۵۰ درصد از ترکیبات اسانس برگ بو و ۳۵/۱۴ درصد از ترکیبات اسانس اکالیپتوس را به خود اختصاص داد.

**واژه‌های کلیدی:** زیست‌سنجی، اسانس، قطره‌گذاری،  $LC_{50}$ ، شته‌ی مومی کلم، گاز کروماتوگرافی-

مس اسپکترومتری

## مقدمه

در میان حشرات، شته‌ها به‌عنوان یکی از آفات مهم محصولات کشاورزی در سراسر جهان مطرح هستند و به‌دلیل مقاوم شدن به‌بسیاری از سموم شیمیایی، تاکنون از استراتژی‌های کنترلی شدیدی علیه آن‌ها استفاده شده است (Ruberson, 1999). شته‌ی مومی کلم که موضوع تحقیق حاضر می‌باشد و به‌شته‌ی کلزا نیز معروف است، به‌عنوان یکی از آفات مهم چلیپاییان، Crussiferae، در ایران و جهان شناخته شده است. این شته در تمام نواحی ایران، به‌ویژه مناطق شمالی و مرکزی انتشار دارد و از روی انواع کلم، کلزا، شلغم، تربچه و چلیپاییان وحشی گزارش شده است (Farahbakhsh, 1961).

شته‌ی مومی کلم (*Brevicoryne brassicae* L.) با حمله به برگ، ساقه و گل‌های گیاه میزبان باعث کاهش محصول یا از بین رفتن گیاه می‌شود. از طرفی عسلک ناشی از فعالیت این شته، باعث رشد قارچ‌های فومارین و کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش کیفیت محصول می‌شود (Behdad, 2002 & Khanjani, 2004). این شته در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی، ۱۵-۲۰ نسل در سال تولید می‌کند و باعث ایجاد خسارت مستقیم از طریق تغذیه از شیره گیاهی و خسارت غیرمستقیم از طریق انتقال ویروس‌های گیاهی مختلف می‌شود (Behdad, 2002 & Monfared, 2003).

از آنجا که در سال‌های اخیر برای کاهش وابستگی شدید کشور به روغن خوراکی وارداتی، توسعه کشت گیاهان روغنی از جمله کلزا در اولویت سیاست‌های وزارت جهاد کشاورزی قرار گرفته، لذا مبارزه با آفت مذکور به‌عنوان آفت مهم کلزا ضروری به‌نظر می‌رسد. هم‌اکنون برای از بین بردن این آفت، انواع حشره‌کش‌های شیمیایی در مزارع مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به این که این ترکیبات مشکلات بهداشتی و زیست محیطی زیادی را ایجاد می‌کنند،

براین اساس استفاده از روش‌های ایمن و مطمئن برای کنترل آفت ضروری است.

از اسانس‌ها به‌طور سنتی برای حفاظت از دانه‌های انباری و بقولات و برای دفع حشرات خانگی استفاده شده است (Isman, 2000). علاوه‌براین، نتایج تحقیقات اخیر در کشورهای مختلف نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی فقط دفع‌کننده آفات نیستند، بلکه اثرات حشره‌کشی آن‌ها نیز به‌صورت تماسی و تدخینی روی برخی آفات مشاهده شده است، همچنین فعالیت قارچ‌کشی آن‌ها روی برخی پاتوژن‌های مهم گیاهی گزارش شده است (Isman, 2000). از طرفی روغن‌های فرار (اسانس‌های) گیاهی به‌دلیل فرار بودن و ماندگاری بسیار کوتاه‌مدت در محیط، به‌عنوان ترکیبات زیست‌سازگار مطرح هستند، بنابراین می‌توان اسانس‌های گیاهی را به‌عنوان یکی از بهترین جایگزین‌های حشره‌کش‌های شیمیایی معرفی کرد (Isman, 2000). اثر جلب‌کنندگی اسانس برخی گیاهان نیز برای کفشدوزک‌ها که از مهم‌ترین دشمنان طبیعی شته‌ها می‌باشند، به اثبات رسیده است (Abramson et al., 2006).

محققین مختلف اثر اسانس‌های گیاهی را روی آفات مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند. Tunç & Sahinkaya (1998) سمیت تدخینی اسانس زیره سبز<sup>۱</sup>، آنیسون<sup>۲</sup>، پونه‌ی کوهی<sup>۳</sup> و اکالیپتوس را روی شته‌ی جالیز (*Aphis gossypii*) ثابت کردند. همچنین Digilio et al. (2008) سمیت تنفسی اسانس‌های گیاهی استخراج شده از ۱۲ گیاه مدیترانه‌ای را روی شته‌ی نخود (*Acyrtosiphon pisum*) و شته‌ی سبز هلو (*Myzus persicae* Sulzer.) نشان داده‌اند. Isik & Gorur (2009) اثر شته‌کشی اسانس هفت گونه گیاهی شامل یید (*Juniperus excels* M. Bieb.)، رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.)،

<sup>۱</sup> Cumin

<sup>۲</sup> Anise

<sup>۳</sup> Oregano

گلدان ها به داخل گلخانه منتقل شده و شته ها روی برگ گیاهان سالم قرار داده شدند. شته ها با استفاده از کتاب کلید شناسایی شته های ایران (Rezvani, 2001) شناسایی شدند. شته های جمع آوری شده پس از پوره زایی به منظور جلوگیری از آلودگی احتمالی کلنی شته به پارازیتوئیدها، حذف شده و پوره های گذاشته شده برای تشکیل کلنی شته استفاده شدند.

به منظور به دست آوردن حشرات کامل هم سن شته برای انجام آزمایشات زیست سنجی، از روش دیسک برگی (Sengonca & Gerlach, 1983) در شرایط دمای  $25 \pm 1$  درجه ی سلسیوس و رطوبت نسبی  $60 \pm 5$  درصد و دوره ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی استفاده شد. برای این منظور تعدادی از حشرات کامل شته از گلدان های آلوده با قلم مو برداشته شدند و به دیسک های برگ کلم که در پتری دیش هایی به قطر ۹ سانتی متر قرار داشتند، منتقل شدند. درون پتری دیش ها یک لایه پنبه ی خیس، برای حفظ رطوبت قرار داده شد، روی پنبه یک کاغذ صافی و روی آن یک دیسک برگی قرار داشت که در ناحیه ی آوند آن یک تکه پنبه ی خیس قرار می گرفت. روی هر دیسک برگی حدود ۲۰-۱۰ حشره کامل شته قرار داده شد. در وسط درب پتری ها برای تهویه، توری تعبیه شده بود. یک روز بعد، حشرات کامل شته پس از پوره زایی از روی دیسک های برگی برداشته شدند و به پوره های هم سن موجود روی دیسک های برگ اجازه داده شد، در شرایط یکسان رشد کنند. پس از ۷-۸ روز، پوره ها به حشرات کامل تبدیل شده و آزمایشات زیست سنجی روی حشرات کامل ۱-۲ روزه انجام شد.

### آزمایشات زیست سنجی

در این آزمایشات، سمیت تماسی با استفاده از روش قطره گذاری (Topical application)، مورد بررسی قرار گرفت و برای تهیه غلظت های مختلف اسانس، از محلول ۱٪ توئین ۸۰ (Tween 80) در آب استفاده شد (Lima et al., 1993).

(Miller)، آنیس (*Pimpinella anisum* L.)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)، *Juglans regia* L. و برگ بو (*Laurus nobilis* L.) را روی شته ی مومی کلم گزارش کرده اند.

با توجه به این که در ایران اطلاعات چندانی در رابطه با اثر کشندگی و دور کنندگی اسانس برگ بو و اکالیتوس روی شته ی مومی کلم وجود ندارد، لذا این تحقیق با هدف بررسی تاثیر اسانس برگ بو و اکالیتوس روی فرم بی بال شته ی مومی کلم انجام شد.

### مواد و روش های پژوهش

#### جمع آوری گیاهان و تهیه اسانس

برگ های گیاه برگ بو از باغ گیاهان موسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور و برگ اکالیتوس از فضای سبز شهری منطقه ی ۱۶ تهران در مرداد ماه ۱۳۸۹ جمع آوری و در شرایط سایه و دمای اتاق و با تهویه ی مناسب خشک شدند. برای تهیه ی اسانس، هر بار ۸۰ گرم از برگ های خشک و خرد شده، همراه با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با کمک دستگاه Clevenger در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. اسانس جمع آوری شده با کمک سولفات سدیم آب گیری شد و تا زمان استفاده در ظروف تیره ی شیشه ای دربسته در دمای ۴ درجه ی سلسیوس نگهداری شد.

#### پرورش گیاه میزبان آفت

بذر کلم *Brassica oleracea* L. ابتدا در کوکویت کاشته شد و سپس نشاء چهار برگی (حدود ۲-۳ هفته پس از کاشت بذر) به گلدان های پلاستیکی حاوی خاک سبک باغچه منتقل شد. گلدان ها هر دو روز یک بار آبیاری شدند.

#### جمع آوری شته ی مومی کلم

برای جمع آوری شته ی مومی کلم، در خرداد ماه سال ۱۳۸۹ چند گلدان حاوی بوته های گل کلم به عنوان گیاه تله در فضای باز خارج از گلخانه قرار داده شد. پس از جلب شدن شته های مومی به برگ های کلم،

استفاده شد. همچنین برای نرمال سازی داده ها از تبدیل آن ها به  $\sqrt{(x+10)}$  استفاده شد. رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2003 انجام شد.

### اثر دورکنندگی اسانس ها

جهت بررسی میزان دورکنندگی اسانس برگ بو و اکالیپتوس، از دستگاه بویایی سنج (Olfactometer) مدل RZR استفاده شد، (Rafiei Karahroodi et al., 2008). این دستگاه به صورت لوله ای Y شکل می باشد که در یک طرف، حشره ی کامل و در دو بازوی مجاور آن میزبان های گیاهی سالم (بدون اسانس) و آغشته به اسانس قرار داده می شوند. برای انجام آزمایش، دستگاه بویایی سنج حدود ۱۵ دقیقه قبل از شروع آزمایش روشن شد تا هوا پس از عبور از ذغال فعال و تصفیه شدن، وارد دستگاه بویایی سنج شود. از یک تکه برگ تازه کلم به ابعاد  $3 \times 3$  سانتی متر به عنوان منبع غذایی استفاده شد. به منظور یافتن حداقل ۵۰٪ دورکنندگی، ابتدا میزان دورکنندگی غلظت  $LC_{50}$  هر دو اسانس مورد آزمایش قرار گرفت و سپس بر حسب نتیجه ی به دست آمده، غلظت های دیگر هر یک از اسانس ها انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت.

برای آلوده سازی میزبان گیاهی شته به اسانس، برگ کلم پس از غوطه ور شدن در امولسیون تهیه شده با غلظت های انتخاب شده ی اسانس، در بازوی مخصوص خود قرار داده شد. همچنین در بازوی شاهد، برگ کلم آغشته به توئین ۸۰ و آب، به نسبت ۱٪ قرار داده شد. حشرات مورد آزمایش به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگه داشته شدند و رهاسازی حشرات کامل شته ی مومی کلم به صورت انفرادی و در ۳۰ تکرار صورت گرفت و پس از ۱۰ دقیقه وضعیت استقرار هر حشره ثبت شد. درصد دورکنندگی اسانس طبق فرمول زیر محاسبه شد (Liu et al., 2006).

$$R = \frac{C - E}{T} \times 100$$

به منظور به دست آوردن میزان  $LC_{50}$  اسانس برگ بو و اکالیپتوس، پس از انجام آزمایشات مقدماتی با استفاده از غلظت های مختلف، اثر غلظت های کشنده ی حدود ۸۰-۲۰ درصد اسانس ها روی حشرات کامل بی بال شته ی مومی کلم مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب غلظت های ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۶۰۰۰، ۸۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۴۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۱۸۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ پی پی ام اسانس برگ بو و غلظت های ۶۰۰۰، ۷۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۲۰۰۰، ۱۴۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۱۸۰۰۰، ۲۰۰۰۰، ۲۳۰۰۰، ۲۶۰۰۰، ۲۸۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ پی پی ام اسانس اکالیپتوس مورد آزمایش قرار گرفت. در تیمار شاهد از محلول ۱٪ توئین در آب استفاده شد. اسانس ها قبل از استفاده، به خوبی با شیکر به هم زده می شد تا کاملاً یکنواخت شود. آزمایش در ۵ تکرار انجام شد و هر تکرار شامل یک دیسک برگه ی ۱۰ حشره ی کامل شته بود. در پشت شکم هر کدام از شته های کامل با سمپلر، یک قطره ی یک میکرولیتری از اسانس ها قرار داده شد. درصد تلفات شته در هر کدام از غلظت های مورد بررسی پس از ۳ ساعت، یادداشت شد. تخمین  $LC_{50}$  با استفاده از برنامه ی پروبیت از نرم افزار SAS (ver.6.12)، برای هر کدام از اسانس ها انجام شد.

### اثر اسانس ها بر باروری و طول عمر شته

به منظور بررسی اثر اسانس ها روی باروری و طول عمر شته ی مومی کلم، شته های زنده مانده پس از تیمار با اسانس دو گیاه برگ بو و اکالیپتوس در غلظت  $LC_{50}$ ، روی دیسک های برگ کلم قرار داده شده و تعداد پوره های گذاشته شده توسط هر شته و تلفات به صورت روزانه تا زمان مرگ شته ها ثبت شد. بدین ترتیب میانگین باروری و طول عمر شته های تیمار شده با شاهد مقایسه شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده های به دست آمده به صورت طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS (ver.6.12) انجام شد و برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪

انجام شد. محاسبات کمی به روش نرمال کردن سطح طیف (غلظت هر ترکیب برابر است با سطح پیک مربوط به آن ترکیب تقسیم بر مجموع متناظر با ترکیبات دیگر) محاسبه شد.

### نتایج

#### تخمین مقدار LC<sub>50</sub> اسانس‌ها روی جمعیت شته

با توجه به نتایج به‌دست آمده، LC<sub>50</sub> اسانس برگ اکالیپتوس روی حشرات کامل شته‌ی مومی کلم (۱۶۸۳۵ پی‌پی‌ام) بیشتر از LC<sub>50</sub> اسانس برگ‌بو (۱۱۵۶۳ پی‌پی‌ام) بود (جدول ۱) و با افزایش غلظت در هر اسانس، میزان مرگ و میر افزایش یافت. با توجه به دامنه‌ی غلظت کشنده‌ی LC<sub>50</sub> در اسانس‌های دو گیاه دارویی برگ‌بو و اکالیپتوس (جدول ۱)، مشاهده می‌شود که اسانس برگ‌بو سمیت تماسی بیشتری نسبت به اسانس اکالیپتوس داشت.

جدول ۱- مقادیر LC<sub>50</sub> محاسبه شده برای اسانس برگ گیاهان برگ‌بو، *Laurus nobilis* و اکالیپتوس، *Eucalyptus camaldulensis* روی حشرات کامل شته‌ی مومی کلم.

Table 1- LC<sub>50</sub> values for essential oils from *Laurus nobilis* and *Eucalyptus camaldulensis* Leaves on cabbage aphid adults.

Plant species	Number (Insect)	x <sup>2</sup> (df)	P-Value	Slope±SE	Intercept ± SI	LC <sub>50</sub> (Confidential limits)
<i>Laurus nobilis</i>	1000	16.12 (6)	0.01	1.48±0.15	-5.99±0.61	11563 (10002-13634)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	800	19.38 (6)	0.05	2.18±0.24	-9.22±1.01	16835 (15268-18730)

اعداد داخل پرانتز بیانگر حدود اطمینان ۹۵ درصد پایین و بالا می‌باشند.

The letters in the parenthesis show lower and upper 95% confidence intervals.

تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل ۱)، به‌طوری که متوسط تعداد پوره‌ی گذاشته شده توسط هر حشره‌ی کامل ماده در شاهد، اکالیپتوس و برگ‌بو به‌ترتیب ۲۰/۶۵، ۱۴/۰۱ و ۱۱/۲۶ عدد به‌دست آمد. غلظت LC<sub>50</sub> اسانس برگ‌بو، طول عمر حشرات کامل شته‌ی مومی کلم را به‌طور معنی‌داری کاهش داد، ولی اسانس اکالیپتوس از این نظر تفاوت

در این فرمول R درصد دورکنندگی، C تعداد حشرات در بازوی شاهد، E تعداد حشرات در بازوی تیمار و T تعداد کل حشرات مورد آزمایش می‌باشد. برای مقایسه‌ی میزان دورکنندگی دو اسانس مورد آزمایش با آزمون T-test از نرم افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۸ استفاده شد.

#### شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان مورد مطالعه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی-مس اسپکترومتری GC/MS مدل HP-5973 مجهز به MS و ستون موئینه (غیرقطبی) HP-5MS (طول ۳۰m، قطر داخلی ۲۵۰nm و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵μm) موجود در آزمایشگاه شیمی مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران استفاده شد. شناسایی طیف‌ها با کمک شاخص‌های بازداری آن‌ها و مقایسه با مقادیر شاخص‌های بازداری ترکیبات استاندارد که در منابع مختلف منتشر شده،

#### تأثیر اسانس‌ها بر باروری و طول عمر شته‌ی مومی کلم

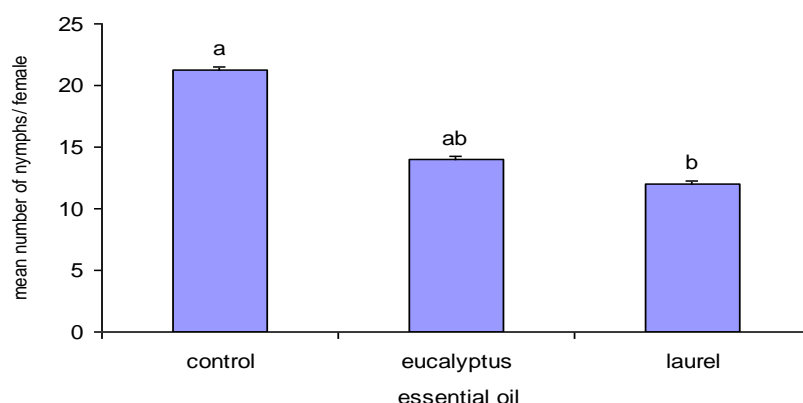
نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که غلظت LC<sub>50</sub> اسانس به‌دست آمده از برگ درخت برگ‌بو، باروری شته را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. اسانس به‌دست آمده از برگ اکالیپتوس نیز باعث کاهش باروری شته‌ی مومی کلم شد، ولی

کدام از اسانس‌های مذکور، درصد دورکنندگی در شته‌ی مومی کلم افزایش می‌یابد. طبق نتایج به‌دست آمده از آزمایش، اثر دورکنندگی اسانس برگ‌بو در غلظت  $LC_{50}$ ،  $86/67$  درصد بود. برای به‌دست آوردن میزان دورکنندگی حدود  $50$  درصد، غلظت‌های پایین‌تر این اسانس (دو غلظت  $LC_{40}$  و  $LC_{30}$ )، مورد آزمایش قرار گرفت که میزان دورکنندگی آن‌ها به‌ترتیب برابر  $60$  و  $50$  درصد به‌دست آمد (شکل ۳). اثر دورکنندگی اسانس اکالیپتوس در غلظت  $LC_{50}$  برابر  $10$  درصد بود که برای به‌دست آوردن میزان دورکنندگی حداقل  $50$  درصد، دو غلظت  $LC_{75}$  و  $LC_{90}$  این اسانس مورد آزمایش قرار گرفت و دورکنندگی آن‌ها به‌ترتیب،  $20$  و  $53/33$  درصد به‌دست آمد (شکل ۴).

معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل ۲). طول عمر حشرات کامل شته‌ی مومی کلم در شاهد، اکالیپتوس و برگ‌بو به‌طور متوسط، به‌ترتیب  $15/59$ ،  $12/59$ ،  $10/48$  روز به‌دست آمد.

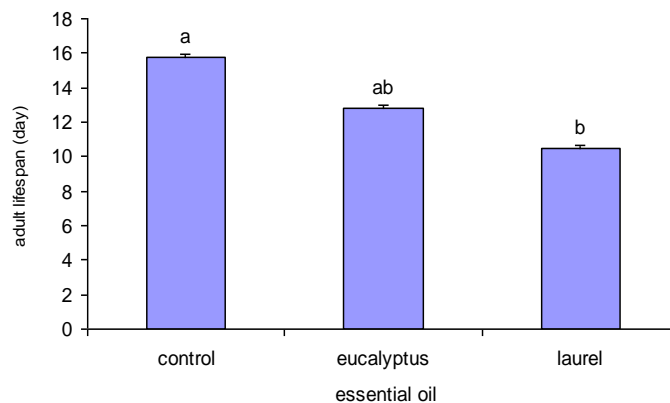
### اثر دورکنندگی اسانس‌ها

غلظت  $LC_{50}$  اسانس دو گیاه دارویی برگ‌بو و اکالیپتوس به‌ترتیب  $86/67$  و  $10$  درصد روی شته‌ی مومی کلم دورکننده بودند (شکل‌های ۳ و ۴). نتایج آزمون T-test نشان داد که بین اسانس این دو گیاه از نظر دورکنندگی شته‌ی مومی کلم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال  $1\%$  وجود داشته و میزان دورکنندگی در اسانس برگ‌بو بیشتر از اسانس اکالیپتوس بود. آزمایشات انجام شده نشان داد که با افزایش غلظت هر



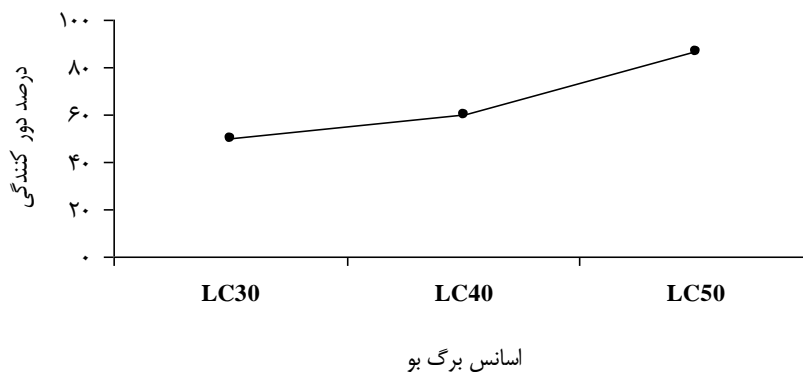
شکل ۱- میانگین تعداد پوره‌ی گذاشته شده توسط شته‌ی مومی کلم (*B. brassicae*) تیمار شده با غلظت  $LC_{50}$  اسانس‌های برگ‌بو (*L. nobilis*) و اکالیپتوس (*E. camaldulensis*) در مقایسه با شاهد

Fig.1- Mean number of nymphs per female for *B. brassicae* treated by  $LC_{50}$  of laurel (*L. nobilis*) and eucalyptus (*E. camaldulensis*) essential oils in comparison to the control.



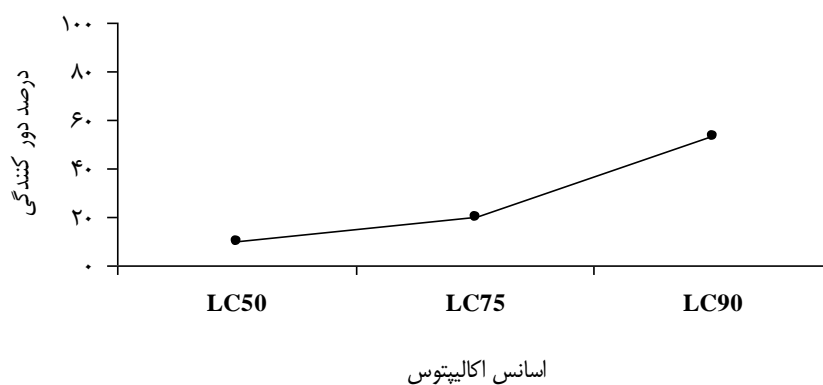
شکل ۲- میانگین طول عمر حشرات کامل شته‌ی مومی (*B. brassicae*) کلم تیمار شده با غلظت  $LC_{50}$  اسانس‌های برگ بو (*L. nobilis*) و اکالیپتوس (*E. camaldulensis*) در مقایسه با شاهد.

Fig. 2- Mean adult longevity for *B. brassicae* treated by  $LC_{50}$  of (*L. nobilis*) and (*E. camaldulensis*) essential oils in comparison to the control.



شکل ۳- درصد دور کنندگی اسانس برگ بو (*L. nobilis* L.) روی شته‌ی مومی کلم (*B. brassicae* L.).

Fig. 3- Repellency percentage of *L. nobilis* L. essential oil on *B. brassicae*.



شکل ۴- درصد دور کنندگی اسانس اکالیپتوس (*E. camaldulensis* Dehnh.) روی شته‌ی مومی کلم (*B. brassicae*)

Fig.4- Repellency percentage of *E. camaldulensis* Dehnh. essential oil on *B. brassicae*.



روی شته‌ی مومی کلم نشان داد. Mareggiani *et al.*, (2008) سمیت تنفسی اسانس اکالیپتوس گونه‌ی *E. globulus* Labill. را روی شته‌ی جالیز *A. gossipii* Glover. نشان داده و  $LC_{50}$  آن را ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌دست آوردند که کمتر از  $LC_{50}$  تماسی اسانس گونه‌ی اکالیپتوس مورد بررسی در تحقیق حاضر روی شته‌ی مومی کلم (۱۶۸۳۵ پی‌پی‌ام) می‌باشد که علت این اختلاف مربوط به تفاوت در گونه‌ی گیاه دارویی، نوع شته و نیز تفاوت در روش زیست‌سنجی می‌باشد.

همچنین بررسی‌های Mareggiani *et al.*, (2008) نشان داد که 1,8-cineol ترکیب اصلی ایجادکننده‌ی سمیت اسانس *E. globulus* می‌باشد. براساس آزمایشات انجام شده در تحقیق حاضر، 1,8-cineole بیشترین درصد ترکیبات موجود در اسانس برگ‌بو و اکالیپتوس (به ترتیب ۲۵/۵۰ و ۳۵/۱۴ درصد) را به خود اختصاص داده و به‌نظر می‌رسد نقش مهمی در سمیت اسانس این دو گیاه دارویی روی شته‌ی مومی کلم داشته باشد. (Bamoniri *et al.*, (2009) نیز 1,8-cineol را به‌عنوان بیشترین ترکیب موجود در برگ گیاه دارویی *E. camaldulensis* واریته‌ی *obtusata* (۳۴/۸۷ درصد) معرفی کرده‌اند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. همچنین Kemal Sangun *et al.*, (2006) ترکیب عمده‌ی اسانس برگ‌بو را 1,8-Cineole معرفی می‌کنند و میزان آن را در سه منطقه‌ی مختلف ۴۶/۶۱ تا ۵۹/۹۴ درصد بیان کرده‌اند.

طبق تحقیقات Abramson *et al.*, (2006) در رابطه با اثر تماسی اسانس دو گیاه دارویی *Citronella* و *Alfazema*، غلظت ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس دو گیاه مذکور به ترتیب سبب حدود ۸۱٪ و ۹۵٪ تلفات در شته‌ی رازیانه (*Hyadaphis foeniculi*) شده و علاوه بر اکالیپتوس و برگ‌بو، اثر تماسی اسانس سایر گیاهان دارویی را روی شته‌ها نشان می‌دهد.

Isik & Görür (2009) تأثیر اسانس هفت گیاه دارویی را بر باروری شته‌ی مومی کلم بررسی نموده و به این نتیجه رسیدند که اسانس سه گیاه *Juniperus oxycedrus*، *excelsa* و برگ‌بو به ترتیب بیشترین

## شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس برگ‌بو و اکالیپتوس

طبق نتایج به‌دست آمده از گاز کروماتوگرافی-مس اسپکترومتری، تعداد ۳۳ ترکیب شیمیایی در اسانس گیاه برگ‌بو شناسایی شد که ترکیبات 1,8-cineole،  $\beta$ -pinene،  $\alpha$ -pinene، sabinene، methyl eugenol به ترتیب با ۲۵/۵۰، ۸/۲۵، ۷/۷۵، ۷/۱۶ و ۵/۰۲ درصد، بیش از ۵۰ درصد از حجم اسانس این گیاه را به خود اختصاص دادند.

در اسانس گیاه اکالیپتوس نیز تعداد ۲۴ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که از آن جمله می‌توان 1,8-cineole، para-  $\alpha$ -pinene و gamma-terpinen، cymen را نام برد که به ترتیب با ۳۵/۱۴، ۱۴/۴۴، ۱۱/۹۹ و ۷/۳۳ درصد، بیش از ۵۰ درصد از حجم اسانس این گیاه را به خود اختصاص دادند.

در مجموع با توجه به نتایج این تحقیق، اسانس دو گیاه دارویی اکالیپتوس گونه‌ی *E. camaldulensis* و برگ‌بو علاوه بر سمیت تماسی، برای شته‌ی مومی کلم، دورکننده بوده و به‌عنوان ترکیبات طبیعی امید بخش برای کنترل شته‌ی مومی کلم معرفی شدند. لذا پیشنهاد می‌شود امکان استفاده از اسانس گیاهان مورد مطالعه برای کنترل این شته در گلخانه و مزارع به عنوان جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی مورد بررسی قرار گیرد که در این میان به‌نظر می‌رسد استفاده از اسانس برگ‌بو، بیشتر از اسانس اکالیپتوس موفقیت آمیز باشد، زیرا اسانس این گیاه علاوه بر کشندگی بیشتر و کاهش معنی‌دار باروری و طول عمر شته‌ی مومی کلم، دورکنندگی بیشتری نیز داشته و میزان دورکنندگی  $LC_{30}$  آن تقریباً معادل دورکنندگی  $LC_{90}$  اسانس اکالیپتوس بود. همچنین بررسی اثر ماده‌ی 1,8-cineole روی شته‌ی مومی کلم در تحقیقات آتی می‌تواند منجر به سنتز این ماده‌ی طبیعی و استفاده از آن در کنترل شته در آینده شود.

## بحث

نتایج به‌دست آمده، سمیت تماسی اسانس دو گیاه دارویی اکالیپتوس گونه‌ی *E. camaldulensis* و برگ‌بو را

(Shakarami et al., 2004). این محققین در تحقیقی دیگر نشان دادند که غلظت زیر کشندگی  $0.03 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  اسانس مریم گلی به ترتیب سبب ۳۸/۱۱، ۴۶/۴۲، ۴۱ و ۴۳/۷۰ درصد دور کنندگی روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه ای حبوبات، شیشه ی آرد، شیشه ی برنج و شیشه ی گندم شد. در تحقیقات انجام شده توسط نگهبان و محرمی پور، ۱۳۸۵، نیز غلظت  $4 \mu\text{l}/\text{ml}$  اسانس گیاه *Artemisia sieberi* حدود ۷۷ درصد روی شیشه ی آرد دور کننده بود (Negahban & Moharramopour, 2006).

### سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای مهندس قلی بیگیان کارشناس آزمایشگاه زراعت، آقای مهندس استادی کارشناس آزمایشگاه حشره شناسی و آقای دکتر لاریجانی مسئول آزمایشگاه شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران به دلیل مساعدت در تهیه اسانس گیاهان دارویی مورد بررسی و انجام گاز کروماتوگرافی - مس اسپکتوفوتومتري سپاسگزاری می شود.

تأثیر را در کاهش باروری شته داشتند، به طوری که پوره زایی روزانه در شاهد حدود ۱۰ عدد بود که اسانس این سه گیاه آن را به حدود ۲ عدد و پایین تر کاهش دادند. طبق تحقیق حاضر نیز اسانس برگ بو باعث کاهش معنی دار باروری شته ی مومی کلم نسبت به شاهد شد، ولی اسانس اکالیپتوس چنین تأثیری را نشان نداد.

نتایج نشان داد که اسانس برگ بو دور کنندگی قابل ملاحظه ای روی شته ی مومی کلم داشته و بیشتر از اسانس اکالیپتوس دور کننده می باشد، به طوری که دور کنندگی  $\text{LC}_{30}$  آن تقریباً معادل دور کنندگی  $\text{LC}_{90}$  اسانس اکالیپتوس می باشد. سایر محققین نیز به دور کنندگی اسانس گیاهان دارویی اشاره کرده اند. برای مثال شاکرمی و همکاران، ۱۳۸۳، دور کنندگی اسانس گیاه درمنه ی کوهی (*Artemisia aucheri*) را روی چهار گونه آفت انباری بررسی کردند که میزان دور کنندگی در غلظت  $0.03 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  را برای هر یک از حشرات سوسک چهار نقطه ای حبوبات، شیشه ی آرد، شیشه ی برنج و شیشه ی گندم به ترتیب برابر ۴۱/۹۹، ۵۱/۴۵، ۴۷/۳۱ و ۴۶/۳۱ درصد بیان کرده اند.

### References

- Abramson, C. I., Wanderley, P. A., Wanderley, M. J. A., Mina, A. J. S. & de Souza, O. B. 2006. Effect of essential oil from Citronella and Alfazema on fennel aphid, *Hyadaphis foeniculi* Passerini (Hemiptera: Aphididae) and its predator, *Cycloneda sanguinea* L. (Coleoptera: Coccinellidae). American Journal of Environmental Sciences. 3(1): 9-10.
- Bamoniri, A., Mazoochi, A., Mirjalili, B. B. F., Mehrasa, M. & Batooli, H. 2009. Survey of the bioactive and fragrant constituents separated by nano scale injection of *Eucalyptus camaldulensis* Var. *obtus* cultivated in Kashan area. Journal of Nanomaterials and Biostructures. 4(4): 603-606
- Behdad, E. 2002. Introductory entomology and important plant pests in Iran. Yadbood Publication. Isfahan. (In Persian).
- Digilio, M. C., Mancini, E., Voto, E. & De Feo, V. 2008. Insecticide activity of Mediterranean essential oils. Journal of Plant Interactions. 3(1): 17-23.
- Farahbakhsh, G. 1961. List of important plant pests and agricultural products in Iran. Iranian Plant Protection Organization Publication. No.1 (In Persian).
- Isik, M. & Görür, G. 2009. Aphidicidal activity of seven essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne Brassicae* L. (Hemiptera: Aphididae). Munis Entomology and Zoology. 4(2): 424-431.

- Isman, M. B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 19: 603-608.
- Khanjani, M. 2004.** Agricultural plant's pests in Iran. Bu Ali Sina University Publication. (In Persian). 719 pp.
- Lima, E. O., Gompertz, O. F., Giesbrecht, A. M. & Paulo, M. Q. 1993.** In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 36: 333-336.
- Mareggiani, G., Serafina, R. & Margarita, R. 2008.** *Eucalyptus globulus* (Mirtaceae) essential oil: efficacy against *Aphis gossypii* (Hemiptera: aphididae), an agricultural pest. *Revista Latino-americana de Química*. 36(1): 16-21.
- Monfared, A., Moharramipour, S. & Fathipour, Y. 2003.** An evaluation of resistance to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) in rapeseed (*Brassica napus* L.) lines, hybrids and varieties under natural field infestation conditions. *Agricultural Sciences Journal*. 34 (4): 987-994 (In Persian with English Summary).
- Negahban, M. & Moharramipour, S. . 2006.** Repellent activity and persistence of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser on three stored-product insect species. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 22(4): 293-302 (In Persian with English Summary).
- Rafiei Karahroodi, Z., Moharramipour, S., Rahbarpoor, A., Zahabi, P. & Salehi Marzigarani, M. 2008.** Presentation of an olfactometer model RZR to assess repellency of essential oils. *Proceedings of 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Vol. I, Pests, 24-27 August, Hamedan, Iran.*
- Rezvani, A. 2001.** Key to the aphids (Homoptera: Aphidinea) in Iran. Ministry of Jihad Agriculture, Iran.
- Ruberson, J. R. 1999.** Handbook of pest management. Marcel Dekkar Inc, New York.
- Sengonca, C. & Gerlach, S. 1983.** A new developed method "leaf-island" for observation of thrips in the laboratory. *Turkiye Bitki Koruma Dergisi*. 7: 17 – 22.
- Shakarami, J., Kamali, K., Moharramipour, S. & Meshkatassadat M. H. 2004.** Effects of three plant essential oils on biological activity of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *Iranian Agricultural Sciences Journal*. 35(4): 965- 972 (In Persian with English Summary).
- Tunc, I. & Sahinkaya, S. 1998.** Sensitivity of two greenhous pests to vapors of essential oils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 86: 183-187.

## Insecticidal and repellent effects of essential oils from laurel, *Laurus nobilis* and eucalyptus, *Eucalyptus camaldulensis* against cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*

Seyedeh Bentolhoda Hosseini amin<sup>1</sup>, Shahram Shahrokhi<sup>2</sup>, Faramarz Alinia<sup>2</sup>, Mahmood Khosroshahli<sup>1</sup>

1- Agriculture Faculty, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Biological Control Research Department, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Seyedeh Bentolhoda Hosseini amin , amin\_hoda@yahoo.com

Received: Apr. 28, 2012

1 (1) 1-11

Accepted: Jan. 9, 2013

### Abstract

Cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* is one of the major pests of Cruciferae plants, especially cabbages and canola. In order to investigate the effect of plant essential oils to control of cabbage aphid, the contact effect of essential oils of laurel, *Laurus nobilis* and eucalyptus, *Eucalyptus camaldulensis* leaves was evaluated on apterous morph adults of cabbage aphid. Bioassay experiments were carried out with essential oil concentrations causing 20-80% mortality to determine LC<sub>50</sub> by Topical application. The experiment was done in a Germinator with 25±1°C, 60±5% RH and photoperiod of 16:8 (L:D) at five replications and 10 aphid adults were placed on cabbage leaf disc in each Petri dish as one replication. According to the results, essential oils derived from the studied plants had contact effect on cabbage aphid. LC<sub>50</sub> of laurel and eucalyptus essential oils on cabbage aphid were estimated as high as 11563 and 16835 ppm, respectively, and so laurel essential oil was more effective than eucalyptus one. Results of the experiments conducted as completely randomized design with five replications also revealed that tested essential oils reduced the aphid's fecundity and longevity in comparison to the control, but laurel essential oil was more effective. Application of laurel essential oil caused up to 45.47% and 32.78% reduction in fecundity and longevity of cabbage aphid, respectively. Repellency activity of essential oils of laurel and eucalyptus was evaluated using an Olfactometer (model RZR). An increased repellency percentage was observed at higher concentration of the studied essential oils. Repellency of laurel's essential oil was more than that of eucalyptus, so that repellency percentage was 86.67% for laurel and 10% for eucalyptus essential oils in LC<sub>50</sub>. Plant essential oils were extracted by Distillation method and their compounds were identified by GC-MS. Results showed that 1,8-cineole (a component with insecticidal effect) was the major component in *L. nobilis* (25.5%) and *E. camaldulensis* (35.14%) essential oils, respectively.

**Key words:** bioassay, essential oil, Topical application, LC<sub>50</sub>, cabbage aphid, GC-MS.

## مطالعه‌ی برخی از مکانیسم‌های آنتاگونیستی جدایه‌های قارچ *Talaromyces flavus* علیه *Verticillium dahliae* و *Verticillium albo-atrum* عوامل بیماری پژمردگی در چند محصول زراعی مهم

لاله نراقی<sup>۱</sup>، اصغر حیدری<sup>۲</sup>، سعید رضائی<sup>۱</sup> و محمد رضوی<sup>۲</sup>

۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: لاله نراقی، lale\_naraghi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۶

۲۸-۱۳ (۱) ۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۲

### چکیده

پژمردگی ورتیسلیومی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاهان زراعی از قبیل پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای محسوب شده و باعث وارد شدن خسارات فراوان به این محصولات مهم می‌شود. کنترل بیولوژیک می‌تواند یکی از مناسب‌ترین روش‌ها جهت مدیریت این بیماری باشد. در این پژوهش، برای بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی *Talaromyces flavus*، ابتدا عوامل بیماری‌زا و قارچ آنتاگونیست *T. flavus* از مناطق کشت گیاهان فوق به ترتیب توسط محیط کشت‌های Komada و TF جداسازی شد. سپس، مکانیسم‌های آنتاگونیستی آن‌ها از جمله میکوپارازیتسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار روی رشد عوامل بیماری‌زای فوق مطالعه گردید. در این پژوهش، ۶۰ جدایه‌ی *T. flavus* استفاده شد که به ترتیب ۲۳، ۱۵، ۱۴ و ۸ جدایه به مناطق کشت پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای تعلق داشت. برای پنبه و سیب‌زمینی با عوامل پژمردگی *Verticillium dahliae* و *Verticillium albo-atrum*، بیش‌ترین میانگین درصد بازدارندگی (۸۱/۵۱ و ۶۴/۹۳) به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Co-G-1 و TF-Po-V-48 به دست آمد و در هر دو جدایه، ترکیبات غیرفرار بیش‌ترین تأثیر را روی بازدارندگی رشد عامل بیماری‌زا نشان دادند. در حالی که، برای گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای با عامل بیماری‌زای *V. albo-atrum*، بیش‌ترین میانگین درصد بازدارندگی (۷۳/۶۷ و ۵۴/۷۸) به ترتیب توسط جدایه‌های TF-To-V-31 و TF-Cu-V-60 موجب شد. براساس بررسی‌های انجام‌شده، مؤثرترین مکانیسم بازدارندگی این دو جدایه، تولید ترکیبات فرار بود.

**واژه‌های کلیدی:** *Talaromyces flavus*، مکانیسم‌های آنتاگونیستی، *Verticillium dahliae*، *Verticillium albo-atrum*، پنبه، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، خیار گلخانه‌ای

### مقدمه

میزبانی وسیع هستند و بیش از ۳۴۰ گونه‌ی گیاهی را مورد حمله قرار می‌دهند. اکثر میزبان‌های این قارچ‌ها از گیاهان دو لپه‌ای هستند، ولی در بافت‌های سطحی ریشه‌ی بعضی از گیاهان تک‌لپه‌ای نظیر گندم و سایر غلات نیز زنده می‌مانند (Malik & Milton, 1980).

در ایران، نژادهای بیماری‌زای *V. dahliae* در مزارع پنبه‌ی نواحی شمالی شناسایی شده (Hamdollahzadeh, 1993) و در سال ۱۳۸۴، در ایستگاه تحقیقاتی استهبان استان فارس، میزان درصد بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پنبه برای

بیماری پژمردگی ورتیسلیومی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاهان زراعی و باغی می‌باشد که تاکنون از ۵۱ کشور جهان روی گیاهان مختلف گزارش شده است. هر چند این بیماری در تمام نقاط دنیا وجود دارد، ولی در مناطق معتدل از اهمیت بیش‌تری برخوردار است (Pegg & Brady, 2002). گونه‌های *Verticillium dahliae* Kleb. و *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold. از عوامل این بیماری محسوب می‌شوند که دارای طیف

گرفته‌شده است (Inglis & Kawchuk, 2002). تحقیقات

بسیاری نشان داده که *T. flavus* جهت تأثیر هرچه بیش‌تر روی عوامل بیماری‌زای مختلف با مکانیسم‌های متفاوت عمل نموده است. به‌عنوان مثال، مؤثرترین مکانیسم این قارچ برای جنس *Verticillium*، تولید ترکیبات غیرفرار شامل آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره‌ی سلولی (کتیناز، گلوکاناز و سلولاز) و گلوکز اکسیداز بوده، درحالی‌که در مورد جنس *Rhizoctonia* هم مکانیسم فوق و هم میکوپارازیتسم، تأثیر به‌سزایی روی بازدارندگی عامل بیماری مذکور داشته‌اند (Inglis & Kawchuk, 2002).

در ایران، برای اولین بار قارچ *T. flavus* از یک مزرعه‌ی پنبه واقع در ایستگاه تحقیقاتی کارکنده استان گلستان گزارش شده است. نتایج تحقیقات نشان داد که در شرایط آزمایشگاه ترکیبات فرار و غیرفرار این قارچ موجب کاهش رشد پرگنه‌ی *V. dahliae* گردیده است (Naraghi et al., 2003). هدف از این پژوهش تعیین مکانیسم‌های آنتاگونیستی جدایه‌های *T. flavus* که از مناطق کشت مختلف گیاهان زراعی به‌دست آمده بود، می‌باشد تا بتوان برحسب جدایه‌های مورد استفاده، پایدار کننده‌های ترکیبات خاص را به بستر تکثیر آن‌ها انتقال داد.

### مواد و روش‌های پژوهش

#### ۱- جداسازی و شناسایی جدایه‌های مختلف *T. flavus* از خاک مزارع در برخی مناطق ایران

در این مرحله، ابتدا نمونه‌برداری خاک مزارع از مناطق مهم کشت چند محصول زراعی شامل پنبه، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای با توجه به سابقه‌ی آلودگی آن‌ها به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی مطابق روش Butterfield & De (1977) انجام گرفت. برای جداسازی جدایه‌های قارچ *T. flavus* از سوسپانسیون‌های خاک، مطابق روش

رقم ورامین ۸۵/۶۳٪ گزارش گردیده است (Kheiri & Fatahi, 2010). تاکنون، درصد آلودگی به این بیماری برای خیار گلخانه‌ای در مناطق عمده‌ی کشت آن‌ها تعیین نشده است، ولی شیوع گسترده‌ی بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در گلخانه‌ای خیار در ورامین مشاهده شده است. هم‌چنین، مقالاتی نیز در زمینه‌ی جداسازی ورتیسلیوم از خیار گلخانه‌ای در یزد (Esmaealzadeh Hosseini, 2006) و سیب‌زمینی در کرمان (Aminae et al., 2006) وجود دارد.

یکی از روش‌های مناسب کنترل پژمردگی ورتیسلیومی، استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست است که ضرورت استفاده‌ی مداوم از اراضی کشاورزی از یک سو و جلوگیری از مسایل زیست‌محیطی ناشی از کاربرد کودها و سموم شیمیایی، محققین بخش کشاورزی را بر آن داشته تا با استفاده از این گونه میکروارگانیسم‌ها جهت افزایش کمیت و کیفیت تولیدات کشاورزی گام مؤثری بردارند (Klosterman et al., 2009; Naraghi et al., 2010). امروزه در بسیاری از کشورهای صنعتی به‌جای استفاده از کودها و سموم شیمیایی، تمام یا بخشی از عناصر غذایی مورد نیاز گیاه را به کمک میکروارگانیسم‌های خاک در اختیار گیاه قرار می‌دهند به‌طوری‌که تولید و مصرف کودهای بیولوژیک در سال‌های اخیر رشد فزاینده‌ای داشته است (Huang et al., 2011). برای استفاده از این روش، ابتدا بایستی عوامل بیولوژیک مؤثر برای کنترل بیماری‌های گیاهی از طریق مطالعه‌ی مکانیسم‌های آنتاگونیستی آن‌ها انتخاب شوند (Knudsen et al., 1997).

به‌طور کلی، مکانیسم‌های مشاهده شده در قارچ‌های آنتاگونیست شامل پارازیتسم، آنتی‌بیوز، رقابت و القای مقاومت سیستمیک می‌باشد (Van Elsas et al., 2007). *T. flavus* توسط این مکانیسم‌ها موجب بازدارندگی رشد عوامل مختلف بیماری‌زا نظیر *Rhizoctonia*، *Valbo-atrum*، *V. dahliae*، *Sclerotium rolfsii* و *Sclerotinia sclerotiorum solani*

بیماری‌ها توسط هر یک از مکانیسم‌های جدایه‌های *T. flavus* از فرمول زیر به دست آمد.

$$I = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$$

که در آن:  $I$ ، درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی قارچ بیماری‌زا،  $D_t$  قطر رشد پرگنه‌ی قارچ بیماری‌زا در تیمار متأثر از جدایه‌ها و  $D_c$  قطر رشد پرگنه‌ی قارچ بیماری‌زا در تیمار شاهد می باشد.

مقایسه‌ی میانگین‌های درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی قارچ بیماری‌زا توسط ترکیبات غیرفرار هریک از جدایه‌های *T. flavus* با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام گرفت.

## نتایج

### ۱- جداسازی و شناسایی جدایه‌های مختلف *T. flavus* از خاک مزارع در برخی مناطق ایران

در این تحقیق، ۶۰ جدایه‌ی مختلف قارچ *T. flavus* از خاک برخی مناطق کشت پنبه استان‌های گلستان (گرگان)، خراسان رضوی (نیشابور) و اردبیل (مغان)، گوجه‌فرنگی استان‌های آذربایجان غربی (ارومیه) و تهران (ورامین)، سیب‌زمینی استان تهران (کرج و ورامین) و خیار گلخانه‌ای تهران (ورامین) به دست آمد. از این تعداد، ۲۳ جدایه به مزارع پنبه در گرگان: از TF-Co-G-1 تا TF-Co-G-11، نیشابور: از TF-Co-N-12 تا TF-Co-N-21 و مغان: از TF-Co-M-22 تا TF-Co-M-23، ۱۵ جدایه به مزارع گوجه‌فرنگی در ورامین: از TF-To-V-24 تا TF-To-V-33 و ارومیه: از TF-To-U-34 تا TF-To-U-38، ۱۴ جدایه به مزارع سیب‌زمینی در کرج: از TF-Po-K-39 تا TF-Po-K-47 و ورامین: از TF-Po-V-48 تا TF-Po-V-52 و ۸ جدایه به گلخانه‌های خیار (از TF-Cu-V-53 تا TF-Cu-V-60) و ۱ (V-60) تعلق داشت (جدول ۱).

در مرحله‌ی شناسایی، پرگنه‌ی جدایه‌های *T. flavus* روی محیط کشت اختصاصی و عمومی (PDA و TF)، دارای هاله‌ی زرد روشن در اطراف و نواحی سبزرنگ در

Marois *et al.*, (1984) از محیط کشت انتخابی TF (TF medium) استفاده شد.

در مرحله‌ی شناسایی، جدایه‌هایی که از لحاظ ماکروسکوپی پرگنه‌ی آن‌ها روی دو محیط کشت اختصاصی و عمومی (PDA و TF) بعد از ده روز نگهداری در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس دارای هاله‌ی زرد روشن در اطراف و نواحی سبزرنگ در مرکز و هم‌چنین از لحاظ میکروسکوپی، دارای ریشه‌ها و شکل غیرجنسی (کنیدیوم و کنیدیوفور) مشابه با جنس *Penicillium* بودند، انتخاب شدند. هم‌چنین، به منظور به دست آوردن شکل جنسی، این جدایه‌ها روی محیط کشت به مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شده و اندام تولید مثل جنسی‌شان شامل آسکوگونیم، آنترییدیوم، آسکوکارپ، آسک و آسکوسپور نیز مطالعه گردید.

### ۲- جداسازی و شناسایی عوامل بیماری‌زای بیماری پژمردگی وریسلیومی

در این مرحله، نمونه‌های خاک و گیاه آلوده از مناطق کشت هر یک از محصولات پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای جمع‌آوری شده و جهت جداسازی عوامل بیماری‌زا از آن‌ها به ترتیب مطابق روش‌های Christen (1981) و Kim *et al.* (2001) عمل شد. پس از خالص‌سازی هر یک از پرگنه‌های به دست آمده روی محیط کشت PDA اقدام به شناسایی آن‌ها شد. شناسایی جدایه‌ها مطابق منابع موجود (Hawksworth & Talboys, 1970; Kim *et al.*, 2001) بر اساس اندازه‌ی کنیدی، طول کنیدیوفور، شکل ساختارهای استراحتی (میکرواسکلروت و میسلیم تیره) و رنگ پرگنه‌ی روی محیط کشت صورت گرفت.

### ۳- مطالعه‌ی مکانیسم فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. flavus*

پس از شناسایی جدایه‌های مختلف *T. flavus* از میان جدایه‌های به دست آمده، مکانیسم فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها شامل میکوپارازیتسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار علیه عوامل بیماری‌زا مطابق روش Wright *et al.*, (1990) مطالعه گردید. درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی قارچ



جدول ۱- جدایه‌های *Talaromyces flavus* به‌دست آمده از مناطق مختلف ایران.Table 1- Isolates of *Talaromyces flavus* obtained from different regions in Iran.

Crop Cultivated in Sampling Region	Regions of Soil Sampling	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i> Isolates	Crop Cultivated in Sampling Region	Regions of Soil Sampling	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i> Isolates	Crop Cultivated in Sampling Region	Regions of Soil Sampling	<i>T. flavus</i> <i>T. flavus</i> Isolates
Potato	Karaj	TF-Po-K-41	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-21	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-1
Potato	Karaj	TF-Po-K-42	Cotton	Moghan	TF-Co-M-22	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-2
Potato	Karaj	TF-Po-K-43	Cotton	Moghan	TF-Co-M-23	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-3
Potato	Karaj	TF-Po-K-44	Tomato	Varamin	TF-To-V-24	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-4
Potato	Karaj	TF-Po-K-45	Tomato	Varamin	TF-To-V-25	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-5
Potato	Karaj	TF-Po-K-46	Tomato	Varamin	TF-To-V-26	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-6
Potato	Karaj	TF-Po-K-47	Tomato	Varamin	TF-To-V-27	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-7
Potato	Varamin	TF-Po-V-48	Tomato	Varamin	TF-To-V-28	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-8
Potato	Varamin	TF-Po-V-49	Tomato	Varamin	TF-To-V-29	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-9
Potato	Varamin	TF-Po-V-50	Tomato	Varamin	TF-To-V-30	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-10
Potato	Varamin	TF-Po-V-51	Tomato	Varamin	TF-To-V-31	Cotton	Gorgan	TF-Co-G-11
Potato	Varamin	TF-Po-V-52	Tomato	Varamin	TF-To-V-32	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-12
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-53	Tomato	Varamin	TF-To-V-33	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-13
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-54	Tomato	Urumia	TF-To-U-34	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-14
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-55	Tomato	Urumia	TF-To-U-35	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-15
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-56	Tomato	Urumia	TF-To-U-36	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-16
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-57	Tomato	Urumia	TF-To-U-37	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-17
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-58	Tomato	Urumia	TF-To-U-38	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-18
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-59	Potato	Karaj	TF-Po-K-39	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-19
Greenhouse cucumber	Varamin	TF-Cu-V-60	Potato	Karaj	TF-Po-K-40	Cotton	Neishaboor	TF-Co-N-20



## تأثیر مکانیسم‌های آنتاگونیستی جدایه‌های *T. flavus* روی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پنبه

در بررسی تأثیر میکوپارازیتسم جدایه‌های *T. flavus* روی *V. dahliae*، محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. dahliae* برابر با  $۸۸/۷۸ - ۵۷/۹۴$  درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Co-M-23 و TF-Co-N-17 موجب گردید (جدول ۲). در این بررسی، حالت نفوذ میان ریشه‌های قارچ بیماری‌زا و جدایه‌های *T. flavus*، قطعه قطعه (Fragmentation) و لیز شدن (Lysis) ریشه‌های عامل بیماری‌زا، جلوگیری از تشکیل و خرد شدن میکرواسکلروت‌ها نیز مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳).

در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *T. flavus* روی *V. dahliae*، علاوه بر کاهش رشد پرگنه‌ی *V. dahliae*، بدون ملانین شدن میکرواسکلروت‌ها نیز مشاهده شد. در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. dahliae* برابر با  $۷۷/۱۴ - ۱۴/۲۸$  درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Co-N-20 و TF-Co-G-8 مشاهده شد. هم‌چنین، نتایج بررسی تأثیر ترکیبات غیرفرار نشان داد که محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. dahliae* برابر با  $۹۲/۵ - ۳۹/۴۴$  درصد بوده که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Co-G-1 و TF-Co-G-8 به دست آمده بود. بنابراین، نتایج مشخص نمود که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. dahliae*، به ترتیب توسط مکانیسم ترکیبات غیرفرار جدایه‌ی TF-Co-G-1 و مکانیسم ترکیبات فرار جدایه‌ی TF-Co-G-8 صورت گرفته است (جدول ۲).

در بررسی مکانیسم میکوپارازیتسم، از میان حالت‌های مختلف برخورد جدایه‌های *T. flavus* با *V. dahliae*،  $۴۴/۵\%$  برخورد و قطعه‌قطعه شدن،  $۴۳/۵\%$  برخورد، قطعه‌قطعه شدن و لیز شدن،  $۴\%$  برخورد و لیز شدن،  $۱۳\%$  عدم برخورد و قطعه‌قطعه شدن و  $۹\%$  عدم برخورد محاسبه

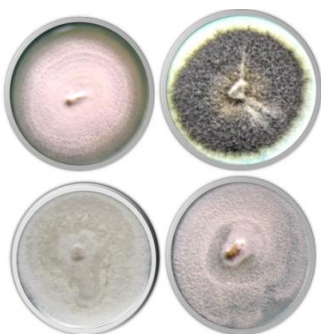
مرکز بود. از لحاظ میکروسکوپی، این جدایه‌ها دارای ریشه‌ها و شکل غیرجنسی (کنیدیوم و کنیدیوفور) مشابه با جنس *Penicillium* بودند. در شکل جنسی جدایه‌های مذکور، اندام آسکوگونیم، آنترییدیوم، آسک و آسکوسپور مشاهده شد.

## ۲- جداسازی و شناسایی عوامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی

در این مرحله، یک جدایه‌ی *V. dahliae* از ساقه‌ی پنبه، یک جدایه‌ی *V. albo-atrum* از ریشه‌ی گوجه‌فرنگی، یک جدایه‌ی *V. albo-atrum* از نمونه‌ی خاک مزرعه‌ی سیب‌زمینی و یک جدایه‌ی *V. albo-atrum* از ریشه‌ی خیار گلخانه‌ای به دست آمد. نتایج بررسی اختلاف‌های تاکسونومیکی میان جدایه‌های *V. dahliae* و *V. albo-atrum* از لحاظ اندازه‌ی کنیدی، طول کنیدیوفور، شکل ساختارهای استراحتی (میکرواسکلروت و میسلیم تیره) و رنگ پرگنه روی محیط کشت نشان داد که *V. dahliae* و *V. albo-atrum* به ترتیب دارای کنیدی‌هایی به اندازه‌ی  $۲/۵ - ۳/۵ \times ۲/۳ - ۱۰/۲$  و  $۲/۵ - ۳/۱۰ \times ۲/۰ - ۸/۶$  میکرومتر بوده و طول کنیدیوفور در *V. albo-atrum* بیش‌تر از *V. dahliae* بوده است. هم‌چنین، در *V. dahliae* میکرواسکلروت و در *V. albo-atrum* تنها میسلیم تیره مشاهده شد. رنگ پرگنه‌های *V. dahliae* و *V. albo-atrum* به ترتیب روی محیط کشت PDA به صورت شفاف (هیالین) تا سیاه و شفاف تا سفید مایل به خاکستری ظاهر گردید (شکل ۱).

## ۳- مکانیسم‌های آنتاگونیستی جدایه‌های *T. flavus*

در این تحقیق با توجه به این که عامل بیماری‌زا و جدایه‌های آنتاگونیست برای هر یک از محصولات پنبه، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای به صورت جداگانه از خاک مزارع همان محصول جداسازی شده، نتایج مربوط به تأثیر مکانیسم‌های مختلف شامل میکوپارازیتسم، ترکیبات فرار و غیرفرار برای محصولات فوق به صورت مجزا به شرح ذیل ارائه گردیده است:

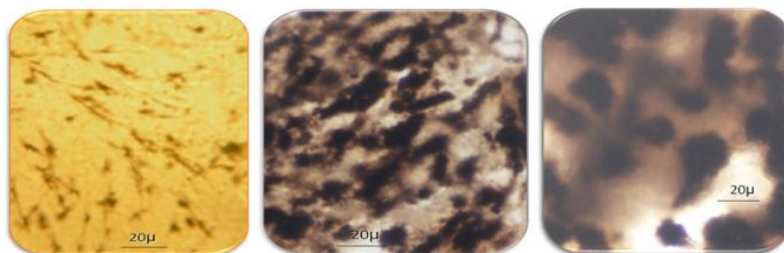
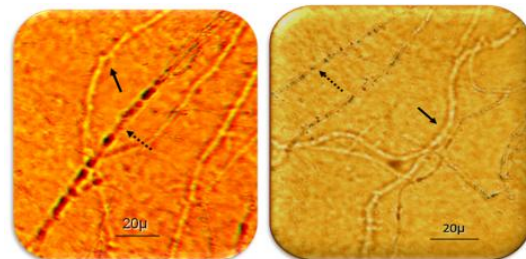


شکل ۱- پرگنه‌های جدایه‌های *Verticillium dahliae* و *Verticillium albo-atrum*: ردیف بالا از راست به چپ: *V. dahliae* (جدایه‌ی پنبه)؛ *V. albo-atrum* (جدایه‌ی گوجه‌فرنگی)؛ ردیف پایین از راست به چپ: *V. albo-atrum* (جدایه‌های سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای)

Fig. 1- Colonies of *Verticillium dahliae* & *Verticillium albo-atrum* isolates: (Up) From Right to Left: *V. dahliae* (cotton isolate); *V. albo-atrum* (tomato isolate); (Down) From Right to Left: *V. albo-atrum* (potato and greenhouse cucumber isolates).

شکل ۲- تأثیر مکانیسم میکوپارازیتیسم *Talaromyces flavus* روی ریشه‌های *Verticillium dahliae*: از راست به چپ) لیز و قطعه‌قطعه شدن ریشه‌های *V. dahliae* توسط جدایه‌های TF-Co-G-15 و TF-Co-G-21 (ریشه‌های لیز و قطعه‌قطعه شده: جهت‌نمای نقطه‌چین، ریشه‌ی سالم: جهت‌نمای پیوسته).

Fig. 2- The effect of mycoparasitism mechanism of *T. flavus* on mycelia of *V. dahliae*: From Right to Left) Lysis & fragmentation in *V. dahliae* mycelia by TF-Co-G-21 & TF-Co-G-15 (Mycelia in Lysis & fragmentation manner: discontinuous arrow, Healthy mycelia: continuous arrow).



شکل ۳- تأثیر میکوپارازیتیسم *Talaromyces flavus* روی میکرواسکلروت‌های *Verticillium dahliae*: راست به چپ) میکرواسکلروت‌های سالم *V. dahliae*، خرد شدن و بازدارندگی تشکیل میکرواسکلروت‌ها توسط جدایه‌های TF-Co-G-20 و TF-Co-G-15.

Fig. 3- The effect of mycoparasitism mechanism of *T. flavus* on microscerotia of *V. dahliae*: From Right to Left) Healthy microscerotia of *V. dahliae*, disintegration & formation inhibitory of microscerotia by TF-Co-G-15 & TF-Co-G-20.

جدول ۲- حالت های مختلف برخورد جدایه های *T. flavus* با *V. dahliae* عامل پژمردگی ورتیسلیومی پنبه در مکانیسم میکوپارازیتیسم و گروه بندی میانگین های درصد بازدارندگی رشد پرگنه ی *V. dahliae* توسط مکانیسم های میکوپارازیتیسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه های *T. flavus* با آزمون دانکن ( $\alpha=0.01$ ).

Table 2- Different manners of *T. flavus* isolates in relation with *V. dahliae*, cotton Verticillium wilt agent, in mycoparasitism mechanism and grouping means of inhibitory percent for *V. dahliae* colony growth in mechanisms of mycoparasitism, volatile and non- volatile metabolites production by Duncan test ( $\alpha = 0.01$ ).

Inhibitory Percent for <i>V. dahliae</i> Colony Growth						Different Manners of <i>T. flavus</i>	<i>T. flavus</i>
Non- volatile Metabolites		Volatile Metabolites		Mycoparasitism		Isolates in Relation With <i>V. dahliae</i> in Mycoparasitism	Isolates
92.50	a	72.61	c	79.43	e	Fragmentation & Lysis	TF-Co-G-1
83.57	b	39.28	h	81.30	d	Fragmentation	TF-Co-G-2
50.55	h	36.90	i	77.60	g	No Relationship & Fragmentation	TF-Co-G-3
72.50	c	21.71	l	77.57	g	Fragmentation	TF-Co-G-4
48.55	ij	69.04	d	82.24	c	Fragmentation	TF-Co-G-5
42.44	m	20.00	m	85.04	b	Lysis	TF-Co-G-6
47.11	k	45.33	g	78.50	f	Fragmentation	TF-Co-G-7
39.44	n	14.28	o	79.43	e	Fragmentation	TF-Co-G-8
44.22	l	36.19	j	70.09	j	Fragmentation	TF-Co-G-9
43.66	l	17.14	n	69.15	k	Fragmentation	TF-Co-G-10
41.85	m	19.04	p	78.50	f	Fragmentation	TF-Co-G-11
46.55	k	58.33	f	81.30	d	Fragmentation & Lysis	TF-Co-N-12
46.77	k	60.71	e	76.63	h	Fragmentation & Lysis	TF-Co-N-13
51.44	g	16.66	n	82.24	c	No Relationship & Fragmentation	TF-Co-N-14
51.44	g	72.61	c	85.04	b	No Relationship & Fragmentation	TF-Co-N-15
50.55	h	28.57	h	71.02	i	Fragmentation	TF-Co-N-16
45.44	f	16.66	n	57.94	m	No Relationship	TF-Co-N-17
50.00	h	22.61	k	78.50	f	Fragmentation & Lysis	TF-Co-N-18
74.88	j	58.33	f	61.68	l	Fragmentation & Lysis	TF-Co-N-19
49.88	h	77.14	a	81.30	d	Fragmentation	TF-Co-N-20
55.55	e	75.42	b	79.43	e	Fragmentation & Lysis	TF-Co-N-21
52.00	g	77.14	a	78.50	f	Fragmentation & Lysis	TF-Co-M-22
48.77	i	76.00	b	88.78	a	No Relationship	TF-Co-M-23
0	o	0	o	0	n		Control

در بررسی مکانیسم میکوپارازیتسم، از میان حالت‌های مختلف برخورد جدایه‌های *T. flavus* با *V. albo-atrum*، ۴۰٪ برخورد، قطعه قطعه و لیز شدن، ۳۳٪ برخورد و قطعه قطعه شدن، ۲۰٪ برخورد و لیز شدن و ۷٪ برخورد، تداخل، قطعه قطعه و لیز شدن محاسبه گردید. هم‌چنین، در مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، ترکیبات فرار و غیرفرار به ترتیب ۴۷،۲۰ و ۱۰۰ درصد کل جدایه‌ها موجب بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* شدند.

### تأثیر مکانیسم‌های مختلف جدایه‌های *T. flavus* روی عامل بیماری پژمردگی وریسلومی سیب‌زمینی

در بررسی تأثیر میکوپارازیتسم جدایه‌های *T. flavus* روی *V. albo-atrum*، محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۵۸/۳۳ – ۸/۳۳ درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Po-K-42 و TF-Po-K-46 موجب گردید (جدول ۴). در این بررسی، حالت نفوذ و تداخل میان ریشه‌های قارچ بیماری‌زا و جدایه‌های *T. flavus*، قطعه‌قطعه و لیز شدن ریشه‌های عامل بیماری‌زا و عدم تشکیل میسلیم تیره (dark mycelium) شبیه مطالعه‌ی قبلی نیز مشاهده شد. این آزمایش نیز، تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *T. flavus* روی *V. albo-atrum*، موجب کاهش رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* و تولید میسلیم هوایی (aerial mycelium) گردید.

در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۸۴/۴۴ درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Po-V-50 و TF-Po-K-45 موجب شد. هم‌چنین، در این بررسی مشخص گردید که سه جدایه‌ی TF-Po-K-39، TF-Po-K-40 و TF-Po-K-42 نه تنها رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* را کاهش نداده بلکه به میزان ۲/۸۵، ۲۰ و ۳۶/۱۹ درصد افزایش رشد آن را تحریک کرده است (جدول ۴). نتایج بررسی تأثیر ترکیبات غیرفرار نشان داد که محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد

گردید. هم‌چنین، در مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، ترکیبات فرار و غیرفرار به ترتیب ۱۰۰، ۴۴ و ۴۸ درصد کل جدایه‌ها موجب بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی رشد پرگنه *V. dahliae* شدند.

### تأثیر مکانیسم‌های مختلف جدایه‌های *T. flavus* روی عامل بیماری پژمردگی وریسلومی گوجه‌فرنگی

در بررسی تأثیر میکوپارازیتسم جدایه‌های *T. flavus* روی *V. albo-atrum*، محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۶۸/۴۲ – ۷/۸۹ درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-To-V-28 و TF-To-V-30 موجب گردید (جدول ۳). در این بررسی، حالت نفوذ و تداخل میان ریشه‌های قارچ بیماری‌زا و جدایه‌های *T. flavus*، قطعه‌قطعه و لیز شدن ریشه‌های عامل بیماری‌زا و عدم تشکیل میسلیم تیره (dark mycelium) نیز مشاهده شد.

در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *T. flavus* روی *V. albo-atrum*، علاوه بر کاهش رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum*، تولید میسلیم هوایی aerial mycelium نیز مشاهده شد. در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۸۵/۰۰ – ۱۸/۳۳ درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-To-V-31 و TF-To-U-35 موجب شد. هم‌چنین، نتایج بررسی تأثیر ترکیبات غیرفرار نشان داد که محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۹۵/۲۲ – ۷۲/۷۷ درصد بوده که بیش‌ترین آن توسط جدایه‌ی TF-To-U-36 و کم‌ترین آن با استفاده از جدایه‌های TF-To-V-26 و TF-To-V-28 اتفاق افتاده است (جدول ۳). بنابراین، نتایج مشخص نمود که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum*، به ترتیب توسط مکانیسم ترکیبات غیرفرار جدایه‌ی TF-To-U-36 و مکانیسم میکوپارازیتسم جدایه‌ی TF-To-V-28 موجب شده است (جدول ۳).

جدول ۳- حالت های مختلف برخورد جدایه های *T. flavus* با *V. albo-atrum* عامل پژمردگی ورتیسلیومی گوجه فرنگی در مکانیسم میکوپارازیتیسم و گروه بندی میانگین های درصد بازدارندگی رشد پرگنه ی *V. albo-atrum* توسط مکانیسم های میکوپارازیتیسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه های مختلف *T. flavus* با آزمون دانکن ( $\alpha=0.01$ ).

Table 3- Different manners of *T. flavus* isolates in relation with *V. albo-atrum*, tomato Verticillium wilt agent, in mycoparasitism mechanism and grouping means of inhibitory percent for *V. albo-atrum* colony growth in mechanisms of mycoparasitism, volatile and non- volatile metabolites production by Duncan test ( $\alpha=0.01$ ).

Inhibitory Percent for <i>V. albo-atrum</i> Colony Growth						Different Manners of <i>T. flavus</i> Isolates	<i>T. flavus</i> Isolates
Non- volatile Metabolites	Volatile Metabolites	Mycoparasitism				in Relation With <i>V. albo-atrum</i> in Mycoparasitism	
73.00	i	54.72	b	60.52	b	Fragmentation & Lysis	TF-To-V-24
74.22	h	45.94	e	21.05	h	Fragmentation & Lysis	TF-To-V-25
72.77	i	46.62	e	47.36	e	Fragmentation	TF-To-V-26
73.33	hi	45.94	e	10.25	j	Fragmentation	TF-To-V-27
72.77	i	45.94	e	7.89	k	Fragmentation & Lysis	TF-To-V-28
77.66	f	33.33	g	42.10	f	Fragmentation & Lysis	TF-To-V-29
80.88	d	50.00	c	68.42	a	Fragmentation & Lysis	TF-To-V-30
80.77	d	85.00	a	55.26	c	Lysis	TF-To-V-31
78.77	e	35.00	f	31.57	g	Fragmentation	TF-To-V-32
83.66	c	31.81	h	60.52	b	Penetration, Fragmentation & Lysis	TF-To-V-33
73.11	i	31.66	h	15.78	i	Fragmentation	TF-To-U-34
94.66	a	18.33	i	47.36	e	Fragmentation	TF-To-U-35
95.22	a	33.33	g	52.63	d	Lysis	TF-To-U-36
75.22	g	18.18	i	52.63	d	Fragmentation & Lysis	TF-To-U-37
92.55	b	48.33	d	52.63	d	Lysis	TF-To-U-38
0	j	0	j	0	l		Control

برابر با ۸۵/۰۰ - ۱۱/۹۴ درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-cu-V-59 و TF-Cu-V-54 موجب شد. هم‌چنین، نتایج بررسی تأثیر ترکیبات غیرفرار نشان داد که محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۴۵/۶۳ - ۹/۰۹ درصد بوده که بیش‌ترین آن توسط جدایه‌ی TF-Cu-V-56 اتفاق افتاده است (جدول ۵). بنابراین، نتایج مشخص نمود که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* به ترتیب توسط مکانیسم ترکیبات فرار جدایه‌ی TF-Cu-V-59 و مکانیسم ترکیبات غیرفرار جدایه‌ی TF-Cu-V-56 موجب شده است (جدول ۵).

در بررسی مکانیسم میکوپارازیتسم، از میان حالت‌های مختلف برخورد جدایه‌های *T. flavus* با *V. albo-atrum*، ۳۷/۵٪ برخورد و قطعه‌قطعه شدن، ۲۵٪ برخورد و لیز شدن، ۲۵٪ برخورد، قطعه‌قطعه و لیز شدن و ۱۲/۵٪ عدم برخورد محاسبه گردید. هم‌چنین، در مکانیسم‌های میکوپارازیتسم و ترکیبات فرار به ترتیب ۸۷/۵ و ۷۵ درصد کل جدایه‌ها موجب بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* شدند، در حالی که در مکانیسم ترکیبات غیرفرار، هیچ یک از جدایه‌ها موجب بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* نگردیدند و بیش‌ترین میزان درصد بازدارندگی ۴۵/۶۳ بود.

### بحث

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که بازدارندگی رشد عوامل بیماری‌زای پژمردگی ورتیسلیومی شامل *V. dahliae* و *V. albo-atrum* در برخی محصولات زراعی نظیر پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای توسط جدایه‌های مختلف *T. flavus* وجود داشته است. این جدایه‌ها از مناطق مختلف کشت محصولات مذکور جداسازی شدند و از طریق مکانیسم‌های آنتاگونیستی میکوپارازیتسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار موجب کاهش معنی‌دار رشد عوامل بیماری‌زای فوق گردیدند. توانایی قارچ *T. flavus* برای اشغال کردن ریزوسفر محصولات فوق

پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۸۹/۲۶ - ۱۴/۷۳ درصد بوده که بیش‌ترین آن توسط جدایه‌ی TF-Po-V-48 و کم‌ترین آن با استفاده از جدایه‌های TF-Po-K-39 اتفاق افتاده است. بنابراین، نتایج مشخص نمود که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* به ترتیب توسط مکانیسم ترکیبات غیرفرار جدایه‌ی TF-To-U-36 و مکانیسم میکوپارازیتسم جدایه‌ی TF-To-V-28 موجب شده است (جدول ۴).

در بررسی مکانیسم میکوپارازیتسم، از میان حالت‌های مختلف برخورد جدایه‌های *T. flavus* با *V. albo-atrum*، ۲۸/۵۷٪ برخورد و قطعه‌قطعه شدن، ۲۸/۵۷٪ برخورد و لیز شدن، ۱۴/۲۸٪ برخورد، ۱۴/۲۸٪ برخورد، قطعه‌قطعه و لیز شدن محاسبه گردید. هم‌چنین، در مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، ترکیبات فرار و غیرفرار به ترتیب ۴۳ و ۴۳ درصد کل جدایه‌ها موجب بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* شدند.

### تأثیر مکانیسم‌های مختلف جدایه‌های *T. flavus* روی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی خیار گلخانه‌ای

در بررسی تأثیر میکوپارازیتسم جدایه‌های *T. flavus* روی *V. albo-atrum*، محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* برابر با ۶۷/۴۴ - ۴۴/۱۸ درصد بود که بیش‌ترین و کم‌ترین آن به ترتیب توسط جدایه‌های TF-Cu-V-54 و TF-Cu-V-56 موجب گردید (جدول ۵). در این بررسی، حالت‌های مختلف نفوذ میان ریشه‌های قارچ بیماری‌زا و جدایه‌های *T. flavus*، قطعه‌قطعه و لیز شدن ریشه‌های عامل بیماری‌زا، عدم برخورد ریشه‌ها با یکدیگر و عدم تشکیل میسلیم تیره (dark mycelium) شبیه مطالعات قبلی مشاهده شد.

در این آزمایش نیز، تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *T. flavus* روی *V. albo-atrum* موجب کاهش رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* و تولید میسلیم هوایی (aerial mycelium) گردید. در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار محدوده‌ی درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum*



غیرفرار و یا فرار برخی از جدایه‌های *T. flavus* روی عوامل بیماری‌زای پژمردگی وریسلیومی نشان داده شد (Huggag & Mohamed, 2007).

عدم تشکیل رنگدانه‌های ملانین در میکرواسکلروت‌ها و سفیدرنگ ماندن آن‌ها یک هفته پس از کشت قارچ بیماری‌زای *V. dahliae* نیز در محیط کشت‌های متأثر از ترکیبات فرار و غیرفرار *T. flavus*، در این تحقیق مشاهده گردید. (Madi et al., 1997) نشان دادند که عدم تشکیل ملانین در میکرواسکلروت‌های *V. dahliae* بر اثر متابولیت‌های *T. flavus* وجود داشته و وقوع بیماری پژمردگی وریسلیومی در تیمارهای متأثر از میکرواسکلروت‌های بدون ملانین در مقایسه با تیمار متأثر از میکرواسکلروت‌های ملانین‌دار کاهش یافته است. بنابراین، با توجه به تحقیقات (Henson et al., 1999) در زمینه‌ی نقش مؤثر ملانین در ورود ریشه‌ی نفوذکننده (Appressorium hyphae) به اپیدرم اندام‌های گیاهی و افزایش بقای میکرواسکلروت‌های عوامل بیماری‌زا، چنین استنباط می‌گردد که جدایه‌های مختلف *T. flavus* می‌تواند در کاهش بیماری‌زایی *V. dahliae* مؤثر باشد. چنانچه، کاهش بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری بلاست برنج (*Magnaporthe grisea*) توسط بازدارنده‌های تشکیل ملانین این قارچ نشان داده شده است (Kurahashi, 2001). در این تحقیق، مکانیسم‌های آنتاگونیستی مشترک جدایه‌های مختلف *T. flavus* مربوط به چهار محصول پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای برای عوامل پژمردگی وریسلیومی، میکوپارازیتسم و تولید ترکیبات فرار بود. در این زمینه نتایج تحقیقات پیشین نیز نشان داده که مکانیسم میکوپارازیتسم عوامل قارچی آنتاگونیست در قطعه‌قطعه و لیز کردن ریشه‌های عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد نظیر *V. albo-atrum*، *V. dahliae* و *F. oxysporum* مداخله داشته است (Deacon, 1991). هم‌چنین، ترکیبات فرار *T. flavus* نظیر الکیل پیرون‌ها و سوربیک اسید دارای تأثیرات آنتاگونیستی روی گونه‌های بیماری‌زای وریسلیوم بوده است (Proksa, 2010).

و کاهش دادن پروپاگول‌های عوامل بیماری پژمردگی وریسلیومی نشان داده شده است (Tjamos et al., 2004). تشخیص ترکیبات شیمیایی موجود در تراوشات ریشه‌ای پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و خیار گلخانه‌ای با استفاده از کروماتوگرافی *High Performance anion-exchange* نشان داده که ترکیبات قندی نظیر گلوکز بخش عمده‌ای از تراوشات ریشه‌ی محصولات مذکور را تشکیل داده است (Lix et al., 2009). این قارچ با واسطه‌ی مکانیسم تولید ترکیبات غیرفرار نظیر آنزیم گلوکز اکسیداز، در حضور گلوکز پراکسید هیدروژن تولید می‌نماید (Kim et al., 1990). این ترکیب برای بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی محصولات زراعی سمی می‌باشد (Murray et al., 1999). بنابراین، با توجه به تحقیقات ذکر شده، جداسازی این قارچ از نمونه‌های خاک مربوط به مناطق کشت محصولات مورد استفاده در تحقیق حاضر دور از انتظار نیست.

مطالعه‌ی مکانیسم میکوپارازیتسم جدایه‌های *T. flavus* نشان داد که نفوذ، تداخل، قطعه‌قطعه و لیز شدن ریشه‌های قارچ بیماری‌زای *V. dahliae* و *V. albo-atrum* توسط جدایه‌های *T. flavus* وجود داشته است. این نتایج، از تحقیقی مشابه در زمینه‌ی تأثیرات آنتاگونیستی *Streptomyces griseus* روی ریشه‌های *Aspergillus flavus* گزارش شده است (Anitha & Rabeeth, 2010). در بخش مطالعه‌ی مکانیسم تولید ترکیبات فرار و غیرفرار، عدم تشکیل میسلیم تیره‌ی *V. albo-atrum* و تولید میسلیم هوایی توسط ترکیبات فرار و غیرفرار نشان داده شد. محققان اثبات کردند که متابولیت‌های فرار و غیرفراری نظیر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجب مهار رشد ریشه‌ها و رویش اسپورهای قارچ (*Botrytis cinerea*) عامل بیماری کپک خاکستری) شده و توانایی بیماری‌زایی آن را کاهش داده است (Hur et al., 2003). نتایج برخی تحقیقات نشان داده که در برخی موارد، ضمن مطالعه‌ی مکانیسم تولید ترکیبات فرار و یا غیرفرار جدایه‌های آنتاگونیست، این جدایه‌ها سبب تحریک افزایش رشد جدایه‌های بیماری‌زا نیز شده‌اند چنانچه در تحقیق حاضر، تأثیر مثبت ترکیبات

جدول ۴- حالت‌های مختلف برخورد جدایه‌های *T. flavus* با *V. albo-atrum* عامل پژمردگی ورتیسلیومی سیب‌زمینی در مکانیسم میکوپارازیتسم و گروه‌بندی میانگین‌های درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* توسط مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های مختلف *T. flavus* با آزمون دانکن ( $\alpha=0.01$ ).

Table 4- Different manners of *T. flavus* isolates in relation with *V. albo-atrum*, potato Verticillium wilt agent, in mycoparasitism mechanism and grouping means of inhibitory percent for *V. albo-atrum* colony growth in mechanisms of mycoparasitism, volatile and non-volatile metabolites production by Duncan test ( $\alpha=0.01$ ).

Inhibitory Percent for <i>V. albo-atrum</i> Colony Growth						Different Manners of <i>T. flavus</i> Isolates in Relation With <i>V. albo-atrum</i> in Mycoparasitism	<i>T. flavus</i> Isolates
Non- volatile Metabolites		Volatile Metabolites		Mycoparasitism			
14.73	j	2.85	j	16.66	h	Fragmentation & Lysis	TF-Po-K-39
25.41	i	-20.00	k	38.88	e	Fragmentation	TF-Po-K-40
25.46	i	37.14	f	44.44	c	Lysis	TF-Po-K-41
77.00	b	-36.19	l	8.33	i	No Fragmentation & No Lysis	TF-Po-K-42
51.57	d	47.61	e	16.66	h	Fragmentation & Lysis	TF-Po-K-43
29.58	h	31.90	g	41.66	d	Fragmentation	TF-Po-K-44
76.66	b	0	i	36.11	f	Lysis	TF-Po-K-45
72.64	c	4.16	h	58.33	a	Penetration	TF-Po-K-46
46.25	e	61.11	d	33.33	g	Fragmentation	TF-Po-K-47
89.26	a	61.11	d	44.44	c	No Fragmentation & No Lysis	TF-Po-V-48
43.98	f	81.11	c	36.11	f	Lysis	TF-Po-V-49
50.74	d	84.44	a	36.11	f	Fragmentation	TF-Po-V-50
31.38	g	82.77	b	36.11	f	Penetration	TF-Po-V-51
25.55	i	82.77	b	47.22	b	Lysis	TF-Po-V-52
0	k	0	i	0	j	-	Control

جدول ۵- حالت‌های مختلف برخورد جدایه‌های *T. flavus* با *V. albo-atrum* عامل پژمردگی ورتیسلیومی خیار گلخانه‌ای در مکانیسم میکوپارازیتسم و گروه‌بندی میانگین‌های درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی *V. albo-atrum* توسط مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های مختلف *T. flavus* با آزمون دانکن ( $\alpha=0.01$ ).

Table 5- Different manners of *T. flavus* isolates in relation with *V. albo-atrum*, greenhouse cucumber Verticillium wilt agent, in mycoparasitism mechanism and grouping means of inhibitory percent for *V. albo-atrum* colony growth in mechanisms of mycoparasitism, volatile and non-volatile metabolites production by Duncan test ( $\alpha=0.01$ ).

Inhibitory	Percent	forV.	<i>albo-atrum</i>	Colony Growth	Different Isolates	Manners in Relation With <i>T. flavus</i> <i>albo-atrum</i> in Mycoparasitism	<i>T. flavus</i> Isolates
Non-volatile Metabolites		Volatile Metabolites		Mycoparasitism			
35.00	b	22.22	f	53.48	c	Lysis	TF- Cu-V- 53
45.63	a	11.94	g	44.18	d	Fragmentation	TF- Cu-V- 54
27.77	c	65.67	d	53.48	c	Fragmentation & Lysis	TF- Cu-V- 55
9.09	f	51.11	e	67.44	a	Fragmentation	TF- Cu-V- 56
13.63	e	82.22	c	58.13	b	Fragmentation & Lysis	TF- Cu-V- 57
13.42	e	82.77	bc	53.48	c	Fragmentation	TF- Cu-V- 58
22.22	d	85.00	a	53.48	c	No Relationship	TF- Cu-V- 59
27.55	c	83.33	b	53.48	c	Lysis	TF- Cu-V- 60
0	g	0	h	0	e		Control



ارتباط میان این مکانیسم‌ها مفهومی ندارد. نتایج تحقیقات پیشین نشان داده که فعالیت آنتاگونیستی هریک از مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار از طریق متابولیت‌های خاص خود صورت می‌پذیرد. این ترکیبات برای مکانیسم ترکیبات فرار، اتیلنی، هیدروژنی، سیانیدی و آلدیدی می‌باشد، در حالی که برای ترکیبات غیرفرار، آنزیم‌هایی نظیر گلوکز اکسیداز، بتاگالاکتوزیداز و بتاگلوکزیلوزیداز معرفی شده است. هم‌چنین، ترکیبات خاص مکانیسم میکوپارازیتسم بیش‌تر به آنزیم‌های گروه کیتیناز تعلق داشته و این گروه از آنزیم‌ها در بروز مکانیسم میکوپارازیتسم سهم بیش‌تری را به خود اختصاص داده است (Proksa, 2010).

### سپاسگزاری

بدین وسیله، نگارندگان از همکاری‌های بی‌شائبه‌ی جناب آقای دکتر حسن عسکری، رئیس سابق مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، جهت اجرای این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

هم‌چنین، با توجه به نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر می‌توان اظهار داشت که علاوه بر مکانیسم‌های آنتاگونیستی مشترک میان جدایه‌های مختلف *T. flavus* مربوط به هر سه محصول مورد مطالعه، جهت فعالیت آنتاگونیستی این جدایه‌ها روی هر یک از عوامل بیماری‌زا یک یا دو مکانیسم دیگر نیز حسب محصول وجود داشته است. در این زمینه تحقیقاتی در زمینه‌ی اختلاف فعالیت و مکانیسم‌های آنتاگونیستی میان جدایه‌های *T. harzianum* و *T. flavus* نشان داده که این اختلاف‌ها به دلیل تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق کشت محصولات زراعی مختلف بوده است (Whipps, 2001). از طرف دیگر، با توجه به جمعیت فراوان جدایه‌های مختلف *T. flavus* در ریزوسفر گیاهان زراعی مختلف نظیر پنبه، گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و بادنجان (Marois et al., 1984)، علاوه بر استفاده‌ی این جدایه‌ها از ترکیبات قندی موجود در تراوشات ریشه‌ای، این ترکیبات که بر حسب محصول متنوع بوده، موجب القای مکانیسم‌های متفاوتی در جدایه‌های *T. flavus* نیز شده است (Roberts & Lohrke, 2003). متابولیت‌های حاصله از مکانیسم‌ها که به واسطه‌ی همین ترکیبات، فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها رخ می‌دهد، متفاوت بوده و از این‌رو، اصلاً، برقراری

### References

- Aminae, M. M., Mansouri, B. & Ershad, D. 2006. A study on Verticillium wilt of potato in Kerman province. Proceedings of the 17<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, Iran, 163.
- Anitha, A. & Rabeeth, M. 2010. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. African Journal of Plant Science. 4: 61-66.
- Butterfield, E. J. & De Vay, J. E. 1977. Assessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. Phytopathology. 67: 1073-1078.
- Christen, A. A. 1981. A selective medium for isolating *Verticillium albo-atrum* from soil. Phytopathology. 72: 47-49.
- Deacon, J. W. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne plant pathogens. Biocontrol Sciences Technology. 1: 5-20.
- Esmailzadeh-Hosseini, S. A., Sarpeleh, A., Fatahi, M. & Ghaiumi-Mohammady, M. 2006. Identification of soilborn phytopathogenic fungi of greenhouse cucumber in Yazd province. Proceedings of the 17<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, Iran, 175.

- Hamdollah-Zadeh, A. 1993.** Properties of defoliant and non-defoliant strains of *Verticillium dahliae* the causal agent of cotton wilt in northern Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 29: 125-131. (In Persian with English Summary).
- Hawksworth, D. L. & Talboys, P. W. 1970.** C. M. I. descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 255. *Verticillium albo-atrum*, No. 256. *Verticillium dahliae*. CAB, Kew, England.
- Henson, J. M., Butler, M. J. & Day, A. W. 1999.** The dark side of the mycelium melanins of phytopathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology. 37: 447-471.
- Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q. & Yang, X. 2011.** *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedling mainly by the mycoparasitism. Applied Microbiology and Biotechnology. 91: 741-755.
- Huggag, W. M. & Mohamed, H. A. 2007.** Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 1: 7-12.
- Hur, J. S., Oh, S. O., Jung, J. S., Koh, Y. J., Park, J. G. & Park, J. C. 2003.** Antifungal properties of *Eucayptus darlympleana* against post harvest pathogens of kiwifruits. ISHS Acta Horticulturae 610: V International Symposium on Kiwifruit, 25 June, Wuhan, China, 66.
- Inglis, G. D. & Kawchuk, L. M. 2002.** Comparative degradation of Oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. Canadian Journal of Microbiology. 48: 60-70.
- Kurahashi, Y. 2001.** Melanin biosynthesis inhibitors (MBI<sub>s</sub>) for control of rice blast. Pesticide Outlook. 12: 32-35.
- Kheiri, A. & Fatahi, M. 2010.** Evaluation of *Verticillium* wilt tolerance in different cotton cultivars. Journal of Research in Agricultural Science. 6: 57-61.
- Kim, J. T., Park, I. H., Lee, H. B., Hahm, Y. I. & Yu, S. H. 2001.** Identification of *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum* causing wilt of tomato in Korea. The Plant Pathology Journal. 17: 222-226.
- Kim, K. K. A. & Fravel, D. R. 1990.** Glucose oxidase as the antifungal principle of talaron from *Talaromyces flavus*. Canadian Journal of Microbiology. 36: 760-764.
- Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E. & Subbarao, K. V. 2009.** Diversity, Pathogenicity and Management of *Verticillium* species. Annual Review of Phytopathology. 47: 39-62.
- Knudsen, I. M. B., Hockenhull, J., Jensen, D. F., Gerhardson, B., Hokeberg, M., Tahuonen, R., Teperi, E., Sundheim, L. & Henriksen, B. 1997.** Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. European Journal of Plant Pathology. 103: 775-784.
- Lix, G., Liu, B., Liu, D. D., Han, Z. M., Zhou, K. X. & Zheng, Y. P. 2009.** Effects of transgenic insect resistant cotton root exudates on the growth of *Verticillium dahliae* Kleb. Ying Yong Sheng Tal Xue Bao. 20: 157-162.
- Madi, L., Katan, T., Katan, J. & Henis, Y. 1997.** Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. Phytopathology. 87: 1054-1060.
- Malik, N. K. & Milton, J. M. 1980.** Survival of *Verticillium* in monocotyledonous plants. Transactions of the British Mycological Society. 75: 496-498.

- Marois, J. J., Fravel, D. R. & Papavizas, G. C. 1984. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry. 16: 387-390.
- Murray, F. R., Llewellyn, D., McFadden, H., Last, D., Dennis, E. S. & Peacock, W. J. 1999. Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. Molecular Breeding. 5: 219-232.
- Naraghi, L., Heydari, A., Karimi Roozbahani, A. & Ershad, D. 2003. Isolation of *Talaromyces flavus* from cotton fields in Gorgan and its antagonistic effects on *Verticillium dahliae*, the causal agent of cotton wilt. Iranian Journal of Plant Pathology. 39: 31-34. (In Persian with English Summary).
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S., Razavi, M. & Jahanifar, H. 2010. Study on antagonistic effects of *Talaromyces flavus* on *Verticillium albo-atrum*, the causal agent of potato wilt disease. Crop Protection. 29: 658-662
- Pegg, G. F. & Brady, B. L. 2002. Verticillium wilts. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Proksa, B. 2010. *Talaromyces flavus* and its metabolites. Chemical Papers. 64: 696-714.
- Roberts, D. P. & Lohrke, S. M. 2003. Programs in biological control of plant diseases. Pest Management Science. 59: 654-664.
- Tjamos, E. C., Tsitsigiannis, D. I., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P. & Katinakis, P. 2004. Selection and Screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of Solanaceous hosts. European Journal of Plant Pathology. 110: 35-44.
- Van Elsas, J. D., Jansson, J. K. & Trevors, J. T. 2007. Modern soil microbiology II. CRC Press- Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, USA.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany. 52: 487-511.
- Wright, E. R., Zapata, R., Delfino, O. S., Lopez, M. V. & Serrile, M. 1990. Efficacy *in vitro* of antagonists *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. Review of Plant Pathology. 69: 2758.

---

**Study on some antagonistic mechanisms of *Talaromyces flavus* against *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum* , the causal agents of wilt disease in several important crops**

Laleh Naraghi<sup>1</sup>, Asghar Heydari<sup>2</sup>, Saeed Rezaee<sup>1</sup> and Mohammad Razavi<sup>2</sup>

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

2- Plant Disease Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Laleh Naraghi, lale\_naraghi@yahoo.com

---

Received: Apr. 10, 2012

1 (1) 13-28

Accepted: Jan.15.2013

---

**Abstract**

Verticillium wilt is one of the most important diseases of cotton, tomato, potato and greenhouse cucumber that causes serious losses in these crops. Biological control could be an effective strategy for controlling this disease. In this study, for the investigation of antagonistic mechanisms of *Talaromyces flavus*, first, pathogenic agents and antagonistic fungus were isolated from cultivated regions of above-mentioned crops using Komada and TF culture media respectively. In next step, antagonistic mechanisms of *T. flavus* including mycoparasitism, volatile metabolites production and non-volatile metabolites production were studied separately. In this study, sixty *T. flavus* isolates were used from which 23, 15, 14 and 8 isolates belonged to cotton, tomato, potato and greenhouse cucumber respectively. For cotton and potato wilt disease caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum* respectively, maximum inhibitory percents (81.51 and 64.93%) were mediated by TF-Co-G-1 and TF-Po-V-48 respectively. Non-volatile metabolites played the most important role in their antagonistic activity. However, for tomato and greenhouse cucumber wilt disease caused by *V. albo-atrum*, maximum inhibitory percents (73.67 and 54.78%) were mediated by TF-To-V-31 and TF-Cu-V-60 respectively. According to the results, the most effective antagonistic mechanisms of these isolates was volatile metabolites production.

**Key Words:** *Talaromyces flavus*, Antagonistic mechanisms, *Verticillium dahliae*, *Verticillium albo-atrum*, Cotton, Potato, Tomato, Greenhouse Cucumber

---

## استفاده از سیستم بینایی ماشین در ارزیابی توانایی کنترل بیولوژیک دو مخمر آنتاگونیست در تلفیق با سیلیکون علیه کپک آبی میوه سیب

لیلا فراهانی<sup>۱</sup>، حسن رضا اعتباریان<sup>۱</sup>، حدیث محسنی تکلو<sup>۲</sup>، حشمت‌اله امینیان<sup>۱</sup>، نوازاله صاحبانی<sup>۱</sup>

۱- گروه گیاه پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشکده مهندسی کامپیوتر، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: لیلا فراهانی، Ifarahani@alumni.ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۵

۳۹-۲۹ (۱) ۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۵

### چکیده

در حال حاضر اندازه‌گیری شدت بیماری در مراکز پژوهشی با استفاده از وسایل دستی و یا از طریق مقیاس‌دهی چشمی بیان می‌شود. با گسترش چشم‌گیر علوم رایانه‌ای در اندازه‌گیری دقیق و سریع شدت بیماری، پژوهشی به‌منظور ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیک دو مخمر *Pichia guilliermondii* (A6) و *Candida membranifaciens* (A4) در تلفیق با سیلیکون (Si) در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ و ترکیب آن‌ها در کنترل جدایه‌های P1 و P2 از قارچ *Penicillium expansum* در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که مخمرهای A6 و A4 به‌طور معنی‌داری سبب کنترل کپک آبی میوه سیب شدند. تلفیق این مخمرها با Si کنترل به‌مراتب بیشتر بیماری را در پی داشت. استخراج خصوصیات آماری از ناحیه‌ی بافت آلوده در کانال‌های قرمز R، سبز G و آبی B تصاویر دیجیتال آن‌ها نشان داد که میانگین آبی  $R^2=0/70$  بیشترین اهمیت و انحراف معیار سبز با  $R^2=0/43$  کمترین اهمیت را در شناسایی گروه‌های آماری شدت بیماری داشتند. تحلیل تشخیص خطی با استفاده از صفات میانگین آبی، میانگین سبز، انحراف معیار آبی، انحراف معیار قرمز، ضریب کشیدگی سبز، انحراف معیار سبز سبب شناسایی گروه‌های آماری شدت بیماری با دقت ۸۰٪ شد. نتایج کلی این پژوهش نشان می‌دهد که رنگ توصیف‌گر قدرتمندی است که می‌توان از آن برای اندازه‌گیری شدت بیماری و اندازه‌گیری میزان کنترل‌کنندگی بیماری کپک آبی میوه سیب (در مقایسه با شاهد) بهره‌گرفت.

واژه‌های کلیدی: LDA، *Penicillium expansum*، *Candida membranifaciens*، *Pichia guilliermondii*

### مقدمه

سیستم بینایی ماشین با افزودن یک دوربین دیجیتال به رایانه به‌وجود می‌آید. با این اتصال نخست تصاویر اجسام مورد نظر به‌وسیله دوربین گرفته شده و سپس به‌صورت یک ماتریس اعداد در حافظه‌ی کامپیوتر ذخیره می‌شود. این تصاویر حاوی اطلاعات بسیار زیاد و ارزشمندی از خواص مورفولوژیکی، مرتبط با انواع کانال‌های رنگی و نیز طیف بافتی می‌باشند. سپس این تصاویر با استفاده از برنامه‌های مختلف رایانه‌ای پردازش شده و در نهایت اطلاعات کمی و کیفی از آن‌ها به‌دست می‌آید. در واقع سیستم بینایی ماشین از طریق آنالیز تصویر روشی مطمئن برای دستیابی به

در حال حاضر اندازه‌گیری شدت بیماری در مراکز پژوهشی با استفاده از وسایل دستی نظیر خط‌کش و کولیس و یا از طریق مقیاس‌دهی چشمی بیان می‌شود. اندازه‌گیری به این شیوه بسیار وقت‌گیر بوده و زمینه‌ی ذهنی، تجربه، دقت و دیگر محدودیت‌های فیزیکی در تعیین اندازه‌گیری تأثیرگذار است. از طرفی با گسترش چشم‌گیر علوم و فن‌آوری رایانه‌ای، و امکان استفاده از این دستگاه در اندازه‌گیری کمیت‌های فیزیکی، رنگی و بافتی محصولات، استفاده هر چه بیشتر از این فن‌آوری ضروری به‌نظر می‌رسد.

برداشت سیب در انبار می‌باشد (Pierson *et al.*, 1971). در این بیماری مناطق پوسیده، نرم، آبکی و به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره می‌شوند. سطح پوسیدگی‌های قدیمی‌تر توسط یک لایه سفید رنگ پوشیده می‌شود که این لایه اسپور به تدریج به رنگ سبزآبی در می‌آید. لکه‌های بیماری از لحاظ بافت و رنگ از قسمت‌های سالم کاملاً قابل تشخیص و متمایزند. لکه‌ی حاصل از بیماری روی میوه‌ی سیب گاهی دایره‌ی کامل نمی‌باشد و حتی در آلودگی‌های شدید، این ناحیه محدب می‌باشد

کنترل بیولوژیک از طریق کاربرد عوامل باکتریایی، قارچی و مخمری آنتاگونیست یکی از روش‌های موفق در کنترل بیماری‌های پس از برداشت بوده که به‌عنوان روش جایگزین قارچکش‌های سنتزی در انبار مورد بررسی قرار گرفته است (Wilson & Wisniewski, 1989). مخمرها با داشتن ویژگی‌هایی چون عدم تولید مایکوتوکسین‌ها، داشتن نیازهای غذایی ساده، دامنه‌ی تحمل بالا نسبت به تغییرات درجه‌ی حرارت، سرعت رشد بالا در سوبستراهای با ارزش غذایی کم، و هم‌چنین دارا بودن مقادیر زیادی ویتامین، عناصر معدنی و هم‌چنین تاثیرات مفید آن‌ها در تغذیه به‌عنوان یکی از عوامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری‌های بعد از برداشت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Druvefors, 2004). افزایش عملکرد این میکروارگانیسم‌ها با سایر عوامل کنترلی از دیگر ویژگی‌های مثبت مخمرها در سیستم‌های کنترل تلفیقی می‌باشد (Lima *et al.*, 1998). به‌منظور بهبود و افزایش کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا، میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست را با سطوح کمی از مواد شیمیایی ایمن مانند کیتوزان (El-Ghaouth *et al.*, 2000)، قند 2-deoxy-D-glucose (El-Ghaouth *et al.*, 2000)، اسید سالیسیلیک (Farahani & Etebarian, 2012)، سیلیکون (Farahani *et al.*, 2012)، متیل جاسمونات (Yao & Tian 2005)، بیکربنات سدیم (Yao *et al.* 2004) تلفیق کرده‌اند.

در حال حاضر ارزیابی شیوه‌ی کنترل اتخاذ شده و کارایی عوامل آنتاگونیست در کنترل بیماری کپک آبی سیب بر اساس مساحت لکه‌ی آلوده ایجاد شده روی میوه‌ی

اطلاعات زیاد از یک عکس دیجیتال می‌باشد که این اطلاعات به‌صورت دقیق، هدفمند، کمی و با سرعت بالا به‌دست می‌آیند (Nilson, 1995).

تحقیقات زیادی در زمینه‌ی کاربرد بینایی ماشین در دانش بیماری‌شناسی گیاهی موجود است. Suzuki *et al.*, (2006) به بررسی شکل سلول مخمری، نحوه‌ی جوانه‌زنی، شکل هسته و موقعیت هسته در درون سلول و نیز توزیع آکتین در مخمرهای *Saccharomyces cerevisiae* و *Schizosaccharomyces pombe* با استفاده از تکنیک پردازش تصویر و با استفاده از نرم‌افزارهای CalMorph و F-CalMorph پرداختند. Chakraborty & Tucker (1997) از تکنیک پردازش تصویر برای ارزیابی شدت بیماری سوختگی آلترناریایی آفتابگردان و هم‌چنین زنگ برگ جو با عامل *Puccinia caronata* f.sp. *avenae* استفاده کردند. تعداد و اندازه لکه‌های ایجاد شده در اثر بیماری از طریق آنالیز عکس برگ محاسبه و با ارزیابی چشمی مقایسه شد. بر اساس نتایج آن‌ها ارتباط خطی معنی‌داری بین دو روش در تعداد لکه‌های زنگ در برگ جو و هم‌چنین شدت بیماری سوختگی آلترناریایی آفتابگردان وجود داشت. Ahmad *et al.*, (1999) از تکنیک پردازش تصویر برای طبقه‌بندی بذور سویای آلوده به عوامل قارچی بر اساس خصوصیات RGB استفاده کردند. در تحقیقات آن‌ها بذور سالم سویا از بذور آلوده به سه بیماری قارچی (*Alternaria* spp., *Cercospora* spp., *Fusarium* spp.) دو بیماری ویروسی (soybean mosaic potyvirus (black) و (soybean mosaic potyvirus (brown) و هم‌چنین بذور نارس سویا با میانگین دقت نسبی ۸۸٪ از یکدیگر تفکیک شدند. Bock *et al.*, (2008) به بررسی ارزیابی شدت بیماری شانکر مرکبات از طریق مشاهده‌ی بصری از طریق کارشناس و ارزیابی دقیق بیماری با استفاده از نرم‌افزار پردازش تصویر پرداختند. آن‌ها گزارش کردند ارزیابی شدت بیماری از طریق کارشناس در تعداد زیادی نمونه‌ی بیماری اغلب به‌سمت برآوردی بیش از مقدار واقعی می‌باشد.

بیماری کپک آبی سیب با عامل *Penicillium expansum* Link یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از

میلی لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه‌ور گردیدند. سپس سوسپانسیون  $1 \times 10^5$  کنیدی در هر میلی لیتر آب مقطر تهیه شد.

**تهیه سوسپانسیون آنتاگونیست:** در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر از محیط NYDA (Nutrient Yeast Dextrose Agar) استریل یک لوپ از سلول‌های مخمر افزوده شد. ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس سلول‌های مخمر با سانتریفیوژ  $3000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه از محیط مایع جدا شده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد (El-Ghaouth et al., 1998). پس از آن با استفاده از لام هماسیتومتر سلول‌های مخمری شمارش و سوسپانسیون مخمرها در غلظت  $10^8$  سلول در میلی لیتر تهیه گردید.

سیلیکون (Si) به فرم سیلیکات سدیم از شرکت Sigma خریداری شد. سیلیکون در آب حل شده، با استفاده از فیلتر میکروپور (ساخت شرکت Starius) استریل و سپس با استفاده از آب مقطر استریل در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ وزن/حجم تهیه گردید.

### بررسی تأثیر مخمرهای آنتاگونیست در تلفیق با غلظت‌های مختلف Si در کنترل کپک آبی سیب:

میوه سیب رقم گلدن دلشز در اندازه‌های یکسان، کاملاً سالم و بدون هیچ گونه عارضه‌ی فیزیولوژیک تهیه شد. برای ضد عفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۱٪ غوطه‌ور شده و سپس دو بار با آب مقطر استریل شست و شو داده شده و در نهایت به مدت ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. سپس با استفاده از یک سوزن استریل روی هر میوه سه چاهک به قطر ۲/۵ میلی متر و عمق ۳ میلی متر ایجاد گردید. هر چاهک با ۲۰ میکرو لیتر از ۱) سوسپانسیون مخمر A4 (۲) سوسپانسیون مخمر A6 (۳) Si در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ (۴) سوسپانسیون مخمر A4 در تلفیق با Si در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ (۵) سوسپانسیون مخمر A6 در تلفیق با Si در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ (۶) آب مقطر استریل تیمار شد. سیب‌های تیمار شده در داخل ظروف پلاستیکی گذاشته و درون کیسه‌ی پلاستیکی قرار

سیب قابل سنجش است. از آنجا که اندازه گیری تعداد زیادی نمونه‌ی سیب به طور دستی و با استفاده از کولیس، کاری وقت گیر و خسته کننده می باشد، بنابراین یافتن راهی به منظور خود کار کردن فرآیند ارزیابی شدت بیماری ضروری به نظر می رسد. این تحقیق اولین گزارش از کاربرد بینایی ماشین و هوش مصنوعی در اندازه گیری شدت بیماری می باشد. با توجه به کار آایی سیستم بینایی ماشین در اندازه گیری ویژگی های رنگی و نیز مساحت ناحیه ی آلوده میوه ی سیب اهداف این تحقیق شامل ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیکی دو مخمر *P. guilliermondii* A6 و *C. membranifaciens* (A4) به تنهایی و در ترکیب با سطوح مختلف سیلیکون در کنترل کپک آبی سیب در دمای ۲۰ درجه ی سلسیوس و نیز تشخیص شدت آلودگی در میوه های سیب با توجه به ویژگی های رنگی RGB ناحیه ی آلوده می باشد.

### مواد و روش های پژوهش

**میوه ی سیب:** جهت انجام آزمایشات، میوه های سیب رقم Golden Delicious از میدان های میوه و تره بار شهرستان پاکدشت تهیه شد. سیب های انتخاب شده بدون هر گونه زخم، لهدگی و یا سوراخ بودند.

### انتخاب جدایه ی قارچ عامل بیماری و مخمر

**آنتاگونیست:** دو جدایه ی قارچ *Penicillium expansum* P1, P2 و دو جدایه ی مخمر *Pichia guilliermondii* A6 و *Candida membranifaciens* A4 از آزمایشگاه بیماری شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید. قدرت بیماری زایی جدایه ی قارچی با استفاده از تست بیماری زایی تعیین شد. قابلیت آنتاگونیستی این دو مخمر نیز در کنترل کپک آبی میوه ی سیب بررسی و به عنوان دو جدایه ی کارا و مؤثر گزارش گردید (Gholamnejad, 2009).

### تهیه ی سوسپانسیون قارچ عامل بیماری: از کشت

۷-۱۰ روزه ی قارچ عامل بیماری جهت تهیه ی سوسپانسیون استفاده شد. یک لوپ از اسپور قارچ عامل بیماری در ۱۰



مقدار خاکستری کمتر از آستانه، ROI را تشکیل داده و بقیه به عنوان پس زمینه در نظر گرفته شدند که نتیجه آن ایجاد یک تصویر باینری (سفید و سیاه) بود (شکل ۱-د). در پایان، خصوصیات آماری میانگین (Average)، انحراف معیار (Standard Deviation)، ضریب چولگی (Skewness) و ضریب کشیدگی (Kurtosis) از ناحیه باینری در تصاویر RGB استخراج شد. در مد رنگی RGB (شکل ۲)، تمام رنگ‌ها از ترکیب سه رنگ پایه‌ی قرمز (R)، سبز (G) و آبی (B) ساخته می‌شوند که به هر رنگ پایه‌ی عددی بین ۰ تا ۲۵۵ اختصاص می‌یابد.

آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS ver.9 انجام شد. ابتدا داده‌های به دست آمده مورد تجزیه‌ی واریانس قرار گرفتند. سپس تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردیدند. سپس گروه‌های به دست آمده به عنوان گروه‌های بیماری‌زا در نظر گرفته شده و تیمارهای مربوط به هر گروه به عنوان تکرارهای گروه در نظر گرفته شدند. به منظور تشخیص گروه‌های بیماری‌زا با استفاده از آنالیز عکس آن‌ها، از روش آنالیز تشخیص خطی فیشر و با روش گام به گام (stepwise discriminant) استفاده گردید. در این خصوص تعداد نمونه‌های هر گروه به دو دسته داده‌های آموزشی<sup>۱</sup> و داده‌های آزمایشی<sup>۲</sup> تقسیم شدند که از داده‌های دسته اول برای آموزش سیستم و از داده‌های دسته دوم برای آزمون کارایی سیستم استفاده شده است (جدول ۱). در مرحله‌ی اول صفات مهم و تأثیرگذار در کار شناسایی با استفاده از رویه‌ی stepdisc نرم افزار SAS و براساس روش Wilks' Lambda شناسایی شدند و صفاتی که تأثیر کمی در شناسایی داشتند حذف شدند. این کاهش خواص ساختاری باعث کم شدن محاسبات و کاهش پیچیدگی روابط در حین تشخیص گونه‌ها گردید. سپس تحلیل تشخیص خطی (LDA) براساس این خصوصیات انجام گرفت.

داده شدند. هر تیمار دارای چهار تکرار بود. با اسپری کردن آب استریل در درون کیسه‌ها رطوبت نسبی داخل آن‌ها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد (Vero et al., 2002). پس از ۲۴ ساعت به درون هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شده و سپس سیب‌ها در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند.

**آنالیز تصویر:** در پایان روز پانزدهم از بافت آلوده سیب‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال عکسبرداری شد (شکل ۱ الف). به منظور کاهش نویز و اثرات نور محیط از یک جعبه با ابعاد ۳۴×۳۴×۳۴ سانتی متر مکعب با نور تنظیم شده استفاده گردید. نور سیستم توسط یک لامپ فلوروسنت گرد و دو لامپ فلوروسنت موازی تأمین شد. این جعبه دارای دریچه‌ای برای قرار دادن سیب‌ها در محل مخصوص خود بود. فاصله‌ی بین سطح تصویربرداری و دوربین در این جعبه قابل تنظیم بود. از یک دوربین دیجیتال با فاصله‌ی ۲۴ سانتی متر از سطح تصویربرداری استفاده شد. تصاویر تهیه شده با استفاده از جعبه ابزار پردازش تصویر نرم افزار Matlab 2008a آنالیز شدند.

**استخراج ناحیه‌ی آلودگی:** ناحیه‌ی مورد نظر که به اصطلاح roi (region of interest) نامیده می‌شود شامل ناحیه‌ای از بافت سیب است که در اثر آلودگی قهوه‌ای شده است (شکل ۱-الف). این ناحیه را می‌توان با قطعه‌بندی تصویر دیجیتال و طی مراحل زیر استخراج کرد:

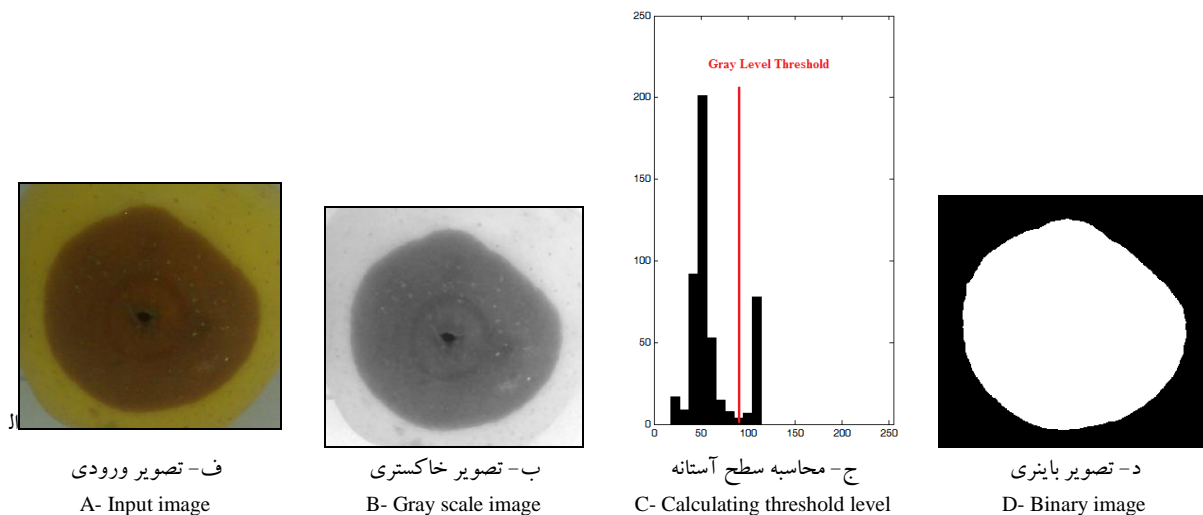
در مرحله‌ی اول تصویر رنگی ورودی به یک تصویر خاکستری تبدیل شد (شکل ۱-ب). در مرحله‌ی دوم سطح آستانه تصویر، بر اساس آنالیز هیستوگرام، محاسبه گردید. آستانه حدی از تصویر خاکستری می‌باشد که نمودار هیستوگرام را به دو بخش تقسیم می‌کند. بخش اول با سطوح خاکستری کمتر به عنوان Region Of Interest (ROI) و بخش دیگر به طور کامل به عنوان پس زمینه شناسایی شد (شکل ۱-ج).

در مرحله‌ی سوم از آستانه‌ی محاسبه شده برای قطعه‌بندی تصویر ورودی استفاده شد. همه‌ی پیکسل‌ها با

<sup>۱</sup> Data Training

<sup>۲</sup> Data Test

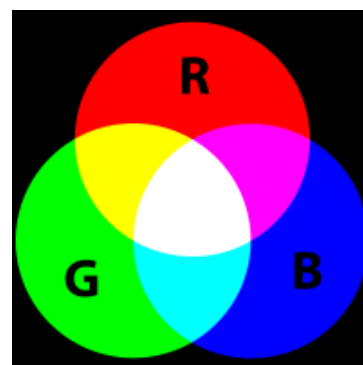




شکل ۱- مراحل قطعه‌بندی و استخراج roi (region of interest)

Fig. 1. Segmentation steps and roi (region of interest) extraction.

سبب *P. guilliermondii* A6 و *C. membranifaciens* A4 کنترل بهتر بیماری حاصل از جدایه‌های P1 و P2 شد. تلفیق کردن مخمرهای *C. membranifaciens* A4 با سیلیکون در غلظت‌های ۰/۵٪، ۰/۳٪ و ۰/۱٪ سبب بهبود چشم‌گیری در کاهش بیماری حاصل از جدایه‌های P1 شد و اختلاف معنی‌داری بین تلفیق Si با مخمر *C. membranifaciens* A4 در کنترل جدایه‌ی P2 مشاهده نگردید. هم‌چنین اختلاف معنی‌داری بین مخمر *P. guilliermondii* A6 در تلفیق با غلظت‌های مختلف Si در کنترل جدایه‌های عامل بیماری مشاهده نگردید ( $p < 0/05$ ) (شکل ۳). نتایج سایر محققین نیز نشان‌دهنده‌ی کارآیی مخمرهای آنتاگونیست در کنترل کپک آبی میوه‌ی سیب می‌باشد (Gholamnejad *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 1999). توانایی مخمرها در کنترل بیولوژیک بیماری‌ها را به رقابت مخمرها بر سر غذا و فضا، تولید موادی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز القای مقاومت نسبت داده‌اند (Droby *et al.* 1989).

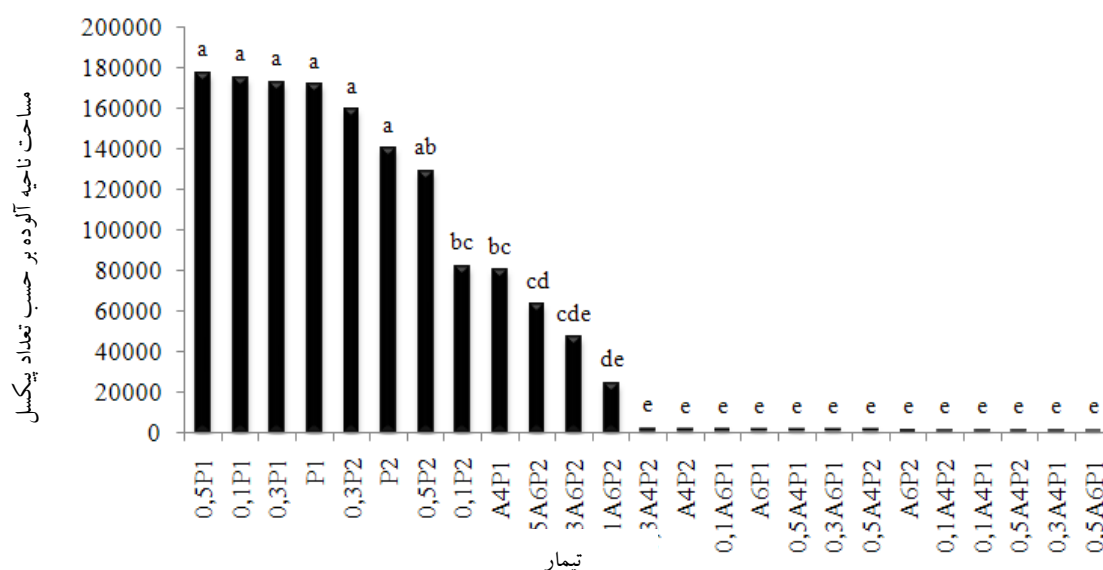


شکل ۲- فضای رنگی RGB.

Fig. 2. RGB color space.

## نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در سطح ۱ درصد وجود داشت. مقایسه‌ی میانگین مساحت ناحیه‌ی آلودگی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که کاربرد سیلیکون به‌تنهایی تأثیر چندانی در کنترل بیماری کپک آبی نداشت. استفاده از مخمرهای آنتاگونیست



شکل ۳- مساحت ناحیه‌ی آلوده در سیب‌های تیمار شده با مخمرهای (A6) *Pichia guilliermondii*، سیلیکون (Si)، *Candida membranifaciens* (A4)، در غلظت‌های ۰/۱٪، ۰/۳٪ و ۰/۵٪ و ترکیب آن‌ها در کنترل جدایه‌های P1 و P2 از قارچ *Penicillium expansum* در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس هر تیمار دارای چهار تکرار بود. بین حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌دار وجود ندارد ( $p < 0.05$ ).

Fig. 3- Infected area apple treated with *Pichia guilliermondii* (A6), *Candida membranifaciens* (A4), Si at 0.1%, 0.3% and 0.5% and combination of them for control of *Penicillium expansum* P1 and P2 at 20 °C. There were four replicates for each treatment. There were no significant difference between the same letter according to Duncan multiple range test ( $p < 0.05$ ).

آبی سیب را نیز به‌توان به ناهمسانی زمان جوانه‌زنی اسپوره‌های قارچ عامل بیماری و القای مقاومت در میوه‌ی سیب در اثر تیمار با Si نسبت داد. هرچند تحقیقات بیشتری در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد. تاثیر تلفیقی Si مخمرهای آنتاگونیست را نیز علاوه بر رقابت مخمرهای آنتاگونیست با قارچ عامل بیماری، تولید متابولیت‌های فرار و غیر فرار (Gholamnejad et al., 2009)، می‌توان به فعال شدن آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز و نیز ترکیبات فنولی نسبت داد (فراهانی، ۱۳۸۹). نتایج این تحقیق با نتایج Qin et al., (2005) مبنی بر کنترل کپک آبی میوه‌ی گیلاس در اثر تلفیق مخمر *Cryptococcus laurentii* با سیلیکون در غلظت ۱٪ منطبق می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر مجموعه‌ی تیمارهای آزمایشی را در هفت گروه متمایز a، ab، bc، cd، cde، de و e قرار داد. به‌منظور تشخیص گروه‌های آماری با استفاده از ویژگی‌های رنگی ناحیه‌ی آلوده‌ی سیب، پس از استخراج ویژگی‌های میانگین،

سیلیکون در فرم  $\text{Si(OH)}_4$ ، دارای وابستگی شدیدی با ترکیبات پلی هیدروکسیل آلی می‌باشد، مانند فنول‌های ارتو، که در سنتز لیگنین شرکت دارند (Inanaga et al. 1995). فراهانی در سال ۱۳۸۹ نیز نتایجی در رابطه با فعال شدن آنزیم‌های دفاعی میوه‌ی سیب به‌دنبال مایه‌زنی با سیلیکون گزارش نموده‌است (Farahani, 2011). نتایج این تحقیق هم‌چنین نشان دهنده عدم کارآیی سیلیکون به‌تنهایی در کنترل کپک آبی میوه‌ی سیب بود، ولی اثر تلفیقی این عنصر در ترکیب با مخمرهای آنتاگونیست، به‌مراتب بهتر از کاربرد سیلیکون و مخمر تنها بود. در این راستا Yu et al., (2007) در بررسی عدم کارآیی اسید سالیسیلیک در کنترل کپک آبی سیب به این نکته اشاره کردند که زمان جوانه‌زنی اسپوره‌های *P. expansum* قبل از فعال شدن مقاومت القایی در اثر اسید سالیسیلیک می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که عدم کنترل‌کنندگی Si در کنترل کپک

شناسایی شدند. کاربرد این چهار صفت در مجموع سبب شناسایی گروه‌ها با میانگین دقت‌نسبی ۷۲٪ شد که نسب به کاربرد دو صفت که با میانگین دقت‌نسبی ۵۲٪ شناسایی شده بودند، ۲۰٪ افزایش نشان‌داد (جدول ۳).

جدول ۲- تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس دو صفت اول از جدول ۱ و با استفاده از آنالیز discrim.

Table 2- Linear discriminant analysis of infected groups according the two first adjective of table 1 using discrim procedure.

	a	ab	bc	Cd	cde	de	e
a	66.67%	0	22.22%	0	0	11.11%	0
ab	50%	0	0	0	0	50%	0
bc	0	0	50%	50%	0	0	0
cd	0	0	50%	0	0	50%	0
cd	0	0	0	0	100%	0	0
e							
de	0	0	0	50%	0	50%	0
e	0	0	0	0	0	0	100%

جدول ۳- تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس چهار صفت اول از جدول ۱ و با استفاده از آنالیز discrim.

Table 3. Linear discriminant analysis of infected groups according the four first adjective of table 1 using discrim procedure.

	a	ab	Bc	cd	cd	de	e
					e		
a	55.56%	11.11%	22.22%	0	0	11.11%	0
ab	0	50%	0	50%	0	0	0
bc	0	0	100%	0	0	0	0
cd	0	0	50%	50%	0	0	0
cde	0	0	0	0	100%	0	0
de	50%	0	0	0	0	50%	0
e	0	0	0	0	0	0	100%

شناسایی گروه‌های بیماری‌زا براساس مجموع شش صفت از جدول ۱ (میانگین آبی، میانگین سبز، انحراف معیار آبی، انحراف معیار قرمز، ضریب کشیدگی سبز و انحراف معیار سبز) نشان‌دهنده دقت ۶۶/۶۷٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪، ۵۰٪، میانگین سبز، انحراف معیار قرمز، ضریب کشیدگی سبز و انحراف معیار سبز) ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ به‌ترتیب برای هریک از گروه‌های a، ab، bc، cd، cde و de بود که در مجموع این گروه‌ها

انحراف معیار، ضریب چولگی و ضریب کشیدگی از هر یک از کانال‌های رنگی قرمز، سبز و آبی، از رویه‌ی stepdisc برای تعیین اهمیت صفات در پروسه‌ی تشخیص استفاده گردید. نتایج آماری نشان داد که میانگین رنگی آبی با بیشترین مقدار  $R^2=0.7$  و  $ASCC=0.291$  بیشترین تأثیر را در شناسایی گروه‌های آماری شدت بیماری داشتند و میانگین رنگ سبز، انحراف معیار رنگ آبی، انحراف معیار رنگ قرمز، ضریب کشیدگی رنگ سبز و انحراف معیار رنگ سبز به‌ترتیب در درجات بعدی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- ترتیب صفات و اهمیت آن‌ها در شناسایی گروه‌های بیماری‌زا با استفاده از آنالیز stepdisc.

Table 1. The adjectives and their importance in discrimination of infected groups using stepdisc procedure.

Average Squared Canonical Correlation (ASCC)	$R^2$	Feature	Step
0.291	0.70	Blue average	1
0.090	0.68	Green average	2
0.049	0.44	Blue standard deviation	3
0.026	0.46	Red standard deviation	4
0.011	0.56	Green kourtosis	5
0.006	0.43	Green standard deviation	6

تحلیل تشخیص خطی فشر براساس صفات میانگین رنگ آبی و سبز سبب شناسایی گروه‌های بیماری‌ کپک آبی با دقت شد. در این مرحله گروه‌های a، ab، bc، cd، cde و de به‌ترتیب با دقت‌های ۶۶/۶۷٪، ۵۰٪، صفر، ۱۰۰٪، ۵۰٪ و ۱۰۰٪ شناسایی شدند (جدول ۲).

تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس چهار صفت از جدول ۱ (میانگین آبی، میانگین سبز، انحراف معیار آبی و انحراف معیار قرمز) انجام شد و نتایج حاصله نشان داد که گروه‌های a، ab، bc، cd، cde و de به‌ترتیب با دقت‌های ۵۶/۵۶٪، ۵۰٪، ۱۰۰٪، ۵۰٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪

کمی و یکسان برای همه‌ی نمونه‌ها روشی نوین در بیماری‌شناسی گیاهی به کار رود. تحقیقات سایر محققین نیز نشان‌دهنده‌ی اهمیت و دقت این تکنیک در تحقیقات بیماری‌شناسی می‌باشد. مثلاً Bock *et al.*, (2008) با ارزیابی بیماری شانکر مرکبات از طریق مشاهده و روش مقیاس‌دهی و هم‌چنین ارزیابی دقیق با استفاده از نرم‌افزارهای پردازش تصویر بیان کردند که تفاوت‌هایی در این دو روش وجود داشته و در مشاهده و مقیاس‌دهی اغلب شدت بیماری بیشتر از حد معمول گزارش شده‌است. به‌نظر می‌رسد در روش مقیاس‌دهی در تعداد زیادی نمونه به‌علت ایجاد خطای چشم‌روند یک‌سانی را برای کل نمونه‌ها رعایت نشود. براساس اطلاعات ما این تحقیق اولین گزارش از کاربرد آنالیز تصویر در تحقیقات بیماری‌شناسی گیاهی می‌باشد. برای تحقیقات تکمیلی، مطالعه کانال‌های رنگی دیگر، بهبود شرایط تصویربرداری و نورپردازی در جهت کاهش نویز تصاویر و نیز استفاده از روش‌های تشخیص و گروه‌بندی شبکه‌ای عصبی در راستای حصول دقت بالاتر، پیشنهاد می‌گردد.

با میانگین دقت‌نسبی ۸۰٪ شناسایی شدند. کاربرد این شش صفت سبب افزایش ۸۰٪ در میانگین دقت‌نسبی شناسایی گونه‌ها شد (جدول ۴).

جدول ۴- تحلیل تشخیص خطی گروه‌های بیماری‌زا براساس شش صفت اول از جدول ۱ و با استفاده از آنالیز discrim.

Table 4. Linear discriminant analysis of infected groups according the six first adjective of table 1 using discrim procedure

	a	ab	bc	cd	cde	de	e
a	66.67%	11.11%	22.22%	0	0	0	0
ab	0	100%	0	0	0	0	0
bc	0	0	100%	0	0	0	0
cd	0	0	50%	50%	0	0	0
cde	0	0	0	0	100%	0	0
de	0	0	0	0	0	100%	0
e	0	0	0	0	0	0	100%

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان‌دهنده‌ی قدرتمندی ابزار پردازش تصویر در استخراج اطلاعات زیاد از یک عکس دیجیتال می‌باشد. بر اساس نتایج، رنگ بافت آلوده یک ابزار قوی در تشخیص شدت بیماری‌ها بوده که می‌تواند با صرفه‌جویی در وقت و نیز استخراج داده‌های

## References

- Ahmad, I. S., Reid, J. F., Paulsen, M. R., & Sinclair, J. B. 1999. Color classifier for symptomatic soybean seeds using image processing. *Plant Disease*. 83: 320-327.
- Bock, C. H., Parker, P. E., Cook, A. Z., & Gottwald, T. R. 2008. Characteristics of the perception of different severity measures of citrus canker and the relationships between the various symptom types. *Plant Disease*. 92: 927- 939.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., & Wisniewski, M., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 794-800.
- Druvefors, U. A. 2004. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds—mode of action of *Pichia anomala*. Doctor's dissertation, performed at the Department of Microbiology Swedish University of Agri Sci., 44pp.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M., & Wilson, C. L. 2000a. Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease*. 84: 243-248.

- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Wisniewski, M., & Wilson, C. L. 2000b.** Improved control of apple and citrus fruit decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. *Plant Disease*. 84: 249-253.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M. 1998.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*. 88: 282-291
- Farahani, L. 2011.** Studies of the combination of salicylic acid and silicon with antagonistic yeasts to control of apple blue mold in storage and possible mechanisms involved. M.Sc. dissertation, University of Tehran. P 97. (In Persian with English summary).
- Farahani, L., & Etebarian, H. R. 2012.** Enhancement of the efficacy of two antagonistic yeasts with salicylic acid against *Penicillium expansum*. *Achieves of Phytopathology and Plant Protection*. 45: 260-267.
- Farahani, L., Etebarian, H. R., Sahebani, N., & Aminian, H. 2012.** Biocontrol of blue mould of apple by *Candida membranifaciens* in combination with silicon. *Achieves of Phytopathology and Plant Protection*. 45: 310-317
- Gholamnejad, J. 2009.** Studies on biological control of blue mold in apple by some yeast isolates and their mechanisms of antagonism. M.Sc. dissertation, University of Tehran. P 152. (In Persian with English summary).
- Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., & Sahebani, N. 2009.** Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food. Science*. 4(1): 001-007.
- Inanaga, S., Okasaka, A., & Tanaka, S., 1995.** Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? *Soil Science and Plant Nutrition*. 41: 111-117.
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. De Cicco, V. 1998.** Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*. 8: 257-267.
- Nilsson, H. E. 1995.** Remote sensing and image analysis in plant pathology. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 17:154-166.
- Pierson. C. F., Leponis, M. J., & McColloch, L. P. 1971.** Market diseases of apples, pears and quince. U.S. Dep. Agric., Agric. Handb. Vol. 376. U. S. Govt. Printing Office, Washington, DC.
- Suzuki, G., Sawai, H., Ohtani, M., Nogami, S., Sano-Kumagai, F., Saka, A., Yukawa, M., Saito, T. L., Sese, J., Hirata, D., Morishita, S., & Ohya, Y., 2006.** Evaluation of image processing programs for accurate measurement of budding and fission yeast morphology. *Current Genetics*. 49: 237-247.
- Teixido, N., Usall, J., & Vinas, I. 1999.** Efficacy of preharvest and postharvest *Candida sake* biocontrol treatment to prevent blue mold on apples during cold storage. *Food Microbiology*. 50: 302-210.
- Tucker C. C., & Chakraborty S. 1997.** Quantitative assessment of lesion characteristics and disease severity using digital image processing. *Phytopathology*. 145: 273-278.
- Vero, S., Mondino, P., Burgaeno, J., Soubes, M., & Wisniewski, M. 2002.** Characterization of biological activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest biology and Technology*. 26: 91-98.
- Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. 1989.** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 425-441.

- Yao, H., Tian, S., & Wang, Y. 2004.** Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology*. 93: 297–304.
- Yao, H. J., & Tian, S. P. 2005.** Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 941– 950.
- Yu, T., Li, H. Y., & Zheng, X. D. 2007.** Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*. 114: 261–266.

## Use of machine vision system for evaluation of biocontrol potential of two antagonistic yeasts in combination with silicon against blue mold of apple fruit

Leila Farahani<sup>1</sup>, Hasan Reza Etebarian<sup>1</sup>, Hadis Mohseni Takallou<sup>2</sup>, Heshmatolah Aminian<sup>1</sup>, Navazolah Sahebani<sup>1</sup>

1- Plant Protection Department, Aboureihan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Computer Engineering Department, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

**Corresponding author:** Leila Farahani, lfarahani@alumni.ut.ac.ir

Received: Sep.15, 2012

1 (1) 29-39

Accepted: Jan.14, 2013

### Abstract

Plant diseases severity is presently evaluated using manual tools such as ruler, digital ruler or by scaling. Extending the great potential of computer science in accurate and rapid determination of disease severity, this study was conducted to evaluate biological control potential of two yeasts, *Pichia guilliermondii* (A6) and *Candida membranifaciens* (A4) in combination with silicon (Si) at 0.1%, 0.3% and 0.5% for controlling *Penicillium expansum* P1 and P2 at 20 °C. The results showed that antagonistic yeasts controlled blue mold of apple significantly. Combination of the yeasts with Si improved the control of blue mold in comparison with yeasts alone. Statistical information obtained from the infected area in RGB channels showed that blue average ( $R^2=0.70$ ) was the most important and green standard deviation ( $R^2=0.43$ ) was the least important factors in recognition of disease severity. Linear discrimination analysis using blue average, green average, blue standard deviation, red standard deviation, green kurtosis and green standard deviation separated the disease severity statistical groups with the accuracy of 80%. The overall results of this study suggest that the color could be a powerful descriptor which could be applied for determination of disease severity in apple blue mold

**Keywords:** *Pichia guilliermondii* • *Candida membranifaciens* • *Penicillium expansum* • LDA

## بررسی کارآیی چند جدایه‌ی بومی تریکودرما در کنترل بیولوژیک پوسیدگی ریشه‌ی چغندرقد با عامل *Pythium aphanidermatum* در شرایط گلخانه

محبوبه عبداللهی<sup>۱</sup>، فرخنده امتی<sup>۲</sup> و مسعود ذاکر<sup>۲</sup>

۱- دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

۲- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شاهرود، ایران

مسئول مکاتبات: مسعود ذاکر، mzakerus@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶

۵۲-۴۱ (۱) ۱

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۶

### چکیده

بیماری پوسیدگی پیتومی ریشه‌ی چغندرقد با عامل *Pythium aphanidermatum* یکی از بیماری‌های مهم خسارت‌زای این محصول در ایران می‌باشد. کنترل شیمیایی این بیماری چندان موفقیت‌آمیز نبوده است، بنابراین کنترل آن با عوامل بیولوژیک از جمله جدایه‌های تریکودرما می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای مدیریت این بیماری تلقی گردد. بررسی میزان کارآیی جدایه‌های تریکودرما در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه طی پژوهشی در طول سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ در مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود انجام گرفت. از بین ۲۲ جدایه‌ی تریکودرمای به‌دست آمده از مزارع چغندرکاری شهرستان شاهرود، تعداد ۷ جدایه متعلق به چهار گونه‌ی *Trichoderma harzianum*، *T. longibrachiatum*، *T. koningii* و *T. erinaceum* که در روش کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار و غیرفرار کارآیی خوبی در بازداري از رشد میسلیمی عامل بیماری از خود نشان داده بودند، جهت بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. از بین آن‌ها گونه‌ی *T. erinaceum* برای میکوفلور ایران جدید می‌باشد. در آزمایشات گلخانه‌ای از دو روش اختلاط مایه‌ی تریکودرما با خاک و آغشته نمودن بذور (بذر مال یا تیمار بذر) استفاده شد. نتایج کلی این پژوهش نشان داد که پوشش دادن بذر چغندرقد با قارچ آنتاگونیست تریکودرما یا اضافه کردن آن به خاک تأثیر چشم‌گیری در کنترل بیماری در مقایسه با شاهد آلوده دارد. براساس نتایج کلی این پژوهش، جدایه‌ی *T. harzianum* - 2736 بهترین تأثیر را در کنترل بیماری از خود نشان داد و در هر دو روش به میزان حدود ۷۰ درصد قادر به کنترل بیماری بود.

**واژه‌های کلیدی:** چغندرقد، بيو کنترل، *Trichoderma*، پوسیدگی ریشه، *Pythium aphanidermatum*.

### مقدمه

آلودگی‌های زیست محیطی و ایجاد نژادهای مقاوم عامل این بیماری به قارچ‌کش‌ها می‌گردد بنابراین استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک با استفاده از عوامل آنتاگونیست از جمله جدایه‌های تریکودرما می‌تواند جانشین خوبی برای کنترل این بیماری باشد (Gray & Garik, 1998). بررسی توانایی گونه‌های تریکودرما به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در شرایط آزمایشگاهی طی سال‌های ۱۹۲۰ تا ۱۹۴۰ میلادی آغاز گردید (Gilman & Abbott, 1927). در حال حاضر فرمولاسیون تعدادی از گونه‌های تریکودرما به عنوان آفت‌کش‌های بیولوژیکی و همچنین

سطح زیر کشت چغندرقد در دنیا حدود ۷۰۰۰۰۰۰ هکتار و در ایران ۵۵۰۰۰ هکتار می‌باشد (Anonymous, 2009). میکروارگانیسم‌های مهم خاک‌زاد از جمله قارچ‌ها از جمله عوامل خسارت‌زا به این محصول مهم می‌باشند. شبه قارچ *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. یکی از عوامل خاک‌زاد خسارت‌زای چغندرقد می‌باشد که باعث کاهش میزان قند این محصول می‌گردد (Abasi-Moghadam et al., 1998). کنترل شیمیایی این بیماری علاوه بر کم اثر بودن، موجب



کنترل بیماری و رشد بهتر بوته‌ها از این طریق به دست آمد. آن‌ها همچنین فعالیت و کلنیزه شدن خاک اطراف ریشه‌ی بوته‌های گوجه‌فرنگی توسط *T. harzianum* را در این روش مشاهده نمودند. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که جدایه‌ی *T. harzianum* جداسازی شده از ناحیه‌ی ریزوسفر بوته‌های جو، خیار، نخود، تربچه و گوجه‌فرنگی در مقایسه با جدایه‌های وحشی آن در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی این محصولات در مرحله‌ی قبل از رویش (pre emergence) مؤثرتر بودند (Ahmad & baker, 1988).

در ایران زمانی زاده و همکاران فرمولاسیون تجاری *T. harzianum* strain T969 تهیه شده از Trichomix-HV را با قارچ کش‌های ریدومیل و ریدومیل-مانکوزب برای کنترل قارچ *P. aphanidermatum* عامل بیماری بوته‌میری خیار گلخانه‌ای در منطقه‌ی جیرفت مورد مقایسه قرار دادند و گزارش کردند که این فرمولاسیون در مقایسه با دو قارچ کش ذکر شده در محیط کشت به میزان مشابهی از رشد میسلیمی قارچ عامل بیماری جلوگیری نمود و زمانی که به صورت اختلاط با خاک بستر بذر استفاده شد، توانست این بیماری را به میزان ۸۲٪ کنترل نمایند (Zamanizadeh et al., 2011). آن‌ها ادعا نمودند که این فرمولاسیون قابلیت جایگزینی با قارچ کش‌ها را برای کنترل بیماری بوته‌میری خیار دارا می‌باشد. عمر و همکاران (Omar et al., 2007) شش جدایه از دو گونه‌ی *T. harzianum* و *T. viride* را در شرایط گلخانه برای کنترل بوته‌میری پنبه مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه‌گیری نمودند که در این رابطه جدایه‌های گونه‌ی نخست بر جدایه‌های گونه‌ی اخیر ارجحیت داشتند. لیو و همکاران (Liu et al., 2009) طی مطالعه‌ای تعداد ۳۱ جدایه‌ی تریکودرما از مواد افزودنی به کشت هیپوتونیک خیار جداسازی نمودند و آن‌ها را در مقایسه با دو فرمولاسیون تجاری *T. viride* TV1 & Remedier WP علیه بیماری بوته‌میری خیار (*P. ultimum*) در شرایط گلخانه‌ای و اتاقک رشد مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که بهترین نتیجه در کنترل بیماری زمانی به دست آمد که اینو کولوم جدایه‌های تریکودرما ۷ روز قبل

تقویت‌کننده‌ی رشد محصولات کشاورزی در بسیاری از کشورها در دسترس کشاورزان می‌باشد که این امر باعث کاهش میزان استفاده از آفت کش‌های شیمیایی شده است. استفاده از این فرمولاسیون‌ها باعث کنترل بیماری‌های گیاهی با عوامل *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* و *Fusarium* spp (Ambrosino et al., 2004), (Abada 1994) طی تحقیقی به این نتیجه رسید که جدایه‌های گونه‌ی *T. harzianum* قادرند که در کنترل بیماری‌های خاک‌زاد چغندر قند و افزایش رشد غده در این محصول نقش داشته باشند. (Tran 2010) در ویتنام تأثیر جدایه‌های تعدادی از گونه‌های تریکودرما از جمله *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* را در کنترل تعدادی از بیماری‌های خاک‌زاد بادام زمینی، گوجه‌فرنگی و خیار از جمله *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotium rolsii* و *Pythium* spp. را در شرایط آزمایشگاه و مزرعه مورد ارزیابی قرار داد و گزارش نمود که گونه‌های تریکودرما توانایی کنترل بسیاری از این بیماری‌ها را داشته و در ضمن در افزایش میزان محصول نیز دخیل می‌باشند.

در پژوهش‌های دیگر، ال محمدی و همکاران تحت شرایط گلخانه‌ای گونه‌های *T. viride* و *T. harzianum* را برای کنترل بیماری پوسیدگی ریشه کلم بروکلی به سه روش اختلاط مایه‌ی تریکودرما با خاک، غوطه‌ور نمودن ریشه در محلول تریکودرما و مخلوطی از دو روش قبل انجام داد و نتیجه‌گیری نمود که استفاده از *T. harzianum* با روش سوم نه تنها به نحو چشم‌گیری باعث کنترل بیماری شد، بلکه در افزایش رشد سبزینه‌ای و کیفیت محصول نیز تأثیر مثبتی داشت (El-Mohamedy et al., 2011). جایاراج و همکاران (Jayaraj et al., 2006) کارایی تعدادی از فرمولاسیون‌های استرین *T. harzianum* M1 مقوام به قارچ کش کاربندازیم را برای کنترل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی گوجه‌فرنگی با عامل *Pythium aphanidermatum* در شرایط گلخانه و مزرعه به صورت ضد عفونی بذر مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش نمودند که تا حدود ۷۴ درصد

گردید. بیست گرم از هر نمونه خاک با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر محتوی ۰/۰۲ درصد اسید سیتریک مخلوط گردید. سپس در شرایط سترون ۵ میلی‌لیتر از هر نمونه در درون تشتک‌های پتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر و در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس ریخته شده و برای اختلاط کامل با ملایمت تکان داده شدند. بعد از خنک شدن، قرص‌های نیم سانتی‌متری از درون این ظروف برداشته شده و به داخل ظروف پتری حاوی محیط کشت اختصاصی داوت (Davet 1979) انتقال داده شده و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. بعد از رشد مناسب و خالص‌سازی جدایه‌ها با استفاده از کلید شناسایی بیست (Bissett, 1991a; Bissett, 1991 b) مورد شناسایی قرار گرفتند.

### بررسی تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل عامل پوسیدگی ریشه‌ی چغندر قند (*P. aphanidermatum*) در شرایط گلخانه

هدف از انجام این آزمایش بررسی میزان کارآیی جدایه‌های تریکودرما در کنترل و یا کاهش پوسیدگی ریشه منجر به مرگ گیاهچه‌های چغندر قند در شرایط گلخانه بود. این آزمایش به شرح ذیل اجرا گردید.

#### تهیه و تکثیر مایه‌ی جدایه‌های *Trichoderma*

در این رابطه از محیط سبوس تخمیر شده استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا مقدار کافی از سبوس گندم درون کیسه‌های پارچه‌ای ریخته و پس از خیساندن آن در آب مقطر با فشار دادن کیسه‌ها، آب اضافی سبوس خارج گردید، سپس در هر ارلن‌مایر ۱ لیتری، ۵۰۰ میلی‌لیتر از سبوس مرطوب ریخته شد. ارلن‌ها در دو روز متوالی هر روز درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۵ دقیقه استریل شدند. پس از سرد شدن ارلن‌ها در شرایط سترون به‌ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر سبوس، ۵ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون اسپور جدایه‌ی تریکودرما ( $10^8$  اسپور/ml) اضافه گردید و ارلن‌ها در داخل ژرمیناتور با دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس زیر نور فلورسنت در رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (Elad et al., 1980).

از آلوده کردن خاک به عامل بیماری به آن اضافه شد. چهار جدایه‌ی آنتاگونیست مذکور تا ۹۵٪ توانستند از وقوع بیماری جلوگیری نمایند که تأثیر این گونه جدایه‌ها تا حدودی بهتر از تأثیر فرمولاسیون Remedier WP برآورد گردید. تعدادی از جدایه‌ها در افزایش رشد بوته‌ها نیز مؤثر بودند.

هدف از انجام این پژوهش یافتن جدایه‌های بومی تریکودرما مؤثر در جلوگیری از رشد شبه‌قارچ *Pythium aphanidermatum* و برای ایجاد بستر تحقیقات دقیق‌تر در این رابطه می‌باشد. زیرا به نظر می‌رسد که به علت سازگاری جدایه‌ها با شرایط آب و هوایی در هر ناحیه می‌توان از جدایه‌های بومی به نحو بهتری سود جست.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه‌ی جدایه‌ی بیماری‌زای *P. aphanidermatum*

تعداد زیادی از نمونه‌های ریشه‌ی چغندر قند دارای علائم پوسیدگی نرم در پاییز از مزارع شاهرود و حومه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس قطعاتی از بین قسمت سالم و بیمار غده‌ها جداسازی شده و پس از ضدعفونی سطحی با محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم در محیط کشت اختصاصی P5ARP کشت داده شدند (Jeffers & Martin, 1986). در این رابطه تعداد زیادی جدایه‌های *Pythium* خالص‌سازی گردید و براساس کلیدهای شناسایی دیک (Dick, 1990) و وندر پلاتس (Van der Plaats, 1981) گونه‌ی غالب تشخیص داده شد. بعد از انجام آزمایشات بیماری‌زایی روی بوته‌های چغندر قند در شرایط گلخانه، جدایه‌ای از گونه‌ی *P. aphanidermatum* که قابلیت بیماری‌زایی بالایی داشت، برای انجام مطالعات بعدی انتخاب گردید.

#### تهیه‌ی جدایه‌های تریکودرما

#### جداسازی جدایه‌های *Trichoderma* از خاک

در این رابطه از روش ریفای (Rifai, 1969) استفاده شد. تعداد زیادی نمونه‌های خاک از ریزوسفر بوته‌های چغندر قند مزارع مختلف شاهرود و حومه جمع‌آوری

### تهیه و تکثیر مایه‌ی *P. aphanidermatum*

جهت تکثیر عامل بیماری درون تعدادی ارلن‌مایر مقدار ۹۵ گرم ماسه‌ی سترون و ۵ گرم بلغور جو و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و در دو روز متوالی هر روز درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۵ دقیقه سترون گردیدند. سپس تعداد ۱۰-۸ برش ۵ میلی‌متری از کشت ۵ روزه شبه‌قارچ عامل بیماری درون هر ارلن‌مایر قرار داده و درون انکوباتور در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند (Naseby *et al.*, 2000). بعد از رشد عامل بیماری روی محیط کشت فوق ارلن‌ها به خوبی تکان داده شده تا کاملاً مخلوط شدند و در زمان انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای محتویات ارلن‌ها توسط آسیاب برقی کاملاً مخلوط گردیدند.

### تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل عامل پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندر قند به صورت اختلاط با خاک

در این آزمایش از تعداد هفت جدایه که بالاترین تأثیر را در جلوگیری از رشد بیمارگر *P. aphanidermatum* در شرایط آزمایشگاه از خود نشان داده بودند، استفاده شد. این جدایه‌ها شامل (*T. harzianum* (2739, 2736, 2733), *T. longibrachiatum* (2737), *T. erinaceum* (2735) و *T. koningii* (2732) بودند.

برای کاشت بذور چغندر قند از رقم حساس پی‌پی ۲۲ استفاده شد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار شاهد سالم (بدون عامل بیماری‌زا و بدون تریکودرما)، تیمار شاهد آلوده حاوی عامل بیماری‌زا (پیتیوم) و فاقد تریکودرما، تیمار گل‌دان‌های حاوی جدایه‌های تریکودرما و فاقد پیتیوم (به منظور مشخص شدن بیماری‌زا بودن احتمالی جدایه‌های تریکودرما) و تیمار گل‌دان‌های حاوی جدایه‌های تریکودرما + عامل بیماری (*P. aphanidermatum*) بودند.

خاک گل‌دان‌های آزمایشی (یک قسمت خاک مزرعه + سه قسمت خاک برگ) درون اتوکلاو سترون شده و به منظور ایجاد زه‌کشی مناسب مقداری ماسه‌ی سترون

در ته هر گل‌دان ریخته شد. در تیمارهای حاوی تریکودرما مقدار ده گرم مایه‌ی تریکودرما روی سبوس به هر کیلوگرم خاک اضافه شد (Ashrafizadeh *et al.*, 2005). مایه‌ی تلقیح عامل بیماری به نسبت سه درصد با خاک گل‌دان‌ها مخلوط شد. سپس بذورهای چغندر قند با استفاده از هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۴ دقیقه ضد عفونی و بعد از سه بار شستشو با آب مقطر به تعداد ۶ عدد درون هر گل‌دان کاشته شد. به خاک گل‌دان‌های شاهد بدون تریکودرما سبوس گندم سترون به میزان ۱۰ گرم به کیلوگرم خاک اضافه شده، شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. آماربرداری از تعداد گیاهان سالم و میزان رشد طولی گیاهان (ارتفاع) هر سه روز یک‌بار به طور مرتب انجام گردید.

### تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل عامل مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند به صورت آغشته نمودن بذور

در این بررسی از جدایه‌های تریکودرما مانند آزمایش قبلی استفاده شد. نوع خاک و بذور به کار رفته نیز مانند آزمایش قبلی بود. ابتدا جدایه‌های تریکودرما روی محیط PDA کشت گردیدند و تشتک‌های پتری درون انکوباتور در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند تا در تاریخ کاشت به اسپوردهی فراوان رسیده باشند. به منظور آغشته نمودن بذور چغندر قند به اسپور تریکودرما ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۴ دقیقه ضد عفونی و سه بار توسط آب مقطر شسته شدند. بذور پس از خشک شدن در اتاقک کشت به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول دو درصد متیل سلولز قرار گرفتند (Vaartaja *et al.*, 1979). سپس بذور چسبناک به مدت دو ساعت در سوسپانسیون اسپور تریکودرما به غلظت  $2 \times 10^8$  اسپور در میلی‌لیتر قرار داده شدند (Burgess & Hepworth, 1996). شمارش اسپورها با استفاده از لام هموسایتومتر انجام شد. پس از گذشت دو ساعت، بذور پوشش داده شده با سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما در گل‌دان‌های مورد نظر کشت گردیدند. برای تیمارهای بدون تریکودرما (شاهد غیر آلوده و شاهد آلوده)

جهت رشد گیاهچه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری مشابه آزمایش قبل بود.

تعداد بوته‌های سالم در هر دو روش پس از ۲۰ روز از زمان کشت شمارش و براساس آن درصد تلفات بوته‌های چغندر قند در اثر عامل بیماری از رابطه‌ی زیر به‌دست‌آمد (Behboodi et al., 2005).

$$100 \times \frac{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار} - \text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم}}{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم}} = \text{درصد تلفات گیاهچه‌های چغندر قند}$$

## ۲- تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندر قند در شرایط گلخانه

### الف- تأثیر جدایه‌ها در جلوگیری از پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندر قند در روش اختلاط با خاک

آلوده کردن خاک گلدان‌های آزمایشی با مایه‌ی عامل بیماری باعث مرگ ۱۰۰ درصد بذور چغندر قند شد و از سبز شدن آن‌ها جلوگیری به‌عمل آمد. هنگامی که جدایه‌های تریکودرما به تنهایی به خاک گلدان‌ها اضافه شدند، تمام گیاهچه‌ها رشد نمودند که این نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر منفی جدایه‌های تریکودرما در سبز شدن بذور بود. در این روش تیمارهای محتوی جدایه‌های تریکودرما + عامل بیماری دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با شاهد بودند. جدایه‌ی *T.h. 2736* بهترین تأثیر را در جلوگیری از مرگ گیاهچه‌ها از خود نشان داد. کمترین میزان کنترل بیماری نیز توسط جدایه‌ی *T.h. 2733* ایجاد گردید (شکل ۱، جدول ۱).

**ب- تأثیر جدایه‌ها در جلوگیری از مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند در روش بذر مال یا تیمار بذر**  
همان‌گونه که در شکل ۱ و جدول ۱ مشاهده می‌شود، در روش بذر مال بین شاهد آلوده و تیمارهای حاوی جدایه‌های تریکودرما + عامل بیماری در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار دیده شد و جدایه‌های تریکودرما به‌طور

از بذرهایی که پس از پوشش داده شدن با متیل سلولز به مدت دو ساعت در آب مقطر قرار گرفته بودند، استفاده شد. در این آزمون خاک گلدان‌های آزمایشی غیر از تیمار شاهد سالم و تیمارهایی که تنها حاوی تریکودرما بودند، طبق روش قبلی با *P. aphanidermatum* مخلوط و تعداد شش عدد بذر درون هر گلدان کاشته شد. شرایط مساعد

## روش‌های آماری

آزمایشات این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. در این تحقیق، برای تجزیه‌ی واریانس کلیه‌ی اعداد خام حاصل از آزمایشات هر دو روش، از نرم‌افزار SAS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد.

## نتایج

### ۱- معرفی گونه‌ی *Trichoderma erinaceum* Bissett, Kubicek & Szakacs به‌عنوان گونه‌ای جدید برای مایکوفلور ایران

شناسایی جدایه‌ی *T.e. 2735* جداسازی شده از مزارع چغندر کاری شاهرود متعلق به این گونه انجام گردید. شعاع پرگنه بر محیط کشت PDA و در دمای ۲۵-۳۰ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط تاریکی ۲۵ میلی‌متر بوده و در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس ۱۷-۲۵ میلی‌متر تعیین گردید. پرگنه به‌صورت مسطح با دوایر متحدالمرکز، کنیدی‌ها سبز رنگ و گاهی زرد رنگ با سطحی صاف و بیضی شکل بودند و اندازه‌ی آن‌ها  $3-5 \times 4-7$  میکرومتر بود. این جدایه فاقد ترشحات رنگی بود و فیالیدهای آن روی شاخه‌های منشعب و دارای قسمت میانی متورم بود. این جدایه توسط آقای دکتر ظفری از دانشگاه بوعلی سینا، همدان با عنوان *T. erinaceum* شناسایی گردید (Zafari et al., 2002). براساس اطلاعات ما این گونه تاکنون از ایران گزارش نشده است و برای مایکوفلور ایران جدید می‌باشد.

جدول ۱- تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند در مقایسه با شاهد.

Table 1- Effect of *Trichoderma* isolates in controlling sugar beet seed rot and damping-off compared to control.

Treatment	% disease control (soil treatment)	% disease control (seed treatment)
<i>T. harzianum</i> -236	72.00 ab	72.00 a
<i>T. koningii</i> - 2731	62.00 abc	55.00 ab
<i>T. longibrachiatum</i> – 2737	50.00 bc	45.50 bc
<i>T. harzianum</i> – 2739	50.00 bc	55.50 ab
<i>T. erinaceum</i> – 2735	50.00 bc	28.84 bc
<i>T. longibrachiatum</i> – 2732	27.80 c	28.40 bc
<i>T. harzianum</i> – 2733	22.22 c	27.80 c
Infested control	0.00 d	0.00 d

داده‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد در روش اختلاط با خاک و در سطح احتمال ۱ درصد در روش تیمار بذر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Values in each column marked by different letters are significantly different in soil treatment ( $P=0.05$ ), and seed treatment methods ( $P=0.01$ ) according to LSD test.

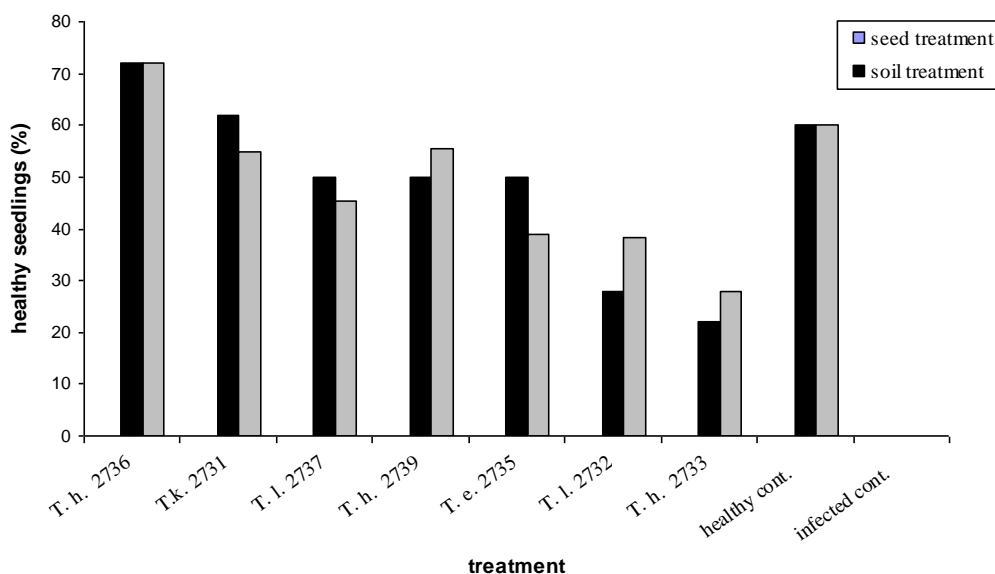
با *T.h.* 2733, *T.l.* 2732, *T.k.* 2731, *T.l.* 2737 به ترتیب با ۷/۳۷، ۷/۲، ۵/۳ و ۵/۲۵ سانتی متر رشد بیشترین ارتفاع بوته را نتیجه دادند که با تیمار شاهد (۴/۷۹ سانتی متر) اختلاف معنی‌دار داشتند. کمترین مقدار ارتفاع بوته مربوط به تیمار حاوی جدایه‌ی *T. erinaceum* 2735 در اندازه‌گیری میانگین ارتفاع مشاهده شد.

در مجموع در مقایسه‌ی دو حالت افزودن آنتاگونیست به خاک و بذر مال جدایه‌ی *T.h.* 2736 بهترین تأثیر را در کنترل بیماری مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند با عامل *P. aphanidermatum* از خود نشان داد و در هر دو روش به یک میزان مؤثر بود. در مورد سایر جدایه‌ها نیز میزان تأثیر بر کنترل عامل بیماری متغیر بود.

معنی‌داری توانستند عامل بیماری را کنترل کنند. نتایج این تحقیق نشان داد که مؤثرترین جدایه‌ها در کنترل بیماری به ترتیب اولویت جدایه‌های *T.h.* 2736، *T.h.* 2739، *T.k.* 2731 بودند، در حالی که *T.h.* 2733 نسبت به سایر جدایه‌ها کمترین تأثیر را در کنترل بیماری از خود نشان داد.

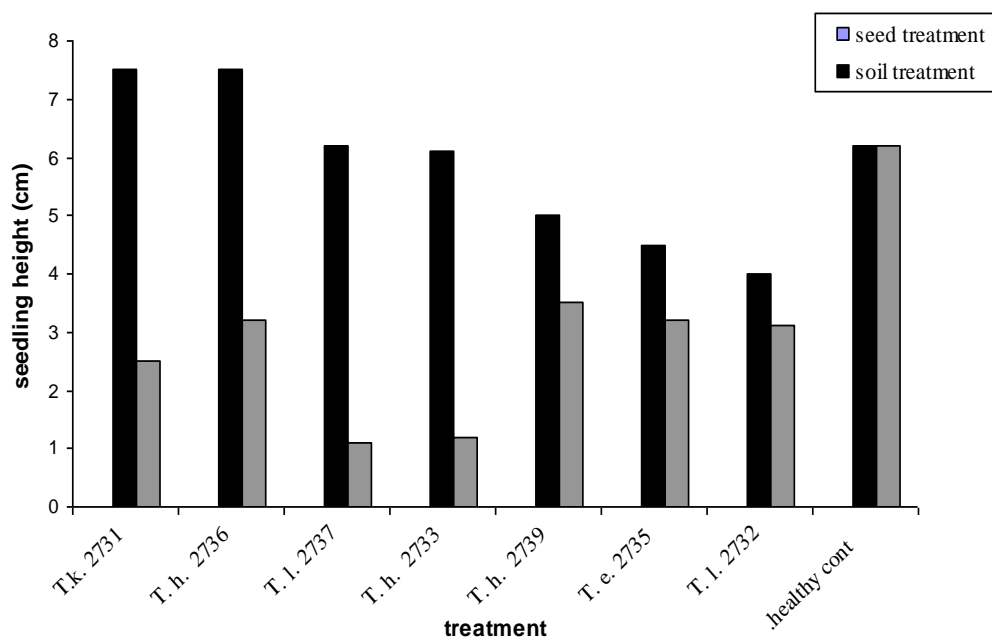
### ج- تأثیر جدایه‌ها در افزایش رشد بوته‌های چغندر قند

بر اساس نتایج به دست آمده تأثیر جدایه‌های تریکودرما در روش اختلاط با خاک در افزایش رشد بوته‌های چغندر قند بسیار محسوس بود، در حالی که در روش بذر مال اختلاف معنی‌داری در ارتفاع رشد تیمارهای حاوی تریکودرما در مقایسه با شاهد مشاهده نگردید (شکل ۲). اثر کاربرد قارچ‌های آنتاگونیست بر ارتفاع بوته‌های چغندر قند در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود. جدایه‌های



شکل ۱- کارآیی جدایه های تریکودرما در کنترل بیماری های پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه ی چغندر قند در دو روش تیمار بذر و اختلاط با خاک.

Fig.1- Efficacy of *Trichoderma* isolates in controlling sugar beet root rot and seedling damping-off diseases in seed and soil treatment methods.



شکل ۲- کارآیی جدایه های تریکودرما در افزایش رشد طولی گیاهچه های چغندر قند در دو روش تیمار بذر و اختلاط با خاک

Fig. 2- Efficacy of *Trichoderma* isolates in promoting sugar beet seedling growth in seed and soil treatment methods

## بحث

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص گردید که وجود جدایه‌های تریکودرما در تیمارهای آزمایشی سبب بهبود رشد گیاهان در مقایسه با شاهد سالم شد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات کلی فیلد و چت (Kleifield & Chet, 1992) و هارمن و همکاران (Harman *et al.*, 2004) مطابقت داشت، زیرا کلی فیلد و همکاران، افزایش رشد گیاهان توسط قارچ را به توانایی بقا و گسترش این قارچ در محیط ریزوسفر دانسته و گزارش کردند که مکانیسم احتمالی در افزایش رشد گیاهان انتقال مواد غذایی از خاک به ریشه می‌باشد. جدایه‌های تریکودرما با کلنیزه کردن ریشه‌ها سبب انتقال مواد غذایی و جذب آن‌ها توسط گیاهان می‌گردند. هارمن و همکاران گزارش نمودند که افزایش عملکرد در نتیجه‌ی کاهش فعالیت قارچ‌های غیر مفید و ترکیبات سمی در منطقه‌ی ریزوسفر و افزایش جذب مواد غذایی و مصرف نیتروژن توسط جدایه‌های تریکودرما می‌باشد.

در بررسی گلخانه‌ای و نحوه‌ی تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندر قند مشخص شد، در بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌ی *T.h. 2735* در هردو روش بذرمال و ترکیب با خاک با تأثیر یکسان به میزان ۷۲ درصد از مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند جلوگیری نموده و به‌عنوان بهترین جدایه معرفی شد. در روش بذرمال جدایه‌های *T.l. 2732, T.h. 2733, T.e. 2739* دارای اثر نسبی بهتری نسبت به روش اضافه کردن به خاک بوده ولی این اختلاف چندان بالا نبوده است. اختلاف در نحوه‌ی اثر دو روش به کار رفته در تحقیق را می‌توان چنین توصیف نمود: افزودن آنتاگونیست‌های تکثیر شده روی سبوس گندم تخمیر شده به خاک می‌تواند بیماری را تا حد قابل ملاحظه‌ای کنترل کند. وقتی جدایه‌های تریکودرما تکثیر شده روی مواد آلی به خاک اضافه می‌شوند، به علت وجود یک زمینه‌ی غذایی، به فراوانی تکثیر شده و برای مدت طولانی در خاک باقی می‌مانند (Karr *et al.*, 1986).

لویس و پاپاویزاس (Lewis & Papavizas, 1984) نشان دادند که استقرار و تکثیر تریکودرما در خاک بستگی

به نحوه‌ی کاربرد آن دارد و هنگامی که روی سبوس گندم استریل تکثیر شوند و سپس به خاک اضافه گردند، به میزان یک میلیون برابر تکثیر شده و استقرار و پایداری آن از زمان کاربرد در خاک ۳۶-۹ هفته به طول می‌انجامد. در تحقیق حاضر جدایه‌های تریکودرما به نسبت ۱۰ گرم به هر کیلو گرم خاک آلوده به قارچ عامل بیماری اضافه شد. طبق تحقیقات اشرفی زاده و همکاران (۱۳۸۴) افزودن ۱۰ گرم مایه‌ی تریکودرما به ۲ کیلو گرم خاک، تعداد  $10^5 - 10^7$  CFU قارچ را در ریزوسفر ایجاد می‌کند، در حالی که حداقل میزان مؤثر آنتاگونیست تریکودرما در خاک حدود  $10^5$  CFU در هر گرم کیلو گرم خاک است.

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشاهده گردید که آغشته نمودن بذر به سوسپانسیون اسپور تریکودرما توانست این پاتوژن را کنترل کند که این با نتایج کوک (Cook, 1994) مطابقت دارد. کوک پیشنهاد کرده بود توانایی کلنیزه کردن میزبان توسط پیتيوم نسبت به قارچ‌های دیگر بالاست، بنابراین تیمار بذر با تریکودرما می‌تواند اثرات پیتيوم را کاهش دهد. مکانیسم‌های به کار رفته در کنترل پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندر قند توسط جدایه‌های تریکودرما را می‌توان چنین بیان نمود که افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌ها در حضور قارچ پیتيوم سبب افزایش چشم گیر کربن در اطراف ریشه و پراکنده شدن مواد غذایی از اطراف ریشه می‌گردد. این عمل در نهایت سبب تخریب ریشه می‌شود. این پژوهشگران همچنین نشان دادند، وجود جدایه‌های تریکودرما تأثیر پیتيوم بر آنزیم‌های خاک را کاهش داده و با کاهش فعالیت این آنزیم‌ها سبب کاهش میزان کربن در اطراف ریشه می‌گردد و بدین ترتیب سبب کنترل بیماری و افزایش رشد گیاه می‌شود. لیف‌شیتز و همکاران (Lifshitz *et al.*, 1986) به بررسی مکانیسم دخیل در کنترل مرگ گیاهچه با استفاده از جدایه‌های تریکودرما در تیمار بذرمال پرداخته و عنوان نمودند که مکانیسم دیگری غیر از مایکوپارازیتسم در کنترل مؤثر می‌باشد. آن‌ها چنین بیان نمودند که جوانه‌زنی کینیدی قارچ تریکودرما به حدود ۱۴-۱۰ ساعت زمان نیاز دارد، ولی اسپورانژهای پیتيوم ظرف ۹۰ دقیقه جوانه‌زنی می‌کند و



زمان آلودگی با پیتوم حدود ۴۸-۲۴ ساعت می باشند، بنابراین مکانیسم مایکوپارازیتیسم در این کارموفق نبوده و مکانیسم های دیگری نظیر متابولیت های فرار و غیر فرار تأثیر گذار می باشد.

باتوجه به این که کنترل مؤثر بیمارگرهای خاک زاد گیاهی توسط عوامل آنتاگونیست مستلزم سازگاری این عوامل با شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژیکی خاک به کاررفته برای فعالیت مؤثر این جدایه های آنتاگونیست روی پیتوم می باشد، بنابراین ممکن است این جدایه که در شرایط گلخانه ای نسبت به سایر تیمارها اثر کمتری داشته اند، در شرایط مزرعه به دلیل سازگاری با شرایط خاک مزرعه و تعامل با میکروارگانیسم های موجود در خاک بتوانند اثر بهتری را نشان دهند. بنابراین مطالعه ی شناخت شرایط اکولوژیکی مناسب برای جدایه های آنتاگونیستی که در شرایط آزمایشگاه و گلخانه اثرات خوبی در کنترل عوامل بیماری زا نشان داده اند، حائز اهمیت است. با توجه به تولید ترکیبات محرک رشد توسط جدایه های تریکودرما مورد آزمایش در این تحقیق به نظر می رسد که آن ها بتوانند در شرایط مزرعه با توجه به مواد آلی و میکوفلور طبیعی خاک عملکرد بهتری از خود نشان دهند. باتوجه به مورد فوق، در آزمایشات آینده لازم است این موضوع در شرایط طبیعی خاک مد نظر قرار گیرد.

همان گونه که از نتایج این تحقیق برمی آید جدایه ی *T. harzianum* 2736 مؤثرترین جدایه در کنترل بیماری

پیتومی چغندر قند در هر دو روش بود که این یافته باتایج (Abada, 1994)، (El-Mohamedy et al., 2011)، (Ahmad & Baker, 1988)، (Jayaraj et al., 2006) و (Omar et al., 2007) کاملاً مطابقت دارد، زیرا این محققان گزارش نمودند که جدایه های *T. harzianum* در کنترل بیماری پیتومی محصولات مختلف تأثیر به سزایی داشته و به خوبی این بیماری را در شرایط گلخانه کنترل نموده است. همانگونه که زمانی زاده و همکاران و سلطانی و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که استفاده از فرمولاسیون های *T. harzianum* می تواند به ترتیب در کنترل بیماری بوته میری خیار (*Pythium aphanidermatum*) و بیماری پژمردگی سیب زمینی (*Fusarium oxysporum*) مؤثر باشد، بنابراین می توان انتظار داشت که استفاده از این فرمولاسیون ها بتواند در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه ی چغندر قند با عامل *P. aphanidermatum* که در نهایت منجر به مرگ و میر گیاهچه های چغندر قند می گردد، نیز مؤثر باشد (Zamanizadeh et al., 2011 & Soltani et al., 2005).

### سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر دوستمراد ظفری دانشیار دانشکده ی کشاورزی دانشگاه بوعلی سینای همدان که در زمان انجام این تحقیق در شناسایی گونه های مؤثر تریکودرما همکاری صمیمانه ای داشتند، سپاسگزاری می شود.

### References

- Abada, K. A. 1994. Fungi causing damping off and root rot on Sugar beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*. Agriculture Ecosystems and Enviromental. 51(3): 333-357.
- Abasi-Moghadam, A., Rastegar, M. F. & Gafarpour, B. 1998. Etiology of sugar beet root and crown rot caused in Khorasan. Proceedings of the 13<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress. Iran, 125.
- Ahmad, J. S. & Baker, R. 1988. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology. 34(3): 229-234.
- Ambrosino, P., Scala, V., Marra, R., Vinale, F., Soriente, I. Ferraioli, S. & Carbone, V. 2004. Extra cellular protein of *Trichoderma harzianum* to identify proteins bio technological value. Journal of Plant Pathology. 86(4, special issue): 95-300.
- Anonymous, 2009. Agricultural statistics, Field crops for 2007-2008. Ministry of Jihad-E-Agriculture.

- Ashrafizadeh, A., Etebarian, H. R. & Zamanizadeh, H. R. 2005.** Evaluation of *Trichoderma* isolates for bio control of Fusarium wilt of Melon. Iranian Journal of Plant Pathology. 41(1): 39-57. (In Persian with English summary).
- Behboodi, K., Sharifi-Tehrani, A., Hajarood, G. & Zaad, J. 2005.** Antagonistic effects of *Trichoderma* species on *Phytophthora capsici*, the causal agent of pepper root and crown rot. Iranian journal of Plant Pathology. 41(3): 345-362. (In Persian with English summary).
- Bissett, J. 1991a.** A revision of the genus *Trichoderma* II. inferageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69: 2357-2372.
- Bissett, J. 1991b.** A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasidium. Canadian Journal of Botany. 69: 2373-2417.
- Burgess, D. R. & Hepworth, G. 1996.** Biocontrol of Sclerotinia stem rot (*Sclerotinia minor*) in Sunflower by seed treatment with *Gliocladium virens*. Plant Pathology. 45: 58.
- Cook, R. J. 1994.** Introduction of soil organisms to control root diseases. In: Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. and Grace, P. R. (eds.), Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO. East Melbourne, Australia. pp. 13- 22.
- Davet, P. 1979.** Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans les sols. Annual Phytopathology. 11: 529-533.
- Dick, M. W. 1990.** Key to *Pythium*. Reading University Press. UK.
- Elad, Y., Chet, I. & Katan, J. 1980.** *Trichoderma harzianum* a bio control effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 70:114-121.
- El-Mohamedy, R. S. R., Abd El-Samad, E. H., Hoda, A. M., Habib, T. & Fath El-Bab, S. H. 2011.** Effect of using bio-control agents on growth, yield, head quality and root rot control in broccoli plants grown under greenhouse conditions. International Journal of Academic Research. 3(2): 71-80.
- Gilman, J. C. & Abbott, E. V. 1927.** A summary of the soil fungi. Iowa state College. Journal of Science. 1: 225-343.
- Gray, F. A. & Gerik, J. S. 1998.** Biology and management of Sugar beet disease in the big horn River Basins of Wyoming. university of Wyoming. Cooperative Extension Service Bulletin. B-1063. 23pp.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004.** *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2: 43-56.
- Jayaraj, J., Radhakrishnan, N. V. & Velazhahan, R. 2006.** Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. Archives of Phytopathology & Plant Protection. 39(1): 1-8.
- Jeffers, S. N. & Martin, S. B. 1986.** Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease. 70: 1038–1043.
- Karr, A., Wyllie, T. D., Moshtay, E. L., Beleid, F. & Novacky, A. 1986.** Toxic, cytolosmin-like component from *Macrophomina phaseolina* Phytopathology. 79: 1166. (Abstract).
- Kleifield, O. & Chet, I. 1992.** *Trichoderma harzianum*: interaction with plants and effect on growth response. Plant and Soil. 144: 267–272.
- Lewis, J. A. & Papavizas, G. C. 1984.** A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. Phytopathology. 74: 1240-1244.

- Lifshitz, R., Windha, M. T. & Baker, R. 1986.** Mechanism of biological control of pre emergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 76: 720-725.
- Liu, J. B., Gilardi, G., Gullino, M. L. & Garibaldi, A. 2009.** Effectiveness of *Trichoderma* spp. obtained from re-used soilless substrates against *Pythium ultimum* on cucumber seedlings. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 116(4): 156–163.
- Naseby, D. C., Pascual, J. A. & Lynch, J. M. 2000.** Effect of bio control strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil Enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 161-169.
- Omar, M. R., El-Samawaty, A. M. A. & El-Wakil, D. A. 2007.** Suppression of *Pythium ultimum* Involved in Cotton Seedling Damping-off by *Trichoderma* spp. *Egyptian Journal of Phytopathology*. 35(2): 111-124.
- Rifai, M. A. 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*. 116: 1-156.
- Soltani, H., Zafari, D. & Rohani, H. 2005.** A study on biological control of crown, root and tuber fungal diseases of potato by *Trichoderma harzianum* under in-vivo and field condition in Hamadan. *Agricultural Research (water, soil & plant in agriculture)*. 5(3): 13-25. (In Persian with English summary).
- Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981.** Monograph of genus *Pythium*. *Studies in Mycology*. 21: 1-242.
- Vaartaja, O., Pitblado, R. E., Buzzeli, R. I. & Crawford, L. G. 1979.** Chemical and Biological control of Phytophthora root and stalk rot of Soybean. *Canadian Journal of Plant Science*. 59: 307-11.
- Tran, N. H. 2010.** Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. *Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 16(1): 17-21.
- Zafari, D., Ershad, J., Zare, R. & Alizadeh, A. 2002.** A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. *Iranian journal of plant pathology*. 38(1-2): 21– 45. (In Persian with English summary).
- Zamanizadeh, H. R., Hatami, N., Aminae, M. M. & Rakhshandehroo, F. 2011.** Application of biofungicides in control of damping disease off in greenhouse crops as a possible substitute to synthetic fungicides. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 8(1): 129-136.

## Efficacy of some native *Trichoderma* isolates in biological control of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of sugar beet root rot under green house condition

Mahbobeh Abdollahi<sup>1</sup>, Farkhondeh Ommati<sup>2</sup>, Masood Zaker<sup>2</sup>

1- College of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

2- Agriculture and Natural Resources Research Center of Shahrood, Iran

Corresponding author: Masood Zaker, Email: mzakerus@yahoo.com

Received: Apr.14, 2012

1 (1) 41-52

Accepted: Jan.15, 2013

### Abstract

*Pythium* root rot of sugar beet caused by *Pythium aphanidermatum* is an important yield reducing disease in Iran and so far its chemical control has not been achieved successfully, therefore, alternative control measures including biological control might be effective in managing this disease. A green house study was conducted to investigate the efficacy of some native *Trichoderma* isolates in controlling this disease in Agricultural Research Center, Shahrood, Iran during 2007- 2008. Out of 22 *Trichoderma* isolates collected from sugar beet fields, seven isolates belonging to four species (*Trichoderma harzianum*, *T. longibrachatum*, *T. erinaceum* and *T. koningii*), among which *T. erinaceum* is a new species for Iran mycoflora and had previously performed effective in inhibiting mycelial growth of the pathogen through dual culture and production of volatile and non-volatile metabolites were selected for green house evaluations using seed and soil treatment methods. Results of green house experiments during two years evaluations indicated significant reduction in seedling damping-off in potted plants treated with *Trichoderma* isolates either as seed or soil treatment (compared with untreated control). Plant growth promotion was also observed in plants treated with *Trichoderma* isolates in comparison with untreated control. Based on the overall results of this study, *T. harzianum* 2736 demonstrated the highest disease reduction (70%) in both methods.

**Key words:** sugar beet, root rot, biocontrol, *Trichoderma*, *Pythium aphanidermatum*.

## کنترل بیولوژیک بیماری بلاست مرکبات با استفاده از چند گونه مخمر به دست آمده از باغات مرکبات شمال ایران

فرید بیکی<sup>۱</sup>، ابراهیم محمدی گل تپه<sup>۱</sup>، حشمت‌اله رحیمیان<sup>۲</sup>، مسعود شمس بخش<sup>۱</sup>، علی برزگر<sup>۲</sup>، آنتونی بوسکت<sup>۳</sup> و جرج لالوکات<sup>۳</sup>  
 ۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 ۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران  
 ۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه UIB، اسپانیا  
 مسئول مکاتبات: حشمت‌اله رحیمیان، H.Rahimian@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۵

۶۴-۵۳ (۱) ۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۱۵

### چکیده

بلاست مرکبات یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در استان‌های شمالی کشور می‌باشد که توسط چند گونه از باکتری بیمارگر سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود. این بیماری در شرایط اقلیمی مساعد، خسارت‌های قابل توجهی را به باغات مرکبات وارد می‌سازد. در این بررسی، سعی شد تا از باغات مرکبات شمال کشور، مخمرهایی جداسازی و معرفی شوند که دارای توان کنترل بیولوژیک قابل قبولی علیه این بیمارگر باشند. ارزیابی در شرایط گلخانه با مایه‌زنی یک جدایه از باکتری بیماریزای *Pseudomonas syringae* روی رقم نارنج صورت گرفت. پاشش مخمر سه بار و با فاصله‌های زمانی دو روزه انجام شد و پس از آن، مایه‌زنی بیمارگر صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمایش براساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن اجرا شد. برای شناسایی جدایه‌های برتر، ناحیه‌ی ITS آن‌ها با به‌کارگیری پرایمرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و تعیین توالی شد. با مقایسه‌ی نتایج در پایگاه اینترنتی NCBI، مخمرهای *Sporobolomyces ruberrimus*، *Cryptococcus albidus*، *C. magnus* و *Rhodotorula* sp. به‌عنوان آنتاگونیست‌های برتر شناسایی شدند. براساس نتایج، *S. ruberrimus* مؤثرترین مخمر بوده و بیماری را بهتر از سایر گونه‌ها کنترل نمود.

**واژه‌های کلیدی:** کنترل بیولوژیک، بلاست مرکبات، *Pseudomonas*، *Sporobolomyces*، *Cryptococcus* و *Rhodotorula*

### مقدمه

ضمن داشتن خطرات سوء زیست محیطی، سبب بروز جدایه‌های مقاوم بیمارگر نیز می‌شوند (Gnanamanickam, 2007; Hwang et al., 2005)، طی سال‌های اخیر، تلاش بر این بوده است تا با کاهش مصرف سموم شیمیایی، سایر روش‌های جایگزین نظیر استفاده از عوامل بیولوژیک، افزایش یابد. کنترل بیولوژیک تعاریف متنوعی دارد ولی در مفهوم کلی، واژه‌ی کنترل بیولوژیک یا بیوکنترل اشاره به استفاده از میکروارگانیسم‌های طبیعی علیه بیمارگر دارد (Barkai-Golan, 2001). در دهه‌های گذشته در خصوص توانایی آنتاگونیستی مخمرها، گزارش‌های بسیاری ارائه شده است. در دهه‌ی ۱۹۸۰ افرادی همچون

بیماری بلاست مرکبات (Citrus blast) از جمله بیماری‌های شایع در اکثر نقاط مرکبات خیز دنیا به‌استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد که به‌وسیله‌ی باکتری سودوموناس (*Pseudomonas* spp.) ایجاد می‌شود (Snowdon, 1990; Whiteside et al., 1989). در ایران، این بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۶۶ از درختان مرکبات استان مازندران گزارش شد (Shams-Bakhsh & Rahimian, 1997). برای پیشگیری و کنترل این بیماری به‌غیر از رعایت بهداشت زارعی، می‌توان از سموم شیمیایی و ارقام مقاوم نیز استفاده نمود (Whiteside et al., 1989). مصرف سموم شیمیایی

مخمرها با مکانیسم‌های متنوعی در کاهش بیماری مؤثرند که مهم‌ترین آن‌ها، رقابت بر سر مکان (Mercier & Wilson, 1994) و غذا (Arras et al., 1998)، برقراری رابطه‌ی انگلی با بیمارگر (Wisniewski et al., 1991) و القای مقاومت در گیاه (El-Ghaouth et al., 2001) می‌باشند. تاکنون اکثر این نوع مکانیسم‌ها در بیمارگرهای قارچی مورد بررسی قرار گرفته است، ولی در خصوص بیمارگرهای باکتریایی، القای مقاومت نسبت به سایر مکانیسم‌ها بیش‌تر مورد توجه بوده است. در مرکبات از القای مقاومت مخمر *C. oleophila* برای کاهش بیماری کپک آبی میوه‌ی گریپ‌فروت استفاده شده و با این مکانیسم، بیوسنتر اتیلن، فعالیت فنیل آلانین آمین‌لیاز، تجمع فیتوالکسین، کیتیناز و ۱-۳ اندوگلوکاناز افزایش یافته است. همچنین محققان توانسته‌اند با کمک مخمر، سیستم دفاعی گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis* sp.) را در برابر باکتری *P. s. pv. syringae* القا کرده و سبب بروز مقاومت نسبت به این باکتری شوند (Raacke et al., 2006). در پی موفقیت برخی از میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست در کنترل عوامل بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی، مطالعات گسترده‌تری برای توسعه‌ی محصولات بیولوژیک صورت گرفته و تعدادی از آنتاگونیست‌های میکروبی نظیر *C. oleophila* و *Cryptococcus albidus* به‌ترتیب تحت عناوین تجاری Aspire و Yiledplus مجوز ثبت و اجازه‌ی استفاده در سطح تجاری را کسب کرده‌اند (Sharma et al., 2009). در ایران استراتژی کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای گیاهی از سالیان دور مورد توجه جدی قرار گرفته و علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته، کاربرد عملی آن‌ها در سطح مزرعه با موفقیت چندانی همراه نبوده است. با توجه به مزیت‌های برشمرده شده در خصوص استفاده از مخمرها و نیز با وجود دانستن چالش‌های موجود در کاربرد عملی آن، در این بررسی سعی شد تا مخمرهایی از مناطق شمالی ایران، جمع‌آوری و پس از بررسی توان بیوکنترلی آن‌ها علیه عامل بیماری بلاست مرکبات، جدایه‌های برتر انتخاب و شناسایی شوند.

جانی‌سیویز (Janisiewicz, 1987) و چالوتز و همکاران (Chalutz et al., 1988)، جنبه‌های مثبتی در مورد توانایی مخمرها در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزیجات، ارایه کرده‌اند. در سال‌های پس از آن نیز تحقیقات زیادی در مورد توان بیوکنترلی مخمرها صورت گرفت و عمده‌ی آن تحقیقات به‌زمینه‌ی کنترل بیماری‌های قارچی در گیاهان مختلف از جمله مرکبات اختصاص یافته‌است. کارآیی مخمرهای *Debaryomyces hansenii*، *Pichia guilliermondii*، *Kloeckera apiculata*، *Candida oleophila* و *Metschnikowia pulcherrima* در کنترل کپک سبز و آبی میوه‌ی مرکبات (Chalutz & Wilson, 1990; Droby et al., 1989; El-Neshawy & El-Sheikh, 1998; Lahlali et al., 2004; Long et al., 2007; Wilson & Chalutz, 1989) و مخمر *D. hansenii* در کنترل بیماری پوسیدگی ترش میوه‌ی مرکبات (Chalutz & Wilson, 1989) گزارش شده است. مؤثر بودن مخمرهای *C. sake*، *C. formata*، *C. saitoana*، *Saccharomyces aureobasidium pullulans*، *M. pulcherrima*، *M. fructicola*، *Cerevisiae* سایر پوسیدگی‌های میوه در مرکبات (Sharma et al., 2009) از جمله دیگر گزارش‌های منتشر شده است. از بین موارد یادشده، مخمر *D. hansenii* دارای بیش‌ترین اثر بیوکنترلی روی بیمارگرها در مرکبات، بوده است (Chalutz et al., 1988; Karabulut & Baykal, 2003; Wilson & Chalutz, 1989; Wisniewski et al., 1988). در ایران نیز گزارش‌هایی درخصوص توان کاهش بیماری‌های گیاهی با برخی مخمرها ارایه شده است. در این زمینه، می‌توان به تأثیر مخمر *M. pulcherrima* در کاهش کپک آبی میوه مرکبات (Ghasemi et al., 2011) و کپک آبی یا خاکستری سیب (Seyfi et al., 2006)، *C. membranifaciens* در کاهش بیماری کپک خاکستری سیب (Gholamnejad et al., 2010; Zangouei et al., 2010) و *Rhodotorula mucilaginosa* و *S. cerevisiae* روی کاهش کپک آبی سیب (Gholamnejad et al., 2009) اشاره نمود.



## مواد و روش های پژوهش

### جداسازی مخمر

برای جداسازی مخمرها، از باغات مرکبات متروکه ای که سم پاشی های متداول صورت نگرفته و درختان آن نیز فاقد علائم بیماری بلاست بوده اند، نمونه هایی از برگ و میوه جمع آوری شد. نمونه برداری از باغ های استان های گلستان، گیلان و مازندران انجام گرفت. برای ثبت موقعیت جغرافیایی جدایه های جمع آوری شده، از دستگاه موقعیت یاب جهانی (Global Positioning System)، (مدل GPS Etrex Vista HCx) استفاده شد (جدول ۱). برای جداسازی مخمرها در آزمایشگاه، تعدادی میوه و برگ جمع آوری شده از هر منطقه، در داخل فلاسک ۵۰۰ میلی لیتری، حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و یک میلی لیتر توین ۲۰ منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه با کمک دستگاه تکان دهنده (Shaker) با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به دست آمده، روی محیط کشت مالت آگار (Malt Agar) حاوی سولفات استرپتومایسین به میزان ۰.۱٪ (w/v) (Wang et al., 2009)، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۱۰۰ ppm) و آمپی سیلین (۵۰ ppm) (Benbow & Sugar, 1999) کشت شد و به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه ی سلسیوس نگهداری گردید. پس از خالص سازی و مشاهده در میکروسکوپ، نمونه ها تا زمان انجام آزمون، در یخچال نگهداری شدند. برای گروه بندی اولیه ی کلیه ی جدایه های به دست آمده، مشخصات ماکروسکوپی (رنگ و شکل) پرکنه ها بررسی و از هر گروه یک جدایه انتخاب و آزمون بیو کنترل در شرایط گلخانه به کار برده شد.

### ارزیابی کارآیی مخمرها در گلخانه

#### تهیه اینوکولوم مخمر

از محیط کشت مایع NYGB (هشت گرم محیط کشت مایع Nutrient Broth) حاوی پنج گرم عصاره ی مخمر، ده گرم گلوکز و یک لیتر آب مقطر) برای تهیه اینوکولوم مخمر، استفاده شد (Cao et al., 2001). هریک از جدایه های مخمر به طور جداگانه به داخل فلاسک محتوی NYGB منتقل شدند و فلاسک ها در دمای ۲۵ درجه ی

سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. محتویات هر فلاسک به مدت ۱۲ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند (De Capdeville et al., 2002). از رسوب به دست آمده، سوسپانسیونی غلیظ با غلظت تقریبی  $10^{10}$  سلول مخمر در هر میلی لیتر (توسط لام هماسیتومتر) تهیه شد.

### تهیه گیاهان آزمون

برای ارزیابی کارآیی جدایه های مخمر در بازداری از رشد باکتری و توان القای مقاومت در گیاه، برای هر جدایه چهار نهال دوساله ی نارنج (*Citrus aurantifolia*) تهیه شد. چهار هفته قبل از ارزیابی، به منظور به دست آوردن برگ های تازه و هم سن، همه ی نهال ها سربرداری شدند. در این مدت، ضمن آبیاری مداوم، از مصرف هرگونه کود و یا سموم شیمیایی برای گیاه خودداری شد.

### تهیه بیمارگر

از کشت ۲۴ ساعته ی جدایه ی ۶۳ گونه *P. syringae* عامل بلاست مرکبات که قبلاً بیماری زایی آن ها اثبات شده بود، برای تهیه ی سوسپانسیون عامل بیماری زا استفاده شد. جدایه روی محیط NA (Nutrient agar) کشت و در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس، نگهداری شد. پس از رشد، سلول های باکتری در آب مقطر پخش شده و با کمک اسپکتروفوتومتر، کدوری سوسپانسیون (OD) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲ واحد (معادل  $10^8$  سلول در هر میلی لیتر) تنظیم شد.

### بررسی میزان کنترل عامل بیمارگر

برای بررسی تأثیرات آنتاگونیستی مخمرها در گیاه علیه عامل بیماری بلاست مرکبات، به ازاء هر تیمار مخمر، ۴ نهال نارنج با برگ های جوان و هم سن، در نظر گرفته شد. سوسپانسیون مخمرها با غلظت  $10^{10}$  سلول در هر میلی لیتر، روی گیاه پاشیده شد. پاشش مخمرها به فواصل هر دو روز، تکرار شد. در این مدت گیاهان در فیتوترون و در دمای ۱۵ درجه ی سلسیوس نگهداری شدند. ۴۸ ساعت پس از پاشش بار سوم مخمرها، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بیمارگر بلاست با غلظت  $10^8$  سلول در هر میلی لیتر، روی هر برگ تزریق و دور ناحیه ی آب سوخته شده در اثر تزریق،



سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت یک دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

### (ب) تخلیص محصول PCR

قطعات ITS تکثیر شده، با استفاده از Microcon- centrifugal filter (شرکت Millipore) خالص‌سازی شدند. محصول نهایی، تا زمان استفاده‌ی بعدی، در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

### (پ) تعیین ترادف

تعیین ترادف کلیه ژن‌های مورد بررسی، از هر دو سمت (Forward, Reverse) انجام گرفت. آغازگرها و شرایط مورد استفاده، همان آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر اولیه، بودند. برای تکثیر از کیت Dye 3.1. Terminator Cycle Sequencing Kit (شرکت Applied Biosystem) استفاده شد.

### نتایج

#### کارآیی مخمر در گلخانه

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪، بین تیمارها و شاهد از نظر کاهش بیماری وجود دارد. در مقایسه‌ی میانگین‌ها با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪، جدایه‌ی ۲ در مقایسه با شاهد و سایر جدایه‌ها، تأثیر بیش‌تری را در کاهش بروز بیماری داشت (شکل ۱).

#### شناسایی مخمرهای برتر

##### بررسی خصوصیات ژنتیکی مخمرها

برای شناسایی مخمرها، ناحیه ۵۶۴ جفت‌بازی، ITS آن‌ها تکثیر و تعیین ترادف شدند (شکل ۲). نتایج حاصل از تعیین ترادف، با کمک پایگاه (NCBI) GenBank شناسایی شدند (جدول ۱).

##### بررسی خصوصیات فنوتیپی

پرگنه‌ی مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* (جدایه‌ی ۲) قرمز رنگ و سلول‌ها بیضی شکل با ابعاد  $5/5 \times 4/1$  میکرومتر، پرگنه‌ی *C. albidus* (جدایه‌ی ۹)

علامت‌گذاری شد. پس از یک هفته نگهداری در دمای ۱۵ درجه‌ی سلسیوس با رطوبت نسبی در حد اشباع، مساحت ناحیه‌ی گسترش علایم، با کمک دستگاه Dino Capture بر حسب میلی‌متر مربع، ثبت گردید. در این آزمون به ازاء هر تیمار، ۵۰ تکرار در نظر گرفته شد. هفت روز پس از مایه‌زنی بیمارگر به برگ نهال‌های نارنج در تیمارها و شاهد، میزان گسترش بیماری بر حسب میلی‌متر مربع و با کمک دستگاه Dino capture ثبت گردید. داده‌ها، به‌صورت طرح بلوک کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند.

#### شناسایی مخمرهای برتر

برای شناسایی ضمن بررسی خصوصیات فنوتیپی، از خصوصیات ژنتیکی آن نیز استفاده شد.

##### بررسی خصوصیات فنوتیپی مخمرها

برای بررسی خصوصیات مرفولوژیکی پرگنه‌ها، جدایه‌ها روی WL nutrient agar کشت شدند. جهت بررسی ابعاد سلول‌های مخمر، از میکروسکوپ Leica DM2500 M استفاده شد. ابعاد ۱۰۰ سلول مخمری که به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند در دو جهت طولی و عرضی اندازه‌گیری و میانگین کلی ابعاد بر حسب میکرومتر، ثبت شد.

##### بررسی خصوصیات ژنتیکی مخمرها

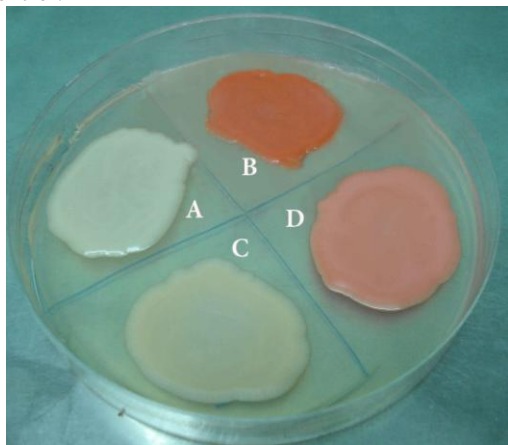
#### الف) تکثیر ناحیه‌ی ITS برای تعیین ترادف

استخراج DNA از سلول‌های تازه کشت شده مخمرها روی محیط کشت W1 nutrient agar، با استفاده از کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit (شرکت Promega) انجام شد. برای تکثیر ناحیه‌ی ITS، از دو آغازگر زیر استفاده شد (White *et al.*, 1990).

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'  
ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'

مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، نیم میکرومولار از هر نوع آغازگر، ۱/۵ میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، یک میلی‌مولار dNTPs و ۱/۵ واحد Taq پلی‌مراز بود. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج دقیقه، سپس ۳۵ چرخه‌ی مجزا (شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه‌ی

(Lambda DNA/EcoRI/Hind III); lane C, negative control.

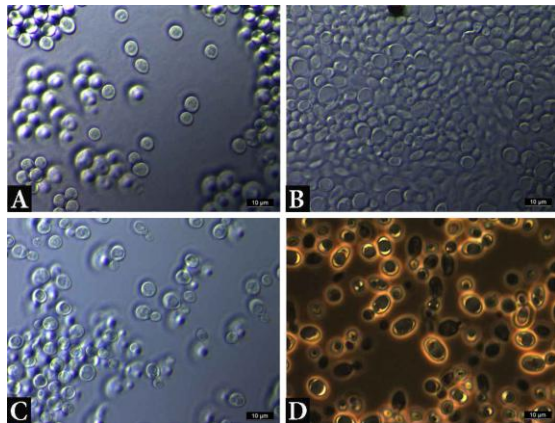


شکل ۳- پرگنه‌ی گونه‌های مخمر مؤثر در کنترل بیولوژیکی

بیماری بلاست مرکبات روی محیط کشت WL nutrient agar

A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.

Fig. 3- Colony morphology of effective yeast species in biocontrol of citrus blast disease on WL nutrient agar. A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.



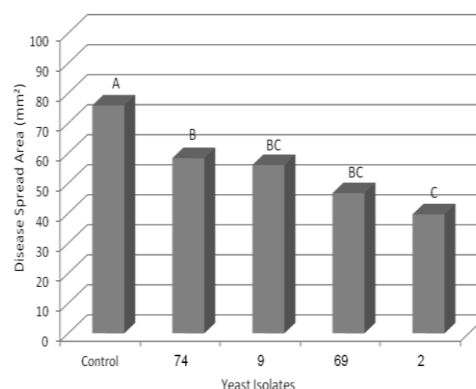
شکل ۴- سلول‌های مخمرهای مؤثر در کنترل بیولوژیکی

بیماری بلاست مرکبات:

A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.

Fig. 4- Cellular morphology of yeast isolates proved to be effective in biocontrol of citrus blast A: *Cryptococcus albidus*, B: *Sporobolomyces ruberrimus*, C: *Cryptococcus magnus*, D: *Rhodotorula* sp.

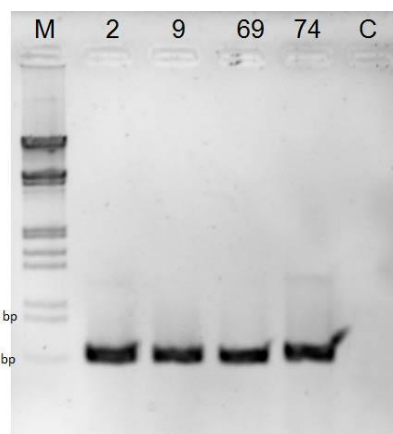
به‌رنگ سفید شیری و سلول‌های کروی شکل با ابعاد  $5/0 \times 5/2$  میکرومتر، در *C. magnus* (جدایه‌ی ۶۹) پرگنه به‌رنگ کرم با سلول‌هایی با ابعاد  $4/6 \times 5/3$  میکرومتر و رنگ پرگنه در مخمر *Rhodotorula* sp. (جدایه‌ی ۷۴) صورتی رنگ بوده و سلول‌های آن بیضی شکل و به ابعاد  $4/5 \times 6/2$  میکرومتر بودند (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین تأثیر جدایه‌های مختلف مخمر

در شدت بیماری بلاست (بر حسب میلی‌متر مربع) بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن.

Fig. 1- Mean comparison of effect of different yeast isolates (see Table 1) on blast disease severity (lesion diameter) using Duncan multiple range test.



شکل ۲- قطعه‌ی تکثیر شده ITS در چهار جدایه‌ی مخمر به کار برده شده در کنترل بیولوژیکی بیماری بلاست پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، M نشانگر جرم مولکولی و C کنترل منفی.

Fig. 2- Agarose-gel electrophoresis of PCR products of ITS region of four yeast isolates used in biocontrol of citrus blast. Lane M, molecular size markers

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی گونه‌های مخمر مؤثر در کنترل بیولوژیک بلاست مرکبات.

Table1- Geographical locations of promising yeast species in the biocontrol of citrus blast disease.

Position	City	Province	Yeast	Isolate
N36 22.833 E52 40.121	Babol	Mazandaran	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	2
N36 44.558 E53 52.727	Galogah	Golestan	<i>Cryptococcus albidus</i>	9
N36 37.579 E51 32.158	Chalus	Mazandaran	<i>Cryptococcus magnus</i>	69
N37 10.278 E50 07.923	Langroud	Gilan	<i>Rhodotorula</i> sp.	74

## بحث

است (Bar-Shimon *et al.*, 2004). دانستن نحوه‌ی اثر عامل

بیوکنترل، بسیار حایز اهمیت بوده و با داشتن اطلاعات جامع‌تر، می‌توان آنتاگونیست‌های مؤثرتری را نیز از طبیعت انتخاب نمود (Wilson & Chalutz, 1989). برای آنتاگونیست‌های میکروبی، چندین نحوه‌ی اثر، ارایه شده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: تولید آنتی‌بیوتیک، رقابت بر سر مکان و غذا، پارازیت نمودن بیمارگر و همچنین القای مقاومت در گیاهان (Droby *et al.*, 2000; El-Ghaouth *et al.*, 2001) و از میان مکانیسم‌های ذکر شده، رقابت بر سر غذا و مکان به‌عنوان مهم‌ترین مکانیسم معرفی شده است (Droby *et al.*, 1992). در مخمرها نیز، هرچند مکانیسم‌هایی که در کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، به‌طور کامل بررسی نشده است، اما ظاهراً مخمرها آنتی‌بیوتیک تولید نکرده و گاهی اوقات به این خاطر نسبت به باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک، ترجیح داده می‌شوند (Chandgoyal & Spotts, 1996; Droby & Chalutz, 1994; Kurtzman & Fell, 1998). به‌طور کلی مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که طی آن، مخمرهای بیوکنترل قادر هستند تا میزان بیماری را کاهش دهند عبارتند از: اتصال عوامل آنتاگونیست به هیف بیمارگرها (Arras *et al.*, 1998)، رقابت بر سر مواد غذایی (Arras *et al.*, 1998; Droby *et al.*, 1992)، رقابت بر سر مکان (Mercier & Wilson, 1994) و پارازیت مستقیم هیف (Wisniewski *et al.*, 1991). به‌نظر می‌رسد در این بررسی، هیچ کدام از مکانیسم‌های ذکر شده در کنترل بیولوژیک باکتری‌ها کاربردی نداشته‌اند، زیرا باکتری سودوموناس، فاقد هیف بوده و از نظر اندازه نیز به مراتب کوچک‌تر از مخمر می‌باشد. مکانیسم القای مقاومت

در سال‌های گذشته، درخصوص توانایی آنتاگونیستی مخمرها تحقیقات متعددی انجام شده است (Chalutz *et al.*, 1988; Droby & Chalutz, 1994; Droby *et al.*, 1989). بررسی اخیر به‌منظور یافتن مخمرهایی که دارای توان خوبی در بیوکنترل بیماری بلاست مرکبات باشند، انجام شده است. نتایج تحقیق نشان داد که تعدادی از مخمرهای به‌دست آمده از استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، در کنترل بیولوژیک بیماری بلاست مرکبات کارآیی داشتند. در گذشته نیز گزارش‌های متنوعی مبنی بر مؤثر بودن این گونه‌ها یا گونه‌های دیگر از این جنس‌ها ارایه شده است که می‌توان به تعدادی از آن‌ها اشاره نمود: مخمرهای *Sporobolomyces roseus* برای بیماری کپک خاکستری سیب (Filonow *et al.*, 1996)، *C. albidus* برای کپک خاکستری و پوسیدگی آبی سیب (Calvo *et al.*, 2003; Chandgoyal & Spotts, 1996; Tian *et al.*, 2002)، *C. magnus* برای آنتراکنوز پاپایا (De Capdeville *et al.*, 2007)، *Cryptococcus laurentii* برای ترش مرکبات (Liu *et al.*, 2010)، *R. aurantiaca* برای کپک آبی گلابی (Chandgoyal & Spotts, 1996) و *R. glutinis* برای پوسیدگی خاکستری گلابی (Zhang *et al.*, 2008) و کپک آبی در سیب (Calvo *et al.*, 2003; Castoria *et al.*, 2005). در تحقیق حاضر نیز از بین چهار گونه مخمر برتر، مخمر *S. ruberrimus* بیش‌ترین کارآیی را در مقایسه با بقیه دارا بود، در حالی که *C. albidus* از لحاظ استفاده در کنترل بیولوژیک، پیشینه‌ی بهتری داشته و به‌صورت تجاری تهیه (با نام Yield Plus) و به‌منظور کاهش خسارت بیماری‌های مختلف مصرف شده

یا القای پاسخ‌های دفاعی به‌وسیله‌ی آنتاگونیست‌های میکروبی نیز به‌عنوان نوعی دیگر از مکانیسم‌های بیوکنترل برای مخمرها معرفی شده است (Arras, 1996; Droby *et al.*, 1992; Fajardo *et al.*, 1998; Porat *et al.*, 1999). مقاومت القایی، سبب ایجاد موانع ساختاری یا تقویت آن (El-Ghaouth *et al.*, 1998) و نیز سبب تولید ترکیبات ضد میکروبی در گیاه می‌شود که مشتمل بر تجمع سیگنال‌های مولکولی نظیر سالیسیلیک اسید (SA)، جاسمونیک اسید (JA)، بیان مولکول‌های ضد میکروبی و تولید ترکیبات فنله نظیر فیتوالکسین می‌باشند (Basse & Boller, 1992; Dangl & Jones, 2001; Suzuki *et al.*, 2005). برخی از آنزیم‌های تولید شده، سبب تخریب واکنش گلیگولیز و چرخه‌ی تری کربو کسلیک اسید می‌گردد (Chan *et al.*, 2007). در این بررسی، پاشش مخمرها روی برگ‌های نارنج، ۳ بار و به‌فواصل دو روزه انجام شد و برای این کار از سلول‌های مخمر تازه کشت شده استفاده شد. البته نه تنها تماس با موجودات زنده، سبب تحریک بیان چنین مکانیسم‌های دفاعی در گیاه خواهد شد، بلکه ترکیبات متعلق به عوامل بیمارگرها نیز سبب القای بیان مکانیسم‌های دفاعی می‌شوند که به القاکنده‌های عمومی و یا مولکول‌های مرتبط با بیمارگرها (Pathogen-associated molecular patterns- PAMP) شناخته شده‌اند و شامل پپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها، الیگوساکاریدها و یا چربی‌ها می‌باشند (Nurnberger *et al.*, 2004). در این زمینه گزارش شده است که مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها، محرک‌های بیش‌تری را دارا هستند (Raacke *et al.*, 2006). نتایج بررسی حاضر نشان داده است که در بین کلیه‌ی جدایه‌های مورد بررسی، تنها معدودی از جدایه‌های مخمرها، قادر بودند تا در مقایسه با شاهد، مقاومت نسبی نسبت به بیماری بلاست را در گیاه مرکبات، افزایش دهند. نتایج تحقیقات پیشین، نشان داد که در القای مقاومت توسط مخمرها، مسیرهای مختلفی تأثیرگذار بوده‌اند. در تحقیقی مشابه با این بررسی، شخص شد که ترکیبات گلیکوپپتیدی دیواره‌ی سلولی مخمر سبب تجمع فیتوالکسین کامالکسین (Camalexin) و بیان ژن‌های مقاومت اکتسابی سیستمیک نسبت به باکتری

*P. s. pv. syringae* در آرآیدوپسیس شده است. در این تحقیق ثابت شده است که مسیر اصلی القای مقاومت، مسیر سالیسیلات (Salicylate) بوده و با موتاسیون مسیر جاسمونات (jasmonate)، خللی در بروز مقاومت ایجاد نخواهد شد (Raacke *et al.*, 2006). برای اینکه سیستم SAR (systemic acquired resistance) و به‌دنبال آن، سایر واکنش‌های مرتبط فعال شده و در برگ پخش شوند، حدود ۴۸-۳۶ ساعت زمان نیاز است (Shulaev *et al.*, 1995). در بررسی حاضر نیز برای حصول اطمینان بیش‌تر در خصوص گسترش سیگنال‌های مقاومت در کل برگ‌ها، تعداد پاشش، سه بار تکرار شد و پس از هر بار پاشش ۴۸ ساعت، برای بروز سیستم مقاومت در گیاه، به آن فرصت داده شد. مخمرها پس از القای اولیه‌ی مقاومت در گیاه، قادرند تا سبب بیان انواع متفاوتی از فیتوالکسین و یا پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-Protein) شوند. به‌عنوان مثال افزایش فیتوالکسین‌های اسکوپارین (Scoparone) و اسکوپولتین (Scopoletin) در مرکبات (Arras, 1996)، افزایش آنزیم‌های مرتبط با بیماری‌زایی یعنی کیتیناز (El-Ghaouth *et al.*, 1998; El-Ghaouth *et al.*, 2000; Ippolito & Nigro, 2000)، گلوکاناز و پراکسیداز در سیب و مرکبات (El-Ghaouth *et al.*, 2000; Ippolito & Nigro, 2000) و یا آنزیم‌هایی که با اختلال در تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز بیمارگر، سبب بروز مقاومت در گیاه خواهند شد (Hashem & Alamri, 2009). فعال‌سازی سیستم مقاومت در گیاه به‌منظور بروز مقاومت در برابر بیمارگرها، همیشه یکنواخت نبوده و تحت تأثیر ارتباط متقابل بین گیاه و بیمارگر بوده و فاکتورهای مختلفی می‌توانند روی آن تأثیرگذار باشند (Elmer & Reglinski, 2006). از این رو کارآیی آن می‌تواند تا حدی با ژنوتیپ‌های بیمارگر، میزبان و نیز شرایط محیطی مرتبط باشد. با توجه به خصوصیات برجسته‌ی مخمرها نظیر غیرسمی بودن، قابل تجزیه بودن در محیط و قیمت ارزان، می‌توان از آن‌ها جهت افزایش مقاومت در گیاهان و به‌صورت گسترده در کشاورزی استفاده نمود.

## References

- Arras, G. 1996.** Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 8: 191-198.
- Arras, G., Cicco, V., Arru, S. & Lima, G. 1998.** Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 73: 413-418.
- Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., Goldway, M., Wisniewski, M. & Droby, S. 2004.** Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*. 45: 140-148.
- Barkai-Golan, R. 2001.** *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control*. Elsevier Science, Amsterdam.
- Basse, C. W. & Boller, T. 1992.** Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells: N-linked glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released from the glycopeptides. *Plant Physiology*. 98: 1239-1247.
- Benbow, J. M. & Sugar, D. 1999.** Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease*. 83: 839-844.
- Calvo, J., Calvente, V., De Orellano, M. E., Benuzzi, D. & De Tosetti, M. I. S. 2003.** Improvement in the biocontrol of postharvest diseases of apples with the use of yeast mixtures. *Biocontrol*. 48: 579-593.
- Cao, H., Baldini, R. L. & Rahme, L. G. 2001.** Common mechanisms for pathogens of plants and animals. *Annual Review of Phytopathology*. 39: 259-284.
- Castoria, R., Morena, V., Caputo, L., Panfili, G., De Curtis, F. & De Cicco, V. 2005.** Effect of the biocontrol yeast *Rhodotorula glutinis* strain LS11 on patulin accumulation in stored apples. *Phytopathology*. 95: 1271-1278.
- Chalutz, E. & Wilson, C. L. 1990.** Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*. 74: 134-137.
- Chalutz, E., Ben-Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B. & Wilson, C. L. 1988.** Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Phytoparasitica*. 16: 69-75.
- Chan, Z. L., Qin, G. Z., Xu, X. B., Li, B. Q. & Tian, S. P. 2007.** Proteome approach to characterize proteins induced by antagonist yeast and salicylic acid in peach fruit. *Journal of Proteome Research*. 6: 1677-1688.
- Chandgoyal, T. & Spotts, R. A. 1996.** Control of postharvest pear diseases using natural saprophytic yeast colonists and their combination with a low dosage of thiabendazole. *Postharvest Biology and Technology*. 7: 51-64.
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*. 411: 826-833.
- De Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S. V. & Aist, J. R. 2002.** Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. *Phytopathology*. 92: 900-908.
- De Capdeville, G., Souza, M. T., Santos, J. R. P., Miranda, S. P., Caetano, A. R. & Torres, F. A. G. 2007.** Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthracnose in post-harvest of papaya fruit. *Scientia Horticulturae*. 111: 179-185.



- Droby, S. & Chalutz, E. 1994.** Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. pp. 63-75. In: Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. (eds.), *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables-Theory and Practice*, CRC Press, Boca Raton.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. 1989.** Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 794-800.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. 1992.** Biological control of postharvest diseases: A promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica*. 20: 149-153.
- Droby, S., Porat, R., Vinokur, V., Cohen, L., Weiss, B. & Daus, A. 2000.** Induction of resistance to postharvest decay by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*. 24: 297-301.
- El-Ghaouth, A. 1997.** Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19: 160-162.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. L. & Wisniewski, M. 1998.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*. 88: 282-291.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C. & Wisniewski, M. 2001.** Induction of systemic resistance in apple by the yeast antagonist *Candida saitoana*. *Bulletin OILB/SROP*. 24: 309-312.
- El-Ghaouth, A., Smilanick, J. L., Brown, G. E., Ippolito, A., Wisniewski, M. & Wilson, C. L. 2000.** Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease*. 84: 243-248.
- El-Neshawy, S. M. & El-Sheikh, M. M. 1998.** Control of green mold on oranges by *Candida oleophila* and calcium treatments. *Annals of Agricultural Sciences Cairo*. 3: 881-890.
- Elmer, P. A. G. & Reglinski, T. 2006.** Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*. 55: 155-177.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. 1999.** Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 329-337.
- Fajardo, J., McCollum, T., McDonald, R. & Mayer, R. 1998.** Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum*. *Biological Control*. 13: 143-151.
- Filonow, A., Vishniac, H., Anderson, J. & Janisiewicz, W. 1996.** Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control*. 7: 212-220.
- Ghasemi, S., Etebarian, H., Sahebani, N. & Aminian, H. 2011.** Control of blue mold on orange fruit by yeast, *Metschnikowia pulcherrima* (m54) and induction of  $\beta$  1,3-glucanase enzyme in albedo and flavedo tissues. *Proceeding of the biological control development congress in Iran*, 27-28 July, Tehran, Iran, 477. (In Persian with English summary)
- Gholamnejad, J., Etebarian, H. R. & Sahebani, N. 2010.** Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science*. 4: 1-7.

- Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Roustae, A. & Sahebani, N. A. 2009.** Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research. 49: 270-275. (In Persian with English summary)
- Gnanamanickam, S. S. 2007.** Plant Associated Bacteria. Springer, Dordrecht.
- Hashem, M. & Alamri, S. 2009.** The biocontrol of postharvest disease (*Botryodiplodia theobromae*) of guava (*Psidium guajava* L.) by the application of yeast strains. Postharvest Biology and Technology. 53: 123-130.
- Hwang, M. S. H., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W. & Guttman, D. S. 2005.** Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. Applied and Environmental Microbiology. 71: 5182-5191.
- Ippolito, A. & Nigro, F. 2000.** Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Crop Protection. 19: 715,723.
- Janisiewicz, W. J. 1987.** Postharvest biological control of blue mold on apples. Phytopathology. 77: 481-485.
- Karabulut, O. A. & Baykal, N. 2003.** Biological control of postharvest diseases of peaches and nectarines by yeasts. Journal of Phytopathology. 151: 130-134.
- Klotz, L. J. 1978.** Fungal, bacterial, and non parasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. pp. 1-23. In: Reuther, W., Calavan, E. C. & Carman, G. E. (eds.), The Citrus Industry: IV. Crop Protection, University of California Press, Berkely.
- Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. 1998.** The Yeasts, a Txonomic Study. Elsevier Science, Amesterdam.
- Lahlali, R., Serrhini, M. & Jijakli, M. 2004.** Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruits in Morocco. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 69: 601-609.
- Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B. & Zheng, X. 2010.** Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. Letters in Applied Microbiology. 51: 30-35.
- Long, C., Deng, B. & Deng, X. 2007.** Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34-9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. Annals of Microbiology. 57: 203-207.
- Mercier, J. & Wilson, C. L. 1994.** Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. Biological Control. 4: 138-144.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. & Piater, L. 2004.** Innate immunity in plants and animals: Striking similarities and obvious differences. Immunological Reviews. 198: 249-266.
- Porat, R., Vinocur, V., Weiss, B., Cohen, L. & Droby, S. 1999.** Effects of various elicitors on the resistance of citrus fruit against pathogens. Phytoparasitica. 27: 157-158.
- Raacke, I., Von Rad, U., Mueller, M. & Berger, S. 2006.** Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as independent mechanisms. Molecular Plant-Microbe Interactions. 19: 1138-1146.
- Seyfi, R., Nahvi, I. & Balali, G. 2006.** Investigation of biological control of post harvest diseases on apple by yeast *Metschenikowia pulcherrima*. Iranian Journal of Biology. 19: 64-76. (In Persian with English summary)



- Shams-Bakhsh, M. & Rahimian, H. 1997.** Comparative study on agents of citrus blast and bacterial canker of stone fruits in Mazandaran. Iranian Journal of Plant Pathology. 33: 132-143. (In Persian with English summary)
- Sharma, R. R., Dinesh, S. & Rajbir, S. 2009.** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control. 50: 205-221.
- Shulaev, V., León, J. & Raskin, I. 1995.** Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? The Plant Cell. 7: 1691-1701.
- Snowdon, A. L. 1990.** A Colour Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Manson Publishing, London.
- Suzuki, H., Reddy, M. S. S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. D., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Blount, J. W., Mendes, P. & Dixon, R. A. 2005.** Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. Planta. 220: 696-707.
- Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y. & Liu, H. B. 2002.** Biocontrol efficacy of antagonist yeasts to gray mold and blue mold on apples and pears in controlled atmospheres. Plant Disease. 86: 848-853.
- Wang, X., Li, G., Jiang, D. & Huang, H. C. 2009.** Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. Biological Control. 50: 164-171.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 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, San Diego.
- Whiteside, J. O., Garnsey, S. M. & Timmer, L. W. 1989.** Compendium of Citrus Diseases. American Phytopathology Society Press, Minnesota.
- Wilson, C. L. & Chalutz, E. 1989.** Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. Scientia Horticulturae. 40: 105-112.
- Wisniewski, M., Wilson, C. L., Chalutz, E. & Hershberger, W. 1988.** Biological control of postharvest diseases of fruit: Inhibition of *Botrytis* rot on apple by an antagonistic yeast. 46<sup>th</sup> Annual meeting of the electron microscopy society of America, 7-12 August, San Francisco, U.S.A., 290-291.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. & Chalutz, E. 1991.** Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. 1. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 39: 245-258.
- Zangouei, E., Etebarian, H. R. & Sahebani, N. A. 2010.** Improving biocontrol of gray mold disease of apple using a mixture of yeast isolates. Iranian journal of plant protection science. 41: 361-372. (In Persian with English summary)
- Zhang, L., Jiang, B., Mu, W. & Zhang, T. 2008.** Characterization of d-tagatose 3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* SK011. Journal of Biotechnology. 136: S726-S726.

## Biological Control of Citrus Blast Disease Using Some Yeast Strains Isolated from Citrus Orchards in the Northern Provinces of Iran

Farid Beiki<sup>1</sup>, Ebrahim Mohamadi Gholtafeh<sup>1</sup>, Heshmatollah Rahimian<sup>2</sup>, Masood Shamsbakhsh<sup>1</sup>, Ali Barzegar<sup>2</sup>,  
Antony Busquets Bisbal<sup>3</sup> and Jorj Lalucat<sup>3</sup>

1- Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- College of Agriculture, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, Sari, Iran.

3- Departament de Biologia, Microbiologia and Institut Mediterrani d'Estudis Avanc, ats (CSIC-UIB), Universitat de les Illes Balears, Campus UIB, 07122 Palma de Mallorca, Spain

**Corresponding author:** Heshmatollah Rahimian, rahimian.h@gmail.com

---

Received: July.5, 2012

1 (1) 53-64

Accepted: Oct.6, 2012

---

### Abstract

Citrus blast caused by *Pseudomonas* spp. is one of the most important diseases in the northern citrus growing provinces of Iran which causes considerable losses to citrus orchards in conducive climatic conditions. In this study, we tried to isolate and introduce some yeast strains from citrus orchards with acceptable biological control potential against the disease. The evaluations were performed under green house conditions on sour orange seedlings. Yeast cell suspensions were sprayed three times with two-days intervals on seedlings before pathogen inoculation. Statistical analysis of the results was carried out using Randomized Complete Block experimental design and comparison of disease severity means was performed by Duncan's Multiple Range Test. For the identification of the effective yeast strains, ITS regions of their rRNA operon were amplified using universal primers(ITS1 and ITS4) by PCR and the amplified fragments were sequenced. Based on the above procedures and comparison of the sequences with those deposited in the GenBank, the effective yeasts were identified as *Sporobolomyces ruberrimus*, *Cryptococcus albidus*, *C. magnus* and *Rhodotorula* sp. According to the results, *S. ruberrimus*, was the most effective yeast and controlled the disease more efficiently than other species.

**Keywords:** Biocontrol, Citrus blast, *Pseudomonas*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*

---

## تأثیر باکتری *Wolbachia* بر پاسخ های بویایی و قدرت پارازیتسم زنبور *Trichogramma brassicae* در شرایط آزمایشگاهی

شهرام فرخی، جلال شیرازی و محمدرضا عطاران

مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک

مسئول مکاتبات: شهرام فرخی، shahram.farrokhi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۳۰

۶۵-۷۹ (۱)

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۱

### چکیده

زنبورهای تریکوگراما به عنوان پارازیتوید تخم و عامل کنترل بیولوژیک بال پولک داران زیان آور در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می گیرند. این زنبورهای هاپلودیپلوئید دارای دو شیوه تولید مثلی شامل نر زایی و ماده زایی می باشند که ماده زایی آن ها اغلب به دلیل حضور باکتری *Wolbachia* به صورت هم زیست درون سلولی است. طی سال های اخیر استفاده از زنبورهای ماده زاء و جمعیت های تک جنسی به عنوان شیوه ای جهت افزایش کارایی کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق به منظور بررسی تأثیر این باکتری بر ویژگی های رفتاری و قدرت پراکنش و میزان پارازیتسم زنبورهای ماده زاء، جمعیت های دو جنسی (B) و ماده زای (BW<sup>+</sup>) زنبور *Trichogramma brassicae* (اکوتیپ بابل سر) در قالب آزمایش های بویایی سنجی و همچنین رهاسازی روی بوته های ذرت در دمای ۲۵ درجه ی سلسیوس اتاق حرارت ثابت با یکدیگر مقایسه شدند. نتایجی که با استفاده از بویایی سنج لوله ای Y شکل بدست آمد، نشان داد که باکتری *Wolbachia* در زنبورهای ماده ی اکوتیپ بابل سر که آلودگی آن به صورت مختلط می باشد، اثر منفی را بر قدرت شناسایی و ردیابی رایحه ی ناشی از آب و عسل و تخم میزبان واسط و نیز تولید فرمون جنسی آن ها تحمیل نمی کند. نتایج آزمایش رهاسازی نیز حاکی از آن است که تفاوت معنی داری بین تعداد تخم پارازیت شده به ازای هر زنبور ماده از جمعیت های مورد آزمایش وجود ندارد. اما بر اساس محاسبات، با رهاسازی ۱۰۰ عدد زنبور (شامل زنبورهای نر در جمعیت دو جنسی)، به طور میانگین تعداد دسته تخم بیشتری به وسیله ی جمعیت ماده زاء (۶/۰۱) در مقایسه با جمعیت دو جنسی (۲/۸۸) پارازیت می شود. در مجموع چنین نتیجه گیری می شود که رهاسازی این لاین ماده زای زنبور تریکوگراما در شرایط طبیعی می تواند از کارایی نسبی بیشتری در برنامه های کنترل بیولوژیک برخوردار باشد.

**واژه های کلیدی:** *Trichogramma brassicae*، جمعیت تک جنسی، *Wolbachia*، بویایی سنج Y شکل، ماده زایی، پراکنش، ذرت.

### مقدمه

در مواردی نیز زنبورهای ماده با بکرزایی به شیوه ی ماده زایی (thelytoky) نتاج ماده ی دیپلوئید تولید می کنند. به نظر می رسد در این نوع از پارازیتویدها زنبور ماده تمایلی به جلب کردن جنس نر نداشته باشند. در مقابل، در جمعیت های دو جنسی، پارازیتویدهای نر زاء (arrhenotokous) در صورت عدم جفت یابی تنها می توانند نتاج نر هاپلوئید تولید کنند و برای ایجاد زنبورهای ماده، جفت گیری و بارور شدن تخم ضروری می باشد. تاکنون

زنبورهای تریکوگراما پارازیتویدهای شناخته شده ای هستند که در سطح وسیعی از اکوسیستم های زراعی به عنوان عامل کنترل بیولوژیک بال پولک داران خسارت زاء رهاسازی می شوند (Li, 1994؛ van Lenteren, و Smith, 1996). سیستم ژنتیکی تعیین جنسیت (sex determination) این حشرات مفید مانند اغلب زنبورهای پارازیتوید هاپلودیپلوئیدی (haplodiploidy) است. به این صورت که نرها به طور معمول هاپلوئید و ماده ها دیپلوئید می باشند، اما

تولیدمثل میزبان خود دارد، در مواردی نیز می‌تواند بر فعالیت سلول‌های سوماتیک (somatic cells) آن‌ها اثر بگذارد. برای مثال در مورد مگس *Drosophila simulans* Sturtevant این احتمال وجود دارد که باکتری *Wolbachia* از طریق تنظیم بیان ژن‌های وابسته به بویایی در میزبان (از جمله ژن *or83b* در مگس‌ها) باعث افزایش سرعت واکنش در آن‌ها شود (Peng & Wang, 2009). در بررسی‌های به‌عمل آمده، تأثیر این باکتری بر میزان باروری و پراکنش جمعیت‌های آلوده مشخص شده است (Stouthamer & Luck, 1993 و Silva, 1999). همچنین در برخی موارد آلودگی مراحل نابالغ زنبور تریکوگراما به باکتری القاکننده بکرزایی *parthenogenesis inducing* (PI-*Wolbachia*) (PI) اثرات منفی بر قدرت رقابت در شرایط سوپرپارازیتسم و نرخ بقای آن‌ها برجای می‌گذارد (Huigens & Hohmann *et al.*, 2001؛ Tagami *et al.*, 2001؛ Miura & Tagami, 2004 و *et al.*, 2004).

اثرات احتمالی *Wolbachia* بر ویژگی‌هایی که از نظر کنترل بیولوژیک حایز اهمیت می‌باشند، مانند قدرت جستجوی میزبان دور از انتظار نمی‌باشد. با این حال، جمعیت‌های تک‌جنسی (unisexual/asexual) (ماده‌زا) تریکوگراما می‌توانند در شرایط محدودیت میزبان به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک برتر محسوب شوند (Stouthamer & Luck, 1993؛ Stouthamer, 1993 و Silva *et al.*, 2000). از جنبه‌ی نظری، استفاده از پارازیتوئیدهای ماده‌زا می‌تواند به‌لحاظ نرخ رشد بالا، پایین‌تر بودن هزینه‌ی تولید، استقرار ساده‌تر به‌علت عدم نیاز به جفت‌یابی و کارایی در تراکم‌های پایین میزبان، دارای مزیت‌های نسبی باشد (Stouthamer, 1993). تلاش‌های زیادی برای دستیابی به مناسب‌ترین گونه یا اکوتیپ زنبور تریکوگراما صورت گرفته (Hassan, 1988) که این غربال‌گری به‌طور مستمر در مراکز تحقیقاتی انجام می‌شود. میزان موفقیت چنین برنامه‌های تحقیقاتی متغیر بوده و بیشترین توجه بر انتخاب کاراترین گونه یا اکوتیپ تریکوگراما متمرکز بوده است (Smith, 1996 و Hassan, 1990).

ماده‌زایی در ۱۰٪ از گونه‌های شناخته شده‌ی زنبور تریکوگراما گزارش شده (Huigens & Stouthamer, 2003 و Almeida, 2004) که در اغلب آن‌ها این شیوه‌ی تولیدمثل بر اثر آلودگی به‌نوعی باکتری همزیست درون سلولی به‌نام *Wolbachia* القا شده است (Stouthamer *et al.*, 1993). تقریباً در تمام زنبورهای پارازیتوئید، افراد نر یک یا چند روز قبل از ماده‌ها ظاهر می‌شوند که این پدیده پروتاندردی (protandry) نام دارد (به‌نقل از: Quicke, 1997). در مورد پارازیتوئیدهای گروهی (gregarious) و یا انفرادی که زنبورهای نر و ماده در نزدیکی یکدیگر از میزبان پارازیت شده خارج می‌شوند، جفت‌گیری در همان منطقه‌ی خروج بسیار محتمل می‌باشد (Pompanon *et al.*, 1997). در چنین شرایطی، جفت‌یابی اغلب از طریق حواس بینایی و لامسه حاصل می‌شود (Tripathi & Singh, 1990). شواهدی دال بر وجود فرمون‌های فرار (volatile pheromone) و غیرفرار در تعدادی از پارازیتوئیدها از جمله زنبورهای خانوادگی Trichogrammatidae به‌دست آمده است (Pompanon *et al.*, 1997). گرچه اغلب فرمون‌های جنسی که به‌وسیله پارازیتوئیدها تولید می‌شوند از نوع فرار می‌باشند، اما به‌نظر می‌رسد در بین گونه‌هایی که جفت‌گیری در همان محل خروج عمومیت بیشتری دارد، استفاده از فرمون‌هایی با برد وسیع و فرار متداول نباشد (Godfray, 1994). با توجه به اینکه تولید فرمون جنسی نیازمند صرف هزینه است، ظاهراً این قابلیت به‌تدریج در زنبورهای ماده‌زای *Eretmocerus mundus* Mercet فاقد جنس نر می‌باشند، از دست رفته باشد (Ardeh, 2005). مشابه این وضعیت در زنبورهای ماده‌زای *Trichogramma cordubensis* Vargas & Cabello تمام افراد جمعیت آلوده به باکتری *Wolbachia* هستند، مشاهده شده است. به‌نحوی که زنبورهای ماده به‌طور کلی قادر به تولید فرمون جنسی نمی‌باشند و یا مقدار تولید آن در حدی نیست که جنس نر هم‌گونه را تحریک نماید (Silva & Stouthamer, 1997). تحقیقات اخیر نشان داده است که باکتری ولباخیا علاوه بر تأثیر عمده‌ای که بر

حرارت، نوع حشره یا گیاه میزبان اشاره کرد (Wang & Kalyebi *et al.*, 1998؛ Fathipour *et al.*, 2000؛ Moezipour *et al.*, 2005؛ Reay-Jones *et al.*, 2006). همچنین تفاوت در نرخ حمله و زمان دستیابی در بین گونه‌ها یا جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی یا مرفولوژیک باشد.

در این پژوهش تأثیر باکتری *Wolbachia* بر قدرت بویایی، روابط شیمیایی، قدرت پارازیتسم و پراکنش یک جمعیت تک‌جنسی آلوده به باکتری زنبور *T. brassicae* که گونه‌ی غالب زنبور تریکوگراما در کشور بوده و برای کنترل برخی آفات کلیدی مانند ساقه خوار برنج و ساقه‌خوار ذرت رهاسازی می‌شود (Attaran؛ Ebrahimi *et al.*, 1998؛ Dadpour Moghanloo, 2011)، در شرایط آزمایشگاهی و کنترل شده مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌های پژوهش

#### جمع‌آوری و شناسایی اکوتیپ‌های زنبور تریکوگراما

به‌منظور دستیابی به نمونه‌های ماده‌زای آلوده به باکتری ولباخیاطی سال‌های ۸۵-۱۳۸۴ دسته تخم‌های پارازیت‌ی *Ostrinia nubilalis* (Hübner) روی گیاه توب (مستک) *Xanthium strumarium* L. (Asterales: Asteraceae) از مناطق مرکزی و شمال غرب استان مازندران جمع‌آوری شد. زنبورهای تریکوگرامای خارج شده در لوله‌هایی جداگانه روی تخم میزبان واسط و در شرایط اتاق حرارت ثابت پرورش داده شدند. سپس گونه‌ی زنبور بر اساس شکل ژنتالیای نر (Ebrahimi *et al.*, 1998) و اندازه و توالی ناحیه‌ی ITS2 (Stouthamer *et al.*, 1999) و Gonçaves *et al.*, 2006) به ترتیب در مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور و آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه واخنینگن هلند شناسایی شد. علاوه بر اسلاید میکروسکوپی، لاین‌هایی از جمعیت‌های مورد نظر نیز در بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه به صورت زنده نگهداری می‌شوند. نمونه‌هایی که نسبت جنسی آن‌ها متمایل به جنس ماده بودند با استفاده از روش PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *wsp* (*Wolbachia* specific protein) (آغازگرهای

براین اساس، برخی ویژگی‌های بیولوژیک مانند قدرت جستجوگری، میزان باروری، طول عمر و نسبت جنسی برای ارزیابی میزان سودمندی یک پارازیتوید مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌ویژه سرعت جستجو به‌عنوان یک شاخص کیفیت برای زنبورهای *Trichogramma brassicae* Bezdenko تولید انبوه شده، پذیرفته شده است (Bigler, 1989 و Cerutti & Bigler, 1995)، چرا که به‌لحاظ نظری بین میزبان‌یابی و میزان پارازیتسم در مزرعه رابطه‌ای وجود دارد (پارازیتویدهایی که سرعت حرکت زیادتری دارند می‌بایست میزبان‌های بیشتری را پارازیت کنند) (Bigler *et al.*, 1988). سرعت قدم‌زدن و جستجوی زنبورهای ماده‌زای *Trichogramma minutum* Riley مقایسه با هم گونه‌های نرزا به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است (van Hezewijk *et al.*, 2000). همچنین تأثیر *Wolbachia* بر زنبورهای *T. deion* Pinto & Oatman در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی شده است. در شرایط آزمایشگاهی، زنبورهای ماده‌ی غیرآلوده که تولیدمثل بکرزایی آن‌ها به‌صورت آرنوتوکی یا نرزایی است از قدرت پراکنش بیشتری برخوردار بودند، در حالیکه زنبورهای لاین ماده‌زا (آلوده به باکتری) در شرایط گلخانه توان بالاتری را برای کنترل بیولوژیک آفت در قیاس با زنبورهای دوجنسی (bisexual/sexual) هم‌گونه از خود نشان دادند (Silva *et al.*, 2000). بررسی دیگری که روی گونه‌ی *T. atopovirilia* Oatman & Platner انجام شد نشان داد که آلودگی به این باکتری تأثیری بر راه رفتن و دیگر صفات رفتاری زنبور ندارد (Almeida, 2004). همچنین واکنش تابعی (functional response) جمعیت‌های ایرانی دوجنسی و ماده‌زای *T. brassicae* که در این پژوهش نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند، از نوع II به‌دست آمده و قدرت جستجو یا نرخ حمله (attack rate) آن‌ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشته است (Farrokhi *et al.*, 2010). عوامل مختلفی می‌توانند ویژگی‌های زیستی زنبورهای پارازیتوید را تحت تأثیر قرار دهند که از آن جمله می‌توان به عوامل زنده و غیرزنده‌ای مانند درجه‌ی

فعال شده (activated charcoal) انباشته شده بودند تصفیه می‌شد. قطر و ارتفاع استوانه‌های استفاده شده در این آزمایش‌ها  $۳۲ \times ۶/۵$  سانتی‌متر بود که تنها در مورد آزمون بررسی پاسخ زنبور نر به فرمون جنسی ماده به دلیل کوچک بودن جثه و متحرک بودن زنبورها از لوله‌های پلاستیکی به ابعاد  $۶۰ \times ۱۲$  میلی‌متر که دو طرف آن‌ها با توری ارگانزا محصور شده بود استفاده شد. اتصال بین پمپ، استوانه‌ها و لوله‌ی Y شکل با استفاده از شیلنگ‌های سیلیکونی مخصوص انجام شد. میزان جریان هوا توسط یک دبی‌سنج (air flow meter) که در بازوی اصلی قرار داده شده بود، در حد  $۱/۵$  لیتر در دقیقه تنظیم شد. طراحی و ساخت این بویایی سنج با اندک تغییراتی بر مبنای مدل (Takabayashi & Dicke, 1992) صورت گرفت.

برای انجام دو آزمایش جداگانه جهت بررسی اثر مستقیم رایحه‌ی تخم میزبان واسط (بید غلات) و غسل روی پاسخ زنبور، ۱۵ دقیقه پیش از آزمایش قطعاتی از کاغذ حاوی ۲-۳ گرم تخم (به همراه مقداری پولک بید غلات) یا تکه پنبه‌ی آغشته به آب و غسل ۲۰٪ داخل سیلندر منبع رایحه قرار داده شد. آزمایش بویایی سنجی با آزاد کردن یک عدد زنبور ماده‌ی باکره با سن کمتر از ۲۴ ساعت در بازوی اصلی آغاز شد و تا انتخاب یکی از بازوهای بویایی سنج در محدوده زمانی تعیین شده، ردیابی حشره ادامه یافت. پاسخ زنبور تنها در صورتی مورد قبول واقع می‌گردید که حشره در مدتی کمتر از ۵ دقیقه، دست کم ۷ سانتی‌متر از بازوی فرعی را می‌پیمود (Moayeri et al., 2008). زنبورهایی که در این فاصله‌ی زمانی هیچ یک از بازوها (تیمارهای رایحه و هوای پاک) را انتخاب نمی‌کردند، به عنوان بی‌پاسخ (no response/no choice) محسوب شده و در محاسبات منظور نمی‌شدند. پس از ارزیابی پاسخ رفتاری هر ۱۰ حشره، لوله‌ی Y شکل با لوله‌ی مشابه و تمیز دیگری جابجا و محفظه‌های مربوط منبع مولد رایحه و هوای پاک بین بازوهای چپ و راست تعویض می‌شدند تا در حد ممکن از بروز هرگونه خطای ناشی از عدم تقارن احتمالی کاسته شود. آزمایش مربوط به پاسخ بویایی زنبورهای ماده‌ی B و  $BW^+$  به رایحه‌ی تخم بید غلات و غسل، هر

(Braig et al., 1998) 81F/691R، از نظر وجود PI-Wolbachia مورد بررسی قرار گرفتند. دو جمعیت دوجنسی غیرآلوده و تک‌جنسی آلوده به *Wolbachia* که از یک زنبور ماده باکره به روش تک‌ماده (isofemale method) به دست آمده بودند، روی تخم‌های بید غلات (*Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lep., Gelechiidae) در لوله‌های شیشه‌ای ( $۳۵ \times ۲۰۰$  میلی‌متر) و در شرایط  $۲۰ \pm ۱$  درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی  $۶۰ \pm ۱۵$  درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی مستقر شدند. با توجه به اثرات منفی و ناشناخته‌ی آنتی‌بیوتیک بر میکروارگانیسم‌های وابسته به حشرات، برای تعیین اثرات احتمالی باکتری بر ویژگی‌های رفتاری و قدرت پراکنش و پارازیتسم زنبور تریکوگراما از دو جمعیت دوجنسی طبیعی (B) و ماده‌زای آلوده به باکتری ( $BW^+$ ) که پیش از این تشابه ژنتیکی آن‌ها تعیین شده (Farrokhi, 2010) و محل جمع‌آوری آن‌ها نیز یکسان بود، در شرایط اتاق حرارت ثابت استفاده شد. زنبورها در زمان انجام آزمایش حداکثر تا ۱۵ نسل در شرایط مذکور پرورش داده شده بودند.

### واکنش‌های بویایی سنجی

به منظور ارزیابی پاسخ زنبورهای ماده‌ی جمعیت‌های دوجنسی و آلوده به ولباخیا، به منبع غذایی و میزبان و همچنین تعیین توانایی آن‌ها در تولید فرمون جنسی از روش بویایی سنجی با بویایی سنج لوله‌ای Y شکل (Y-tube olfactometer) در اتاق حرارت ثابت ( $۲۵ \pm ۱$  درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی  $۶۰ \pm ۱۵$  درصد و روشنایی دائم) استفاده شد. قسمت اصلی دستگاه مزبور متشکل از یک لوله‌ی شیشه‌ای پیرکس دو شاخه به قطر  $۲/۵$  سانتی‌متر، طول بازوی اصلی آن ۱۵ سانتی‌متر، بازوهای فرعی آن هر کدام ۲۰ سانتی‌متر و زاویه‌ی بین آن‌ها  $۷۵$  درجه بود. یکی از بازوهای فرعی به منبع رایحه (compounds odor/volatile) و دیگری به استوانه‌ی خالی به عنوان هوای پاک و فاقد مواد محرک (تیمار شاهد) متصل شدند. جریان هوای مداوم ایجاد شده به وسیله‌ی پمپ هوا، قبل از ورود به استوانه‌های خالی و حاوی منبع رایحه با عبور از استوانه‌هایی که از ذغال



امکان پذیر باشد. اما در شاخه‌ی میانی  $m$ ، سه بوته ( $M$ ) با فاصله‌ی ۴۵ سانتی‌متر از یکدیگر چیده شدند، که زنبورها به دلیل متصل نبودن برگ‌ها به یکدیگر تنها با پرواز کردن قادر به جابجایی از بوته‌ای به بوته‌ی دیگر بودند. محل رهاسازی، گلدان مشترک بین سه شاخه‌ی  $m$  در نظر گرفته شد (شکل ۵). در هر تیمار به غیر از بوته‌ی میانی که برای رهاسازی زنبور در نظر گرفته شده بود، در ارتفاع میانی هر یک از بوته‌ها سه عدد نوار کاغذی سبز رنگ ( $1 \times 10$ ) سانتی‌متر) هر یک شامل دو دسته‌ی ۱۵۰ عددی تخم پید غلات به صورت تصادفی قرار داده شد به نحوی که دسته‌های تخم در دو سطح رویی و زیرین برگ قرار می‌گرفتند. برای ایجاد یکنواختی و کاهش تلفات احتمالی زنبورها در خاک مرطوب پای بوته‌ها، سطح تمام گلدان‌ها با صفحات مقوایی به ابعاد  $30 \times 30$  سانتی‌متر که در مرکز آن‌ها سوراخی به قطر ۲ سانتی‌متر برای خروج ساقه گیاه تعبیه شده بود، پوشانده شد. رهاسازی دو جمعیت  $B$  و  $BW^+$  در ۵ تکرار و در هر تکرار به طور هم‌زمان در یک اتاق که با توری به دو بخش تقسیم شده بود، انجام شد. بر مبنای درصد خروج و نسبت جنسی زنبورهای ماده‌زا و دوجنسی، تا حد ممکن تعداد زنبور ماده‌ی رهاسازی شده (حدود ۵۰۰ عدد) برای هر دو تیمار مشابه یکدیگر در نظر گرفته شد. همچنین برای به حداقل رساندن خطای آزمایشی، محل رهاسازی جمعیت‌های مورد نظر پس از هر تکرار در دو بخش تفکیک شده‌ی اتاق جابجا می‌شد. تله تخم‌های کاغذی ۵ روز پس از رهاسازی زنبورها، جمع‌آوری و به تفکیک هر بوته و تیمار تا سیاه شدن تخم‌های پارازیت در لوله‌های آزمایش و در شرایط محیطی مناسب نگهداری شدند. در نهایت پس از شمارش و ثبت نتایج و تعیین یکنواختی واریانس نمونه‌ها، از آزمون  $t$  (t-test) در نرم‌افزار MSTATC برای مقایسه‌ی آماری میزان پارازیتسم هر یک از جمعیت‌ها استفاده شد ( $\alpha = 0.05$ ). ابتدا داده‌ها به روش جذری ( $\sqrt{\chi + 0.5}$ ) تبدیل و سپس تجزیه شدند.

کدام در چهار مرحله و هر مرحله با ۳۰ عدد زنبور ماده‌ی تغذیه نشده و منابع جدید مولد رایحه تکرار شد (در مجموع ۱۲۰ زنبور ماده از هر جمعیت). برای آزمایش پاسخ بویایی زنبور نر جمعیت  $B$  به ماده‌های غیرآلوده و آلوده به باکتری ( $B$  و  $BW^+$ ) در هر تکرار سه عدد زنبور ماده‌ی باکره از هر یک از دو جمعیت مورد نظر، در لوله‌ی کوچک پلاستیکی محصور شده با توری ارگانزا قرار داده شد. به دلیل نتایج قطعی که در حین انجام این سری از آزمایش‌ها به دست آمد از تعداد تکرار کمتری استفاده شد (دو مرحله و هر مرحله با ۲۰ تکرار).

برای تعیین عدم تجانس در بین تکرارهای هر یک از آزمایش‌ها از روش تکرار نکیوی برآزش (replicated goodness of fit) استفاده شد (Sokal & Rohlf, 1995) و داده‌های حاصله با مربع کای ( $\chi^2$ ) مورد آزمون قرار گرفتند. گرایش یکسان زنبورها به هر یک از دو بازوی بویایی سنج به عنوان فرض صفر در نظر گرفته شد.

### تعیین میزان پارازیتسم و جابه‌جایی زنبورها در اتاق حرارت ثابت

برای تهیه بوته‌های سالم و هم‌سن گیاه میزبان، بذره‌ای ذرت (KSC 250) به صورت جداگانه در گلدان‌هایی به قطر ۲۲ و عمق ۲۵ سانتی‌متر در شرایط گلخانه ( $28 \pm 7$  درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی  $55 \pm 10$  درصد) در خاک زراعی مناسب کشت و نگهداری شدند. پس از ۷-۶ برگی شدن بوته‌ها، گلدان‌ها به اتاق حرارت ثابت ( $5 \times 5 \times 3$  متر) با شرایط محیطی  $25 \pm 1$  درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 10$  درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. در هر تکرار ۱۸ گلدان به صورت حرف  $m$  روی سکوهایی به ابعاد  $2 \times 3$  متر قرار داده شدند (در مجموع ۳۶ گلدان به طور هم‌زمان روی دو سکو). در هر واحد آزمایشی، ۱۴ گلدان در دو طرف محل رهاسازی روی دو بازوی چپ و راست ( $L$ ,  $R$ ) به فاصله‌ی ۳۰ سانتی‌متر از هم قرار داده شدند به نحوی که با اتصال برگ‌ها انتقال زنبورها به بوته‌ی مجاور از طریق راه رفتن نیز



## نتایج

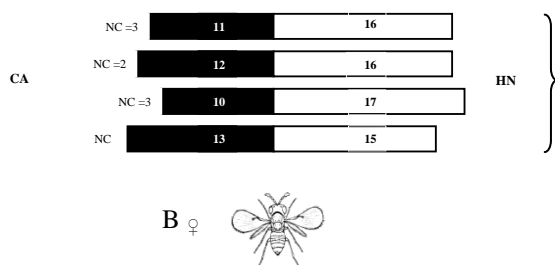
## شناسایی جمعیت‌های زنبور تریکوگراما

در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از زنبور تریکوگراما، آلودگی به *PI-Wolbachia* به ترتیب در بین ۲/۵، ۳/۶ و ۴۹/۵ درصد از افراد جمعیت‌های نور، چمستان و بابلسر برآورد شد. برای انجام آزمایش‌ها یک لاین ماده‌زای خالص شده از جمعیت بابلسر به همراه جمعیت دوجنسی که از همان ناحیه از روی گیاه مستک و دسته‌های تخم ساقه‌خوار اروپایی ذرت جمع‌آوری شده بود، به ترتیب با اسامی  $BW^+$  و  $B$  در نظر گرفته شد که هر دو جمعیت متعلق به گونه‌ی *T. brassicae* بودند. مشخصات مربوط به توالی ژن *wsp* باکتری ولباخیا و ناحیه‌ی (ITS2) جمعیت زنبور ماده‌زای  $BW^+$  به ترتیب با اسامی *wBaT.bra* و *Tbra-B11* و کدهای FJ441291 و FJ441292 در بانک ژن جهانی به ثبت رسیده‌اند (Farrokhi et al., 2010).

## بویایی سنجی

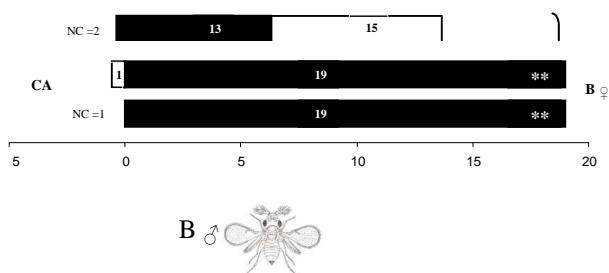
با توجه به متجانس بودن تکرارها در تمام آزمایش‌ها (به ترتیب آزمایش:  $G_h = 1/75$ ،  $P = 0/63$ ،  $G_h = 0/525$ ،  $P = 0/913$ ،  $G_h = 0/001$ ،  $P = 1$ ،  $G_h = 0/431$ ،  $P = 0/931$ ؛ داده‌های حاصله با هم تجمیع و مورد آزمون قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش‌های بویایی سنجی تعیین واکنش زنبورهای ماده به میزبان و ماده‌ی غذایی که در چهار مرحله (۳۰ تکرار) انجام شد، اگر چه در همه‌ی موارد بیش از ۵۰٪ زنبورهای هر دو جمعیت به رایحه‌ی تخم و پولک بید غلات یا آب و عسل جلب شدند (شکل‌های ۱ و ۳) اما تجزیه‌ی آماری تفاوت معنی‌داری در جهت‌گیری آن‌ها به سمت رایحه یا هوای پاک نشان نداد ( $p > 0/05$ ). با وجود این، از نتایج تجمیع شده ( $n=120$ , pooled data) چنین برمی‌آید که زنبورهای ماده‌زای آلوده به باکتری ( $BW^+$ ) از نظر شناسایی و ردیابی رایحه‌ی تخم و پولک میزبان واسط و همچنین عسل برتر از زنبور دوجنسی ( $B$ ) می‌باشند (جداول ۱ و ۲). از طرفی نیز واکنش بویایی

زنبور نر به ماده‌ها نشان می‌دهد که افراد ماده‌ی جمعیت‌های غیرآلوده و آلوده به باکتری به‌خوبی توسط افراد نر قابل تشخیص و ردیابی هستند ( $p < 0/001$ ) (شکل‌های ۲ و ۴).

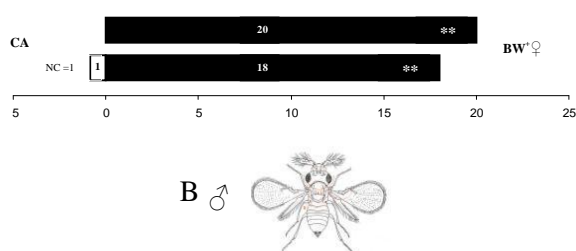


شکل ۱- پاسخ بویایی زنبور ماده‌ی جمعیت دوجنسی *Trichogramma brassicae* ( $B$ ) به تخم بید غلات (SE) و آب و عسل (HN). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) تمایل داشته‌اند و از نظر آماری اختلافی با یکدیگر ندارند ( $P > 0/05$ ,  $n=120$ ). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Olfactory response of *Trichogramma brassicae* female wasp ( $B$ : bisexual population collected from Baboulsar) to factitious host egg (SE) and honey water solution (HN). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) ( $n=120$ ,  $P>0.05$ , Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.



شکل ۲- پاسخ بویایی زنبور نر جفت‌گیری نکرده *Trichogramma brassicae* به زنبور ماده‌ی باکره از همان جمعیت دوجنسی ( $B$ ). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) متمایل شده‌اند و از نظر آماری تفاوت آنها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد ( $n=40$ ). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.



شکل ۴- پاسخ بویایی زنبور نر جفت گیری نکرده *Trichogramma brassicae* دوجنسی (B) به زنبور ماده‌ی باکره آلوده به *Wolbachia* (BW<sup>+</sup>). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) متمایل شده‌اند و از نظر آماری تفاوت آنها در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (n=۴۰). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

Fig. 4. Olfactory response of bisexual *Trichogramma brassicae* unmated male wasp (B: bisexual population) to *Wolbachia*-infected virgin female (BW<sup>+</sup>: unisexual population collected from Baboulsar). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=40, 0.001<P≤0.01, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.

جدول ۱- پاسخ بویایی زنبورهای ماده‌ی دوجنسی و ماده‌زای *Trichogramma brassicae* به تخم بید غلات در دستگاه بویایی سنج لوله‌ای Y شکل (نتایج تجمیع شده، n=۱۲۰).

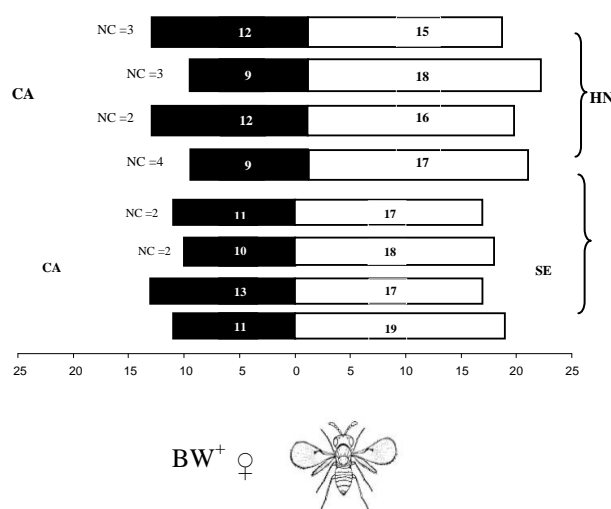
Table 1. Olfactory response of bisexual and thelytokous *Trichogramma brassicae* female wasp to factitious host egg (SE) in Y-tube olfactometer (pooled data, n=120).

<i>T. brassicae</i> population	Number of attracted and no choice wasps			$\chi^2$	P-value
	SE	CA	NC		
BW <sup>+</sup>	71 4	45		5.82 <sup>*</sup>	0.015
B	65	50	5	1.95 <sup>ns</sup>	0.162

BW<sup>+</sup>: *Wolbachia*-infected strain collected from Baboulsar, B: Bisexual strain, SE: factitious host egg (*Sitotroga cerealella*), CA: clean air, NC: no choice, \*: 0.01<P≤0.05, ns: non significant.

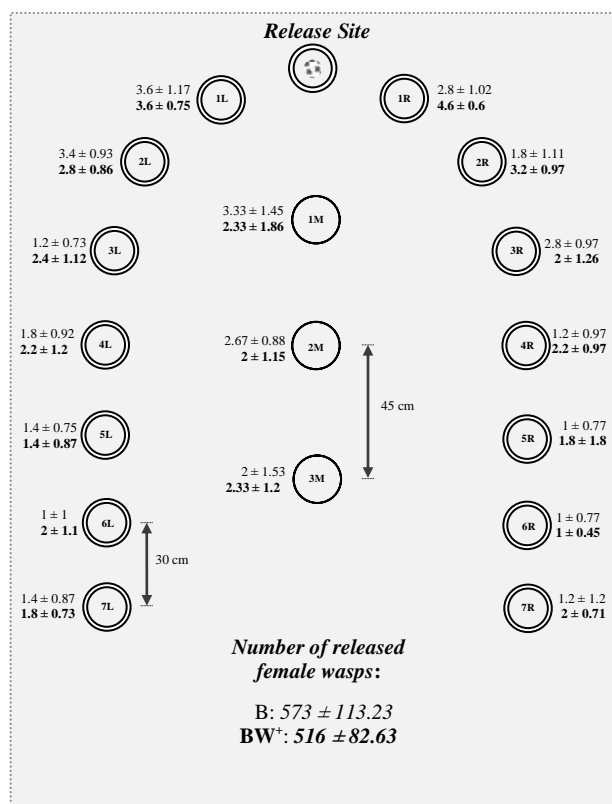
BW<sup>+</sup>: جمعیت ماده‌زای آلوده به ولباخیا، B: جمعیت دوجنسی طبیعی جمع‌آوری شده از بابلسر، SE: تخم بید غلات، CA: هوای پاک، NC: بی‌پاسخ. \*: اختلاف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. ns: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

Fig. 2. Olfactory response of *Trichogramma brassicae* unmated male wasp to virgin female of the same population (B: bisexual population collected from Baboulsar). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=40, 0.001<P≤0.01, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.



شکل ۳- پاسخ بویایی زنبور ماده‌ی جمعیت تک‌جنسی *Trichogramma brassicae* آلوده به *Wolbachia* (BW<sup>+</sup>) به تخم بید غلات (SE) و آب و عسل (HN). اعداد داخل مستطیل معرف تعداد افرادی است که در دستگاه بویایی- سنج لوله‌ای Y شکل به منبع رایحه پاسخ داده یا به سمت بازوی مرتبط با هوای پاک (CA) تمایل داشته‌اند و از نظر آماری اختلافی با یکدیگر ندارند (n=۱۲۰، P>۰.۰۵). NC تعداد افراد بی‌پاسخ را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Olfactory response of *Trichogramma brassicae* female wasp (BW<sup>+</sup>: *Wolbachia*-infected collected from Baboulsar) to factitious host egg (SE) and honey water solution (HN). Numbers in rectangular bars represent individual wasps that moved toward the volatiles and clean air (CA) (n=120, P>0.05, Chi-square test). NC indicates the number of tested individuals that did not respond in Y-tube olfactometer.



شکل ۵- موقعیت قرار گرفتن بوته‌های ذرت و میزان پارازیتسم زنبورهای *Trichogramma brassicae* در آزمایش رهاسازی در اتاق حرارت ثابت به نحوی که بوته‌های دو ردیف چپ و راست (L & R) در تماس با یکدیگر بوده اما بوته‌های میانی (M) با فاصله بیشتری نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند. تعداد دسته تخم پارازیت شده در هر بوته ( $\pm$ SE میانگین)، به ترتیب برای جمعیت‌های دوجنسی (B) و ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* (BW<sup>+</sup>) با اعداد ساده و پررنگ در کنار هر گلدان نمایش داده شده است. تفاوت بین دو جمعیت در هیچ یک از بوته‌ها معنی‌دار نمی‌باشد.

Fig 5. Position of corn plants and parasitism rates of bisexual (B) and thelytokous *Wolbachia*-infected (BW<sup>+</sup>) *Trichogramma brassicae* on 17 corn plants in paired releases. In right and left rows (L & R), each plant touched the two adjacent, but in middle row (M), the plants were separate from another. Bold numbers represent mean quantity of sentinel egg masses parasitized by *Wolbachia*-infected line (BW<sup>+</sup>) at each plant ( $\pm$ SE)(n=5, P>0.05).

جدول ۲- پاسخ بویایی زنبورهای ماده‌ی دوجنسی و ماده‌زای *Trichogramma brassicae* به آب و عسل در دستگاه

بویایی سنج لوله‌ای Y شکل (نتایج تجمیع شده، n=۱۲۰).

Table 2. Olfactory response of bisexual and thelytokous *Trichogramma brassicae* female wasp to honey water solution (HN) in Y-tube olfactometer (pooled data, n=120).

<i>T. brassicae</i> population	Number of attracted and no choice wasps			$\chi^2$	P-value
	HN	CA	NC		
BW <sup>+</sup>	66	42	12	5.33*	0.02
B	64	46	10	2.94 <sub>ns</sub>	0.086

BW<sup>+</sup>: *Wolbachia*-infected strain collected from Baboulsar, B: Bisexual strain, HN: honey water solution, CA: clean air, NC: no choice, \*:  $0.01 < P \leq 0.05$ , ns: non significant.

BW<sup>+</sup>: جمعیت ماده‌زای آلوده به ولباخیا، B: جمعیت دوجنسی طبیعی جمع آوری شده از بابلسر، HN: آب و عسل، CA: هوای پاک، NC: بی‌پاسخ. \*: اختلاف در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. ns: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

## میزان پارازیتسم و پراکنش زنبورها در شرایط اتاق حرارت ثابت

براساس نتایج به‌دست آمده در خصوص تعداد تخم و دسته‌ی تخم پارازیت شده (جدول ۳) می‌توان چنین اظهار داشت که از نظر قدرت پارازیتسم و یافتن دستجات تخم میزبان روی گیاه ذرت، با وجود برتری عددی زنبور ماده‌زای آلوده به باکتری (BW<sup>+</sup>) نسبت به جمعیت دوجنسی (B) به لحاظ آماری تفاوت آن‌ها معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین نتایجی که در شکل ۵ ارائه شده، نشان می‌دهد که در مجموع جمعیت‌های B و BW<sup>+</sup> از نظر تعداد دسته‌ی تخم پارازیت شده روی بوته‌هایی که به فواصل مختلف از محل رهاسازی (گلدان مرکزی) به‌صورت به‌هم پیوسته قرار داشتند (گلدان‌های کناری L و R) و همچنین در بوته‌های میانی (M) که برگ‌های آن‌ها به یکدیگر متصل نبودند، اختلاف معنی‌داری با هم ندارند ( $p > 0.05$ ). به عبارت دیگر قدرت پراکنش این دو جمعیت از طریق راه رفتن و یا پرواز مشابه یکدیگر می‌باشد، هر چند به‌طور متوسط تعداد زنبور ماده‌ی رها شده از جمعیت دوجنسی بیشتر از BW<sup>+</sup> بوده است (شکل ۵).

(BW<sup>+</sup>) که در آزمون بویایی سنجی به تخم آلوده به پولک میزبان و همچنین عسل واکنش نشان دادند، در مقایسه با ماده‌های غیر آلوده بیشتر بوده (جدول ۱ و ۲)، اما نمی‌توان دلیل علمی خاصی را برای آن در نظر گرفت. اما این امر نشان می‌دهد که باکتری ولباخیا در شرایطی که در جمعیت زنبور تریکوگراما تثبیت شده باشد، دست کم تأثیر منفی بر میزبان خود تحمیل نمی‌کند. به‌طور کلی عدم واکنش مناسب زنبورهای ماده این دو جمعیت به تخم میزبان، می‌تواند به پرورش مستمر چندین نسل از این زنبورها در محیط محدود و اشباع شده‌ی انسکنتاریوم از رایحه و ترکیبات شیمیایی وابسته به بید غلات (مانند فرمون جنسی، تخم و پولک) و پایین آمدن حساسیت این جمعیت‌ها نسبت به علایم شیمیایی میزبان واسط مرتبط باشد. البته در اغلب موارد رایحه‌ی مربوط به تخم و پولک پروانه‌ها به‌عنوان یک کیرومون برای زنبورهای تریکوگراما حالت متوقف‌کننده (arrestant) دارد (به نقل از: Fatouros *et al.*, 2008). در آزمایشی که Fatouros (2006) با استفاده از بویایی سنج لوله‌ای Y شکل انجام داد، زنبورهای *T. brassicae* نیز به رایحه‌ی برگ کلم حاوی تخم‌های *Pieris brassicae* (L.) جلب نشدند. در هر صورت، بالا بودن تعداد افراد بی‌پاسخ در آزمون بویایی سنجی زنبورهای ماده به تخم میزبان و آب و عسل ایجاب می‌کند تا در بررسی‌های تکمیلی ضمن ایجاد برخی تغییرات اصلاحی در قطر لوله و زاویه‌ی بین بازوها لوله‌ی Y شکل و غلظت رایحه‌ی مورد نظر، از مواد و ترکیبات دیگری مانند فرمون جنسی، پولک و یا پروانه‌ی بالغ آفت هدف استفاده شود. بدیهی است که افزایش موارد تحقیقاتی مشابه در این زمینه امکان بحث و نتیجه‌گیری بهتری را فراهم خواهد نمود.

در آزمایشی که به‌منظور تعیین قدرت پراکنش و پارازیتسم جمعیت‌های ماده‌زا و دوجنسی روی بوته‌های ذرت به انجام رسید، گرچه میانگین تعداد تخم و دستجات تخم پارازیت شده به‌وسیله‌ی یک زنبور ماده‌ی آلوده به باکتری (BW<sup>+</sup>) بیشتر از جمعیت دوجنسی B به‌دست آمد، اما تفاوت آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبود. همچنین در مقایسه‌ی میزان پارازیتسم دو جمعیت در هر یک از

به‌دلیل تفاوت نسبت جنسی زنبورهای ماده‌زا و دوجنسی، میزان پارازیتسم ۱۰۰ عدد زنبور ماده‌زا (BW<sup>+</sup>) روی گیاه ذرت بیش از زنبور دوجنسی (B) برآورد شد (جدول ۳). البته این برتری تنها از لحاظ تعداد دسته‌ی تخم پارازیت (جمعیت ماده‌زا ۶/۰۱ دسته تخم، جمعیت دوجنسی ۲/۸۸ دسته تخم) معنی‌دار می‌باشد (p=۰/۰۲۸۶) و با وجود آنکه میانگین تعداد تخم پارازیت شده به‌وسیله‌ی ۱۰۰ عدد زنبور ماده‌زا و دوجنسی به‌ترتیب ۳۶۴/۳۵ و ۱۵۴/۴۲ عدد تعیین شد، اما از نظر آماری تفاوتی محسوب نمی‌شود (p>۰/۰۵).

## بحث

به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده در مبحث رفتار و بویایی سنجی حاکی از آن است که باکتری *Wolbachia* در جمعیت‌های مختلط زنبور تریکوگراما اثر منفی روی غدد تولیدکننده‌ی فرمون جنسی و گیرنده‌های حسی محرک‌های شیمیایی زنبورهای تک‌جنسی ماده‌زا (BW<sup>+</sup>) ندارد. اگر چه زنبورهای ماده‌زای *E. mundus* و *T. cordubensis* که تمام افراد جمعیت آن‌ها به باکتری آلوده هستند، قادر به تولید فرمون جنسی نمی‌باشند (Silva & Stouthamer, 1997) و (Ardeh, 2005)، اما تولید فرمون جنسی توسط زنبورهای ماده‌زای جمعیت مختلط *T. brassicae* بابلسر (BW<sup>+</sup>) و جفت‌گیری با نرهای هم‌گونه‌ی آن‌ها در جمعیت B که افراد آلوده و غیر آلوده از نظر ژنتیکی غیرقابل تفکیک می‌باشند، به‌دلیل آن‌که آلودگی آن‌ها تثبیت نشده و قابل برگشت به حالت دوجنسی است، طبیعی به‌نظر می‌رسد (مکاتبات شخصی با پروفیسور Stouthamer). نتایج بررسی‌های انجام شده توسط Almeida (2004) نیز حاکی از عدم تأثیر باکتری *Wolbachia* بر سرعت راه رفتن و دیگر صفات رفتاری زنبور *T. atovovirilia* بوده است.

وینسون علایم شیمیایی ساطع شده از تخم و مواد پوشش‌دهنده آن، فرمون‌ها، پولک و بقایای مربوط به پروانه‌ها را برای پارازیتوئیدهای تخم به‌عنوان کیرومون (kairomone) معرفی کرده است (Vinson, 1988). در این پژوهش گرچه نسبت زنبورهای ماده‌ی آلوده به ولباخیا

نمی‌گذارد. برای اطمینان هرچه بیشتر و تأیید نتایج به‌دست آمده لازم است در تحقیقات تکمیلی ضمن مقایسه‌ی جمعیت‌های بیشتر، از جمعیت آلوده‌ی معالجه شده با آنتی‌بیوتیک نیز با وجود اثرات جانبی که می‌تواند روی زنبور داشته باشد به‌همراه تیمار آلوده (ماده‌زا) و غیر آلوده‌ی طبیعی استفاده شود (Silva *et al.*, 2000). با وجودیکه از لحاظ قدرت پراکنش و پارازیتسم این جمعیت ماده‌زای آلوده به باکتری ( $BW^+$ ) تفاوتی با زنبور دوجنسی هم‌گونه‌ی خود ندارد، اما از جنبه‌ی کاربردی در صورت رهاسازی تعداد یکسانی از این دو جمعیت در شرایط مناسب طبیعی، انتظار می‌رود جمعیت ماده‌زا از کارایی بیشتری برخوردار باشد. همچنین گرچه در آزمایش‌های قبلی زمان دستیابی جمعیت آلوده بیشتر از زنبور دوجنسی برآورد شده است (Farrokhi *et al.*, 2010)، اما این اختلاف می‌تواند برای کنترل ساقه خوارهای ذرت و برنج که به‌صورت دسته‌ای تخم‌ریزی می‌کنند از اهمیت کمتری برخوردار باشد. بدیهی است با وجود مزیت‌های اقتصادی استفاده از پارازیتوئیدهای ماده‌زا و همچنین نتایج به‌دست آمده از مجموعه پژوهش‌هایی که تاکنون انجام شده، لازم است پیش از هر گونه توصیه کاربردی برای استفاده از این لاین تک‌جنسی (Tbra-B11)، آزمایش‌های تکمیلی نیز در سطح مزرعه انجام شود.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله ضمن قدردانی از همکاری آقای احمدعلی اکبری در پرورش میزبان واسط و حفظ جمعیت‌های زنبور، از آقای دکتر حمیدرضا صراف معیری که در ارزیابی نتایج ما را از نظرات خود بهره‌مند نمودند، صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود. این پژوهش با حمایت مالی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی در بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به انجام رسیده است.

بوته‌های جانبی و میانی و نیز در گلدان‌هایی که نسبت به محل رهاسازی در فواصل دور، متوسط و نزدیک قرار گرفته‌اند، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۳). این امر نشان می‌دهد که این دو جمعیت به‌صورت انفرادی از نظر میزان پارازیتسم، قدرت یافتن دسته‌های تخم میزبان و قدرت پراکنش به هر دو شیوه‌ی راه رفتن روی برگ و پرواز کردن تفاوتی با یکدیگر ندارند. میزان قدرت جستجو (a) یا نرخ حمله‌ی برآورد شده برای آن‌ها در بررسی‌های فرخی و همکاران (۲۰۱۰) نیز با نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای هم‌خوانی دارد، به این صورت که با وجود برتری عددی قدرت جستجوی زنبور ماده‌زا ( $BW^+$ ) نسبت به زنبور دوجنسی، اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نمی‌باشد. در مجموع نیز این دو جمعیت از نظر قدرت پارازیتسم دسته‌ی تخم میزبان تفاوتی با یکدیگر ندارند (جدول ۳). اما به لحاظ تعداد دسته‌ی تخم پارازیت شده به‌ازای ۱۰۰ عدد زنبور نر و ماده، زنبورهای تک‌جنسی آلوده به *Wolbachia* برتری محسوسی نسبت به جمعیت دوجنسی (B) دارند ( $\alpha = 0.05$ )، که علت را می‌توان به تفاوت در نسبت جنسی و فقدان زنبور نر در جمعیت ماده‌زا و در نتیجه عدم نیاز به جفت‌گیری و صرف زمان مربوطه نسبت داد. در آزمایش گلخانه‌ای مشابهی که Silva *et al.* (2000) برای مقایسه‌ی جمعیت‌های دوجنسی و آلوده به باکتری در دو گونه زنبور *T. deion* و *T. cordubensis* روی گوجه‌فرنگی انجام دادند تفاوت معنی‌داری در تعداد دسته‌ی تخم‌های پارازیت شده توسط یک زنبور ماده مشاهده نکردند، ضمن آنکه نتایج آن‌ها نیز در خصوص پارازیتسم حاصل از رهاسازی ۱۰۰ عدد زنبور، حاکی از برتری جمعیت‌های آلوده به باکتری می‌باشد. اما جمعیت‌های دوجنسی به‌طور متوسط تعداد تخم‌های بیشتری را پارازیت کرده بودند.

از نتایج آزمایش‌ها در مجموع چنین به‌نظر می‌رسد که آلودگی به *Wolbachia* در جمعیت‌های مختلط باعث اختلال در تولید فرمون جنسی زنبور ماده نشده، همچنین تأثیری نیز بر قدرت جستجو و میزان پارازیتسم پارازیتوئیدهای بررسی شده در شرایط آزمایشگاهی

جدول ۳- میزان پارازیتیزم حاصل از رهاسازی دو جمعیت ماده‌زای آلوده به *Wolbachia* و دوجنسی زنبور *Trichogramma brassicae* روی بوته‌های ذرت در شرایط آزمایشگاهی.

Table 3. Parasitism by released thelytokous *Wolbachia*-infected and bisexual *Trichogramma brassicae* wasps on corn plants in laboratory conditions.

<i>T. brassicae</i> population	Line	Female proportion (Sex Ratio)	Mean number of parasitized eggs per female $\pm$ SE	Number of eggs parasitized per 100 wasps	Mean number of parasitized egg masses per female $\pm$ SE	Number of egg masses parasitized per 100 wasps
BW <sup>+</sup>	Unisexual (Thelytokous)	1	3.64 $\pm$ 2.55 <sup>ns</sup>	364.35 <sup>ns</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>ns</sup>	6.01 <sup>*</sup>
B	Bisexual (Arrhenotokous)	0.69	2.43 $\pm$ 1.68	154.42	0.04 $\pm$ 0.01	2.88

BW<sup>+</sup>: *Wolbachia*-infected strain collected from Baboulsar, B: Bisexual strain, \*: 0.01 < P ≤ 0.05, ns: non significant, n=5.

BW<sup>+</sup>: جمعیت ماده‌زای آلوده به ولباخیا، B: جمعیت دوجنسی طبیعی جمع‌آوری شده از بابلسر، \*: اختلاف تیمارها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار است. ns: اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد.

## References

- Almeida, R. 2004. *Trichogramma* and its relationship with *Wolbachia*: Identification of *Trichogramma* species, phylogeny, transfer and costs of *Wolbachia* symbionts. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 142 pp.
- Ardeh, M. J. 2005. Whitefly control potential of *Eretmocerus* parasitoids with different reproductive modes. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 104 pp.
- Attaran, M. R. & Dadpour Moghanloo, H. 2011. An analytical review of present status and future prospective in utilization of *Trichogramma* wasps for biological control of agricultural pests in Iran. Proceeding of the biological control development congress in Iran, 27-28 July, Tehran, Iran, 94-112.
- Bigler, F. 1989. Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. Journal of Applied Entomology. 108: 390-400.
- Bigler, F., Bieri, M., Fritschy, A. & Seidel, K. 1988. Variation in locomotion between laboratory strains of *Trichogramma maidis* and its impact on parasitism of eggs of *Ostrinia nubilalis* in the field. Entomologia Experimentalis et Applicata. 49: 283-290.
- Braig, H. R., Zhou, W., Dobson, S. & O'Neill, S. L. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. Journal of Bacteriology. 180: 2373-2378.
- Cerutti, F. & Bigler, F. 1995. Quality assessment of *Trichogramma brassicae* in the laboratory. Entomologia Experimentalis et Applicata. 75: 19-26.
- Ebrahimi, E., Pintureau, B. & Shojai, M. 1998. Morphological and enzymatic study of the genus *Trichogramma* in Iran. Applied Entomology and Pathology. 66: 39-43 (In Persian with English summary).
- Farrokhi, S. 2010. Evaluation of *Wolbachia* impact on biological characteristics of thelytokous *Trichogramma brassicae*. Ph.D. Thesis, University of Tehran, Iran, 153 pp. (In Persian with English summary).



- Farrokhi, S., Ashouri, A., Shirazi, J., Allahyari, H. & Huigens, M.E. 2010.** A comparative study on the functional response of *Wolbachia*-infected and uninfected forms of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. Journal of Insect Science. 10(167).
- Fathipour, Y., Kamali, K., Khalghani, J. & Abdollahi, G. 2000.** Functional response of *Trissolcus grandis* (Hym., Scelionidae) on different egg densities of *Eurygaster integriceps* (Het., Scutelleridae) and effects of different wheat genotypes on it. Applied Entomology and Phytopathology. 68: 1-17 (In Persian with English summary).
- Fatouros, N. E. 2006.** Parasitic wasps on butterfly expedition: Foraging strategies of egg and larval parasitoids exploiting infochemicals of brussels sprouts and their *Pieris* hosts. Ph.D. Thesis, Freie Universität Berlin, 181 pp.
- Fatouros, N. E., Dicke, M., Mumm, R., Meiners, T. & Hilker, M. 2008.** Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. Behavioral Ecology. 19(3): 677-689.
- Godfray, H. C. J. 1994.** Parasitoids. Princeton University Press, Chichester, West Sussex.
- Gonçalves, C. I., Huigens, M. E., Verbaarschot, P., Duarte, S., Mexia, A. & Tavares, J. 2006.** Natural occurrence of *Wolbachia*-infected and uninfected *Trichogramma* species in tomato fields in Portugal. Biological Control. 37: 375-381.
- Hassan, S. A. 1988.** Choice of the suitable *Trichogramma* species to control the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hbn. and the cotton bollworm *Heliothis armigera* Hbn. Colloques de l'INRA. 43: 197-198.
- Hassan, S. A. 1990.** A simple method to select effective *Trichogramma* strains for use in biological control. pp. 201-205 In: Wajnberg, E. & Vinson, S. B. (eds), *Trichogramma* and other egg parasitoids, Les Colloques de l'INRA 56.
- Hohmann, C. L., Luck, R. F. & Stouthamer, R. 2001.** Effect of *Wolbachia* on the survival and reproduction of *Trichogramma kaykai* Pinto & Stouthamer (Hym., Trichogrammatidae). Neotropical Entomology. 30(4).
- Huigens, M. E., Hohmann, C. L., Luck, R. F., Gort, G. & Stouthamer, R. 2004.** Reduced competitive ability due to *Wolbachia* infection in the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 110: 115-123.
- Huigens, M. E. & Stouthamer, R. 2003.** Parthenogenesis associated with *Wolbachia*. pp. 247-266. In: Bourtzis, K. & Miller, T. A. (eds), Insect symbiosis. CRC Press.
- Kalyebi, A., Overholt, W. A., Schulthess, F., Mueke, J. M., Hassan, S. A. & Sithanantham, A. 2005.** Functional response of six indigenous trichogrammatid egg parasitoids (Hym., Trichogrammatidae) in Kenya: influence of temperature and relative humidity. Biological Control. 32: 164-171.
- Li, Y. L. 1994.** Worldwide use of *Trichogramma* for biological control on different crops: a survey. pp. 37-55. In: E. Wajnberg, & S. A. Hassan (eds), Biological control with egg parasitoids, CAB International.
- Miura, K. & Tagami, Y. 2004.** Comparison of life history characters of arrhenotokous and *Wolbachia*-associated thelytokous *Trichogramma kaykai* Pinto and Stouthamer (Hym., Trichogrammatidae). Annals of the Entomological Society of America. 97(4): 765-769.
- Moayeri, H. R. S., Ashouri, A., Goldansaz, S. H., Mohaghegh, J., Poll, L. & Enkegaard, A. 2008.** Olfactory response of the predatory mirid bug, *Macrolophus caliginosus* (Het., Miridae) to clean and infested green bean with two-spotted spider mite and identification of their volatile compounds by using GC-MS technique. Journal of Entomological Society of Iran. 27(2), 79-92.



- Moezipour, M., Kafil, M. & Allahyari, H. 2008.** Functional response of *Trichogramma brassicae* at different temperatures and relative humidities. *Bulletin of Insectology*. 62(2): 245-250.
- Peng, Y. & Wang, Y. 2009.** Infection of *Wolbachia* may improve the olfactory response of *Drosophila*. *Chinese Science Bulletin*. 54(8): 1369-1375.
- Pompanon, F., Schepper, B., Mourer, Y., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 1997.** Evidence for a substrate-borne sex pheromone in the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae*. *Journal of Chemical Ecology*. 23: 1349-1360.
- Quicke, D. L. J. 1997.** Parasitic wasps. Chapman & Hall.
- Reay-Jones, F. P. F., Rochat, J., Goebel, R. & Tabone, E. 2006.** Functional response of *Trichogramma chilonis* to *Galleria mellonella* and *Chilo sacchariphagus* eggs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 118: 229-236.
- Silva, I. M. M. S. 1999.** Identification and evaluation of *Trichogramma* parasitoids for biological pest control. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 151 pp.
- Silva, I. M. M. S., van Meer, M. M. M., Roskan, M. M., Hoogenboom, A., Gort, G. & Stouthamer, R. 2000.** Biological potential of *Wolbachia*-infected versus uninfected wasps: laboratory and greenhouse evaluation of *Trichogramma cordubensis* and *T. deion* strain. *Biocontrol Science and Technology*. 10: 223-228.
- Silva, I. M. M. S. & Stouthamer, R. 1997.** To mate or not to mate... Can sex pheromones be used as taxonomic tool in *Trichogramma* spp.? *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)*. 8: 41-46.
- Smith, S. M. 1996.** Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and their potential use. *Annual Review of Entomology*. 41: 375-406.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995.** Biometry, 3<sup>rd</sup> ed. Freeman, New York, USA.
- Stouthamer, R. 1993.** The use of sexual versus asexual wasps in biological control. *Entomophaga*. 38: 3-6.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., Luck, R. F. & Werren, J. H. 1993.** Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*. 361: 66-68.
- Stouthamer, R., Hu, J., van Kan, F. J. P. M., Platner, G. R. & Pinto, J. D. 1999.** The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. *BioControl*. 43: 421-440.
- Stouthamer, R. & Luck, R. F. 1993.** Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 67: 183-192.
- Tagami, Y., Miura, K. & Stouthamer, R. 2001.** How does infection with parthenogenesis-inducing *Wolbachia* reduce the fitness of *Trichogramma*? *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 267-271.
- Takabayashi, J. & Dicke, M. 1992.** Response of predatory mites with different rearing histories to volatiles of uninfested plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 64: 187-193.
- Tripathi, R. N. & Singh, R. 1990.** Mating behavior of *Lysiphlebia mirzai* Shuja-Uddin (Hymenoptera: Aphididae), a parasitoid of *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hem., Aphididae). *Entomon*. 15: 21-26.
- van Hezewijk, B. H., Bouchier, R. S. & Smith, S. M. 2000.** Searching speed of *Trichogramma minutum* and its potential as a measure of parasitoid quality. *Biological Control*. 17: 139-146.

- van Lenteren, J. C. 2000.** Success in biological control of arthropods by augmentation of natural enemies. pp. 77-103. In: Gurr, G. & Wratten, S. (eds), Biological control: Measure of success. Kluwer, Academic Publisher.
- Vinson, S. B. 1988.** Comparison of host characteristics that elicit host recognition behavior of parasitoid hymenoptera. pp. 285-291. In: Gupta, V. K. (ed), Advances in parasitic hymenoptera research. Brill, Leiden.
- Wang, B. & Ferro, D. N. 1998.** Functional response of *Trichogramma ostrinae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to *Ostrinae nubilalis* (Lep., Pyralidae) under laboratory and field conditions. Environmental Entomology. 27: 752-758.

## ***Wolbachia* effect on olfactory responses and parasitism rate of *Trichogramma brassicae* in laboratory conditions**

Shahram Farrokhi, Jalal Shirazi and Mohammad Reza Attaran

Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection

**Corresponding author:** Shahram Farrokhi, shahram.farrokhi@gmail.com

Received: July.26, 2012

1 (1) 65-79

Accepted: Jan.1, 2013

### **Abstract**

*Trichogramma* wasps (Hym., Trichogrammatidae) are frequently used as egg parasitoid and biological control agent of lepidopteran pests. These haplodiploid wasps display two reproductive modes, including thelytoky and arrhenotoky. The thelytoky (unisexuality) are often associated with the presence of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria ( $\alpha$ -proteobacteria). The use of thelytokous parasitoids has long been considered as a way to enhance the biocontrol efficacy. In this study a series of experiments were conducted to compare the behavioral aspects, dispersal potential and parasitism of thelytokous (BW<sup>+</sup>) and bisexual (B) *Trichogramma brassicae* strains (Baboulsar ecotype) at 25°C in laboratory conditions. By using Y-tube olfactometer, it was observed that the *Wolbachia* infection in the Baboulsar strain (mixed population) neither affected the wasp's response to volatile odors of honey water solution and factitious host eggs nor did it interfere with female wasp's sex pheromone emission. Greenhouse release tests on corn plants, resulted in non significant differences between the strains taking the number of parasitized eggs per one female wasp into consideration. However, based on releasing 100 wasps (male and female in the case of bisexual), the number of egg masses parasitized by thelytokous *T. brassicae* (6.01) was significantly higher than B strain (2.88). Therefore, this thelytokous line of *Trichogramma* might be superior to bisexual conspecifics under more natural conditions and hence have a higher potential in pest control.

**Keywords:** *Trichogramma brassicae*, unisexual, *Wolbachia*, Y-tube olfactometer, thelytoky, dispersal, Corn

## بررسی برخی ویژگی های زیستی سن شکارگر *Arma custos* در پرورش آزمایشگاهی

جعفر محقق نیشابوری

بخش تحقیقات سن، موسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران، mohaghegh@iripp.ir

تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۵

۹۰-۸۱ (۱) ۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۵

### چکیده

سن *Arma custos* از شکارگرهای عمومی عرصه های طبیعی است که به ویژه از لارو پروانه ها و قاب بالان تغذیه می کند. برای مطالعه ی زیست شناسی و پارامترهای تولید مثلی آن، کلنی آزمایشگاهی این شکارگر روی پروانه ی موم خوار *Galleria mellonella* در دمای  $25 \pm 1$  درجه ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰-۷۰٪ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی ایجاد شد. نتایج حاصله نشان داد که میانگین دوران نشو و نما ی تخم و پنج سن پورگی شکارگر به ترتیب  $7/30 \pm 0/02$ ،  $4/25 \pm 0/03$ ،  $4/96 \pm 0/03$ ،  $4/69 \pm 0/02$  و  $5/46 \pm 0/02$  روز بود. درصد بقای کلی در مراحل فوق به ترتیب ۸۹٪، ۸۴٪، ۷۵٪، ۶۷٪، ۶۳٪ و ۵۵٪ به دست آمد. دوران نشو و نما ی حشرات ماده ( $34/96 \pm 0/11$  روز) به طور معنی داری از سن های نر ( $34/59 \pm 0/08$  روز) طولانی تر بود. در بررسی دموگرافی این شکارگر پارامترهای نرخ ذاتی و نهایی افزایش جمعیت (روز<sup>-۱</sup>)، نرخ ناخالص و خالص تولید مثل (تخم) و طول دوره ی یک نسل (روز) به ترتیب  $0/0579$ ،  $1/0597$ ،  $1/06/2$ ،  $35/44$  و  $61/579$  برآورد شد. سن بهینه ی حذف کلنی روز چهل و ششم عمر حشرات کامل تعیین شد. استفاده از این یافته ها به منظور ادامه ی مطالعه پیرامون این سن شکارگر مورد بحث قرار گرفته است.

**واژه های کلیدی:** پرورش آزمایشگاهی، نرخ برداشت از کلنی، سن های شکارگر، *Heteroptera*, *Asopinae*, *Arma custos*

### مقدمه

می شود ولی عرصه های طبیعی واقع در حاشیه ی جنگل ها مورد حمله ی این آفت قرار می گیرد. به علاوه، جنگل های شمال از مخازن عوامل کنترل طبیعی آفات گوناگون محسوب می شوند. به دلیل حساسیت ویژه ی کنترل آفت برگ خوار سفید درختان در عرصه های طبیعی، راهبرد کنترل بیولوژیک اهمیت مضاعفی برای مهار آفت دارد و در نخستین گام استفاده از دشمنان طبیعی آن در منطقه می بایست مد نظر قرار گیرد.

در کانزاس آمریکا بررسی چهارصد لانه ی لاروی برگ خوار سفید درختان نشان داد که جمعیت های سن شکارگر و عنکبوت ها به نسبت دارای بیشترین فراوانی بودند (Warren et al., 1967). در کانادا مطالعات سیزده ساله نشان داد که بیشترین جمعیت شکارگران موجود در لانه ی

سن های شکارگر زیرخانواده ی *Asopinae* (Hemiptera: Pentatomidae) در کنترل طبیعی آفات محصولات کشاورزی و حشرات زیان آور زیست بوم های طبیعی نقش موثری دارند (De Clercq, 2000). با توجه به وجود تعدادی از افراد این خانواده در شمال کشور، آشنایی با نحوه ی پرورش مهمترین این گونه ها، امکان استفاده از آن ها را در مبارزه بیولوژیک بهتر فراهم خواهد کرد.

از سال ۱۳۸۱ که وجود آفت برگ خوار سفید درختان یا پروانه ی سفید آمریکایی (*Hyphantria cunea* (Drury) منطقه ی لشت نشاء استان گیلان گزارش شد (Abai & Ebrahimifar, 2002)، تا چند سال متوالی دامنه ی آن هر سال رو به گسترش نهاد. اگرچه اکنون مدتی است که از شدت حمله و جمعیت آن کاسته شده و به طور پراکنده ظاهر

آن‌هاست در کاهش جمعیت پروانه‌ی سفید آمریکایی نقش برجسته‌ای دارند.

در برنامه‌های موفق کنترل بیولوژیک، ابتدا باید بتوان عامل زنده‌ی کنترل را در آزمایشگاه پرورش داد تا ضمن امکان تکثیر، بررسی ویژگی‌های گوناگون زیستی آن فراهم گردد. پرورش آزمایشگاهی برخی از سن‌های شکارگر زیرخانواده‌ی Asopinae به‌ویژه سن‌های جنس *Podisus* به‌خوبی مطالعه شده است و اقتباس از روش‌های پرورش آن‌ها (De Clercq, 2000) و نیز روش پرورش سن دیگری از این‌گروه که سال‌های متمادی تجربه‌ی آن در کشور وجود دارد یعنی سن شکارگر *Andrallus spinidens* (F.) (Mohaghegh & Amir-Maafi, 2007) می‌تواند در ارایه‌ی یک روش موفقیت‌آمیز برای پرورش آزمایشگاهی سن شکارگر *A. custos* مؤثر باشد.

هدف این بررسی امکان پرورش و ایجاد کلنی آزمایشگاهی، شناخت ویژگی‌های زیستی و دموگرافی سن شکارگر *A. custos* در شرایط کلنی پرورشی است که به نوبه‌ی خود می‌تواند بعد از تکمیل سایر اطلاعات لازم در اتخاذ راهبرد مناسب کنترل بیولوژیک برگ‌خوار سفید درختان و سایر آفات مشابه مورد استفاده قرار گیرد.

### مواد و روش‌های پژوهش

سن‌های شکارگر *A. custos* جمع‌آوری شده از لشت نشاء لاهیجان در تابستان مبنای کلنی آزمایشگاهی واقع شد. مراحل مختلف شکارگر در ظروف مختلف پلاستیکی شفاف که دهانه‌ی آن‌ها سوراخ و با توری پوشانده شده بود پرورش یافتند. بیشتر ظرف‌های مورد استفاده ۱/۵ لیتری (۶ × ۱۳/۵ × ۱۹ سانتی‌متر، به‌ترتیب: ارتفاع، عرض و طول) بودند که عموماً در پرورش شکارگر دیگری از این گروه به‌نام *A. spinidens* استفاده می‌شد (Mohaghegh & Amir-Maafi, 2007). در مرحله‌ی حشره‌ی کامل درون هریک از این ظرف‌ها پانزده جفت سن نر و ماده (به‌نسبت مساوی) قرار داده شد. کف ظرف‌ها با دستمال کاغذی حوله‌ای پوشانده شد و یک برگ دستمال به‌صورت

لاروهای پروانه سفید درختان از دو گروه سن‌های شکارگر خانواده‌ی Pentatomidae و عنکبوت‌ها بودند (Morris, 1972). سن شکارگر *Arma custos* (F.) یک شکار عمومی است که به‌ویژه از لارو پروانه‌ها و قاب‌بالان تغذیه می‌کند. این سن در ایتالیا به‌عنوان شکارگر زنبور برگ‌خوار توسکا، *Croesus septentrionalis* L. معرفی شده است (Caccamo, 1968). در نهالستان‌های صنوبر فرانسه یکی از عوامل عمده‌ی مرگ و میر در جمعیت سوسک‌های برگ‌خوار جنس *Chrysomela* شناخته شده است (Augustin & Léveux, 1993). در چین گزارش شده که سن *A. custos* شکارگر چهل گونه از آفات محصولات کشاورزی و جنگلی است (Zheng et al., 1992). در جنوب لهستان به‌عنوان شکارگر مهم چهار گونه از بال‌پولک‌داران آفت درختان باغی و جنگلی بوده که از مراحل تخم و لارو آن‌ها تغذیه می‌کرد (Lipa, 1969). از طرفی کاربرد این شکارگر در کنترل لارو سوسک برگ‌خوار نارون، *Ambrostoma quadriimpressum* (Motschulsky) و لاروهای برگ‌خوار پروانه‌های *Cnidocampa flavescens* (Walker) و *Clostera anachoreta* Schifferrmüller به‌صورت رهاسازی حشرات کامل به‌طور میانگین به‌ترتیب سبب کاهش جمعیت این آفات به‌میزان ۴۰، ۷۰ و ۶۵ درصد شده است (Zheng et al., 1992).

سن شکارگر *A. custos*، یکی از دشمنان طبیعی پروانه‌ی سفید درختان در ایران، است که در حال تغذیه از لاروهای برگ‌خوار آمریکایی روی درختان توت از گیلان جمع‌آوری شده است؛ همچنین دو گونه از سن‌های شکارگر خانواده‌ی Pentatomidae به نام‌های *Pinthaeus sanguinipes* (F.) و *Troilus luridus* (F.) در منطقه‌ی مذکور گزارش شده است (Mohaghegh, 2008). این دو شکارگر در مجارستان نیز در تارهای درهم تنیده‌ی لاروهای *H. cunea* مشاهده شده‌اند (Nagy, 1957). از این‌رو به‌نظر می‌رسد که دسته‌ای از شکارگران زیر خانواده‌ی Asopinae که سن شکارگر *A. custos* هم یکی از

به‌عمل آمده و میزان مرگ و میر، پوست‌اندازی و جنسیت حشرات بالغ نوظهور یادداشت می‌شد. همچنین آب و شکار کافی تأمین و دستمال کاغذی‌ها نیز تجدید گردید. ظرف‌های پرورش هر هفته با ظرف‌های تمیز جایگزین شدند. به این ترتیب دوران نشو و نمای جنین و پنج سن پورگی مشخص شد. مقایسه‌ی بین دوران نابالغ حشرات نر و ماده به کمک آزمون *t*-student و نرم‌افزار SPSS انجام شد.

به‌منظور تعیین نرخ برداشت از کلنی شکارگر، تعداد ۱۲۰ جفت حشره‌ی کامل تازه ظاهر شده‌ی نر و ماده (به‌نسبت مساوی) از افراد کلنی یادشده‌ی بالا انتخاب و در هشت عدد ظرف پرورشی ۱/۵ لیتری قرار گرفت، به‌طوری که در هر ظرف تعداد پانزده جفت حشره‌ی کامل وجود داشت. تجدید تغذیه‌ی سن‌ها، انجام نظافت ظرف‌های پرورش و آماربرداری از مرگ و میر و میزان تخم‌ریزی حشرات کامل به‌طور روزانه انجام می‌شد. جمع‌آوری داده‌ها تا هفته‌ی ششم پس از اولین تخم‌ریزی (پنجاه روزگی حشرات کامل) ادامه یافت. نرخ برداشت (*h*, harvest rate) و میزان تولید روزانه (*P*, daily per-female yield) حشرات ماده‌ی کامل از کلنی پرورشی بر مبنای شاخص‌های دموگرافیک و با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Meiracker, 1999; Carey & Vargas, 1985; Carey, 1993).

$$h = 1 - (R_o)^{-1}$$

که در آن *h* نرخ برداشت و *R<sub>o</sub>* نرخ خالص تولید مثل است.

$$P = 2hL_0 / (1-h) \sum_{x=\varepsilon}^{x=\delta} L_x$$

که در آن *P* میزان تولید به‌ازای هر ماده در روز، *h* نرخ برداشت و *L<sub>0</sub>* درصدی از جمعیت که تا زمان برداشت زنده است، *L<sub>x</sub>* درصدی از جمعیت که تا سن *x* زنده است، *ε* زمان پیدایش حشرات کامل، *δ* زمان حذف کلنی و عدد 2 ضریبی است برای این حشره که نسبت جنسی تقریباً برابر دارد. این آزمایش در اتاق پرورش با شرایط یادشده در بالا انجام شد. برآورد پارامترهای دموگرافیک با استفاده از روش سنتی (traditional) صورت گرفت (Birch, 1948; Carey, 1993). طول دوره‌ی مراحل نابالغ و میزان مرگ

مچاله‌شده نیز درون هر ظرف قرار گرفت. به‌این ترتیب ضمن امکان جذب مواد زاید حشره‌ی شکارگر و اجساد باقیمانده از شکار به دستمال کاغذی، مخفی‌گاهی نیز برای کاهش خطر هم‌خواری (cannibalism) بین شکارگران و بستری برای تخم‌گذاری حشرات کامل ماده ایجاد شد، همان‌گونه که در مورد سن‌های جنس *Podisus* نیز عمل شده‌است (De Clercq, 2000). چنان‌که عادت غذایی این شکارگران است از سن دوم پورگی به‌بعد، به اندازه‌ی کافی لاروهای سنین آخر میزبان واسط یا لاروهای پروانه‌ی موم‌خوار، *Galleria mellonella* L. به ظرف‌های پرورش افزوده شد (De Clercq, 2000; Mohaghegh & Amir-De Clercq, 2007). منبع تأمین رطوبت لوله‌های آزمایش پر از آب با مقداری پنبه‌ی مرطوب فشرده در دهانه‌ی آن‌ها بود. افزون بر آن درون ظرف‌ها، تشک‌های پلاستیکی کوچکی به قطر ۳ سانتی‌متر حاوی پنبه‌ی مرطوب قرار داده شد. نظافت، جایگزینی آب و شکار، جمع‌آوری دسته‌های تخم و رسیدگی به کلنی پنج روز در هفته (ایام کاری) انجام شد. در بازدیدهای مکرری که هنگام رسیدگی به کلنی به‌عمل می‌آمد، برخی رفتارهای ویژه‌ی این حشره مانند هم‌خواری و یا زمان جفت‌گیری نیز ثبت شد. شرایط اتاق پرورش عبارت بود از: دمای ۲۵±۱ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۷۰٪ و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی.

برای بررسی نشو و نمای مراحل نابالغ این شکارگر دسته‌های تخم با سن کمتر از ۲۴ ساعت در ظرف‌های ۰/۵ لیتری (۴/۵ × ۸ × ۱۴ سانتی‌متر، به‌ترتیب: ارتفاع، عرض و طول) قرار گرفت و تا پیدایش حشرات کامل جدید، هر دسته مستقلاً درون یک ظرف بود. کف ظرف‌ها با دستمال کاغذی پوشانده شد. مقداری نوار کاغذی به‌صورت آکاردئونی برای افزایش سطح تماس و ایجاد پناهگاه در ظرف‌ها گذاشته شد. از لاروهای سنین آخر پروانه‌ی موم‌خوار به‌عنوان غذا و از تشک‌های کوچک (به قطر ۲ سانتی‌متر) و لوله‌های آزمایش پر از آب نیز به‌عنوان منبع تأمین رطوبت استفاده شد. از ظروف پرورش هر روز بازدید

تعداد پوره‌ها و حشرات بالغ به‌دست آمده از تخم‌ها و درصد بقای کلی و مرحله‌ای این سن در جدول ۱ نشان داده شده‌است.

به‌طور کلی دوران نابالغ حشرات ماده با  $0.11 \pm 34/96$  روز نسبت به حشرات نر با میانگین  $0.08 \pm 34/60$  روز تفاوت معنی‌دار داشت ( $t$ -test:  $t$ -value = 2.749,  $df$  = 745,  $P$  = 0.006). نسبت جنسی  $0.48$  به  $0.52$  (♀ به ♂) به نفع نرها به‌دست آمد. شاید بتوان این موضوع را یک راهبرد برای آمادگی نسبی نرها در ادامه نسل شکارگر دانست. در صورتی که در مورد سن شکارگر *A. spinidens* تفاوتی در دوران نشو و نما بین افراد نر و ماده وجود نداشت (Mohaghegh & Amir-Maafi, 2007). سن‌های شکارگر *P. maculiventris* و *P. nigrispinus* جنسیت تأثیر معنی‌داری در دوران نشو و نما نداشت و نسبت جنسی (♀ به ♂) بین  $0.48$  تا  $0.52$  متغیر بود (Mohaghegh et al., 1988a, b).

جدول ۱- میانگین  $\pm$ SE دوران نشو و نما (روز) و بقای مراحل مختلف نابالغ سن شکارگر *Arma custos*

Table 1- Mean ( $\pm$ SE) developmental times (days) and survival percentages of different immature stages of *Arma custos*.

Stage	Number of individuals (n)	Duration	Stage survival	Total survival
Egg	1251	$7.30 \pm 0.02$	89%	89%
1 <sup>st</sup> nymph	1178	$4.25 \pm 0.03$	95%	84%
2 <sup>nd</sup> nymph	1051	$4.96 \pm 0.03$	89%	75%
3 <sup>rd</sup> nymph	915	$4.69 \pm 0.02$	89%	67%
4 <sup>th</sup> nymph	859	$5.46 \pm 0.02$	94%	63%
5 <sup>th</sup> nymph	747	$8.15 \pm 0.02$	87%	55%

باید توجه داشت که سن شکارگر *A. custos* به تغییرات دمایی و دوره‌ی نوری و همچنین ترکیب این دو عامل حساس است (Volkovich & Saulich, 1994) که سهل انگاری در این مورد منجر به ایجاد وقفه‌ی طولانی در کلنی پرورشی شده و کار تکثیر را با مشکل جدی مواجه می‌سازد. این شرایط بحرانی طبق تحقیق

ومیر آن‌ها و نیز نسبت جنسی براساس آزمایش قبلی در محاسبه‌ی لحاظ گردید.

## نتایج و بحث

### تشکیل کلنی آزمایشگاهی و نشو و نما

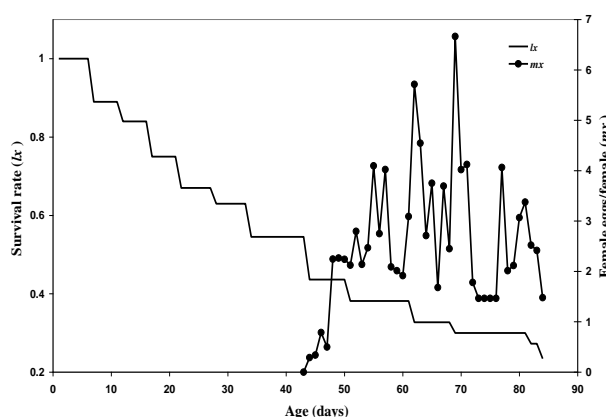
روش پرورش به کار رفته در این بررسی برای ایجاد کلنی مناسب بوده و این حشره‌ی شکارگر به‌خوبی در آزمایشگاه مستقر شده و زاد و ولد طبیعی خود را ادامه داد. هم‌چنان که در روسیه پرورش متوالی این شکارگر در آزمایشگاه و تحت شرایط نوری روزبند گزارش شده‌است (Saulich, 1995). این روش همچنین برای سن‌های شکارگر دیگر از همین زیرخانواده مانند *Podisus maculiventris* (Say) (De Clercq, 2000, Mohaghegh) *nigrispinus* (Dallas) (Mohaghegh & Amir-Maafi, 1996) و *A. spinidens* (Maafi, 2007) نیز مناسب بوده است. تعداد تخم در ۵۸ دسته تخم مورد بررسی بین ۷ تا ۵۳ عدد با میانگین  $1/20 \pm 24/35$  متفاوت بود. Putshkova (1961) نیز تعداد تخم در دسته را بین ۸ تا ۵۰ عدد گزارش کرده‌است. تعداد ردیف تخم در این دسته‌ها بین ۲ تا ۶ با میانگین  $3/89 \pm 0/13$  ردیف به‌دست آمد. به‌طور کلی از ۱۴۱۲ عدد تخم تعداد ۱۲۵۲ عدد آن تفریخ شد، بنابراین نرخ تفریخ تخم ۸۹٪ بود. از ۱۴۱۲ عدد تخم گذاشته‌شده در پایان، ۷۴۷ عدد حشره‌ی کامل (۳۶۱ ♀ و ۳۸۶ ♂) حاصل شد؛ تعداد ۲۱ عدد پوره (۱/۵٪) نیز به‌دلیل خطاهای آزمایشی (مثلاً له‌شدن بین درب و دیواره‌ی بدنه ظرف پرورش، قرار گرفتن لوله‌ی آب روی بدن پوره و یا فرار از ظرف پرورش) از بین رفتند. بنابراین نرخ تبدیل تخم‌ها به حشرات بالغ ۵۵٪ بود که نرخ قابل قبولی است. در یک پژوهش در چین درصد تفریخ تخم این شکارگر ۷۶٪، به‌دست آمد (Zheng & Su, 1985). میزان تفریخ تخم در سن شکارگر دیگری از این جنس به‌نام *Arma chinensis* Fallou، ۹۰٪ برآورد شده است در این گونه نیز پوره‌های سن اول منحصراً از آب تغذیه می‌کنند (Gao et al., 2011).



دوم را تداعی می‌کند که مرگ و میر افراد با نرخ به‌نسبت ثابتی اتفاق می‌افتد به‌طوری که این روند به‌صورت خط مستقیم کاهنده‌ای به‌نظر می‌رسد. به عبارت دیگر نرخ مرگ و میر وابستگی به سن حشره ندارد (Carey, 1993; Jervis *et al.*, 2007).

در این بررسی برآورد پارامترهای دموگرافیک براساس مقطع فعال زندگی حشرات کامل سن شکارگر *A. custos* صورت گرفته‌است. هم‌چنان‌که محاسبه‌ی پارامترهای دموگرافی شپشه‌ی برنج (*Sitophilus oryzae* (L.)) از زندگی حشره‌ی کامل رایج شده‌است (Birch, 1948) و یا در سه گونه مگس میوه از خانواده‌ی Tephritidae سی‌روز نخستین دوران تخم‌ریزی ملاک تجزیه و تحلیل دموگرافیک آن‌ها واقع شده‌است (Carey *et al.*, 1988b). هم‌چنین محاسبه‌ی پارامترهای دموگرافیک برای مگس میوه‌ی میترانه‌ای (*Ceratitis capitata* (Wiedemann)) و زنبور پارازیتوئید آن (*Biosteres tryoni* (Cameron)) مبنای تولیدمثل آن‌ها به ترتیب تا روزهای ۱۴ و ۱۳ عمر حشرات کامل انجام شده‌است (Carey *et al.*, 1988a). هم‌چنان‌که (Birch, 1948) بیان نموده‌است، میزان مشارکت افرادی که در نخستین بخش زندگی حشره زاده می‌شوند در برآورد پارامتر مهم نرخ ذاتی افزایش جمعیت ( $r$ ) بسیار بالا است، به‌طوری که در شپشه‌ی برنج *S. oryzae تخم‌های گذاشته شده در سه هفته‌ی اول عمر حشره که ۳۷٪ کل تخم‌های گذاشته‌شده در طول عمر آن بوده‌است در برآورد این پارامتر به میزان ۹۳/۸۴٪ دخالت داشته‌است (Birch, 1948). در بررسی حاضر نیز میزان تخم گذاشته‌شده تا یک ماهگی حشرات کامل ماده و یا سه هفته‌ی اول دوران تخم‌ریزی ۵۳٪ کل تخم‌های مورد بررسی بود اما این مقدار تخم در برآورد نرخ ذاتی افزایش جمعیت ۹۱/۳۵٪ دخالت داشت. در این تحقیق تخمین پارامترهای دموگرافی با استفاده از روش سنتی که فقط افراد ماده را در نظر می‌گیرد انجام گرفته‌است. اما از آن‌جا که افراد نر این حشره نیز در پدیده‌ی شکارگری اهمیت دارند، تهیه‌ی جدول زندگی دوجنسی برای مطالعات آتی توصیه می‌شود.*

(Volkovich & Saulich, 1994) در محدوده‌ی دمایی زیر ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و دوره‌ی نوری زیر ۱۴ ساعت رخ می‌دهد. دوران جنینی این شکارگر در دمای ۲۲ تا ۳۵ درجه‌ی سلسیوس بین ۱۱ تا ۶ روز گزارش شده‌است (Couturier, 1938). (Zheng & Su, 1985) در دمای ۲۵-۲۶ درجه‌ی سلسیوس دوران جنینی *A. custos* را هفت روز به‌دست آوردند. Lipa (1969) بدون ذکر شرایط دمایی دوران جنینی را تا ۱۰ روز و طول دوران نابالغ را بین ۳۵ تا ۳۷ روز می‌داند. به‌طور کلی یافته‌های این تحقیق در زمینه‌ی نشو و نما کم و بیش در توافقی با منابع یادشده‌است. در سن شکارگر *A. chinensis* طول دوران نابالغ بین ۴۰ تا ۵۰ روز طول می‌کشد (Gao *et al.*, 2011).



شکل ۱- منحنی‌های نرخ بقا ( $l_x$ ) و میزان باروری ویژه‌ی

سنی ( $m_x$ ) سن شکارگر *Arma custos*

Fig. 1- Age specific survival ( $l_x$ ) and fecundity ( $m_x$ ) curves in *Arma custos* during its life span.

## نرخ برداشت از کلنی

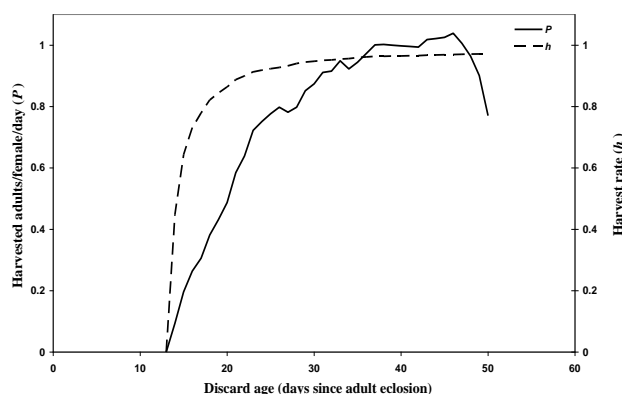
پارامترهای نرخ ذاتی افزایش جمعیت ۰/۰۵۷۹ (روز<sup>-۱</sup>)، نرخ نهایی افزایش جمعیت ۱/۰۵۹۷ (روز<sup>-۱</sup>)، نرخ ناخالص تولید مثل ۱۰۶/۲ (تخم)، نرخ خالص تولید مثل ۳۵/۴۴ (تخم)، طول دوره‌ی یک نسل ۶۱/۵۷ (روز) و زمان دو برابرشدن جمعیت ۱۱/۹۶ روز برآورد شد. شکل ۱ منحنی‌های بقا و باروری ویژه‌ی سنی شکارگر را نشان می‌دهد. روند منحنی بقا نوع

زمان برداشت بین ۳۲ تا ۴۹ روز برآورد شده است (Meiracker, 1999). این زمان اصطلاحاً زمان بهینه‌ی حذف کلنی (optimal discard age) نیز نامیده می‌شود (Carey, 1993). به عبارت دیگر، نگهداری کلنی سن شکارگر *A. custos* از روز چهل و ششم عمر حشرات ماده‌ی کامل به بعد توجیه اقتصادی ندارد.

### برخی مشاهدات رفتاری

هم‌خواری که به صورت "شکارگری درون گونه‌ای" (intraspecific predation) هم تعریف شده است، از معضلات پرورش بسیاری از حشرات به ویژه حشرات شکارگر است (De Clercq, 2000; Lattin, 2000; Wheeler, 2000). در سن‌های زیرخانواده‌ی Asopinae اغلب طراحی ظرف‌ها و قفس‌های پرورش و نیز فضا سازی درون ظرف‌ها بر مبنای جلوگیری از این پدیده‌ی کاهنده‌ی جمعیت است (De Clercq and Degheele, 1993). گذاشتن دستمال کاغذی مچاله شده که فضای بیشتری را برای حرکت شکارگر ایجاد می‌کند هم‌زمان نقش مخفی گاه برای آنان را بازی می‌کند. با این وجود همیشه انتظار وقوع درصد کمی از هم‌خواری وجود دارد. طی این بررسی دو مورد از هم‌خواری پوره‌های سن پنجم و یک مورد هم در پوره‌های سن چهارم و یک مورد هم بین حشرات کامل دیده شد. این پدیده به ویژه هنگامی که حشره در حال جلد انداختن است و توان دفاع فیزیکی ندارد، معمولاً بیشتر رخ می‌دهد. برخی از محققین، یکی از علت‌های اصلی کمی تراکم جمعیت سن‌های زیرخانواده‌ی Asopinae را در طبیعت مربوط به شدت پدیده‌ی هم‌خواری بین افراد آن‌ها می‌دانند (Carayon, 1961). فرار هم یکی دیگر از معضلات پرورش حشرات است. پوره‌های سنین پایین تر به دلیل داشتن جثه کوچک تر، آسان تر فرار می‌کنند به گونه‌ای که از ۹ مورد فرار هشت مورد

اولین تخم‌ریزی سن *A. custos* در روز دهم حشرات کامل رخ داد (شکل ۱). میانگین تخم‌ریزی یک ماده در تحقیق حاضر ۱۳۶/۱۶ عدد به دست آمد. Lipa (1969) میزان تولید تخم توسط یک حشره‌ی ماده را ۹۴ عدد، Couturier (1938) حدود ۳۰۰ عدد در شرایط صحرایی، و Zheng & Su (1985) بین ۱۶۰ تا ۴۰۰ عدد گزارش کرده‌اند. این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به شرایط محیطی، نوع شکار و نیز نژاد شکارگر و شرایط آزمایشی باشد. به هر صورت مقایسه آماری این ظرفیت‌ها صرفاً تحت شرایط یکسان آزمایشی امکان پذیر است. در مورد گونه‌ی *A. chinensis* میزان تخم‌ریزی بسته به بستر رهاسازی آن داشته به طوری که روی درختان نارون، صنوبر و گیاه سویا به ترتیب ۳۳۰/۸، ۲۵۵/۷ و ۲۲۵/۳ عدد به ازاء هر ماده در طول عمر خود تخم گذاشته است (Gao et al., 2012).



شکل ۲- نرخ برداشت حشرات کامل جدید ( $h$ ) و میزان تولید روزانه‌ی آن‌ها ( $P$ ) در زمان‌های مختلف برداشت از کلنی حشرات کامل ماده‌ی سن شکارگر

*Arma custos*

Fig. 2- Harvest rate ( $h$ ) and daily production of newly adults ( $P$ ) at different discard ages in *Arma custos* female adults.

حداکثر میزان برداشت حشرات کامل از کلنی به تعداد ۱/۰۳۹ عدد به ازای هر ماده در روز بود که در روز چهل و ششم عمر ماده‌های کامل رخ داد (شکل ۲). در چند گونه سن شکارگر از جنس *Orius* بهترین

سایر حشرات قابل بررسی است. چنانکه Khlistovskii et al. (1985) پرورش سن‌های شکارگر *A. custos* و *P. maculiventris* را روی بقایای بدن حشرات کامل بید غلات *Sitotroga cerealella* L. گزارش کرده‌اند. میزان بقای مراحل نابالغ این شکارگرها روی لاشه‌ی بید غلات بین ۹۶/۳ - ۸۸/۲ درصد بوده‌است.

همچنین پیرامون کارایی سن شکارگر *A. custos* بایستی بررسی‌های آزمایشگاهی و صحرایی صورت گیرد. در چین این شکارگر را بعد از پرورش به نسبت ۱:۵ (شکارگر: شکار) علیه چندین آفت جنگلی رهاسازی نموده که بسته به گونه‌ی آفت بین ۴۰ تا ۷۰ درصد نسبت به شاهد کاهش جمعیت داشته‌است (Zheng et al., 1992). یارها سازی آن علیه کرم برگ‌خوار سویا *Spodoptera exigua* Hübner به نسبت ۱:۱۵ بعد از بیست روز ۸۳/۳٪ جمعیت کرم برگ‌خوار سویا را کاهش داده‌است (Gao et al., 2012). استفاده‌ی دیگر از جمعیت‌های آزمایشگاهی سن شکارگر *A. custos* می‌تواند تزریق آن در مواقع لازم به بوم‌سامانه‌های جنگلی و درختی باشد تا مجموعه‌ی جمعیت‌های طبیعی موجود این شکارگر در بوم‌سامانه‌های یادشده تقویت گردد.

## References

- Abai, M. & Ebrahimifar, H. 2002. Report on a quarantine pest *Hyphantria cunea* (Drury 1773) from Guilan province. Newsletter of the Entomological Society of Iran 14: 1-2 (In Persian).
- Augustin, S. & Léveux, J. 1993. Life history of the poplar beetle *Chrysomela tremulae* F. in the central region of France. The Canadian Entomologist. 125: 399-401.
- Birch, L. C. 1948. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. Journal of Animal Ecology. 17: 15-26.
- Caccamo, C. 1968. Animal organisms living at the expense of *Croesus septentrionalis* L. (Hym. - Symphyta). Frustula Entomologica. 9: 1-10. (In Italian with English summary).
- Carayon, J. 1961. Quelques remarques sur les Hémiptères-Hétéroptères: Leur importance comme insectes auxiliaires et les possibilités des leur utilisation dans la lutte biologique. Entomophaga. 6: 133-141.
- Carey, J. R. & Vargas, R. I. 1985. Demographic analysis of insect mass rearing: a case study of three tephritids. Journal of Economic Entomology. 78: 523-527.
- Carey, J. R. 1993. Applied Demography for Biologists with Special Emphasis on Insects. Oxford University Press, New York.

مربوط به پوره‌ی سن ۱ و یک مورد مربوط به پوره‌ی سن پنجم بوده‌است.

اولین جفت‌گیری سه روز بعد از پیدایش حشرات کامل دیده شد و در طول زندگی آن‌ها ادامه داشت. اغلب موارد جفت‌گیری (۸ مورد از ۱۴ مورد) در ظرف‌های پرورش در ساعات پایانی مرحله‌ی روشنائی مشاهده شد. اما طبیعی است که برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر در خصوص زمان و تعداد دفعات جفت‌گیری نیاز به انجام آزمایش ویژه‌ای است که در آن مقاطع زمانی متعدد و متناوب در نظر گرفته شود. همانگونه که در سن شکارگر *P. maculiventris* جفت‌گیری ممتد تا یک شبانه‌روز هم گزارش شده‌است (De Clercq, 2000). در شرایط صحرایی اولین جفت‌گیری این شکارگر بین ۸ تا ۱۰ روز پس از پیدایش حشرات کامل دیده شده‌است (Zheng & SU, 1985).

## نتیجه‌گیری

سن شکارگر *A. custos* با روش پرورشی به کاررفته در این بررسی، به‌خوبی در آزمایشگاه مستقر شد و اطلاعات مقدماتی زیست‌شناسی آزمایشگاهی آن به‌دست آمد. با این وجود مطالعات بیشتری در خصوص ویژگی‌های زیستی این شکارگر مورد نیاز است. از جمله امکان پرورش انبوه آن روی غذای مصنوعی و نیز روی مواد زاید حاصل از تکثیر

- Carey, J. R., Wong, T. T. Y. & Ramadan, M. M. 1988a. Demographic framework for parasitoid mass rearing: case study of *Biosteres tryoni*, a larval parasitoid of tephritid fruit fly. Theoretical Population Biology. 34: 279-296.
- Carey, J. R., Yang, P. & Foote, D. 1988b. Demographic analysis of insect reproductive levels, patterns and heterogeneity: case study of laboratory strains of three Hawaiian tephritids. Entomologia Experimentalis et Applicata. 46: 85-91.
- Couturier, A. 1938. Les asopides et le doryphore. Revue Zoologique de l' Agriculture. 37: 171-176.
- De Clercq, P. 2000. Predaceous stinkbugs (Pentatomidea: Asopinae). pp. 737-789. In: Schaefer, C. W. & Panizzi, A. R. (eds.), Heteroptera of Economic Importance. CRC Press, Boca Raton.
- De Clercq, P. & Degheele, D. 1993. Quality of predatory bugs of the genus *Podisus* (Pentatomidea: Asopinae) reared on natural and artificial diets. pp. 129-142. In: Nicoli, G., Benuzizi, M. & Leppla, N. C. (eds.), Proceedings of the 7<sup>th</sup> Workshop of the IOBC Global Working Group "Quality Control of Mass Reared Arthropods," September 13-16, Rimini, Italy.
- Gao, Z., Wang, X., Zhang, L., Sun, Y., Fan, J., Fu, X., Jin, N. & Wang, G. 2012. Study on artificial breeding technology and releasing in field of *Arma chinensis* Fallou. Journal of Engineering of Heilongjiang University. No. 1: 65-73. (In Chinese with English summary).
- Gao, Z., Wang, X., Zhang, L., Sun, Y., Fan, J. & Wang, G. 2011. Biological characteristic of *Arma chinensis*. Journal of Engineering of Heilongjiang University. No. 4: 72-77, 83. (In Chinese with English summary).
- Jervis, M. A., Copland, M. J. W. & Harvey, J. A. 2007. The life-cycle. pp. 73-165. In: Jervis, M. A. (ed.): Insects as Natural Enemies, a Practical Perspective. Springer, Dordrecht.
- Khlistovskii, E. D., Oleshchenko, I. N., Shirinyan, Zh. A. & Ismailov, V. Ya. 1985. Artificial nutrient media for rearing larvae of predatory bugs of the family Pentatomidae. Zoologicheskii Zhurnal. 64: 117-123. (In Russian with English summary).
- Lattin, J. D. 2000. Minute pirate bugs (Anthocoridae). pp. 607-637. In: Schaefer, C. W. & Panizzi, A. R. (eds): Heteroptera of Economic Importance. CRC Press, Boca Raton.
- Lipa, J. J. 1969. Studies on *Arma custos* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae). Prace Naukowe Instytutu Ochrony Roślin. 11: 197-214. (In Polish with English summary).
- Meiracker, R. A. F. van den 1999. Biocontrol of western flower thrips by heteropteran bugs. Ph.D. thesis, University of Amsterdam, The Netherlands, 147pp.
- Mohaghegh, J. & Amir-Maafi, M. 2007. Reproduction of the predatory stinkbug *Andrallus spinidens* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on live and frozen prey. Applied Entomology and Zoology. 42: 15-20.
- Mohaghegh, J. 2008. New records of the predatory stinkbugs (Het.: Pentatomidae: Asopinae) from Iran. Journal of Entomological Society of Iran. 27(2) Supplement: 1-4.
- Mohaghegh, J., De Clercq, P. & Tirry, L. 1998a. Effects of maternal age and egg weight on developmental time and body weight of offspring of *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Annals of the Entomological Society of America. 91: 315-322.
- Mohaghegh, J., De Clercq, P. & Tirry, L. 1998b. Maternal age and egg weight affect offspring performance in the predatory stink bug *Podisus nigrispinus*. BioControl. 43: 163-174.
- Mohaghegh-Neyshabouri, J., De Clercq, P. & Degheele, D. 1996. Influence of female body weight on reproduction in laboratory-reared *Podisus nigrispinus* and *Podisus maculiventris* (Heteroptera:

- Pentatomidae). Mededelingen Faculteit Landbouwkundige & Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent. 61: 693-696.
- Morris, R. F. 1972.** Predation by insects and spiders inhabiting colonial webs of *Hyphantria cunea*. The Canadian Entomologist. 104: 1197-1207.
- Nagy, B. 1957.** Recently observed predacious bugs (*Pinthaeus* and *Troilus*) living in the larval nests of *Hyphantria cunea*. Annals of the Hungarian Plant Protection Institute. 7: 263-267. (In Hungarian with English summary).
- Putshkova, L.V. 1961.** The eggs of Hemiptera. VI. Pentatomoidea, 2, Pentatomidae and Plataspidae. Entomologicheskoe Obozrenie. 60: 131-143. (In Russian English summary).
- Saulich, A. Kh. 1995.** Natural predatory bug *Arma custos* as possible agent against *Leptinotarsa decemlineata*. European Journal of Plant Pathology. Abstracts of the XIII International Plant Protection Congress, July, 2-7, The Hague, the Netherland, 909.
- Volkovich T.A. & A.Kh. Saulich 1994.** The predatory bug *Arma custos*: photoperiodic and temperature control of diapause and coloration. Zoologicheskii Zhurnal. 73: 26-37. (In Russian with English summary).
- Warren, L. O., Peck, W. B. & Tadic, M. 1967.** Spiders associated with the fall webworms, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Kansas Entomological Society. 40: 382-395.
- Wheeler, A.G.Jr. 2000.** Predacious plant bugs (Miridae). pp. 657-693. In: Schaefer, C. W. & Panizzi, A. R. (eds.): Heteroptera of Economic Importance. CRC Press, Boca Raton.
- Zheng, Y. X. & Su, G. L. 1985.** The predator *Arma custos*. Natural Enemies of Insects Kunchong Tiandi. 7: 87-89. (In Chinese with English summary).
- Zheng, Z. Y., Chen, Y.W. & Wen, Y. G. 1992.** Experiments on the use of *Arma custos* (Fabricius) (Hem.: Pentatomidae) to control forest pests. Chinese Journal of Biological Control. 8: 155-156. (In Chinese with English summary).

---

## Study of some biological characteristics of *Arma custos* (Hemiptera: Pentatomidae) in a laboratory rearing

Jafar Mohaghegh

Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran, mohaghegh@iripp.ir

---

Received: Oct. 06, 2012

1 (1) 81-90

Accepted: May.05, 2013

---

### Abstract

The asopine *Arma custos* is a generalist predator feeding mainly on lepidopteran and coleopteran larvae. In order to study its reproductive potential, a laboratory colony of the predator was established using *Galleria mellonella* larvae as prey. Experiments were carried out in a controlled climate room ( $T = 25 \pm 1$  °C,  $RH = 60-70\%$  and  $L:D = 16:8$  h.). Development times of eggs and five nymphal instars were  $7.30 \pm 0.02$ ,  $4.25 \pm 0.03$ ,  $4.96 \pm 0.03$ ,  $4.69 \pm 0.02$ ,  $5.46 \pm 0.02$  and  $8.15 \pm 0.02$  days, respectively. The respective overall survival rates were: 89, 84, 75, 67, 63 and 55 percent. Females took longer ( $34.96 \pm 0.11$  days) to develop than males ( $34.59 \pm 0.08$  days). Estimated values for demographic parameters of intrinsic and finite rates of increase ( $\text{day}^{-1}$ ), gross and net reproductive rates (eggs) and generation time (days) were 0.0579, 1.0597, 106.2, 35.44 and 61.57, respectively. Optimal discard age of the culture was at day 46 from adults eclosion. Use of these findings for further studies on the predator was discussed.

**Key words:** Laboratory rearing, harvest rate, predatory bugs, Heteroptera, Asopinae, *Arma custos*.

---

## بررسی اثرات تلفیقی سرکه ی چوب و تی کمپوست بر بیماری های پوسیدگی ریشه و زوال بوته و پوسیدگی ذغالی ریشه خربزه

مهین صابری<sup>۱</sup>، حسن عسکری<sup>۲</sup>، ابوالفضل سرپله<sup>۲</sup>

۱- دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آشتیان، ایران

۲- مؤسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: مهین صابری، Mahinsaberi2@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۳

۱۰۱-۹۱ (۱)

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۳۰

### چکیده

پوسیدگی ریشه و زوال بوته با عامل *Monosporascus cannonballus* و پوسیدگی ذغالی ریشه بر اثر *Macrophomina phaseolina* از بیماری های مهم خربزه در اکثر مناطق کشت آن در ایران می باشد. در این پژوهش، اثرات ضد قارچی سرکه ی چوب بر رشد این قارچ ها در شرایط آزمایشگاه به همراه تأثیر توأم سرکه ی چوب و تی کمپوست، در کنترل *M. cannonballus* در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بررسی متابولیت های سرکه ی چوب با اضافه نمودن قرص های قارچی فعال و جوان به تشتک های حاوی محیط کشت PDA با غلظت های ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۳۷، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۰ درصد حجمی سرکه ی چوب انجام شد. نتایج نشان داد که ترکیبات سرکه ی چوب باعث کاهش معنی دار رشد میسلیومی *M. cannonballus* و *M. phaseolina* در سطح ۵٪ شدند. در گلخانه بذور خربزه در خاک گلدان های حاوی ۱۵٪ حجمی تی کمپوست و آلوده به *M. cannonballus* کشت گردید. سه غلظت از سرکه ی چوب (۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۱۲۵) که بیشترین کارایی را در بررسی های آزمایشگاهی داشتند، به خاک گلدان ها اضافه شدند. ارزیابی تیمارها نشان داد که هر سه غلظت سرکه ی چوب باعث کاهش معنی دار شدت بیماری نسبت به شاهد شدند. همچنین تلفیق سرکه ی چوب و تی کمپوست، سبب کاهش شدت بیماری به میزان ۹۴ درصد و افزایش وزن ریشه و تاج گیاه به میزان ۸ و ۲۵ درصد در مقایسه با شاهد گردید ( $\alpha=0/05$ ).

**واژه های کلیدی:** بیماری های خاکبرد، قارچ ایستایی، مواد با منشأ طبیعی، تحریک کننده ی رشد، پیرولگنیوس اسید

### مقدمه

بین رفتن بوته ها می شود (Martyn & Miller, 1996; Holmes & Stanghellini, 1998; Cohen et al., 2000;

Sarpeleh, 2008). این بیماری برای اولین بار از ایالت آریزونا ی آمریکا در سال ۱۹۷۰ گزارش شد (Troutman & Matejka, 1970) و در سال ۱۹۷۴ عامل آن به عنوان *Monosporascus cannonballus* شناسایی گردید (Pollack & Uecker, 1974) این بیماری در اسپانیا در طول ۱۵ سال باعث کاهش سطح زیر کشت خربزه تا ۴۰ درصد شده است (Garcia et al., 2000) و در جالیز کاری های کالیفرنیا همه ساله خسارت قابل توجهی به بار می آورد

خربزه (*Cucumis melo*) از خانواده ی کدویان (Cucurbitaceae) و یکی از محصولات با ارزش در اکثر کشورهای جهان می باشد. ایران از تولید کنندگان عمده ی گیاهان این خانواده و به ویژه طالبی و خربزه می باشد. یکی از بیماری های بسیار مهم در خربزه، پوسیدگی ریشه و زوال بوته ها با عامل *Monosporascus cannonballus* است (Pollack & Uecker, 1974) که معمولاً در شرایط گرم و خشک و به ویژه در سال های کم آب به صورت همه گیر در مزرعه ظاهر و ۱-۲ هفته مانده به برداشت محصول باعث از



اسپوروگون به‌ترتیب در غلظت‌های ۱ و ۵ میکروگرم ماده مؤثره در میلی لیتر به‌طور کامل مانع رشد *M. cannonballus* شدند. قارچ‌کش‌های آرتیواتاپ و فلوآزینام نیز رشد میسلومی این بیمارگر را در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر محدود کردند (Cheraghali & Sarpeleh, 2012). کنترل بیولوژیک این بیمارگر توسط قارچ آنتاگونیست *Trichoderma virens* (IRAN 1101 C) سبب کاهش شدت بیماری ناشی از *M. cannonballus* در شرایط گلخانه شده است (Keshavarzi et al., 2012). سرکه‌ی چوب یا Pyrolignious acid یک مایع قهوه‌ای متمایل به قرمز است و از جمع‌آوری گاز حاصل از سوختن چوب در شرایط بی‌هوای به‌دست می‌آید (Nurhayati et al., 2005). عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی سرکه‌ی چوب شامل الکل‌ها (متانول و بوتانول) اسیدها (استیک، فرمیک، پروپیونیک، والریک)، فرم آلدئید، استن، فرفورال، فنل، کریوزول، متیل آمیدین و پیریدین می‌باشد (Tiilikkala et al., 2010). سرکه‌ی چوب محصولی است که دارای خاصیت ضدقارچی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، به راحتی قابل تولید بوده و ثابت شده است که فاقد اثرات مخرب زیست‌محیطی و نامطلوب بر روی موجودات زنده و محیط می‌باشد (Tiilikkala et al., 2010).

در پژوهش‌های پیشین، تأثیر سرکه‌ی چوب روی بیمارگرهای قارچی گیاهان نشان داده شده است. به‌طور مثال تأثیر آن بر کاهش رشد قارچ‌های بیمارگر *Fusarium.spp.* *Rhizoctonia.spp.* *Pythium* به اثبات رسیده است (Kadota et al., 2002; Yagi & Tsukamoto, 1991). در پژوهشی مشابه، سرکه‌ی چوب استحصالی از درخت سرو ژاپنی اثرات ضد قارچی بر قارچ‌های *Fusarium*, *Pythium splendens*, *Phytophthora oxysporum*, *capsici* نشان داده است (Hwang et al., 2005). در مطالعه‌ی تأثیر سرکه‌ی چوب بر قارچ بیمارگر *Alternaria mali* عامل بلایت آلترناریایی سیب، نشان داده شد که رقت ۱:۳۲ سرکه‌ی چوب باعث توقف کامل رشد بیمارگر شده و کارایی آن با قارچ‌کش پلی‌اکسین‌بی در رقت ۲ میلی گرم در میلی لیتر یکسان بوده است

(Aegerter et al., 2000). علائم بیماری معمولاً ۱-۲ هفته مانده به برداشت محصول ظاهر شده و بیشترین خسارت وقتی که گیاه تحت تنش‌های گرما و خشکی به‌ویژه در موقع رسیدن میوه باشد، ایجاد می‌شود (Kim et al., 1995; Bruton et al., 2000). در ایران این بیماری نخستین بار از روی بوته‌های طالبی و خربزه از مناطق گرمسار و ایوانکی گزارش شد (Sarpeleh & Sonbolkar, 2002). در سال‌های اخیر پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه و طالبی از مناطق گرم و نیمه خشک ایران و یا زراعت‌هایی با مالچ پلاستیک به‌صورت گسترده مشاهده شده که باعث خسارت زیاد به صیفی‌کاران و در نتیجه در بسیاری از نقاط باعث کاهش شدید کشت این محصول شده است (Sarpeleh, 2008, Sarpeleh et al., 2012).

قارچ *Macrophomina phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی ذغالی و ایجاد خسارت اقتصادی در بسیاری گیاهان و از جمله خربزه می‌نماید (M. phaseolina (wyllie, 1993). میزبان‌های خود را در مرحله‌ی ابتدایی رشد مانند بذر و گیاهچه آلوده کرده و در نهایت باعث مرگ و میر بوته‌های مبتلا و در نتیجه کاهش شدید عملکرد می‌شود. نتایج مطالعات مقایسه‌ای نشان داده است که پوسیدگی ذغالی، وزن گیاه، حجم و وزن ریشه را بیش از ۵۰٪ کاهش می‌دهد (Ndiaye, 2007).

روش‌های مختلف شیمیایی، بیولوژیکی و زراعی در مدیریت این بیمارگرها به کار رفته است. روش‌هایی مانند ضد عفونی خاک با مواد شیمیایی، پیوند زدن و کاربرد روش‌های آبیاری باعث کاهش رشد ریشه می‌شوند (Cohen et al., 2000). همچنین از بین بردن ریشه‌ها به‌طریق شیمیایی در پایان فصل، به دلیل کاهش اینوکلوم در کاهش بیماری مؤثر می‌باشد. فلوآزینام و کرسوکسیم متیل دو قارچ‌کش آزمایش شده در آزمایشگاه هستند که در کاهش این بیماری مؤثر هستند و هر دو کاملاً مانع رشد رویشی قارچ *M. cannonballus* می‌شوند (Cohen et al., 1999).

در ایران تا کنون مطالعات محدودی در خصوص کنترل *M. cannonballus* انجام شده است. در یک بررسی آزمایشگاهی، به کارگیری قارچ‌کش‌های متالاکسیل و

خریزه، اثرات تلفیقی این ماده به همراه تی کمپوست در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال خریزه مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچ *M. phaseolin* و *M. cannonballus* که قبلاً از بوته‌های خریزه از منطقه‌ی گرمسار جداسازی شده بودند از کلکسیون مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور و سرکه‌ی چوب و تی کمپوست نیز توسط این مؤسسه تهیه گردید. فرآورده‌ی سرکه‌ی چوب از ضایعات چوب مرکبات تهیه شده و pH آن ۳/۴ و قسمت عمده‌ی ترکیبات تشکیل دهنده‌ی آن شامل اسید استیک، متانول، استن، فنل و تار بود. این ماده ابتدا با استفاده از کاغذ واتمن شماره‌ی یک صاف شده و سپس از طریق عبور دادن از فیلتر میکروپور (۰/۲۲ میکرومتر) سترون شد. تی کمپوست که از هوادهی، مرطوب کردن و عصاره‌گیری ورمی کمپوست تهیه شده بود، پس از صاف نمودن آن، مورد استفاده قرار گرفت.

### تأثیر سرکه‌ی چوب روی رشد میسلیومی جدایه‌ها

برای بررسی تأثیر سرکه‌ی چوب بر رشد رویشی قارچ‌های فوق‌الذکر، مقادیر مختلف آن به ظروف مک کارتنی حاوی ۲۰ میلی لیتر PDA اضافه گردید تا غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۳۷، ۰/۷۵ درصد حاصل شود (در ظروف پتری شاهد آب مقطر سترون اضافه شد). سپس از کشت چهار روزه‌ی جدایه‌ی قارچ‌ها در محیط PDA، قرص‌های فعال و تازه به قطر ۳ میلی‌متر برداشته و در مرکز ظروف پتری (با قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی غلظت‌های فوق‌الذکر قرار داده شد. کلیه‌ی کشت‌ها در دمای  $27 \pm 2$  درجه‌ی سلسیوس نگهداری و رشد پرگنه‌ی قارچ هر روزه تا زمانی که میزان آن در تیمار شاهد به تمام سطح پتری رسید، اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی قطر پرگنه نسبت به شاهد بر اساس فرمول  $X = (A-B)/A \times 100$  محاسبه شد (Zhong et al., 2007). در این رابطه، X درصد بازدارندگی، A قطر رشد پرگنه در تشتک شاهد و B قطر

(Jung, 2007). با توجه به شواهد موجود به‌نظر می‌رسد سرکه‌ی چوب روی طیف وسیعی از بیمارگرهای قارچی اثر کنترل‌کنندگی داشته باشد.

دومین ترکیب، تی کمپوست است که به‌عنوان یک مایع غذایی زیستی محسوب می‌شود. این فرآورده از طریق عصاره‌کشی از کمپوست یا ورمی کمپوست و استخراج مواد غذایی و میکروارگانیسم‌های مفید آن‌ها حاصل می‌شود (Ingham, 2003). دلیل عمده‌ی استفاده از تی کمپوست که امروزه در بسیاری از کشورها متداول است، انتقال توده‌ی میکروبی، مواد ارگانیکی و ترکیبات شیمیایی محلول به خاک و گیاهان است، خصوصاً در مواردی که خاک در اثر تیمارهای شیمیایی (استفاده از سموم آفت‌کش و کودهای شیمیایی) جمعیت میکروبی مفید خود را از دست داده است. متخصصین برای تی کمپوست فواید و مزایای زیادی بیان داشته‌اند. تکنیک تخمیر کمپوست مایع، اصولاً فرآیند هوازی است. این تخمیر سبب استخراج و رشد تعدادی از میکروارگانیسم‌های فعال می‌گردد. کمپوست‌ها به رشد بهتر گیاه کمک کرده و تی کمپوست علاوه بر این، باعث فراهم آوردن مواد مغذی برای گیاهان و فعال کردن ارگانیسم‌های مفید خاک و در نتیجه افزایش مقاومت به بیماری‌ها می‌شود. (Brinton et al., 1996; Touart, 2000; Quarles, 2001; Scheuerell & Mahaffee, 2002; Ingham, 2003) کمپوست‌ها از تندش اسپور بعضی از قارچ‌ها جلوگیری کرده (Singh et al., 2003) و در نتیجه از اپیدمی شدن برخی از آنها مانند *Pythium* spp. و *Verticillium dahliae* بازدارندگی می‌نمایند (Goldstein, 1998; Doube et al., 1994). اثرات بازدارنده‌ی تی کمپوست بر عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی خیار *Pythium ultimum* (Scheuerell & Mahaffee, 2004) و لکه باکتریایی گوجه‌فرنگی *Xanthomonas vesicatoria* نیز نشان داده شده است (Al-Dahmani et al., 2003).

باتوجه به اثرات بازدارندگی سرکه‌ی چوب و تی کمپوست در کنترل تعدادی از بیمارگرهای گیاهی و افزایش شاخص‌های رشدی گیاهان، در پژوهش حاضر ضمن بررسی تأثیر سرکه‌ی چوب بر روی بیمارگرهای مهم

رشد پرگنه در هر یک از تیمارها می‌باشد. کلیه‌ی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. داده‌های هر آزمایش با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

### تأثیر سرکه‌ی چوب و تی‌کمپوست در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌ی خربزه

برای تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح قارچ *M. cannonballus* دو فلاسک ۱ لیتری حاوی بذور جو و پرلیت سترون به نسبت ۱:۳ با افزودن بلوک‌های میسیلیومی از پرگنه‌ی چهار روزه *M. cannonballus* در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. سپس مایه‌ی تلقیح آماده شده به میزان ۱۲۰ میلی‌لیتر از مایه‌ی مذکور (معادل ۶۰ گرم) به گلدان‌های ۲/۵ لیتری حاوی خاک سترون اضافه شد تا میزان ۷۵ پروپاگول در گرم خاک از مایه‌ی قارچ حاصل شود (Sarpeleh, 2012; Bruton et al., 1995). تیمارهای به‌همراه تی‌کمپوست نیز ۱۵٪ حجمی گلدان، تی‌کمپوست اضافه گردید. جهت گلدان‌های شاهد ۱۲۰ میلی‌لیتر بذور جو سترون استفاده گردید. در هر گلدان یک بذر خربزه (اکوتیپ مشهدی) کشت شد.

سه غلظت از سرکه‌ی چوب شامل ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد حجمی که در شرایط آزمایشگاه اثرات بازدارندگی معنی‌داری روی رشد *M. cannonballus* نشان داده بودند، انتخاب و یک روز بعد از بذورکاری (۳۰ میلی‌لیتر به ازای هر بذر) و به فواصل هر دو هفته یک‌بار (۷۰ میلی‌لیتر به ازای هر گیاه) به خاک گلدان‌ها اضافه شدند. در مجموع در ۳ مرحله سرکه‌ی چوب اضافه شد. گلدان‌ها در دمای ۲۵±۳ درجه‌ی سلسیوس در گلخانه نگهداری و هر دو روز یک‌بار از نظر بروز علائم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار (جدول ۱) و در ۵ تکرار (گلدان) انجام گرفت. ارزیابی اثر تیمارهای آزمایش در کاهش خسارت از طریق تعیین درصد آلودگی و شدت بیماری، زمانی که آلودگی تیمار شاهد به ۶۰ درصد رسید، انجام شد. شاخص شدت بیماری (Diseases Severity Index: DSI) بر اساس لکه‌ها و

زخم‌های نکروز ریشه تعیین گردید (Crosby, 2000). براین اساس عدد ۱= بدون علائم ۲= نکروز ناچیز در ریشه‌های انتهایی ۳= نکروز ناچیز در تمام ریشه‌ها ۴= نکروز شدید در تمام ریشه‌ها، مقدار ناچیزی از ریشه‌های انتهایی باقی مانده و ۵= نکروز شدید در تمام ریشه‌ها و فقط ریشه‌های اصلی باقی مانده است، می‌باشد. به‌منظور تعیین تأثیر سرکه‌ی چوب و تی‌کمپوست روی شاخص‌های رشدی بوته‌های خربزه، وزن تر و خشک ریشه‌ها و تاج بوته‌ها نیز اندازه‌گیری شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شده و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ با یکدیگر مقایسه شدند.

جدول ۱- تیمارهای مورد آزمایش برای بررسی اثر سرکه‌ی چوب و تی‌کمپوست روی *M. cannonballus* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته در خربزه.

Table 1- Treatments used in the experiment for studying the efficacy of wood vinegar and compost tea on *M. cannonballus*.

1- Non inoculated plants (Control-)
2- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> (Control+)
3- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> + 0.125% wood vinegar
4- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> + 0.25% wood vinegar
5- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> + 0.5% wood vinegar
6- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> + 0.125% wood vinegar+ Compost tea
7- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> + 0.25% wood vinegar+ Compost tea
8- Inoculated plants with <i>M. cannonballus</i> + 0.5% wood vinegar+ Compost tea

### نتایج

#### تأثیر سرکه‌ی چوب بر میزان رشد *Macrophomina phaseolina*

جدول ۲ ارایه دهنده‌ی نتایج این قسمت از پژوهش می‌باشد. در مقایسه‌ی میانگین رشد پرگنه‌ی *M. phaseolina* در غلظت‌های مختلف سرکه‌ی چوب،

### تأثیر سرکه ی چوب بر میزان رشد *Monosporascus cannonballus*

نتایج این بخش از پژوهش در جدول ۳ ارائه گردیده است. سرکه ی چوب روی میزان رشد پرگنه ی *M. cannonballus* تأثیر معنی داری داشته و رابطه ی مستقیمی بین افزایش غلظت سرکه ی چوب و کاهش رشد پرگنه ی قارچ مشاهده شد (جدول ۳). در غلظت ۰/۰۵٪ سرکه ی چوب اگرچه میانگین اختلاف رشد قارچ با شاهد در سطح ۵٪ معنی دار بود، ولی با افزایش غلظت بر میزان قارچ ایستایی افزوده شد، به طوری که در غلظت های ۰/۲۵، ۰/۳۷، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد، موجب عدم استقرار قارچ گردید (جدول ۳).

### تأثیر سرکه ی چوب بر بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته و شاخص های رشدی خربزه

جدول ۴ و ۵ در برگیرنده و ارائه دهنده ی نتایج مربوط به این بخش می باشند. هر سه غلظت ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد سرکه ی چوب بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته در خربزه را کنترل کردند (جدول ۴) به گونه ای که شدت بیماری در گیاهان مایه زنی شده در حضور این غلظت ها به ترتیب ۸، ۱۲ و ۱۲ درصد بود (جدول ۵). کاربرد تلفیقی سرکه ی چوب و تی کمپوست سبب کاهش شدت بیماری به میزان ۹۴٪ گردید (جدول ۵).

غلظت های ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد به طور کامل مانع استقرار قارچ شدند و با کاهش غلظت سرکه ی چوب از میزان بازدارندگی از رشد قارچ کاسته شد، به طوری که در غلظت ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ درصد، میانگین رشد قارچ با شاهد اختلاف معنی دار نشان نداد (جدول ۲).

### جدول ۲- تأثیر غلظت های مختلف سرکه ی چوب بر رشد پرگنه ی قارچ *Macrophomina phaseolina*.

Table 2-Effect of different concentrations of wood vinegar on mycelial growth of *M. phaseolina*.

% inhibition	Average of colony diameter (mm)	Concentration of wood vinegar (%)
-	90	0
1.11e	89	0.025
6.66e	84	0.05
17.77d	74	0.125
43.33c	51	0.25
65.55b	31	0.37
100a	0	0.5
100a	0	0.75

میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می باشند، تفاوتشان در سطح ۵ درصد بر طبق آزمون چند دامنه ای دانکن معنی دار نیست.

Means followed by similar letter (s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple-range test.

### جدول ۳- تأثیر غلظت های مختلف سرکه ی چوب بر رشد پرگنه قارچ *Monosporascus cannonballus*

Table 3- Effect of different concentrations of wood vinegar on the mycelial growth of *M. cannonballus*.

% inhibition	Average of colony diameter (mm)	Concentration of wood vinegar%
	90	0
1.11d	89	0.025
28.88c	64	0.05
61.11b	35	0.125
100a	0	0.25
100a	0	0.37
100a	0	0.5
100a	0	0.75

میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می باشند تفاوتشان در سطح ۵ درصد بر طبق آزمون چند دامنه ای دانکن معنی دار نیست.

Means followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple-range test

جدول ۴- جدول تجزیه‌ی واریانس شدت بیماری و فاکتورهای رشدی خربزه تیمار شده با قارچ *Monosporascus. cannonballus*، در حضور سرکه‌ی چوب و تی کمپوست در شرایط گلخانه.

Table 4- Analysis of variance for disease severity and growth factors of muskmelon plants inoculated with *Monosporascus. cannonballus*, in the presence of wood vinegar and Compost tea in greenhouse condition.

Pr>F	F	Coefficient of variation	Mean of squares	Degree of freedom	Source of variation
0.000**	10.35	19	0.62	7	Disease severity
0.000**	6.35	9	8.6	7	Shoot Height
0.120	1.79	16	2.28	7	Root Height
0.008**	3	20	1.67	7	Root fresh weight
0.002**	4.03	8	2.52	7	Shoot fresh weight
0.002**	4.18	12	0.14	7	Root dry weight
0.000**	5.95	7	0.44	7	Shoot dry weight

\*\* significant at 5% probability levels.

جدول ۵- مقایسه‌ی میانگین ارتفاع (سانتی متر)، وزن تر و وزن خشک ریشه و اندام هوایی (گرم) و شدت بیماری (درصد) خربزه تیمار شده با سرکه‌ی چوب و تی کمپوست تحت شرایط گلخانه.

Table 5- Comparison of diseases severity index (%), height (cm), fresh and dry weight of root and canopy of muskmelon (g) treated with wood vinegar and Composts tea in greenhouse conditions.

Diseases severity	Shoot dry weight	Root dry weight	Shoot fresh weight	Root fresh weight	Root Height	Shoot Height	Treatment
8 <sup>c</sup>	8.99 <sup>de</sup>	1.44 <sup>ab</sup>	71.92 <sup>d</sup>	11.92 <sup>ab</sup>	39.6 <sup>ab</sup>	91.6 <sup>c</sup>	inoculated plants + 0.125% wood vinegar
12 <sup>d</sup>	10.3 <sup>cde</sup>	1.9 <sup>a</sup>	82.78 <sup>cd</sup>	15.34 <sup>a</sup>	38.2 <sup>ab</sup>	123 <sup>bc</sup>	inoculated plants + 0.25% wood vinegar
12 <sup>d</sup>	12.2 <sup>abc</sup>	1.14 <sup>abc</sup>	98.42 <sup>abc</sup>	9.62 <sup>ab</sup>	55.2 <sup>ab</sup>	159.8 <sup>ab</sup>	inoculated plants + 0.5% wood vinegar
0 <sup>a</sup>	14.02 <sup>a</sup>	1.88 <sup>a</sup>	112.36 <sup>a</sup>	15.74 <sup>a</sup>	40.4 <sup>ab</sup>	178.6 <sup>a</sup>	inoculated plants + 0.125% wood vinegar + compost tea
4 <sup>b</sup>	13.24 <sup>ab</sup>	1.06 <sup>abc</sup>	106.42 <sup>ab</sup>	8.9 <sup>ab</sup>	53.6 <sup>ab</sup>	156.22 <sup>b</sup>	inoculated plants + 0.25% wood vinegar + compost tea
8 <sup>c</sup>	12.32 <sup>abc</sup>	1.88 <sup>a</sup>	99.52 <sup>abc</sup>	15.28 <sup>a</sup>	63.2 <sup>a</sup>	168.4 <sup>a</sup>	inoculated plants + 0.5% wood vinegar + compost tea
0 <sup>a</sup>	11.06 <sup>bcd</sup>	0.8 <sup>bc</sup>	88.84 <sup>bcd</sup>	6.7 <sup>b</sup>	43 <sup>ab</sup>	167.8 <sup>a</sup>	Non inoculated plants (Control-)
68 <sup>e</sup>	8.14 <sup>e</sup>	0.58 <sup>c</sup>	82.56 <sup>cd</sup>	6.06 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>	117 <sup>c</sup>	inoculated plants (Control+)

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند تفاوتشان در سطح احتمال ۵ درصد بر طبق آزمون چند دامنه‌ای دانکن معنی‌دار نیست.

Means followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple-range test

## بحث

می‌شوند (Ikergami *et al.*, 1992) یا شیموتو در بررسی‌های خود در مورد نحوه‌ی عملکرد سرکه‌ی چوب، ثابت نمود که مواد موجود در این ترکیب، مانند هورمون‌ها عمل کرده و در غلظت کم تأثیر مثبتی را روی خاک و عامل بیمارگر می‌گذارند (Yashimoto, 1994).

تی کمپوست دارای خاصیت بازدارندگی از رشد بیمارگرها می‌باشد. طی مطالعات مختلفی اثرات بازدارندگی تی کمپوست روی بیمارگرهای متعددی از جمله *Alternaria solani* عامل بلایت آلترناریایی گوجه‌فرنگی به اثبات رسیده است (Haggag & Saber, 2007).

خاصیت ضد قارچی سرکه‌ی چوب در کنترل برخی بیمارگرهای گیاهی به اثبات رسیده است (Kadota & Niimi., 2004; Qiaozhi *et al.*, 2009). محققین مختلف اثرات ضد قارچی سرکه‌ی چوب را به ترکیبات فنلی موجود در آن نسبت داده‌اند (Cowan, 1999; Yodthong & Niamsa, 2009; Baimark *et al.*, 2008). گویاکول، کریوزول، ۴ اتیل ۲ متوکسی فنل و ۶-۲ دی متوکسی فنل از مهمترین ترکیبات فنلی هستند که باعث خواص ضد قارچی سرکه‌ی چوب

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر گواه بر اثرات مثبت تی کمپوست در افزایش شاخص های رشدی گیاه بود. تی کمپوست در موارد متعدد علاوه بر کنترل آفات و بیماری ها در برنامه های حاصل خیزی خاک نیز به کار رفته است (Scheuerell & Mahaffee, 2002; Quarles, 2001; Ingham, 2003). تی کمپوست به دلیل غنی بودن از مواد آلی پایدار و مواد هوموسی و نسبت کربن به نیتروژن پایین، سبب افزایش رشد گیاهان می شود و از طرف دیگر به دلیل آزاد شدن تدریجی مواد آلی موجود در آن از خطر آب شویی در امان بوده و دوره ی تغذیه ی گیاه را به طور کامل پوشش می دهد (Guiti, 2010).

نتایج کلی این بررسی نشان داد که سرکه ی چوب بر رشد میسلیمی قارچ های *M. cannonballus* و *M. phaseolina* در سطح ۵ درصد به صورت معنی داری اثرات بازدارندگی داشته و در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته های خربزه بر اثر *M. cannonballus* تأثیر معنی داری دارد. نتایج به دست آمده می تواند به عنوان یکی از راه کارهای مناسب در جهت توسعه ی روش های غیر شیمیایی برای کنترل عوامل بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

### نتیجه گیری

استنتاج کلی از نتایج این تحقیق این است که سرکه ی چوب و تی کمپوست هر کدام به تنهایی سبب کاهش شدت بیماری و افزایش شاخص های رشدی گیاه خربزه گردیدند. تلفیق سرکه ی چوب و تی کمپوست نیز باعث افزایش معنی دار این اثرات در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته در خربزه گردید.

### سپاسگزاری

نگارندگان مراتب قدردانی خود را از جناب آقای دکتر مهران غزوی و جناب آقای مهندس محمدی پور و سرکار خانم مهندس ودیعه چراغعلی از موسسه ی تحقیقات گیاه پزشکی کشور به لحاظ همکاری های بی دریغشان، ابراز می دارند.

بررسی دیگری نشان داده شد که استفاده از تی کمپوست باعث کنترل عامل سفیدک پودری خیار گردید (Tateda et al., 2007). به نظر می رسد که تی کمپوست به علت وجود یک یا چند میکروارگانیسم متعارض بیمارگر دارای خاصیت بازدارندگی می باشد. این میکروارگانیسم های متعارض یا ناهمساز به طرق مختلف از قبیل تولید آنتی بیوتیک، تولید آنزیم های تجزیه کننده، رقابت برای غذا، یا مستقیماً از طریق پارازیت کردن عامل بیماری زا به بیمارگر اجازه تولید جمعیت کافی برای ایجاد بیماری حاد را نمی دهند (Ketterer et al., 1992; Beicht, 1981; Budde & Weltzien, 1990).

در این پژوهش، سرکه ی چوب به تنهایی باعث افزایش شاخص های رشدی گیاه شد. اضافه کردن تی کمپوست اثرات این افزایش را به طور معنی داری بهبود بخشید. غلظت ۰/۱۲۵ سرکه ی چوب در ترکیب با تی کمپوست روی کلیه ی فاکتورهای رشدی گیاه بیشترین تأثیر را نشان داد. یکی از تأثیرات مثبت سرکه ی چوب را می توان در افزایش رشد گیاهان دید که این ویژگی را معمولاً به ترکیبات متانول و فرفورال (Furfural) موجود در آن نسبت می دهند (Nurhayati et al., 2005). در موارد دیگر نیز محققین مختلف اثرات سرکه ی چوب را بر رشد گیاهان نشان داده اند (Ichikawa & Ota, 1982; Shirakawa et al., 1995; Mu et al., 2003). سرکه ی چوب شامل ۱۵ عنصر از عناصر پر مصرف و کم مصرف شامل کلسیم، کادمیم، کروم، مس، آهن، پتاسیم، منگنز، آلومینیوم، سدیم، روی، آرسنیک، مولیبدن، فسفر، سرب و بروم می باشد (Zulkarami et al., 2011). اکثر این عناصر در فعالیت های حیاتی گیاه و افزایش فتوسنتز نقش دارند. وجود هم زمان اسید استیک در کنار کاتیون های کلسیم و آهن باعث می شود که اسید استیک با این کاتیون ها تشکیل کمپلکس محلولی را بدهد که در آن پیوند یونی جایگزین پیوند کووالانسی می گردد. در نتیجه از رسوب آهن در خاک جلوگیری شده و از آب شویی سایر عناصر ممانعت به عمل می آید (Taiz & Zieger, 2006).



## References

- Aegerter, B. J., Gordon, T. R. & Davis, R. M. 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Disease*. 84: 224-230.
- Al Dahmani, J. H., Abbasi, P. A., Miller, S. A. & Hoitink, H. A. J. 2003. Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse conditions. *Plant Disease*. 87:913-919.
- Baimark, Y., Threeprom, J. & Dumrongchai, N. 2008. Utilization of wood vinegars as sustainable coagulating and antifungal agents in the production of natural rubber sheets. *Journal of Environmental Science and Technology*. 1(4): 157-163.
- Beicht, W. 1981. Induction of Resistance in Plants by Microbial Metabolites. Dissertation, University Hannover.
- Brinton, W. F., Trankner, A. & Droffner, M. 1996. Investigations into liquid compost extracts. *Biocycle*. 37(11):68-70.
- Bruton, B. D., Davis, R. M., & Gordon, T. R. 1995. Occurrence of *Acremonium* sp. And *Monosporascus cannonballus* in the major cantaloupe and watermelon growing areas of California. (Note) *Plant Disease*. 79: 754.
- Bruton, B. D., Garcia Jimenez, J. & Armengol, J. 2000. Assessment of Virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on Cucumis melo. *Plant Disease*. 84: 907-913.
- Budde, K. & Weltzien, H. C. 1990. The use of compost extracts and substrates for combating *Erysiphe graminis*. 6<sup>th</sup> International Symposium on Grain Diseases in German, 5-9 Nov, Halle, Germany . 2: 527-528.
- Cheraghali, V. & Sarpeleh, A. 2012. Study of the efficacy of different fungicides on the control of *Monosporascus cannonballus* the causal agent of root rot and vine decline of muskmelon in Iran. 20<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress in Iran, 25-27 september, Shiraz, Iran, P.324.
- Cohen, R., Pivonia, S., Burger, Y., Edelstein, M., Gamliel, A. & Katan, J. 2000. Towards intergrated management of *Monosporascuse* wilt of melon in Israel. *Plant Disease*. 84: 496-505.
- Cohen, R., Pivonia, S., Shtienberg, D., Edelstein, M., Raz, D., Gerstl, Z. & Katan J. 1999. Efficacy of fluazinam in suppression of *Monosporascuse cannonballus* the causal agent of sudden wilt of melon. *Plant Disease*. 83: 1137-1141.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbial Reviews*. 12 (4): 564-582.
- Crosby, K. 2000. Impact of *Monosporascuse cannonballus* on root growth of diverse melon varieties and their F1 progeny in the field. *Subtropical Plant Science*. 52: 8-11.
- Doube, M. B., Stephen, P. M., Davoren, H. & Ryder, M. 1994. Interaction between earthworms, beneficial soil micro-organisms and root pathogens. *Soil Ecology*. 1: 3-10.
- Garcia, J., Armengo, J., Sales, R., Jorda, C. & Bruton, B. D. 2000. Fungal pathogens associated with melon collapse in Spain. *EPPO Bulletin*. 30: 169-173.
- Goldstein, J. 1998. Compost suppresses disease in the lab and on the fields. *Biocycle*. 39: 62-65.
- Guiti, A. 2010. Compost, sustainable soil and water management and environmental remediation. 1<sup>th</sup> ed. University of Tehran Press. 427pp.
- Haggag, W. M. & Saber, M. 2007. Suppression of early blight on tomato and purple blight on onion by foliar sprays of aerated and non aerated compost teas. *International Journal of Food, Agriculture and Environment*. 5(2): 302- 309.



- Holmes, G. J. & Stanghellini, M. E. 1998. *Monosporascus* root rot of melons in Imerial Valley. (Abst.) Phytopathology. 88: 121.
- Hwang, Y., Matsushita, Y., Sugamoto, K. & Matsui, T. 2005. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *Cryptomenia japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. Journal of Microbial Biotechnology. 15(5):1106-1109.
- Ichikawa, T. & Ota, Y. 1982. Plant growth-regulating activity of pyroligneous acid I. Effect of pyroligneous acid on the growth of rice seedlings. Japan Journal of Crop Science. 51: 14-17.
- Ikerami, F., Sekin, T. & Fuji, Y. 1992. Antidemaptophyte activity of phenolic compounds in Mokusaku-eki. Yakugaku Zasshi. 118: 27-30.
- Ingham, E. R. 2003. The Compost Tea Brewing Manual. 4<sup>th</sup> ed. Soil Food Web. Inc Corvallis Oregon. 88pp.
- Jung, K. H. 2007. Growth inhibition effect of pyroligneous acid on pathogenic fungus, *Alternaria mali*, the agent of alternaria blotch of apple. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12: 318-322.
- Kadota, M., Hirano, T., Imizu, K. & Niimi, Y. 2002. Pyroligneous acid improves in vitro rooting of Japanese pear cultivars. Horticulture Science. 37:194-195.
- Kadota, M. & Niimi, Y. 2004. Effects of charcoal with pyroligneous acid and barnyard manure on bedding plants. Scientia Horticulturae. 101(3): 327-332.
- Keshavarzi, S., Behboudi, K., Sarpeleh, A. & Ahmadzadeh, M. 2012. Induction of chitinase dependent resistance by *Trichoderma virens* strain IRAN 1101 C against *Monosporascus cannonballus*, the casual agent of root rot and vine decline of muskmelon. 20<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress in Iran, 25-27 september, Shiraz, Iran, P.261.
- Ketterer, N., Fisher, B. & Weltzien, H. 1992. Biological control of *Botrytis cinerea* on grapevine by compost extracts and their microorganisms in pure culture. In: K. Verhoeff, N. Malathrakakis and B. Williamson (eds.). Recent Advances in Botrytis Research. Proceedings IO<sup>th</sup> International Botrytis Symposium, Heraklion. 179-186.
- Kim, D. H., Rasmussen, S. L. & Stanghellini, M. E. 1995. *Monosporascus cannonballus* root rot of muskmelon: Root infection and symptom development in relation to soil temperature. (Abst.) Phytopathology. 85: 1195.
- Martyn, R. D. & Miller, M. E. 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline: An emerging disease of melons worldwide. Plant Disease. 80: 716-725.
- Mu, J., Uehara, T. & Furuno, T. 2003. Effect of bamboo vinegar on regulation of germination and radical growth of seed plants. Journal of Wood Science. 49: 262-270.
- Ndiaye, M. 2007. Ecology & management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the sahel. PhD. dissertation. Wageningen University, The Netherland.
- Nurhayati, T., Roliadi, H. & Bermawie, N. 2005. Production of Mangium (*Acacia mangium*) Wood vinegar and its utilization. Journal of Forestry Research. 2(1): 13 – 25.
- Pollack, F. G. & Uecker, F. A. 1974. *Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots. Mycologia. 66: 346-349.
- Qiaozhi, M., Zhong, Z. & Xihan, M. 2009. Preparation, toxicity and components analysis of apricot branch wood vinegar. Journal of Northwest A & F University-Natural Science. 10: 91-96.
- Quarles, W. 2001. Compost tea for organic farming and gardening. The IPM Practitioner. 23(9):1-8.

- Sarpeleh, A. 2008.** The role of *Monosporascus cannonballus* in melon collapse in Iran. Australasian Plant Disease Notes. 3: 162-164.
- Sarpeleh, A., Cheragali, V. & Razavi, M. 2012.** Detection of *Monosporascus cannonballus* from melon plants using molecular tools. Journal of Crop Protection. 1(4) 349-359.
- Sarpeleh, A. & Sonbolkar, A. 2002.** Isolation of *Monosporascuse Cannonballus* from cantaloupe and musekmelon in Iran. 15<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress in Iran, 26-30 september, Kermanshah, Iran, P.185.
- SAS Institute Inc. 2002.** SAS/STAT User's Guide. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Scheuerell, S. J & Mahaffee, W. F. 2002.** Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. Compost Science and Utilization. 10(4):313-338.
- Scheuerell, S. J. & Mahaffee, W. F. 2004.** Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*. Phytopathology. 94: 1156-1163.
- Shirakawa, N., Ichikawa, T., Koyama, R., Taniguchi, H., Honma, S. & Terada, S. 1995.** Effect of pyroligneous acid on the growth of Rice. Agriculture and Horticulture. 70: 806-808.
- Singh, U. P., Maurya, S. & Singh, D. P. 2003.** Antifungal activity and induced resistance in pea by aqueous extract of vermicompost and for control of powdery mildew of pea and balsam. Journal of Plant Diseases and Protection. 110 (6): 544-553.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006.** Plant Physiology. 4<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts. 676 p.
- Tateda, M., Yoneda, D. & Sato, Y. 2007.** Effects of compost tea making from differently treated compost on plant disease control. College of Technology, Toyama Prefectural University, Toyama. 433.436.
- Tiilikkala, K., Fagernas, L. & Tiilikkala, J. 2010.** History and use of wood pyrolysis liquids as biocide and plant protection product. The Open Agriculture Journal. 4: 111-118.
- Touart, A. P. 2000.** Time for compost tea in the Northwest. Biocycle. 41(10): 74-77.
- Troutman, J. L & Matejka, J. C. 1970.** Three fungi associated with cantaloupe roots in Arizona. (Abst.) Phytopathology. 60: 1317.
- Wyllie, T. D. 1993.** Charcoal rot. In: J.B. Sinclair & P.A. Backman, Editors, Compendium of soybean diseases. 3<sup>th</sup> ed. APS Press. St. Paul, MN. 106pp.
- Yagi, T. & Tsukamoto, S. 1991.** Association Place Protection of Hokuriko. 39: 93-98.
- Yashimoto, T. 1994.** Toward Enhanced and Sustainable Agricultural Productivity in the 2000's. Breeding Research and Biotechnology Proceedings of The 7<sup>th</sup> International Congress of the Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania (SABRAO). 811-820.
- Yodthong, B. & Niamsa, N. 2009.** Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets. Biomass and Bioenergy. 33: 994-998.
- Zhong, Z., Chen, R., Xing, R., Chen, X., Liu, S., Guo, Z., Ji, X., Wang, L. & Li, P. 2007.** Synthesis and antifungal properties of sulfanilamide derivatives of chitosan. Carbohydrate Research. 342 (16): 2390-2395.
- Zulkarami, B., Ashrafuzzaman, M., Husni, M. O. & Ismail, M. R. 2011.** Effect of pyroligneous acid on growth, yield and quality improvement of rockmelon in soilless culture. Australian Journal of Crop Science. 5(12): 1508-1514.

## Integrated effects of wood vinegar and tea compost on root rot and vine decline and charcoal root rot diseases of muskmelon

Mahin Saberi<sup>1</sup>, Hassan Askary<sup>2</sup> and Abolfazl Sarpeleh<sup>2</sup>

1- Agriculture college, Islamic Azad University, Ashtian branch, Ashtian, Iran

2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

Corresponding author: mahinsaberi2@gmail.com

Received: Dec.20,2013

1 (1) 91-101

Accepted: May.05,2013

### Abstract

Root rot and vine decline disease caused by *Monosporascus cannonballus* and charcoal root rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* are important diseases of melon plants in Iran. In this study, the efficacy of wood vinegar on the mycelial growth of these pathogens as well as the integrated effect of wood vinegar and compost tea were examined on the control of root rot and vine decline disease. To test the antifungal activity of wood vinegar, mycelial disks (3 mm in diameter) of *M. cannonballus* and *M. phaseolina* were placed on PDA culture media amended with different concentrations of wood vinegar (0.025, 0.05, 0.37, 0.5, 0.75 v/v). Wood vinegar inhibited the mycelial growth of both pathogens at 0.05 probability level. In green house condition, muskmelon seeds were sown into pot-soil containing 15% v/v of compost tea and infested with *M. cannonballus*. Three concentrations of wood vinegar (0.125%, 0.25%, 0.5%) which had shown the maximum inhibitory effect on mycelial growth in the laboratory were then drenched into the soil. Results showed that disease severity was significantly reduced in all concentrations used ( $\alpha = 0.05$ ). The integration of compost tea and wood vinegar reduced the pathogenicity of *M. cannonballus* up to 94% compared with untreated control. Roots and shoots weights increased by 8% and 25% respectively in the presence of wood vinegar and compost tea ( $\alpha = 0.05$ ).

**Keywords:** soil-borne disease, fungistatic, natural products, growth stimulator, Pyrolignous acid.

## گزارش کوتاه علمی

اولین گزارش زنبور *Dolichomitus kriechebaumeri* (Hymenoptera: Ichneumonidae) پارازیتوید لاروسوسک شاخک بلند *Cerambyx dux* در ایرانحبیب عباسی پور<sup>۱</sup>، غلام حسین حسن شاهی<sup>۱</sup> و ریجیو جوسیلا<sup>۲</sup>

۱- گروه گیاه پزشکی دانشگاه شاهد- تهران

۲- موزه جانورشناسی- دانشگاه تورکو - فنلاند

مسئول مکاتبات: حبیب عباسی پور habbasipour@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۶

۱۰۳-۱۰۵ (۱)

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲

## چکیده

طی نمونه برداری هایی که از باغ های زردآلوی مناطق شمالی استان فارس انجام گرفت یک پارازیتوید لاروی سوسک شاخک بلند روزاسه شناسایی شد. این گونه با نام علمی: *Dolichomitus kriechebaumeri* (Hym.: Ichneumonidae: Pimplinae: Ephialtini) تاکنون از ایران گزارش نشده است و برای اولین بار از ایران از روی این آفت گزارش می گردد.

واژه های کلیدی: سوسک شاخک بلند، *Dolichomitus kriechebaumeri*، پارازیتوید، ایران

*kriechebaumeri* (Schulz, 1906) (Ichneumonidae: Pimplinae: Ephialtini) برای اولین بار از ایران گزارش شد. این نمونه از شهرستان های بوانات و خرمبید و در بهمن و اسفند ماه سال ۱۳۹۰ از لاروهای زمستان گذران *Cerambyx dux* جمع آوری شد. این گونه توسط نگارنده ی سوم، دکتر جوسیلا از موزه ی جانورشناسی بخش تنوع زیستی و علوم زیست محیطی دانشگاه تورکو کشور فنلاند شناسایی شد.

گونه ی *D. kriechebaumeri* پارازیتوید داخلی (Endoparasitoid) لاروی می باشد که از روی لارو چندین گونه از سخت بالپوشان (خصوصاً خانواده ی Buprestidae) شامل *Anthaxia*، *Sphenoptera tappesi* Marseul و *Anthaxia caucasica manca* L. از باغات هلو، آلو و گیلاس گزارش شده است (Bolu, 2008; Aubert, 1969; Kalashyan, 1984; Cinar et al., 2004). هم چنین به عنوان پارازیتوید لاروی شب پره *Cydia molesta* (Busck.) (Lep.: Olethreutidae) گزارش شده

به منظور شناسایی پارازیتویدهای لاروی سوسک شاخک بلند *Cerambyx dux* Fald. (Col.: Cerambycidae) در مناطق شمالی استان فارس، نمونه برداری از باغ های زردآلوی این مناطق در سال ۱۳۹۰ صورت گرفت. شاخه های آلوده به لارو آفت به آزمایشگاه انتقال داده شده و در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. شاخه های حاوی لارو آفت در ظروف پلاستیکی استوانه ای شکل که در آن با توری ارگانزا پوشیده شده بود، قرار گرفت و در شرایط دمایی  $25 \pm 2$  درجه ی سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 2$  درصد و ۱۴ ساعت روشنایی تا زمان خروج حشرات کامل پارازیتویدهای احتمالی نگهداری شدند. این نمونه ها به صورت روزانه برای جمع آوری پارازیتویدها بررسی و زنبورهای خارج شده در الکل ۷۵ درصد نگهداری شدند. پس از خروج پارازیتویدها و شناسایی مقدماتی، به منظور شناسایی نهایی برای محققین خارج از کشور ارسال شد. در میان نمونه ها گونه ی *Dolichomitus*

انتهایی و میانی است. شیار u شکل پس سری (Occipital carina) کامل با یک شیب قوی در خط میانی است. غلاف تخم ریز به طول ۱۸ میلی متر است. نوک تیغه‌ی پائینی تخم ریز دارای لبه پستی که تا حدودی در میان نوک تیغه‌ی بالایی قرار می گیرد (Sheng & Sun, 2002). این زنبور از نواحی پالتارکتیک و از کشورهای اتریش، بوسنی و هرزگوین، بلغارستان، قبرس، چکسلواکی، مصر، فنلاند، فرانسه، آلمان، یونان، مجارستان، ایتالیا، هلند، لهستان، رومانی، روسیه، اسپانیا، سوئیس، تاجیکستان، ترکیه، ترکمنستان، اوکراین، ازبکستان و صربستان گزارش شده است (Oehlke, 1967; Townes, 1969). نمونه‌های اصلی آن به تعداد ۴ عدد از جنس ماده در آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه شاهد (تهران) نگه‌داری می‌شود.

است (Altay, 1966). این گونه متعلق به زیرخانواده‌ی Cheloninae می‌باشد.

برخی از مشخصات شکل‌شناسی این زنبور به این شرح می‌باشد: در حشرات ماده بدن به طول ۱۲ میلی متر، بال‌های جلو به طول ۱۰ میلی متر، سلول Areolet کمی پهن، دومین رگبال بالای در قاعده‌ی سلول آرئولت قرار دارد. رگ‌بال عرضی سلول میانی در بال عقبی (Nervellus) نزدیک یا در بالای بخش میانی قرار دارد. اولین ترژیت بلند، تقریباً به بلندی ترژیت دوم است. ترژیت دوم با یک شیار مورب آشکار در هر طرف که از قسمت قاعده، در نزدیکی خط وسط، به سمت سوراخ تنفسی قرار دارد. ترژیت‌های سوم و چهارم تقریباً همیشه دارای برآمدگی‌های گره مانند ریز انتهایی و میانی هستند. قطعه‌ی زیرپیشانی (Clypeus) سیاه تا سفید متمایل به زرد، بخش فوقانی آن با یک شکاف عمیق متوسط است و به‌ندرت دارای برآمدگی‌های گره مانند ریز

## References

- Altay, M. 1966. Investigations on Biology and Control of *Laspeyresia molesta* Busck in Bursa Province and Marmara region. Istanbul.
- Aubert, J. F. 1969. Les Ichneumonides Ouest-Palearctiques et leurs hotes , Tome, 2. Pimplinae, Xoridinae et Acaenitinae. Laboratoire d'Evolution des Etres Organises. Paris.
- Bolu, H. 2008. A New host *Sphenoptera tappesi* Marseul (Coleoptera: Buprestidae) for *Dolichomitus kriechebaumeri* (Schulz) (Hymenoptera: Ichneumonidae) from Turkey. Turkish Journal of Zoology. 32: 225-226.
- Cinar, M., Cimen, I. & Bolu, H. 2004. Elazığ ve Mardin illeri kiraz agaclarında zararlı olan turler, dogal duflmanları ve onemlileri uzerindeki gozlemler. Turkish Journal of Entomology. 28: 1-11.
- Kalashyan, M. Yu. 1984. Species of parasites of Armenian metallic wood-borers (Coleoptera, Buprestidae). Biological Journal of Armenia. 37: 986-987.
- Oehlke, J. 1967. Westpaläarktische Ichneumonidae, Ephialtinae Hymenopterorum Catalogus (new edition). 2: 1-49.
- Sheng, M. L. & Sun, S. P. 2002. The Genus *Dolichomitus* Smith (Hymenoptera: Ichneumonidae) from North China. Linzer Biologische Beitrage. 34(1): 475-483.
- Townes, H. T. 1969. Genera of Ichneumonidae, Part 1 (Ephialtinae (Pimplinae), Tryphoninae, Labiinae, Adelognathinae, Xoridinae, Agriotypinae). Memories of the American Entomological Institute. 11: 1-300.

## Scientific Note

### First record of *Dolichomitus kriechebaumeri* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a Larval parasitoid of long horned beetle, *Cerambyx dux* in Iran

Habib Abbasipour<sup>1</sup>, Gholamhosein Hasanshahi<sup>1</sup> and Reijo Jussila<sup>2</sup>

1- Plant Protection Department, College of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran

2- Zoological Museum, Section of Biodiversity and Environmental Sciences, FIN-20014, University of Turku, Finland

**Corresponding Author:** Habib Abbasipour, habbasipour@yahoo.com

---

Received: Sep. 22. 2012

1 (1) 103-105

Accepted: Feb. 17.2013

---

#### Abstract

During sampling of Apricot branches in several locations in Fars province (in Bavanat and Khorram-Bid) (Iran) at February and March 2012, a larval parasitoid of long horned beetle *Cerambyx dux* (Col.: Cerambycidae) was found. The ichneumonid parasitoid, *Dolichomitus kriechebaumeri* (syn. *subglabratus*), was reared from the larvae of *Cerambyx dux*, which infests the trunks and twigs of apricot in orchards. *Cerambyx dux* is a new host for *D. kriechebaumeri*.

**Keywords:** *Dolichomitus kriechebaumeri*, *Cerambyx dux*, new host, Ichneumonidae

---