نشریه بوم شناسی کشاورزی
جلد 2، شماره 3، پاییز 1389، ص. 416-407

Journal of Agroecology
Vol. 2, No. 3, Fall 2010, p. 407-416

بررسی امکان کنترل بیولوژیک علف هرز سس (*Cuscuta campestris* L.) با استفاده از عوامل بیماری‌زای قارچی

فرنوش فلاح پور[1*]، علیرضا کوچکی[2]، مهدی نصیری محلاتی[2]، ماهرخ فلاحتی رستگار[2] و رضا قربانی[3]

تاریخ دریافت: 89/4/10
تاریخ پذیرش: 89/9/24

چکیده

علف‌های هرز از مهمترین عوامل کاهش عملکرد محصولات زراعی می‌باشند، از این میان علف هرز سس (*Cuscuta campestris* L.) گیاهی انگلی است یکساله با گسترش جهانی که سبب کاهش عملکرد بسیاری از محصولات زراعی و باغی می‌شود. جهت یافتن عامل کنترل بیولوژیک مناسب به منظور کنترل سس، پژوهشی در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار در سال 88-1387 در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. جمع آوری نمونه های سس آلوده به عوامل بیماری زا در منطقه چناران و از مزارع چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) صورت گرفت. پس از گردآوری، کشت و خالص سازی قارچ های موجود در رشته های سس جنس های *Fusarium* sp. ، *Alternaria* sp. و *Colletotrichum* sp. شناسایی شدند. مایه زنی ایزوله‌ها با غلظت 10^8 اسپور در میلی لیتر آب مقطر در مراحل مختلف رشدی علف هرز سس (جوانه زنی، پیش از اتصال به میزبان، پس از اتصال به میزبان و تشکیل هوستوریوم) در آزمایشگاه و گلخانه تحقیقاتی صورت گرفت. از میان قارچ های بدست آمده گونه *F. oxysporum* توانست کنترل مؤثری بر جوانه زنی بذور سس داشته باشد. با توسعه مراحل رشدی سس و استقرار آن روی میزبان از بیماری زایی قارچ مورد نظر کاسته شد. جهت بررسی تکمیلی، بیماری زایی این جدایه روی سایر گیاهان زراعی از جمله گندم (*Triticum aestivum* L.)، جو (*Hordeum vulgare* L.)، یونجه (*Medigago sativa* L.)، چغندرقند و ریحان (*Ocimum basilicum* L.) مورد بررسی قرار گرفت و هیچگونه علایم بیماری در آنها مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: آلترناریا، فوزاریوم،گیاهان انگل.

مقدمه

علف های هرز همراهان همیشگی گیاهان زراعی محسوب می شوند و از دلایل اصلی کاهش تولید محصولات زراعی هستند (Rashed Mohasel & Mousavi, 2006). ازاین میان علف هرز سس از جمله گیاهان انگلی است که خانواده های زیادی از گیاهان را مورد هدف قرار می دهد و سبب کاهش رشد و کاهش عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی و باغی می شود (Vagen, 2002).

مدیریت موفقیت آمیز سس بسیار مشکل است، چراکه بذور آن دارای پوسته سخت هستند که بقای علف هرز را برای سال‌های متوالی در خاک حفظ می‌کنند (Hutchinson & Ashton, 1980)، به علاوه با توجه به ارتباط نزدیکی که میان میزبان و انگل وجود دارد در مبارزه شیمیایی به علف کشهای کاملا اختصاصی نیاز است تا صدمه ای به گیاه زراعی وارد نشود (Goldwasser, et al., 2001) و به دلیل مقاومت این علف هرز به علفکش‌های وسیع الطیف مانند گلایفوسیت کنترل شیمیایی آن مشکل است (Nadler-Hasser & Rubin, 2003). در سال‌های اخیر با توجه به ایجاد آلودگی های زیست محیطی و خطرات کاربرد علفکش های شیمیایی بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده و بروز پدیده مقاومت به علف کش های شیمیایی استفاده از روش‌های موثر جایگزین مانند روش‌های بیولوژیکی جهت مهار علف‌های هرز می‌تواند مفید باشد (Nadjafi, 2006). کنترل بیولوژیکی علف‌های هرز روشی است که ضمن رعایت اصول اکولوژیکی قادر است با بکارگیری دشمنان طبیعی و عوامل بیماریزای علف هرز، تراکم آنها را در زیر سطح خسارت اقتصادی نگه دارد (Hallett, 2005).

برای دستیابی به عوامل بیولوژیک مؤثر بر گیاه سس تلاش‌های فراوانی در سایر کشورها صورت گرفته است. تا کنون چندین قارچ

1، 2 و3- به ترتیب دانشجوی دکتری بوم شناسی کشاورزی، استاد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: farnoosh_fa82@yahoo.com)

بیماری‌زا از جمله *Fusarium tricinctum* ، *Alternaria* spp. ، *Geotrichum candidum* شناسایی شده اند که در گونه های مختلف سس بیماری ایجاد می‌کنند و پراکنش سس و ایجاد خسارت توسط این گیاه انگل را در میزبان کاهش می‌دهند (Boari et al., 2004). در سال 1966 جدایه ای از قارچ *Colletotrichum gloeosporiodes* در چین به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی انگل سس به نام لوبوآ-1[1] به ثبت رسید. این محصول به صورت گرانول تولید شد و در دهه 1970 در حدود 670000 هکتار از کشتزارهای سویا به عنوان اولین علفکش قارچی در جهان بکار برده شد که کارایی آن در کنترل سس بیش از 80% بود، ولی به تدریج به دلیل کاهش کارایی این جدایه کاربرد آن کاهش یافت و دستیابی به جدایه دیگری از این قارچ در سال 1985 تولید آن با نام لوبوآ-2[2] از سر گرفته شد (Shimi et al., 1997). این قارچ می‌توانند گونه‌های *C. chinensis* و *C. australis* را در سویا به صورت انتخابی کنترل کنند (Lanini et al., 2002; Butt et al., 2000). درسال 1984 قارچ *Alternaria destruens* روی *C. gronovii* در ویسکونسین شناسایی شد و استفاده از این قارچ به عنوان یک علفکش زیستی در 1990 به ثبت رسید (Bewick, 1990). اسمولدر[3] یک علفکش زیستی است که به صورت تجاری از این قارچ تهیه شده است. این قارچ در کاهش خسارت سس تحت شرایط زراعی بسیار مؤثر است (Charudattan, 2001).

با توجه به اینکه تحقیقات انجام شده در رابطه با کنترل بیولوژیک سس در ایران بسیار محدود است، تحقیق حاضر با هدف بررسی امکان کنترل بیولوژیک این انگل با استفاده از عوامل بیماری‌زای گیاهی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور یافتن عامل کنترل بیولوژیک مناسب، گیاهان سس دارای علائم آلودگی قارچی طی 25 بار نمونه برداری از مزارع چغندرقند تحت آلودگی شدید به این انگل در منطقه چناران گردآوری شدند. نمونه های گردآوری شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از قیچی استریل به قطعات کوچک 3-2 میلیمتری تقسیم شدند و جهت ضدعفونی در ظروف حاوی محلول هیپوکلریت سدیم[4] 0/5% به مدت یک دقیقه و نمونه‌های خشبی‌تر (مانند گل) به مدت سه دقیقه قرار گرفتند. پس از ضدعفونی، نمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شدند سپس نمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا رطوبت همراه آنها گرفته شود و به پتری‌های حاوی محیط کشت PDA[5] انتقال داده شدند، سپس نمونه‌ها داخل انکوباتور با دمای 25 درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از گذشت 24 تا 48 ساعت از کشت اولیه، جهت خالص سازی مقدماتی قسمتی از هریک از کلنی‌های رشد یافته به پتری دیش های دیگری که حاوی محیط PDA بودند، انتقال داده شدند. سپس شناسایی مقدماتی قارچ ها انجام گرفت و با توجه به قارچ مورد نظر با استفاده از روش تک اسپور و یا نوک هیف در محیط آب- آگار خالص سازی انجام شد. پرگنه‌هایی[6] که مشخصات ظاهری قارچ فوزاریوم را داشتند به محیط برگ میخک- آگار[7] (CLA) منتقل گردیده و در زیر قفسه‌ی نوری با تناوب نوری 12 ساعته قرار گرفتند. پس از خالص سازی جهت تهیه سوسپانسیون به منظور تلقیح روی گیاه از محیط کشت مایع استفاده شد.

برای تولید مایه قارچ جهت مایه‌زنی، جدایه‌های خالص در پتری‌های حاوی PDA کشت شدند و در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس از کشت پنج روزه‌ی هر کدام از جدایه‌های قارچ در زیر هود استریل بلوکی به ویال‌های حاوی محیط کشت مایع منتقل گردید و به مدت سه روز بر روی دستگاه شیکر با دور 90 دور در دقیقه در آزمایشگاه با دمای 2± 24 درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از سه روز جهت حذف میسلیوم‌ها و مواد زاید، محتویات هر کدام از ویال‌ها از پارچه‌ی ململ سترون عبور داده شد. سوسپانسیون بدست آمده به مدت 5 دقیقه در لوله‌های 45 میلی لیتری با دور 4000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب بدست آمده که حاوی اسپور قارچ بود، در آب مقطر استریل حل شد. به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور، شمارش اسپورها با کمک لام هموسایتومتر انجام شد و از غلظت 1×10^8 اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی استفاده شد و به هر جدایه 0/5% توئین 20 به عنوان سورفکتنات اضافه گردید.

با توجه به تعداد زیاد جدایه‌های یافت شده، در ابتدا توان بیماری زایی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه بررسی گردید. به علت اینکه علف هرز سس یک گیاه انگل است از دو روش استفاده شد. به این ترتیب که گیاهان سس به همراه میزبان (چغندرقند) که فاقد هر گونه علایم بیماری بودند از مزارع جمع آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه رشته‌های سس سالم به قطعات 5 سانتیمتری بریده شده و داخل پتری دیش‌های به قطر دهانه 9 سانتیمتر دارای کاغذ صافی سترون مرطوب قرار گرفتند. سپس رشته‌های سس بوسیله سوزن

1- Lubao-1
2- Lubao-2
3- Smolder
4- NaOCl

5- Potato Dexterose Agar
6- Colony
7- Carnation Leaf-piece Agar (CLA)

سترون در چند ناحیه خراش‌دهی شدند و با استفاده از سمپلر روی قسمت‌های خراشدهی شده یک قطره سوسپانسیون به غلظت 1×10^8 اسپور در میلی‌لیتر قرار گرفت. در تیمارهای شاهد از آب مقطر سترون به همراه 0/5 درصد توئین 20 به جای سوسپانسیون قارچ استفاده شد. پتری ها به مدت 10 روز زیر پوشش پلاستیکی در دمای 25 درجه سانتیگراد در رطوبت 90 درصد قرار گرفتند. به صورت روزانه پتری‌ها بازدید شده و هر گونه علایم بیماری زایی روی رشته‌های سس ثبت شد.

در روش دیگر از رشته‌های سس متصل به میزبان استفاده شد. جهت حفظ طراوت گیاهان چغندرقند آلوده به علف هرز سس جمع آوری شده از مزرعه در طی آزمایش دمبرگ های این گیاهان داخل ظروف آب قرار گرفتند و سپس رشته‌های سس مطابق روش قبل بوسیله سوسپانسیون قارچ مایه زنی شدند و به منظور ایجاد رطوبت مناسب برای رشد قارچ، ظروف زیر پوشش پلاستیکی قرار گرفتند. تا 10 روز پس از مایه زنی، ظروف به صورت روزانه مورد بازدید قرار گرفتند. جدایه‌هایی که هیچ نوع علایم بیماری ایجاد نکردند، از آزمایشات بعدی حذف شدند و جدایه‌هایی که سبب بروز علایم بیماری روی سس شدند مجدداً جداسازی و خالص سازی شده و با کشت اولیه مورد مقایسه قرار گرفتند و در آزمون هایی که جهت تعیین توان بیماری زایی پاتوژن صورت گرفت استفاده شدند.

به منظور تعیین توان بیماری زایی پاتوژن های جداسازی شده سه آزمایش جداگانه در مراحل مختلف رشدی سس شامل مرحله جوانه زنی سس، مرحله سبز شدن سس و پس از ایجاد رابطه انگلی با میزبان (چغندرقند) در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار در آزمایشگاه و گلخانه تحقیقاتی دانشکده فردوسی مشهد به انجام رسید. تا پایان آزمایش پتری دیش‌ها (تا10 روز پس از اعمال تیمار) و گلدان‌ها (تا یک ماه پس از اعمال تیمار) به صورت روزانه بررسی شدند و هر نوع علایم بیماری ثبت شد. در پایان درصد جوانه زنی، درصد ظهور گیاهچه و طول گیاهچه اندازه گیری شد. ارزیابی میزان بیماری زایی در گیاهان تیمار شده بر اساس مقیاس شماره‌دهی به ترتیب از صفر تا 5 برای درصد بیماری‌زایی کم تا شدید صورت گرفت. سیستم شماره دهی بدین صورت بود که 0= عدم بیماری، 1= 1-25 درصد آلودگی رشته سس، 2= 26-50% آلودگی، 3= 51-75% آلودگی، 4= 76-97% و 5= 99% آلودگی (مرگ گیاه). پس از پایان آزمایش جدایه های موفق به ایجاد آلودگی مجددا جداسازی و خالص سازی شده و مورد شناسایی قرار گرفتند. شناسایی جدایه‌ها تا سطح گونه در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت. جهت آزمون ایمنی بذر تعدادی از گیاهان زراعی شامل چغندرقند، یونجه، ریحان، گندم و جو در گلدان کشت شده و آزمایش بیماریزایی در مرحله جوانه زنی (اسپور پاشی در خاک گلدان به میزان) و مرحله 4-2 برگی (اسپورپاشی روی اندام هوایی خراشدهی شده با غلظت 1×10^8 اسپور در میلی‌لیتر) گیاهان یاد شده در قالب طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار انجام گرفت. گلدان ها در گلخانه ای با دمای 30-25 درجه سانتیگراد و سیکل نوری 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار گرفته و به منظور ایجاد رطوبت کافی جهت فعالیت قارچ، به مدت 24 ساعت پس از استفاده از سوسپانسیون گلدان ها زیر پوشش پلاستیکی قرار گرفتند. به مدت یک ماه گیاهان تیمار شده در قیاس با شاهد از نظر بروز بیماری مورد بازدید قرار گرفتند تا بدین ترتیب دامنه میزبانی جدایه مورد نظر تعیین گردد.

داده‌های حاصل از تمامی آزمایشات با استفاده از نرم افزار MINITAB ver-13.1 آنالیز شدند. میانگین‌ها نیز با استفاده از نرم افزار MSTAT-C و آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح احتمال 5 درصد مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. نمره بیماری کسب شده در رابطه با هر یک از جدایه‌ها با استفاده از آزمون غیرپارامتری کروسکال- والیس[1] مورد مقایسه قرار گرفت (Sokal & Rohlf, 1992). جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2003 استفاده شد.

نتایج و بحث

از نمونه‌های سس جمع آوری شده از مزارع آلوده چغندرقند، جمعاً چهار پرگنه از قارچ *Alternaria* spp.، سه پرگنه از قارچ *Choleototrichum* spp. و 30 پرگنه از قارچ *Fusarium* spp. روی محیط PDA رشد نمودند. از میان آنها جدایه‌های *Alternaria* spp. و *Choleototrichum* spp. هیچ گونه علایمی روی رشته‌های سس ایجاد نکردند، ولی پنج جدایه از پرگنه‌های قارچ *Fusarium* spp. پس از مایه زنی با سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^8 اسپور در میلی لیتر، روی رشته‌های سس علایمی به صورت لکه‌های قهوه ای در محل مایه زنی ایجاد نمودند که به تدریج توسعه یافته و به قسمت‌های بالا و پایین محل اولیه کشیده شد. در حالیکه در رشته‌های سس که به عنوان شاهد با آب مقطر سترون مایه زنی شده بودند هیچ گونه علایمی مشاهده نشد. جدایه‌هایی که بدین ترتیب بیماری زایی آنها اثبات شد، با شماره‌های 100، 200، 300، 303 و 323 کدگذاری شدند و برای آزمایش توان بیماری زایی در نظر گرفته شدند.

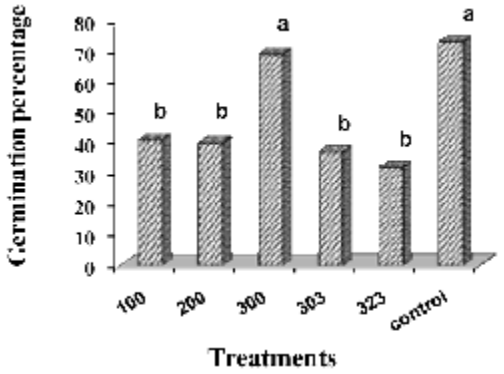
تعیین توان بیماری زایی پاتوژن قبل از ایجاد رابطه انگلی (مرحله جوانه زنی)

کمترین جوانه زنی در پتری دیش های تیمار شده با جدایه 323 مشاهده شد. بطوریکه جوانه زنی در این تیمار نسبت به شاهد 41 درصد کاهش نشان داد، اما از نظر آماری تفاوت معنی داری ($p<0/05$) با سایر تیمارها نداشت. درصد جوانه زنی در جدایه 300 و شاهد تفاوت معنی داری نداشت و این جدایه نتوانست از جوانه زنی

1- Kruskal-Wallis test

بذور سس جلوگیری کند (شکل1).

کمترین طول گیاهچه پس از 10 روز از شروع جوانه زنی در تیمار 323 با 3/34 سانتیمتر مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد 66 درصد کاهش نشان داد و دارای اختلاف معنی دار با دیگر تیمارها بود. جدایه 300 در این صفت نیز تفاوت معنی داری با شاهد نداشت (شکل 2).

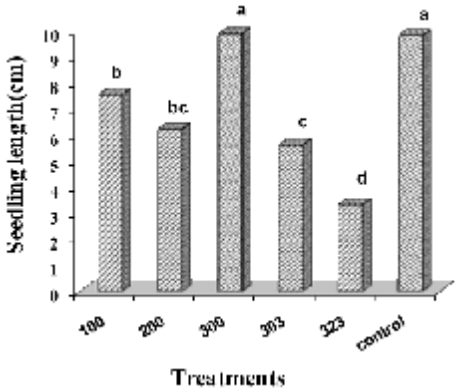


شکل 1- درصد جوانه زنی بذور سس تحت تیمار جدایه‌های مختلف

Fig. 1- Germination percentage of dodder seeds in different treatments

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار میانگین ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون دانکن می باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Duncan Multiple Range Test.



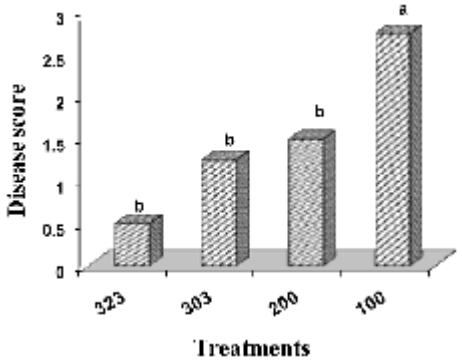
شکل 2- طول گیاهچه پس از 10 روز از شروع جوانه زنی تحت تیمار جدایه‌های مختلف

Fig. 2- Seedling length 10 days after germination started in different treatments

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Duncan Multiple Range Test.

در مقایسه بیماری‌زایی جدایه های گرفته شده از نمونه‌های سس آلوده در مرحله جوانه زنی، جدایه 323 بیشترین نمره بیماری (به صورت میانگین2/75 که نشان دهنده 50-26درصد توسعه بیماری بود) را به خود اختصاص داد. در مرحله جوانه زنی جدایه 300 هیچ گونه علایم بیماری روی گیاهچه های سس ایجاد نکرد و در صفت طول گیاهچه و همچنین درصد جوانه زنی نیز فاقد اختلاف معنی دار با شاهد بود (شکل 1و 2). سایر تیمارها از نظر قدرت بیماری زایی تفاوت معنی داری ($p<0/05$؛ $H=9/8$) باهم نداشتند (شکل3).



شکل 3- اثر جدایه‌های قارچی بر توسعه بیماری روی سس در شرایط آزمایشگاه

Fig. 3- Effect of fungal strains in the laboratory conditions on disease development in *Cuscuta campestris*

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار میانگین ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون کروسکال-والیس می باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Kruskal-Wallis Test.

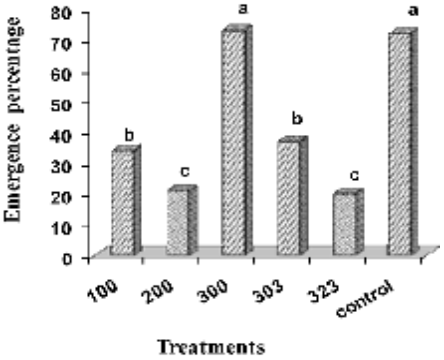
در بررسی‌های توماس و همکاران (Thomas et al., 1998) نشان داده شد که کاربرد *Fusarium oxysporum* پیش از کاشت گیاه اصلی در خاک تحت شرایط کنترل شده توانست انگل گل جالیز (*O. cumana*) را به خوبی کنترل کرده و از خسارت آن جلوگیری کند و علت این امر حساسیت مراحل اولیه جوانه زنی انگل نسبت به این قارچ گزارش شده است به طوری که کاربرد فوزاریوم سبزشدن گل جالیز را 81-34 درصد کاهش داد و گیاهچه‌ها علایم نکروزه نشان دادند و میزان اتصال به میزبان شدیدا کاهش یافت. زمانی که بذور بوسیله *F. oxysporum* تیمار می شوند ترکیباتی از جمله پکتین متیل استراز[1] و پکتین ترانس المیناز[2] بوسیله قارچ ترشح می شود که می تواند باعث حل کردن پکتین دیواره های سلولی شده و نفوذ قارچ را به بذر آسان سازد، در ادامه سیتوپلاسم نیز تخریب شده و غشاء سلولی می شکند و میسلیوم های قارچ داخل بذر را اشغال می‌کنند. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نیز نشان داد که میسلیوم قارچ *F. oxysporum* می‌تواند به بذور دارای پوسته سخت و آن ها که در دوره خواب به سر می برند نیز حمله کند و سبب از بین رفتن آنها شود

1- Pectin methylesterase
2- Pectin transeleminase

در نتیجه استفاده از سوسپانسیون‌های این قارچ در مزارع می‌تواند عامل موثری در جهت کنترل بذور گیاهان انگل باشد و مزیت کاربرد آن این است که می‌توان از این عوامل در دوره ای که گیاه زراعی در زمین حضور ندارد استفاده کرد و بانک بذر گیاهان انگل را کاهش داد (Thomas et al., 1999).

مرحله سبز شدن

درصد بوته های سس سبز شده نسبت به شاهد در تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی دار ($p<0/05$) بود. بیشترین درصد سبز شدن در تیمار شاهد و جدایه 300 به ترتیب با 72 و 73 درصد (فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال 5 درصد) و کمترین درصد سبز شدن در تیمارهای 323 و 200 به ترتیب با 20 و 21 درصد گیاهچه سبز شده (فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال 5 درصد) مشاهده شد. جدایه 100 و 303 نیز در این صفت اختلاف معنی داری نداشتند (شکل4). در گلدان های تحت تیمار بوسیله جدایه های مختلف فوزاریوم تفاوت معنی داری از نظر درصد اتصال گیاهچه و درصد انگلی شدن گیاه میزبان با تیمار شاهد مشاهده شد. کمترین درصد اتصال (11درصد) در گلدان های تیمار شده با جدایه 323 و 200 مشاهده شد و بیشترین درصد به تیمار شاهد و جدایه 300 به ترتیب با 62 و 58 درصد اتصال گیاهچه به میزبان اختصاص یافت و این دو تیمار از نظر آماری فاقد تفاوت معنی دار بودند (شکل4).



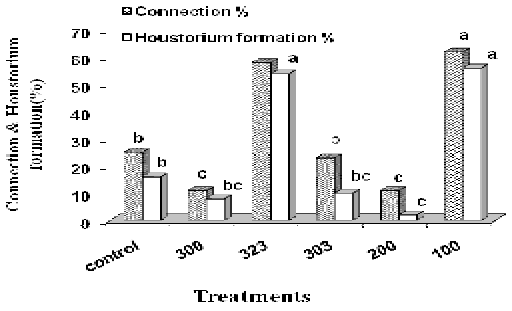
شکل 4- درصد سبز شدن گیاهچه‌های سس تحت تیمار در شرایط گلخانه

Fig. 4- Emergence percentage of dodder seedlings in different treatments in the greenhouse condition

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Duncan Multiple Range Test.

با کاهش درصد اتصال گیاهچه های سس به میزبان و همچنین گسترش علایم بیماری در گیاهچه های سس موجود در گلدان های تیمار شده با جدایه 323 انگلی شدن میزبان شدیداً کاهش یافت و تشکیل هوستوریوم نسبت به تیمار شاهد 54 درصد کاهش نشان داد که نشان‌دهنده اثر عامل بیماری‌زا در کاهش فعالیت انگل و در نهایت کاهش خسارت بوسیله آن است. میان جدایه های 323 و 200 از نظر درصد اتصال و میان جدایه‌های 323، 303 و200 از نظر درصد تشکیل هوستوریوم تفاوت معنی داری مشاهده نشد (شکل5).



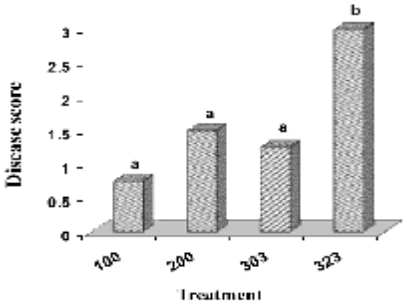
شکل5- درصد اتصال و تشکیل هوستوریوم در گیاهچه های سس تحت تیمار در شرایط گلخانه

Fig. 5- Connection and houstorium formation percentage of dodder in different treatments in the greenhouse condition

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Duncan Multiple Range Test.

بر اساس مقیاس نمره دهی بیشترین بیماری زایی مربوط به جدایه 323 به میزان 3 بود (گستره 75-51 درصد توسعه بیماری). جدایه های100، 200 و 303 از نظر نمره بیماری فاقد اختلاف معنی دار ($p>0/05$؛ $H=8/98$) بودند (شکل6) و جدایه 300 هیچگونه علایم بیماری ایجاد نکرد.



شکل6- اثر جدایه‌های قارچی بر توسعه بیماری روی گیاهچه سس در شرایط گلخانه

Fig. 6- Effect of fungal strains in the greenhouse conditions on disease development in *Cuscuta campestris* seedling

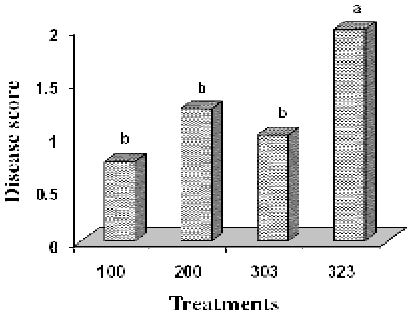
حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار میانگین‌ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون کروسکال- والیس می‌باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Kruskal-Wallis Test.

با توجه به عدم ایجاد هرگونه علایم بیماری بوسیله جدایه 300 در دو آزمایش انجام شده و عدم وجود تفاوت معنی دار با شاهد در صفات درصد جوانه زنی و درصد سبز شدن بذور سس، این جدایه از آزمایشات بعدی حذف شد و به عنوان عاملی ناکارآمد در کنترل سس شناخته شد. ممانعت از جوانه زنی بذور سس و استقرار اولیه گیاهچه یکی از مناسب ترین روش های کنترل غیرشیمیایی این علف هرز می باشد (Sandler, 2010). در بررسی های منتظری (Montazeri, 2007) چندین جدایه از قارچ فوزاریوم توانستند سبز شدن گل جالیز را 90-80 درصد کاهش دهند.

بررسی توان بیماری زایی جدایه ها پس از ایجاد رابطه انگلی موفق توسط سس

با ایجاد رابطه انگلی میان علف هرز سس و میزبان توان بیماری زایی پاتوژن های مورد آزمایش کاهش یافت. ولی بازهم بیشترین بیماری زایی در جدایه 323 با نمره 2 (نشان دهنده 50-26 درصد توسعه بیماری) مشاهده شد. سایر تیمارها فاقد اختلاف معنی دار (H=8/06 ؛p<0/05) بودند (شکل7).



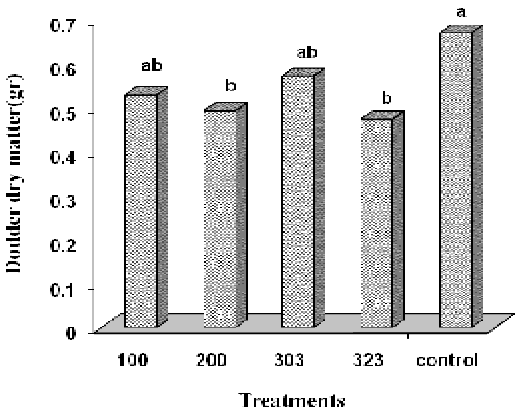
شکل7- مقایسه قدرت بیماری جدایه‌های استخراج شده در شرایط گلخانه، دو هفته پس از ایجاد رابطه انگلی میان سس و میزبان

Fig. 7- Effect of fungal strains in the greenhouse conditions on disease development in *Cuscuta campestris*, two weeks after parasitism formation

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی دار میانگین ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون کروسکال-والیس می‌باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Kruskal-Wallis Test.

کمترین وزن خشک سس در گلدان های تیمار شده به وسیله جدایه‌های 323 و 303 مشاهده شد که دارای تفاوت معنی دار با شاهد بودند، ولی میان جدایه های دیگر با شاهد از نظر آماری تفاوت معنی داری ملاحظه نشد. جدایه 323 توانست وزن خشک سس را نسبت به تیمار شاهد 29 درصد کاهش دهد (شکل8). با توجه به اینکه این آزمون پس از ایجاد رابطه انگلی توسط سس انجام شد کاهش وزن خشک سس نشان دهنده بیماری زایی در رشته های سس است که ممکن است از طریق ممانعت در توسعه رشد ثانویه این انگل و تشکیل هوستوریوم های کمتر توسط آن ایجاد شده باشد.



شکل 8- وزن خشک سس در گلدان‌های تحت تیمار بوسیله جدایه‌های قارچی

Fig. 8- Dry matter of dodder in pots under fungi isolate treatments

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها در سطح احتمال 5% بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Similar letters shows not significantly different at 5% probability level, according to Duncan Multiple Range Test.

در بررسی های مزرعه ای انجام شده در کالیفرنیا در رابطه با کنترل زیستی علف هرز سس استفاده از عامل بیماری زای *Alternaria destruens* در کنترل این انگل موثر نبوده است در حالیکه در برخی گونه های سس این قارچ کنترل موفقیت آمیزی در زراعت cranberry داشته است. در این بررسی عدم موفقیت در آزمون های مزرعه ای به شرایط اقلیمی کالیفرنیا، از جمله آب و هوای خشک و وجود گونه‌های متفاوت سس نسبت داده شده است (Lanini, 2004). جدایه lc*508 قارچ *A. alternata* که برای مهار زیستی گیاه هرز *Lantana camara* به کار رفته در شرایط کنترل شده به خوبی توانست این گیاه هرز را مهار کند (Ghorbani et al., 2002). منتظری (Montazeri, 2005) با سنجش *A. alternata* و بکارگیری جدایه 423 این قارچ آنرا به عنوان یک عامل مهار زیستی تاج خروس ریشه قرمز معرفی کرد. پیتلی و آموریم (Pitelli & Amorim, 2002) با بررسی قارچ *A. cassia* بر روی گیاه هرز *Senna obtusifolia* دریافتند که این قارچ برای مهار گیاه هرز یاد شده به دمای پایین (23 و 20 درجه سانتیگراد) و دوره شبنم 12 ساعته نیاز دارد. افزون بر پتانسیل ژنتیکی، عواملی مانند رژیم غذایی در اثنای اسپور زایی و مواد همراه در فرمولاسیون نیز در کارایی یک

عامل میکروبی در کنترل علف هرز هدف تـأثیر چشـمگیری دارد. در مطالعات منتظری (Montazeri, 2007) نیز اسـپورزایی جدایـه 507 قارچ فوزاریوم، عامل کنترل زیستی گل جالیز، در محیط کشت مـایع نیمه تعریف شده با نسبت کربن به نیترژن 5 به 1 بطور معنـی داری بیش از رژیم هایی با نسبت کربن به نیتروژن 15 به 1 و 40 به 1 بود. به علاوه شستشوی اسپورهای این قارچ با محلـول قنـدهای 6 و 12 کربنه تأثیر معنی داری بر میزان جوانه زنی و رشد طولی لوله تندشی آن ها پس از گذرانیـدن دوره هـای خشـکی نداشـت. در حالیکـه در بررسی منتظری (Montazeri, 2005)، شستشوی اسـپورهای قـارچ *Colletotrichum truncatum* با استفاده از ساکارز در مقایسه با آب مقطر بطور معنی داری موجب افزایش جوانه زنی و رشـد لولـه هـای تندشی شد در حالیکه سوربیتول آن را کـاهش داد. اسـتفاده از قـارچ *Puccinia canaliculata* در اوایل بهار در باغات جهت کنترل علف هرز اویارسلام (*Cyperus esculentus* L.) توانست تـراکم و تولیـد غده های جدید توسط این علف هـرز را بـه ترتیـب 46 و 66 درصـد کاهش دهد ولی کـاربرد یوردینیوسـپورهای ایـن قـارچ در تابسـتان نتوانست جمعیت علف هرز را کنترل کند و تنها زیست توده غده ها را به میزان 32 درصد کاهش داد (Li et al., 2003).

اسـتفاده از سوسپانسـیون 2×10^6 اسـپور در میلـی لیتـر از قـارچ *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* در شرایط 20 ساعت نقطه شبنم و دمای 30 درجه سانتیگراد توانسته اسـت کنتـرل مـوثری را در علـف هـرز *Malva pusilla* Sm. داشـته باشـد (Makowski, 1993). بـه عـلاوه قـارچ *Colletotrichum truncatum* عامل بیماری زایی مفیـدی جهـت کنتـرل *Sesbania exaltata* شناسایی شده است. قارچ *Alternaria cassia* نیز عامـل زیستی موثر در کنترل *Cassia obtusifolia* می باشد و می توان از آن به عنوان علف کش زیستی اسـتفاده کـرد (Boyetchko et al., 2002).

شناسایی عوامل بیماری زا

هر چهار جدایـه از گونـه *Fusarium oxysporum* تشـخیص داده شدند. تفاوت درتوان بیماری زایی آن ها نشان داد که جدایه ها با یکدیگر متفاوت اند.

آزمایشات ایمنی

نتایج حاصل از آزمون ایمنی در گلخانه بر روی گیاهان زراعـی چغندر قند، یونجه، ریحان، گندم وجو نشان داد که جدایه 323 قـارچ *Fusarium oxysporum* توانایی ایجاد هیچ نوع آلودگی و بیمـاری زایی را بر روی گیاهان زراعی یاد شده ندارد. گونه‌های قارچ فوزاریوم دارای فرم های اختصاصی متنوعی هسـتند کـه روی میزبـان هـای خاص بیماری زایی دارند و تخصص میزبانی آن ها متفاوت است. به عنوان مثال بـوآری و ورو (Boari & Vurro, 2004) در آزمایشـات خود از گونه های فوزاریوم به عنوان عامل بیوکنترل گل جالیز استفاده کردنـد و دریافتنـد کـه در نمونـه هـای بررسـی شـده گونـه *F. oxysporum* و *F. solani* تا حدود 60 درصد و *F. camproceras* و *F. chlamydosporum* تا 50 درصد توانایی بیماری زایی روی این انگل را داشتند. الزین و همکـاران (Elzine, et al., 2004) بـا بکـار گیـری جدایـه Foxy2، *F. oxysporum* بـه صـورت فرمولاسـیون گرانول علیه انگل جـادوگر (*Striga* sp.) توانسـتند ایـن قـارچ را بـه عنوان یک عامل بیوکنترل معرفی کنند.

تا کنون چندین قارچ بیماری زای سـس شناسـایی شـده انـد، از جمله *Fusarium tricinctum* و *Alternaria* spp. که در گونه *C. gronovii* بیماری زایی ایجاد می کند و *Geotrichum candidum* و *Alternaria alternate* که در گونه *C. campestris* بیماری زایی دارند. طی تحقیقاتی که در چـین انجـام شـد مشـخص شـده اسـت سوسپانسـیون کنیـدی‌هـای قـارچ *Colletotrichum gloeosporioides* مـی توانـد گونـه‌هـای *C. chinensis* و *C. australis* را در سویا به صورت انتخابی کنترل کنند (Lanini et al., 2002).

میکروراگانیزم ها ترکیبات متنوعی از نظر ساختار و نحـوه عمـل تولید می کنند که به گیاه میزبان هجوم برده و سبب بیمـاری زایـی، تخریب ساختار سلولی، ایجاد لکه های نکروزه و کلروزه در آن ها می شوند و در حال حاضر دانشمندان توجـه ویـژه ای بـه ایـن ترکیبـات مبذول داشته اند تا بتوانند از آن ها جهـت کنتـرل علـف هـای هـرز استفاده کنند و سعی دارند سـاختار شـیمیایی ایـن ترکیبـات و علـت ناکامی در تولید آن ها بـا اسـتفاده از روش هـای متـداول در تولیـد آفتکش ها را دریابند. از خصوصیات منحصر به فرد این ترکیبات عدم سمیت برای پستانداران و ناپایداری در طبیعت است و در مقایسـه بـا ترکیبات شیمیایی خطرات زیست محیطی نخواهند داشت (Li et al., 2003). فیتوتوکسین‌ها از نظر اندازه و ساختار شیمیایی بسیار متفاوت می‌باشند تعدادی از آن‌ها پلی‌پپتیـد هسـتند، برخـی دیگـر در گـروه ترپن‌ها قرار می گیرند و برخی ماکروسیکلیک و باکلیت[1] مـی‌باشـند این ترکیبات از نظر تخصص میزبانی نیز متفاوتند برخی تنها در یک گونه خاص کاربرد دارند ولی برخی دیگر تعـداد زیـادی از گیاهـان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. از جمله قارچ هایی که ترکیبات فیتوتوکسین تولیـد مـی‌کننـد مـی‌تـوان بـه *Alternaria*، *Fusarium* و *Colletotrichum* اشاره کرد (Strobel, 1991).

این نکته حائز اهمیت اسـت کـه افـزون بـر پتانسـیل ژنتیکـی، فاکتورهایی مانند رژیم غذایی در اثنای اسپور زایـی، مـواد همـراه در فرمولاسیون و شرایط رشدی نیز در کارایی یک عامـل میکروبـی در کنترل علف هرز هدف تأثیر چشمگیری دارد. در مطالعـات منتظـری

1- Bakelit

(Montazeri, 2007) اسپورزایی جدایه 507 قارچ فوزاریوم، عامل بیوکنترل گل جالیز، در محیط کشت مایع نیمه تعریف شده با نسبت کربن به نیتروژن 5 به 1 بطور معنی داری بیش از رژیم هایی با نسبت کربن به نیتروژن 15 به 1 و 40 به 1 بود. به علاوه شستشوی اسپورهای این قارچ با محلول قندهای 6 و 12 کربنه تأثیر معنی داری بر میزان جوانه زنی و رشد طول لوله تندشی آن ها پس از گذرانیدن دوره‌های خشکی نداشت. در حالیکه در بررسی منتظری و همکاران (Montazeri et al., 2002)، شستشوی اسپورهای قارچ *Colletotrichum truncatum* با استفاده از ساکارز در مقایسه با آب مقطر بطور معنی داری موجب افزایش جوانه زنی و رشد لوله های تندشی شد در حالیکه سوربیتول آن را کاهش داد. جهت کنترل بیولوژیک گل جالیز، از میان میکروارگانیزم های گوناگون جدایه های فوزاریوم که تولید توکسین های مختلفی از جمله اسید فوزاریک، فومونیسین، بیورسین، انیاتین، مونیلیفورمین و تریکوتسینس می کنند، بیش از سایر پاتوژن ها مورد پژوهش قرار گرفته اند (Vurro, 2002). هر یک از این توکسین ها نقش متفاوتی مانند نکروزه، کلروزه، پیشگیری از رشد، پژمردگی و پیشگیری از تندش بذر را دارند و با مکانیزم مربوطه می توانند گل جالیز را کنترل نمایند (Vurro, 2002). در ایران نیز روی گونه های قارچ فوزاریوم برای کنترل گل جالیز بررسی هایی صورت گرفته و در شرایط پژوهشی نتایج خوبی بدست آمده است (Montazeri, 2007).

نتیجه گیری با توجه به آزمایشات انجام شده جدایه 323 قارچ *Fusarium oxysporum* قادر به بیماری زایی علف هرز سس می‌باشد و از طرف دیگر گیاهان زراعی آزمایش شده دارای ایمنی مناسبی نسبت به این قارچ بودند. اما با توجه به بیماری زایی پایین این قارچ بایستی آزمایشات تکمیلی روی فرمولاسیون این عامل میکروبی و بکارگیری مواد همراه مناسب که موجب پایداری اسپورها شده و نفوذ آن ها را به میزبان تسهیل می‌کند، صورت گیرد. به علاوه با توجه به حساسیت بالای عوامل بیماری زا به شرایط محیطی باید بیماری زایی این قارچ تحت شرایط مختلف محیطی مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر حمید روحانی و سرکار خانم مهندس الهه ربیعی برای همکاری در اجرای این تحقیق و شناسایی نمونه‌های قارچی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- Bewick, T., Stewart, J.S., Binning L.K., and Stevenson, W.R. 1990. Biological Control of Dodder. United States Patent 4915726. Available at http://www.freepatentsonline.com/4915726.html (Accessed 2009/02/20).
2- Boari, A., and Vurro, M. 2004. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche romase*). Biological Control 30: 212-219.
3- Boyetchko, S.M., Rosskopf, E.N., Caesar, A.J., and Charudattan, R. 2002. Biological weed control with pathogens: From search for candidates to applications. In G.G. Khachatourians and D.K. Arora, Applied Mycology and Biotechnology, Volume II, Applications of Fungal biotechnology to food production (pp. 239-274). New York: Elsevier Science.
4- Butt, T.M., and Copping, L.G. 2000. Fungal Biological Control Agents. University of Wales Swansea. Available at http://www.rsc.org/delivery/_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b008009h & JournalCode=PO (Accessed 2010/09/10).
5- Charudattan, R. 2001. Biological control of weeds by means plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. Journal of Biocontrol 46: 229-260.
6- Elzine, A., Kroscher, J., and Muller-Stover, D. 2004. Effects on inoculum type and propagule concentration on self life of pesta formulation containing *Fusarium oxysporum*, a potential mycoherbicide agent for *Striga* spp. Biological Control 30: 203-211.
7- Ghorbani, R., Seel, W., Litterick, A., and Leifert, C. 2000. Evaluation of *Alternaria alternata* for biocontrol of *Amaranthus retroflexus*. Weed Science 48: 473-479.
8- Goldwasser, Y., Lanini, W.T., and Wrobel, R.L. 2001. Tolerance of tomato varieties to lespedeza dodder. Weed Science 49: 520-523.
9- Hallett, S.G. 2005. Where are the bioherbicides? Weed Science 53: 404-415.
10- Hutchinson, J.M., and Ashton, F.M. 1980. Germination of field dodder (*Cuscuta campestris*). Weed Science 28:330-333.
11- Lanini, W.T., Cudney, D.W., Miyao, G., and Hembree, K.J. 2002. Dodder-Integrated Pest Management for Home Gardeners and Professional Horticulturalists. University of California, Agriculture and Natural Resources.
12- Lanini, W.T., Cudney, D.W., Miyao, G., Hembree, K.J. 2002. Dodder-Integrated pest management for home gardeners and professional horticulturalists. University of California, agriculture and natural resources. Available at http://www.ardentermite.com/2003/pestnotes/plants/pndodder.pdf (Accessed: 2009.07.8).
13- Li, Y., Sun, Z., Zhuang, X., Xu, L., Chen, S., and Li, M. 2003. Research progress on microbial herbicides. Journal

of Crop Protection 22: 247-252.
14- Makowski, R.M.D. 1993. Effect of inoculum concentration, temperature, dew period, and plant growth stage on disease of roundleaved mallow and velvetleaf by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*. Journal of Phytopathology 83: 1229–1234.
15- Montazeri, M. 2005. The role of Melanin and periods of dryness on germination of conidia and viruhence of *Alternaria alternata* on *Amaranthus teroflexus*. Iranian Journal of Weed Science 1(2): 141-154. (In Persian with English Summary)
16- Montazeri, M. 2007. Biological control of *Orobanch* spp. in Iran. 2nd Weed Science Conference of Iran. P. 27-47. (In Persian with English Summary)
17- Nadjafi, H. 2006. Nonchemical Methodes of Weeds Management. Kankash Danesh Press. (In Persian)
18- Nadler-Hasser, T., and Rubin, B. 2003. Natural tolerance of *Cuscuta campestris* to herbicides inhibiting amino acid biosynthesis. Weed Research 43: 341-347.
19- Pitelli, R.I., and Amorim, I. 2002. Effects of different dew periods and temperatures on infection of *Senna obtusifolia* by a Brazilian isolate of *Alternaria cassiae*. Biological Control 28: 237-242.
20- Pitelli, R.I., and Amorim, I. 2002. Effects of different dew periods and temperatures on infection of *Senna obtusifolia* by a Brazilian isolate of *Alternaria cassiae*. Journal of Biological Control 28: 237-242.
21- Rashed Mohessel, M.H., and Mousavi, K. 2005. Management of Weeds. Ferdowsi University of Mashhad Press. pp 566. (In Persian)
22- Sandler, H.A. 2010. Managing *Cuscuta gronovii* (swamp dodder) in cranberry requires an integrated approach. Journal of Sustainability 2: 660-683.
23- Shabana, Y.M. 2005. The use of oil emulsions for improving the efficacy of *Alternaria eichhorniae* as a mycoherbicide for water hyacinth (*Eichhorina crassipes*). Biological control 32: 77-89.
24- Shimi, P., and Mousavi, M.R. 1997. Parasitic Weeds of the World (Biology and Management). Barahmand Press. pp 412. (In Persian)
25- Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. 1992. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Researches. Freeman Company, New York, NY.
26- Strobel, G. 1991. Phytotoxins as potential herbicides. Journal of Experiential 47: 819–826.
27- Thomas, H., Heller, A., Sauerborn, J., and Muller-Stover, D. 1999. *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras*, a potential mycoherbicide, parasitizes seeds of *Orobanche cumana* (sunflower broomrape): a cytological study. Journal of Annals of Butany 83: 453-458.
28- Thomas, H., Sauerborn, J., Muller-stover, D., Ziegler, A., Bedi, J.S., and Kroschel, J. 1998. The potenthial of *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* as a biological control agent for *Orobanche cumana* in sunflower. Journal of Biological Control 13: 41-48.
29- Vaughn, K.C. 2002. Attachment of the parasitic weed dodder to the host. Journal of Protoplasma 219: 227-237.
30- Vurro, M. 2002. Integration of fungal toxins with pathogens. In proceedings of the meeting 'Integrated control of broomrape', Obermarchtal, Germany. 25-27 July.