Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۹- ۲۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

استفاده از مایع تخمیر *Aspergillus westerdijkiae* UTMC 5040 در کنترل زیستی علف هرز جودره (*Hordeum spontanum*)

جواد حامدی *: دانشیار میکروبیولوژی، مرکز پژوهشی فن‌آوری و فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir
حمید چراغیان رادی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز پژوهشی فن‌آوری و فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، hcheraghian@alumni.ut.ac.ir
حمید مقیمی: استادیار میکروبیولوژی، مرکز پژوهشی فن‌آوری و فرآورده‌های میکروبی، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: علف هرز جودره *(Hordeum spontanum)* از مهم‌ترین علف‌های هرز مزارع غلات به ویژه گندم است. هدف از انجام پژوهش حاضر، معرفی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی جدا شده از خاک‌های مناطق مختلف ایران برای کنترل زیستی این علف هرز است.

مواد و روش‌ها: ابتدا ۱۵۰ نمونه قارچ جدا شده از نقاط مختلف ایران طی دو مرحله متوالی با غربال‌گری اولیه و ثانویه روی برگ آفتابگردان و جودره قرار گرفتند. به این منظور، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع تخمیر هر کدام از قارچ‌های کشت داده شده در محیط PDB روی برگ گیاهان یاد شده اسپری شد. در ادامه، توانایی جدایه‌های منتخب برای ایجاد نکروز در علف هرز جودره رشد داده شده در گلدان و نیز توانایی آن‌ها در مهار جوانه‌زنی و ریشه‌زایی علف هرز و همچنین، طیف میزبانی جدایه‌های منتخب بررسی شد.

نتایج: پس از انجام غربال‌گری اولیه و ثانویه مشخص شد که جدایه *Aspergillus westerdijkiae* UTMC 5040 بیش‌ترین توانایی را در ایجاد نکروز در علف هرز جودره دارد. پس از اسپری ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع تخمیر سانتریفوژ شده این جدایه قارچی بر برگ‌های بالغ علف هرز جودره کشت داده شده در گلدان، و پس از گذشت ۳ هفته نکروز شدیدی در گیاه مشاهده شد. بررسی توانایی جدایه منتخب برای مهار جوانه‌زدن و ریشه‌زایی علف هرز، نشان داد که پس از گذشت ۱۰ روز قوه نامیه جودره به میزان ۷۵ درصد و قدرت ریشه‌زایی به طور میانگین از ۶۰ میلی‌متر به ۳۵ میلی‌متر کاهش یافت. بررسی طیف میزبانی جدایه مورد نظر نشان داد که از بین ۲۵ گیاه مختلف، این جدایه توانایی ایجاد علایم بیماری را در سه گیاه هرز جودره، گارس و پیچک صحرایی دارد.

بحث و نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر، نخستین گزارش از کنترل زیستی علف هرز جودره توسط مایع تخمیر *A. westerdijkiae* UTMC5040 است و نتایج به دست آمده می‌تواند در یافتن علف‌کش‌های زیستی جدید استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: علف هرز جودره، قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، کنترل زیستی، *Aspergillus westerdijkiae* UTMC5040

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

هر ساله علف‌های هرز به کاهش بیش از ۹/۷ درصد بازده محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان منجر می‌شوند (۱). کنترل علف‌های هرز بخش قابل توجهی از فعالیت‌های لازم برای تولید محصولات کشاورزی را به خود اختصاص داده است. علف‌های هرز بازده محصولات کشاورزی را در اثر رقابت با گیاه اصلی برای آب، مواد غذایی و نور خورشید کاهش می‌دهند (۲). همچنین، می‌توانند به طور مستقیم عملیات جمع‌آوری محصول را با تأخیر مواجه کرده، کیفیت محصول را کاهش داده و مواد شیمیایی زیان‌بار تولید کنند. در ایالات متحده امریکا با وجود کوشش زیاد برای مقابله با علف‌های هرز، خسارت سالانه ناشی از این عوامل مزاحم بیش از ۸ میلیارد دلار تخمین زده شده است (۳). علف هرز جودره با نام علمی *Hordeum spontanum* عضوی از خانواده گندمیان و از جمله مهم‌ترین علف‌های هرز در مزارع گندم است. زیست‌گاه طبیعی این گیاه یک‌ساله در مناطق آمریکای جنوبی، آفریقای جنوبی، آسیا و نیز ایران است (۴). این علف هرز بیشتر در رقابت با گندم سریع‌تر جوانه زده و عامل بسیار مهمی در کاهش محصول نهایی است. در یک مطالعه انجام شده در استان فارس مشخص شده که رشد جودره می‌تواند محصول گندم را تا ۸۳ درصد در هکتار کاهش دهد (۵ و ۶).

برای کنترل علف‌های هرز از روش‌های مکانیکی، شیمیایی و زیستی استفاده می‌شود (۷). امروزه استفاده از علف‌کش‌های شیمیایی به عنوان روش اصلی برای مقابله با علف‌های هرز در نظر گرفته می‌شود، اما آثار مضر این علف‌کش‌ها بر سلامت انسان و حیوانات، ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی از قبیل آلودگی خاک، آب‌های زیرزمینی و مواد غذایی، از بین بردن ارگانیسم‌های غیرهدف و افزایش مقاومت علف‌های هرز در برابر علف‌کش‌های شیمیایی، توجه دانشمندان را به استفاده از روش‌های جایگزین جلب کرده است (۸ و ۱۰). هم اکنون علف‌کش‌های زیستی به عنوان مهم‌ترین روش جایگزین برای علف‌کش‌های شیمیایی در نظر گرفته می‌شوند. از جمله ویژگی‌های مثبت این نوع از علف‌کش‌ها می‌توان به اختصاصی بودن نسبت به علف هرز هدف، ایمن بودن برای محیط زیست و کاهش توسعه مقاومت در بین علف‌های هرز اشاره کرد (۱۱). در روش کنترل زیستی علف‌های هرز از نماتودها، حشرات، باکتری‌ها و قارچ‌ها برای مهار رشد یا از بین بردن این عوامل مزاحم استفاده می‌شود. در این میان استفاده از قارچ‌ها به عنوان مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در گیاهان، بیش‌ترین توجه و موفقیت را در برداشته است (۱۲). در روش کنترل زیستی علف‌های هرز به وسیله قارچ‌ها یا از اسپورهای قارچی مثل اسپورهای *Colletotrichum gloeosporioides* و *Alternaria cassi* و یا از فیتوتوکسین‌های تولید شده توسط آن‌ها استفاده می‌شود (۱۳). در سال ۱۹۸۴ بیویک[1] و همکارانش گونه *Alternaria destruens*را از گیاه بیمار *Cuscuta gronovii* جداسازی کردند (۱۴). در مطالعات بعدی، مشخص شد که این قارچ بیماری‌زا به میزان ۹۲ درصد به کنترل علف هرز *Cuscuta gronovii* قادر است (۱۵).

با توجه به توانمندی‌های زیاد قارچ‌ها در این زمینه و اهمیت کنترل زیستی جودره در کشت غلات و به ویژه گندم، در پژوهش حاضر، برای نخستین بار توانمندی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در ایران به منظور معرفی یک عامل زیستی توانمند در کنترل زیستی گیاه هرز جودره بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

کشت و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی: در پژوهش حاضر، ۱۵۰ جدایه قارچی از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان آلوده جمع آوری شده از سراسر کشور به دست آمد. به منظور کشت و جداسازی و همچنین خالص‌سازی جدایه‌های قارچی از محیط سیب زمینی دکستروز آگار [۲] استفاده شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۷ تا ۱۴ روز در دمای ۲۸ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. جدایه‌ها پس از کشت مجدد روی PDA داخل ارلن مایرهای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز براث [۳] تلقیح شده و به مدت ۶ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. مایع تخمیر حاصل از رشد قارچی ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل در مراحل بعدی برای سنجش روی گیاه استفاده شد (۹).

آماده‌سازی گیاهان: بذر گیاهان مورد استفاده در پژوهش حاضر، از موسسه علف‌های هرز ایران تهیه شد. فهرست این گیاهان در جدول ۱ آورده شده است. به منظور استریل کردن بذرها قبل از کشت، در ابتدا هر بذر در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد شستشو و به دنبال آن با آب مقطر دو مرحله شستشو انجام شد (۱۶). بذرهای سترون شده به منظور جوانه زدن اولیه در محیط آب آگار کشت و به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بذرهای جوانه زده و بدون آلودگی به داخل محیط کشت MS آگار [۴] انتقال یافتند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در زیر روشنایی مستقیم قرار داده شدند. گیاهان بالغ ۴ هفته‌ای برای انجام سنجش زیستی آثار عصاره‌های قارچی استفاده شدند. به منظور رشد گیاهان مورد نظر در گلدان، خاک باغچه غنی شده با کود برگ که توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده بود، به گلدان‌های پلاستیکی ۱۵سانتی‌متر مکعب انتقال داده شد. سپس، در هر گلدان ۴ عدد بذر علف هرز قرار گرفت. آبیاری به شکل روزانه انجام گرفت و در نهایت، گلدان‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ تا ۶ هفته قرار داده شدند.

سنجش زیستی فعالیت جدایه‌های قارچی در پلیت: در مرحله غربال‌گری اولیه، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع تخمیر به دست آمده از ۱۵۰ جدایه خالص شده روی برگ، ساقه و ریشه گیاه آفتابگردان در محیط MS قرار داده شد و گیاه مورد نظر به مدت ۱۰ روز بررسی شد. طی این مرحله از گیاه آفتابگردان تیمار شده با محیط کشت به تنهایی به عنوان نمونه شاهد منفی استفاده شد. در ادامه ارزیابی بیماری‌زایی قارچ‌های منتخب از مرحله اول بر روی علف هرز جودره به ترتیبی که در بالا برای آفتابگردان یاد شد، انجام شد. طی انجام این مرحله از گیاه گندم اسپری شده با محیط کشت تلقیح نشده به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. هر عصاره به دست آمده روی سه گیاه مستقل و در دو آزمایش به شکل جداگانه تکرار شد (۱۷).

سنجش فعالیت زیستی جدایه منتخب در گلدان: در این مرحله تاثیر مایع تخمیر جدایه منتخب در مهار رشد و ایجاد نکروز روی گیاهان بالغ جودره بررسی شد. برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع تخمیر سانتریفوژ شده جدایه منتخب روی برگ‌های گیاهان بالغ ۴ هفته‌ای اسپری شد. در طول مدت انکوباسیون ۱۲روزه، تیمار مایع تخمیر قارچ منتخب روی برگ‌ها ۳ بار و هر ۴ روز یکبار انجام شد. در این آزمایش از گندم و محیط کشت تلقیح نشده به عنوان نمونه شاهد منفی استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات گیاهان شاهد و گیاه مورد آزمایش، روزانه عکس‌برداری شد. به منظور تکرار آزمایش، عصاره قارچ منتخب روی سه گلدان مستقل و در دو آزمایش، جداگانه آلوده‌سازی شد (۱۷).

سنجش میزان مهار قدرت جوانه‌زنی بذر گیاه هرز: به منظور بررسی مهار قدرت جوانه‌زنی بذر علف هرز توسط جدایه منتخب، ۵۰ عدد از بذر جودره در پلیت‌های حاوی آب آگار قرار داده شد و سپس، ۳ میلی‌لیتر از مایع تخمیر سانتریفوژ شده روی سطح بذرها ریخته شد. در نهایت، پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. از پلیت‌های حاوی بذر که تنها با محیط کشت تلقیح نشده تیمار شده بودند، به عنوان شاهد استفاده شد. قوه نامیه بذرها پس از گذشت ۱۰ روز بررسی شد (۹). این آزمایش برای علف هرز مورد آزمایش ۳ بار و هر بار با ۳ تکرار ۵۰ تایی از بذرها تکرار و میانگین نتایج حاصل با نمونه شاهد مقایسه شد.

سنجش میزان مهار ریشه‌زایی بذر گیاه هرز: به منظور بررسی توانایی جدایه منتخب در جلوگیری از ریشه‌زایی علف هرز جودره، ۵۰ عدد از بذرهای جوانه زده این گیاه با ۳ میلی‌لیتر از مایع تخمیر سانتریفوژ شده قارچی تیمار شدند. سپس، بذرها در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۰روز نتایج ثبت شد. این آزمایش برای علف هرز مورد آزمایش ۳ بار و هر بار با سه تکرار ۵۰ تایی از بذرها تکرار و میانگین نتایج حاصل با نمونه شاهد مقایسه شد.

بررسی طیف میزبانی جدایه منتخب: به منظور بررسی طیف اثر جدایه منتخب، بیماری‌زایی آن برای ۲۵ گونه گیاهی متعلق به ۹ خانواده مختلف بررسی شد (۱۸). در این مرحله ۱ میلی‌لیتر از مایع تخمیر سانتریفوژ شده از جدایه منتخب در محیط PDB روی برگ‌های گیاهان مورد نظر تیمار شد. در ادامه، گیاهان تیمار شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. از گیاهان تیمار شده با آب مقطر به عنوان نمونه‌های شاهد منفی استفاده شد. گیاهان بر اساس میزان آسیب وارد شده به سه دسته ایمن (بدون نکروز قابل مشاهده)، مقاوم (با لکه نکروزی دارای قطر کمتر از ۱ میلی‌متر) و یا حساس (دارای لکه نکروزی بزرگتر از ۲ میلی‌متر) تقسیم بندی شدند (۱۸). این آزمایش برای هر کدام از ۲۵ گونه گیاهی، جداگانه و به شکل ۳ تکرار انجام شد.

شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی جدایه منتخب: شناسایی ریخت‌شناسی جدایه منتخب از طریق تهیه کشت روی لام و رنگ آمیزی با لاکتوفنول کاتن بلو و مشاهده میکروسکوپی و سپس، روش مولکولی انجام شد. برای این منظور جدایه منتخب در محیط PDB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. میسلیوم‌های قارچ با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته و به شکل فیزیکی با روش کوبیدن زیست توده منجمد شده با ازت مایع سلول‌ها شکسته شده و DNA آن با روش استخراج با روش فنل- کلروفرم جداسازی شد (۱۹). PCR با پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1: 5′TCC GTA GGT GAA CCT GCG G′3 و ITS4: 5′TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC′3) انجام شد (۲۰). ویال PCR حاوی ۲۵ میکرولیتر از اجزای واکنش، شامل ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۲ میکرولیتر DNA نمونه با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱۲/۵ میکرولیتر آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID

Taq DNA polymerase master mix، شرکت آمپلیکون [۵] بود. تکثیر قطعه مورد نظر در شرایط زیر انجام شد: ۵ دقیقه واسرشتی ابتدایی در ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه PCR شامل واسرشتی اولیه ۴۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال پرایمر و پلیمریزاسیون برای ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. پلیمریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول به دست آمده پس از خالص‌سازی از روی ژل، برای تعیین توالی استفاده شد. به منظور توالی‌یابی، باند مورد نظر از ژل با کمک کیت استخراج از ژل ساخت شرکت ژن آل- کره جنوبی [۶] استخراج و به شرکت ماکروژن- کره جنوبی ارسال شد. تعیین ترادف بر اساس روش تغییر یافته سنگر انجام شد و نتایج تعیین ترادف در بانک ژن و از طریق هم‌ردیفی توالی ارزیابی شد.

تحلیل آماری نتایج: داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شد. آزمون نرمال سنجی برای آزمایش‌های پتانسیل جوانه‌زنی، ریشه‌زایی و میزان آسیب وارد شده به برگ‌ها پس از اسپری کردن مایع تخمیر با استفاده از آزمون شاپیرو- ویلک [۷] انجام شد. همچنین، معنادار بودن این داده‌ها به کمک آزمون تی [۸] ارزیابی شد.

نتایج

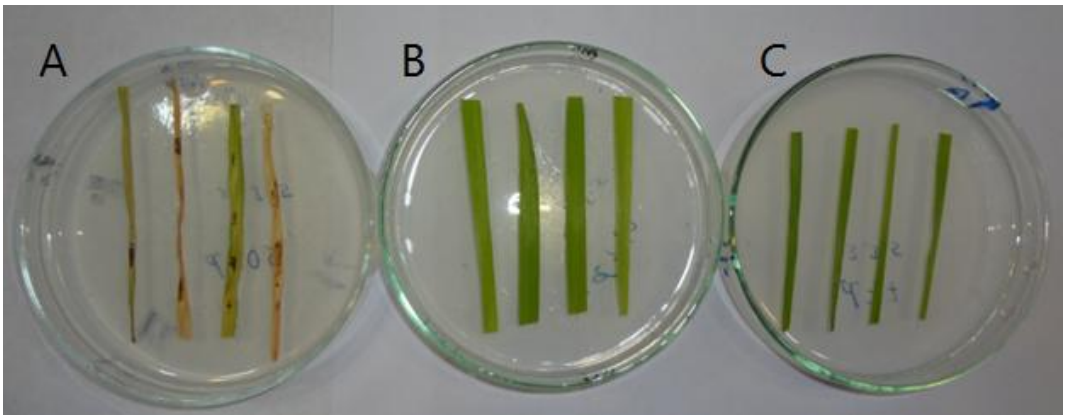
غربال‌گری جدایه‌ها بر اساس سنجش سمیت بر آفتابگردان و جودره: با توجه به حساسیت بالای گیاه آفتابگردان به متابولیت‌های ضد گیاهی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها (۱۷)، به منظور غربال‌گری اولیه جدایه‌ها از این گیاه استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده پس از گذشت ۱۰ روز مشخص شد که از میان ۱۵۰ جدایه مورد آزمایش، ۳۰ جدایه توانایی ایجاد نکروز و مرگ در برگ‌های گیاه آفتابگردان را دارند (شکل ۱). ایجاد نکروز و کلروز، رشد قارچ در سطح گیاه، مهار رشد برگ و از بین رفتن ساقه و ریشه معیارهای انتخاب جدایه‌های مثبت در این مرحله بود.

شکل ۱- سنجش زیستی جدایه‌های قارچی روی گیاه آفتابگردان.

راست: گیاه تیمار شده با ۱ میلی‌لیتر مایع تخمیر به دست آمده از جدایه HC99، چپ: گیاه شاهد تیمار شده با عصاره محیط کشت PDB

www.SID.ir

Archive of SID

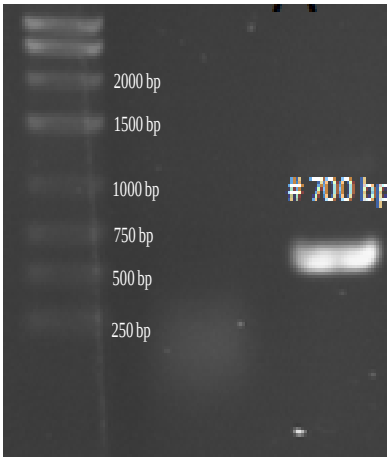


شکل ۲- سنجش زیستی جدایه‌های قارچی بر روی برگ‌های جودره

A: برگ گیاه جودره تیمار شده با عصاره تخمیر سانتریفوژ شده جدایه HC99، B: برگ گیاه جودره تیمار شده با عصاره محیط کشت PDB و C: برگ‌های گندم تیمار شده با مایع تخمیر حاصل از HC99 (*P value*<0.05).

در غربال‌گری ثانویه ۳۰ جدایه منتخب در مرحله قبل که در کوتاه‌ترین زمان بیش‌ترین آثار تخریبی را روی آفتابگردان به همراه داشتند، به منظور بررسی اثر روی گیاه جودره آزمایش شدند. از بین ۳۰ جدایه یاد شده ۶ جدایه توانایی در خور توجهی در ایجاد علایم بیماری در علف هرز مورد آزمایش داشتند، که از بین آن‌ها جدایه HC99 به علت داشتن بیش‌ترین اثر سمی در کم‌ترین زمان نسبت به سایر جدایه‌ها انتخاب و برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شد (شکل ۲).

شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی جدایه HC99: برای شناسایی جدایه‌های قارچی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها از قبیل شکل میسلیوم، آرایش اسپورها، آرایش و رنگ کلونی و پیگمان‌های تولیدی از طریق رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو و تهیه اسلاید کالچر و نیز با توجه به کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی مرجع بررسی شد (۲۱). در جدول ۱ ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه HC99 مشاهده می‌شود. ساختار کنیدی‌های گرد در انتهای کلوملای مربوط به جنس *Aspergillus* مشاهده می‌شود. PCR با استفاده از پرایمرهای ITS انجام شده یک باند حدود ۷۰۰ جفت بازی ایجاد کرد که در شکل ۳ مشاهده می‌شود. توالی تعیین ترادف شده برای جدایه مورد نظر با شماره دسترسی [۹] ۱۷۷۳۵۱۰ در بانک ژنی NCBI ثبت شد. نتیجه حاصل از تعیین ترادف این باند مشخص کرد که جدایه HC99 به میزان ۱۰۰ درصد با گونه *Aspergillus westerdijkiae* خویشاوندی دارد.

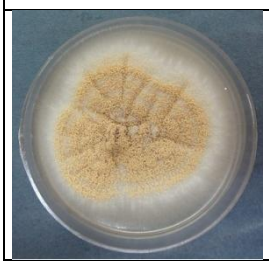


شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز آگارز ۱درصد حاصل از PCR منطقه ITS در *A. Westerdijkae* UTMC 5040

www.SID.ir

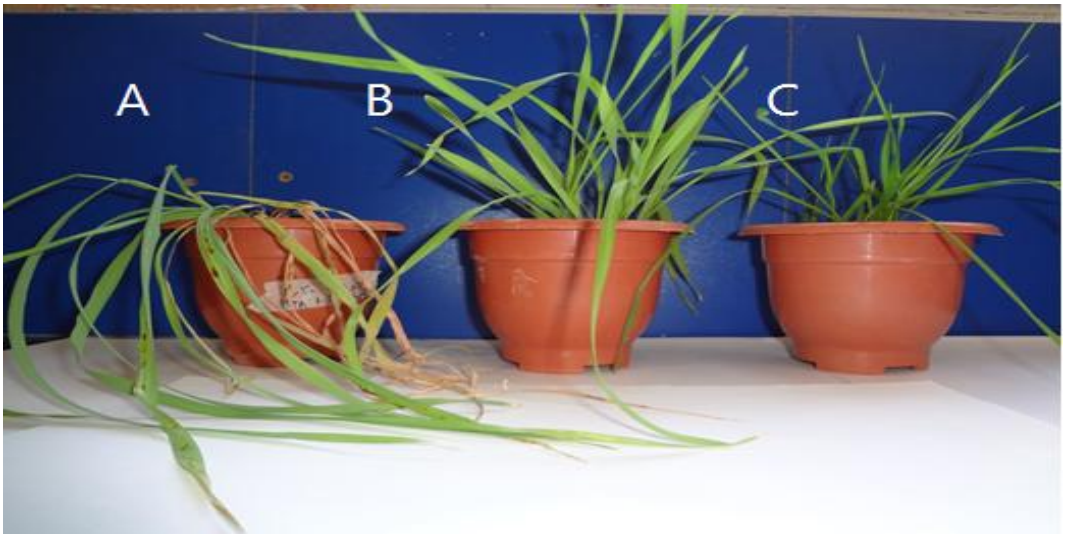
Archive of SID

جدول ۱- ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی کلونی‌های جدایه *A. westerdijkiae* UTMC 5040

میسلیوم هوایی	رنگ اسپور	رنگ کلونی‌ها	شکل کلونی	تصویر انتهای میسلیوم هوایی جدایه HC99	تصویر جدایه HC99 در محیط کشت PDA
سفید رنگ	زرد روشن	زردرنگ با حاشیه سفید	بزرگ، حاشیه‌دار، چروکیده، پودری		

رنگ و چروکیدگی کلونی‌ها از جمله ویژگی‌های متمایز کننده سویه یاد شده از سایر گونه‌های این جنس از قبیل *Aspergillus niger* و *Aspergillus fumigatus* است. جدایه مورد نظر با شماره UTMC 5040 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران نگهداری شد.

سنجش زیستی فعالیت مایع تخمیر جدایه *A. westerdijkiae* UTMC5040 در کشت گلدانی جودره: عصاره قارچ *A. westerdijkiae* UTMC5040 روی برگ‌های گیاهان بالغ ۶ تا ۸ هفته‌ای تیمار شد. تیمار زیستی گیاهان با عصاره در ۳ مرحله و هر ۴ روز یک‌بار انجام گرفت. نتایج به دست آمده از سنجش زیستی عصاره روی گیاه در شکل ۴ مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده، نکروز و بافت مردگی برگ‌ها پس از ۳ هفته در گیاهان تیمار شده با عصاره تخمیر قارچی به طور کامل مشاهده شد (شکل ۴). در این مرحله از گیاه گندم به عنوان شاهد استفاده شد که بر اساس نتایج ارایه شده در شکل ۴، مایع تخمیر قارچ تأثیری روی گیاه شاهد پس از ۲۱ روز نداشت.



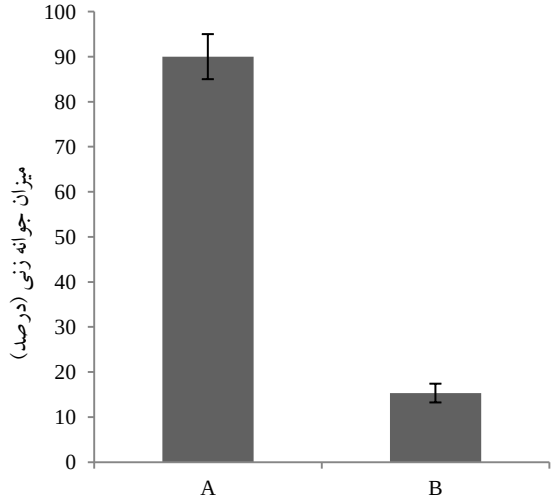
شکل ۴- سنجش زیستی آثار نکروزی مایع تخمیر *A. westerdijkiae* UTMC 5040 در گیاهان بالغ

A: علف هرز جودره تیمار شده با عصاره تخمیر سانتریفوژ شده *A. westerdijkiae* UTMC 5040، B: علف هرز جودره تیمار شده با عصاره محیط کشت PDB و C: گیاه گندم تیمار شده با مایع تخمیر سانتریفوژ شده جدایه *A. westerdijkiae* UTMC 5040 *(P value<0.05)*

www.SID.ir

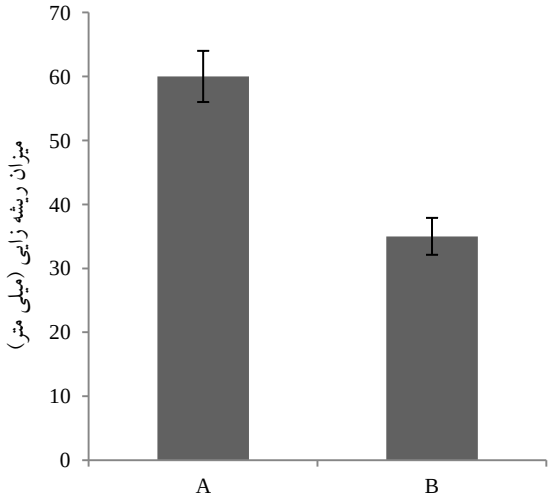
Archive of SID

ارزیابی توان مایع تخمیر قارچی در جلوگیری از جوانه زدن علف هرز جودره: در این آزمایش در هر تکرار ۵۰ عدد از بذر علف هرز با مایع تخمیر قارچی تیمار شد و نتایج پس از گذشت ۱۰ روز ثبت شد. نتایج به دست آمده نشان داده که قوه نامیه بذرها بدون هیچگونه تیمار ۹۰ درصد بود. در ادامه قوه نامیه بذرهای تیمار شده با محیط کشت تلقیح نشده به عنوان شاهد و بذرهای تیمار شده با مایع تخمیر قارچی اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده نشان داد که مایع تخمیر *A. westerdijkiae* UTMC 5040 می‌تواند جوانه زدن علف هرز جودره را به میزان ۷۵ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش دهد (شکل ۵).



شکل ۵- A: درصد جوانه‌زنی بذرهای علف هرز جودره اسپری شده با عصاره محیط کشت تلقیح نشده و B: درصد جوانه‌زنی بذرهای علف هرز جودره اسپری شده با مایع تخمیر *A. westerdijkiae* UTMC 5040 *(P value<0.05)*.

ارزیابی توان مایع تخمیر قارچی در مهار ریشه‌زایی علف هرز جودره: در این آزمایش در هر تکرار ۵۰ عدد از بذر علف هرز تیمار شد. پس از گذشت ۱۰روز از زمان اسپری مایع تخمیر قارچی روی بذرها، نتایج ثبت شد. نتایج به دست آمده نشان داد که اندازه ریشه گیاه جودره به طور میانگین از ۶۰ میلی‌متر در نمونه‌های شاهد به ۳۵ میلی‌متر در نمونه‌های تیمار شده کاهش یافت. نتایج به دست آمده نشان داد که مایع تخمیر *A. westerdijkiae* UTMC5040 می‌تواند ریشه‌زایی علف هرز جودره را تا بیش از ۴۵ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش دهد (شکل ۶).



شکل ۶- A: میزان ریشه‌زایی بذرهای جوانه زده جودره اسپری شده با عصاره محیط کشت تلقیح نشده و B: میزان ریشه‌زایی بذرهای جوانه زده جودره اسپری شده با مایع تخمیر *A. westerdijkiae* UTMC 5040 *(P value<0.05)*.

بررسی طیف میزبانی *A. westerdijkiae* UTMC5040: به منظور ارزیابی دامنه میزبانی، سنجش زیستی مایع تخمیر جدایه *A. westerdijkiae* UTMC5040 روی گیاهان زراعی و گیاهان هرز مختلف بررسی شد. جدول ۲ فهرست گیاهان هرز و جدول ۳ فهرست گیاهان زراعی مورد استفاده در این آزمایش را نشان می‌دهد. در انتخاب این گیاهان خویشاوندی دور و نزدیک به جودره و همچنین، میزان انتشار و گسترش علف‌های هرز مورد توجه قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- پاسخ علف‌های هرز مختلف در برابر تیمار با ۱ میلی‌لیتر مایع تخمیر سانتریفوژ شده جدایه *A. westerdijkiae* UTMC 5040. گیاهان براساس میزان آسیب وارد شده به سه دسته ایمن (بدون نکروز قابل مشاهده)، مقاوم (با لکه نکروزی دارای قطر کمتر از ۱ میلی‌متر) و یا حساس (دارای لکه نکروزی بزرگتر از ۲ میلی‌متر) تقسیم‌بندی شدند (۱۸) *(P value<0.05)*.

نام علمی	نام فارسی	شدت بیماری
Amaranthus retroflexus	تاج خروس ایستاده	ایمن
Amaranthus blitoides	تاج خروس خوابیده	ایمن
Brassica cf deflexa	کلم وحشی	ایمن
Chenopodium album	سلمه تره	ایمن
Convolvulus arvensis	پیچک صحرایی	حساس
Cuscuta sp.	سس	ایمن
Trifolium sp.	شبدر	ایمن
Echinochloa crusgali	سوروف	ایمن
Eremopyrum bonaepartis	گارس	حساس
Hordeum murinum	جوموشک	مقاوم
Hordeum spontanum	جودره	حساس
Lolium sp.	چچم	مقاوم
Sorghum halepense	قیاق	ایمن
Rumex sp	ترشک	ایمن

بر اساس نتایج ارایه شده در جدول ۲ و ۳، آثار نکروزی ناشی از عصاره قارچ منتخب در ۴ گونه گیاهی از ۲۴ گونه گیاهی مورد آزمایش مشاهده شد. همچنین، در نمونه‌های شاهد هیچگونه اثر نکروزی دیده نشد. علاوه بر جودره که بیش‌ترین علایم نکروزی در آن مشاهده شد، در ۲ گیاه هرز گارس [۱۰] و علف هرز پیچک صحرایی [۱۱] آثار نکروزی ایجاد شد. شایان ذکر است جودره و گارس به هم نزدیک بوده و در خانواده *پواسه* [۱۲] قرار می‌گیرند. همچنین، در سایر اعضای متعلق به خانواده *پواسه*، آثار نکروزی کم و بدون از بین بردن گیاه در جوموشک، چچم و ذرت دیده شد. از میان گیاهان زراعی آثار نکروزی تنها در گیاه کدو [۱۳] مشاهده شد.

جدول ۳- پاسخ گیاهان زراعی مختلف در برابر تیمار با ۱ میلی‌متر مایع تخمیر جدایه *A. westerdijkiae* UTMC 5040 *(P value<0.05)*

نام علمی	نام معمول	شدت بیماری
Allium ampeloprasum	تره	ایمن
Raphnus sativus	ترب	ایمن
Citrullus vulgaris	هندوانه	ایمن
Cucurbita moschata	کدو	حساس
Phaseolus vulgaris	لوبیا	ایمن
Pisum sativum	نخود فرنگی	ایمن
Lens culinaris	عدس	ایمن
Oryza sativa	برنج	ایمن
Triticum sp.	گندم	ایمن
Zea mays	ذرت	مقاوم

بحث و نتیجه‌گیری

علف هرز جودره یکی از علف‌های هرز رایج و مخرب در مزارع گندم است که هر ساله خسارات در خور توجهی را به مزارع وارد می‌کند (۶). امروزه به منظور مقابله با این گیاه از علف‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود. سولفوسولفورون [۱۴] با نام تجاری آپیروس و مت سولفورون متیل به همراه سولفوسولفورون [۱۵] با نام تجاری توتال مهم‌ترین علف‌کش‌های شیمیایی مورد استفاده برای کنترل جودره هستند (۲۲). ماندگاری بالای این ترکیبات در خاک و همچنین، سمیت ناشی از آن از جمله معایب استفاده از این علف کش‌های شیمیایی است (۲۳).

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که مایع تخمیر جدایه *A. westerdijkiae* UTMC5040 آثار نکروزی بالایی را در جودره ایجاد کرده و توانمندی زیادی برای کنترل این گیاه دارد (شکل ۲ و ۴). نتایج آزمون گلدانی نشان داد که در شرایط کنترل شده، عصاره سانتریفوژ شده مایع تخمیر این قارچ

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌زایی در خور توجهی برای علف هرز جودره ایجاد می‌کند. نتایج همچنین نشان داده که این جدایه به خوبی قدرت جوانه‌زنی این علف هرز را مهار می‌کند. اطلاعاتی که از آزمایش طیف میزبانی حاصل شد نشان می‌دهد که جدایه *A. westerdijkiae* UTMC5040 در سطح خانواده دارای طیف اثر اختصاصی است و می‌تواند به عنوان یک عامل زیستی توانمند در کنترل جودره استفاده شود.

از جمله عواملی که کنترل زیستی علف‌های هرز به وسیله اسپورهای قارچی را با مشکل مواجه می‌کند، نیاز اسپورهای قارچی به رطوبت بالا برای تندش است. بیشتر اسپورها برای تندش به رطوبت نزدیک به حالت اشباع نیاز دارند (۲۴). ولی این مقدار رطوبتی در بسیاری از مواقع به ویژه در مزارع غلات مثل گندم قابل تأمین نیست. از جمله راه‌های جایگزین برای کنترل زیستی علف‌های هرز، استفاده از متابولیت‌های قارچی است. اعضای جنس *Aspergillus* توانمندی بسیار زیادی در تولید متابولیت‌های زیستی دارند. از ۲۰۰ گونه مختلف این جنس تاکنون بیش از ۵۰۰ متابولیت کشف شده است. این در حالی است که عدد در مورد مخمرها با بیش از ۱۵۰۰ گونه شناخته شده مخمر و بیش از ۳۰ هزار گونه بازیدیومیست، به ترتیب حدود ۵۰ و ۳۰۰ متابولیت کشف شده است (۲۵). به تازگی نیز کاظم‌زاده [۱۶] و همکاران نیز از مایع تخمیر ***A. awamori*** به منظور کنترل زیستی بیماری شانکر مرکبات ایجاد شده توسط *Xanthomonas citri* استفاده کرده‌اند (۲۹). بر اساس بررسی‌های انجام شده پژوهش حاضر، نخستین گزارش از توانمندی‌های متابولیت‌های زیستی جنس *Aspergillus* در کنترل علف‌های هرز است. ولی با توجه به ایجاد حساسیت اسپورهای برخی از گونه‌های جنس *Aspergillus* مانند *A. niger* و نیز امکان تولید آفلاتوکسین توسط این گونه‌ها (۲۶ و ۲۷)، استفاده مستقیم از سویه‌ها در مزرعه، فقط پس از اطمینان از حذف این موارد میسر است. البته می‌توان این متابولیت‌ها را در فرمانتور تولید، استخراج و برای اهداف کنترل زیستی استفاده کرد. ولی در این کار باید هزینه حاصل از کشت انبوه قارچ در فرمانتور، استخراج و خالص‌سازی محصول را در نظر گرفت (۲۵ و ۲۶)، به نحوی که از نظر اقتصادی محصول قابل رقابت با سموم شیمیایی باشد. راه حل دیگر خاموش کردن ژن‌های مضر در سویه مولد و استفاده مستقیم از آن در مزرعه است. *A. westerdijkiae* به دست آمده در پژوهش حاضر، قادر به تولید متابولیت‌های زیستی زیادی از قبیل پنی‌سیلینیک اسید، ۴- هیدروکسی‌میلین، زانتومگنین، ویومیلین، ویوزانتین، سیرکامداتین (A- G)، آسپرولوگزین‌ها و آسپرگامیدهاست (۲۸). اما تاکنون گزارشی مبنی بر فعالیت علف کشی در جنس *Aspergillus* و استفاده از آن ارایه نشده است. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند در معرفی این قارچ و متابولیت‌های تولیدی توسط آن به عنوان یک عامل زیستی کنترل کننده علف هرز جودره استفاده شود.

References

(1) Li Y., Sun Z., Zhuang X., Xu L., Chen S., Li M. Research progress on microbial herbicides. *Crop Protection* 2003; 22 (4): 247- 52.

(2) Zimdahl R. *Weed-Crop competition.* 2nd. ed. UK: Blackwell publishing Ltd Oxford; 2004.

www.SID.ir

Archive of SID

(3) Pimentel D., McLaughlin L., Zepp A., Lakitan B., Kraus T., Kleinman P., et al. Environmental and economic impacts of reducing U.S. agricultural pesticide use. In: Pimentel D., editor. Handbook of Pest Management in Agriculture. 2nd. ed. Florida, CN: CRC Press, Boca Raton; 1991. 679- 720.

(4) Blattner F. Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus Hordeum (Poaceae: Triticeae). *Breeding Science* 2009; 69 (5): 471- 80.

(5) Baghestani M., Saiedipor H., Minbashi M., Lashkari A. *Integrated management of H.spontanuem in wheat fields*.1st. ed. Tehran: Agricaltural ecology; 2009.

(6) Ellis R., Nevo E., Beiles A. Milling energy polymorphism in *Hordeum spontaneum* Koch in Israel and its potential utilization in breeding for malting quality. *Plant Breeding* 1993; 111 (6): 78- 81.

(7) Kennedy G., Sutton T. *Emerging Technologies for Integrated Pest Management: Concepts., Research and Implementation*. 1st. ed. Minnesota: The American phytopathological society; 2000.

(8) Watson AK. The classical approach with plant pathogens. In: TeBeest DO, editor. Microbial Control of Weeds. 1st. ed. New York, CN: Chapman and Hall;1991. 3- 23.

(9) Charudattan R., Dinoor A. Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. *Crop Protection* 2000; 19 (4- 9): 691- 5.

(10) Charudattan R. Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target. *Biological Control* 2005; 35 (5): 183- 96.

(11) Saxena S., Pandey A. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Application of Microbial Biotechnology* 2001; 55 (9): 395- 403.

(12) Holm L., Pancho J., Holm E., Pancho J., Herberger J. *The worst world weeds: Distribution and biology*. 1st. ed. Honolulu: University of Hawaii press; 1977.

(13) Hoagland R., Boyette C., Weaver M., Abbas H. Bioherbicides: research and risks. *Toxin Review* 2007; 26 (7): 313- 42

(14) Bewick T., Binning L., Stevenson W. Discovery of two fungal pathogens of swamp dodder (Cuscuta gronovii Willd). *Weed Science Society* 1986; 3 (5): 26- 7.

(15) Bewick TA., Binning LK., Stevenson WR., Stewart J. A mycoherbicide for control of swamp dodder (Cuscuta gronovii Willd.). In: Weber H., Forstreuter W., editor. Parasitic flowering plants. 2nd. ed. Marburg, CN: Federal and Republic; 1987. 93- 104.

(16) Sauer D., Burroughs R. Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology* 1986; 76 (5): 745- 9.

(17) Hamedi J., Papiran R., Moghimi H., Mohammadipanah F. Screening of phytotoxic activity and *nlp* genes from rhizosphere actinomycetes. *Annals of Microbiology* 2014; 3 (9): 1- 6.

(18) Wapshere A. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals Application of Biology* 1974; 77 (3): 201- 11.

(19) Sambrook J., David W., Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

(20) Hassanshahian M., Emtiazi G., Cappello S., Isolation and characterization of crude-oil- degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine. Pollution. Bulletin* 2012; 64 (1); 7- 12.

(21) Watanabe T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi*: *Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. 3rd. ed. NewYork: Taylor and Francis; 2011.

(22) Zand A., Baghestani M., Bitarafan M., Shimi P. *Iranian rigistrated herbicides guideline*. 1st. ed. Mashhad: Jahad daneshgahi; 2007.

www.SID.ir

Archive of SID

(23) Moyer J., Hamman W. Factors affecting the toxicity of MON 37500 residues to following crops. *Weed Technology* 2001; 15 (2): 42- 7.

(24) Amsellem Z., Cohen B., Gressel J. Engineering hypervirulencein a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. *Natural Biotechnology* 2002; 20 (4): 1035- 9.

(25) Jůzlová P., Martínková L., Křen V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: A review. Journal of Industrial Microbiology. 1996; 16 (3): 163- 70.

(26) Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J., Van Dijck P. On the safety of *Aspergillus niger* a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 59 (4): 2650- 2.

(27) Abarca M., Bragulat M., Castellá G., Cabañes F. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger*. *Applied Environmental Microbiology* 1994; 60 (7): 2650- 2.

(28) Frisvad JC., Frank JM., Houbraken JAMP, Angelina F.A. Kuijpers AFA, Samson RA. New ochratoxin A producing of *Aspergillus* section Circumduction. *Studies in Mycology* 2004; 50 (6): 23- 43.

(29) Kazemzadeh S., Farrokhi N., Aminzadeh S., Alavi SM., Mamarabadi M., Gudarzi T. Biocontrol of Causative Agent of Citrus Canker Disease Using Antimicrobial Substances Produced by *Aspergillus awamori* K-03. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3 (11): 91- 8.

[1]- Bewick
[2]- Potato Dextrose Agar
[3]- Potato Dextrose Broth
[4]- Murashinge and Skoog Agar
[5]- Amplicon
[6]- Gene all, South Korea
[7]- Shapiro- wilk test
[8]- T-test
[9]- Accession Number
[10]- *Eremopyrum bonaepartis*
[11]- *Convolvulus arvensis*
[12]- Poaceae
[13]- *Cucurbita moschata*
[14]- Sulfosulfuron
[15]- Metsulfuron methyl + Sulfosulfuron
[16]- Kazemzadeh

www.SID.ir

Archive of SID

Biological control of *Hordeum spontanum* by fermentation broth of *Aspergillus westerdijkiae* UTMC 5040

Javad Hamedi *
Associate professor of microbiology, Microbial technology and Products research center, University of Tehran, Iran, jhamedi@ut.ac.ir
Hamid Cheraghian Radi
M.Sc. of microbiology, Microbial technology and Products research center, University of Tehran, Iran, h.cheraghian@alumni.ut.ac.ir
Hamid Moghimi
Assistant professor of microbiology, Microbial technology and Products research center, University of Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: *Hordeum spontanum* is one of the most important crop weeds, especially for wheat. The aim of this study was screening of phytopathogenic fungi for biocontrol of *H. spontanum.*

Materials and methods: Firstly, 150 fungal isolates were obtained from different soil sources of Iran. The isolates were subjected under primary and secondary screening on the sunflower and *H. spontanum* leaves. In these steps, 200 µl of centrifuged fermentation broth of cultivated fungi in PDB medium was sprayed on the leaves of sunflower and *H. spontanum.* Also, the ability of selected isolates to induce disease and necrosis on *H. spontanum* leaves in pot, preventing seed germination and root growth repression were studied. Finally, the host range of selected isolate was investigated.

Results: The results of primary and secondary screening showed that *Aspergillus westerdijkiae* UTMC 5040 produced the highest lesion halo on *H. spontanum* leaves. In pot test, treatment with 1.5 ml of fermentation broth produced huge necrosis on mature *H. spontanum* plant after 3 weeks. *H. spontanum* seed germination decreased from 90 to 25% and root emersion decreased from 60 to 35 mm 10 days after treatment by the fermentation broth. Host range study revealed that among 25 different plant strains, *A. westerdijkiae* UTMC 5040 caused disease on *H. spontanum*, *Eremopyrum bonaepartis* and *Convolvulus arvensis* leaves.

Discussion and conclusion: This study was the first report of biological control of *H. spontanum* with fermentation broth of *A.westerdijkiae* UTMC 5040. The obtained results can be useful to finding a new fungal bio-herbicide.

Key words: *Hordeum spontanum*, Phytopathogenic fungi, Biological control, *Aspergillus westerdijkiae* UTMC 5040

* Corresponding author
Received: October 7, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014

www.SID.ir