

اثر ترکیبات بیولوژیک و برخی قارچ کش ها در مبارزه با عامل بیماری ذغالی بلوط (*Biscogniauxia mediterranea*) در شرایط درون شیشه‌ای

محمدرضا کاوسی^۱، رضا یاوریان^۲، الله‌وردی محمدزاده^{۳*} و جلیل کرمی^۴

- ۱- دانشیار، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۲- کارشناسی ارشد جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۳- دانشجوی دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۴- دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۹

چکیده

در این بررسی نمونه‌برداری از پارک جنگلی قرق واقع در استان گلستان به صورت کاملاً تصادفی انجام شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها، بر اساس اطلاعات مندرج در کلید شناسایی جنس *Biscogniauxia* sp. عامل بیماری ذغالی تشخیص داده شد. تأثیر سه گونه قارچی *Trichoderma aviride*، *T. koningii* و *T. atroviride* روی رشد عامل بیماری در شرایط کشت درون شیشه‌ای با استفاده از دو روش کشت متقابل و تأثیر مواد فرار مورد بررسی قرار گرفت. هر سه گونه *Trichoderma* در آزمون کشت متقابل و تأثیر مواد فرار، دارای تأثیری مثبت در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر است. اثر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش‌های اکسی کلرایدمس، پروپیکونازول، کاربندازیم و متلاکسیل - مانکوزب بر عامل بیماری در شرایط کشت درون شیشه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد قارچ‌کش پروپیکونازول در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام و کاربندازیم با غلظت ۱۰۰ پی پی ام بیش‌ترین درصد بازدارندگی (۱۰۰ درصد) را در بین غلظت‌های قارچ‌کش‌ها داشته است و دو غلظت، پروپیکونازول ۱۰ پی پی ام (۸۷/۲ درصد) و کاربندازیم ۱۰ و ۵۰ پی پی ام به ترتیب ۸۶/۲۵ و ۸۱/۴۵ درصد، بیش‌ترین بازدارندگی را داشتند. قارچ‌کش‌های متلاکسیل - مانکوزب، کوپراکسی کلراید تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: استان گلستان، بلندمازو، بیماری ذغالی بلوط، تریکودرما، جنگل قرق.

1986؛ Ju and Rogers, 1996؛ Collado *et al.*, 1999؛
 2001؛ Nugnet *et al.*, 2005؛ Linaldeddu *et al.*؛
 2006؛ Jurc and Ogris؛ Mirabolfathy، 2011) به-
 خصوص مناطق که دچار تغییرات آب و هوایی
 شده‌اند، تبدیل شده است (Jurc and Ogris، 2006؛ Ju
et al.، 1998). علائم بیماری در درختان آلوده به این
 صورت است که بخشی از پوست به تدریج لایه‌لایه شده
 و به راحتی از تنه درختان جدا می‌شود. در برخی موارد
 خروج شیرابه گیاهی مشاهده می‌شود که در این زمان
 ممکن است با بیماری ناشی از گونه‌های شبه قارچی
Phytophthora اشتباه تشخیص داده شود
 (Mirabolfathy، 2011). پس از توسعه و رشد قارچ در
 زیر و یا لابه‌لای آنها توده پودری به صورت لکه‌ای و
 نواری از استرومای دودی قارچ به رنگ مشکی و یا
 ذغالی به صورت گسترده و کشیده و یا نواری به طول
 پنج تا ۱۰ سانتی‌متر و به ضخامت یک تا دو میلی‌متر
 ظاهر می‌شود. اندازه استروما با گذشت زمان حتی پس
 از مرگ درخت قابل افزایش است، بدین علت که هم
 چنان قارچ می‌تواند به صورت ساپروفیت رشد کند
 (Rostaii، 2010). فرم غیرجنسی این قارچ در فصل بهار
 و تابستان و فرم جنسی آن (آسک و آسکوسپور) در
 فصل زمستان تشکیل می‌شود (Alexopoulos *et al.*،
 1996؛ Jurc and Ogris، 2006). یکی از روش‌های
 مدیریتی بیمارگرهای گیاهی، کنترل بیولوژیک و استفاده
 از قارچ‌کش‌ها است (Khanjani *et al.*، 2008).
 یکی از موفق‌ترین و پرکاربردترین عامل در کنترل
 بیولوژیک، گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma*
 است (Harman *et al.*، 2004). گونه‌های جنس
Trichoderma، قارچ‌هایی با پراکنش وسیع هستند که
 در خاک، مواد گیاهی، مواد در حال پوسیدن و روی
 چوب یافت می‌شوند. فعالیت ضد قارچی این
 میکروارگانیسم‌ها از سال ۱۹۳۰ شناخته‌شده و از آن

بلوط بلندمازو گونه‌ای از درختان بلوط با نام علمی
Quercus castaneifolia از تیره Fagaceae و راسته
 Fagales است. تیره Fagaceae دارای هشت جنس و
 بیش از ۱۰۰۰ گونه گیاهی است که اعضای جنس
Quercus در این میان با داشتن حدود ۶۰۰ گونه مهم-
 ترین عضو خانواده مزبور شناخته می‌شوند. بلندمازو
 بومی جنگل‌های قفقاز و هیرکانی و پراکنش جغرافیایی
 آن در ایران، به سه استان گلستان (مینودشت، رباط قرلق،
 علی‌آباد کتول، شاه‌پسند، گرگان، پارک گلستان، بندرگز
 و زیارت)، مازندران (چالوس، نوشهر، بهشهر، ساری،
 بابلسر، کدوک، نکا و دشت نظیر) و گیلان (منجیل،
 لاهیجان، بندر انزلی، جنوب هشت پر، تاش، آستارا و
 مابین آستارا تا اردبیل) محدود می‌شود (Mozaffarian،
 2004). این گونه از نظر تعداد ۷/۶۵ درصد و از نظر
 حجم ۸/۰۱ درصد موجودی از جنگل‌های شمال را به-
 خود اختصاص داده است (Resane *et al.*، 2001).
 بیماری ذغالی بلوط یا خشکیدگی بلوط در گذشته
 نه‌چندان دور با نام زخم هیپوکسیلونی نیز شناخته می-
 شد. بیماری مزبور در سال‌های اخیر منجر به زوال
 تدریجی و مرگ تعداد زیادی از درختان بلندمازو در
 جنگل‌های شمال کشور به‌خصوص شرق هیرکانی شده
 است (Mirabolfathy، 2011)، عامل بیماری ذغالی
 بلوط بر اساس آخرین رده‌بندهای معتبر قارچی از شاخه
 Ascomycota، زیر شاخه Pezizomycotina، رده
 Sordariomycetes، زیررده Xylariomycetidae،
 راسته Xylariales و خانواده Xylariaceae است
 (Khoda parast، 2010). گونه *B. mediterranea* یکی
 از مهم‌ترین بیمارگران گیاهی در جنس مشروح است.
 گونه اخیر در مناطقی با آب‌وهوای مدیترانه‌ای و
 نیمه‌مدیترانه‌ای به‌علت ایجاد شانکرهای ذغالی، به یکی
 از مشکلات اصلی جنگل‌های بلوط جهان (Spooner،

بیولوژیک بر بیماری ذغالی در ایران و جهان، دست‌یابی به دانش بومی مناسب با شرایط اکولوژیکی مناطق شمالی کشور امری اساسی به‌شمار می‌آید. از این‌رو، این پژوهش با اهداف یافتن پاسخی مناسب و جامع برای سؤالات زیر انجام شده است:

۱- آیا قارچ‌کش‌های اکسی کلراید مس، پروپیکونازول، کاربندازیم و متلاکسیل-مانکوزب در کنترل قارچ *B. mediterranea* در شرایط کشت درون شیشه‌ای مؤثر هستند؟

۲- تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش‌های مزبور، در کنترل قارچ *B. mediterranea* در شرایط کشت درون شیشه‌ای چیست؟

۳- عملکرد سه گونه قارچ آنتاگونیست *T. koningii*، *T. atroviride* و *T. viride* در کنترل قارچ *B. mediterranea* در شرایط کشت درون شیشه‌ای چگونه است؟

۴- کدام یک از تیمارهای به‌کار رفته دارای بهترین تأثیر معنادار از نظر علم آمار است؟

۵- در مقام مقایسه آیا عوامل کنترل بیولوژیک قادر به رقابت با سموم شیمیایی هستند؟

بی‌شک پژوهش‌های آزمایشگاهی گام اول در شناسایی روش‌های کنترلی کارآمد و مناسب مدیریت آسیب‌های گیاهی به‌منظور به‌کارگیری آن در عرصه طبیعت است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از پارک جنگلی قرق واقع در فاصله ۲۳ کیلومتری گرگان در زمستان ۱۳۹۱ و بهار ۱۳۹۲ صورت گرفت. نمونه‌برداری به‌صورت کاملاً تصادفی و قطعات پوست تنه از درختان دارای علائم بیماری ذغالی جدا شد. نمونه‌ها به‌صورت جداگانه در پاکت‌های کاغذی

زمان تلاش بسیاری برای استفاده از آنها در کنترل بیماری‌های گیاهی انجام شده است (Harman et al., 2004). (Benitez et al., 2004). (Manczinger et al., 2002; Monte, 2001; Papavizas 1985). در نتیجه از آن به‌عنوان یک قارچ-کش بیولوژیک، افزایش‌دهنده رشد گیاه و فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید استفاده می‌شود (Baker and Schubert et al., 2008; Cook, 1974). توانایی آنتاگونیستی *Trichoderma* از طریق آزمون‌های درون شیشه‌ای و به کمک کشت متقابل، کلنیزاسیون و تولید متابولیت‌های فرار را به اثبات رساندند (Abbaszadeh Dantoff et al., 2008; Gheorghe et al., 2011; et al., 2011; Khodaei et al., 2011; Dolat abadi et al., 1995; al., 2013; Chegini et al., 2013). قارچ‌کش مناسب باید ضمن داشتن سمیت زیاد برای عامل بیماری در غلظت پایین، برای گیاه میزبان سمی نبوده و اثرهای جانبی کمی روی جانداران غیرهدف داشته باشد. همچنین از منظر اقتصادی استفاده از آن توجیه‌پذیر بوده و احتمال بروز مقاومت در آن کم باشد (LaMondia, 2014). ضروری به‌نظر می‌رسد قبل از کاربرد و توصیه هر ترکیب شیمیایی در مدیریت بیماری‌های گیاهی، سنجش مقدار سمیت آن برای بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار بگیرد تا ترکیب مناسب انتخاب و برای عملیات سم‌پاشی در عرصه طبیعی مورد استفاده قرار گیرد و از محاسن این روش، سرعت عمل زیاد و کم‌هزینه بودن است. مدیریت عامل بیماری ذغالی بلوط متکی به یکپارچگی بهترین عملیات مدیریتی است و این عملیات شامل، بازدید، عملیات بهداشتی، کنترل‌های بیولوژیکی و کاربرد قارچ‌کش-هاست، اطلاعاتی از اثرهای قارچ‌کش‌ها در این زمینه منتشر نشده است. با توجه به عدم وجود اطلاعات علمی پیرامون تأثیر سموم شیمیایی و عوامل کنترل

قرار داده شدند. روی هر پاکت اطلاعات مربوط به مکان و تاریخ نمونه برداری درج شد. سپس هر پاکت شماره گذاری، درون یک کیسه پلاستیکی جداگانه قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه های به دست آمده تا زمان شروع آزمایش در یخچال با شرایط دمایی 1 ± 4 درجه سلسیوس نگهداری شد.

جداسازی، خالص سازی و نگهداری قارچ

در ابتدا قسمتی از نمونه های گیاهی که حاوی علائم ذغالی بودند، انتخاب شد. قطعاتی به ابعاد 5×5 میلی متر از بافت استرومایی قارچ با استفاده از تیغ اسکالپل برش داده شده و جدا شدند. تیغ اسکالپل قبل از تهیه هر برش روی شعله چراغ الکلی حرارت داده شد و درون الکل خنک شد تا استرون باشد. مراحل بعدی زیر هود بیولوژیک استرون انجام شد. بدین منظور، با استفاده از پنبه آغشته به الکل اتیلیک ۷۰ درصد سطح داخلی هود به طور کامل تمیز و به مدت ۲۰ دقیقه فضای داخلی آن با تشعشع نور ماورای بنفش لامپ U. V. استرون شد. پس از آن نمونه ها به مدت دو الی سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (وایتکس ده درصد) غوطه ور شدند. با استفاده از یک پنس استرون شده با شعله آتش، نمونه ها به مدت یک دقیقه درون تشتک پتری حاوی اتانول ۷۰ درجه قرار داده شدند. سپس با استفاده از پنس استرون نمونه ها درون آب مقطر استرون شستشو داده شدند. لازم به ذکر است تمامی ابزار فلزی مورد استفاده در کشت و خالص سازی جدایه های قارچی قبل از شروع کار درون فویل آلومینیومی گذاشته شده و در دمای 140 درجه سلسیوس درون آون استرون شدند. پس از انتقال آنها زیر هود، در مراحل بعدی به ازای هر بار استفاده روی شعله آتش استرون و درون بشر ۱۰۰ سی سی حاوی اتانول خنک شدند. ابزار به کار برده به منظور حذف اتانول یک بار از روی شعله آتش عبور داده شدند. آب مقطر قبلاً درون اتوکلاو در

دمای 121 درجه سلسیوس و به مدت ۲۰ دقیقه استرون شده بود. به منظور خشک کردن سطح، نمونه ها به مدت پنج دقیقه در میان دو لایه از کاغذ صافی استرون شده با اتوکلاو قرار داده شدند. پس از آن در کنار شعله، با استفاده از پنس استرون، تعداد پنج قطعه به ازای هر نمونه به تشتک پتری حاوی آب آگار (WA) دو درصد منتقل شدند. به منظور کاهش آلودگی، درب تشتک ها با استفاده از نوار پارافیلیم مسدود شد.

تشتک های پتری درون پس از درج مشخصات شامل نام نمونه و زمان کشت در دو لایه پلاستیک فریزر گذاشته و به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت درون انکوباتور با شرایط تاریکی مطلق و دمای 1 ± 24 درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از مشاهده جوانه زنی و استقرار میسلیوم قارچی روی محیط کشت به کمک استریومیکروسکوپ و سوزنی ظریف که روی شعله آتش استرون شده بود، به منظور خالص سازی قطعه ای از آگار حاوی نوک ریشه روی تشتک پتری حاوی محیط غذایی سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) قرار داده شد. دوباره درب تشتک های پتری با پارافیلیم مسدود و پس از ثبت مشخصات تشتک ها در شرایط مزبور درون انکوباتور نگهداری شدند.

شناسایی قارچ

در ابتدا به منظور شناسایی جنس و گونه قارچ بیمارگر درختان بلندمازو که دارای علائم ذغالی بودند خصوصیات ریخت شناسی در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس اطلاعات مندرج در کلید شناسایی گونه های جنس *Biscogniauxia* خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی ارزیابی و ثبت شد (Ju and Rogers, 2001). خصوصیات میکروسکوپی با تهیه اسلاید مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا قطره ای از اسید لاکتیک روی لام قرار گرفت. سپس با استفاده از سوزن تشریح استرون شده روی شعله، نمونه از زیر

کشت متقابل

در این آزمون به روش (Dennis and Webster, 1971a) عمل شد. بدین منظور در یک طرف تشتک پتری به فاصله دو سانتی متر از حاشیه، قطعه‌ای از آگار به قطر پنج میلی متر حاوی میسلیوم جدایه بیمارگر و در طرف دیگر با همان شرایط جدایه‌ای از *Trichoderma* قرار داده شد. در تیمار شاهد قارچ بیمارگر با همان شرایط مذکور در بالا قرار گرفته و به جای حلقه قارچ آنتاگونیست، یک حلقه پنج میلی متری از محیط کشت بدون میسلیوم قارچ آنتاگونیست در طرف دیگر قرار داده شد. سپس درب با نوار پارافیلیم مسدود و تشتک‌های پتری پس از درج مشخصات درون دو لایه پلاستیک فریزر گذاشته شدند. تشتک‌ها تا زمان پر شدن سطح محیط کشت از پرگنه قارچ بیمارگر در نمونه متعلق به تیمار شاهد در انکوباتور با دمای 24 ± 1 درجه سلسیوس نگهداری شدند. در انتها قطر رشد میسلیوم در هر تیمار اندازه‌گیری شده و درصد بازداری از رشد میسلیوم با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$\text{رابطه (۱)} \quad \frac{\text{شعاع رشد میسلیوم در غلظت معین قارچ‌کش یا قارچ تریکودرما} - \text{شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد}}{\text{شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد}} \times 100$$

شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد

جفت از تشتک‌ها شامل تشتک کشت شده با پرگنه قارچی بیمارگر و تشتک دیگر که تیمار است روبروی هم قرار گرفته و دور آنها با استفاده از پارافیلیم پوشانده و تثبیت شد. تیمارها شامل سه گونه قارچی بیوکنترل و شاهد هستند. منظور از تیمار شاهد قرص آگار فاقد میسلیوم قارچ عامل بیماری *B. mediterranea* است. پس از درج مشخصات مربوط، تشتک‌ها درون دو لایه کیسه فریزر قرار داده شده و به انکوباتور با شرایط تاریکی مطلق و دمای 24 ± 1 درجه سلسیوس منتقل شدند. لازم به ذکر است هر یک از جفت تشتک‌های مورد آزمایش طوری قرار گرفتند که تشتک حاوی عامل

سطح استروما گرفته شد و درون قطره اسیدلاکتیک به خوبی مخلوط شد. لبه لامل با زاویه ۴۵ درجه در حاشیه قطره قرار داده شده و به منظور جلوگیری از تشکیل حباب، با کمک یک سوزن باریک لامل به آرامی روی لام قرار داده شد. پس از قرار دادن لامل، به منظور تثبیت نمونه و از بین بردن حباب‌های هوا، اسلاید به مدت چند ثانیه روی شعله چراغ الکلی حرارت داده شد. پس از مشاهده ابتدایی اسلاید زیر میکروسکوپ و کسب اطمینان از صحت و کیفیت آن، برای انجام پژوهش‌های بعدی به کمک لاک اسلاید دائمی شد. مشخصات از قبیل نام نمونه و زمان تهیه درج و اسلایدها نگهداری شدند. اسلایدها زیر میکروسکوپ بررسی و تصاویر با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ ثبت شد.

بررسی قدرت بازدارندگی قارچ *Trichoderma sp.* روی

عامل بیماری ذغالی

به منظور ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیک عامل بیماری توسط گونه‌های تریکودرما از دو روش کشت متقابل و تأثیر مواد فرار استفاده شد.

اثر ترکیبات فرار

در این آزمون به روش (Dennis and Webster, 1971b) عمل شد. بدین منظور ابتدا حلقه‌های پنج میلی متری از حاشیه پرگنه دو روزه جدایه‌های قارچی مورد آزمایش برداشته و در مرکز تشتک پتری‌های نه سانتی متری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس تشتک پتری‌های به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی مطلق و دمای 24 ± 1 درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند تا از استقرار پرگنه روی محیط کشت اطمینان حاصل شود. در ادامه، درب تشتک‌های پتری در شرایط سترون زیر هود آزمایشگاهی برداشته و یک

تکان داده شد تا محیط کشت به طور کاملاً یکنواختی از سم به دست آید. سپس محتوی ارلن‌ها در کنار شعله آتش در زیر هود آزمایشگاهی سترون به درون تشتک-های پتری نه سانتی‌متری سترون ریخته شدند. در تیمار شاهد به جای محلول سمی از آب مقطر سترون استفاده شد. پس از انعقاد محیط کشت حاوی سم، یک حلقه پنج میلی‌متری از محیط کشت حاوی پرگنه در حال رشد قارچ *B. mediterranea* در هر تشتک پتری قرار داده شد. درب تشتک‌ها با نواری از پارافیلیم مسدود، مشخصات مربوط به تیمارها روی تشتک‌ها ثبت و درون دو لایه پلاستیک فریزر قرار داده شدند. سپس تشتک‌ها تا زمان پر شدن کامل سطح محیط کشت با پرگنه قارچ بیمارگر در نمونه مربوط به تیمار شاهد در شرایط تاریکی مطلق و دمای 24 ± 1 درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. اندازه‌گیری شعاع پرگنه قارچ با استفاده از کولیس از پشت تشتک پتری انجام شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل ۱۸ تیمار به همراه نمونه شاهد و هر تیمار با پنج تکرار انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی مراحل تجزیه و تحلیل آماری در محیط نرم‌افزار Stat-Graphics Centurion XV 15.2.05 (Stat-) Point Company انجام شد. به منظور اثبات وجود تفاوت معنی‌دار بین اثر کنترلی تیمارهای مورد آزمایش، جدول تجزیه واریانس (ANOVA) رسم شد. تجزیه واریانس از طریق روش GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار LSD در حداکثر سطح اطمینان درصد انجام شد.

نتایج

شناسایی بیمارگر ذغالی بلندمازو

بیوکنترل در زیر و تشتک مربوط به بیمارگر در بالا جای داشته باشد. این تشتک‌ها تا اشغال کامل سطح محیط کشت مربوط به نمونه شاهد توسط پرگنه قارچ بیمارگر در شرایط مزبور نگهداری شدند. این مدت به عنوان زمان پایان آزمایش در نظر گرفته شد. هر یک از تیمارهای نامبرده با پنج تکرار صورت گرفت. پس از گذشت زمان لازم برای رشد کامل نمونه تیمار شاهد، قطر پرگنه ارزیابی و محاسبه شد. اثر متابولیت‌های فرار تیمارهای قارچی بیوکنترل با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد:

$$IG = [(C-T)/C] \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

در این رابطه، IG، درصد بازدارندگی از رشد میسلیمومی، C، قطر رشد میسلیم بیمارگر در تشتک پتری شاهد و T، قطر رشد میسلیم بیمارگر در هر تیمار است.

بررسی تأثیر قارچ‌کش‌ها بر رشد قارچ بیمارگر

در این پژوهش اثر قارچ‌کش‌های اکسی کلراید مس، پروپیکونازول، کاربندازیم و متالاکسیل-مانکوزب بر قارچ عامل بیماری ذغالی درختان بلندمازو در شرایط کشت درون شیشه‌ای بررسی شد. اختلاط سموم با محیط کشت با روش هورسفال انجام شد. بدین ترتیب که پس از سترون‌سازی ارلن‌های محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه، به حمام بن‌ماری با دمای ۴۵ درجه سلسیوس منتقل شدند تا دمای محیط کشت ثابت و به حالت مایع باقی بماند. در این دما به ارلن‌ها، غلظت‌های از پیش تهیه شده قارچ‌کش‌ها اضافه شد و در نهایت غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام برای متالاکسیل-مانکوزب، کوپراکسی کلراید و غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام برای پروپیکونازول و کاربندازیم تهیه شدند. قبل از انتقال محیط کشت حاوی سم، مخلوط به دست آمده به آرامی

و هر یک از طریق کانالی مجزا به یک استیول منفرد وصل می‌شوند. اندازه‌گیری فضای استیولار نشان داد در پهن‌ترین قسمت عرض حدود ۰/۵ تا ۰/۷ میلی‌متر و طول آنها حدود ۱/۲ میلی‌متر است (شکل ۳). در پژوهش‌های میکروسکوپی، پریتسیوم‌ها گرد و گلابی شکل و دارای یک گردن کوتاه بودند. آسک‌ها کیسه‌ای تا سیلندری شکل و کنار یکدیگر از قاعده به سمت بالای آسکوکارپ به‌طور منظم قرار داشتند. در اسلایدهایی که پریتسیوم در آنها شکسته شده بود، تعدادی آسک سالم نیز مشاهده شده که درون آنها تعداد هشت آسکوسپور جای داشتند. برخی از آسک‌ها شکسته و آسکوسپورها به‌خوبی قابل مشاهده بودند. این اسپورهای جنسی، از گرد تا دوکی‌شکل مشاهده شدند. رنگ آنها در هنگام بلوغ قهوه‌ای تیره و گاهی روشن، سطح صاف فاقد هرگونه تزئینات بود. دو انتهای آسکوسپورها همسان و فاقد زوائد و یا هرگونه شواهدی دال بر حضور آنها از قبیل زخم حاصله از افتادن آن بود. منفذ تندشی آسکوسپورها منفرد، کشیده شده در طول آسکوسپورو به شکل صاف تا خمیده مشاهده شد. در بررسی مورفومتری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر، طول و عرض آسکوسپورها به ترتیب (۱۴) $11-16 \times (7) 6-8$ میکرومتر ارزیابی شد (شکل ۴). بر اساس مشخصات بالا و استناد بر کلیدهای معتبر علمی نام‌برده، عامل بیماری *B. mediterranea* var. *microspore* تشخیص داده شد.

پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی، ارزیابی ابتدایی به‌منظور کسب اطمینان از صحت و کیفیت آن انجام شد. بدین منظور اسلایدهایی که در آنها پریتسیوم به‌صورت کامل و سالم قرار گرفته بودند، انتخاب شد. به‌منظور ارزیابی دقیق آسکوسپورها، اسلایدهایی که حاوی تعداد کافی از آسکوسپورهای بالغ بودند نیز گزینش شدند. برای پژوهش‌های تکمیلی و به‌دلیل نیاز به نگهداری طولانی‌مدت این اسلایدها، با کمک لاک شفاف ناخن لامل به لام چسبانده شده و اسلایدهای دائمی تهیه شدند. پس از درج مشخصات شامل شماره نمونه روی اسلاید، با استناد بر کلید ارائه‌شده شناسایی قارچ بیمارگر انجام شد (Ju and Rogers, 1998, 2001). مشخصات ریخت‌شناسی قارچ عامل بیماری به شرح زیر است: با چشم غیرمسلح، استرومای بالغ به حالت افقی و کشیده، از نظر جنس به حالت کرینی و به رنگ خاکستری تیره تا سیاه، دارای حاشیه مشخص، سطح صاف به همراه شکستگی و کمی بالاتر از پوست درخت است (شکل ۱). در بزرگ‌نمایی حدود ۴۰ برابر زیر استریومیکروسکوپ، برجستگی‌های مربوط به پریتسیوم‌ها پستانکی شکل و منفذ استیول به‌خوبی قابل مشاهده بود. در مشاهده از بالا، حضور چندگانه پریتسیوم‌ها درون یک بافت استرومایی به‌خوبی قابل تشخیص است (شکل ۲). با تهیه برشی از استروما به کمک اسکالپل، فضای در برگیرنده پریتسیوم‌ها، گلابی‌شکل تا کشیده مشاهده شد. همچنین درون هر کدام فقط یک پریتسیوم حضور داشت



شکل ۱- تنه درخت بلندمازو در جنگل قرق و علائم بیماری ذغالی

Figure 1. Oak tree trunks in Ghorogh forest and symptoms of *B. mediterranea*



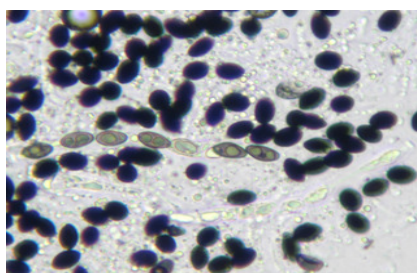
شکل ۲- برجستگی‌های پستانکی شکل در محل قرارگیری پریتسیوم درون بافت استرومایی قارچ *B. mediterranea*

Figure 2. Pacifier shaped nodes perithecia location within tissue stromal fungus *B. mediterranea*



شکل ۳- محفظه در بر گیرنده پریتسیومها در برش عرضی استرومای قارچ *B. mediterranea*

Figure 3. Cross section stromal compartment contains the perithecia of the fungus *B. mediterranea*



شکل ۴- آسکوسپورهای گونه قارچی *B. mediterranea*

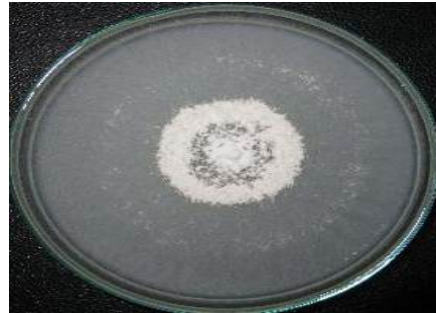
Figure 4. Ascospores fungal species *B. mediterranea*

از بافت استرومایی قارچ *B. mediterranea* هستند. به منظور خالص سازی و به دست آوردن جدایه خالص، زیر استریومیکروسکوپ و با استفاده از سوزنی باریک، قطعه کوچکی از آگار حامل نوک ریشه جدا شده و زیر هود آزمایشگاهی با رعایت اصول و نکات بهداشتی

جداسازی، خالص سازی و نگهداری قارچ پس از گذشت دو الی پنج روز، استقرار میسلیم قارچی روی سطح محیط کشت WA مشاهده شد. این میسلیمها حاصل از کشت قطعاتی به ابعاد ۵×۵ میلی متر

قرص آگار از حاشیه پرگنه که حاوی میسلیوم جوان است تهیه و روی محیط کشت PDA درون لوله آزمایشگاهی زیر کشت شد. پس از رشد قارچ تحت شرایط انکوباسیون که در بالا ذکر شده است لوله‌های آزمایش درون یخچال با دمای حدود چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

روی محیط کشت PDA قرار داده شد. پس از گذشت یک هفته از زمان شروع انکوباسیون با شرایط دمایی $24 \pm$ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق، پرگنه قارچ به حالت مخملی با حاشیه و مرکز سفید و در برخی موارد مرکز کلنی به رنگ سبز زیتونی تا خاکستری روشن مشاهده شد (شکل ۵). به منظور نگهداری طولانی مدت،



شکل ۵- کلونی قارچ بیمارگر ذغالی درختان بلندمازو روی محیط کشت PDA

Figure 5. Colony of fungi *B. mediterranea* on PDA

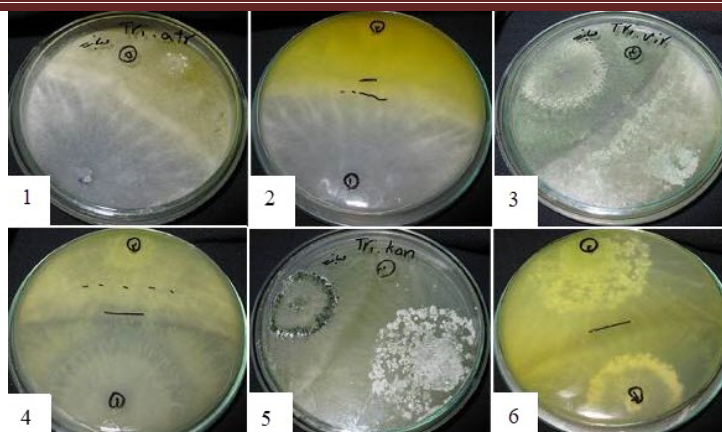
رشد میسلیومی اندازه‌گیری و ثبت شد. داده‌های به‌دست‌آمده در ابتدا به نرم‌افزار اکسل منتقل و پس از اجرا ویرایش لازم با استناد بر رابطه ۳، ارائه شده توسط (Dennis and Webster, 1971a) برای انجام تجزیه و تحلیل آماری ذخیره شدند.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط گونه-های قارچ تریکودرما پس از اشغال کامل سطح محیط کشت توسط پرگنه قارچ *B. mediterranea* در نمونه شاهد، رشد خطی میسلیوم‌ها در زیر کشت، تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۶). بدین منظور با استفاده از کولیس شعاع

رابطه (۳) شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد - شعاع رشد میسلیوم در غلظت معین $100 \times$

شرایط کشت متقابل، بیش از ۵۰ درصد است. در این رابطه، بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر در جدایه متعلق به گونه *T. koningii* رقم خورد که برابر با ۶۷/۸ درصد بود. همچنین کمترین مقدار بازدارندگی توسط جدایه متعلق به گونه *T. viride* مشاهده شد که برابر با مقدار ۶۷ درصد بود. تفاوت بین تیمارهای متعلق به قارچ‌های آنتاگونیست از نظر آماری با یکدیگر معنادار نیست (جدول ۱).

شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد در فرمول ارائه شده، همان‌طور که مشهود است پس از محاسبه نتیجه کاستن رشد خطی میسلیوم در نمونه‌های تیمار از نمونه شاهد، عدد به‌دست‌آمده تقسیم بر رشد خطی میسلیوم در نمونه شاهد می‌شود تا مقدار بازدارندگی عامل‌های تیمار بر رشد قارچ محاسبه شود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های مورد استفاده از سه گونه نام‌برده جنس قارچی *Trichoderma* در



شکل ۶- ممانعت از رشد میسلیم قارچ *B. mediterranea* توسط ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست

Figure 6. The effect of inhibitory mycelia growth of *B. mediterranea* with isolate antagonistic fungus

جدول ۱- قدرت بازدارندگی از رشد میسلیم *B. mediterranea* در کشت متقابل با قارچ آنتاگونیست

Table 1. The inhibitory effect of mycelia growth of *B. mediterranea* in dual culture with antagonistic fungus

میانگین قدرت بازدارندگی (میلی متر) Mean of inhibitory effect (mm)	قارچ‌های آنتاگونیست‌ها Antagonistic fungus
0 ^(a)	شاهد Control
69.8 ^(b)	<i>T. koningii</i>
68.1 ^(b)	<i>T. atroviride</i>
67 ^(b)	<i>T. viride</i>

LSD = 17.6641, C.V = 28.51%, P-value = 0.00371

* اعداد با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد هستند.

* Numbers with the same letters indicating non-significant statistical difference at the 1% level.

تیمار شاهد سه گونه اخیر در گروه آماری مستقلی جای می‌گیرند (جدول ۲ و شکل ۷).

نتایج تأثیر قارچ‌کش‌ها در رشد قارچ بیمارگر

نتایج حاکی از آن است که دو قارچ‌کش تفاوت معنی‌دار آماری با شاهد دارند (جدول ۳)، به طوری که قارچ‌کش پروپیکونازول در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام و کاربندازیم با غلظت ۱۰۰ پی پی ام بیش‌ترین بازدارندگی را در بین غلظت‌های قارچ‌کش‌ها داشته، رشد قارچ عامل بیماری صفر میلی‌متر بوده و بعد از این دو غلظت، پروپیکونازول ۱۰ پی پی ام با رشد ۸۷/۲ میلی‌متری و کاربندازیم ۱۰ و ۵۰ پی پی ام به ترتیب ۸۶/۲۵ و ۸۱/۴۵ میلی‌متری قارچ عامل بیماری بیش‌ترین بازدارندگی را

بررسی تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما بر جلوگیری از رشد میسلیمی بیمارگر

نتایج مربوط به قدرت بازدارندگی ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست *Trichoderma* می‌توانند در حدود ده الی ۳۰ درصد مقدار رشد میسلیمی *B. mediterranea* روی محیط غذایی PDA را کاهش دهند، اما تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر در جدایه متعلق به گونه *T. koningii* رقم خورد که در حدود ۲۸ درصد ارزیابی شد. همچنین کمترین مقدار بازدارندگی توسط جدایه متعلق به گونه *T. viride* مشاهده شد که برابر با مقدار ۱۰ درصد بود. از این نظر، جدایه‌های متعلق به گونه تریکودرما همگی در یک گروه آماری قرار گرفتند. درحالی‌که نسبت به

در میان قارچ‌کش‌ها و غلظت‌های آنها داشتند. قارچ-کش‌های متالاکسیل-مانکوزب، کوپراکسی کلراید با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام هیچ تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد بدین معنی که این دو قارچ‌کش نتوانسته‌اند در غلظت‌های مورد استفاده بر رشد قارچ عامل بیماری ذغالی تأثیر داشته باشند (جدول ۳).

جدول ۲- قدرت بازدارندگی ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست روی رشد میسلیموم *B. mediterranea*

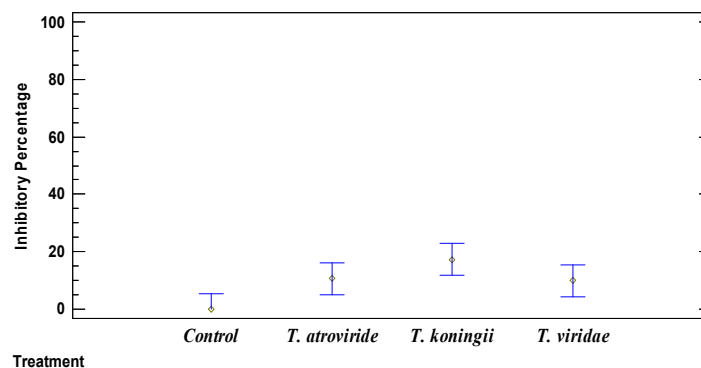
Table 2. The inhibitory effect of mycelia growth of *B. mediterranea* in dual culture with antagonistic fungus

میانگین رشد میسلیمومی (میلی متر)	قارچ‌های آنتاگونیست‌ها
Mean of mycelia growth (mm)	Antagonistic fungus
0 (a)	شاهد
	Control
28.1556 (b)	<i>T. koningii</i>
10.6667 (b)	<i>T. atroviride</i>
10 (b)	<i>T. viride</i>

LSD = 6.22881, C.V = 39.8118%, P-value = 0.0034

* اعداد با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد هستند.

* Numbers with the same letters indicating non-significant statistical difference at the 1% level.



شکل ۷- ممانعت از رشد میسلیموم قارچ *B. mediterranea* توسط ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست

Figure 7. The effect of inhibitory mycelia growth of *B. mediterranea* with isolate antagonistic fungus

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر قارچ‌کش‌ها بر قارچ *B. mediterranea* با استفاده از آزمون LSD

Table 3. Comparison of the effects of fungicides on fungi *B. mediterranea* using LSD test

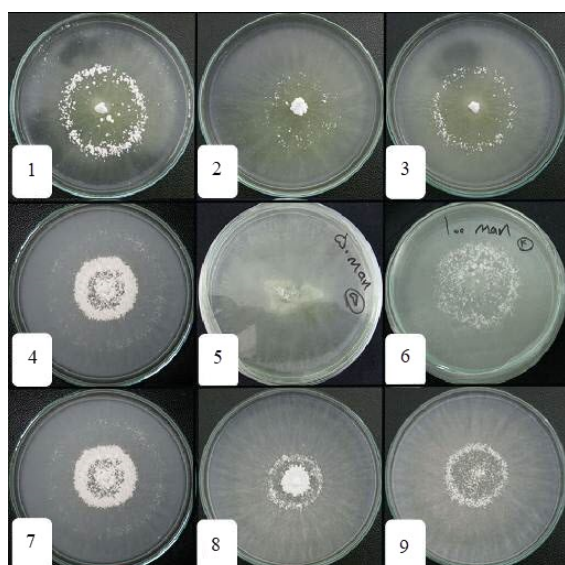
درصد بازدارندگی (غلظت سم (پی پی ام) مخلوط با محیط کشت)							قارچ‌کش‌ها
Percentage of inhibition (Toxin concentration (ppm) Mixed with growth medium)							Fungicide
500	400	300	200	100	50	10	
-	-	-	-	100 (a)	86.25 (c)	81.45 (b)	Carbendazim
-	-	-	-	100 (a)	100 (a)	81.2 (b)	Propiconazol
0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	Copper oxychloride
0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	0 (d)	Metalaxyl-Mancozeb

C.V = 35.713%, LSD = 1.18831, P-Value = 0.00023

* اعداد با حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد هستند.

* Numbers with the same letters indicating non-significant statistical difference at the 1% level.

رشد کلنی قارچ *B. mediterranea* عامل بیماری ذغالی بلوط در شرایط آزمایشگاه شد ولی قارچ‌کش‌های متالاکسیل-مانکوزب، کوپراکسی کلراید در مقایسه با شاهد هیچ‌گونه تأثیری در کنترل عامل بیماری نشان ندادند (شکل‌های ۸ و ۹).

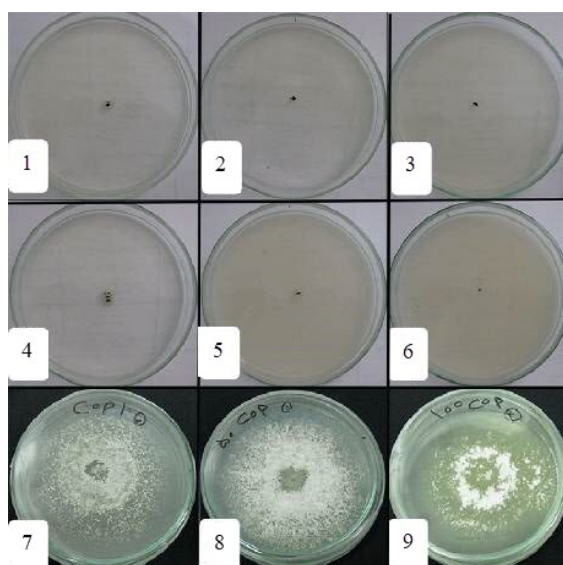


شکل ۹- ردیف اول: عدم تأثیر قارچ‌کش کوپراکسی کلراید در غلظت ۲۰۰ (۱)، ۳۰۰ (۲) و ۴۰۰ (۳) پی‌پی‌ام بر رشد خطی. ردیف دوم و سوم: عدم تأثیر قارچ‌کش متالاکسیل-مانکوزب در غلظت ۱۰ (۴)، ۵۰ (۵)، ۱۰۰ (۶)، ۲۰۰ (۷)، ۳۰۰ (۸) و ۴۰۰ (۹) پی‌پی‌ام بر رشد خطی میسلیم.

Figure 9. First row: the inactivation of copraxyl chloride fungicide at concentrations of 200 (1), 300 (2) and 400 (3) ppm on linear growth. Second and third row: The inactivation of metalaxyl-mannocid fungicide at concentrations of 10 (4), 50 (5), 100 (6), 200 (7), 300 (8) and 400 (9) ppm on linear growth of mycelium.

در ابتدا برحسب مشاهدات بالینی علائم از قبیل خروج صمغ از تنه و شاخه‌ها، کم‌پشت شدن تاج، زردی عمومی برگ‌ها و در نهایت زوال تدریجی و مرگ درختان بیمار تصور می‌شد مربوط به گونه‌هایی از شبه قارچ *Phytophthora* باشد. همچنین این علائم در سال

آزمایش‌های انجام‌شده در مورد قارچ‌کش‌های متالاکسیل-مانکوزب، کوپراکسی کلراید، کاربندازیم و پروپیکونازول روی قارچ *B. mediterranea* عامل بیماری ذغالی بلوط در کشت متقابل نشان داد که قارچ-کش پروپیکونازول و کاربندازیم سبب کنترل و کاهش



شکل ۸- ردیف اول: تأثیر کنترلی قارچ‌کش پروپیکونازول در غلظت ۱۰ (۱)، ۵۰ (۲) و ۱۰۰ (۳)، ردیف دوم: اثر کنترلی قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ۱۰ (۴)، ۵۰ (۵) و ۱۰۰ (۶) و ردیف سوم: عدم تأثیر قارچ‌کش کوپراکسی کلراید در غلظت ۱۰ (۷)، ۵۰ (۸) و ۱۰۰ (۹) پی‌پی‌ام بر رشد خطی میسلیم.

Figure 8. First row: effect of control of propiconazole fungicide at concentrations of 10 (1), 50 (2) and 100 (3) ppm on linear growth of mycelium. Second row: control effect of fungicide carbendazim at concentrations of 10 (4), 50 (5) and 100 (6) ppm on linear growth of mycelium. Third row: the inactivation of coxacharide fungicide at concentrations of 10 (7), 50 (8) and 100 (9) ppm on linear growth of mycelium.

بحث

بین سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۱ موارد متعددی از زوال و خشکیدگی تدریجی درختان بلوط ایرانی (*Q. brantii*) در سلسله جبال زاگرس مشاهده شده بود. گزارش‌ها حاکی از شیوع شدید نوعی بیماری گیاهی داشتند که

حالت زوال تدریجی صورت گرفته و قارچ به سمت پوست رشد می‌کند. خروج صمغ با پاره شدن پوست تنه و شاخه‌ها حادث و در سال بعد بافت استرومایی قارچ ظاهر و علائم مربوطه به بیماری ذغالی مشاهده می‌شود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان اذعان کرد پتانسیل آنتاگونیستی جدایه‌های هر سه قارچ *T. atroviride aviride* و *T. koningii* در بازداری از رشد میسلیمی قارچ بیمارگر ذغالی در شرایط کشت درون شیشه‌ای از نظر آماری قابل تفکیک نیست اگرچه نسبت به نمونه شاهد از قدرت بالایی در بازداری از رشد میسلیمی بیمارگر برخوردار هستند (جدول ۱). در شرایط آزمایشگاه طی تحقیق مربوط به مقابله قارچ پاتوژن با جدایه‌های مختلف *Trichoderma sp.* ثابت شد تمامی آنتاگونیست‌های مورد بررسی قادر به ممانعت از رشد کلنی عامل بیماری ذغالی بلندمازو بیش از ۵۰ درصد هستند. این خاصیت را می‌توان مربوط به قدرت زیاد رقابت رشد گونه‌های *Trichoderma sp.* دانست زیرا سرعت رشد آنها بیشتر از رشد عامل بیماری ذغالی بلوط بوده به طوری که پس از چند روز کلونی آنها را کلنیزه کرد (رقابت بر سر نیچ اکولوژیک شامل غذا و فضا). در این مورد تمام جدایه‌ها اثر کنترلی یکسانی داشتند. این نتایج با نتایج (Peyghami 2001) مطابقت داشت. نتایج آن نشان داد که کاربرد جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیولوژیکی عامل پوسیدگی انتهایی ریشه گندم مؤثر بود و تفاوت معنی‌دار آماری (۰/۰۵ < p) بین گونه‌های *T. tomentosum* و *T. harzianum* در ممانعت از رشد بیمارگر مشاهده نشد اما هر دو گونه مذکور سبب بازداری معنی‌داری (۰/۰۵ < p) از رشد میسلیمی گونه شدند (Peyghami, 2001). Khodaei و همکاران (2013) نیز عدم تفاوت معنی‌دار آماری بین اثر بازداری سه گونه قارچ تریکودرما، شامل *T. longibrachiatum* و *T. tomentosum harzianum*

۱۳۹۱ روی درختان بلندمازو (*Q. castaneifolia*) و آزاد (*Zelkova carpinifolia*) در شمال کشور مشاهده شد. بررسی‌های صورت گرفته نشان داد عامل بیماری در هر سه مورد نام‌برده، *B. mediterranea* است (Mirabolfathy et al., 2011). این پژوهش‌ها بر پایه خصوصیات ریخت‌شناسی و همچنین بارکدگذاری DNA صورت پذیرفت. بر اساس خصوصیات ارائه‌شده برای اندازه آسکوسپوره‌های عامل بیماری به‌دست‌آمده از پژوهش‌های مورفومتری (طول و عرض آسکوسپورها به ترتیب ۱۹-۱۴ × ۹-۷ میکرومتر) توسط Mirabolfathy (2011) و با استناد به کلید شناسایی گونه‌های جنس *Biscogniauxia* ارائه‌شده توسط Rogers و همکاران (1996)، می‌توان اذعان کرد قارچ معرفی‌شده توسط آن محققین به‌عنوان بیمارگر درختان بلندمازو در جنگل قرق *B. mediterranea var. mediterranea* است. بیماری ذغالی درختان جنگلی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل زوال و خشکیدگی در جنگل‌های کشور پرتغال و اسلوونی مطرح است (Jurc and Orgis, 2006). همچنین شیوع این بیماری از جنگل‌های روسیه، کشورهای حوزه آمریکای مرکزی، آفریقا و اروپا گزارش شده است. در کشور پرتغال قارچ *B. mediterranea* سبب زوال و خشکیدگی حدود ۴۰ درصد از جمعیت درختان بلوط چوب‌پنبه (*Q. suber*) شده است. این گونه‌های جنس قارچی *Biscogniauxia* در مرحله غیرجنسی به‌صورت اندوفیتی همزیست بیماری از درختان هستند. در این مرحله علائمی از حضور آنها مشاهده نمی‌شود. به اثبات رسیده است که جمعیت این همزیستان درون درختان میزبان با کاهش رطوبت و افزایش دما ارتباط مستقیم دارد به نحوی که در شرایط استرس خشکی جمعیتشان به‌شدت افزایش یافته و بافت‌های آوندی را به‌سرعت کلونیزه می‌کنند (Vannini and Scarascia Mugnozza, 1991). در این

همکاران (2008) در شرایط درون شیشه‌ای نشان دادند که گونه‌های مختلف تریکودرما در کنترل بیولوژیکی قارچ عامل بیماری پوسیدگی درختان تأثیر معنی‌داری دارند و از بین گونه‌های مختلف قارچ *T. atroviride* بیش‌ترین اثرها را در کنترل قارچ عامل بیماری را نشان داد. تأثیر متابولیت‌های فرار سه گونه *Terichoderma* را در بازدارندگی از رشد *R. solani* مقایسه کردند. تأثیر متابولیت‌های فرار *T. harzianum* به مراتب بیشتر از *T. viride* و *T. virens* مشاهده شد (Mohamadi et al., 2012). در پژوهشی که Khodaei و همکاران (2013) انجام دادند نیز مشخص شد سه گونه قارچی *T. longibrachiatum* و *T. tomentosum harzianum* در آزمون متابولیت فرار، نه تنها سبب بازدارندگی از رشد قارچ *F. semitectum* نمی‌شوند بلکه موجب تحریک رشد آن می‌شود. از طرفی تأثیر متابولیت‌های فرار *T. longibrachiatum* بر *F. solani* و *F. moniliforme* معنی‌دار نبوده است که با نتایج این تحقیق مغایرت دارد. روش‌های کنترل شیمیایی بیماری‌های گیاهی همواره به دلیل تأثیر محسوس و سریع آنها مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند (Rostaii, 2010). سموم شیمیایی شامل انواعی از قارچ‌کش‌ها، باکتری‌کش‌ها و نماتودکش‌ها هستند که اغلب آنها به کمک روش‌های شیمیایی از ترکیبات آلیو معدنی به وجود می‌آیند درحالی‌که برخی از آنها منشأ بیولوژیک داشته و به عنوان متابولیت یک موجود زنده شناخته می‌شوند، در واقع هنگام استفاده از سموم شیمیایی همواره باید عواقب ناگوار و بعضاً جبران‌ناپذیر آن مانند سمیت برای انسان، دام و دیگر جانداران غیر هدف، اثر جانبی روی آنتاگونیست‌های مفید از قبیل قارچ‌های دخیل در کنترل بیولوژیک که منتج به برهم خوردن تعادل اکولوژیک می‌شود و همچنین کاهش تنوع فلور موجود در نظر

بر قارچ *F. moniliforme* گزارش کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. همچنین Niknezhad (2007) نیز طی تحقیقات خود تفاوت معنی‌دار آماری بین گونه‌های *T. harzianum*، *T. viride* و *Gliocladium virens* از نظر بازدارندگی از رشد قارچ فوزاریوم مشاهده نکردند، هرچند که هر سه گونه در بازدارندگی از رشد بیمارگر موفق عمل کردند. با مقایسه درصد بازدارندگی از رشد سه گونه *Trichoderma* بر رشد قارچ بیمارگر در آزمون متابولیت‌های فرار (جدول ۲) می‌توان نتیجه گرفت که سه گونه *Trichoderma* استفاده‌شده در این آزمون دارای تأثیر در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر است. نتایج آزمون متابولیت‌های فرار با نتایج پژوهش‌ها مطابقت دارد (Shahiri, Behboudi et al., 2005; Mohamadi et al., 2012; tabarestani, 2008; Chegini et al., 2013)، در تمامی این پژوهش‌ها، متابولیت‌های فرار گونه‌های مختلف *Trichoderma* قادر به بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر بودند. Behboudi و همکاران (2005) گزارش کردند همگی ۲۴ جدایه تریکودرما تولید متابولیت‌های فرار می‌کنند که دارای اثر بازدارندگی بر شبه قارچ *Phytophthora capsici* هستند. در این بین برخی از جدایه‌های *T. harzianum* و *T. viride* بیش‌ترین و جدایه‌های *T. koningii* کمترین اثر بازدارندگی را داشت. گزارش کردند که متابولیت‌های جدایه‌های *Trichoderma* جداسازی شده از سطح پسته مقدار رشد پرگنه قارچی *A. flavus* را کاهش می‌دهند. در این میان گونه *T. harzianum* دارای اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به *T. longibrachiatum* بوده است (Chegini et al., 2013). گزارش کرد متابولیت‌های فرار *T. viride* تا سطح ۶۹/۹۳ درصد توانسته از رشد قارچ *R. solani* بازدارندگی کند (Shahiri tabarestani, 2008) و Schubert.

اقدامات کافی در زمینه شناسایی، آزمودن و بهینه‌سازی کاربرد آنها صورت نگرفته است. هرچند که نتایج آزمایش‌ها در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی به‌ویژه در مورد مایکوپارازیت‌ها به‌علت متفاوت بودن شرایط تحت کنترل در این آزمون‌های و شرایطی که در طبیعت حاکم است، با اطمینان بالا قابل تعمیم به شرایط میدانی نیست اما آزمون‌های آزمایشگاهی روی محیط‌های کشت و در شرایط تحت کنترل به‌ویژه در ارتباط با قارچ‌های آنتاگونیست از این نظر حائز اهمیت است که با انجام این سری از آزمایش‌ها و آگاهی از نقش و اهمیت آنها در ممانعت از رشد و توسعه قارچ‌های بیماری‌زا زمینه برای انجام پژوهش‌های میدانی فراهم می‌شود. با استناد به نتایج حاصل از این تحقیق و دیگر پژوهش‌های انجام‌گرفته در رابطه با نقش عوامل کنترل بیولوژیک، می‌توان دریافت که این عوامل قادرند به‌طور موفقیت‌آمیزی رشد بیمارگر را مهار کرده و از این رو می‌توان از آنها در آزمایش‌های گلخانه‌ای و سپس عرصه جنگلی به‌منظور کنترل قارچ عامل پوسیدگی ذغالی استفاده کرد. بی‌شک بررسی‌های آزمایشگاهی و در این پژوهش کشت درون شیشه‌ای مقدمه‌ای برای ارزیابی در سطوح بالاتر از قبیل تحقیق‌های گلخانه‌ای و یا عرصه طبیعی هستند. در این پژوهش مشخص شد هر سه گونه نام‌برده از توانایی مناسبی در بازدارندگی از رشد بیمارگر ذغالی برخوردار هستند.

References

- Abbaszadeh, F., E. Mohammadi Goltapeh, E. Pourjam, Y. Rezaie Danesh, A. Khorasani & A. Varma, 2011. Study on Antagonistic Efficacy of Root Endophytic Fungi and Trichoderma Species on *Macrophomina phaseolina* in vitro, *Quarterly Journal of Research in Plant Pathology*, 1(1): 1-15.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims & M. Blackwell, 1996. *Introductory Mycology*, 4th Ed. John Wiley & Sons Press, New York, 880 p.

گرفته شود. در ضمن هزینه اجرای کنترل شیمیایی می‌تواند یک عامل محدودکننده باشد (Rostaii, 2010). به‌طورکلی سه کاربرد برای قارچ‌کش‌ها متصور است که شامل کاهش مقدار اینوکولوم (زاد مایه) اولیه قارچی و یا ریشه‌کنی آن، غیرفعال کردن عامل بیماری در سطح میزبان (حفاظت از میزبان و پیشگیری از بیماری) و یا از بین بردن آن و درمان بیماری گیاهی استقرار یافته روی میزبان است؛ بنابراین بسته به سطح پیشرفت بیماری (مرحله تماس تا گسترش بیمارگر) انتخاب نوع قارچ-کش می‌تواند تغییر کند. یک قارچ‌کش مناسب باید ضمن داشتن سمیت زیاد برای عامل بیماری در غلظت پایین، برای گیاه میزبان سمی نبوده و اثرهای جانبی کمی روی جانداران غیر هدف داشته باشد. همچنین از منظر اقتصادی استفاده از آن توجیه‌پذیر بوده و احتمال بروز مقاومت در آن کم باشد (LaMondia, 2014). روش‌های کنترل بیولوژیک ممکن است در مقایسه با روش‌های کنترل شیمیایی، از کارایی پایین‌تری برخوردار باشند، اما باید در نظر داشت که عوامل بیولوژیک به‌شرط سازگاری، از دوام بیشتری در اعمال اثر برخوردار بوده و به حفظ تنوع زیستی کمک می‌کنند. در ضمن موانع موجود در زمینه‌های تجاری‌سازی عوامل بیولوژیک، سبب جلوگیری از تولید انبوه آنها شده است. به‌نظر می‌رسد که عدم استفاده وسیع از عوامل بیولوژیک انعکاس‌دهنده این واقعیت است که

- Baker, K. F. & R. J. Cook, 1974. *Biological control of plant pathogens*, WH Freeman and Company Press, 433 p.
- Behboudi, K., A. Sharifi tehrani, GH. A. Hejaroud & S. J. Zad, 2005. Antagonistic effects of *Trichoderma* species on *Phytophthora capsici*, the causal agent of pepper root and crown rot, *Quarterly Iranian Journal of Plant Pathology*, 41(3): 345- 362. (In Persian)
- Benitez, T., A. M. Rincon, M. C. Limon & A. C. Codon, 2004. Biocontrol mechanisms of

- Trichoderma* strains, *International Microbiology*, 7(4): 249-260.
- Chegini, S., K. Behboudi, M. Javan nikkhah & M. Farzane, 2013. Study the effect of *Trichoderma* spp Isolate in preventing growth of fungus *Aspergillus flavus* and Reduce aflatoxin on pistachio, *Biological control of pests and plant diseases*, 2(2): 71-79. (In Persian)
 - Collado, J., G. Platas, I. González & F. Peláez, 1999. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*, *The New Phytologist*, 144(3): 525-532.
 - Datnoff, L. E., S. Nemeč & K. Pernezny, 1995. Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*, *Biological Control*, 5(3): 427-431.
 - Dennis, C. & J. Webster, 1971b. Antagonist properties of species group of *Trichoderma*, 2. Production of volatile antibiotics, *Transaction of British Mycological Society*, 57(1): 41-48.
 - Dennis, C. & J. Webster, 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions, *Transactions of the British Mycological Society*, 57(3): 363-369.
 - Dolatabadi, K. H., E. M. Goltapeh, A. Varma & N. Rohani, 2011. In vitro evaluation of arbuscular mycorrhizal-like fungi and *Trichoderma* species against soil borne pathogens, *Journal of Agriculture Technology*, 7(1): 73-84.
 - Gheorghe, A., L. Jeca, A. Rosu, F. Popea, A. Voicu & A. Nita, 2008. Antagonism of *Trichoderma* sp. vs phytopathogen microorganisms. Proceedings of the International Conference BIOATLAS Transilvania University of Brasov, Romania.
 - Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet & M. Lorito, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature Reviews Microbiology*, 2(1): 43-56.
 - Ju, Y. M. & J. D. Rogers, 2001. New and interesting *Biscogniauxia* taxa, with a key to the world species, *Mycology Research*, 105(9): 1123-1133.
 - Ju, Y. M. & J. D. Rogers, 1996. A revision of the genus *Hypoxydon*, American Phytopathological Society (APS Press).
 - Ju, Y. M., J. D. Rogers, F. San Martin & A. Granmo, 1998. The genus *Biscogniauxia*, *Mycotaxon*, 66: 1-98.
 - Jurc, D. & N. Ogris, 2006. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia, *Plant Pathology*, 55(2): 299-299.
 - Khanjani, M., J. Khalghani & M. J. Soleimani pari, 2008. Principles of Control of pests and plant diseases, Payam noor University of Publication. 303 p. (in Persian)
 - Khoda Parast, S. A., 2010. Dynasty of Fungi, Gilan university of Publication, 811 p. (in Persian)
 - Khodaei, A., M. Arzanlou & A. Babayi ahari, 2013. Inhibitory Effects of Three *Trichoderma* Species Against three Species of *Fusarium* in Laboratory Conditions, *Journal of Agricultural sciences and Sustainable Production*, 22(4.1): 105-115. (In Persian)
 - LaMondia, J. A., 2014. Fungicide efficacy against *Calonectria pseudonaviculata*, causal agent of boxwood blight, *Plant Disease*, 98(1): 99-102.
 - Linaldeddu, B. T., A. Franceschini & M. A. Pulina, 2005. Epidemiological aspects of *Biscogniauxia mediterranea* in declining cork oak forests in Sardinia (Italy), *IOBC WPRS BULLETIN*, 28(8): 75-81.
 - Manczinger, L., Z. Antal & L. Kredics, 2002. Ecophysiology and breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 49(1): 1-14.
 - Mirabolfathy, M., J. Z. Groenewald & P. W. Crous, 2011. The Occurrence of Charcoal Disease Caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Chestnut-Leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) in the Golestan Forests of Iran, *Plant Disease*, 95(7): 876-876.
 - Mohamadi, S., R. Mohamadi & N. Arshadi, 2012. Biological control of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium* determine antagonistic alternative use of pesticides to protect the environment. First International Conference of environmental crisis and ways to improve it. (In Persian)
 - Monte, E., 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology, *International Microbiology*, 4(1): 1-4.

- Mozaffarian, V., 2004. Trees and Shrubs of Iran, Fahang- moaser Publication, Tehran, 991 p (in Persian).
- Niknezhad kazempour, M., 2007. Effect of *Pseudomonas fluorescens* isolates on *Rhizoctonia solani* Kühn the causal agent of sheath blight on rice, *Journal of Agriculture Science*, 12(4): 729-744. (In Persian)
- Nugent, G., K. W. Fraser, G. W. Asher & K. G. Tustin, 2001. Advance in New Zealand Mammalogy 1990-2000, Deer, *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 31(1): 263-298.
- Papavizas, G. C., 1985. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol, *Annual Review of Phytopathology*, 23(1): 23-54.
- Peyghami, E., 2001. Anagonistic Effects of Several Isolates of Trichoderma on Fungi Causing Onion Root Rot, East Azarbaijan Province, *Iranian Journal of Agriculture Sciences*, 32(3): 747-755. (In Persian)
- Resane, Y., Moshtagh kahnmoii and Salehi, P. 2001. Quantitative and qualitative study of northern forests. National Conference on Management of northern forests and sustainable development. 55-79. (in Persian)
- Rogers, J. D., Y. M. Ju & F. Candoussau, 1996. *Biscogniauxia anceps* comb. nov. and *Vivantia guadalupensis* gen. et sp. nov, *Mycological Research*, 100(6): 669-674.
- Rostaii, A., 2010. Plant pathology and plant diseases, SID Press, Tehran, 521 p. (in Persian)
- Schubert, M., S. Fink & F. W. Schwarze, 2008. In vitro screening of an antagonistic Trichoderma strain against wood decay fungi, *Arboricultural Journal*, 31(4): 227-248.
- Shahirie tabarestani, M., 2008. Investigate the mechanism of the effect Isolates of Trichoderma and Gliocladium on the growth of fungi *Rhizoctonia solani*. *Peyke olume noor*. 2(1): 25-37. (In Persian)
- Spooner, B., 1986. Weavers and Dealers: The Authenticity of an Oriental Carpet, *The social life of things: Commodities in cultural perspective*, 1: 95-235.
- Vannini, A. & G. Scarascia Mugnozza, 1991. Water stress: a predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*, *Forest Pathology*, 21(4): 193-201.

The effect of biological compounds and fungicides to combat *Biscogniauxia mediterranea* causal agent of "Charcoal Disease" in vitro

M. R. Kavosi¹, R. Yavarian², A. Mohamadzade^{*3} and J. Karami⁴

1- Associate Professor, Department of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I.R. Iran.

2- M.Sc. of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I.R. Iran.

3- Ph.D. student of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I.R. Iran.

4- Ph.D. of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Recourses, Gorgan, I.R. Iran.

Received: 09.05.2017

Accepted: 17.12.2017

Abstract

In this research, sampling was conducted quite randomly from the Ghorogh forest park located in Golestan province. After isolation and purification of the fungi, charcoal pathogen was detected in Caucasian oak based on the information contained in *Biscogniauxia* key species identification. The effect of three fungal species including *Trichoderma viride*, *T. atroviride* and *T. koningii* on growth rate of charcoal pathogen in vitro evaluated using two dual culture test assay and the impact of volatile substances. All three species of *Trichoderma* used in dual culture tests and the impact of volatile substances, have a positive impact on the growth of the fungus. Also effect of different concentrations of fungicides including Copper oxychloride, Propiconazole, Carbendazim and Metalaxyl - Mancozeb upon the causal agent of charcoal disease were investigated in vitro culture conditions. Results showed that Propiconazol at concentrations of 50-100 ppm, and Carbendazim at concentrations of 100 ppm have the highest percentage of inhibition among the concentrations of all fungicides. Metalaxyl – Mancozeb and Copper oxychloride showed no significant difference with the control means.

Keywords: Golestan province, *Quercus castaneifolia*, *Biscogniauxia*, *Trichoderma*, Ghorogh Forest.

* Corresponding author:

Email: Ecology2020@yahoo.com