

بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های

پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

Investigation of the effect of antagonistic fungi on the incidence of cotton Verticillium wilt and seedling damping-off diseases

لاله نراقی^{۱*}، عبدالرضا احمدی^۲، صمد سرکاری^۳، اصغر حیدری^۱ و نصراله مالکی^۳

۱- بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

۲- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی

۳- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)

(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۰، تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۰)

چکیده

با توجه به زیان‌های فراوان سموم شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی از جمله زراعت پنبه، انجام تحقیقات در زمینه روش‌های مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های مهم پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه رایزوکتونایی پنبه امری ضروری است. در این تحقیق، بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست (*Talaromyces flavus* و *Trichoderma harzianum*) بر روی بیماری‌های مذکور و برخی صفات رویشی پنبه در مزارع مغان و نیشابور صورت پذیرفت. هر آزمایش در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ده تیمار و چهار تکرار انجام گردید. نتایج به دست آمده از منطقه نیشابور نشان داد که اگرچه تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست روی صفات رویشی معنی‌دار نبود ولی آغشته‌سازی خاک با هر یک از قارچ‌های آنتاگونیست (*T. flavus* یا *T. harzianum*) موجب بیشترین کاهش معنی‌دار بیماری گردید. از طرف دیگر، در منطقه مغان، با آغشته‌سازی خاک و بذر با هر دو قارچ آنتاگونیست بیشترین افزایش و کاهش

* Corresponding author: lale_naraghi@yahoo.com

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

معنی دار به ترتیب برای صفات رویشی و بیماری مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: پنبه، بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، بیماری مرگ گیاهچه، مبارزه بیولوژیکی،

Trichoderma harzianum, *Talaromyces flavus*

Abstract

Chemical pesticides used in the agriculture including cotton cultivation may have different harmful impacts on the agricultural environment. Since, one of the most suitable strategies for controlling cotton diseases is biological control, we therefore studied the possibility of biological control of cotton Verticillium wilt and seedling damping-off diseases in the field condition. The effectiveness of antagonistic fungi (*Trichoderma harzianum* and *Talaromyces flavus*) on above-mentioned diseases and several growth characteristics was investigated in Neishaboor and Moqan cotton fields. Each experiment was conducted as a randomized complete block with ten treatments and four replications. Overall results obtained from Neishaboor experiment showed that antagonistic fungi did not affect growth characteristics, but soil treatment with *T. flavus* or *T. harzianum* mediated maximum decrease in disease incidence. On the other hand, in Moqan experiment, application of both antagonistic fungi as soil and seed treatment, significantly increased growth characteristic and caused a significant decrease in the incidence of both diseases.

Key words: Cotton, Verticillium wilt disease, Seedling damping-off disease, Biological control, *Talaromyces flavus*, *Trichoderma harzianum*

مقدمه

در زمینه کاربرد قارچ‌های آنتاگونیست، نتایج تحقیقی در مزرعه نشان داد که *T. harzianum*، بیماری‌های گیاهچه پنبه را که از *R. solani* و *Sclerotium rolfsii* ناشی شده بودند، کاهش داده است (Koehl and Lewis, 1984).

تحقیقات (1982) Marois *et al.* در انگلستان نشان داد که *T. flavus* پژمردگی ورتیسلیومی را مهار نموده و محصول بادنجان را افزایش داده است. این قارچ که صورت جنسی *Penicillium dangeardii* می‌باشد، توسط (1982) Mc Laren *et al.* بعنوان انگل سختینه‌های *R. solani* و سختینه‌ها و ریشه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* گزارش شده است. همچنین تحقیقات (1981) Dutta نشان داد که *T. flavus* پژمردگی ورتیسلیومی در گوجه فرنگی را

می‌کاهد. مطابق گزارش (Tjamos, 1991) *Aspergillus terreus* و *T. flavus* از عوامل کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی ورتیسلیومی درختان زیتون در یونان محسوب می‌شوند. نتایج بررسی (Kim and Fravel, 1990) نشان داد که چهل درصد از ترکیب ترشحات غیر فرار *T. flavus* به آنزیم گلوکز اکسیداز اختصاص دارد. خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی این ترکیب به دلیل تولید پر اکسید هیدروژن از گلوکز توسط آنزیم مذکور است که دارای خاصیت سمی شدید برای *V. dahliae* می‌باشد. نتایج آزمایش تأثیر *T. flavus* بر پژمردگی ورتیسلیومی بادنجان نشان داد که شاخص بیماری که به صورت بالاترین در صد (حداکثر میزان بروز آن) بیان شده، در خصوص بذور گیاهانی که با *T. flavus* آغشته شده بودند کمتر از گیاهان تیمار نشده بود. دوازده هفته پس از انتقال نشاها ظهور بیماری در گیاهانی که با آنتاگونیست مزبور تیمار شده بودند ۱۲/۵ درصد بر آورد گردید که در مقایسه با میزان ۵۶ درصدی بروز بیماری در گیاهان تیمار نشده کاهش قابل ملاحظه به میزان ۷۷ درصد مشهود گشت (Fahima and Henis, 1997).

با وجود آن که از گذشته، به قابلیت‌های فراوان محیط‌های کشت طبیعی جامد برای تکثیر قارچ‌های آنتاگونیست پی برده شده بود، کاربردهای تجارتي این گونه محیط‌ها بسیار کم بوده است (Mitchell et al., 2000). تحقیقات (Pandy et al., 1994) نشان داد که استفاده از محیط‌های جامد طی فرآیند تخمیر میکروارگانیسم‌ها (Solid State Fermentation) ظرفیت تولید منابع آنزیمی نظیر سلولوتیک، پکتینولیتیک، لگنینولیتیک و لیپولیتیک را بالا می‌برد. همچنین در تحقیق دیگری در زمینه پایداری کنیدیوم‌های قارچ آنتاگونیست *Clonostachys rosea* روی بذور جو و قابلیت آنتاگونیستی آن بر علیه عامل بیماریزای قارچی بذرزاد *Bipolaris sorokiniana* برتری محیط کشت جامد به محیط کشت مایع به منظور تهیه زادمایه محتوی کنیدیوم‌های قارچ آنتاگونیست به اثبات رسید (Jensen et al., 2002).

استفاده از سبوس گندم در شرایط گلخانه در تهیه تیمارهای آزمایشی متاثر از کنیدیوم‌های *Trichoderma lignorum* به صورت افزودن به خاک (10^6 - 10^7 کنیدیوم در هر گرم سبوس گندم و ۲۰ گرم سبوس گندم در هر کیلوگرم خاک) جهت مبارزه با بیماری مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از *R. solani* سبب افزایش درصد تعداد بذور سالم به میزان ۹۲٪ گردید (Aziz et al., 1997).

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

همچنین، محیط کشت جدیدی با نام اختصاری SSC-06 متشکل از کومپوست قارچ جنگلی (Spent Forest Mushroom Compost)، پوسته شلتوک کربونیزه شده، پوست میگو، پوست خرچنگ، سلول خونی و آهک ضمن دار نبودن خواص بازدارندگی از فعالیت قارچ *R. solani* به عنوان بستری مناسب برای رشد گیاهچه‌های کلم معرفی شده است (Huang and Huang, 2000). این محققان نشان دادند که کاهش خواص بازدارندگی محیط مذکور بعد از قرار گرفتن در دمای مرطوب 100°C به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه توسط افزودن کنیدیوم‌های قارچ *T. harzianum* به میزان 10^6 کنیدیوم در هر گرم محیط خشک جبران می‌گردد. در ایران، اخیراً بررسی‌های بسیاری در زمینه مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های محصولات زراعی مختلف توسط باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست صورت گرفته است (Heydari et al., 2004; Heydari and Pesarakli, 2010; Naraghi et al., 2010a; Naraghi et al., 2010b; Naraghi et al., 2010c). نتایج تحقیقی در مزرعه پنبه نیز نشان داد که گیاهان در تیمارهای متأثر از خاک آغشته به زادمایه *T. flavus* در مقایسه با تیمارهای عاری از این نوع زادمایه، از لحاظ زودرسی برتری داشته‌اند (Naraghi et al., 2006). با توجه به این که کشورهای دیگر جهان با اعمال روش‌های بیولوژیک موفق به کنترل مؤثر بیماری‌ها و آفات پنبه شده‌اند و میزان استفاده از سموم شیمیایی را کاهش داده و نهایتاً عملکرد و تولید این محصول را به طور قابل توجهی افزایش داده‌اند، در کشور ما نیز اجرای تحقیقاتی در زمینه مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های پنبه ضروری به نظر رسید.

روش بررسی

بررسی‌های آزمایشگاهی:

تعیین جمعیت سختینه‌های *V. dahliae* در خاک دو مزرعه واقع در نیشابور و مغان: برای تعیین جمعیت سختینه‌های *V. dahliae* در خاک هر مزرعه، ده نمونه خاک از نقاط مختلف مزرعه تهیه گردید. روش نمونه برداری به این ترتیب بود که با کنارزدن پنج تا هشت سانتی‌متر از سطح خاک تا عمق ۲۵ سانتی‌متر با لوله‌هایی به قطر ۲/۵ سانتی‌متر نمونه برداری انجام گرفت (Butterfield and De Vay, 1977). سپس کلیه نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده با یکدیگر

مخلوط شد و به مدت چهار تا شش هفته در دمای آزمایشگاه ($20-24^{\circ}\text{C}$) برای از بین بردن پروپاگول‌های (واحد‌های پرگنه ساز) حساس (قطعات میسلومی و کنیدیوم‌ها خشک گردید. در مرحله بعد، سه نمونه یک گرمی از خاک به دست آمده انتخاب شد و پس از گذراندن از الک دو میلی‌متری باهاون چینی حتی الامکان یکنواخت گردید. برای جداسازی سختینه از روش (Huisman and Ashworth 1974) به شرح ذیل استفاده شد.

هر نمونه خاک یک گرمی در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون که حاوی یک درصد کالگن و یک صدم درصد ترزیتول NPX بود، به حالت تعلیق در آمد و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در خرد کن یکنواخت گردید و نهایتاً از الک ۱۲۵ و ۳۷ میکرونی گذرانده شد. رسوبات الک ۳۷ میکرونی به مدت ۵ دقیقه در ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوبات باقیمانده با افزودن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون توسط دستگاه تکان دهنده (Shaker) مخلوط شد بعد از تهیه سوسپانسیون یکنواخت، یک میلی‌لیتر از آن به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط آگار در حال سرد شدن ($45-40^{\circ}\text{C}$) افزوده شد و پس از مخلوط کردن به تشتک‌های پتری انتقال یافت. محیط کشت آگاردار مورد استفاده در این مرحله، Ethanol Potassium Amoxicillin Agar (EPPA) بود که طبق روش (Mansoori 2011) تهیه گردید.

پس از قرارگیری تشتک‌های پتری به مدت سه تا پنج روز در انکوباتور 25°C ، پرگنه‌های رویش یافته از سختینه‌های جدا شده از خاک، بر روی محیط کشت EPPA ظاهر شدند. بنابراین، با پیدایش یک پرگنه از یک سختینه، برای محاسبه تعداد سختینه‌ها در هر گرم از خاک مزرعه، اقدام به شمارش پرگنه‌های ظاهر شده بر روی محیط کشت EPPA گردید و با میانگین سه عدد بدست آمده مربوط به هر نمونه یک گرمی خاک، تعداد سختینه‌ها برای هر گرم خاک مزرعه تعیین گردید. با مشاهده تعداد کافی سختینه برای ایجاد درصد کل آلودگی است که بر اساس تحقیق (Hamdollahzadeh 1993) تعداد تقریبی ۱۶۰ سختینه در هر گرم خاک موجب آلودگی به میزان $46/66$ درصد گردیده است.

در این مرحله، ضمن تعیین جمعیت سختینه‌های *V. dahliae* در خاک هر یک از مناطق نیشابور و مغان، جهت حصول اطمینان از رویش پرگنه‌های *V. dahliae* از سختینه‌های جدا

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

سازی شده، از تشتک‌های پتری هر منطقه، برگه یک جدایه بر روی PDA تجدید کشت شد. پس از قرار گیری تشتک‌های پتری به مدت هفت تا ده روز در انکوباتور 25°C ، اقدام به شناسایی آن‌ها از طریق مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گردید.

مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه‌های *V. dahliae*. تأیید صحت گونه *V. dahliae* برای این جدایه‌ها مطابق منابع موجود (Hawksworth and Talboys, 1970; Kim et al., 2001) بر اساس اندازه کنیدی، طول کنیدیوفور، شکل ساختارهای استراحتی (سختینه و میسلیم تیره و رنگ برگه روی محیط کشت PDA صورت گرفت.

تعیین جمعیت *T. harzianum* و *T. flavus* در خاک هر یک از دو مزرعه: برای تعیین جمعیت *T. flavus* مطابق روش (Marois et al., 1984)، از محیط کشت اختصاصی T.F. (یک لیتر آب مقطر، ۳۹ گرم PDA تجارتي، دو میلی لیتر از محلول ۵۰ درصد لاکتیک اسید، ۱۰۰ میلی گرم سولفات استریتومایسین، ۵۰ میلی گرم کلرو تتراسیکلین، ۵۰ میلی گرم کلرامفنیکل، چهار میلی گرم پیماریسین به صورت سوسپانسیون ۲/۵ درصد و ۰/۰۵ گرم رزبنگال) و برای تعیین جمعیت *T. harzianum* مطابق روش (Koehl (1989) از محیط کشت اختصاصی TSM2 (یک لیتر آب مقطر، یک گرم K_2HPO_4 ، نیم گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۵ گرم پپتون، ۰/۲۵ گرم کلرامفنیکل، ۱۰ گرم پنتا کلرو نیترو بنزن، ۲۰ گرم آگار و یک میلی لیتر لاکتیک اسید ۵۰٪) استفاده شد این محاسبه جهت آگاهی از وجود شرایط مساعد در هریک از مزارع برای رشد قارچ‌های مذکور ضروری بود. در این مرحله، ضمن تعیین جمعیت هر یک از جدایه‌های *T. flavus* و *T. harzianum* در خاک هر یک از مناطق نیشابور و مغان، برگه جدایه‌های *T. flavus* و *T. harzianum* هر یک از مناطق بر روی محیط کشت‌های اختصاصی شان مشاهده شد سپس جهت حصول اطمینان از صحت گونه‌ها، بعد از تجدید کشت هر یک از جدایه‌های مذکور بر روی محیط کشت PDA، اقدام به شناسایی آن‌ها از طریق مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گردید.

مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه‌های *T. harzianum* و *T. flavus*: شناسایی برگه‌های *T. harzianum* بر اساس مشخصات ماکروسکوپی (رنگ برگه) و میکروسکوپی (انشعابات کنیدیوفور، شکل فیالیدها و کنیدیوم‌ها) انجام گرفت

(Siddiquee *et al.*, 2009). برای شناسایی پرگنه‌های *T. flavus* نیز ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها بررسی شد. بدین ترتیب که مطابق نوشته مارویس و همکاران (Marois *et al.*, 1984) جدایه‌هایی که از لحاظ ماکروسکوپی پرگنه آن‌ها بعد از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۳۰°C هاله زرد روشن در اطراف و نواحی سبز رنگ در مرکز داشتند و همچنین از لحاظ میکروسکوپی، دارای ریشه‌ها و شکل تولید مثل غیر جنسی (کنیدیوم و کنیدیوفور) مشابه با جنس *Penicillium* بودند، انتخاب گردیدند. همچنین، به منظور به دست آوردن شکل تولید مثل جنسی، این جدایه‌ها روی محیط کشت PDA به مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۳۰°C نگهداری شدند و اندام تولید مثل جنسی شان شامل آسکوگونیوم، آنتریدیوم، آسکوکارپ، آسک و آسکوسپور نیز مطالعه گردید.

تهیه زادمایه قارچ‌های آنتاگونیست مورد استفاده در مزارع: برای تهیه زادمایه‌های مورد استفاده هر منطقه از جدایه‌های مربوطه (دو جدایه *T. harzianum* و دو جدایه *T. flavus*)، از روش تغییر یافته Naraghi *et al.* (2006) استفاده شد. بدین ترتیب که مقداری سبوس برنج به مدت ۲۴ ساعت در آبی با دمای (۳۰-۳۵°C) خیسانده، سپس بر روی کاغذهای صافی بزرگ گسترانیده و خشک شد در مرحله بعد به میزان ۲۰۰ گرم از سبوس برنج شسته شده در کیسه‌های سلوفان در اتوکلاو (فشار ۱ اتمسفر، حرارت ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) سترون گردید. سپس، برای تهیه زادمایه هر یک از جدایه‌ها، سوسپانسیونی محتوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و چهار قطعه یک سانتی‌متری از محیط کشت ۱۰ روزه جدایه مربوطه در کیسه‌های سلوفان ریخته شد. همچنین، برای هر منطقه، زادمایه ای نیز از مخلوط دو جدایه *T. harzianum* و *T. flavus* مربوطه تهیه گردید. بدین ترتیب، همانند روش قبل عمل شد، به استثنای این که از هر یک از جدایه‌های مذکور، چهار قطعه یک سانتی‌متری از محیط کشت ۱۰ روزه منظور گردید. برای رشد جدایه‌ها، کیسه‌های سلوفان در انکوباتور ۳۰°C به مدت یک ماه و نیم تا دو ماه قرار گرفتند. وقتی قارچ به صورت کامل سطوح سبوس‌ها را پوشانید، مواد مذکور برای خشک شدن بر روی کاغذهای صافی گسترده شدند. در مرحله بعد، سبوس‌های آغشته به اسپور جدایه‌ها، بعنوان زادمایه مصرفی در مزرعه به دو صورت افزودن به خاک و آغشته سازی بذور با آن مورد استفاده قرار گرفت. سپس، زادمایه‌های موجود در کلیه کیسه‌های

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

سلوفان مربوط به هر نوع زادمایه با یکدیگر مخلوط شده و میزان اسپورها در هر گرم از زادمایه به دست آمده توسط لام هموسایتومتر شمارش گردید. مقدار زادمایه مصرفی در تیمار به صورت افزایش زادمایه به خاک، براساس ۲۵ گرم زادمایه (۱۰٪ اسپور در هر گرم زادمایه) در هر خط کاشت ده متری، مشخص شد. جهت تهیه تیمارهای بذری به میزانی از زادمایه استفاده شد که کلیه سطوح بذور به زادمایه آغشته گردید (Naraghi et al., 2006).

بررسی‌های مزرعه‌ای: در این مرحله از تحقیق، آزمایش بطور جداگانه برای هر یک از مزارع واقع در نیشابور و مغان با استفاده از رقم پنبه رایج هرمنطقه در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با ده تیمار و چهار تکرار یا بلوک انجام گرفت تیمارها عبارت بودند از ۱- خاک و بذور بدون زادمایه ۲- خاک با زادمایه *T. flavus* ۳- خاک بدون زادمایه و بذور آغشته به زادمایه *T. flavus* ۴- خاک و بذور آغشته به زادمایه *T. flavus* ۵- خاک با زادمایه *T. harzianum* و بذور بدون زادمایه، ۶- خاک بدون زادمایه و بذور آغشته به زادمایه *T. harzianum*، ۷- خاک و بذور آغشته به زادمایه *T. harzianum* ۸- خاک با زادمایه مخلوط دو قارچ و بذور بدون زادمایه، ۹- خاک بدون زادمایه و بذور آغشته به زادمایه مخلوط دو قارچ و ۱۰- خاک و بذور آغشته به زادمایه مخلوط دو قارچ. هر تکرار شامل پنج خط کاشت به طول ۱۱ متر با احتساب اثر حاشیه ای بود. فاصله بوته‌ها از یکدیگر در روی ردیف کاشت با ابعاد ۸۰×۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. پنجاه بوته میانی در هر خط کاشت، مبنای محاسبات آماری قرار گرفت. ارزیابی میزان تأثیر تیمارهای آزمایشی در کنترل قارچ عامل بیماری با تعیین درصد مرگ گیاهچه، شاخص و درصد بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، عملکرد و زودرسی انجام گرفت. بدین منظور، یادداشت برداری‌های مرگ گیاهچه در ۳۰، ۴۰ روز بعد از کاشت صورت گرفت و در نهایت درصد مرگ گیاهچه محاسبه گردید. یادداشت برداری‌های بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در ۶ مرحله انجام شده و برای تعیین شاخص بیماری حدود چهارماه بعد از کاشت، بوته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. ابتدا تعداد بوته‌های سالم در دو خط وسط اندازه گیری و سپس شدت بیماری (DS= disease severity) با استفاده از روش Booth (1970) مطابق فرمول زیر محاسبه شد.

$$DS = \frac{(A \times 0) + (B \times 1) + (C \times 2) + (D \times 3) + (E \times 4)}{M}$$

A: تعداد بوته با درجه صفر، B: تعداد بوته با درجه یک، C: تعداد بوته با درجه دو،
 D: تعداد بوته با درجه سه E: تعداد بوته با درجه چهار، M: تعداد کل بوته‌ها
 بوته کاملاً سالم = بوته درجه صفر = ۰
 صفر تا ۳۳٪ برگ‌ها علائم بیماری را نشان می‌دهند بوته درجه یک = ۱
 ۳۴ تا ۶۶٪ برگ‌ها علائم بیماری را نشان می‌دهند بوته درجه دو = ۲
 ۶۷ تا ۱۰۰٪ برگ‌ها علائم بیماری را نشان می‌دهند = بوته درجه سه = ۳
 بوته کاملاً بدون برگ و قوزه = بوته درجه چهار = ۴
 سپس شاخص بیماری (DI= disease index) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

شدت بیماری × درصد بیماری = شاخص بیماری

برای محاسبه عملکرد چین اول چهارماه بعد از کاشت و برای تعیین عملکرد چین دوم پایان دوره رویشی اقدام گردید. همچنین، برای محاسبه عملکرد کل، مجموع عملکردهای چین اول و دوم برآورد گردید. زودرسی نیز مطابق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{عملکردچین اول} \times 100 = \frac{\text{عملکردچین اول}}{\text{عملکرد کل}} = \text{زودرسی}$$

در نهایت، محاسبه و مقایسه میانگین صفات مختلف پنبه (درصد مرگ گیاهچه، درصد بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، شاخص بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، عملکرد چین اول، عملکرد چین دوم، عملکرد کل و درصد زودرسی) با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و تحت برنامه آماری Ms TAT C انجام گرفت.

جداسازی و شناسایی عوامل قارچی بیماری‌زا از اندام‌های گیاهی آلوده مزارع نیشابور و مغان: برای جداسازی عامل بیماری مرگ گیاهچه رایزوکتونیاپی (*R. solani*) از طوقه و ریشه‌های گیاهچه آلوده هر یک از مزارع نیشابور و مغان، مطابق روش Heydari et al. (2004) از محیط کشت آب-آگار (WA) استفاده شد. برای حصول اطمینان از صحت گونه *R. solani* برای جدایه‌های قارچی به دست آمده، مشاهدات ماکروسکوپی، به صورت چگونگی رشد و

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

رنگ پرگنه روی محیط کشت PDA، روزانه به مدت دو هفته صورت پذیرفت. همچنین، مشاهدات میکروسکوپی، به صورت چگونگی انشعابات ریشه‌ها، فقدان اسپور، وجود دیواره عرضی و سختینه‌ها انجام گرفت (Heydari et al., 2004).

برای جداسازی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی (*V. dahliae*) از ریشه و ساقه گیاهان آلوده هر یک از مزارع نیشابور و مغان، مطابق روش Kim et al. (2001) از محیط کشت APDA Acidified Potato Dextrose Agar (شامل اسید لاکتیک ۰.۲۵٪ به میزان دو میلی لیتر در لیتر استفاده گردید). (Kim et al., 2001). شناسایی جدایه‌های به دست آمده، بر اساس اندازه کنیدیوم، طول کنیدیوفور، شکل ساختارهای استراحتی (سختینه و میسلیم تیره و رنگ پرگنه روی محیط کشت PDA صورت گرفت (Hawksworth and Talboys, 1970; Kim et al., 2001).

آزمون اثبات بیماری زایی: برای اثبات بیماری زایی جدایه‌های *R. solani*، کشت ۷۲ ساعته این جدایه بر روی محیط کشت PDA به خاک سترون گلدان‌هایی حاوی بذر پنبه اضافه شد در این مرحله، گلدان‌هایی نیز عاری از *R. solani* به عنوان شاهد منظور گردیدند. ارزیابی پس از گذشت یک هفته تا حداکثر یک ماه بر اساس تعداد گیاهچه‌های سالم صورت پذیرفت (Heydari et al., 2004). آزمون اثبات بیماری زایی برای جدایه‌های *V. dahliae* با قرارگیری ریشه گیاهچه‌های پنبه در سوسپانسیون‌های *V. dahliae* (۱۰^۷ کنیدیوم در میلی لیتر) به مدت یک ساعت و انتقال آن‌ها به گلدان‌هایی محتوی مقادیر یکسان از خاک پیت، ورمی‌کولیت و پرلیت انجام گرفت. برای گلدان‌های شاهد، به جای سوسپانسیون کنیدیایی عامل بیماریزا، آب مقطر سترون استفاده گردید. چهار هفته بعد از مایه زنی، ارزیابی به صورت شاخص بیماری (۰= گیاه سالم، ۱= گیاه با علائم تغییر رنگ آوندی و بدون پژمردگی، ۲= گیاه با علائم پژمردگی و ۳= گیاه با علائم پژمردگی شدید و از بین رفتن کامل آن) صورت پذیرفت (Kim et al., 2001).

نتیجه و بحث

بررسی‌های آزمایشگاهی: تعیین جمعیت سختینه‌های *V. dahliae* در خاک دو مزرعه واقع در نیشابور و مغان: از طریق میانگین سه عدد بدست آمده مربوط به هر نمونه یک

گرمی‌خاک، تعداد سختینه‌ها برای هر گرم خاک مزرعه نیشابور و مغان، به ترتیب ۱۴۰ و ۱۳۶ عدد تعیین شد که این مقادیر به ترتیب با ایجاد ۴۰/۸۱ و ۳۹/۶۶ درصد آلودگی برای انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای قابل قبول بودند. در این مرحله، یک جدایه *V. dahliae* (VD-Co-N-1) از خاک مزرعه نیشابور و یک جدایه *V. dahliae* (VD-Co-M-2) از مزرعه پنبه مغان جهت مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی روی محیط کشت PDA تجدید کشت شد.

مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه‌های *V. dahliae*: از لحاظ ماکروسکوپی، پرگنه‌های *V. dahliae* به علت وجود سختینه‌ها سیاه رنگ ظاهر شدند. از لحاظ میکروسکوپی، هر یک از جدایه‌های *V. dahliae* دارای ریشه‌هایی به حالت عمودی (Verticillate) با انشعابات فراهم دو گانه در امتداد محور اصلی کنیدیوفور بودند. همچنین، کنیدیوم‌ها اندازه‌ای برابر با $۲/۳ - ۳/۵ \times ۱۰/۲ - ۲/۵$ داشتند.

تعیین جمعیت *T. harzianum* و *T. flavus* در خاک مزارع نیشابور و مغان: در هر یک از مزارع نیشابور و مغان به ترتیب ۱۰^۶ و ۱۰^۵ اسپور *T. flavus* در هر گرم خاک محاسبه شد. همچنین، تعداد اسپور *T. harzianum* در هر گرم خاک از مزارع مذکور ۱۰^۵ برآورد گردید. این نتایج نشان داد که در هر یک از مزارع، شرایط مساعد برای رشد قارچ‌های مذکور وجود داشته است. در این مرحله، یک جدایه *T. harzianum* (TH-Co-N-1) و یک جدایه *T. flavus* (TF-Co-N-1) از مزرعه پنبه نیشابور و یک جدایه *T. harzianum* (TH-Co-M-2) و یک جدایه *T. flavus* (TF-Co-M-2) از مزرعه پنبه مغان جهت مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی روی محیط کشت PDA تجدید کشت شد.

مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه‌های *T. harzianum* و *T. flavus*: بررسی‌های ماکروسکوپی جدایه‌های *T. harzianum* نشان داد که پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA، از بخش فوقانی ابتدا سفید رنگ بودند و بعد از دو روز با پیدایش کنیدیوم‌های سبز رنگ از مرکز متمایل به سبز روشن شدند. هفت تا هشت روز پس از کشت، پرگنه‌ها زرخش فوقانی تا ۶۰٪ به صورت سبز تیره در حالیکه از بخش زیرین باریک‌سبز روشن‌نمایان گردید. در مطالعات میکروسکوپی این جدایه‌ها، کنیدیوفورها در امتداد محور اصلی دارای انشعابات دو گانه بودند. فیالدها نیز به صورت فلاسکی شکل با بخش میانی متورم در انتهای

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

انشعابات کنیدیوفور حالت خوشه ای فراهم را دارا بودند. از طرف دیگر کلامیدوسپورها، بدون رنگ و با دیواره صاف مشاهده شدند. همچنین، بررسی‌های میکروسکوپی جدایه‌های *T. flavus* مشخص نمود که رنگ پرگنه این جدایه‌ها روی محیط کشت PDA دارای‌هاله زرد روشن در اطراف و نواحی سبز رنگ در مرکز بوده است. از لحاظ میکروسکوپی، جدایه‌های مذکور دارای ریشه‌ها و شکل غیر جنسی (کنیدیوم و کنیدیوفور) مشابه با جنس *Penicillium* بودند. در شکل جنسی این جدایه‌ها، علاوه بر آسکوکارپ، آسک و آسکوسپور، آنتریدیوم نیز مشاهده شد که به صورت مارپیچی اطراف آسکوگونوم قرار گرفته بود.

بررسی‌های مزرعه‌ای

الف) مزرعه نیشابور: در بررسی‌های مزرعه ای نیشابور بذور مربوط به تیمار متأثر از خاک و بذر آغشته به مخلوط دو قارچ آنتاگونیست سبز نشدند. بنابراین محاسبات آماری این آزمایش با حذف یک تیمار (خاک و بذر آغشته به مخلوط دو قارچ آنتاگونیست) صورت پذیرفت. آزمایش تأثیر تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست روی عملکرد چین اول، عملکرد چین دوم، عملکرد کل و زودرسی معنی دار نبود در حالیکه تأثیر این گونه تیمارها روی درصد و شاخص بیماری پژمردگی ورتیسلیومی و درصد مرگ گیاهچه معنی دار بود. در این آزمایش بیشترین کاهش معنی دار شاخص بیماری پژمردگی ورتیسلیومی و درصد هر یک از دو بیماری در تیمار متأثر از خاک آغشته به *T. flavus* در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده گردید (جدول ۱).

ب) مزرعه مغان: تأثیر تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست روی کلیه صفات اندازه گیری شده شامل شاخص بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، درصد دو بیماری پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه، زودرسی، عملکرد چین اول، عملکرد چین دوم و عملکرد کل معنی دار بوده است. در این آزمایش، بیشترین درصد زودرسی و کمترین درصد بیماری پژمردگی ورتیسلیومی به تیمار بذر آغشته به دو قارچ آنتاگونیست اختصاص داشته است (جدول ۲ و ۳). همچنین، تیمار خاک و بذر آغشته به دو قارچ آنتاگونیست، کمترین درصد مرگ گیاهچه و خاک آغشته به قارچ تریکودرما کمترین شاخص پژمردگی ورتیسلیومی و بیشترین عملکرد را به خود اختصاص داد (جدول ۲ و ۳).

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های درصد مرگ گیاهچه رازیوکونیا، شاخص و درصد پژمردگی ورتیسلیومی میان تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست در مزرعه نیشابور (۱/۰/۰۱) (α=۰/۰۱)

Table 1. Means comparison of Rhizoctonia seedling damping-off percent, Verticillium wilt index and Verticillium wilt percent among treatments affected by antagonistic fungi in Neishaboor field (α=0.01)

درصد پژمردگی ورتیسلیومی Verticillium wilt percent	شاخص پژمردگی ورتیسلیومی Verticillium wilt index	درصد مرگ گیاهچه Seedling damping-off percent	تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست Treatments affected by antagonistic fungi	
11.44	a	14.08	ab	خاک و بذر بدون زادمایه (شاهد) Soil and seed without inoculum (control)
7.95	b	12.25	b	خاک آغشته به <i>T. flavus</i> Soil mixed with <i>T. flavus</i>
9.56	ab	13.42	ab	بذر آغشته به <i>T. flavus</i> Seed mixed with <i>T. flavus</i>
8.84	b	14.75	ab	خاک و بذر آغشته به <i>T. flavus</i> Soil and seed mixed with <i>T. flavus</i>
8.67	b	12.00	b	خاک آغشته به <i>T. harzianum</i> Soil mixed with <i>T. harzianum</i>
7.95	b	14.58	ab	بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> Seed mixed with <i>T. harzianum</i>
8.93	b	13.92	ab	خاک و بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> Soil and seed mixed with <i>T. harzianum</i>
8.81	b	13.75	ab	خاک آغشته به <i>T. harzianum</i> و <i>T. flavus</i> Soil mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>
7.95	b	17.42	a	بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> و <i>T. flavus</i> Seed mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>

نرافی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

جدول ۲ - مقایسه میانگین‌های درصد مرگ گیاهچه رایزوتکتونیایی، شاخص و درصد پژمردگی ورتیسلیومی میان تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست در مزرعه مغان (۰/۰/۱) ($\alpha=0.01$)

Table 2. Means comparison of Rhizoctonia seedling damping-off percent, Verticillium wilt index and Verticillium wilt percent among treatments affected by antagonistic fungi in Moghan field ($\alpha=0.01$)

درصد پژمردگی ورتیسلیومی Verticillium wilt percent	درصد پژمردگی ورتیسلیومی Verticillium wilt index	شاخص پژمردگی ورتیسلیومی Seedling damping-off percent	درصد مرگ گیاهچه Seedling damping-off percent	تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست Treatments affected by antagonistic fungi	
55.47	1.07	a	13.37	a	خاک و بذر بدون زادمایه (شاهد) Soil and seed without inoculum (control)
16.81	0.92	abc	13.24	a	خاک آغشته به <i>T. flavus</i> Soil mixed with <i>T. flavus</i>
33.48	0.99	abc	13.02	a	بذر آغشته به <i>T. flavus</i> Seed mixed with <i>T. flavus</i>
3.96	0.76	bc	10.84	ab	خاک و بذر آغشته به <i>T. flavus</i> Soil and seed mixed with <i>T. flavus</i>
3.10	0.73	c	12.17	ab	خاک آغشته به <i>T. harzianum</i> Soil mixed with <i>T. harzianum</i>
13.77	0.87	abc	12.32	a	بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> Seed mixed with <i>T. harzianum</i>
33.66	1.01	ab	10.09	ab	خاک و بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> Soil and seed mixed with <i>T. harzianum</i>
33.48	1.00	abc	12.38	a	خاک آغشته به <i>T. harzianum</i> و <i>T. flavus</i> Soil mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>
2.91	0.74	bc	13.22	a	بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> و <i>T. flavus</i> Seed mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>
4.21	0.81	abc	8.84	b	خاک و بذر آغشته به <i>T. flavus</i> و <i>T. harzianum</i> Soil and seed mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های عملکرد چین اول، عملکرد چین دوم، عملکرد کل و رزود رسی میان تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست در مزرعه معغان (α=0.01)

Table 3. Means comparison of first harvest yield, second harvest yield, total yield and pre-maturing percent among treatments affected by antagonistic fungi in Moghan field (α=0.01)

درصد زودرسی Pre-maturing percent	عملکرد کل (کیلوگرم در هکتار) Total yield (kg/ha)	عملکرد چین دوم (کیلوگرم در هکتار) Second harvest yield (kg/ha)	عملکرد چین اول (کیلوگرم در هکتار) First harvest yield (kg/ha)	تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست Treatments affected by antagonistic fungi
93.08	4003.64	266.64	3737.00	خاک و بذر بدون زادمایه (شاهد) Soil and seed without inoculum (control)
94.57	4996.26	233.10	4763.16	خاک آغشته به <i>T. flavus</i> Soil mixed with <i>T. flavus</i>
96.82	4812.44	166.44	4646.00	بذر آغشته به <i>T. flavus</i> Seed mixed with <i>T. flavus</i>
95.13	5110.60	294.92	4815.68	خاک و بذر آغشته به <i>T. flavus</i> Soil and seed mixed with <i>T. flavus</i>
92.53	5296.44	395.92	4900.52	خاک آغشته به <i>T. harzianum</i> Soil mixed with <i>T. harzianum</i>
96.34	4913.85	199.17	4714.68	بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> Seed mixed with <i>T. harzianum</i>
93.41	5211.60	363.60	4848.00	خاک و بذر آغشته به <i>T. harzianum</i> Soil and seed mixed with <i>T. harzianum</i>
96.65	5112.21	231.89	4880.32	خاک آغشته به <i>T. flavus</i> و <i>T. harzianum</i> Soil mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>
97.19	4957.08	258.56	4698.52	بذر آغشته به <i>T. flavus</i> و <i>T. harzianum</i> Seed mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>
95.07	4435.92	262.60	4173.32	خاک و بذر آغشته به <i>T. flavus</i> و <i>T. harzianum</i> Soil and seed mixed with <i>T. flavus</i> and <i>T. harzianum</i>

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

جداسازی و شناسایی عوامل قارچی بیماری‌زا از اندام‌های گیاهی آلوده مزارع نیشابور و مغان: در این مرحله، یک جدایه *R. solani* (RH-Co-N-1) و یک جدایه *V. dahliae* (VD-Co-N-3) از گیاهان پنبه آلوده مزرعه نیشابور و یک جدایه *R. solani* (RH-Co-M-2) و یک جدایه *V. dahliae* (TF-Co-M-4) از گیاهان پنبه آلوده مزرعه مغان جداسازی شد. مشاهده ماکروسکوپی جدایه‌های *R. solani* نشان داد که این جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA تولید سختینه نموده و پرگنه‌ها آنها دارای رنگ کرم روشن تا قهوه‌ای تیره بوده است. همچنین، از لحاظ میکروسکوپی، هیچ گونه اسپوری مشاهده نگردید و این جدایه‌ها دارای سختینه و ریشه‌هایی با دیواره عرضی و انشعابات با زوایای ۴۵ تا ۹۰ درجه بودند. در بررسی ماکروسکوپی جدایه‌های *V. dahliae*، پرگنه‌ها آنها به علت وجود سختینه‌ها سیاه رنگ ظاهر شدند. نتایج بررسی میکروسکوپی این جدایه‌ها نشان داد که هر یک از جدایه‌های *V. dahliae* دارای ریشه‌هایی به حالت عمودی (Verticillate) با انشعابات فراهم دو گانه در امتداد محور اصلی کنیدیوفور بودند. همچنین، اندازه کنیدیوم‌ها برابر با $۲/۳ - ۳/۵ \times ۱۰/۲ - ۲/۵$ بود.

آزمون اثبات بیماری زایی: نتایج این مرحله نشان داد که در مقایسه با میانگین تعداد گیاهچه‌های سالم در گلدان‌های شاهد (۱۰)، این میانگین به ترتیب در گلدان‌هایی محتوی دو جدایه RH-Co-N-1 (۶/۷۵) و RH-Co-M-1 (۶/۲۵)، به میزان ۳۲/۵ و ۳۷/۵ درصد کاهش یافته است. همچنین، به گیاهان متأثر از دو جدایه VD-Co-N-3 و VD-Co-M-4، به ترتیب شاخص‌های بیماری ۱ و ۲ اختصاص یافت. نتایج کلی این تحقیق بی‌یونگر این است که کاربرد قارچ‌های آنتاگونیست می‌تواند به طور مؤثری باعث کنترل بیماری‌های مرگ گیاهچه و پژمردگی ورتیسلیومی پنبه گردد، البته میزان تأثیر این عوامل بستگی زیادی به شرایط محیطی مزرعه دارد. بر اساس تحقیقات Cooney and Emerson (1964) در زمینه بیولوژی و شرایط مساعد برای رشد قارچ‌های گرمادوست، محاسبه جمعیت هر یک از گونه‌های قارچی آنتاگونیست *T. flavus* و *T. harzianum* به میزان $۱۰^۵$ تا $۱۰^۶$ اسپور در هر گرم خاک مناطق نیشابور و مغان قابل انتظار بود. بنا به اظهارات محققان مزبور، برای تولید میزان اسپور ذکر شده، بسته به دیگر شرایط محیطی، دامنه دمایی مورد نیاز از ۲۵ تا ۳۵ °C می‌باشد که در زمان نمونه برداری خاک (نیمه اول اردیبهشت ماه: آغاز دوره فصل رویشی)، دمای حاکم در هر یک

از مناطق، در دامنه فوق قرار گرفته بود. از طرف دیگر، در تحقیق حاضر، علیرغم میزان بالای اسپور قارچ‌های آنتاگونیست، تعداد بالایی از سختینه‌ها نیز به میزان ۱۴۰ و ۱۳۶ در هر یک از مناطق نیشابور و مغان برآورد گردید که این موضوع نشان دهنده آن است که توان آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی آنتاگونیست مذکور در خاک پایین بوده و با انتخاب جدایه‌هایی با کارایی آنتاگونیستی بالا و افزودنشان به خاک، می‌توان این مشکل را برطرف نمود.

از چند دهه اخیر تا کنون، کاهش بیماری‌های گیاهی ناشی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد نظیر *V. dahliae* و *R. solani* توسط عوامل قارچی آنتاگونیست به اثبات رسیده است (Srinon et al., 2006). در این تحقیق نیز، در آزمایش تأثیر تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست روی بیماری‌های پنبه، کاهش معنی‌دار هر یک از بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه در تیمارهای متأثر از قارچ‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد مشاهده گردید. همچنین، آزمایش تأثیر این گونه تیمارها روی صفات مختلف پنبه در منطقه مغان نشان داد که برخی از تیمارهای متأثر از عوامل آنتاگونیست از لحاظ افزایش معنی‌دار عملکرد چین اول، عملکرد چین دوم، عملکرد کل و زودرسی نسبت به سایر تیمارها برتری داشته‌اند. در تحقیقی مشابه، (Rini and Sulochana, 2006) نشان دادند که کاهش بیماری مرگ گیاهچه فلفل (*Capsicum annum* L.) توسط چندین گونه از قارچ تریکودرما باکتری سودوموناس فلورسنت با افزایش این محصول همراه بوده است. در تحقیقی دیگر، (Fahima and Henis, 1995) نشان دادند که *T. flavus* موجب به کاهش شاخص بیماری پژمردگی ورتیسلیومی و افزایش عملکرد چین اول بادنجان گردیده است. نتایج تحقیقات (Bal and Altintas, 2006) نیز نشان داد که استفاده از تیمارهای متأثر از *T. harzianum* موجب افزایش عملکرد چین اول و زودرسی گیاهان گوجه‌فرنگی گردیده است. در تحقیقی مشابه، کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی به همراه افزایش محصول گوجه‌فرنگی توسط گونه‌های قارچی آنتاگونیست پنسیلیوم به اثبات رسید (Rahman Khan and Majid Khan, 2001).

بر اساس تحقیق (Wright, 1999)، میزان کمتری از تجمع پتاسیم و فسفر در برگ‌های گیاهان پنبه زودرس با وزن قوزه بالا نسبت به پنبه‌های دیررس و با وزن قوز پایین مشاهده شد مطابق تحقیق اخیر، غلظت پتاسیم و فسفر در گیاهان پنبه زودرس به ترتیب تقریباً به

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

میزان نیم و یک چهارم غلظت این عناصر در برگ‌های گیاهان پنبه دیررس بود. بدین ترتیب که گیاه با جذب کمتر فسفر و پتاسیم زودتر مرحله رویشی را سپری کرده و دوره گلدهی را آغاز نموده است. بنابراین، در این تحقیق، می‌توان استنباط کرد که چون قارچ‌های آنتاگونیستی نظیر *T. harzianum* و *T. flavus* برای متابولیسم آنزیم‌هایی از قبیل کیتوبیوزیداز، اندوکتیناز، اندو بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و آن استیل گلوکوزامینیداز، فسفر و پتاسیم موجود در خاک را به صورت محلول در آورده و استفاده می‌نمایند (Marois et al., 1984; Dal-Soglio et al., 1998; Williams et al., 2003)، امکان زودرسی برای گیاهان پنبه به دلیل دسترسی کم تر به این عناصر فراهم شده است. در تیمارهای متأثر از خاک و بذر آغشته به مخلوط دو قارچ آنتاگونیست، هیچ یک از بذور پنبه در مزرعه نیشابور سبز نشدند در حالیکه در مزرعه مغان، کلیه بذور در همان تیمارها رویش یافتند. در این زمینه، (Cooney and Emerson (1964 اظهار داشته‌اند که دو عامل دما و رطوبت برای رشد بهینه قارچ‌های گرمادوست نظیر *Trichoderma* و *Talaromyces* نقش مهمی ایفا می‌نماید. همچنین، در بررسی دیگری، به پوسیدگی بذور در اثر فعالیت ساپروفیتی میکروارگانیسم‌ها روی بسترشان اشاره شده است (Zad, 1987). با توجه به اظهارات فوق و استفاده از غلظت یکسان اسپور در تیمار متأثر از خاک و بذر آغشته به مخلوط دو قارچ آنتاگونیست در دو منطقه، چنین استنباط می‌گردد که شرایط آب و هوایی نیشابور به گونه‌ای بوده است که افزایش بیش از حد تکثیر جدایه‌ها رخ داده و موجبات پوسیدگی بذور فراهم شده است. بنابراین، در منطقه نیشابور در صورت استفاده از این تیمار، بایستی غلظت‌های کم تری از اسپور جهت آغشته سازی بذور و افزایش به خاک منظور گردد. در پایان امید است نتایج این تحقیق بتواند جهت کاهش بروز بیماری‌های پنبه در مزارع کشور مورد استفاده قرار گرفته و در رسیدن به اهداف کشاورزی پایدار که همانا افزایش تولید محصولات کشاورزی، کاهش استفاده از سموم شیمیایی و حفاظت از محیط زیست و ذخایر بیولوژیکی می‌باشد نقش کوچکی ایفا نماید* .

* نشانی نگارندگان: دکتر لاله نراقی و دکتر اصغر حیدری، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران، ایران؛ مهندس عبدالرضا احمدی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، ایران؛ مهندس صمد سرکاری و آقای نصراله مالکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل (مغان)، ایران.

منابع

- AZIZ, N. H., M. Z. EL-FOULY, A. A. EL-ESSAVY and M. A. KHALAF, 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. Bot. Bull. Acad. Sin. 38: 33-39.
- BAL, V. and S. ALTINTAS, 2006. Effects of *Trichoderma harzianum* on the yield and fruit quality of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) grown in an unheated greenhouse. Aust. Exp. Agric. 46: 131-136.
- BOOTH, J. A. 1970. In Crop Loss. Assessment Methods. FAO manual on the evaluation and prevention of losses by pests, diseases and weeds. 50 p.
- BUTTERFIELD, E. J. and J. E. DE VAY, 1977. Assessment of soil assays for *Verticillium dahliae*. Phytopathology 67:1073-1078.
- COONEY, D. G. and R. EMERSON, 1964. Thermophilic fungi, an account of their biology, activities, and classification, San Francisco, W.H. Freeman Publ., pp: 3-13.
- DAL-SOGLIO, F. K., B. L. BERTAGNOLLI, J. B. SINCLAIR, G. Y. YU and D. M. EASTBURN, 1998. Production of chitinolytic enzymes and endoglucanase in the soybean rhizosphere in the presence of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. Biol. Control 12: 111-117.
- DUTTA, B. K. 1981. Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of *Verticillium* wilt. Plant and Soil 63:209-216.
- FAHIMA, T. and Y. HENIS, 1995. Quantitative assessment of the interaction between the antagonistic fungus *Talaromyces flavus* and the wilt pathogen *Verticillium dahliae* on eggplant roots. Plant and Soil 176: 129-137.
- FAHIMA, T. and Y. HENIS, 1997. Increasing of *Trichoderma hamatum* and *Talaromyces flavus* on the root of healthy and useful hosts. p. 296-322. In: "Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens Hornby" (A. Alavi, A. Ahoonmanesh, eds.). Tehran, Iran.
- HAMDOLLAHZADEH, A. 1993. Characteristics of defoliant and nondefoliant races of *Verticillium dahliae* causal agent of cotton wilt in the north of Iran. Iran. J. Plant Path. 29: 3-4 (in Persian with English summary).
- HAWKSWORTH, D. L. and P. W. TALBOYS, 1970. C. M. I. descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 255. *Verticillium albo-atrum*, No. 256. *Verticillium dahliae*.

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

CAB, Kew, England.

- HEYDARI, A. and M. PESSARAKLI, 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *J. Biol. Sci.* 10: 273-290.
- HEYDARI, A., H. FATAHI, H. ZAMANIZADEH, N. HASANZADEH and L. NARAGHI, 2004. Investigation on the possibility of using bacterial antagonists for biological control of cotton seedling damping-off in greenhouse. *Appl. Ent Phyt.* 72: 51-68 (in Persian with English summary).
- HUANG, J. W. and H. C. HUANG, 2000. A formulated container medium suppressive to *Rhizoctonia* damping-off of cabbage. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: 49-56.
- HUISMAN, O. C. and L. J. ASHWORTH, J. R. 1974. Quantitative assessment of *Verticillium albo-atrum* in field soils: procedural and substrate improvements. *Phytopathology* 64: 1043- 1044.
- JENSEN, B., I. M. B. KNUDSEN, and D. F. JENSEN, 2002. Survival of conidia of *clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Biopolaris sorokiniana*. *Biocontrol Sci. Tech.* 12: 427-441.
- KIM, J. T., I. H. PARK, H. B. LEE, Y. I. HAHM and S. H. YU, 2001. Identification of *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum* causing wilt of tomato in Korea. *Plant Pathol. J.* 17: 222-226.
- KIM, K. K. A. and D. R. FRAVEL, 1990. Glucose oxidase as the antifungal principle of talaron from *Talaromyces flavus*. *Can. J. Microbiol.* 36: 760-764.
- KOEHL, J. 1989. *Eingung von staeminen aus der gattung Trichoderma fur die biologische Bekämpfung phytopathogene pilze.* Wissenschaftlicher Fachverlag, Gissen, Germany, 150 pp.
- KOEHL, R. J. and C. F. LEWIS, 1984. *Cotton.* Madison, Wiscosin: American Society of Agronomy, 605 pp.
- MANSOORI, B. 2011. An improved ethanol medium for efficient recovery and estimation of *verticillium dahliae* populations in soil. *Can. J. Plant Pathol.* 33: 88-93.
- MAROIS, J. J., D. R. FRAVEL and G. C. PAPAIVIZAS, 1984. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 16: 387-390.
- MAROIS, J. J., S. A. JOHNSTON, M. T. DUNN and G. C. PAPAIVIZAS, 1982. Biological control of *Verticillium* wilt of eggplant in the field. *Plant Disease* 66:1166- 1168.
- MC LAREN, D. L., H. C. HUANG and S. R. RIMMER, 1982. Hyphal intraction occurring

- between *Sclerotinia sclerotiorum* and *Penicillium vermiculatum*. Can. J. Plant Pathol. 4: 308 (Abstract).
- MITCHELL, D. A., M. BEROVIC and N. KRIEGER, 2000. New products and new areas of bioprocess engineering. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 68: 61-138.
- NARAGHI, L., A. HEYDARI and D. ERSHAD, 2006. Sporulation and survival of *Talaromyces flavus* on different plant material residues for biological control of cotton wilt caused by *Verticillium dahliae*. Iran. J. Plant. Path. 42: 381-397 (in Persian with English summary).
- NARAGHI, L., A. HEYDARI, S. REZAEI, M. RAZAVI and H. AFSHARI-AZAD, 2010a. Biological control of Verticillium wilt of greenhouse cucumber by *Talaromyces flavus*. Phytopathol. Mediterr. 49: 321-329.
- NARAGHI, L., A. HEYDARI, S. REZAEI, M. RAZAVI and H. JAHANIFAR, 2010b. Study on antagonistic effects of *Talaromyces flavus* on *Verticillium albo-atrum*, the causal agent of potato wilt disease. Crop Prot. 29: 658-662.
- NARAGHI, L., A. HEYDARI, S. REZAEI, M. RAZAVI, H. JAHANIFAR and E. MAHMOODI KHALEDI, 2010c. Biological control of tomato Verticillium wilt disease by *Talaromyces flavus*. J. Plant Protection Res. 50: 360-365.
- PANDY, A., P. SELVAKUMAR, C. R. SOCCOL and P. NIGAM, 1994. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Wiley Eastern Publisher, New Delhi, PP: 3- 10.
- RAHMAN KHAN, M. and S. MAJID KHAN, 2001. Biomangement of Fusarium wilt of tomato by the soil application of certain phosphates solublizing microorganisms. Int. J. Pest Manag. 47: 227-231.
- RINI, C. R. and K. K. SULOCHANA, 2006. Management of seedling rot of chilli (*Capsicum annum* L.) using *Trichoderma spp.* and fluorescent pseudomonads (*pseudomonas fluorescens*). J. Trop. Agric. 44: 79-82.
- SIDDIQUEE, S., U. K. YUSUF, K. HOSSAIN and S. JAHAN, 2009. In vitro studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. J. Food Agr. Environ. 7: 970-976.
- SRINON, W., K. CHUNCHEEN, K. GIRATTIWARUTKUL, K. SOYTONG, and S. KANOKMEDHAKUL, 2006. Efficacies of antagonistic fungi antagonist Fusarium wilt disease of cucumber and tomato and the assey of its enzyme activity. J. Agric. Technol.

نراقی و همکاران: بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر وقوع بیماری‌های پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه پنبه

2: 191-201.

TJAMOS, E. C. 1991. Recovery of olive tree with *Verticillium dahliae* after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease* 75: 557-562.

WILLIAMS, J., J. M. CLARKSON, P. R. MILLS and R. M. COOPER, 2003. A selective medium for quantitative reisolation of *Trichoderma harzianum* from *Agaricus bisporus* compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4190-4191.

WRIGHT, P. R. 1999. Premature senescence of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)—predominantly a potassium disorder caused by an imbalance of source and sink. *Plant and Soil* 211: 231-239.

ZAD, S. J. 1987. Mycoflora of cotton seed in Iran. *Rev. Plant Pathol.* 66: 4311.

Address of the authors: Dr. L. NARAGHI and Dr. A. HEYDARI, Department of Plant Diseases Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran, Iran; Eng. A. AHMADI, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center; Eng. S. SARKARI and N. MALEKI, Ardebil Agricultural and Natural Resources Research Center.