ضدعفونی خاک توسط بازامید گرانولیت علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه*

Soil sterilization by Basamid granulate to control Fusarium wilt of tomato under glasshouse conditions

جهانشیر امینی

دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان

دریافت ۸۵/۴/۳ پذیرش ۸۶/۸/۲

چکیده

در این تحقیق امکان کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی توسط ماده بازامید گرانولت (Dazomet 98%) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بازامید گرانولیت به صورت میکروگرانول در سه مقدار ۲۰۰، ۲۶۶ و ۳۳۳ گرم در مترمکعب به خاک گلدانها اضافه گردید و خواص قارچکشی آن علیه بیماری مذکور بررسی گردید. آزمایش با استفاده از نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج آزمایشات در آزمایشگاه و گلخانه بترتیب نشان داد که بازامید گرانولیت به مقدار۳۳۳ گرم در متر مکعب مانع از رشد کلنی قارچ روی محیط کشت شده و میتواند به طور کامل میسلیوم و کلامیدوسپور قارچ عامل بیماری را در خاک و بقایای گیاهی از بین ببرد. در نتیجه کاربرد این ماده در قیاس با متیل بروماید و سایر قارچکشهای دیگر بسیار ارزان و کم خطرتر است و بعنوان یک جایگزین خوب برای کنترل عوامل بیماریزای خاکزاد نظیر بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در گلخانه توصیه میشود.

واژه های کلیدی: گوجه فرنگی، بازامید گرانولیت، پژمردگی، فوزاریوم

*این مقاله بر اساس نتایج بدست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۴/۲۵۷۴۷ دانشگاه کردستان تهیه گردیده است

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بیماری پژمردگی گوجه فرنگی که عامل آن *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snydder & Hansen (Sacc.) است در مناطق گرم و در خاکهای اسیدی و شنی شایع است و خسارت قابل توجهی به محصول گوجه فرنگی در گلخانه و مزرعه وارد میکند (Westcott 1969).

از روشهای کنترل این بیماری در کنار روشهای زراعی، بیولوژیکی و فیزیکی، روشهای شیمیایی با استفاده از قارچکش‌های مثل Prochloraz و Carbendazim و تدخین خاک است (Weitang *et al.* 2004). قارچکش Azoxystrobin بیماری پژمردگی گوجه فرنگی و بادمجان را به مقدار قابل توجهی کاهش میدهد (Bubici *et al.* 2006). مصرف این قارچکشها به سبب مشکلات زیست محیطی، گیاه سوزی و ایجاد مقاومت در بیماری محدود شده است (Nusret Ozbay & Steven 2004). آفتابدهی خاک و استفاده از بخار آب هر کدام محدودیت‌های خاص خود را دارند، زیرا بخار آب نیز باعث تجمع مواد محلول در خاک میشود (Salles & *et al.* 2001, Bello & *et al.* 2001) . همچنین کاربرد متیل بروماید علیه عوامل بیماریزای خاکزاد سبب خسارت های محیطی شده و مصرف آن محدود شده است (Akkopru & Demir 2005) و نیاز به مواد تدخینی کم خطر برای محیط زیست اطراف گیاه است. ماده بازامید گرانولیت یک جایگزین مناسب برای کنترل قارچهای خاکزاد نظیر *Phytophthora* spp, *Alternaria brassicae, Fusarium* spp, *Sclerotinia sclerotiorum* است و حتی مانع جوانه زدن بذر علف‌های هرز و باعث مرگ آنها و نماتودهای خاکزاد میشود (Slusarski & Pietr, 2003; Daniel & Martin, 2001; Park & Landschoot, 2003). تدخین خاک بوسیله بازامید گرانولیت باعث کنترل کامل عوامل بیماریزای خاکزاد کدوئیان مثل قارچها و نماتودها میشود(Ashcheulov, 2001) و موجب از بین رفتن عوامل بیماریزای قارچی ریشه گیاهان شامل *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. میگردد (Brown & Schimanski, 2002). افزایش ۱۰۰g/m^2 بازامید به خاک، *Rosellinia necatrix* عامل پوسیدگی سفید ریشه را تا عمق ۵۰ سانتی متری از بین میبرد (Nitta, 2002).

بازامید به صورت میکروگرانول فرموله شده و در معرض رطوبت خاک فعال میشود و گاز

Archive of SID

www.SID.ir

MITC (Methyl Iso-thio-Cyanate) تولید میکند که روی عوامل بیماریزای خاکزاد، حشرات، کنه‌ها، بذر علف های هرز و غیره تاثیر دارد و باعث مرگ آنها میشود (Shelemekh *et al.* 2001, Shelemekh, 2001).

هدف از تحقیق حاضر بررسی امکان کنترل شیمیایی بیماری پژمردگی قارچی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با استفاده از قارچکش Basamid-granulat و تعیین مناسبترین غلظت موثر آن بر روی بیماری است.

روش بررسی

تهیه مایه

در شرایط *In-vitro* برای تهیه اینوکولوم قارچ (میسلیوم، اسپور و کلامیدوسپور) به سه روش زیر عمل شد: در روش اول حدود ۲۵۰ گرم دانه گندم را داخل ارلن نیم لیتری ریخته و پس از اضافه کردن ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر ۲۴ ساعت نگهداری شد تا آب در بذر نفوذ کند. سپس درب ارلن ها را با پنبه و فویل آلومینیوم پوشانده و دو بار ، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه درون اتوکلاو و به فاصله ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۱ اتمسفر سترون گردید. بعد از خارج کردن ارلن‌ها از اتوکلاو و سرد شدن آنها، تحت شرایط سترون زیر هود، قطعاتی از حاشیه کشت ۷ روزه جدایه‌های FOL و FOL2 از نژاد یک *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* روی PDA به ارلن‌های حاوی گندم اتوکلاو شده اضافه گردید. ارلن ها ۲۱ روز در انکوباتور با دمای ۲۴°C نگهداری شدند و هر چند روز یکبار آنها را تکان داده تا مایه قارچ درون ارلن‌ها بصورت توده بهم چسبیده در نیایند.

در روش دوم چند قطعه از حاشیه کشت ۷ روزه جدایه‌های FOL و FOL2 قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی روی PDA را به ارلن حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر عصاره سیب‌زمینی و ساکارز (بدون آگار) اضافه گردید و آن را روی دستگاه شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ده شبانه روز در دمای ۲۴°C–۲۲ قرار داده شد. سپس عصاره محیط کشت را به وسیله پارچه‌ای متشکل از سه لایه صاف و میسلیوم همراه کنیدیوم آن را جدا گردید.

روش سوم: جدایه های قارچ پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در روی محیط کشت PDA در داخل تشتک‌های پتری به قطر نه سانتی‌متر کشت و به مدت دو هفته در دمای ۲۵°C

Archive of SID

www.SID.ir

در انکوباتور نگهداری گردید. برای بدست آوردن کلامیدوسپور قارچ تعدادی از تشتک‌های پتری درون یخچال برای۱۰ روز گذاشته شد (سرمای یخچال باعث تولید کلامیدوسپور در محیط کشت میشود). پس از آن با اضافه کردن ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک پتری سوسپانسیون مایه تلقیح قارچ تهیه و با هماسیتومتر غلظت آن تعیین گردید.

بررسی اثر بازامید گرانولیت در بازدارندگی از رشد کلنی قارچ عامل بیماری

مقدار دو گرم از بذر گندم حاوی اینوکولوم قارچ در روش اول، و دو گرم از میسلیوم صاف شده در روش دوم را لای پارچه ای از جنس اکریل پیچیده و در خاک گلدان، جایی که قبلا" قارچکش بازامید گرانولیت به مقدار صفر، ۲۰۰، ۲۶۶، و ۳۳۳ گرم در متر مکعب به آن اضافه شده بود، در عمق ۱۵-۱۰ سانتی‌متری خاک در وسط گلدانها دفن گردید، بطوریکه به وسط پارچه‌های حاوی اینوکولوم قارچ (میسیلوم، میکروکنیدیوم و ماکروکنیدیوم و کلامیدوسپور)، نخی به طول ۴۰-۳۰ سانتی متر وصل و یک سر آن را به کناره گلدان روی سطح خاک متصل گردید. سپس گلدانها را آبیاری و روی آنها را با پلاستیک از جنس پلی اتیلن پوشانده شد. پس از ده روز پارچه‌های حاوی اینوکولوم قارچ فوزاریوم از داخل خاک خارج و آنها را روی محیط کشت PDA جهت توانایی تاثیر ماده بازامید کشت داده شد و پس از چهار و هفت روز بعد از کشت، قطرکلنی قارچ عامل بیماری اندازه‌گیری گردید (Shelemekh 2001). سپس مساحت پرگنه قارچ را محاسبه و درصد بازدارندگی رشد کلنی قارچ در مقایسه با شاهد محاسبه گردید. درصد های بدست آمده با استفاده از فرمول $Arc\sin\sqrt{\%}$ تبدیل به اعدادی گردید که به توزیع نرمال نزدیکتر باشند و سپس اعداد بدست آمده در محاسبات آماری منظور گردید (Little & Hill 1978) . آزمایش در قالب یک طرح کاملا" تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار انجام شد و داده ها با نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

بررسی اثر بازامید گرانولیت روی بیماری گوجه‌فرنگی (افزودن ماده بازامید به خاک) در شرایط گلخانه

در شرایط گلخانه *In vivo* به منظور تاثیر بازامید گرانولیت در کنترل بیماری پژمردگی گوجه فرنگی اینوکولوم قارچ عامل بیماری(ماکروکنیدیوم، میکروکنیدیوم و کلامیدوسپور) را که با روش سوم تهیه گردیده بود به غلظت 10^4 اسپور در یک گرم خاک به گلدانها اضافه و با آن مخلوط گردید(Larkin & Fravel 1998). بعد از سه روز قارچکش بازامید گرانولیت در مقدار

Archive of SID

www.SID.ir

صفر، ۲۰۰، ۲۶۶ و ۳۳۳ گرم در متر مکعب به روش ذکر شده به خاک گلدانهای آلوده به قارچ عامل بیماری اضافه و پس از آبیاری روی گلدانها پلاستیکی را بوسیله نایلون از جنس پلی‌اتیلن پوشانده شد. بعد از ده روز نایلون روی گلدانها را برداشته و ۷۲ ساعت بعد از عمل تهویه و گاز زدایی، نشاءهای گوجه‌فرنگی رقم Beliy naliv-241 حساس به نژاد یک عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را در مرحله ۳-۲ برگی در خاک گلدانهای مذکور کشت و گلدانها به گلخانه منتقل گردید. دمای گلخانه در شب ۱۸-۱۵ و در طول روز ۳۰-۲۷°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود.

تعیین جمعیت عامل بیماری در مایه خاک

در هنگام کاشت نشاءهای گوجه‌فرنگی (بعد از افزودن بازامید به خاک و عمل گاززدایی) و ۳۰ روز بعد از آن (پایان آزمایش) در کلیه تیمارها جمعیت عامل بیماری در خاک اندازه گیری شد. برای اینکار از محیط کشت انتخابی استفاده گردید (Nash & Snyder 1962) که ترکیب آن شامل، یک گرم فسفات پتاسیم، ۵۰۰ میلی گرم سولفات منیزیم، یک گرم پنتاکلرونیتروبنزن، یک گرم استرپتومیسین، ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب بود. بدین صورت در کلیه تیمارها در هر مرحله ۵ گرم از خاک هر گلدان در مجموع ۳۰ گرم از خاک هر تیمار توزین شد (هر تیمار شامل شش تکرار). سپس نمونه های خاک در هر تیمار در شرایط آزمایشگاه به مدت یک هفته در داخل تشتک پتری خشک و در هاون چینی پودر گردید. یک گرم از نمونه خاک هر تیمار توزین و در لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. لوله‌های آزمایش را به مدت یک دقیقه در روی دستگاه شیکر لوله قرار داده و سوسپانسیونی به رقت 10^{-4} تهیه گردید. از این سوسپانسیون یک میلی‌لیتر در روی محیط کشت اختصاصی ریخته و توسط یک میله شیشه ای L مانند به طور یکنواخت روی سطح محیط غذایی پخش گردید. تشتک های پتری در دمای ۲۵°C تا ظهور پرگنه قارچ نگهداری شدند. بعد از چهار روز پرگنه ظاهر و شمارش و CFU آن در هر گرم خاک محاسبه شد. علاوه بر آن در پایان آزمایش بعد از اندکس بیماری، وجود و یا عدم وجود کلامیدوسپور قارچ و جمعیت آن در خاک گلدانهای سالم و آلوده بررسی شد. برای اینکار طبق روش بالا ۱۵ میکرو لیتر از سوسپاسیون تهیه شده از خاک با پیپت برداشته و روی سطح لام ریخته و پخش گردید و پس از خشک شدن مایع در سطح لام بوسیله محلول متیلن بلو (methylene blue)

Archive of SID

www.SID.ir

رنگ‌آمیزی شد. سپس تعداد کلامیدوسپور در هر پرپاراسیون شمارش گردید (De Cal *et al.* 1997).

ارزیابی بیماری

نتایج آزمایش بعد از ۲۵ روز از کاشتن نشاءهای گوجه‌فرنگی در خاک آلوده به قارچ عامل بیماری براساس یادداشت‌برداری از روند بیماری در گلدانها انجام شد. قهوه‌ای شدن آوند چوبی، اندکس برگ (Leaf disease index) و ارتفاع گیاه معیارهای بکار رفته، جهت تاثیر قارچکش روی میزان بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در آزمایش بودند (Grattidge & o' Brien 1982) .

طرح آماری مورد استفاده در این آزمایش طرح کامل تصادفی بود که برای هر تیمار ۶ تکرار (هر تکرار شامل یک گلدان و در هر گلدان سه گیاهچه کشت گردید) و یک تیمار شاهد در نظر گرفته شد. میانگین‌ها با روش آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) مقایسه گردید.

جداسازی مجدد قارچ عامل بیماری از گیاه

به منظور جداسازی مجدد عامل بیماری از ساقه و ریشه گیاهان سالم و بیمار، قطعاتی از ریشه و ساقه آنها بعد از ضدعفونی سطحی با محلول ده درصد مایع سفید کننده (حاوی ۵ درصد هیپوکلریت سدیم) روی محیط غذایی PDA کشت گردید.

نتیجه

نتایج آزمایش در شرایط آزمایشگاه نشان داد که اضافه کردن بازامید در مقدار ۲۰۰ و ۲۶۶ گرم در متر مکعب به خاک باعث حذف کامل میسلیوم و کلامیدوسپور قارچ عامل بیماری در خاک نمیشود، در صورتیکه مقدار ۳۳۳ گرم بازامید در مترمکعب، باعث مرگ کامل قارچ عامل بیماری در خاک شد و قارچ پس از هفت روز هیچ گونه رشدی روی محیط کشت PDA نداشت. بطوریکه درصد بازدارندگی رشد کلنی قارچ عامل بیماری بعد از هفت روز در تیمارهای صفر، ۲۰۰، ۲۶۶ و ۳۳۳ گرم بازامید در متر مکعب بترتیب صفر، ۷۱، ۹۰ و ۱۰۰ درصد بود. مصرف ۲۰۰ و ۲۶۶ گرم بازامید در متر مکعب باعث جلوگیری از رشد کامل قارچ در خاک نشد، هر چند درصد بازدارندگی از رشد هر دو غلظت ذکر شده قابل توجه بود.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین در تیمار شاهد مایه قارچ درون پارچه های دفن شده در خاک پس از یک هفته در روی محیط کشت PDA بخوبی رشد کرد و تمام فضای تشک پتری را پر کرد یعنی درصد بازدارندگی از رشد قارچ در غیاب ماده بازامید صفر بود.

کلیه تیمارها در آزمون دانکن در سطح ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند.

نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نیز نتایج آزمایشات بالا را تایید کرد، بطوریکه کاربرد مقدار ۳۳۳ گرم بازامید در متر مکعب در خاک باعث مرگ کامل *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* در خاک شد و ارتفاع بوته‌های گوجه‌فرنگی در خاک محتوی ۳۳۳ گرم بازامید و قارچ عامل بیماری با بوته های گوجه فرنگی در تیمار شاهد (کنترل آب) تفاوت معنی‌داری نداشت. در صورتیکه کاربرد بازامید به مقدار ۲۰۰ و ۲۶۶ گرم درخاک در متر مکعب باعث کنترل کامل بیماری نشدند، با وجود اینکه شدت بیماری در آنها نسبت به شاهد (تیمار آلوده به قارچ عامل بیماری بدون کاربرد بازامید) کمتر بود (جدول ۱). همچنین در تیمار شاهد در غیاب ماده بازامید ۷۰ درصد قسمت‌های هوایی گوجه فرنگی زرد و پژمرده شدند و ارتفاع بوته های آن در قیاس با کنترل آب و تیمار ۳۳۳ گرم در مترمکعب بطور چشمگیری کاهش پیدا کرد (جدول ۱).

کاربرد چهل گرم در متر مربع بازامید در خاک قبل از کاشت نشاءهای گوجه‌فرنگی، شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی را به مقدار ۷۵ درصد کاهش میدهد (Nikolaeva 1978) و باعث تحریک رشد گیاه و ارتقاء کیفیت میوه های گوجه فرنگی در مقایسه با شاهد میشود (Indirani *et al.* 2000, Chpchugov *et al.* 2002).

آزمایشات نشان داد که Dazomet تاثیر بسیار بیشتری نسبت به metam sodium در کنترل *Macrophomia phaseolina* عامل پوسیدگی ریشه درختان و نماتودها در خزانه دارد (Barnard *et al.* 1994, Giannakou *et al.* 2003). علاوه بر آن بازامید خسارت قارچهای خاکزاد مثل *Verticillium dahliae*، *Sclerotium rolfsii* و *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* را روی محصولات زراعی در خاک به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (Pietro *et al.* 2003).

نتایج کلی آزمایشات نشان میدهد که کاربرد بازامید گرانولیت به مقدار ۳۳۳ گرم در متر مکعب به خاک گلخانه قبل از کاشت نشاءهای گوجه فرنگی، باعث مرگ کامل قارچ پژمردگی

Archive of SID

www.SID.ir

فوزاریومی گوجه فرنگی در خاک و بقایای گیاهی میشود (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر قارچکش بازامید گرانولیت روی ضد عفونی خاک آلوده به *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*، ۲۵ روز بعد از کاشت نشاءها گوجه‌فرنگی

Table 1. The Effect of granulated basamid application in artificially infected soil on tomato plant infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 25 days after plantlets planting

تیمارها Treatments	اندکس بیماری* (disease severity index)	ارتفاع گیاه (stem height, cm)	قهوه‌ای شدن آوند (Vascular browning, cm)
کنترل آب	0	49,5	0
کنترل FOL	1,7	35,3	31.0
کنترل FOL2	2,3	26,5	25.5
FOL + Basamid (200 g/m^3)	0.9	39.0	19.0
FOL2+ Basamid (200 g/m^3)	1,5	31.5	22.0
FOL + Basamid (266 g/m^3)	0,4	42,5	9.0
FOL2+ Basamid (266 g/m^3)	0,8	38.0	13.5
FOL + Basamid (333 g/m^3)	0	51,0	0
FOL2+ Basamid (333 g/m^3)	0	49,7	0

اعداد متن جدول، میانگین شش تکرار هستند که بوسیله آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (L.S.D) در سطح ۵٪ مقایسه صورت گرفت و بین میانگین‌ها اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

Data are means of 6 replicates.
Significant differences are denoted by different letters within each column at 5% according to L.S.D.

× Disease index: 0 = 0 - 25% of leaves yellowed;
1 = 25 - 50 % of leaves yellowed;
2 = 50 - 75 % of leaves yellowed;
3 = 75 - 100 % of leaves yellowed;
4 = Dead

Archive of SID

www.SID.ir

در پایان آزمایش دوباره قارچ فوزاریوم از ساقه و ریشه و خاک تیمار شاهد (بدون کاربرد بازامید) جداسازی گردید، ولی در تیماری که ماده بازامید به مقدار ۳۳۳ گرم در متر مکعب به خاک اضافه شده بود هیچ اندام قارچی از ساقه و ریشه گیاهان و حتی کلامیدوسپور از خاک درون گلدانها جداسازی نشد. همچنین در تیمار شاهد در پایان آزمایش کلامیدوسپور قارچ از خاک جداسازی گردید. نتیجه نشان میدهد که قارچکش بازامید روی قارچ فوزاریوم درون خاک تاثیر داشته و باعث از بین بردن کامل کلیه اندامهای قارچ حتی کلامیدوسپور آن در خاک میشود. همچنین اندازه گیری جمعیت عامل بیماری در خاک (cfu/g) نشان داد که جمعیت آن در طول آزمایش تقریباً ثابت ماند. میانگین تیمارها در آرمون کمترین اختلاف معنی‌دار (L.S.D) در سطح ۵٪ مقایسه صورت گرفت و بین آنها اختلاف معنی دار مشاهده شد.

تدخین خاک بوسیله ۶۰ گرم بر مترمربع بازامید منجر به حذف کامل قارچ Verticillium wilt در مزارع گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی میشود (Minuto *et al.* 2000, Cirulli 2001, Sumino *et al.* 2001). کاربرد بازامید به همراه پوشش پلاستیکی بهترین روش برای از بین بردن عوامل بیماریزای خاکزاد است (Lopez *et al.* 2003)، زیرا کاربرد بازامید خطر جمع شدن مواد محلول مثل نیترات آمونیوم و نیترات نیتروژن در نتیجه استفاده از بخار آب، متیل بروماید و کلروپیکرین را ندارد (Tanaka *et al.* 2001). بنابر این ایمن بودن و کاربرد آسان و سایر مزایای بازامید گرانولیت در مقایسه با سایر سموم شیمیایی و تدخینی، موجب جایگزینی آن برای کنترل بیماریهای خاکزاد شده و برای ضدعفونی خاک برعلیه عوامل بیماریزایی خاکزاد در گلخانه توصیه میشود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (80-77) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: دکتر جهانشیر امینی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، سنندج، بلوار کردستان، صندوق پستی ۴۱۶ کد پستی ۶۶۱۷۷-۱۵۱۷۵

Archive of SID

www.SID.ir