مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۲۳-۱۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

اثر تلفیقی چند قارچ‌کش سنتتیک با چند عامل بیولوژیک در کنترل مرگ گیاهچه ریزوکتونیایی پنبه

Integrative effect of some synthetic fungicides with some biological agents in control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings

لیلا موسوی میرک، اکبر شیرزاد*، داود محمدی
Mosavi Mirak Leila, Shirza Akbar*, Mohammadi Davoud

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashirzad@azaruniv.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۷ – تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲)

چکیده

قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* یکی از بیمارگرهای خاک‌زاد مهم است که دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و باعث مرگ گیاهچه یا پوسیدگی طوقه و ریشه در گیاهان میزبان می‌شود. استفاده از چند عامل کنترل در مدیریت تلفیقی آفات و بیماریها به عنوان یکی از روش‌های کارآمد در کنترل عوامل بیمارگر توصیه شده است که اهمیت آن به‌خصوص در بحث مدیریت مقاومت به سموم متداول بسیار زیاد است. در این بررسی، مقادیر EC_{50} و EC_{25} سه قارچ‌کش زینب، کاپتان و کربوکسین‌تیرام و دو عامل بیوکنترلی *Pseudomonas fluorescens* 73 و *Trichoderma harzianum* T22 در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای علیه بیمارگر *Rhizoctonia solani* در بیماری مرگ گیاهچه پنبه مورد بررسی قرار گرفت. در بین قارچ‌کش‌های مورد بررسی، کربوکسین تیرام با EC_{50} معادل ppm ۰/۰۵ در مقایسه با زینب و کاپتان در کنترل بیمارگر موثرتر بود. در اختلاط قارچ‌کش‌های شیمیایی با آنتاگونیست *T. harzianum* T22 بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به ترکیب مقادیر EC_{50} آنتاگونیست با قارچ‌کش کربوکسین‌تیرام بود (۷۵٪). همچنین در اختلاط قارچ‌کش‌ها با باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 نیز بیشترین بازدارندگی مربوط به ترکیب تیماری مقادیر EC_{50} و EC_{25} باکتری آنتاگونیست با قارچ‌کش کاپتان به‌دست آمد (هر دو ۷۵٪). در مطالعات گلخانه‌ای که تاثیر عوامل کنترلی به صورت انفرادی و در ترکیب با یکدیگر مورد بررسی قرار گرفته بودند، بیشترین کنترل در شاهد مثبت و EC_{50} قارچ‌کش‌ها در ترکیب با *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73 مشاهده شد. در این بررسی مشخص شد که تلفیق روش‌های کنترل در مدیریت این بیماری، نتیجه قابل قبولی در شرایط آزمایشگاهی دارد و در گلخانه نیز با این روش مدیریت تلفیقی، امکان کنترل بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه پنبه افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی

کنترل تلفیقی
رایزوکتونیا
کنترل بیولوژیک
Trichoderma
Pseudomonas

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

مقدمه

سالهاست که روش کنترل شیمیایی از راه‌های موثر و مهم در کنترل بیماری‌های گیاهی بوده است. هر چند سموم شیمیایی به‌دلیل سهولت استفاده و اثر سریع در کنترل بیماری‌ها و آفات نقش ارزنده‌ای دارند، لاکن موجب بروز مشکلات زیست محیطی می‌شوند. هزینه‌ی تولید و مصرف این مواد و باقی‌مانده‌ی سموم، سرطان‌زا بودن و بحث مقاومت آفات و بیمارگرها به سموم شیمیایی نیز از مشکلات استفاده وسیع از آفت‌کش‌ها می‌باشد (Berger, 1995). در هر صورت باید به این نکته توجه داشت که حتی امروزه نیز سموم شیمیایی در عمل نیرومندترین سلاح کنترل بیماری‌های گیاهی به‌شمار می‌روند و احتمالا بشر هرگز از آن‌ها کاملا بی‌نیاز نخواهد شد (Biljana, 2018).

در کشاورزی پایدار، کاهش وابستگی مدیریت بیماری‌های گیاهی به استفاده از سموم شیمیایی از اهداف عمده است. از جمله روش‌های جایگزین، روش کنترل بیولوژیکی را می‌توان ذکر کرد، ولی روش کنترل بیولوژیکی هم دارای محدودیت‌هائی مانند رقابت میکروبی و کارایی کم در شرایط نامساعد محیطی می‌باشد. این موضوع در مورد بیمارگرهای خاکزاد اهمیت بیشتری دارد و پیچیدگی اکوسیستم خاک، کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای ریشه را با چالش جدی مواجه می‌سازد. برهم‌کنش‌های بین میزبان، بیمارگر، آنتاگونیست و محیط خاک، باعث عدم ثبات کارایی و عملکرد عوامل بیوکنترل در مناطق و فصول مختلف می‌شود. عوامل بیولوژیکی باعث کنترل بیماری به‌طور موثر و سازگار با محیط زیست می‌شوند، اما اغلب نسبت به عوامل محیطی حساس، غیر قابل پیش‌بینی و تهیه‌ی فرمولاسیون از آن‌ها اغلب پر هزینه و زمان‌بر می‌باشد (Gerbore *et al*. 2014; Brewer and Larkin 2005). با به‌کارگیری روش‌های مدیریت تلفیقی و استفاده از چند روش کنترلی از جمله روش بیولوژیکی به‌همراه روش شیمیائی می‌توان تا حدی این معایب را برطرف نمود. کاربرد تلفیق عوامل بیوکنترل با قارچکش‌های سیستمیک یکی از استراتژی‌های موفق مدیریت تلفیقی است. در موارد زیادی مشخص شده است که کارائی عوامل بیوکنترل در تلفیق با قارچ‌کش‌های سنتتیک بیشتر می‌شود. البته به‌شرطی که این عوامل باهم سازگار بوده و آفت‌کش‌های به‌کار رفته، اثر منفی روی این عوامل بیوکنترل نداشته باشند (Budge and Whipps, 2001).

برهم‌کنش‌های مثبت و منفی بین عوامل بیوکنترل و میکروفلور بومی می‌تواند در چگونگی عمل آنها در ریزوسفر موثر باشد. برای مثال، دو گروه از میکروارگانیسم‌هایی که زیستگاه اکولوژیکی یکسان و نیازهای تغذیه‌ای مشابهی دارند، برای به دست آوردن غذا با همدیگر به رقابت خواهند پرداخت و این موضوع کارایی آنها را تحت تاثیر قرار خواهد داد (Fukui 1994; Raaijmakers *et al*.1995). مطالعات مختلفی در راستای کارایی تلفیق دو عامل کنترلی به خصوص روش شیمیایی و بیولوژیک صورت گرفته است و در این بین، علاوه بر کنترل موثرتر در تلفیق دو عامل، تاثیر احتمالی عوامل کنترل بر یکدیگر و سازگاری این عوامل در تلفیق باهم موضوع مطالعه محققین مختلف بوده است (Panyda *et al*. 2012; Tapwal *et al*. 2012). در یک بررسی، هفت قارچ‌کش سیستمیک تریفلومیزول، بیترتانول، ازوکسی استروبین، تبوکونازول، تریادیمورف، پروپیکونازول، هگزاکونازول و دو قارچ کش تماسی کوپر هیدروکسید، کوپر اکسی‌کلراید، پنج حشره‌کش پروپارژیت، اندوسولفان، فنپروپاترین، دیکوفول، کینالفوس و سه حشره‌کش بیولوژیکی نیمبیسایدین، پونیم و اویس روی عامل بیوکنترلی *T. harzianum* برای سازگاری اختلاط مورد مطالعه قرار گرفتند که از بین آن‌ها قارچ‌کش‌های سیستمیک بیترتانول و آزوکسی استروبین و سه حشره‌کش تماسی دیکوفول، کینالفوس و اندوسولفان سازگاری خوبی با عامل بیوکنترلی داشتند، اما حشره‌کش‌های بیولوژیکی، ناسازگار با عامل بیوکنترلی گزارش شدند (Sarkar 2010). همچنین در بررسی مشابهی اثر قارچ‌کش‌های کوپراکسی کلراید، هگزاکونازول، پروپیکونازول و کاربندازیم بر روی *T. harzianum* نشان داد که به غیر از قارچ‌کش تماسی کوپراکسی کلراید بقیه‌ی آن‌ها روی این عامل بیوکنترلی اثر سمی دارند (Islam *et al*. 2011). تحقیقات Adolf and David (1994) نیز نشان داده است که قارچهای آنتاگونیست *Trichoderma* و *Gliocladium* با بسیاری از ترکیبات آفت‌کش شیمیایی از جمله کاربوکسین، کاپتان، کوپراکسی‌کلراید و متالاکسیل سازگار بوده‌اند. حالت هم‌افزایی *Streptomyces* sp. با قارچ‌کش‌های مانکوزب و

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

کاربندازیم گزارش شده است که باعث ممانعت از جوانه‌زنی اسپور و کاهش زیست‌توده‌ی قارچی ناشی از پژمردگی *F. udum* در نخود کفتری *Cajanus cajan* شده است. مقدار EC_{50} برای باکتری،$^{6}10$ اسپور بر میلی‌لیتر و برای دو قارچ‌کش مانکوزب و کاربندازیم به ترتیب ۴۰ و۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (Singh and Chhatpar 2011). باکتری *P. fluorescense* در ترکیب با قارچ‌کش بنومیل حالت هم‌افزایی را در کنترل زردی کلم *F. oxysporum* نشان داد (Someya *et al*. 2007). بررسیها نشان داده که *T. harzianum* T22 در ترکیب با قارچ‌کش‌های شیمیایی بهترین نتیجه را در کنترل پاتوژن‌های خاک‌زاد دارد (Harman 2000). اختلاط عامل بیولوژیکی *T. harzianum* و قارچ‌کش فلوتونالیل در کنترل *R. solani* در سیب‌زمینی نشان داد که کنترل این بیمارگر به‌خصوص هنگامی که در فاصله‌ی ۳۰ میلی‌متری غده استفاده شود، بهترین نتایج را در کاهش بیماری نسبت به حالتی که هرکدام از عوامل به تنهایی استفاده شوند، دارد (Wilson *et al*. 2008). کنترل توسط آنتاگونیست *B. subtilis* Nj-18 در ترکیب با قارچ‌کش‌های فلوتونالیل به‌عنوان اسپری برگی و دیفن‌کونازول با ضدعفونی بذر نتایج بهتری را در کاهش بیماری نسبت به استفاده انفرادی در کنترل *R. cerealis* در گندم نشان داده است (Shandong *et al*. 2014).

همچنین دو باکتری آنتاگونیست *Streptomyces philanthi* RM-1-138و *B. subtilis* درترکیب با قارچ‌کش‌های کاربندازیم، والیدامایسین، پروپیکونازول و مانکوزب در کنترل *R. solani* PTRRS-9 در برنج مورد بررسی قرار گرفت و از بین آنها موفقیت بهتر در ترکیب با قارچ‌کش‌های کاربندازیم و پروپیکونازول به‌دست آمد (Boukaew *et al*. 2013). طی تحقیقی، ترکیب آنتاگونیست قارچی *F. oxysporum* strain cs20 با قارچ‌کش‌های تیرام، کلروتالونیل، آزوکسی استروبین، مانکوزب، مفنوکسیم و کلروتالونیل در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در مقابل *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* مورد بررسی قرار گرفت. از بین قارچ‌کش‌های مورد استفاده، کلروتالونیل، آزوکسی استروبین در شرایط آزمایشگاهی و قارچ‌کش تیرام در شرایط گلخانه‌ای برای این آنتاگونیست سمی بود. تلفیق *T. harzianum* با قارچ‌کش PCNB در کنترل رایزوکتونیای گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت که به علت تاثیر منفی قارچ‌کش برروی آنتاگونیست باعث شکست این کنترل تلفیقی شد (Henis *et al*. 1978). کارایی روش‌های مختلف کنترلی از جمله تلفیق دو یا چند روش و بخصوص اگر یک جزء تلفیق عامل بیوکنترلی قارچی یا باکتریایی باشد بسته به نوع میزبان، نحوه استفاده، محل استفاده و نوع آفت‌کش مورد استفاده ممکن است بالا و یا بسیار پایین باشد. آگاهی درست از نحوه تعامل و سازگاری دو عامل کنترلی در بحث تلفیق آنها برای کنترل هر عامل بیمارگر و شرایط استفاده بسیار حائز اهمیت است (Fravel *et al*. 2005).

Rhizoctonia solani یکی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد مهم پنبه بوده و قادر به حمله به طیف وسیعی از گیاهان می‌باشد که باعث پوسیدگی ریشه، طوقه، سوختگی برگ، و گیاهچه میری در گیاهان میزبان می‌شود (Ajayi-Oyetunde and Bradley 2018). هر چند روش‌های کنترلی مختلف از جمله روش‌های بیولوژیکی برای این عامل گزارش شده است (Brewer M and Larkin 2005) ولی در بحث مدیریت تلفیقی، تلفیق چند عامل کنترلی برای مبارزه با این بیمارگر مهم ارزش بالایی دارد. در این پژوهش، تاثیر تلفیق چند قارچ‌کش شیمیایی و دو عامل بیوکنترل *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens 73* در کنترل این بیماری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* T22 از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز و جدایه آنتاگونیست *P. fluorescens* 73، و بیمارگر *R. solani* AG4 از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد.

بررسی تاثیر قارچ‌کش‌های شیمیایی بر رشد بیمارگر

در این بررسی از پودر وتابل سه قارچ‌کش زینب (80% WP)، کاپتان (50% WP) و کربوکسین تیرام (75% WP) استفاده شد. برای هر یک از قارچ‌کشها یک محدوده‌ی غلظت کلی ppm ۱۰،۵۰، ۵۰۰ ، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ در محیط کشت PDA تهیه شد و یک حلقه‌ی میسلیومی از کشت تازه قارچ بیمارگر *R. solani* AG4

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

در آن محیط‌ها کشت داده شد و بعد از گذشت چهار روز، میزان مهار رشد بیمارگر نسبت به شاهد (محیط کشت بدون قارچ‌کش) با اندازه‌گیری میزان رشد قطری ریسه‌های بیمارگر ارزیابی گردید. از فرمول شماره ۱ برای محاسبه درصد بازدارندگی استفاده شد. غلظت موثر برای جلوگیری از رشد توده قارچی با نام Effective Concentration (EC) با نرم افزار SPSS و تجزیه پروبیت محاسبه گردید.

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد} = \frac{Gc - Gt}{Gc} \times ۱۰۰ \qquad [۱]$$

Gc: میزان رشد در شاهد، Gt: میزان رشد در تیمار

بررسی تاثیر آنتاگونیست‌های *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73 بر رشد بیمارگر

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون غلظت‌های $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۲}$ اسپور در میلی‌لیتر قارچ *T. harzianum* T22 در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌لیتر PDA پخش شد. آنگاه بیمارگر در این محیط‌ها کشت گردید. تیمار محیط PDA بدون اسپور آنتاگونیست به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد. پس از چهار روز میزان رشد کلنی بیمارگر اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شد.

در مورد آنتاگونیست باکتریایی نیز غلظت‌های $۱۰^{۷}$، $۱۰^{۶}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۲}$ سلول در میلی‌لیتر باکتری تهیه و به‌طور جداگانه به صورت دو نقطه‌ای در محیط PDA+NA کشت داده شدند. سپس بیمارگر فوق در قسمت وسط پتری قرار داده شد و رشد آن با اندازه‌گیری سطح رشد کلنی در آن محدوده‌ها بررسی گردید. مطابق روش مورد استفاده در بخش بررسی اثر قارچ‌کش‌ها، درصد مهارکنندگی رشد و مقادیر (EC) Effective Concentration برای آنتاگونیست‌ها نیز محاسبه گردید.

بررسی تاثیر مقادیر EC_{50} و EC_{25} قارچ‌کش‌ها در رشد آنتاگونیست‌های *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73

چون از مقادیر EC_{25} و EC_{50} قارچ‌کش‌ها در بررسی تلفیقی استفاده خواهد شد، تاثیر مقادیر EC_{25} و EC_{50} قارچ‌کش‌های مورد مطالعه بر رشد میسلیومی *T. harzianum* T22 و جمعیت سلولی *P. fluorescens* 73 مورد بررسی قرار گرفت تا اثرات سوء احتمالی قارچ‌کش‌ها بر آنتاگونیست‌ها مشخص شود. برای این منظور، در محیط PDA دارای EC_{25} و EC_{50} سموم مورد مطالعه به‌طور جداگانه، یک حلقه میسلیومی از قارچ *T. harzianum* T22 کشت داده شد. با پر شدن تشتک پتری شاهد، میزان تاثیر احتمالی قارچکش‌ها در رشد *T. harzianum* بررسی شد. همچنین برای بررسی تاثیر احتمالی قارچ‌کش‌ها بر آنتاگونیست باکتریایی *P. fluorescens* 73 به محیط کشت LB حاوی EC_{25} و EC_{50} سموم مورد مطالعه، ۲۰ میکرولیتر از کشت تازه‌ی باکتری *P. fluorescens* 73 با غلظت $۱۰^{۵}$ CFU/ml اضافه شد. بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۷°C با ۱۶۰ دور در دقیقه، میزان تکثیر باکتری با شاهد بدون قارچ‌کش مورد مقایسه قرار گرفت. ارزیابی رشد باکتری با شمارش جمعیت آن با اسپکتروفتومتر مشخص گردید. برای اینکه مطمئن باشیم آنتاگونیست‌های مورد مطالعه در این آزمون هنوز هم فعال هستند، بازکشت نیز صورت گرفت.

بررسی اثر اختلاط قارچ‌کش‌های شیمیایی با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

بعد از تهیه دو غلظت EC_{50} و EC_{25} برای هریک از سموم شیمیایی مورد استفاده (کاپتان، کربوکسین‌تیرام و زینب) و قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22، تلفیق دو غلظت از عامل بیولوژیک و سموم شیمیایی با چهار حالت ممکن (EC_{50} آنتاگونیست + EC_{50} قارچ‌کش، EC_{25} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش، EC_{50} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش و EC_{25} آنتاگونیست + EC_{50} قارچ‌کش) در محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت. در محیط حاوی غلظت‌های مختلف قارچ‌کش، میزان مورد نیاز از سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* T22 اضافه شد تا میزان غلظت مورد نظر حاصل شود. سپس در این تشک‌های پتری، قارچ بیمارگر *R. solani* کشت داده شد. نتایج آزمایش پس از پرشدن تشتک پتری شاهد بررسی شد. آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی در چهار تکرار انجام شد.

بررسی تاثیر اختلاط قارچ‌کش‌های شیمیایی و باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens 73* در کنترل بیمارگر

ابتدا در محیط کشت NA تلفیق بین باکتری *P. fluorescens* 73 و سموم شیمیایی در چهار ترکیب مختلف (EC_{50} آنتاگونیست +

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

EC_{50} قارچ‌کش، EC_{25} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش، EC_{50} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش و EC_{25} آنتاگونیست + EC_{50} قارچ‌کش) به طور جداگانه انجام گرفت و قارچ بیمارگر ریزوکتونیا در این محیط، کشت گردید. نتایج آزمایش پس از پرشدن تشتک پتری شاهد بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

بررسی اثر باکتری *P. fluorescens* 73 روی قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22

بررسی اثر احتمالی باکتری *P. fluorescens* 73 در رشد میسلیومی *T. harzianum* T22 در محیط PDA+NA با کشت دو نقطه‌ای مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که در دو طرف حاشیه‌ی تشتک پتری ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های باکتری (غلظت 10^7 و 10^5 سلول بر میلی‌لیتر معادل EC_{50} و EC_2) به‌طور جداگانه با رعایت فاصله‌ی یک سانتی‌متری از حاشیه‌ی پتری‌ها کشت گردید و یک حلقه‌ی میسلیومی از آنتاگونیست قارچی در وسط پتری قرار داده شد. اندازه‌گیری رشد قارچ آنتاگونیست نسبت به شاهد تا پر شدن پتری شاهد ادامه یافت. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

تاثیر تلفیق باکتری *P. fluorescens 73* با قارچ *T. harzianum T22* در کنترل بیمارگر

در این بررسی، تلفیق دو غلظت $10^3 \times 6$ و $10^2 \times 3$ اسپور بر میلی‌لیتر از قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 به ترتیب با دو غلظت 10^7 و 10^5 سلول بر میلی‌لیتر باکتری *P. fluorescens* 73 به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گرفت (غلظت‌ها بر اساس EC_{50} و EC_{25} دو عامل تعیین گردید). سوسپانسیون باکتریایی + سوسپانسیون آنتاگونیست قارچی به‌طور ترکیبی بکار برده شد. این آزمایش در چهار حالت (EC_{50} دو آنتاگونیست ، EC_{25} دوآنتاگونیست ، EC_{50} آنتاگونیست قارچی+ EC_{25} آنتاگونیست باکتریایی و EC_{25} آنتاگونیست قارچی+ EC_{50} آنتاگونیست باکتریایی) انجام شد. در هر تیمار، در یک نقطه پتری به فاصله ۱ سانتیمتر از حاشیه، میزان ۲۰ میکرولیتر از مخلوط دو آنتاگونیست با غلظتهای ذکر شده کشت شد و در نقطه مقابل، یک دیسک پنج میلی‌متری از بیمارگر کشت داده شد. میزان بازداری از رشد میسلیومی بیمارگر پس از پر شدن تیمار شاهد ارزیابی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در چهار تکرار انجام گرفت.

بررسی گلخانه‌ای تاثیر هر یک از عوامل کنترلی و تلفیق آنها بر کنترل بیمارگر در گیاه پنبه

بعد از اثبات بیماری‌زایی *R. solani* AG4 در روی پنبه رقم ورامین، اثر تیمارهای کنترلی روی این بیمارگر به شرح زیر بررسی گردید: اینوکلوم قارچ بیمارگر به روش Pal *et al*. (2001) تهیه شد. گلدانها با خاک استریل حاوی یک گرم اینوکلوم بیمارگر به ازای یک کیلوگرم خاک پر شدند. پس از ضدعفونی بذور با هیپوکلریت سدیم ۵٪ ، در هر گلدان پلاستیکی چهار بذر پنبه کشت گردید. برای تهیه‌ی اینوکلوم *T. harzianum* T22 از کشت هشت روزه‌ی قارچ زمانی که در حال اسپورزایی بود از یک قطعه پنج میلی‌متری در اطراف هر بذر استفاده گردید. برای بررسی اثر کنترلی باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 نیز از روش Pal *et al*. (2001) استفاده شد. باکتری در محیط کشت LB به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. غلظت آن به مقدار 10^7 سلول بر میلی‌لیتر با اسپکتروفتومتر تنظیم گردید. برای هر بذر کشت شده یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری در حاشیه خاک اطراف بذر استفاده شد. دو غلظت EC_{50} و EC_{25} هر یک از قارچ‌کش‌های مورد مطالعه در ترکیب با مقادیر EC_{50} هر کدام از آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی(*T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73) به‌طور جداگانه مطالعه شدند. بعد از ۲۰ روز فاکتورهای رشدی گیاه شامل ارتفاع بوته و وزن تر و خشک، اندازه‌گیری شد. در مجموع از یک غلظت معادل EC_{50} آنتاگونیست‌ها با دو غلظت EC_{50} و EC_{25} قارچ‌کش‌ها در مطالعات تلفیق در شرایط گلخانه‌ای استفاده شد. شدت بیماری با تبعیت از روش Kim *et al*. (1977) با مقیاس صفر تا پنج به شرح زیر ارزیابی شد: "۰" گیاهان سالم بدون هیچ‌گونه علائم آلودگی، "۱" کمتر از ۲۰ ٪ریشه آلوده شده و دارای حداقل یک شانکر قهـوه‌ای درشت، "۲" حدود ۵۰ ٪ ریشه دارای شانکرهای تیپیک باشد،" ۳" بیش از ۶۰-۷۰ ٪ ریشه دارای شانکر باشد، "٤" مرگ گیاهچه پس از خروج گیاهچه از خاک (Postemergence)، طول

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

گیاهچه کمتر از پـنج سانتی‌متر باشد، "۵" مرگ گیاهچه قبل از خروج از خاک (Preemergence) یا پوسیدگی بذر شاخص بیماری (Disease Index(DI بر حسب درصد و بـا اسـتفاده از فرمـول شماره ۲ محاسبه شد.

$$\%DI=\frac{(A\times B)}{5\times T}\times 100 \quad [۲]$$

A: مقیاس آلودگی،B: تعداد گیاهان آلوده در مقیاس، T: تعداد کل تیمارها. مخرج کسر حداکثر مقیاس آلـودگی × تعـداد کل تیمارها است که نتیجه آن حداکثر شدت بیماری ممکـن می‌باشد.

تجزیه آماری برای محاسبه مقادیر موثر بر مهار رشد بیمارگر از تجزیه پروبیت با استفاده از نرم افزار SPSS (V 16) استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ی دانکن با نرم افزار MSTAT-C انجام شد.

نتایج و بحث

تاثیر قارچ‌کش‌های شیمیایی و آنتاگونیست‌ها بر رشد بیمارگر

بر اساس نتایج حاصل از بازداری از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر توسط غلظت‌های مورد آزمایش هر یک از عوامل بیولوژیکی و قارچ‌کش‌ها، مقادیر EC_{75} ، EC_{50} و EC_{25} محاسبه شده با تجزیه پروبیت برای قارچ‌کش‌ها و آنتاگونیست‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود قارچ‌کش کربوکسین تیرام با EC_{50} معادل ۰/۰۵ ppm بیشترین تاثیر را در بین قارچ‌کش‌ها نشان داد. مقدار EC_{50} برای قارچ آنتاگونیست ۶×۱۰^{۳} اسپور بر میلی‌لیتر و برای باکتری آنتاگونیست $۱۰^{۷}$ سلول بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

تاثیر قارچ‌کش‌های شیمیایی روی عوامل بیولوژیک

در بررسی تاثیر غلظت‌های EC_{50} وEC_{25} قارچ‌کش‌های مورد مطالعه بر روی رشد آنتاگونیست قارچی و باکتریایی، کاهش رشد معنی‌داری مشاهده نشد. هچنین مقادیر EC_{50} وEC_{25} باکتری *P. fluorescens* 73 بر رشد قارچ *T. harzianum* T22 تاثیر منفی نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است).

اختلاط سموم شیمیایی با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

نتایج حاصل نشان می‌دهد که درصد بازدارندگی تیمارهای تلفیقی قارچ آنتاگونیست با قارچ‌کش‌ها در مقایسه با هر یک از تیمارهای انفرادی بیولوژیکی و شیمیایی در کنترل بیمارگر معنی‌دار است. بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به ترکیب مقادیر EC_{50} آنتاگونیست تریکودرما با قارچ‌کش کربوکسین‌تیرام است (جدول۲). با توجه به آنالیز داده‌ها اثرات هم‌افزایی در تلفیق توأم سموم شیمیایی با عوامل بیولوژیکی در غلظت‌های مختلف وجود دارد و حتی تلفیق غلظت‌های پایین آنتاگونیست‌ها و قارچ‌کش‌ها هم می‌تواند در کنترل بیمارگر در مقایسه با تاثیر هر کدام از این عوامل به‌طور جداگانه بهتر عمل نماید (جدول ۲).

تلفیق قارچ‌کش‌ها با باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 در کنترل بیمارگر

تمام تیمارها باعث بازداری از رشد بیمارگر *R. solani* شدند، اثر تیمارهای ترکیبی در مقایسه با استفاده‌ی هر کدام از این عوامل به طور جداگانه، معنی‌دار بود. بیشترین بازدارندگی مربوط به ترکیب تیماری مقادیر EC_{50} و EC_{25} باکتری آنتاگونیست با قارچ‌کش کاپتان است (جدول ۲). نکته مهم تاثیر یکسان دو غلظت بالا و پایین این قارچ‌کش با یک غلظت از باکتری می‌باشد که در راستای کاهش مصرف غلظت سم مصرفی دارای اهمیت مدیریتی می‌باشد.

اختلاط باکتری*P. fluorescens* 73 با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

آنالیز میانگین داده‌ها نشان داد که اختلاف بین تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. بیشترین میانگین بازدارندگی به ترتیب به EC_{50} آنتاگونیست *T. harzianum* T22 با مقادیرEC_{50} و EC_{25} باکتری*P. fluorescens* 73 اختصاص دارد (جدول۳).

بررسی گلخانه‌ای تاثیر هر یک از عوامل کنترلی و تلفیق آنها بر رشد بیمارگر در گیاه پنبه

در این بررسی، بیشترین آلودگی‌ها مربوط به شاهد منفی (بدون اعمال روش کنترل) و EC_{25} قارچ‌کش‌های مورد مطالعه است. شاهد مثبت (بدون بیمارگر) بدون آلودگی بوده و کمترین

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

آلودگی در EC_{50} قارچ‌کش‌ها در ترکیب با تریکودرما و سودوموناس مشاهده شد. درصد جوانه‌زنی به مراتب با افزایش آلودگی رایزوکتونیایی کاهش یافت (جدول ٤). تلفیق مقادیر زیرکشنده قارچ‌کش‌ها با عوامل بیوکنترل تا ۵۰ درصد آلودگی به بیمارگر را کاهش داد. همچنین تلفیق دو عامل بیوکنترل با یکدیگر نیز به نحو موثری از آلودگی به بیمارگر جلوگیری کرد.

جدول ۰۱- مقادیر EC_{50} و EC_{25} قارچ‌کش‌ها و آنتاگونیست‌ها در کنترل *R. solani*

Table 1. EC_{25} and EC_{50} values of fungicides and antagonists in *R. solani* control

عامل کنترل	EC_{25} (٪۹۵ CL)	EC_{50} (٪۹۵ CL)*	EC_{75} (٪۹۵ CL)
زینب	۰/۹۵ (۰/۷۹ –۱/۱)	۲۸ (۲۵–۳۱)	۸٤ (۷۵–۹۵)
کاپتان	۱۱ (۰/۹ –۱۳)	۱۸ (۱۵ –۲۱)	۲۹ (۲٤–۳٦)
کربوکسین‌تیرام	۰/۰۲ (۰/۰۱–۰/۰۳)	۰/۰۵ (۰/۰٤–۰/۰۷)	۰/۱٦ (۰/۱۱ –۰/۲٤)
T. harzianum T22	۳×۱۰^{۲} (۱/۳×۱۰^{۲}–۵/۷ × ۱۰^{۲})	٦×۱۰^{۳} (۳/۳۹×۱۰^{۳}–۱۰/۵ × ۱۰^{۳})	۱۲۵×۱۰^{۳} (۵۹×۱۰^{۳}–۳۷۹ × ۱۰^{۳})
P. fluorescens 73	۱۰^{۵} (۳×۱۰^{٤}–۲/۵ × ۱۰^{۵})	۱۰^{۷} (۵×۱۰^{٦}–۲ × ۱۰^{۷})	۱۰^{۹}(٤/۵×۱۰^{۸}–۳/۸ × ۱۰^{۹})

*واحد غلظت‌های قارچ‌کش‌ها به صورت قسمت در میلیون (ppm) و واحد قارچ و باکتری آنتاگونیست به ترتیب اسپور و سلول بر میلی‌لیتر می‌باشد.

The units of fungicides concentrations, the fungal antagonist and the bacterial antagonist are presented as parts per million (ppm), spore per ml and cell per ml, respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای اختلاط سموم شیمیایی با آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریائی در بازدارندگی از رشد بیمارگر

Table 2. Mean comparison of the effects of mixed chemical compounds in interaction with fungal and bacterial antagonists for pathogen growth inhibition.

تیمارها		زینب			کاپتان		کربوکسین تیرام	
		EC_0	EC_{50}	EC_{25}	EC_{50}	EC_{25}	EC_{50}	EC_{25}
T. harzianum	EC_0	-	٤۷/۳۳ g	۲٦/٦٦ h	٤۷/۳۳g	۲۵ h	٤۵/٦٦g	۲۳/۳۳ h
	EC_{50}	٤۳/ ۳۳g	٦۷/٦٦ bc	۵۰ fg	۷۳/۳۳ ab	۵۵ ef	۷۵ a	٦۰ de
	EC_{25}	۲٦/٦٦h	۵۵ ef	۵۰fg	٦۵ cd	۵۵ ef	٦۰ de	٦۰ de
P. fluorescens	EC_0	-	٤۷/۳۳c	۲٦/٦٦e	٤۷/۳۳c	۲۵e	٤۵/٦٦c	۲۳/۳۳e
	EC_{50}	٤٦c	٤٦/٦۷ c	٤۵ c	۷۵ a	۷۵ a	٦۰ b	٦۵ b
	EC_{25}	۲۵ e	٤٦/٦۷ c	۲۵ e	۵۰ c	۳۵ d	٦۰ b	۳۰ de

حروف مشابه در غلظت‌های مختلف هر عامل کنترل بیولوژیک نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۵٪ است.

Means indicated by the same letter in different treatments, show no significant difference (p=0.05) according to the Duncan's test.

جدول ۰- مقایسه میانگین تیمارهای اختلاط باکتری *P. fluorescens* 73 با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 بر رشد بیمارگر

Table 3. Mean comparison of the *P. fluorescens* 73 mixed with *T. harzianum* T22 in inhibition of pathogen growth

تیمارها	EC_0P	$EC_{50}P$	$EC_{25}P$
EC_0T	-	٤٦±۱cd	۲۵±۰ e
$EC_{50}T$	٤۳/۳۳± ۳/۳d	٦۰±۲ a	۵۵± ۲/۸ab
$EC_{25}T$	۲٦/٦٦±۱/٦٦ e	۵۰±۱/۲ bc	٤۵±۲/۸ c

*T: *T. harzianum* T22 , P : *P. fluorescens* 73

حروف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۵٪ است.

Values indicated by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to the Duncan's test

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

جدول ٤- تاثیر تیمارهای مختلف بر بیماری‌زایی قارچ *R. solani* روی گیاه پنبه

Table 4. The effect of different treatments on pathogenicity of *R. solani* on cotton plant

بدون آلودگی	آلودگی کمتر از ۲۰٪	آلودگی۵۰٪	آلودگی۶۰ الی ۷۰ ٪	مرگ گیاهچه (Postemergence)	مرگ گیاهچه (Preemergence)
	EC_{50} Z+T	EC_{25} Z +T	EC_{50} Z	EC_{25} Z	
	EC_{50} C+T	EC_{25} C +T	EC_{50} C	EC_{25} C	
	EC_{50} Ct+T	EC_{25} Ct +T	EC_{50} Ct	EC_{25} Ct	
شاهد مثبت	EC_{50} Z +P	EC_{25} Z +P	P	_	شاهد منفی
	EC_{50} C +P	EC_{25} C +P	T	_	
	EC_{50} Ct +P	EC_{25} Ct +P	_	_	
	P+T	_	_	_	

P و T به‌ترتیب غلظت‌های EC_{50} *P. fluorescens* 73 و *T. harzianum* T22 می‌باشد. Z، C و Ct به‌ترتیب نشانه قارچ‌کش‌های زینب، کاپتان و کربوکسین‌تیرام است.

T and P are indicating the concentration of EC_{50} of *T. harzianum* and *P. fluorescens*, respectivily. Z, C, and Ct are presenting Zineb, Captan and Carboxin-thiram fungicides, respectively.

جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف بر فاکتورهای رشدی گیاه پنبه

Table 5. Mean comparison of the effect of different treatments on plant growth factors of cotton

ارتفاع (سانتی‌متر) Plant length (cm)	وزن خشک (گرم) Dry plant weight (g)	وزن تر (گرم) Fresh plant weight (g)	تیمار Treatment
۲۰/٦۰ fgh	۰/۱۰٦۰ chi	۱/٤۲۰ cdefg	EC_{50} Z
۱٤/۲۰ i	۰/۰٦٦ ۰۰ ij	۱/۲۰۰ efg	EC_{25} Z
۱۸/٦۰ fghi	۰/۰۸٤۰۰ ij	۱/۱۹٤ efg	EC_{50} C
۱٦/٦۰ ghi	۰/۰٦٤ ۰۰ ij	۱/۱٦۰ efg	EC_{25} C
۲۰/۲۰ efghi	۰/۰۸۲۰۰ ij	۱/۱۲۰ fgh	EC_{50} Ct
۱٥/٤۰ hi	۰/۰ ۸ ۰۰ ij	۱/۰٤۰gh	EC_{25} Ct
۳۳/۲۰a	۰/۱۷۸۲ cde	۱/۸۸۰ bcd	EC_{50} Z +T
۲٥/٤۰ bcde	۰/۱۰٦۰ chi	۱/۸۰۰bcde	EC_{25} Z +T
۳۰ ab	۰/۲٥۰۰ b	۲/۰٦۰c	EC_{50} C +T
۲۰/۲۱ defgh	۰/۱٥۰۰ ef	۱/٤٥٤ cdefg	EC_{25} C +T
۳۱/۲۰ ab	۰/۳۲۲۰ a	۲/٥٦۰ a	EC_{50} Ct +T
۲۳/٦۰ cdef	۰/۲۰٦۰۰ bcd	۲/ ۳۰۰ab	EC_{25} Ct +T
۲۹/٤۰ abc	۰/۲۲۲۰ bc	۱/۷٤۰ bcdef	EC_{50} Z +P
۲۱/٦۰ defgh	۰/۱٤٦۰ efg	۱/٦۲۰ cdefg	EC_{25} Z +P
۲۷ abcd	۰/۱٦۸۰ def	۱/۷۸۰ bcde	EC_{50} C +P
۲۱/۸۰ defgh	۰/۱۳۲۰ fgh	۱/٦٦۰ cdefg	EC_{25} C +P
۳۰/۸۰ ab	۰/۲٤۲۰ b	۱/۹۷۸ abc	EC_{50} Ct +P
۲۲/۸۰ defg	۰/۱۸٤۰ cde	۱/٤٦۰ cdef	EC_{25} Ct +P
۱٥/٦۰ hi	۰/۹٤۰۰ hi	۱/۰۳۸gh	P
۱٥/۸۰ hi	۰/۹٤۰۰ hi	۱/۰۲۰ gh	T
۲۷/٤۰ abcd	۰/۲۱۳۸ bc	۱/۷۲۰ bcdef	P+T
۷/۱۸۰ j	۰/۰ ٤۰۰j	۰/٥٤۰۰ h	کنترل منفی
۳۱/٤۰ ab	۰/۱۸٥۲ cde	۱/۲٦۰ defg	کنترل مثبت

P و T به‌ترتیب غلظت‌های EC_{50} *P. fluorescens* 73 و *T. harzianum* T22 می‌باشد. Z، C و Ct به‌ترتیب قارچ‌کش‌های زینب، کاپتان و کربوکسین‌تیرام است. حروف مشابه در هر ستون نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۱٪ است.

P and T are indicating the concentration of EC_{50} of *T. harzianum* and *P. fluorescens*, respectivily. Z, C, and Ct are presenting Zineb, Captan and Carboxin-thiram fungicides, respectively. Means in each column labeled by similar letters are not significantly different at p=0.01 probability level, using Duncan's Multiple Range Test

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

نتایج حاصل از تاثیر تلفیق عوامل کنترل بر پارامترهای رشدی گیاه پنبه تیمار شده با بیمارگر نشان می‌دهد که وزن تر، خشک و ارتفاع گیاه پنبه در حالت کنترل تلفیقی بیولوژیکی- شیمیایی بیشتر از کنترل هر کدام از این عوامل به تنهایی است. بیشترین وزن تر و خشک پنبه به ترتیب در تیمارهای تلفیقی معادل‌های EC_{50} تریکودرما با قارچ‌کش کربوکسین‌تیرام با مقدار ۲/۵۶۰ گرم و ۰/۳۲۲۰ گرم مشاهده شد. بیشترین ارتفاع محصول پنبه نیز در ترکیب غلظت بالای زینب با آنتاگونیست *T. harzianum* به‌دست آمد (جدول ۵).

یکی از مکانیسم‌های کنترلی آنتاگونیست تریکودرما عمدتاً میکوپارازیتیسم به حالت پیچش پیرامون هیف‌های بیمارگر و تداخل هیف‌ها در همدیگر می‌باشد (Tran 2010). البته، مزیت استفاده از *Trichoderma* spp. به‌عنوان یک قارچ‌کش بیولوژیک، فعال نمودن چندین مکانیسم بیوکنترلی مختلف به‌طور هم‌زمان در کنترل بیماری‌های خاک‌زاد است. لذا بوجود آمدن گونه‌های مقاوم بیمارگر در برابر آن عملا غیر ممکن است و این مزیت همراه با تلفیق‌پذیری و سازگاری با قارچ‌کش‌های معمول، اهمیت استفاده از این عامل در برنامه مدیریت تلفیقی را بالا می‌برد (Benitez *et al.* 2004). گزارش شده است که *T. harzianum* T22 با سموم شیمیایی، قارچ‌های میکوریزی و آفت‌کش‌ها تقریبا سازگار است (Harman 2000) که این موضوع در تحقیق حاضر نیز به اثبات رسید.

مکانیسم‌های بیوکنترلی که باکتری *P. fluorescense* بر علیه پاتوژن‌های خاک‌زاد به‌کار می‌برد اغلب پیچیده بوده و بیشترین ویژگی کنترلی آن به تولید آنتی بیوتیک نسبت داده شده است (Howell *et al.* 1988). یکی از این آنتی‌بیوتیک‌ها diacetylphloroglucnol 2-4 می‌باشد که در کنترل بیمارگرهای گیاهی خاک‌زاد نقش عمده‌ای دارد (Postma 2011). در بررسی حاضر نیز ترشحات نارنجی تا قهوه‌ای رنگ در آنتاگونیست باکتریایی P. fluorescense 73 تولید شد که احتمالا مربوط به تولید آنتی‌بیوتیک است، که می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی بیوکنترلی، نقش اصلی را در تخریب پاتوژن ایفا کند. البته این موضوع در بررسی تاثیر متابولیتهای باکتریایی قابل نفوذ در آگار هم مشخص شد (داده‌ها نشان داده نشده است).

ترکیب *P. fluorescens* با قارچ‌کش پنسیکرون در کنترل پوسیدگی ریشه‌ی گندم، کاهش دز مصرفی این قارچ‌کش را به دنبال داشت (Mathre *et al.* 1995). در این بررسی هم آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که تاثیر تلفیقی عوامل بیولوژیکی و شیمیایی در کنترل *R. solani* AG4 به مراتب بیشتر از استفاده‌ی هر کدام از این عوامل به تنهایی است. در بحث اختلاط، اگرچه بیشترین بازدارندگی‌ها مربوط به غلظت‌های بالاتر (EC_{50}) آنتاگونیست‌ها و قارچ‌کش‌های مورد مطالعه است، اما در تعدادی از تیمارها، استفاده از غلظت‌های بالای آنتاگونیست‌ها (*T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73) و غلظت‌های کم قارچ‌کش‌ها، بازدارندگی یکسانی در کنترل بیمارگر نشان داد. این موضوع از نظر کاهش دز مصرفی قارچ‌کش شیمیایی در برنامه مدیریت تلفیقی اهمیت دارد. احتمال دارد در این موارد قارچ‌کش‌ها به نحوی باعث افزایش فعالیت بیوکنترلی در غلظت‌های پایین (EC_{25}) عوامل آنتاگونیستی شده است یا اینکه هضم دیواره‌ی سلولی توسط آنتاگونیست‌ها باعث جذب بهتر قارچ‌کش‌ها شده و بیمارگر در حد قابل ملاحظه‌ای کنترل شده است. مشخص شده است که استفاده از غلظت پایین قارچ‌کش باعث کنترل ضعیف پاتوژن می‌شود اما وقتی با آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی ترکیب می‌شود آن‌ها را به آنتاگونیست‌هایی قوی تبدیل می‌کند که باعث افزایش فعالیت کنترلی نیز می‌گردد (Malathi *et al.* 2002).

در مواردی عدم موفقیت در تلفیق عوامل بیوکنترل با قارچ کش‌های سنتتیک نیز مشاهده شده است. گزارش شده که به‌دلیل تاثیر منفی قارچ‌کش PCNB در روی آنتاگونیست *T. harzianum*، تلفیق این دو عامل کنترلی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه موفقیت‌آمیز نبود و اثرات آنتاگونیستی در این نوع تلفیق مشهود است (Henis *et al.* 1978). در یک بررسی عدم سازگاری دو جدایه *Trichoderma* IBT-II و *Trichoderma* MT-4 w با قارچکش کاربندازیم در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد و مشخص گردید که جدایه MT-4 w حساس‌تر بوده و در کمترین غلظت بازدارندگی ۱۰۰٪ داشته است (Nongmaithem 2015). نشان داده شده که از پنج قارچ‌کش مورد مطالعه (DitaneM-45,

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

(ridomil, captaf, bluecopper, bavistin) در تلفیق با *T. viride*، فقط دو قارچ‌کش کاپتاف (Captaf) و کات کبود (Blue copper) سازگار بودند (Ashwani T, *et al*. 2012). در این پژوهش، در شرایط آزمایشگاهی هرچند تمام تیمارهای تلفیقی بهتر از تیمارهای انفرادی عمل کردند، لاکن سازگاری بیشتری در تلفیق *T. harzianum* T22 با قارچ‌کش کربوکسین‌تیرام و تلفیق *P. fluorescens* 73 با قارچ‌کش کاپتان مشاهده شد. احتمال می‌رود علت هم افزایی این باشد که دو جزء تلفیقی به نحوی باعث افزایش فعالیت یکدیگر شده‌اند و رشد بیمارگر نیز به نحو زیادی تحت تاثیر قرار گرفته است. در گزارشی اسپور باکتری *B. subtilis* بسیار متحمل به شرایط محیطی و تنش‌ها از جمله قارچ‌کش بوده است و همراه با استفاده‌ی یک قارچ‌کش سازگار باعث افزایش فعالیت بیوکنترلی آن از جمله افزایش میزان و فعالیت آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های دخیل در فعالیت کنترلی شده است. همچنین امکان کاهش دز مصرفی قارچ‌کش فلوتولانیل با این روش از ۷۵۰ به ۳۷۵ گرم بر لیتر میسر شده است (Di Peng *et al*. 2014). کارائی بهتر کنترل تلفیقی باکتری‌های *Streptomyces* sp. با قارچ‌کش‌های مختلف، به این نسبت داده شده است که باکتری با مکانیسم‌های مختلف باعث هضم دیواره سلولی شده و این عمل باعث جذب بیشتر قارچ‌کش توسط غشاء سیتوپلاسمی می‌شود و لذا اختلاط سموم بیولوژیکی با سموم شیمیایی، نسبت به استفاده هر کدام از آن‌ها به تنهایی، بازده بیشتری داشته و کاراتر و موثرتر خواهد بود (Boukaew *et al*. 2013). در این بررسی هر چند در شرایط آزمایشگاهی در ترکیب غلظت‌های پایین باکتری و قارچ‌کش زینب اثرات کنترلی اندکی مشاهده شد، در شرایط گلخانه تمام تیمارهای تلفیقی در کنترل بیماری نتیجه‌ی بهتری داشتند. احتمال می‌رود قارچ‌کش‌ها حفاظت از مراحل اولیه‌ی بذر را انجام می‌دهند و پایداری کنترل در طول رشد توسط عوامل بیوکنترلی تضمین می‌شود. شاخص‌های رشدی گیاه شامل وزن تر و خشک، و میزان کنترل بیماری در تیمار تلفیق *T. harzianum* T22 با EC_{50} قارچ‌کش کربوکسین‌تیرام (کنترل بیماری با بیش از ۸۰ درصد) در مقایسه با دو قارچ‌کش دیگر و استفاده‌ی مجزای هر کدام از این عوامل بیشتر بود. احتمالا به این دلیل که این قارچ‌کش سیستمیک بوده و حتی بدون تماس با محل آلودگی قادر به حرکت در گیاه است و می‌تواند تخریب پاتوژن را در هر قسمت از گیاه انجام دهد، واین امر در تلفیق با آنتاگونیست T22 باعث کارائی بیشتر این تیمار شده است. مزیت استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک علاوه بر کنترل بیماری‌های بذور، ریشه‌کن کردن بهتر بیمارگرهای بذرزاد است (Brewer M and Larkin 2005). در ترکیب *T. harzianum* با قارچ‌کش توپسین–ام نیز وزن تر و خشک ساقه و ریشه بخصوص زمانی‌که عامل بیوکنترلی قبل از کاشت و قارچ‌کش بعد از کاشت استفاده شده است بیشترین مقدار خود را نشان داد (Gveroska and Ziberoski 2011). ترکیب *S. sannanensis* با قارچ‌کش‌های سیستمیک کاربندازیم و تیوفانات متیل در مقایسه‌ی با قارچ‌کش تماسی مانکوزب در کنترل بیماری‌های خاک‌زاد موفق‌تر عمل کرد و علت آن تاثیر سریع در جوانه‌زنی، حفاظت در مراحل حساس گیاهچه و قدرت حرکت این قارچ‌کش‌های سیستمیک در گیاه گزارش شده است (Gnanamangai and Ponmurugan 2012). نتایج مشابه در ترکیب *T. harzianum* با قارچ‌کش فلوتولانیل در کنترل رایزوکتونیا در سیب‌زمینی به‌دست آمد. دلیل این موفقیت تلفیقی این است که پایداری کنترل توسط قارچ آنتاگونیست در طول فصل رشد تضمین شده است. قارچ‌کش نیز با تاثیر سریع، حفاظت در مراحل اولیه رشد گیاه را فراهم آورده است و ترکیب این دو باعث موفقیت کنترلی بیشتر نسبت به استفاده‌ی هر کدام به تنهایی شده است (Wilson *et al*. 2008).

تلفیق غلظت‌های پایین دو آنتاگونیست بیوکنترل در کنترل رایزوکتونیا تا حد قابل قبولی نتیجه داده است. این تلفیق در آزمون گلخانه‌ای نیز کنترل بهتری داشت. قرار گرفتن عامل بیوکنترلی در ریزوسفر ریشه می‌تواند یکی از عوامل مهم موفقیت در یک برنامه کنترل باشد، بطوریکه در آزمایشی که در تلفیق *P. fluorescens* P5 با *T. atroviridea* انجام گرفت، علت موفقیت کنترل تلفیقی، قرار گرفتن آنتاگونیست‌ها در محل مناسب نزدیک ریزوسفر ریشه گزارش شده است (Poornima 2011) که در بررسی حاضر نیز شاید یکی از دلایل موفقیت کنترل در شرایط گلخانه ای محل و زمان مناسب معرفی عوامل کنترلی بوده است. در یک بررسی، علت شکست تلفیق *P. fluorescens* با *T.*

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

harzianum، سیدروفور تولید شده توسط گونه‌های سودوموناس تشخیص داده شد که در این شرایط تریکودرما با کمبود آهن مواجه شده و نتوانسته فعالیت بیوکنترلی خوبی از خود ارائه دهد (Harman and Hadar 1983).

در این تحقیق به‌دلیل توان تهاجمی جدایه‌ی قارچی بیمارگر بکار رفته اکثر گیاهچه‌های شاهد، دچار مرگ گیاهچه قبل از بیرون آمدن از خاک شدند و گیاهچه‌های زنده در ناحیه‌ی طوقه زخم نشان دادند و جوانه‌زنی به بیش از ۵۰ درصد کاهش پیدا کرد. در این کنترل تلفیقی هر دو جزء (قارچ‌کش + عامل بیوکنترل) نقش عمده‌ای در کاهش بیمارگر داشتند. در شرایط گلخانه در تیمارهای تلفیقی در مقایسه با تیمارهای کاربرد این عوامل به تنهایی، گیاهانی با ریشه و ساقه‌های ضخیم که وزن تر و خشک آن‌ها نیز به مراتب بیشتر است به‌دست آمد. حتی غلظت پایین (EC_{25}) قارچ‌کش‌ها با عوامل بیولوژیکی نیز در کنترل بیمارگر با بازدارندگی حدود ٦٠ تا ٨٠ درصد موفق عمل کرد. در بررسی‌های صورت گرفته، کنترل تلفیقی علاوه بر کاهش آلودگی زیست محیطی و کاهش دز مصرفی، باعث کاهش تکرار مصرف قارچ‌کش می‌شود. این مسئله در بحث مقاومت به قارچ‌کش‌ها حائز اهمیت است که بحران اصلی در کشاورزی نوین محسوب می‌شود (Spadaro and Gullino 2005)، به عبارتی با کاهش غلظت قارچ‌کش و تعداد دفعات سمپاشی می‌توان گام موثری در مدیریت مقاومت بیمارگر به قارچ‌کش‌های متداول برداشت. گزارش شده که که عواملی مثل تناوب زراعی، شخم قبل از کشت، آفتاب‌دهی خاک، بافت و pH خاک در این مکانیسم کنترل تلفیقی تاثیر دارند و حتماً باید با آگاهی از این عوامل (شناخت کامل هر کدام از عوامل کنترلی و چگونگی اختلاط آن‌ها، زمان صحیح استفاده، شناخت کامل بیمارگر و پاتوژن و مراحل حساس آن‌ها، پیش‌بینی‌های شرایط آب وهوایی، ترکیب درست بافت خاک و رطوبت ...) تلفیق صورت گیرد تا کنترل موثر بدست آید (Virgen-Calleros *et al*. 2000).

منابع

Adolf LB, David MS. 1994. Options to methyl bromide for the control of soil-borne diseases and pests in California with reference to the Netherlands. Environmental Protection Agency1:1-59.

Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA. 2018. Rhizoctonia solani: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. Plant Pathology 67:3–17.

Ashwani T, Rajesh K, Nandini G, Shailesh P. 2012. Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. International Journal of Plant Pathology 3(2): 89-94.

Benitez T, Rincón AM, Limon MC, Codon AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7:249-260.

Berger A. 1995. The potential of botanical pesticides in plant disease control. Plant Protection Section, Mt Makulu Agricultural Research Station, Chilanga- Zambia 37: 1-7.

Biljana G. 2018. In vitro evaluation of the effectiveness of some new fungicides in the control of *Rhizoctonia solani* in tobacco seedlings. International Journal of Environmental and Agriculture Research 4: 56-65.

Boukaew S, Klinmanee Ch, Prasertsan P. 2013. Potential for the integration of biological and chemical control of sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* on rice. World Journal of Microbiology Biotechnology 29: 1885–1893.

Brewer M, Larkin P. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection 24: 939-950.

Budge SP, Whipps JM. 2001. Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. Phytopathology: 91(2): 221-227.

Di Peng, Shandong Li, Changjun C, Mingguo Z. 2014. Combined application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat. Biological Control. 70: 28–34.

Fravel DR, Deahl KL, Stommel J. 2005. Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. Biological Control 34:165–169.

Fukui R, Schroth MN, Hendson M, Hancock JG. 1994. Interaction between strains of pseudomonads in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. Phytopathology 84: 1322–1330.

Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. Environmental Science and Pollution Research 21:1-14.

Gnanamangai BM, Ponmurugan P. 2012. Evaluation of various fungicides and microbial based biocontrol agents against bird's eye spot disease of tea plants. Crop Protection 32 :111-118.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

Gveroska B and Ziberoski J. 2011. The influence of *Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by *Rhizoctonia solani*. International Journal of Pure and Applied Science and Technological 2: 1-11.

Harman GE, Hadar Y. 1983. Biological control of *Pythium* species. Seed Science Technology 11: 893–906.

Harman GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84:377-393.

Henis YA, Bakerr G. 1978. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: Effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. Phytopathology 68: 900-907.

Howell CR, Beier RC, Stipanovic RD. 1988. Production of ammonia *by Enterobacter cloacae* and its possible role in the control of *Pythium preemergence* damping off by the bacterium. Phytopathology 78:1075-1078.

Islam MS, ALI M, Rahman MS. 2011. In vitro studies on the fungicidal effect on *Trichoderma* species in tea plantation. Bangladesh Journal Agriculture Research 36: 677-683.

Kim DS, Cook RJ, Weller DM. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87: 551-558.

Malathi P, Viswanathan R, Padmanaban P, Mohanraj D, Ramesh A. 2002. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against seed rot disease of sugarcane. Sugarcane Technology 4:131-136.

Mathre D, Johnston R, Callan N, Mohan SK, Martin J, Miller J. 1995. Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of Sh2 sweet corn. Plant Disease 79:1145-1148.

Nongmaithem N, 2015. Compatibility of pesticides with Trichoderma spp. and their antagonistic potential against some pathogenic soil borne pathogens. Indian J. Agric. Res., 49 (2): 193-196.

Pal KK, Tilak K, Saxena A, Dey R, Singh C. 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research 156: 209-223.

Pandya J, Sabalpara A, Chawda S, Waghunde R. 2012. Compatibility of *Trichoderma harzianum* with fungicide. Bioinfolet 9: 695 – 696.

Poornima S. 2011. Evaluation of disease control and plant growth promotion potential of biocontrol agents on *Pisum sativum* and comparison of their activity with popular chemical control agent – carbendazim. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences 3: 127-138.

Postma J, Scheper R, Schilder M. 2011. Effect of successive cauliflower plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. Soil Biology and Biochemistry 42: 804-812.

Raaijmakers J, Leeman M, Van Oorschot M, Van der Sluis I, Schippers B, Bakker P. 1995. Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 85: 1075–1081.

Sarkar S, Narayanan P and Divakaran A, 2010. The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus*Trichoderma harzianum.* Turkish Journal Biological 34 :399-403.

Shandong Li DP, Chen Ch, Zhou M. 2014. Combined application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat. Biological Control 70: 28–34.

Singh A, Chhatpar H, 2011. Combined use of *Streptomyces* sp. A6 and chemical fungicides against fusarium wilt of *Cajanus cajan* may reduce the dosage of fungicides required in the field. Crop Protection 30: 770-775.

Someya N, Tsuchiya K, Yoshida T, Tsujimoto-Noguchi, M, Sawada H. 2007. Combined application of *Pseudomonas fluorescens* strain LRB3W1 with a low dosage of benomyl for control of cabbage yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. conglutinans. Biocontrol Science Technology 17:21-31.

Spadaro D, Gullino M. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soil borne pathogens. Crop Protection 24: 601–613.

Tapwal A, Kumar R, Gautam N, Pandey S. 2012. Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. International Journal of Plant Pathology 3: 89-94.

Tran N. 2010. Using *Trichoderma* spcies for biological control of plant pathogens in Vietnam. Journal ISSAAS 1:17-21.

Virgen-Calleros G, Olalde-Portugal V, Carling D. 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in central Mexico and potential for biological and chemical control. American Journal of Potato Research. 77:219-224.

Wilson P, Ahvenniemi P, Lehtonen1 MJ, Kukkonen M, Rita H, Valkonen J. 2008. Biological and chemical control and their combined use to control different stages of the *Rhizoctonia* disease complex on potato through the growing season. Annals of Applied Biology 53: 307-320.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

Integrative effect of some synthetic fungicides with some biological agents in control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings

Mosavi Mirak Leila, Shirza Akbar*, Mohammadi Davoud

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
*Corresponding Author: ashirzad@azaruniv.ac.ir

Rhizoctonia solani is an important soil-borne pathogen which has a broad host range and cause damping-off or rottenness in root and crown of cultivated plants. The combined use of different control methods in IPM programs is an effective strategy against pathogens and is useful especially in resistance management programs. In this study, EC_{50} and EC_{25} values of three conventional chemical fungicides Zineb, Captan and Carboxin thiram and two biocontrol antagonist *Pseudomonas fluorescens* 73 and *Trichoderma harzianum* T22 were tested against *R. solani in vitro* and greenhouse condition. The results revealed that Carboxin thiram was effective than other fungicides with EC_{50} values of 0.05 ppm in vitro. The best control (75%) were obtained in combined use of Carboxin thiram fungicides with EC_{50} value of *T. harzianum* T22. and EC_{50} and EC_{25} values of *P. fluorescens* 73 in combination with Captan fungicide showed the best control (near 75%) *in vitro*. In green house tests that the control agents individually and in combination with each other were evaluated showed that, the best control of the disease were observed in positive control (without infection) and EC_{50} values of fungicides in combination with each of biocontrol agents. Overall results of this research showed that combined use of two antagonists with selected fungicides in both *in-vitro* and green house condition are effective than individual use of each control agent and may be it is possible to control the *R. solani* derived disease using this integrated method in cotton crop.

Key words: Biological control, Integrative control, *Pseudomonas*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.3.9]