نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳ ص: ۲۱۳-۲۰۵

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 2, No. 3, Fall 2014, P. 213-205

شناسایی برخی از قارچ‌های عامل پوسیدگی بنه زعفران و کنترل آن‌ها

آیت‌اله سعیدی زاده[1*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۳۰

چکیده

جهت شناسایی عوامل قارچی پوسیدگی بنه زعفران و کنترل آن‌ها، از مزارع و محل‌های نگهداری بنه، واقع در بشرویه از توابع استان خراسان جنوبی، نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از کشت بافت‌های آلوده، گونه‌های قارچی *Penicillium digitatum*، *Aspergillus niger* و *Rhizopus stolonifer* جداسازی و شناسایی گردید. جهت کنترل این بیمارگرها از چهار غلظت از سوسپانسیون باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHAO، قارچ *Trichoderma harzianum* Bi و قارچ‌کش‌های اکسی‌کلرورمس و بنومیل در چهار تکرار استفاده شد. بر اساس میزان قطر پرگنه رشد یافته از بیمارگر و مقایسه با شاهد، میزان اثر کنترلی عوامل کنترل زیستی و ترکیبات شیمیایی اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که بیشترین میزان کنترل در مورد قارچ همستیز، مربوط به غلظت‌های ۱×۱۰^{۷} و ۱×۱۰^{۸} و در مورد باکتری همستیز به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱×۱۰^{۹} و ۱×۱۰^{۱۰} بوده است. در مورد ترکیبات شیمیایی به‌کار رفته بیشترین میزان اثر کنترلی در مورد بنومیل و اکسی‌کلرورمس به‌ترتیب در غلظت‌های ۳×۱۰^{-۳} و ۴×۱۰^{-۳} به‌دست آمد. در مقایسه کلی تیمارها، قارچ *T. harzianum* بیشترین اثر را در کاهش رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر داشت.

کلمات کلیدی: کنترل زیستی، قارچ‌های همستیز، زعفران، خراسان جنوبی.

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. متعلق به تیره زنبق (Iridaceae) و یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در ایران است که از ارزش دارویی و اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است (Forakinejad, 2008). همانند دیگر محصولات کشاورزی، کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز در مورد زعفران نیز اجتناب‌ناپذیر است. با این وجود زعفران از جمله گیاهانی است که مورد حمله و آسیب تعداد اندکی از بیمارگرها قرار گرفته است (Moazami Goudarzi, 2008).

انواع مختلفی از قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدها به‌عنوان عوامل بیماری‌های پس از برداشت[2] روی انواع میوه‌ها، سبزیجات، غلات و اندام‌های تکثیری گیاهان فعال می‌باشند (Dennis, 1983). کمبود قارچ‌کش مناسب، تمایل به خرید محصولات سم‌نخورده و محدودیت‌های استفاده از قارچ‌کش‌ها روی میوه و سبزی موجب افزایش خسارت بیماری‌های پس از برداشت شده است. از این‌رو استفاده از روش‌های غیر شیمیایی جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت مورد توجه محققین قرار گرفته است (Coursey & Booth, 1972).

در سال‌های اخیر، کنترل زیستی عوامل پوسیدگی در مورد محصولات مهم و اقتصادی مورد توجه محققین قرار گرفته است. تحقیقات متعددی در مورد کنترل زیستی بیمارگرهای انگور (Dubos et al., 1982; Dubos, 1984)، توت‌فرنگی (Tronsmo & Raa, 1977)، آناناس (Lim & Rohrbach, 1980)، هسته‌داران (Pusey & Wilson, 1984)، سیب (Janisiewicz, 1987) و سایر محصولات (Wilson et al., 1987) انجام گرفته است. آلودگی میوه

۱- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: ayatsaeed314@gmail.com)

2- Post-harvest diseases

Archive of SID

www.SID.ir

سیب به *Botrytis cinerea* و *Penicillium expansum* با استفاده از دو عامل بیوکنترل (قارچ *Acremonium breve* و باکتری *Pseudomonas* sp.) کنترل شده است (Janisiewicz, 1988).

در ایران تحقیق و گزارش مشخصی در مورد کنترل قارچ‌های مولد پوسیدگی بنه زعفران مشاهده نشده است. با این‌حال تحقیقات متعددی در این زمینه در هند (Shah & Srivastava, 1984; Thakur et al., 1992; Sud et al., 1999; Kalha et al., 2007) و چین (Yuan et al., 2000) انجام گرفته است که در اغلب موارد از روش‌های شیمیایی جهت کنترل پوسیدگی بنه زعفران استفاده شده است.

با توجه به اهمیت و ارزش محصول زعفران و از آن‌جایی که کشت بنه‌های سالم و عاری از بیماری در رشد سریع‌تر و محصول‌دهی این گیاه تأثیر به‌سزایی دارند، در این تحقیق با بررسی بنه‌های به‌دست‌آمده از مزارع و انبارها، به جداسازی و شناسایی عوامل پوسیدگی بنه زعفران مبادرت شده است. پس از شناسایی عوامل پوسیدگی بنه، جهت کنترل آن‌ها از روش‌های زیستی (استفاده از قارچ *Trichoderma harzianum* Bi و باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHAO به‌عنوان دو مورد از مهم‌ترین عوامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهان) و شیمیایی (استفاده از اکسی‌کلرورمس و بنومیل به‌عنوان دو مورد از مهم‌ترین سموم تماسی و سیستمیک) استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ‌های عامل پوسیدگی بنه

نمونه‌برداری جهت جداسازی عوامل پوسیدگی قارچی بنه زعفران از سه مزرعه به مساحت‌های ۱، ۰/۴ و ۰/۳ هکتار و دو محل نگه‌داری خانگی بنه در حومه غربی (منطقه قنات) شهر بشرویه واقع در استان خراسان جنوبی در آذرماه ۱۳۸۸ انجام گرفت. نحوه کشت در مزارع موردنظر به‌صورت ردیفی بوده و بوته‌های زعفران به‌طور کپه‌ای یا گلوله‌ای به تعداد ۵-۴ عدد در کنار یک‌دیگر کشت شده بود. فاصله کپه‌های کشت ۳۰-۲۵ سانتی‌متر بود. بنه‌های دارای پوسیدگی، تغییر رنگ و هرگونه عوارض غیرطبیعی از بنه‌های سالم تفکیک‌شده و به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شاهد منتقل گردید. پس از سترون‌کردن سطح بنه با محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد تجاری موجود در بازار به مدت یک دقیقه و آبشویی آن‌ها توسط آب مقطر سترون، با کمک اسکالپل سترون در حد فاصل بخش سالم و بیمار، از بنه قطعات کوچکی به قطر حدوداً یک سانتی‌متر برداشته شد. این قطعات به تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار[1] منتقل‌شده و در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

پس از شکل‌گیری پرگنه‌ها، جهت شناسایی بهتر قارچ‌ها، خالص‌سازی و تک اسپور کردن پرگنه‌ها در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار صورت گرفت. از پرگنه‌های قارچی اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. با به‌کارگیری میکروسکوپ مجهز به لوله ترسیم و با استفاده از مشخصات ریخت‌شناختی و مورفومتریک شناسایی قارچ‌ها بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر (Schipper, 1984; Van Tieghem, 1867; Frisvad & Samson, 2004) صورت گرفت.

برای جداسازی، کشت و نگهداری و مطالعات آزمایشگاهی قارچ‌های *Penicillium* spp و *Aspergillus* spp. می‌توان از محیط‌های زاپک داکس آگار[2]، عصاره مالت آگار[3]، سیب‌زمینی دکستروز آگار[4]، عصاره مخمر سوکروز آگار[5]، مخمر مالت آگار[6]، آگار هرولد[7] و آگار سابورود[8] استفاده کرد (Zain et al., 2009). قارچ‌های موردنظر روی روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار از سرعت رشد مطلوبی برخوردارند. از این‌رو، در تحقیق حاضر از این محیط جهت جداسازی و آزمون کنترل استفاده شد.

آزمون بیماری‌زایی

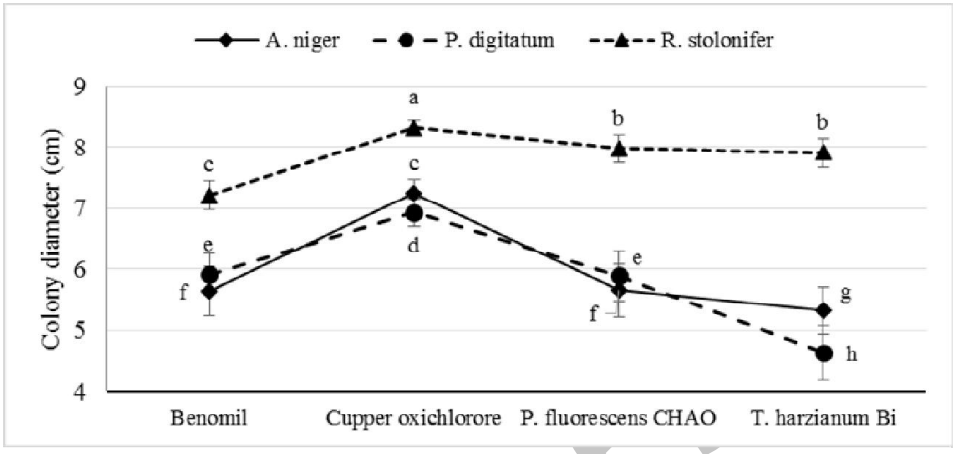
برای اثبات بیماری‌زایی قارچ‌های به‌دست آمده از بنه‌های زعفران، از اسپری سوسپانسیون اسپور قارچ‌ها روی بنه‌های سالم استفاده شد. مایه تلقیح در این مورد شامل سوسپانسیون اسپور به غلظت 1×10^{6} عدد در هر میلی‌لیتر بود. در این آزمایش پنج بنه سالم با رنگ طبیعی انتخاب‌شده و سطح آن‌ها با هیپوکلریت سدیم پنج درصد به مدت سه دقیقه سترون شده و سپس با آب مقطر آب‌شویی شد. به میزان یک

1- Potato dextroseagar
2- CzapekDox Agar
3- Malt Extract Agar
4- Potato Dextrose Agar
5- Yeast Extract Sucrose Agar
6- Yeast Malt Agar
7- Harrold's Agar
8 - Sabouraud agar

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور روی هر بنه اسپری گردید. برای بنه-های شاهد همین میزان آب مقطر سترون اسپری شد. هر بنه در یک ویال سترون قرار گرفت. ویال‌ها در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۱۰-۷ روز قسمت‌هایی از بنه‌ها که علائم بیماری را نشان می‌دادند، انتخاب و در محیط پی‌دی‌ا کشت گردید. پتری‌ها به مدت ۵-۴ روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. پس از این مدت از کلنی‌های ایجادشده اسلاید تهیه شد و مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت.



شکل ۱- مقایسه اثر ترکیبات قارچ کش و عوامل بیوکنترل روی میزان قطر کلنی هر یک از قارچ های مولد پوسیدگی بنه
Figure 1- Comparison of the effect of fungicides and biocontrol agents on the colony diameter of each corm rot fungi.

تیمار کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر

ابتدا مایه بیمارگر قارچ و باکتری همستیز تهیه شد. برای تهیه مایه قارچ *T. harzianum* Bi، قطعه‌ای از پرگنه قارچ موردنظر (موجود در کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه شاهد) روی تشتک پتری حاوی محیط کشت پی‌دی‌ا تکثیر شد. تحت شرایط سترون به هر پتری حاوی پرگنه ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. توسط یک میله شیشه‌ای سر کج سترون و حرکت آرام آن روی سطح پرگنه، اسپورها از پرگنه جدا شده و سوسپانسیونی از آن شکل گرفت. سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ دو لایه سترون عبور داده شد. جهت شمارش اسپورها و تعیین غلظت آن‌ها در سوسپانسیون از اسلاید گلبول شمار (هماسیتومتر) استفاده شد. چهار غلظت (۱×۱۰^{۵}، ۱×۱۰^{۶}، ۱×۱۰^{۷} و ۱×۱۰^{۸}) مورد نیاز از سوسپانسیون اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد (Schnathorst & Mathre,1966; Rowe et al., 2000).

جهت تهیه سوسپانسیون مایه باکتری *P. fluorescens* CHAO از روش ولر و کوک (Weller & Cook, 1983) استفاده شد. برای این کار یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته باکتری از محیط کینگ بی (King B) به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع کینگ بی منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شده و ۳-۲ مرتبه با محلول نمک فیزیولوژیک (۰/۱۴ مول NaCl) برای برطرف شدن باقیمانده محیط شستشو گردید. در این آزمایش چهار غلظت (۱×۱۰^{۷}، ۱×۱۰^{۸}، ۱×۱۰^{۹} و ۱×۱۰^{۱۰} سلول در میلی‌لیتر (cfu/ml)) از باکتری همستیز در نظر گرفته شد. با استفاده از منحنی استاندارد با روش اسپکتروفتومتری در محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز غلظت‌های مورد نظر تهیه شد (Weller & Cook, 1983).

جهت مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ و باکتری همستیز بر میزان رشد پرگنه قارچ‌های مولد پوسیدگی، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت. ابتدا یک پرگنه به قطر یک سانتی‌متر از قارچ بیمارگر در وسط پتری به قطر ۹ سانتی‌متر حاوی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از هر غلظت سوسپانسیون عامل همستیز به‌طور جداگانه با استفاده از یک پیپت سترون به‌صورت یک حلقه به قطر هشت سانتی‌متر در حاشیه محیط موجود در پتری قرار گرفت. نمونه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

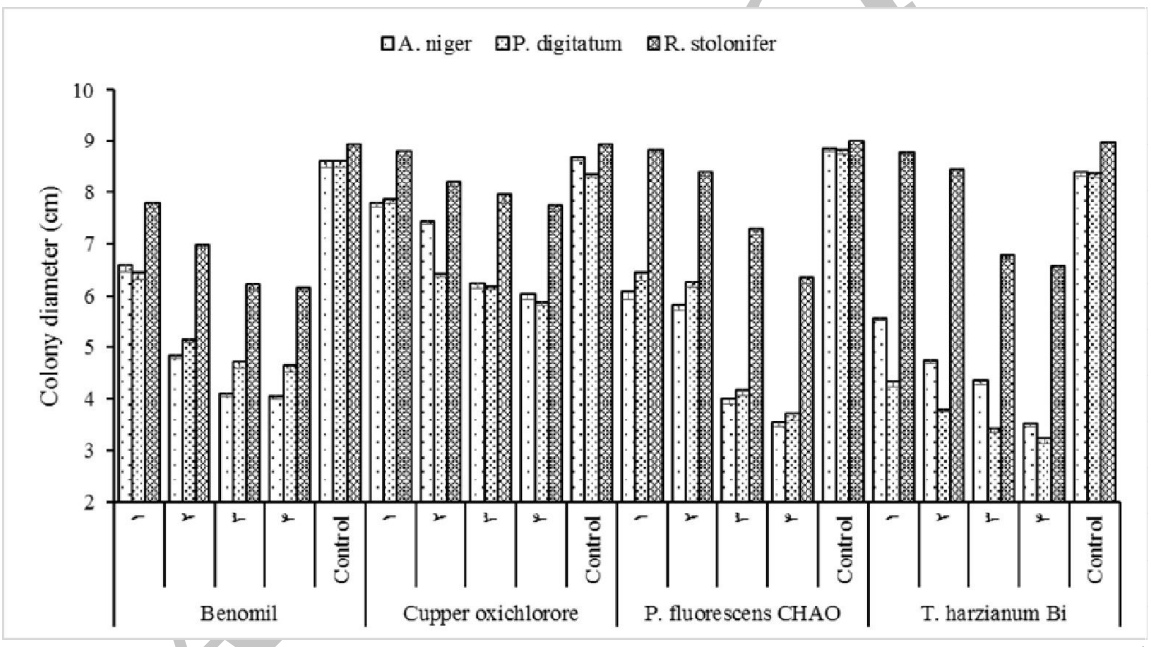
شاهد با یک میلی‌لیترآب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. پتری‌ها در انکوباتور به دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. با بازدید روزانه پتری‌ها، پس از پر شدن تشتک‌های پتری شاهد توسط پرگنه قارچ-های بیمارگر آزمایش متوقف گردید. میزان قطر پرگنه شکل گرفته از قارچ بیمارگر در هر پتری اندازه‌گیری شد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 8.0 آنالیز گردید (SAS, 1999; Maleki Ziyarati et al., 2009).

تیمار شیمیایی قارچ‌های بیمارگر

برای هریک از قارچ‌های بیمارگر به‌دست آمده از بنه زعفران تیمارهایی شامل چهار غلظت (۱×۱۰^{-۳}، ۲×۱۰^{-۳}، ۳×۱۰^{-۳} و ۴×۱۰^{-۳}) (۱، ۲، ۳ و ۴ در هزار) از قارچ‌کش بنومیل و اکسی‌کلرورمس با چهار تکرار منظور شد. پس از طی دوره انکوباسیون میزان پرگنه هر تکرار و تیمار با نمونه‌های شاهد مقایسه شده و داده‌های به‌دست آمده بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از برنامه آماری SAS 8.0 با یکدیگر مقایسه گردید (SAS, 1999).

نتایج وبحث

تعداد قارچ‌های به‌دست آمده از بنه‌های آلوده شامل سه گونه قارچی *Penicillium digitatum*، *Aspergillus niger* و *Rhizopus stolonifer* بود. در گونه *P. digitatum* کنیدیفورها به‌صورت پایه‌هایی کشیده، ساده تا منشعب و شفاف می‌باشند.



شکل ۲- مقایسه اثر غلظت های مختلف ترکیبات قارچ کش و عوامل بیوکنترل روی میزان قطر کلنی هر یک از قارچ های مولد پوسیدگی بنه

Figure 2- Comparison of the effect of different concentrations of fungicides and biocontrol agents on the colony diameter of each corm rot fungi.

۱-٤: غلظت های ترکیبات قارچ کش و عوامل بیوکنترل. بنومیل (۱: ۱×۱۰^{-۳}، ۲: ۲×۱۰^{-۳}، ۳: ۳×۱۰^{-۳} و ٤: ٤×۱۰^{-۳} گرم در لیتر)، اکسی کلرور مس (۱: ۱×۱۰^{-۳}، ۲: ۲×۱۰^{-۳}، ۳: ۳×۱۰^{-۳} و ٤: ٤×۱۰^{-۳} گرم در لیتر)، باکتری *P. fluorescens* CHAO (۱: ۱×۱۰^{۷}، ۲: ۱×۱۰^{۸}، ۳: ۱×۱۰^{۹} و ٤: ۱×۱۰^{۱۰} سلول در میلی لیتر) و قارچ *T. harzianum* Bi (۱: ۱×۱۰^{۵}، ۲: ۱×۱۰^{۶}، ۳: ۱×۱۰^{۷} و ٤: ۱×۱۰^{۸} اسپور در میلی لیتر).

1-4: Concentrations of fungicides and biocontrol agents. Benomil (1: 1×10^{-3}, 2: 2×10^{-3}, 3: 3×10^{-3} and 4: 4×10^{-3} g/l), Cupper oxichlorore (1: 1×10^{-3}, 2: 2×10^{-3}, 3: 3×10^{-3} and 4: 4×10^{-3} g/l), *P. fluorescens* CHAO (1: 1×10^{7}, 2: 1×10^{8}, 3: 1×10^{9} and 4: 1×10^{10} CFU ml $^{-1}$) and *Trichoderma harzianum* Bi (1: 1×10^{5}, 2: 1×10^{6}, 3: 1×10^{7} and 4: 1×10^{8} spore ml $^{-1}$).

در روی انشعابات کنیدیفور لایه‌ای از فیالید قرار دارد. کنیدوم‌ها کم‌وبیش بیضوی تا استوانه‌ای،تک‌سلولی و شفاف به ابعاد ۹-۶ × ۶- ۲/۸ میکرومتر روی فیالید به‌صورت زنجیره‌ای از تیپ بن سو مشاهده می‌شوند. پرگنه این گونه به رنگ سبز روشن است. قطر پرگنه در

www.SID.ir

محیط‌های کشت شناسایی این قارچ هفت سانتیمتر بوده است (Frisvad & Samson, 2004).

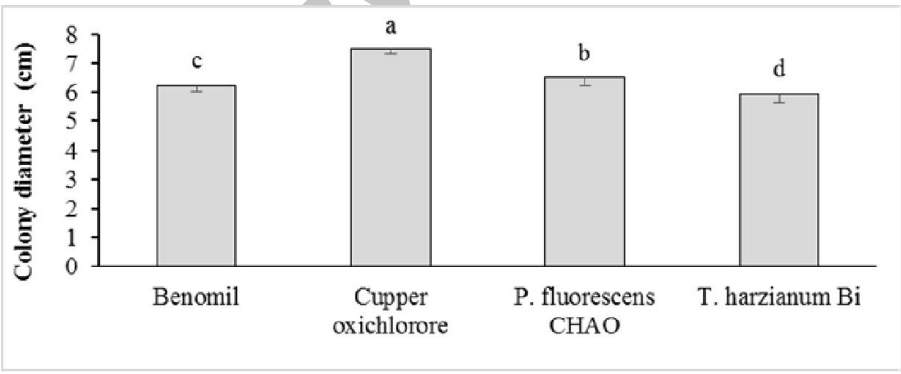
در گونه *A. niger* کنیدیفورها به‌صورت پایه‌هایی کشیده و ایستاده، نسبتاً بلند، ساده و شفاف، حداکثر دارای سه میلی‌متر طول و ۲۰-۱۵ میکرومتر ضخامت می‌باشند. فیالیدها بطری شکل به ابعاد ۱۰-۷ × ۳/۵-۳ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها کم‌وبیش کروی، تک‌سلولی و شفاف به قطر ۵-۳ میکرومتر بوده که به‌صورت زنجیری روی فیالید ایجاد می‌شوند. پرگنه قارچ *A. niger* به رنگ سیاه است. قطر پرگنه در محیط‌های کشت شناسایی این قارچ هفت سانتی‌متر بوده است (Van Tiegh, 1867).

در گونه *R. stolonifer* رشته‌های هیف شفاف تا خاکستری کم-رنگ و بدون دیواره عرضی (Aseptate)هستند. اسپورانژیفورها غالباً به‌صورت دوتایی در کنار هم شکل می‌گیرند. اسپورانژیوسپورها تک‌سلولی، تقریباً کروی و بی‌رنگ و به ابعاد ۴-۳ میکرومتر می‌باشند. پرگنه این قارچ، باز و تارعنکبوتی است. قطر پرگنه در محیط‌های کشت شناسایی این قارچ نه سانتی‌متر بوده است (Schipper, 1984). قارچ‌های مذکور در طی آزمون بیماری‌زایی نیز از بنه‌ها جداسازی و شناسایی گردید.

نتایج حاصل از مایه‌کوبی قارچ *T. harzianum* Bi روی پرگنه *P. digitatum*، *A. niger* و *R. stolonifer* نشان داد که قارچ همستیز در غلظت‌های مختلف موجب کاهش رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر شده است. این اثر در مورد قارچ‌های *P. digitatum* و *A. niger* مشهودتر است. بیش‌ترین اثر آنتاگونیستی *T. harzianum* Bi در غلظت ۱×۱۰^{۸} به‌ویژه در مورد قارچ‌های *P. digitatum* و *A. niger* به‌دست آمده است. از نتایج به‌دست آمده از مایه‌کوبی باکتری *P. fluorescens* CHAO روی پرگنه‌های قارچ‌های مولد پوسیدگی چنین برمی‌آید که باکتری همستیز در غلظت‌های مختلف به‌ویژه در غلظت ۱×۱۰^{۱۰} موجب کاهش رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر شده است (شکل ۱، ۲و ۳).

تیمار پرگنه قارچ‌های بیمارگر با قارچ‌کش بنومیل در غلظت‌های مختلف موجب کاهش رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر شده است. این اثر در مورد قارچ‌های *P. digitatum* و *A. niger* مشهودتر است. بیش-ترین اثر قارچ‌کشی بنومیل مربوط به غلظت ۴×۱۰^{-۳} بوده است. این شرایط در مورد اکسی‌کلرورمس نیز صادق است.

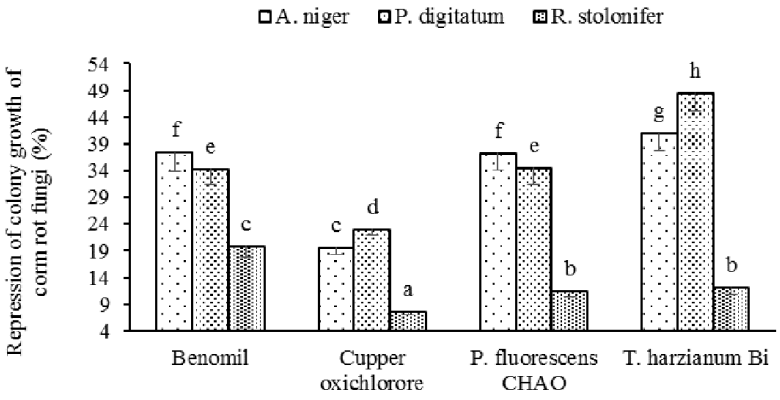
در مقایسه کلی تیمارهای شیمیایی و کنترل زیستی، قارچ *T. harzianum* Bi بیش‌ترین اثر را در کاهش رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر داشته است (شکل ۱، ۲و ۳).



شکل ۳- مقایسه اثر ترکیبات قارچ کش و عوامل بیوکنترل روی میزان قطر کلنی مجموعه قارچ های مولد پوسیدگی بنه
Figure 3- Comparison of the effect of fungicides and biocontrol agents on the colony diameter of corm rot fungi.

تفاوت بین تیمارهای اعمال‌شده نشان داد که تیمارهای مربوط به *T. harzianum* Bi، بنومیل، CHAO *P. fluorescens* و اکسی-کلرورمس به ترتیب بیش‌ترین تا کم‌ترین میزان بازدارندگی را در رشد کلنی قارچ‌های بیمارگر داشته‌اند. کم‌ترین کلنی بیمارگر در تیمارهای مربوط به *T. harzianum* Bi در غلظت ۱×۱۰^{۸}، *P. fluorescens* CHAO در غلظت ۱×۱۰^{۱۰}، بنومیل در غلظت ۳×۱۰^{-۳} و اکسی‌کلرور مس در غلظت ۳×۱۰^{-۳} بوده است (شکل ۲). کم‌ترین و بیش‌ترین اثر بازدارندگی به‌ترتیب در مورد قارچ‌های *R. stolonifer* و *A. niger* به‌دست آمده است.

www.SID.ir



شکل ٤- مقایسه اثر بازدارندگی ترکیبات قارچ کش و عوامل بیوکنترل بر میزان رشد قارچ های مولد پوسیدگی بنه

Figure 4- Comparison of the repression effect of fungicides and biocontrol agents on the colony diameter of corm rot fungi.

در میان عوامل شیمیایی و بیوکنترلی به‌کار رفته در آزمون بیشترین اثر بازدارندگی از رشد بیمارگرهای قارچی مربوط به قارچ *T. harzianum*Bi در مورد قارچ *P. digitatum* بوده است (شکل ۴ و ۵). در سال‌های اخیر، کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی خصوصاً عوامل پوسیدگی میوه و دیگر اندام‌های ذخیره‌ای گیاه توسط همستیزها به‌عنوان یک روش مناسب در کنار دیگر روش‌ها و در مواردی نیز به‌عنوان جایگزینی مطلوب برای روش شیمیایی موردتوجه بسیار قرار گرفته است (White et al., 1999).

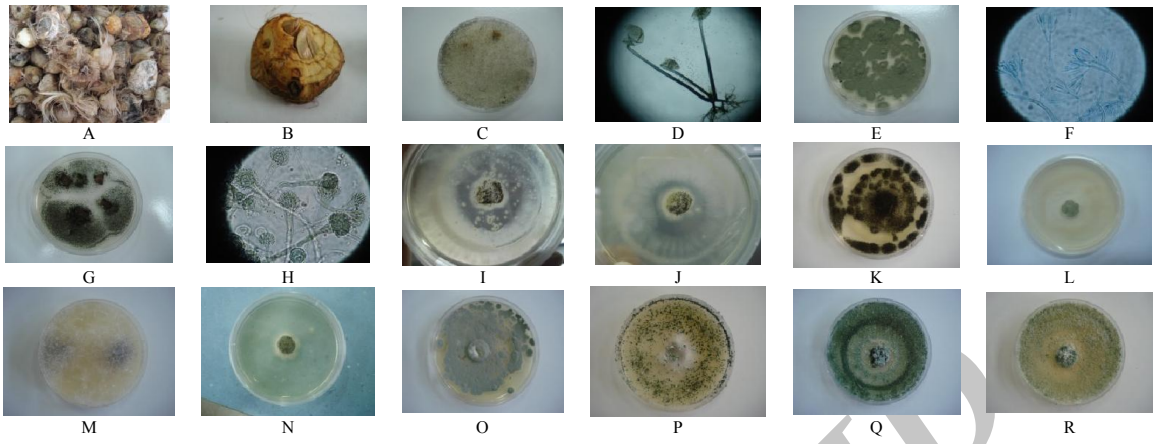
کنترل زیستی بیماری‌های پس از برداشت مدنظر بسیاری از محققین بوده است (Tronsmo & Raa, 1977; Lim & Rohrbach, 1980; Dubos et al., 1982; Tronsmo, 1983; Dubos, 1984; Janisiewicz, 1987; Wilson et al., 1987). پوسیدگی بنه زعفران در برخی مناطق جهان مورد توجه محققین بوده است. تاکور و همکاران (Thakur et al., 1992) با مطالعه مزارع زعفران موجود در منطقه بروار-کیشوار (Bervar-Kishwar) قارچ *Macrophomina phaseolina* به‌عنوان عامل پوسیدگی بنه و پژمردگی بوته‌های زعفران معرفی کرده‌اند.

در مورد زعفران در اغلب تحقیقات کنترل پوسیدگی بنه به‌صورت شیمیایی و با استفاده از ترکیبات قارچ‌کش انجام گرفته است. در ایتالیا *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* به‌عنوان عامل پوسیدگی بنه زعفران معرفی شده است (Primo & Cappelli, 2000). جهت کنترل این بیمارگر قبل از کشت،بنه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول دو در هزار دیفولتان (کاپتافول ۸۰ درصد)، باویستین (کاربندازیم) و بنلات (بنومیل) تیمار شده‌اند که در پی آن پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران به میزان معنی‌داری کاهش یافته است (Shah & Srivastava, 1984). در این آزمایش از غلظت‌های مختلف بنومیل برای کنترل قارچ‌های *A. niger*، *P. digitatum* و *R. stolonifer* استفاده شد. این ترکیب سیستمیک در مقایسه با اکسی‌کلرورمس در کاهش رشد کلنی قارچ‌های مذکور تأثیر بیشتری داشت. اثر بازدارندگی بنومیل روی *A. niger* بیش از سایر قارچ‌های مورد آزمایش بود.

از مقایسه نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر با گزارش‌های دیگر محققین چنین برمی‌آید که در اغلب موارد قارچ‌های مرتبط با خاک به‌ویژه گونه‌های متعلق به جنس‌های *Rhizopus*، *Penicillium*، *Aspergillus*، *Rhizoctonia* و *Fusarium* در پوسیدگی بنه زعفران نقش مؤثری دارند. با این وجود برخی محققین قارچ *Sclerotium rolfsii* را عامل پوسیدگی بنه زعفران در مناطقی از هند (کیشوار و کشمیر) معرفی کرده‌اند (Kalha et al., 2007). در کشمیر هند مزارع وسیعی از زعفران وجود دارد که توسط برخی از گونه‌های متعلق به قارچ‌های *Fusarium*، *Penicillium* و *Rhizoctonia* دچار پوسیدگی ریشه و بنه می‌شوند (Hassan & Devi, 2003). نشانه‌های اولیه بیماری در زمان گلدهی (ماه‌های اکتبر و نوامبر) مشاهده شده است. این نشانه‌ها به‌صورت زردی و پژمردگی جوانه‌ها و پوسیدگی ابتدای ساقه و نیز تشکیل لکه‌های سفیدرنگ روی بنه‌ها بروز می‌کند. نهایتاً پودر سیاه‌رنگی از بافت‌های پوسیده و پرگنه قارچ‌های بیمارگر در ناحیه تحتانی بنه‌ها مشاهده می‌شود (Hassan & Devi, 2003).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- بنه های دارای علایم بیماری، قارچ های جدا شده از بنه ها و برخی تیمارهای دارای عوامل قارچی و باکتریایی همستیز و ترکیبات قارچ کش

Figure 5- The corms with symptoms, fungi isolated from the corms, and some treatments of fungal and bacterial biocotrol agents and fungicides.

A،B: بنه های دارای علایم بیماری؛ C،D: مشخصات پرگنه و اسپورانژ قارچ *R. stolonifer* ؛ E،F: مشخصات پرگنه و کیندیفور قارچ *P. digitatum* ؛ G،H: مشخصات پرگنه و کیندیفور قارچ *A. niger* ؛ I: اثر باکتری *P. fluorescens* CHAO با غلظت 1×10^{10} cfu/ml روی قارچ *A. niger* ؛ J: اثر باکتری *P. fluorescens* CHAO با غلظت 1×10^{9} cfu/ml روی قارچ *P. digitatum* ؛ K: اثر باکتری *P. fluorescens* CHAO با غلظت 1×10^{7} cfu/ml روی قارچ *A. niger* ؛ L: اثر بنومیل با غلظت 1×10^{-3} روی قارچ *P. digitatum* ؛ M: اثر بنومیل با غلظت 2×10^{-3} روی قارچ *R.stolonifer* ؛ N: اثر بنومیل با غلظت 4×10^{-3} روی قارچ *P. digitatum* ؛ O: اثر اکسی کلرور مس با غلظت 2×10^{-3} روی قارچ *P. digitatum* ؛ P: اثر قارچ Bi *T. harzianum* با غلظت 1×10^{8} spore/ml روی قارچ *R.stolonifer* ؛ Q: اثر قارچ Bi *T. harzianum* با غلظت 1×10^{8} spore/ml روی قارچ *A. niger* ؛ R: اثر قارچ Bi *T. harzianum* با غلظت 1×10^{8} spore/ml روی قارچ *P. digitatum*

A,B: The corms with symptoms ; C,D: Colony and sporangium of *R. stolonifer* ; E,F: Colony and conidiophore of *P. digitatum* ; G,H: Colony and conidiophore of *A. niger* ; I: The effect of *P. fluorescens* CHAO (1×10^{10} CFU ml $^{-1}$) on *A. niger* ; J: The effect of *P. fluorescens* CHAO (1×10^{9} CFU ml $^{-1}$) on *P. digitatum* ; K: The effect of *P. fluorescens* CHAO (1×10^{7} CFU ml $^{-1}$) on *A. niger* ; L: The effect of benomil (1×10^{-3}) on *P. digitatum* ; M: The effect of benomil (2×10^{-3}) on *R.stolonifer* ; N: The effect of benomil (4×10^{-3}) on *P. digitatum* ; O: The effect of Cupper oxichlorore (2×10^{-3}) on *P. digitatum* ; P: The effect of *T. harzianum* Bi (1×10^{8} spore ml $^{-1}$) on *R. stolonifer* ; Q: The effect of *T.harzianum* Bi (1×10^{8} spore ml $^{-1}$) on *A. niger* ; R: The effect of *T. harzianum* Bi (1×10^{8} spore ml $^{-1}$) on *P.digitatum*.

برخی پژوهشگران هندی قارچ *Fusarium solani* را عامل مؤثر در کاهش زعفران برداشت‌شده در ایالت هیماچال پارادش (Himachal Paradesh) هند می‌دانند(Sud et al., 1999). این محققین شش نوع قارچ‌کش (Blitox [copper oxychloride]، Indofil M-45 [mancozeb]، Difolatan [captafol]، Foltaf [captafol] و Bavistin [carbendazim] و Tecto [thiabendazole]) را جهت تیمار بنه‌ها با غلظت دو در هزار به‌کار برده‌اند. در این میان تکتو (تیابندازول) بهترین اثر را در کنترل پوسیدگی بنه‌ها داشته است (Sud et al., 1999). در چین نیز در زمینه کنترل شیمیایی عوامل پوسیدگی بنه زعفران تحقیقاتی انجام شده است (Yuan et al., 2000). به‌هرحال، به‌کارگیری ترکیبات شیمیایی، متداول‌ترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی در اغلب کشورهای در حال توسعه است. بنومیل به‌عنوان یک ترکیب سیستمیک مؤثر بر قارچ‌های آسکومیست و اغلب قارچ‌های ناقص، در مقایسه با اکسی‌کلرور مس در آزمایش ما اثر بیشتری داشته است. اکسی‌کلرور مس بیشتر به‌عنوان یک ترکیب ضدامیست‌ها و باکتری‌ها شناخته شده است.

تجربه نشان داده است که غالباً عوامل بیوکنترل جایگزین مناسب و موفقی برای آفت‌کش‌ها نبوده‌اند و در برخی موارد نسبت به روش‌های زراعی متداول نیز از بازده اندکی برخوردار بوده‌اند. از ضعف‌های عوامل بیوکنترل نسبت به ترکیبات آفت‌کش می‌توان به فقدان دامنه وسیع فعالیت، تناقض در عمل تحت شرایط آزمایشگاه و مزرعه و کندی فعالیت و رشد تحت شرایط خاص اشاره نمود. از مشکلات اساسی کاربرد عوامل بیوکنترل در مزرعه، عدم موفقیت این عوامل در

Archive of SID

www.SID.ir

کنترل بیمارگرها علی‌رغم موفقیت نسبی آن‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی می‌باشد (Hebbar et al.,1998; Kerry, 1998). در این آزمون قارچ Bi *T. harzianum* و باکتری *P. fluorescens* CHAO در مقایسه با قارچ‌کش‌های بنومیل و اکسی‌کلرور مس اثر بازدارندگی مطلوبی بر رشد پرگنه عوامل پوسیدگی بنه بر جای گذاشتند؛ به‌طوری‌که نتایج نشان داد قارچ Bi *T. harzianum* در کاهش رشد پرگنه بیمارگرها بهتر از قارچ‌کش بنومیل و باکتری *P. fluorescens* CHAO بهتر از قارچ‌کش اکسی‌کلرورمس عمل کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

روش‌های غیرشیمیایی غالباً در مورد بیماری‌های پس از برداشت محصولاتی مانند میوه و سبزی توصیه می‌شود. در خصوص بنه‌های زعفران که مصرف خوراکی ندارند، می‌توان با استفاده از سموم به‌کار رفته در این آزمایش پوسیدگی بنه را تا حد قابل‌ملاحظه‌ای کنترل نمود. با توجه به نتایج به‌دست آمده و جهت اجتناب از اثرات نامطلوب مواد شیمیایی در طبیعت پیشنهاد می‌گردد بنه ها با سوسپانسیونی از قارچ و یا باکتری همستیز مورد بحث، تیمار گردند.

منابع

Coursey, D.G., and Booth, R.H. 1972. The post-harvest phytopathology of perishable tropical produce. Review of Plant Pathology 51: 751-765.

Dennis, C. 1983. Post-harvest pathology of fruits and vegetables. Academic Press, New York. Pp. 264.

Dubos, B. 1984. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine by antagonistic strain of *Trichoderma harzianum*. Pages 370-374 in: Current Perspectives in Microbial Ecology. M.J. Klub and C.A. Reedy, eds. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Dubos, B. Jailloux, F., and Bulit, J. 1982. Employing antagonistic properties of *Trichoderma* against *Botrytis cinerea* in the protection of vineyards against grey-mold. Phytoparasitica 10:134.

Forakinejad, Z. 2008. Saffron, red gold of Iran. Journal of Teaching Biology 22 (2): 62.

Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* sungenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology 49: 1-173.

Hassan, M. G., and Devi, L.S. 2003. Corm rot diseases of saffron in Kashmir valley. Indian Phytopathology 56 (1): 112.

Hebbar, K. P., Martel, M. H., and Heulin, T. 1998. Suppression of pre- and postemergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. European Journal of Plant Pathology 104: 29-36.

Janisiewicz, W.j. 1987. Biological control of postharvest diseases of pome fruits. (Abstr.). Phytopathology 75: 1301.

Janisiewicz, W.J. 1988. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. Phytopathology 78: 194-198.

Kalha, C. S., Gupta, V., Gupta, D., and Priya S. 2007. First report of sclerotial rot of saffron caused by *Sclerotium rolfsii* in India. Plant Diseases 91 (9): 1203-1203.

Kerry, B.R. 1998. Progress towards biological control strategies for plant-parasitic nematodes. The 1998 Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases 3:739-746.

Lim, T.K., and Rohrbach K.G. 1980. Role of *Penicillium funicoulosum* starins in the development of pineapple fruit diseases. Phtopathology 70: 663-665.

Maleki Ziyarati H., Roostaei A., Sahebani N., Etebarian H.R., and Aminian H. 2009. Study on biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood by fungus *Trichoderma harzianum* Rifai in tomato at greenhouse and quantitative changes in phenolic compounds in plant. Seed and Agronomy 25 (3): 274- 261.

Moazami Goudarzi, M. 2008. Red gold of Iran, from production to process. Journal of Livestock, agro-industry 103: 56.

Primo, P., and Cappelli, C. 2000. Preliminary characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* causing Fusarium corm rot of saffron in Italy. Plant Diseases 84 (7): 806-806.

Pusey, P.L., and Wilson, C.I. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillius subtilis*. Plant Diseases 68: 753-756.

Archive of SID

www.SID.ir

Rowe, R.C., Johnson, D.A., Beery, W.R., and Omer, M.A. 2000. Vegetative compatibility analysis of strains of *Verticillium dahliae* from potato seed tubers and plants from the western and eastern United States Pp 74-94 in: advances in verticillium research and disease management (E. Tjamas, R.C. Row, J.B. Heal and D. Fravel, eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

SAS Institute. 1999. SAS/Stat User's Guide, Version 8.0. SAS Institute, Cary, NC.

Schipper, M.A.A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rh.stolonifer*-group and *Rhizopusoryzae*. CBS Studies in Mycology 25:1-19.

Schnathorst, W.C., and Mathre D.E. 1966. Host rang and differentiation of a severe form of *Verticilliumalbo–atrum* in cotton. Phytopathology 56: 1155-1161.

Shah, A., and Srivastava K.K. 1984. Control of corm rot of saffron. Progressive Horticulture 16(1/2): 141-143.

Sud, A.K., Paul, Y.S., and Thakur B.R. 1999. Corm rot of saffron and its management. Journal of Mycology and Plant Pathology 29(3): 380-382.

Thakur, R.N., Singh, C., and Kaul B.L. 1992. First report of corm rot in *Crocus sativus*. Indian Phytopathology 45 (2): 278.

Tronsmo, A. 1983. *Trichoderma harzianum* used as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple. Colloq. INRA 18: 109-113.

Tronsmo, A., and Raa J. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology 89: 216-220.

Van Tieghem, P.E.L. 1867. *Aspergillus niger*. Annual of Science of National Botany 5 (8): 240.

Weller, D.M., and Cook R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 78: 463-469.

White, D., Knox, G., Killham, K., and Leifert C. 1999. The application of lux-gene technology in the control of soilborne diseases. 227-248.

Wilson, C.L., Franklin, J.D., and Pusey, P.L. 1987. Biological control of Rhizopus rot of peach with *Entrobacter cloacae*. Phytopathology 77: 303-305.

Yuan, K.K., Guang, X.Z., Sheng, C.Q., Chong, H.D., Jun, Z.L., and Zhong, C. 2000. Study on occurrence and chemical control of saffron corm rot in Shanghai suburbs. Acta Agriculturae Shanghai 16: 41-45.

Zain, M.E., Razak, A.A., El-Sheikh, H.H., Soliman, H.G., and Khalil, A.M. 2009. Influence of growth medium on diagnostic characters of *aspergillus* and *penicillium* species. African Journal of Microbiology Research 3 (5): 280-286.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of some saffron corm rot fungi and their control

Ayatollah Saeedizadeh[1]*

Received: 9 July, 2014 **Accepted:** 19 September, 2014

Abstract

In order to isolation and identification of causal agents of corm rot and their control, the sampling was done from corms in farms of Bushroueye, southern Khorasan province. After culturing of sections of infected corms, the fungi, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus niger*, and *Rhizopus stolonifer* were isolated and identified. For their control test, four concentrations of *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Trichoderma harzianum* Bi, and four concentrations of fungicides, cupper oxichlorore and benomil,were used with four replications. The control effect of antagonists and fungicides were determined by measurement of diameter of pathogens colony on medium. The results showed that the maximum of control of antagonistic fungus were obtained in concentrations of 1×10^{7} and 1×10^{8}, and in the case of antagonistic bacterium wereshown in concentrations of 1×10^{9} and 1×10^{10}. The fungicides had maximum control in concentrations of 3×10^{-3} and 4×10^{-3}. In general, among of the treatments, *T. harzianum*was most effective to reducing the growth of pathogenic fungi.

Keywords: Biocontrol, Antagonist, Saffron, Southern Khorasan.

Archive of SID

1- Assistant Professor of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University.
(*- Corresponding author Email: ayatsaeed314@gmail.com)

www.SID.ir