



عنوان مقالات

- مهار زبستی *Fusarium fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از برخی باکتری‌های
آنتاگونیست در استان گیلان ۲۷۸
محمد رضا صفری مطلق - مرضیه دشتی
- شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های عمده *Meloidogyne* و پراکنش آن‌ها در باغ‌های انار
استان‌های خراسان ۲۹۷
نفسه کتولی - عصمت مهدیخانی مقدم - رضا اقنوم
- بهینه‌سازی روش‌های مولکولی شناسایی نماتد عامل ریشه‌گره‌ای (*Meloidogyne javanica*) ۳۰۹
رحمان کشاورز کوهجردی - علی پاک نیت جهرمی - مهرزاد هنرور - مجید پاک نیت جهرمی
- بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس کوتولگی سبزه هندوانه (WmCSV) استان سیستان و بلوچستان
بر اساس توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی ۳۲۵
مجید جعفری - زهرا صادقی - سعید نصراله نژاد - احمد رضا شاهرخی
- تأثیر *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* بر بیماری‌زایی *Meloidogyne javanica* در سه رقم هلو در
شرایط گلخانه ۳۳۷
اکرم عبدالحی ارجنکی - ناصر پنجه‌که - علی اکبر فدایی تهرانی - محمد سالاری - عبدالحسین طاهری
- تأثیر ارقام مختلف سیب‌زمینی روی جمعیت تریپس پیاز، *Thrips tabaci* Lindeman و دشمنان طبیعی آن در
شرایط مزرعه‌ای استان اردبیل ۳۴۷
سید علی اصغر فتحی - مهدیه جعفری جاهد
- مورچه‌های (Hymenoptera: Formicidae) همیار با شیشک *Paracoccus ficus* در انجیرستان‌های
استان فارس ۳۵۷
مهدی اسفندیاری - شیمیا محمدی - مسلم جعفری - معصومه مقدم
- اثر روغن‌های گیاهی بر کارایی علف‌کش ستوکسیدیم در کنترل یولاف‌وحشی (*Avena ludoviciana* Durieu.) ۳۶۱
حسین حمامی - محمد حسن راشد محصل - مهدی پارسا - محمد بنایان اول - اسکندر زند
- تأثیر توالی و فاصله زمانی افزودن ماده افزودنی و سولفوسولفوروئید به آب سخت در کنترل یولاف وحشی زمستانه
اکبر علی وردی - سمیه بدرخانی - گودرز احمدوند ۳۷۳
(*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* Durieu.)
- بررسی مقاومت بیوتیپ‌های یولاف وحشی زمستانه به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase در مزارع گندم
شهرستان رامیان ۳۸۵
مهتاب هروی - جاوید قرخلو - آسیه سیاهمرگویی - حسین کاظمی - سعید حسن پور بورخیلی

Contents

- Biological Control of *Fusarium fujikuroi*, the Causal Agent of Bakanae Using Some
Antagonistic Bacteria in Guilan Province 295
M.R. Safari Motlagh - M. Dashti
- Morphological and Molecular Identification of Major Species of *Meloidogyne* and Distribution
there in Pomegranate Orchards in Khorasan Provinces 308
N. Katooli - E. Mahdikhani Moghadam - R. Aghnour
- Improving Molecular Diagnosis of Root Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) 324
R. Keshavarz Kuhjerdi - A. Pakniat Jahromi - M. Honarvar - M. Pakniat Jahromi
- Phylogenetic Relation of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) Isolates of Sistan and
Baluchestan Province by Sequencing of Coat Protein Gene 336
M. Jafari - Z. Sadeghi - S. Nasrollanejad - A.R. Shahrokhi
- The Effect of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* on Pathogenicity of *Meloidogyne javanica* in
Three Rootstocks of Peach under Greenhouse Condition 346
A. Abdollahi Arjenaki - N. Panjehkeh - A.A. Fadaei Tehrani - M. Salari - A.H. Taheri
- Effect of Different Cultivars of Potato on Population Density of the Onion Thrips, *Thrips
tabaci* Lindeman and its Natural Enemies under Field Condition in Ardabil Province 356
S.A.A. Fathi - M. Jafari Jahed
- Mutualistic Ants (Hymenoptera: Formicidae) Associated with *Paracoccus ficus* in Fig
Orchards of Fars Province, Iran 360
M. Esfandiari - Sh. Mohammadi - M. Jafari - M. Moghaddam
- Effect of Vegetable Oils on Sethoxydim Efficacy on the Control of Wild Oat
(*Avena ludoviciana* Durieu.) 371
H. Hammami - M.H. Rashed Mohassel - M. Parsa - M. Bannayan-Aval - E. Zand
- The Effect of Sequence and Time Interval of Adding Adjuvant and Sulfosulfuron to Hard
Water in the Control of Winter Wild Oat (*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* Durieu.) 383
A. Aliverdi - S. Badrkhani - G. Ahmadvand
- Investigating the Resistance of Winter Wild Oat Biotypes to ACCase Inhibitor Herbicide in
Wheat Fields of Ramian County 399
M. Heravi - J. Gherekhloo - A. Siahmarguee - H. Kazemi - S. Hassanpour - Bourkheili

نشریه حفاظت گیاهان

(علوم و صنایع کشاورزی)

با شماره پروانه 21/2015 و درجه علمی - پژوهشی شماره 26524 از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
68/4/11 73/10/19

پاییز 1399

شماره 3

جلد 34

بر اساس مصوبه وزارت عتف از سال 1398، کلیه نشریات دارای درجه "علمی-پژوهشی" به نشریه "علمی" تغییر نام یافتند.

صاحب امتیاز: دانشگاه فردوسی مشهد

مدیر مسئول: رضا ولی زاده استاد - تغذیه نشخوارکنندگان (دانشگاه فردوسی مشهد)

سرمدیر: راشد محصل، محمد حسن استاد - علوم علف های هرز (دانشگاه فردوسی مشهد)

اعضای هیئت تحریریه:

ایزدی دربندی، ابراهیم	دانشیار - علوم علف های هرز (دانشگاه فردوسی مشهد)
پور جم، ابراهیم	دانشیار - بیماری شناسی گیاهی (دانشگاه تربیت مدرس تهران)
حسینی، مجتبی	دانشیار - حشره شناسی کشاورزی (دانشگاه فردوسی مشهد)
راشد محصل، محمد حسن	استاد - علوم علف های هرز (دانشگاه فردوسی مشهد)
راشد محصل، آرش	محقق، اکولوژی حشرات، تگزاس
راضی، هومن	دانشیار - ژنتیک مولکولی (دانشگاه شیراز)
رجائی، حسین	حشره شناس، مدیر کلکسیون بالپولکداران، موزه ایالتی تاریخ طبیعی اشتوتگارت (آلمان)
صادقی نامقی، حسین	استاد - حشره شناسی کشاورزی (دانشگاه فردوسی مشهد)
صبوری، علیرضا	استاد - حشره شناسی کشاورزی (دانشگاه تهران)
صحراگرد، احد	استاد - حشره شناسی کشاورزی (دانشگاه گیلان)
مرعشی، سید حسن	استاد - بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)
مهدیخانی مقدم، عصمت	استاد - بیماری شناسی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)

ناشر: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد

نشانی: مشهد - کد پستی 91775 صندوق پستی 1163

دانشکده کشاورزی - دبیرخانه نشریات علمی - نشریه حفاظت گیاهان

پست الکترونیکی جهت مکاتبات: Jpp1@um.ac.ir نمابر: 0511-8787430

این نشریه در پایگاههای زیر نمایه شده است:

پایگاه استنادی علوم ایران (ISC) پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID) بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)

مقالات این شماره در سایت <https://jm.um.ac.ir> به صورت مقاله کامل نمایه شده است .

این نشریه به صورت فصلنامه (4 شماره در سال) چاپ و منتشر می شود.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

مندرجات

صفحه	عنوان مقاله
278	مهار زیستی <i>Fusarium fujikuroi</i> عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از برخی باکتری‌های آنتاگونیست در استان گیلان محمد رضا صفری مطلق - مرضیه دشتی
297	شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های عمده <i>Meloidogyne</i> و پراکنش آن‌ها در باغ‌های انار استان‌های خراسان نفیسه کتولی - عصمت مهدیخانی مقدم - رضا اقنوم
309	بهبودسازی روش‌های مولکولی شناسایی نماتد عامل ریشه‌گره‌ای (<i>Meloidogyne javanica</i>) رحمان کشاورز کوهجردی - علی پاک نیت جهرمی - مهرزاد هنرور - مجید پاک نیت جهرمی
325	بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس کوتولگی سبزد هندوانه (WmCSV) استان سیستان و بلوچستان بر اساس توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی مجید جعفری - زهرا صادقی - سعید نصراله نژاد - احمد رضا شاهرخی
337	تأثیر <i>Bacillus subtilis</i> و <i>Bacillus cereus</i> بر بیماری‌زایی <i>Meloidogyne javanica</i> در سه رقم هلو در شرایط گلخانه اکرم عبداللہی ارجنکی - ناصر پنجه‌که - علی اکبر فدایی تهرانی - محمد سالاری - عبدالحسین طاهری
347	تأثیر ارقام مختلف سیب‌زمینی روی جمعیت تریپس پیاز، <i>Thrips tabaci</i> Lindeman و دشمنان طبیعی آن در شرایط مزرعه‌ای استان اردبیل سید علی اصغر فتحی - مهدیه جعفری جاہد
357	مورچه‌های (Hymenoptera: Formicidae) همیار با شپشک <i>Paracoccus ficus</i> در انجیرستان‌های استان فارس مهدی اسفندیاری - شیمیا محمدی - مسلم جعفری - معصومه مقدم
361	اثر روغن‌های گیاهی بر کارایی علف‌کش ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی (<i>Avena ludoviciana</i> Durieu.) حسین حمامی - محمد حسن راشد محصل - مهدی پارسا - محمد بنایان اول - اسکندر زند
373	تأثیر توالی و فاصله زمانی افزودن ماده افزودنی و سولفوسولفورون به آب سخت در کنترل یولاف وحشی زمستانه (<i>Avena sterilis</i> ssp. <i>ludoviciana</i> Durieu.) اکبر علی وردی - سمیه بدرخانی - گودرز احمدوند
385	بررسی مقاومت بیوتیپ‌های یولاف وحشی زمستانه به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase در مزارع گندم شهرستان رامیان مہتاب هروی - جاوید قرخلو - آسیه سیاهمرگویی - حسین کاظمی - سعید حسن پور بورخیلی

مقاله علمی-پژوهشی

مهار زیستی *Fusarium fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از برخی باکتری‌های آنتاگونیست در استان گیلان

محمد رضا صفری مطلق^{۱*} - مرضیه دشتی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۱

چکیده

در این تحقیق از مجموع ۸۰ نمونه برنج جمع‌آوری شده از شالیزارهای استان گیلان، ۱۸ سویه باکتریایی جداسازی گردید و توانایی آنتاگونیستی هشت سویه باکتریایی شامل *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens* (N47)، *Pseudomonas aeruginosa* (CHA0) و *Pseudomonas fluorescens* (149) در آزمایشگاه و گلخانه به اثبات رسید. در روش کشت متقابل *P. putida* با ۳۹/۹۲ درصد، در روش اثر ترکیبات فرار *B. subtilis* با ۳۱/۰۱ درصد، در روش تولید سیدروفور سویه‌های *P. fluorescens* (N47) و *B. subtilis* به ترتیب با ۵۲/۱۰ و ۴۵/۸۵ درصد و در روش تولید آنتی‌بیوتیک *P. putida* با ۵۹/۲۱ درصد بیشترین تأثیر را در مهار رشد میسلیمی قارچ عامل بیماری نشان دادند. این سویه‌های باکتریایی روی برنج در شرایط گلخانه‌ای، مایه‌زنی شدند. در بین باکتری‌های مورد بررسی، کمترین شدت بیماری به‌ترتیب متعلق به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis*، در مورد صفت ارتفاع بیشترین ارتفاع به‌ترتیب مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* و در مورد صفات وزن تر و نیز وزن خشک بیشترین وزن مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوکنترل در آزمایشگاه و گلخانه، سویه‌های *P. putida* و *B. subtilis* موثرترین باکتری‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج بودند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های آنتاگونیست، برنج، مهار زیستی، *Fusarium fujikuroi*

مقدمه

مرحله جوانه‌زنی مشاهده شد که تمام پنج باکتری آنتاگونیست، کنترل خوبی بر روی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج و تأثیر بسزایی در بهبود عملکرد برنج از خود نشان دادند. هوا و همکاران (۶) اثر کنترلی *B. subtilis* علیه بیماری پوسیدگی طوقه برنج را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که اثر کنترلی این باکتری با توجه به شرایط آزمایش قابل قبول بود و علاوه بر این، این سویه مانع جوانه‌زنی بذر و رشد جوانه برنج نشد. کومار و همکاران (۱۲)، در مطالعه‌ای نشان دادند که سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* از طریق تولید آنزیم‌های مختلف مانند پکتیناز و نیز تولید سیدروفور به‌طور معنی‌داری رشد میسلیمی قارچ را کاهش داده و نیز باعث کاهش شدت بیماری در گلخانه شدند. در مطالعه ماتینج و همکاران (۱۴) در مورد کنترل *F. fujikuroi* در برنج با استفاده از آنتاگونیست‌های باکتریایی مشخص گردید که تیمار بذر با باکتری‌های آنتاگونیست به همراه حرارت درمانی در کنترل بیماری موثر است. علاوه بر آن کاظم‌پور و انوری (۹) در تحقیق دیگری به این نتیجه رسیدند که سویه‌های مختلف *P. fluorescens* از طریق تولید فنازین کربوکسیلیک اسید موجب مهار

پوسیدگی طوقه برنج از جمله بیماری‌های مهم در ارقام پرمحصول برنج نظیر خزر و سپیدرود می‌باشد (۱۶). کنترل بیولوژیک یکی از روش‌هایی است که امروزه سرمایه‌گذاری گسترده‌ای در دنیا روی آن انجام شده است. در تحقیق انجام شده به‌وسیله روزالس و میو (۱۷) از میان بیش از ۴۰۰ سویه باکتریایی، ۱۱۳ سویه به عنوان بازدارنده رشد میسلیمی عامل پوسیدگی طوقه برنج معرفی شدند که از طریق بهبود جوانه‌زنی گیاه برنج منجر به کاهش بیماری بین ۷۱ تا ۹۳ درصد گردیدند. لو و همکاران (۱۳)، اثر باکتری‌های آنتاگونیست علیه بیماری پوسیدگی طوقه برنج و عملکرد برنج را بررسی کردند. در

۱- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی

(*)- نویسنده مسئول: (Email: ssafarimotlagh@yahoo.com)

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، موسسه آموزش عالی دیلمان لاهیجان

رشد عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج می‌گردند. هدف از این تحقیق، کشت، جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی است که خاصیت آنتاگونیستی در مقابل *F. fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج نشان داده و در کنترل بیولوژیکی عامل بیماری در آزمایشگاه و گلخانه مؤثر باشند.

مواد و روش‌ها

پس از نمونه‌برداری از خزانه‌ها و مزارع آلوده و از نشاء، برگ، طوقه و خوشه برنج، جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی بر پایه صفات ریخت‌شناسی انجام شد. جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های متفاوت از لحاظ مشخصات پرگنه به روش کشت خطی در محیط نوترینت آگار انجام شد (۱). برای شناسایی سویه‌های باکتریایی از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اکسیداز، آزمون کاتالاز، رشد بی‌هوازی در محیط مایع گلوکز، تولید رنگیزه فلورسنت روی محیط کشت کینگزبی، استفاده از سیترات، هیدرولیز نشاسته، تولید اسپور، هیدرولیز ژلاتین، آزمون تحرک، استفاده از آرابینوز، استفاده از مانیتول و آزمون تولید مواد احیاکننده از سوکروز استفاده شد (۱۸). در مطالعات کنترل بیولوژیک و در آزمایشگاه از روش‌های کشت متقابل (۱۹)، اثر ترکیبات فرار (۴)، تولید مواد سیدروفور (۵) و تولید آنتی‌بیوتیک (۱۱) استفاده شد. در مطالعات گلخانه‌ای پس از مایه‌زنی قارچ‌های بیمارگر و سویه‌های باکتریایی آنتاگونیست روی گیاه برنج، شدت بیماری محاسبه گردید (۲) و سپس ارتفاع، وزن تر، و وزن خشک بوته‌های برنج تعیین گردید. آزمایش‌های گلخانه‌ای در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار و سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام گرفت.

نتایج و بحث

از مجموع جدایه‌های قارچی به‌دست آمده، تعداد ۱۰ جدایه قارچی از *F. fujikuroi* برای مطالعات بیماری‌زایی و بررسی‌های کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه و از میان این جدایه‌ها، یک جدایه قارچی برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب گردید. از مجموع ۱۸ سویه باکتریایی جداشده، هشت سویه باکتریایی شناسایی شده بر اساس مطالعات فنوتیپی که در این بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از: *Pseudomonas*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *aeruginosa*، سه سویه از *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas syringae*. لازم به ذکر است که دلیل نام‌گذاری سه سویه *P. fluorescens* تفاوت در منطقه جغرافیایی جداسازی آنها و نیز رنگ و سرعت رشد پرگنه

بود که تفاوت‌هایی با هم داشتند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در آزمون‌های کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و تولید آنتی‌بیوتیک بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر درصد مهار رشد میسلیمی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیمی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در کشت متقابل، بیشترین درصد مهار مربوط به تیمار *P. putida* با ۳۹/۹۲ درصد بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیمی هم مربوط به تیمار *P. fluorescens* (N47) با ۹/۶۵ درصد بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱). در این تحقیق مجموعاً ۱۸ سویه باکتریایی از فلور طبیعی برنج، جداسازی گردید که توانایی آنتاگونیستی هشت سویه از این باکتری‌ها علیه قارچ عامل بیماری با استفاده از روش کشت متقابل به اثبات رسید. در تحقیقی کومار و همکاران (۱۲) تاثیر باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* در مهار زیستی *F. moniliforme* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج را مورد بررسی قرار دادند. آنها در مجموع شش سویه از باکتری‌های *P. fluorescens* و ۳ سویه از *B. subtilis* را مورد آزمایش قرار دادند که در روش کشت متقابل به ترتیب ۵۲/۱ و ۵۸/۴ درصد باعث مهار رشد *F. moniliforme* شدند که با مطالعه حاضر مبنی بر کارایی دو باکتری فوق در کنترل قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه هم‌سو است. نتایج آزمون کشت متقابل سویه‌های باکتری‌های آنتاگونیست نشان داد که از مجموع هشت سویه باکتریایی، سویه‌های *P. putida* و *B. subtilis* به‌ترتیب با ۳۹/۹۲ و ۳۰/۲۲ درصد موفق به مهار رشد میسلیمی *F. moniliforme* در مقایسه با شاهد شدند که این نتیجه با نتایج به‌دست آمده از تحقیق کاناهی و همکاران (۸) و کومار و همکاران (۱۲) در مورد کارایی این دو سویه باکتریایی در کاهش رشد بیمارگر مطابقت داشت.

همچنین بیشترین درصد مهار رشد میسلیمی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در آزمون متابولیت‌های فرار، مربوط به تیمار *B. subtilis* با ۳۱/۰۱ درصد بود که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیمی هم مربوط به تیمار *P. syringae* بود که به‌جز تیمار *B. subtilis* با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱). در این تحقیق تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی سویه‌های آنتاگونیست روی رشد *F. fujikuroi* مورد مطالعه قرار گرفت و معلوم شد که تمام این سویه‌ها، ترکیبات فراری را تولید می‌نمایند که تأثیر مطلوبی در بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری دارند و از بین آنها *B. subtilis* و *P. fluorescens* (N47) به‌ترتیب با ۳۱/۰۱ و ۳۰/۵۶ درصد بیشترین تأثیر در بازدارندگی رشد *F. fujikuroi* در مقایسه با شاهد را داشتند که این امر با یافته نوروژیان و همکاران (۱۵) مطابقت داشت.

طوقه هم علائم پوسیدگی نمایان شد. پس از گذشت ۱۰ روز علائم بیماری کاملاً آشکار شد، بدین معنی که برگ‌ها کاملاً زرد شده و سپس علائم نکروز و در قسمت‌هایی کلروز مشاهده گردید و همچنین در قسمت طوقه، پوسیدگی تقریباً شدید ظاهر شد. در این حالت میانگین شدت بیماری ۷/۹ بود. در گیاهانی که به‌طور هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *B. subtilis* مایه‌زنی شده بودند، اولین علائم پنج روز پس از تلقیح به‌صورت ایجاد لکه‌های کوچک زرد رنگ روی طوقه و برگ برنج ظاهر شد. استفاده از این باکتری باعث کاهش شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله عامل بیماری، به میزان ۴۵/۵۶ درصد گردید. در گیاهانی که به‌طور هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *B. circulans* مایه‌زنی شده بودند، این باکتری شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *F. fujikuroi* را به میزان ۲۰/۷۷ درصد کاهش داد. در تلقیح هم‌زمان با عامل بیماری و *P. putida* اولین علائم شش روز پس از تلقیح به صورت لکه‌های زرد خفیف روی طوقه، ساقه و برگ برنج ظاهر شد. این باکتری ۶۲/۰۲ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در مایه‌زنی هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. syringae* اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت نازک شدن برگ‌ها و ایجاد لکه‌های کوچک متعدد بر روی طوقه، ساقه و برگ برنج ظاهر شد. این باکتری شدت بیماری را به‌میزان ۲۴/۰۵ درصد کاهش داد. در تلقیح هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. aeruginosa* شدت بیماری به میزان ۳۱/۱۶ درصد کاهش یافت. در مایه‌زنی هم‌زمان با قارچ عامل بیماری و *P. fluorescens* (N47) اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت لکه‌های کوچک زرد و قهوه‌ای روی برگ‌های برنج ظاهر شد. استفاده از این باکتری شدت بیماری را ۴۰/۵ درصد کاهش داد. در تلقیح هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (149) کاربرد باکتری آنتاگونیست باعث کاهش شدت بیماری به میزان ۱/۲۶ درصد شد. در مایه‌زنی هم‌زمان با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (CHA0) اولین علائم چهار روز پس از تلقیح به‌صورت لکه‌های کوچک روی برگ و طوقه برنج ظاهر شد و این باکتری شدت بیماری را به میزان ۳۹/۲۴ درصد کاهش داد. لازم به ذکر است که در همه موارد ذکر شده در بالا در گیاهان برنج شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در شرایط گلخانه، بین تیمارهای مختلف از نظر صفات شدت بیماری، وزن تر، وزن خشک و ارتفاع بوته اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. در بین باکتری‌های مورد بررسی، کمترین شدت بیماری به‌ترتیب متعلق به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و همچنین با سایر باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند. همچنین بیشترین شدت بیماری مربوط به *P. fluorescens* (149) بود که به غیر از شاهد *F. fujikuroi* با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

به طور کلی در آزمون تولید آنتی‌بیوتیک، بیشترین درصد مهار مربوط به تیمارهای *P. putida* با ۵۹/۲۱ درصد و *B. subtilis* با ۵۶/۵۷ درصد بود که بین این دو تیمار و *P. aeruginosa* اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کمترین درصد مهار رشد میسلیمی نیز مربوط به تیمار *B. circulans* با ۱۷/۵۵ درصد بود که با تیمارهای *P. syringae* و *P. fluorescens* (149)، *P. fluorescens* (N47) اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱). در مطالعه حاضر و در آزمایش تأثیر آنتی‌بیوتیک، سویه‌های *P. putida*، *B. subtilis* به‌ترتیب با ۵۹/۲۱ و ۵۶/۵۷ درصد باعث بازدارندگی رشد *F. fujikuroi* شدند که نتیجه این تحقیق با نتایج تارا و گنانامانیکام (۲۰) و دی بوئر و همکاران (۳) مطابقت داشت.

در آزمون تولید سیدروفور، هر هشت سویه باکتریایی در محیط کشت King's B، با غلظت‌های (صفر، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کلرید آهن III) مورد آزمایش قرار گرفتند و در هیچ یک از غلظت‌ها به جز غلظت ۱۰ میکرومولار، هاله بازدارندگی در برابر *F. fujikuroi* تشکیل نشد. بر اساس مقایسه درصد مهار رشد میسلیمی *F. fujikuroi* ناشی از تولید سیدروفور به‌وسیله هشت سویه آنتاگونیستی مختلف در غلظت ۱۰ میکرومولار در مقایسه با شاهد (محیط کشت فاقد کلرید آهن III)، مشخص گردید که سویه‌های (*P. fluorescens* (N47) و *B. subtilis* به ترتیب با ۵۲/۱۰ درصد و ۴۵/۸۵ درصد دارای بیشترین توانایی در تولید سیدروفور و ایجاد بازدارندگی در رشد قارچ عامل بیماری هستند (جدول ۱). براین اساس بین (*P. fluorescens* (N47) و *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی بین (*P. fluorescens* (N47) و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. کمترین بازدارندگی مربوط به تیمار *P. fluorescens* (CHA0) با ۱۷/۱ درصد بود که با تیمارهای *P. fluorescens* (N47)، *B. subtilis*، *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* (N47) اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱). در آزمایش تولید سیدروفور هر هشت باکتری مورد مطالعه توانستند در محیط کشت King's B شامل ۱۰ میکرومول کلرید آهن III از رشد *F. fujikuroi* جلوگیری نمایند و از بین آنها سویه‌های (*P. fluorescens* (N47) و *B. subtilis* به ترتیب با ۵۲/۱۰ و ۴۵/۸۵ درصد بیشترین کارایی را نشان دادند. در تحقیقی کاظم‌پور و الهی‌نیا (۱۰)، در بررسی تأثیر سیدروفوری ۲۳۸ سویه باکتریایی جدا شده از ریزوسفر روی دانه‌های برنج آلوده به *F. fujikuroi*، در غلظت‌های متفاوت کلرید آهن III، به این نتیجه رسیدند که در مورد *P. fluorescens* و *Bucillus cereus* غلظت آهن بر رشد شعاعی *F. fujikuroi* موثر است.

در مطالعات گلخانه‌ای در روزهای اولیه مایه‌زنی قارچ عامل بیماری روی گیاه علائمی دیده نشد اما از روز چهارم برگ‌ها کم‌کم حالت کشیده، نازک و رنگ‌پریده پیدا کردند و در روز ششم در قسمت

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیمومی *F. fujikuroi* در مطالعات آزمایشگاهی توسط باکتری‌های آنتاگونیست
 Table 1- Comparison of means of mycelium growth inhibition percent in laboratory studies using antagonistic bacteria

تیمارها Treatments	بازدارندگی رشد در کشت متقابل (درصد) Growth inhibition in dual culture (%)	بازدارندگی رشد در متابولیت‌های فرار (درصد) Growth inhibition in volatile metabolites (%)	بازدارندگی رشد در روش تولید آنتی‌بیوتیک (درصد) Growth inhibition in antibiotic production method (%)	بازدارندگی رشد در روش تولید سیدروفور (درصد) Growth inhibition in siderophore production method (%)
<i>Pseudomonas putida</i>	39.92 a	21.14 ab	59.21 a	25.45 cde
<i>Bacillus subtilis</i>	30.22 b	31.01 a	56.27 ab	45.85 ab
<i>Bacillus circulans</i>	28.45 b	18.50 bc	17.55 e	27.1 bcd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23.25 bc	28.19 a	45.94 abc	35.45 bc
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (149)	16.67 cd	22.27 ab	28.93 de	23.75 de
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (CHA0)	10.52 d	17.46 bc	43.42 bcd	17.1 ef
<i>Pseudomonas syringae</i>	9.65 d	10.04 c	32.00 cde	23.75 e
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (N47)	9.65 b	30.56 a	34.22 cde	52.1 a

میانگین‌های دارای یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) ندارند.

The means having at least one similar letter do not show a significant difference at $P = 0.05$.

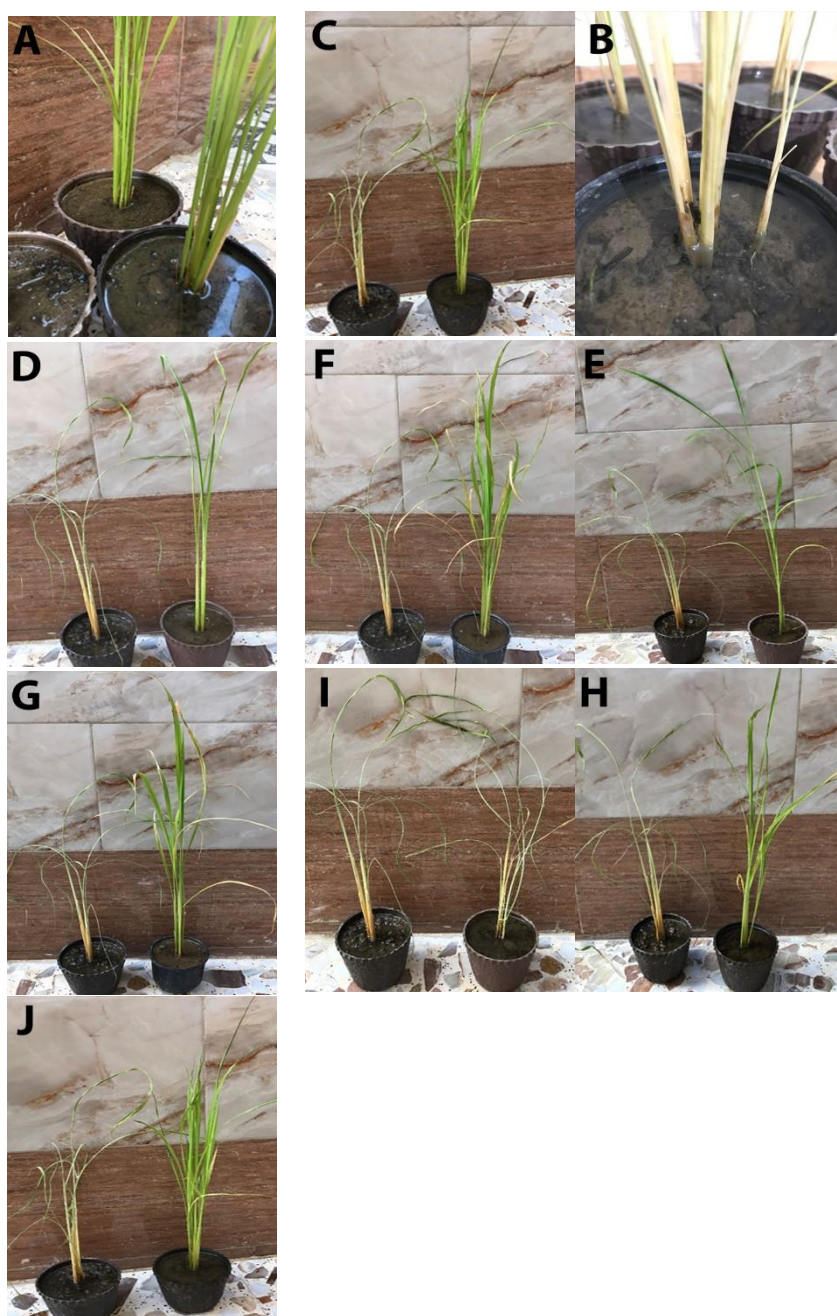
(CHA0) بود که با تیمارهای *P. putida*، *P. aeruginosa* و *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). در مورد صفت وزن خشک بدون ریشه بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در این مورد کمترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. fluorescens* (149) بود که با تیمارهای *P. putida* و *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

از میان سه سویه از *P. fluorescens*، سویه (*P. fluorescens* N47) بهترین عملکرد را نسبت به دو سویه دیگر هم در آزمایشگاه و هم در گلخانه نشان داد که این موضوع خود نشانگر تفاوت در کارایی سویه‌های مختلف یک گونه باکتریایی در مهار زیستی عوامل بیماری‌زا است.

پاداشت دهکایی و همکاران (۱۶) در مطالعه‌ای در گلخانه در مورد مهار زیستی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج به این نتیجه رسیدند که هفت سویه از *Bacillus subtilis*، *Bacillus circulans*، *Bucillus* sp.، *Trichoderma harzianum*، *T. virens* (دو سویه) و F.23 (شناسایی نشده)، دارای تأثیر خوبی در کاهش تشکیل پرگنه قارچ روی بذر و گیاهچه بودند و *B. circulans*، بهتر از بقیه آنتاگونیست‌ها عمل کرد و مشخص شد که آغشتن بذر با آنتاگونیست‌ها قبل از آلوده‌سازی با عامل بیماری، تأثیر معناداری در کاهش آلودگی نسبت به به‌کارگیری آنتاگونیست‌ها بعد از آلوده‌سازی با عامل بیماری داشته است.

در مورد صفت ارتفاع گیاه و بین تیمارهای مورد آزمایش، بیشترین ارتفاع به‌ترتیب مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. putida* و *B. subtilis* بود که اولی با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و دومی به‌جز با *B. circulans* و *P. aeruginosa* با سایر باکتری‌های مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. syringae*، *P. fluorescens* (149) و (*P. fluorescens* CHA0) بود که با یکدیگر و سایر تیمارها به‌جز *B. subtilis* اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲). در مورد صفت وزن تر با ریشه بیشترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری‌های *P. fluorescens* (N47) و (*P. fluorescens* CHA0) بود که با تیمارهای *P. putida*، *B. subtilis*، *P. aeruginosa* و *P. syringae* اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲).

در مورد صفت وزن تر بدون ریشه بیشترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در این مورد کمترین وزن تر مربوط به تیمار با باکتری‌های (*P. fluorescens* N47) و (*P. fluorescens* CHA0) بود که با تیمارهای *P. putida*، *B. subtilis* و *P. syringae* اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲). در مورد صفت وزن خشک با ریشه بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. putida* بود که با همه تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. در این مورد کمترین وزن خشک مربوط به تیمار با باکتری *P. fluorescens*



شکل ۱- نمایی از مطالعات گلخانه‌ای: علائم بیماری روی برنج: A: پس از مایه‌زنی با آب مقطر سترون، B: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi*، C: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *B. subtilis*، D: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *B. circulans*، E: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. putida*، F: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. syringae*، G: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. aeruginosa*، H: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (N47)، I: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (149)، J: پس از مایه‌زنی با *F. fujikuroi* و *P. fluorescens* (CHA0).

Figure 1- Schema of greenhouse studies: Symptoms of disease on rice: A: After inoculation with distilled water, B: After inoculation with *F. fujikuroi*, C: After inoculation with *F. fujikuroi* and *B. subtilis*, D: After inoculation with *F. fujikuroi* and *B. circulans*, E: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. putida*, F: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. syringae*, G: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. aeruginosa*, H: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. fluorescens* (N47), I: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. fluorescens* (149), J: After inoculation with *F. fujikuroi* and *P. fluorescens* (CHA0).

جدول ۲- مقایسه میانگین شدت بیماری پوسیدگی طوقه برنج، ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک گیاه در گلخانه در حضور باکتری‌های آنتاگونیست
Table 2- Comparison of means of disease rating, height, fresh weight and dry weight of plant in greenhouse in the presence of antagonist bacteria

تیمارها Treatments	شدت بیماری Disease rating	ارتفاع بوته Height (سانتی‌متر) (cm)	وزن تر (با ریشه) Fresh weight (with root) گرم (gr)	وزن تر (بدون ریشه) Fresh weight (without root) گرم (gr)	وزن خشک (با ریشه) Dry weight (with root) گرم (gr)	وزن خشک (بدون ریشه) Dry weight (without root) گرم (gr)
<i>B. subtilis</i>	4.33 c	74.66 c	15 cd	3.50 c	3.00 c	1.83 c
<i>B. circulans</i>	6.16 c	67.66 cd	12.66 ef	2.86 cde	2.33 cd	1.33 cde
<i>P. aeruginosa</i>	5.77 e	69.66 cde	13.66 e	3.16 e	2.83 e	1.83 e
<i>P. syringae</i>	6.06 f	66.33 d	14 cd	3.50 c	2.83 cd	1.66 cd
<i>P. putida</i>	3.06 b	77.66 b	16.66 b	5.00 b	4.16 b	2.50 b
<i>P. fluorescens</i> (149)	7.80 g	66.33 d	12.64 ef	2.66 de	2.33 cd	1.16 de
<i>P. fluorescens</i> (N47)	4.73 d	64.66 d	12.33 f	3.16 cd	2.33 cd	1.33 cde
<i>P. fluorescens</i> (CHA0)	4.83 d	66.33 d	12.33 f	2.66 de	2.16 d	1.33 cde
<i>F. fujikuroi</i> شاهد	7.96 g	60.66 e	9.33 g	2.16 e	2.16 d	1 e
control						
شاهد آب مقطر						
Distilled water	1 a	87.33 a	19.66 a	8.33 a	5.33 a	3.16 a
control						

و گونه‌های مختلف باکتریایی، تفاوت در شرایط محیطی و خصوصیات ژنتیکی میزبان، مطابقت زیادی با تحقیقی که توسط محققان فوق صورت گرفت، ندارد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوکنترل در آزمایشگاه و گلخانه، سویه‌های *P. putida* و *B. subtilis* موثرترین باکتری‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج هستند.

در این تحقیق از میان هشت سویه‌ای که در آزمایشگاه تاثیر خوبی علیه *F. fujikuroi* نشان دادند، همه سویه‌ها در شرایط گلخانه‌ای نیز فعالیت آنتاگونیستی داشتند که *P. putida* با کاهش شدت بیماری به میزان ۶۲/۰۲ درصد و نیز افزایش ارتفاع، وزن تر و وزن خشک گیاه، موثرترین آنتاگونیست در بررسی‌های گلخانه‌ای است که نتیجه تحقیق حاضر به دلایل مختلف از جمله وجود جنس‌ها

منابع

- Barraquio W.L., Ladha, J.K., and Watanabe I. 1983. Isolation and identification of N2-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 29(8): 867-873.
- Bertrand P.F., and Gottwald T.R. 1997. Evaluation of fungicides for pecan disease control. In: Hickey, K. D., (ed), *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*. Oxford and IHB Publisher, Calcutte, India pp. 179-181.
- de Boer M., Bom P., Kindt F., Keurentjes J.J., van der Sluis I., Van Loon L.C., and Bakker P.A. 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanisms. *Phytopathology* 93(5): 626-632.
- Fiddaman P.J., and Rossal S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus*. *Journal of Applied Bacteriology* 74(2): 119-126.
- Geels F.P., and Schippers B. 1983. Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Journal of Phytopathology* 108(3-4): 207-214.
- Hua J.L., Li X.M., and Luo R.H. 2004. Identification of antagonistic bacterial strain B-77 and its control effect against rice bakanae. *Acta Agriculturae Jiangxi* 3: 62-64.
- Jamali F., Sharifi Tehrani A., Akhovat M., and Zakeri Z. 2005. Effect of several bacteria antagonists on *Fusarium oxysporum*, the causal agent of Fusarium wilting of Iranian pease in greenhouse conditions. *Iranian Journal of Agricultural Science* 36(3): 711-717. (In Persian with English abstract)
- Kannahi M., Malathi P., Kannahi M., and Malathi P. 2013. Antagonistic effect of tomato rhizospheric microbes against some pathogens. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 5(9): 10-14.
- Kazempour M.N., and Anvari M. 2009. Isolation of *Fusarium fujikuroi* antagonistic bacteria and cloning of its phenazine carboxylic acid genes. *African Journal of Biotechnology* 8(23): 6506-6510.

- 10- Kazempour M.N., and Elahinia S.A. 2007. Biological control of *Fusarium fujikuroi*, the causal agent of bakanae disease by rice associated antagonistic bacteria. Bulgarian Journal of Agricultural Science 13(4): 393-408.
- 11- Kraus J., and Loper J.E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of Pythium damping-off of cucumber. Phytopathology 82(3): 264-271.
- 12- Kumar M.N., Laha G.S., and Reddy C.S. 2007. Role of antagonistic bacteria in suppression of bakanae disease of rice caused by *Fusarium moniliforme* Sheld. Journal of Biological Control 21(1): 97-104.
- 13- Lu F., Chen Z.Y., and Liu Y.F. 1999. Effect of antagonistic bacteria against rice bakanae and on rice yield. Chinese Journal of Biological Control 15: 59-61.
- 14- Matić S., Spadaro D., Garibaldi A., and Gullino M.L. 2014. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. Biological Control 73: 59-67.
- 15- Nourozian J., Etebarian H.R., and Khodakaramian G. 2006. Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin Journal of Science and Technology 28(Suppl 1): 29-38.
- 16- Padasht Dehkaee F., Mansouri Jajai Sh., and Rouhani H. 2004. Effect of anagonist microorganisms in Guilan rice farms Soils on rice footrot disease. Journal of Agricultural Science and Technology 8(1): 213-221. (In Persian with English abstract)
- 17- Rosales A.M., and Mew T.W. 1997. Suppression of *Fusarium moniliforme* in rice by rice-associated antagonistic bacteria. Plant Disease 81(1): 49-52.
- 18- Schaad N.W., Jonse J.B., and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition, APS Press.
- 19- Sivakumar D., Wijeratnam R.W., Wijesundera R.L.C., Marikar F.M.T., and Abeyesekere M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica 28(3): 240-247.
- 20- Thara K.V., and Gnanamanickam S.S. 1994. Biological control of rice sheath blight in India: Lack of correlation between chitinase production by bacterial antagonists and sheath blight suppression. Plant and Soil 160(2): 277-280.



Biological Control of *Fusarium fujikuroi*, the Causal Agent of Bakanae Using Some Antagonistic Bacteria in Guilan Province

M.R. Safari Motlagh^{1*}- M. Dashti²

Received: 09-06-2019

Accepted: 12-10-2020

Introduction: Rice bakanae disease caused by *Fusarium fujikuroi* is one of the most important diseases of rice in Iran and in the world. Studies show that the disease has spread to a wide range of paddy fields worldwide, with losses in Japan up to 20%, in India up to 15%, and Thailand's northern and central areas have been reported to be 7.3% -14.7%. Symptoms include rice foot blackness and yellowish and then wilting of infected plants. The pathogen is more likely to attack the foot rot which is a sign of the abnormal growth of contaminated plants in the farm. Infected seedlings are slender and taller than healthy plants, and highly infected plants may die before or after transplantation. The tillering is reduced, consequently the leaves die in a short time. The fungus causes the disease threats the human and animal health through the production of phytotoxins. Identification of *Fusarium* species is currently confusing, on the other hand, several *Fusarium* species have always been isolated together with rice contaminated with the disease. Therefore, it is not clear which species of this fungus are the main reason of the disease. This fungus is soil-borne and has a long life in heavy soils. It has also a global expansion and is active in most parts of the world. Rice foot rot disease in all major rice producing countries in the world is considered as a seed disease and the transmission of the disease agent from one season to another season is mainly due to contaminated seed, but soil-borne fungus can be as well. Currently, treating the seeds with fungicides is the best method to control this disease, however using chemical pesticides can lead to environmental pollution. In this situation, it is important to achieve a healthy alternate method. For this purpose, biological control is one of the ways in which today a large investment is being made around the world.

Materials and Methods: Samples of rice exhibiting the symptoms of bakanae were randomly collected from different parts of Guilan province, Iran. Pieces of organs with rot symptoms were cut and they were surface-disinfected after washing with 0.5% sodium hypochlorite solution. At the next step, they were washed with distilled water and dried on filter papers. Then, they were cultured in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) culture medium and were placed in an incubator at 28°C for 3-5 days. Afterward, they were placed on a water-agar medium for purification and morphological identification. In this research, from a total of 80 samples collected from rice farms in Guilan province, 18 bacterial strains were isolated and the antagonistic ability of 8 strains of bacteria in the laboratory and greenhouse was investigated. For this purpose, in laboratory, dual culture method, volatile compounds, siderophore and antibiotic production were used. These bacterial strains were inoculated into rice under greenhouse conditions, and then the severity of the disease was determined in the tested treatments. After calculating the severity of the disease, the height of the rice bushes was measured by the ruler. To measure the fresh weight, the rice bush with the roots was removed from the soil and measured by a scale. Each bush was then separately placed for 48 hours in an oven at 80-90°C. After leaving the oven, each of the bushes was re-weighed. This weight was recorded as dry weight.

Results and Discussion: A total of 18 isolated bacterial strains, 8 bacterial strains including *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* (N47), *Pseudomonas fluorescens* (149) and *Pseudomonas fluorescens* (CHA0) were identified and used for biological control studies in laboratory and greenhouses. *P. putida* with 39.99 % in the dual culture, *B. subtilis* with 31.01% in the volatile metabolites, in the method of siderophore production, *P. fluorescens* (N47) and *B. subtilis* with 52.10 % and 45.85 % respectively, and in the antibiotic production, *P. putida* with 59.21% had the greatest effect on inhibiting the mycelial growth of the disease causative agent. Based on the results of the analysis of variance under greenhouse conditions, there was a significant difference between treatments for severity of disease, fresh weight, dry weight and plant height at 1% probability level. Among the studied bacteria, the least severity of the disease belonged to the treatment with *P. putida* and *B. subtilis*, respectively. Regarding height, the highest height was related to treatment with *P. putida* and *B. subtilis* and in terms of fresh weight and dry weight, the highest weight was related to *P. putida*.

1- Associate Professor, Department of Plant Protection, Rasht Branch, Islamic Azad University, Iran

(*- Corresponding Author Email: ssafarimotlagh@yahoo.com)

2- Graduated of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Deylaman Institute for High Education, Lahijan, Iran

Conclusion: According to the results of biocontrol studies in laboratory and greenhouse conditions, *P. putida* and *B. subtilis* strains were the most effective bacteria for controlling rice foot-rot disease. Therefore, isolating and identifying these bacterial strains as much as possible can be promising for the greater effectiveness of biocontrol methods in the management of rice crown-rot disease control.

Keywords: Antagonistic bacteria, Biological control, *Fusarium fujikuroi*, Rice

مقاله علمی-پژوهشی

شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های عمده *Meloidogyne* و پراکنش آن‌ها در باغ‌های انار استان‌های خراسان

نفیسه کتولی^۱ - عصمت مهدیخانی مقدم^۲ - رضا اقنوم^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۳

چکیده

انار از محبوب‌ترین درختان میوه و یکی از مهم‌ترین محصولات صادراتی در ایران است. نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از بیمارگرهای جدی در انار می‌باشند. به منظور بررسی پراکنش آلودگی باغ‌های انار به گونه‌های نماتد ریشه گرهی، طی سال‌های ۹۴ و ۹۵، تعداد ۱۹۵ نمونه خاک و ریشه از مناطق عمده تحت کشت انار در استان‌های خراسان رضوی، شمالی و جنوبی جمع‌آوری گردید. پس از استخراج، شناسایی گونه‌ها با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت سنجی لارو، ماده‌ی بالغ و شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده صورت گرفت. همچنین برای اولین بار در استان شناسایی گونه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SCAR انجام گرفت. گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* شناسایی شدند. آغازگرهای Inc-14 قطعه ۳۹۹bp را برای گونه *M. incognita*، ar قطعه ۴۲۰bp را برای گونه *M. arenaria* و Jav قطعه ۶۷۰bp را برای گونه *M. javanica* نشان داد. آلودگی درختان انار به نماتد ریشه گرهی تقریباً در اغلب شهرستان‌ها مشاهده گردید اما شدت آلودگی بسیار متغیر می‌باشد. درصد آلودگی باغ‌های انار به نماتد ریشه گرهی به ترتیب در شهرستان‌های بردسکن ۱۹/۹۳٪، بجستان ۱۲/۳٪، خلیل آباد ۶/۹٪، فردوس ۵/۴٪، کاشمر ۴/۳٪، تربت حیدریه ۳/۵٪، نهبندان ۱/۳٪، مانه ۱/۱٪ و جاجرم ۰/۸٪ برآورد شده است. بالاترین درصد آلودگی به نماتد ریشه گرهی با ۵۷/۵٪ در باغ‌های انار شهرستان بردسکن (بخش انابد روستای فاطمیه) مشاهده گردید و گونه *M. incognita* نژاد دو بیشترین پراکنش را در باغ‌های انار استان نشان داد.

واژه‌های کلیدی: انار، آغازگر اختصاصی SCAR، *M. incognita*، *M. arenaria*، *M. javanica*

مقدمه

بین کشورهای تولیدکننده انار، ایران به دلیل تنوع ارقام، کیفیت مرغوب، زیبایی ظاهری و رنگ درخشان حبه‌های آن جایگاه ویژه‌ای دارد (۱۶).

نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) انگل داخلی ساکن، یکی از مهم‌ترین گروه‌های انگل گیاهی بوده که گسترش جهانی داشته و دارای دامنه میربانی با بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی می‌باشد. تا کنون بیش از ۱۰۰ گونه از این جنس توصیف شده است، که مهم ترین گونه‌ها از نظر اقتصادی گونه‌های گرمسیری *M. incognita*، *M. javanica*، *M. arenaria* و گونه معتدل *M. hapla* می‌باشند (۲۰). انار یکی از گیاهان حساس نسبت به گونه‌های مختلف نماتد ریشه گرهی است. در ایران گونه‌های *M. javanica* و *M. incognita* از باغ‌های انار استان اصفهان، یزد و گونه *M. javanica*، *M. incognita* و *M. hapla* از باغ‌های انار استان فارس و گونه *M. arenaria* از روی انار گیلان گزارش شده است (۲ و ۲۱). گونه *M. javanica* از خاک اطراف ریشه درختان انار در شهرستان‌های

انار (*Punica granatum* L.) از قدیمی‌ترین میوه‌های دانه‌دار و یکی از مهم‌ترین میوه‌های اقتصادی است، که در بسیاری از مناطق مختلف گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا با بیش از ۱۰۰۰ رقم کشت می‌گردد. شواهد تاریخی دال بر این است که ایران مرکز تنوع و پیدایش انار بوده است (۵ و ۳۲). ایران بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده انار در دنیاست و سطح زیر کشت آن در کشور ۸۹۰۰۰ هکتار و میزان تولید سالیانه آن بیش از ده هزار تن می‌باشد (۳). در

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*)- نویسنده مسئول: (Email: Mahdikhani-e@um.ac.ir)

۳- استادیار مرکز تحقیقات و آموزش خراسان رضوی، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مشهد

تهران، شمیرانات، ساوه و قم و گونه *M. incognita* از شهرستان‌های ساوه و قم گزارش شده است (۱۸ و ۲۲). مهم‌ترین خسارت نماتد ریشه گرهی در انار ایجاد گال در ریشه و در قسمت‌های هوایی علائمی مشابه کمبود مواد غذایی از جمله کاهش یا توقف رشد، ضعف عمومی، زردی برگ‌ها، ریزش برگ‌های فوقانی، خشک شدن تدریجی سرشاخه و در نهایت منجر به مرگ تدریجی درخت می‌گردد (۱۹ و ۳۰). متأسفانه در ایران تا کنون آمار دقیقی از کاهش محصول انار بر اثر نماتد ریشه گرهی گزارش نشده است اما در کشور هندوستان کاهش عملکرد ناشی از نماتد ریشه گرهی *M. incognita* ۱۷/۳ درصد گزارش شده است (۱۴). این نماتد به عنوان مشکل جدی در بیشتر کشورهایی که انار کشت می‌شود گزارش شده است. با توجه به جایگاه ایران در بازار جهانی صادرات انار، شناسایی آفات و بیماری‌ها جهت مبارزه و افزایش عملکرد آن بسیار حائز اهمیت است.

متأسفانه، بخاطر مورفولوژی حفظ شده بالایی که بین گونه‌های *Meloidogyne* وجود دارد، تمایز گونه‌های این جنس همیشه مورد چالش بوده است. بطور سنتی، گونه‌های *Meloidogyne* بر پایه خصوصیات مورفولوژیک، الگوهای آنزیمی و آلودگی در میزبان‌های گیاهی شناسایی می‌شوند (۱۰). اما خصوصیات مورفولوژیکی، تحت شرایط محیطی مختلف و میزبان‌های متفاوت، متغیر هستند (۱۳ و ۲۴) در نتیجه روش‌های شناسایی توسعه پیدا کرده و در نهایت، روش‌های مبتنی بر DNA به یک جایگزین جذاب تبدیل شده است. این روش‌ها به دلیل اینکه سریع، بسیار قابل اعتماد و از مکان یا مرحله زندگی نماتد مستقل هستند، بکار می‌روند. (۱ و ۲۴). توسعه در روش‌های مولکولی برای شناسایی چهار گونه مهم نماتد ریشه گرهی، هدف بسیاری از تحقیقات بوده است. اولین روش برای شناسایی نماتدهای ریشه گرهی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR^۱ توسط هریس و همکاران (۱۹) گزارش گردید، در این روش DNA میتوکندریایی با استفاده از یک لارو سن دوم در آب مقطر و اضافه کردن به داخل واکنش PCR بسط و گسترش داده شده است. این روش بعدها توسط پاور و هریس (۲۷) توسعه پیدا کرد، بطوری‌که پرایمرهایی از نواحی داخلی کدهای بین ژنی میتوکندریایی، ناحیه سیتوکروم اکسیداز دو^۲ و 16S rRNA را برای شناسایی پنج گونه از جنس *Meloidogyne* طراحی کردند. مارکرهای مولکولی متفاوتی از نواحی مختلف DNA شامل زیر واحد کوچک DNA ریپوزومی^۳ مارکر 18S و قطعات توسعه یافته زیر واحد بزرگ DNA ریپوزومی^۴ مارکر 28S D2D3 (۲۷)، ناحیه بین ژنی IGS، ناحیه داخلی رونویسی

و DNA میتوکندریایی، برای شناسایی گونه‌های *Meloidogyne* توسعه یافته است (۱۵). در حال حاضر، روش‌های مولکولی RAPD^۵، SCAR^۶، RFLP^۷، نشانگرهای دی‌ان‌ای‌های ماهواره‌ای، سنجش Real-time PCR و توالی‌یابی DNA برای شناسایی نماتدهای ریشه گرهی کاربرد دارند (۳۳ و ۳۵).

مارکرهای DNA از لحاظ روابط نقش مهمی را ایفا می‌کنند. هم‌نیطور توالی برخی از ژن‌ها مانند SSU 18S و LSU 28S و ITS در گونه‌های نماتد ریشه گرهی بسیار حفاظت شده هستند و تشخیص گونه‌ها مخصوصاً برای سه گونه گرمسیری رایج *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* بر اساس این توالی‌ها بسیار دشوار است (۹، ۱۳ و ۲۳). هم‌نیطور نتایج مشابه نشان داده است که توالی ناحیه LSU D2-D3 توانایی جدا کردن این سه گونه را از بقیه گونه‌های *Meloidogyne* دارد اما قادر به تفکیک و تمایز بین سه گونه اصلی *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* نیست. لذا نشانگر SCAR به عنوان یک ویژگی مولکولی ارزشمند در شناسایی گونه‌های نماتد ریشه گرهی ذکر شده است (۳۷). در واکنش PCR-RAPD باندهایی را که برای یک گونه به صورت اختصاصی هستند توالی‌یابی می‌کنند و از روی این توالی‌ها، آغازگرهایی را که طول بیشتری نسبت به آغازگرهای RAPD دارند و می‌توانند به صورت اختصاصی در واکنش PCR عمل کنند، طراحی می‌کنند. این توالی‌های اختصاصی به نام SCAR-Primer معروف‌اند. اندازه این آغازگرها بلندتر از آغازگرهای RAPD بوده و اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. این آغازگرها حساسیت کمتری نسبت به آغازگرهای RAPD به تغییر شرایط واکنش دارند و می‌توانند DNA استخراج شده از توده تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ را تکثیر نمایند. بنابراین این روش به سن و مرحله رشدی نماتد بستگی ندارد و می‌تواند برای شناسایی سه گونه عمده به صورت سریع، قابل اعتماد و همیشگی استفاده شود (۱۱). زیلسترا و همکاران (۳۷) بعد از انجام واکنش RAPD و با استفاده از توالی‌یابی باندهای اختصاصی که برای هر گونه پیدا کردند، جفت آغازگرهای اختصاصی SCAR را برای گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* طراحی کردند. این آغازگرها بر پایه روش SCAR و با توجه به آنالیز RAPD معرفی شده‌اند و دارای توانایی بالایی در تشخیص تعدادی از گونه‌های *Meloidogyne* می‌باشند.

هدف از این بررسی شناسایی گونه‌های عمده نماتد ریشه گرهی با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی، با پرایمرهای اختصاصی SCAR و تعیین پراکنش آنها در باغ‌های انار استان‌های خراسان رضوی، جنوبی و شمالی بوده است.

- 1- Polymerase chain reaction
- 2- cytochrome oxidase subunit II
- 3- Small subunit rDNA
- 4- Large subunit rDNA

- 5- Random amplified polymorphic DNA
- 6- Sequence characterized amplified region
- 7- Restriction fragment length polymorphisms

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، تکثیر و شناسایی نماتد

نمونه‌برداری در سال‌های ۹۴ و ۹۵ در شهریور ماه، از باغ‌های عمده تحت کشت انار شهرستان‌های استان خراسان رضوی (شهرهای تربت حیدیه، فیض آباد، بجستان، بردسکن، کاشمر، خلیل آباد و سبزوار)، خراسان جنوبی (فردوس، نهبندان) و خراسان شمالی (مانه و جاجرم)، از خاک و ریشه درختان انجام شد. نمونه‌ها در بسته‌های دو کیلوگرمی با مشخصات کامل به آزمایشگاه منتقل گردید. از ریشه‌های گال‌دار جهت استخراج لارو سن دوم، ماده‌های بالغ و توده تخم به منظور شناسایی استفاده گردید. کیسه‌ی تخم به گلدان حاوی نشای گوجه فرنگی رقم حساس رد کلود^۱، برای تکثیر و خالص‌سازی گونه‌ی نماتد، اضافه شد. پس از تهیه اسلاید با روش دگریسه (۹)، شناسایی گونه‌ها بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لارو سن دوم، ماده بالغ و خصوصیات کوتیکولی نقوش انتهایی بدن ماده‌ها، با میکروسکوپ Olympus مدل BH2 مورد بررسی قرار گرفت. تعیین نژاد از طریق آزمون میزبان‌های افتراقی (گوجه فرنگی، توتون، پنبه، هندوانه، بادام زمینی، فلفل)، بر اساس روش پیشنهادی بارکر و همکاران (۶) انجام شد.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA و شناسایی گونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز PCR، چندین روش مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت پس از ارزیابی کیفی DNA استخراج شده با الکتروفورز افقی، روش سیلوا و همکاران (۲۹) برای استخراج DNA از تخم و لارو سن دوم و روش یی و همکاران (۳۴) با کمی تغییرات برای استخراج از ماده بالغ به شرح ذیل انجام گرفت. در روش سیلوا و همکاران، ابتدا ۳۰-۵۰ میکرولیتر لارو سن دوم، تخم و یا مخلوط تخم و لارو سن دوم معلق در آب مقطر دوبار سترون، درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. لوله‌های حاوی نماتد در نیتروژن مایع قرار گرفت. سپس نمونه با سوزن مناسب کاملاً ساییده و له شد. ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (100mM Tris-HCl Ph 8, 1/4M NaCl, 20 mM EDTA, 3%) (CTAB, 1% β-mercaptoethanol) به میکروتیوب‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و فاز رویی به لوله جدید منتقل گردید. سپس هم حجم آن مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل ۲۴:۱ اضافه و پس از یک تکان شدید و مخلوط شدن

کامل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام این مرحله فاز رویی به لوله جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت ده دقیقه در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد. رسوب حاصل پس از شستشو با اتانول ۷۰٪ و سانتریفوژ مجدد در دمای محیط خشک و سپس در ۲۰-۳۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار سترون حل گردید.

برای استخراج DNA از ماده بالغ با استفاده از روش یی و همکاران، ابتدا یک عدد ماده بالغ در آب مقطر استریل چند بار شستشو داده شد و سپس این نماتد روی یک لام استریل قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از بافر TE (Tris-EDTA buffer) شامل (10 mM Tris, pH 8, with HCl, 1 mM EDTA) به نماتد ماده اضافه شده و توسط یک لامل استریل این نماتد کاملاً له شد. سپس برای جمع کردن محتویات له شده‌ی روی لام، ۵۰ میکرولیتر دیگر از بافر به لام اضافه کرده و در نهایت محتویات روی لام با کمک سمپلر جمع‌آوری و درون میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتر در فریزر نگهداری شد.

انجام واکنش PCR و توالی‌یابی

برای تکثیر DNA در واکنش PCR از گونه‌های مختلف نماتد، از آغازگرهای اختصاصی Inc-K14-R /ar R و Inc-K14-F /ar R استفاده شد (جدول ۱). این آغازگرها برای هر گونه یک قطعه مشخص جفت بازی را در کلیه جمعیت‌های گونه تکثیر کرده و در نهایت گونه را از بقیه متمایز می‌کنند. آغازگرها از شرکت ماکروژن کره جنوبی تهیه و توالی آنها در جدول ۱ ذکر شده است. در واکنش PCR برای جلوگیری از خطاهای احتمالی در هنگام برداشتن مقادیر کم مواد و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، اقدام به تهیه محلول پایه^۲ گردید. واکنش PCR برای هر جفت آغازگر در جدول ۲ بیان شده است. پس از اتمام واکنش PCR، ۳ میکرولیتر از محصول PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ در بافر ۳ TEB بارگیری شد. چاهک کنترل منفی شامل تمام مواد به غیر از DNA می‌باشد و چاهک اول برای تخمین اندازه قطعات تولیدی نشانگر Ladder بارگیری گردید.

تعیین پراکنش آلودگی به گونه‌های *Meloidogyne* در باغ-

های انار استان‌های خراسان

برای تعیین جمعیت لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی در خاک، نمونه‌های جمع‌آوری شده از یک باغ با هم مخلوط و ۲۰۰ گرم آن وزن گردید. استخراج نماتدها از خاک با روش سینی و سانتریفوژ انجام

2- Stock solution

3- Tris Borate EDTA

1- Red cloud

گرفت (۳۲). لاروهای استخراج شده با استفاده از پتری مدرج شمارش گردید. برای تعیین درصد آلودگی در باغ، تعداد درختانی که علایم آلودگی را نشان دادند شمارش و نسبت به کل درختان باغ محاسبه گردید.

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی SCAR مورد استفاده برای شناسایی سه گونه عمده *Meloidogyne* به همراه توالی و اندازه باند

Table 1- SCAR primer for identification of major *Meloidogyne* with sequence and band size

نام پرایمر	گونه‌ها	توالی پرایمرها	محصول پی سی آر	منابع
Primer name	Species	Primer Sequences (5'-3')	PCR product (bp)	Reference
Far	<i>M. arenaria</i>	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420	Zijlstra et al. (2000)
Rar		TCGGCGATAGACACTACAAACT		
Fjav	<i>M. javanica</i>	GGTGGCGGATTGAACTGAGC	670	Zijlstra et al. (2000)
Rjav		CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC		
Inc-K14-F	<i>M. incognita</i>	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	399	Randig et al. (2002)
Inc-K14-R		CCCGCTACACCCTCAACTTC		

جدول ۲- برنامه حرارتی واکنش PCR برای سه جفت آغازگر Inc-14، ar و Jav (Adam et al, 2007)

Table 2- Thermal program of PCR reaction for three of primer Inc-14, ar, Jav

واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	گسترش	گسترش نهایی
Initial denaturing	Denaturing	Annealing 35 cycles	Extension	Final extension
		64°C (Fjav/Rjav)		
		61°C (Far/Rar)		
		6۲°C (Inc-K14-F/Inc-K14-R)		
94°C 2 min	94°C 30 secs	30 secs	72°C 90 secs	72°C 7 min 4°C 60 min

نتایج و بحث

مشاهدات و بررسی‌های میدانی طی دو سال نمونه‌برداری از باغ‌های انار گویای این واقعیت است که نماتد ریشه‌گرهی در باغ‌های انار استان در حال گسترش بوده و خسارت قابل توجهی به درختان انار خصوصا درختان جوان وارد می‌کند. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که گونه غالب (گونه‌ای که بیشترین فراوانی را دارد) در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی *M. incognita* نژاد دو و در استان خراسان شمالی گونه *M. javanica* می‌باشد. گونه *M. incognita* برای تعیین نژاد تحت کشت میزبان‌های افتراقی قرار گرفت، این گونه در ریشه گیاهان توتون، فلفل، گوجه فرنگی و هندوانه به خوبی گال تولید کرده در حالی که در میزبان‌های بادام زمینی و پنبه هیچ گره‌ای مشاهده نشد. در نتیجه نژاد دو برای این گونه قطعی گردید.

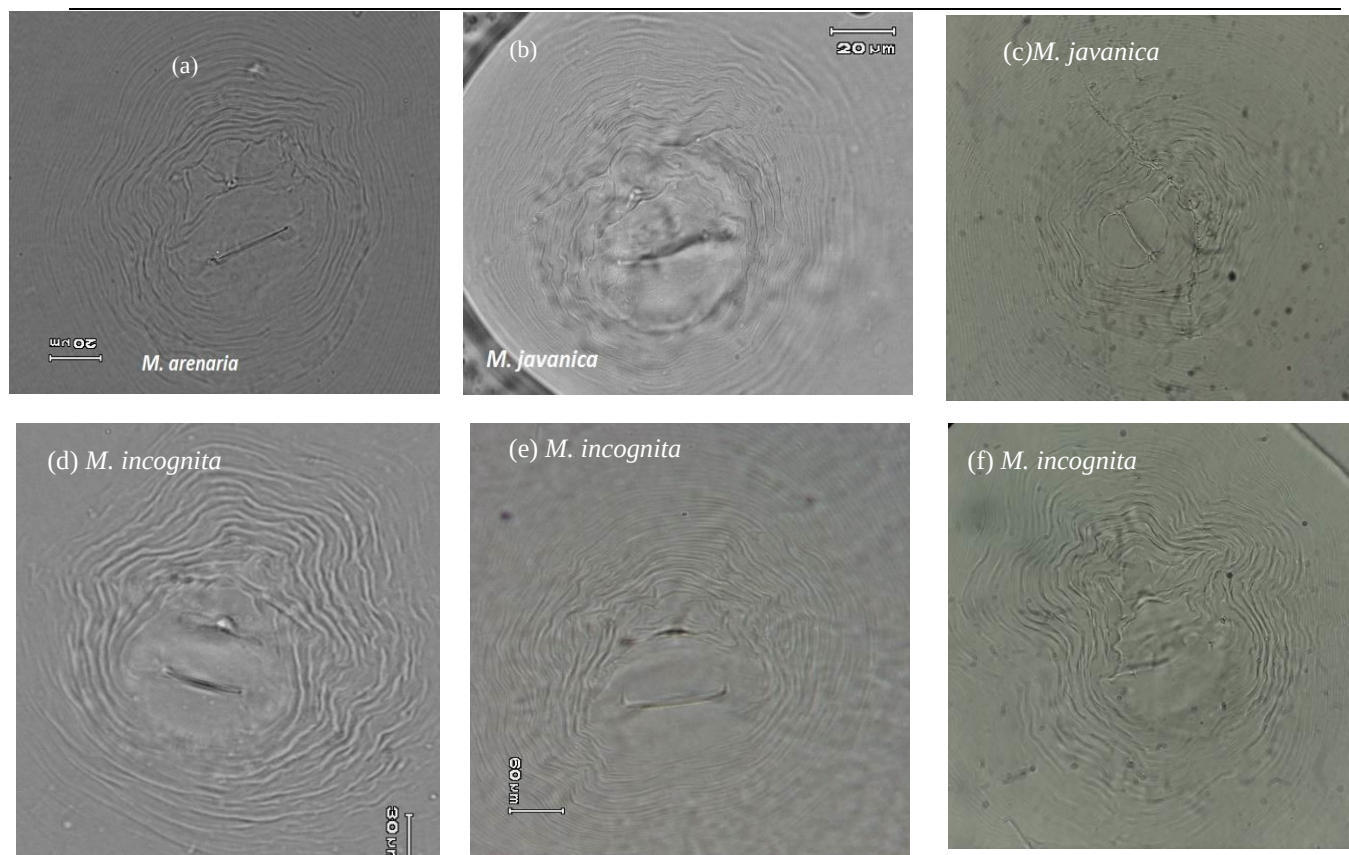
با توجه به نتایج بدست آمده از خصوصیات ریخت‌سنجی (جدول ۳) و مشخصات لارو سن دوم و نقوش انتهایی بدن نماتدهای ماده بالغ (شکل ۱)، سه گونه عمده *M. incognita*، *M. javanica* و *M. arenaria* شناسایی شد که مشخصات آن با شرح جپسون (۱۴) مطابقت دارد. در گونه *M. incognita* ماده‌ی بالغ گلابی شکل و سفیدرنگ، با گردن مشخص و برجسته، استایلت ظریف به طول ۱۴/۵ تا ۱۶ میکرومتر با گره‌های گرد و به سمت جانبی بدن. شبکه

کوتیکولی در این گونه در گروه ۶ بوده و تنوع بالایی را نشان می‌دهد. مشخصه اصلی این گروه شیپارهای بیضی شکل با کمان پشتی بلند و مربعی و در بعضی موارد گرد، خطوط سطوح جانبی بدن نا مشخص و گاهی بوسیله شیپارهای شکسته و چنگال مانند مشخص می‌شود. شکل کمان پشتی متغیر بوده و در قسمت نوک تخت و پخ می‌باشند. طول شکاف فرج ۱۷/۵ تا ۲۴/۵ میکرومتر و فاصله آن از مخرج ۱۸ تا ۲۲ میکرومتر می‌باشد. لاروسن دوم کرمی شکل متوسط تا نسبتا بلند بوده، سر همطراز بدن، استایلت ظریف به طول ۱۰ تا ۱۲/۵ با گره‌های برجسته و متمایل به عقب بدن می‌باشد. دم مخروطی با طول ۳۳ تا ۵۴/۵ میکرومتر و هیالین به اندازه ۹/۵ تا ۱۲ میکرومتر می‌باشد. شکل نقوش انتهایی بدن ماده بالغ در این گونه تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهد (شکل ۱). در گونه *M. javanica* ماده بالغ نسبتا گرد و درشت، با گردن مشخص، استایلت ظریف به طول ۱۴/۵ تا ۱۷/۲ میکرومتر با کمی خمیدگی به سمت پشتی. شبکه کوتیکولی این گونه در گروه ۵ قرار می‌گیرد، با انتهایی گرد تا بیضی شکل با خطوط جانبی مشخص و واضح به صورت دو شیپار موازی و حاشیه‌ای که شیپارها را قطع کرده و بطور مشخصی شبکه کوتیکولی انتهایی بدن را به دو قسمت پشتی و شکمی تقسیم می‌کند. طول شکاف فرج ۲۲ تا ۲۵ میکرومتر و فاصله آن از مخرج ۱۵ تا ۱۷ میکرومتر می‌باشد.

جدول ۳- مشخصات ریخت‌سنجی لارو سن دوم از گونه‌های نماتد ریشه گرهی جمع‌آوری شده از شهرستان‌های: گونه *M. incognita* از بردسکن - انابد، گونه *M. javanica* از جاجرم و گونه *M. arenaria* از بجنستان

Table 3- Morphometric characterize of second stage juvenile on root knot nematode species collected from cities: *M. incognita* of Bardaskan- Anabad, *M. javanica* of Jajarm and *M. arenaria* of Bajestan

فاکتور اندازه گیری Measurement factor	<i>Meloidogyne javanica</i> (n=15)	<i>Meloidogyne incognita</i> (n=15)	<i>Meloidogyne arenaria</i> (n=15)
طول بدن (L) (Body length)	436 (416-456)	412.2 (392-436.5)	428 (400-445)
طول دم (Tail length)	53.6 (49-61.5)	46.2 (33-54.5)	51.4 (42-58.5)
طول هیالین (Hyaline Length)	13.5 (12-15)	10.83 (9.5-12)	12.8 (10.5-14.7)
طول استالت Stylet length	11.4 (10.5-12.8)	10.8 (10-12.5)	10.8 (10.2-11.5)
DGO	3.4 (2.5-4)	2.7 (2.5-3.5)	3.4 (2.8-3.9)
a	33.26 (30.5-34.8)	25.37 (23.75-26.96)	34.6 (30-38.2)
c	8.7 (8.3-9.2)	8.38 (7.6-10.05)	6.9 (6.2-7.5)



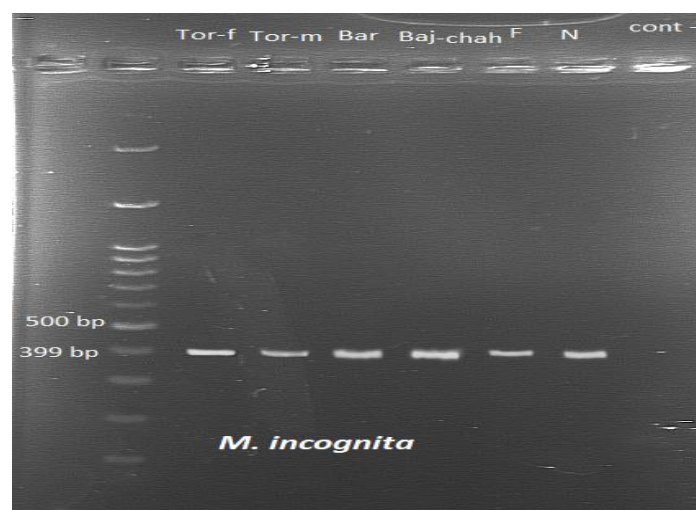
شکل ۱- تنوع در شکل نقوش انتهایی کوتیکولی ماده بالغ سه گونه (a) *M. arenaria* (بجنستان)، (b) *M. javanica* (جاجرم)، (c) *M. javanica* (مانه)، (d) *M. incognita* (تربت حیدریه-فیض آباد)، (e) *M. incognita* (کاشمر) و (f) *M. incognita* (بردسکن - انابد) جدا شده از ریشه‌های انار با بزرگنمایی 100x

Figure 1- Diversity of Perineal pattern in mature female of three species of a) *M. arenaria* in Bajestan, b) *M. javanica* a Jajarm, c) *M. javanica* in Maneh, d) *M. incognita* in Torbat Heidariye-feya Abad, e) *M. incognita* in Kashmar, f) *M. incognita* in Bardaskan- Anabad,) extracted on pomegranate roots. 100x

شده تایید کرد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SCAR شناسایی سه گونه عمده نماتد ریشه گریه باغهای انار از استانهای خراسان برای اولین بار انجام گرفت. DNA تمام نمونههای استخراج شده از استان با هر سه آغازگر بررسی شد و نتایج بدست آمده با شناسایی بر اساس مشخصات مورفومتری مطابقت داشت. در آزمایشات مولکولی آغازگرهای Inc-14 و ar یک باند غیر اختصاصی تولید می کردند که با تغییر دمای اتصال برای هر دو جفت آغازگر در محدوده دمایی ۵۸ تا ۶۴ درجه سانتی گراد در دستگاه گرادیانت مناسب ترین دما برای اتصال مشخص شد (جدول ۲)، در نتیجه باند غیر اختصاصی محو شده و تنها یک باند اختصاصی تشکیل گردید. آغازگر Inc-14 یک قطعه ۳۹۹ جفت بازی را برای گونه *M. incognita* تشکیل داد. از تمام مناطق آلوده‌ای که این گونه استخراج و با بررسی‌های ریخت سنجی و ریخت‌شناسی شناسایی گونه انجام شده بود، از آغازگر Inc-14 برای تایید شناسایی گونه استفاده شد (شکل ۲).

لارو سن دوم کرمی شکل نسبتا بلند، سر همطراز بدن، استایلت ظریف با گره‌های گرد و متمایل به ناحیه‌های جانبی بدن است. سطوح جانبی بدن دارای چهار شیار طولی مشخص، دم به طول ۴۹ تا ۶۱/۵ میکرومتر و هیالین به طول ۱۲ تا ۱۵ میکرومتر با شیارهای درشت در انتهای دم می‌باشد. در گونه *M. arenaria* ماده‌ها گلابی شکل با گردن مشخص، استایلت به طول ۱۵ تا ۱۶/۸ میکرومتر با گره‌های گرد و متمایل به عقب بدن. شبکه کوتیکولی انتهایی بدن گرد یا بیضی شکل با کمان پستی کوتاه و معمولا فشرده، شیارها نسبتا عریض و جدا از هم و غالبا صاف، خطوط سطوح جانبی بدن معمولا بوسیله شیارهای دوشاخه و چنگال مانند و شکسته مشخص می‌شوند. شبکه کوتیکولی این گونه در گروه اصلی ۴ قرار می‌گیرد. طول شکاف فرج ۲۲/۵ تا ۲۴ میکرومتر و فاصله آن از مخرج ۱۴/۲ تا ۱۸/۴ میکرومتر می‌باشد. لارو سن دوم کرمی شکل با استایلت ظریف به طول ۱۰/۲ تا ۱۱/۵ میکرومتر، دم باریک به طول ۴۲ تا ۸۵/۵ میکرومتر با انتهای گرد می‌باشد (شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی با نشانگر SCAR، بررسی های ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی را در مورد سه گونه شناسایی



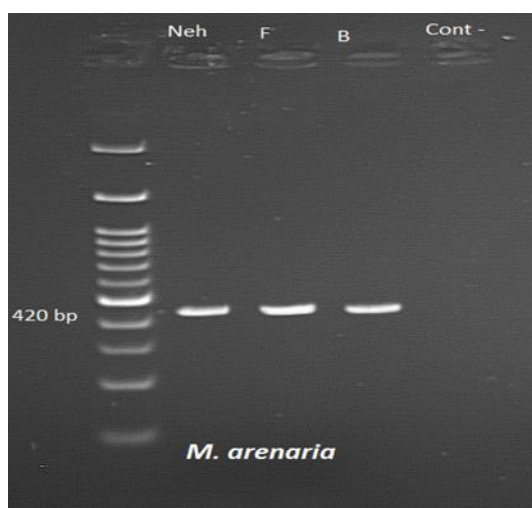
شکل ۲- تکثیر باند ۳۹۹ جفت بازی با استفاده از آغازگر اختصاصی Inc-14 جهت شناسایی *M. incognita* به ترتیب نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، جدایه‌های مناطق Tor-f: تربت حیدریه - فیض آباد، Tor-m: تربت حیدریه - سه راه مهنه، Bar: بردسکن، Baj-chah: بجستان - چاه پالیز، F: فردوس - باغستان و N: نه‌بندان - شوسف و cont-: کنترل منفی

Figure 2- Amplification of 399 bp bands using specific primer Inc-14 for identification of *M. incognita* respectively Molecular marker 100 bp, isolated of areas from Tor-f : Torbat Heidaryeh-Feyzabad, Tor-m : Torbat Heidaryeh- Serah Mehne, Bar: Bardaskan, Baj-Chah: Bajestan- Chahpaliz, F: Ferdows-Baghestan, N: Nehbandan- shusf, control -

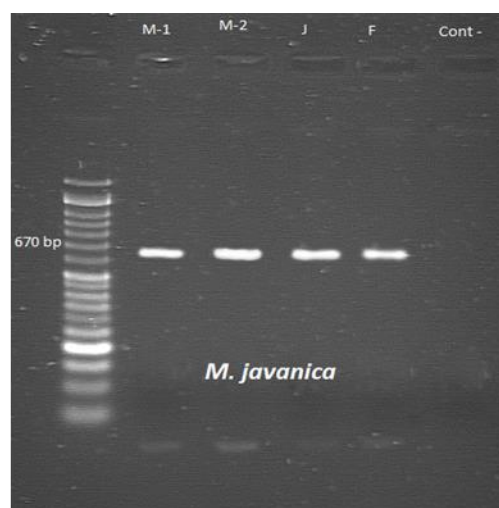
M. arenaria، و آغازگر Jav یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی را برای گونه *M. javanica* در همه جدایه‌ها تکثیر نموده و جمعیت‌ها را از یکدیگر متمایز می‌کنند (شکل ۳). نتایج این بررسی با نتایج جنگ و همکاران (۳۶) در چین، همخوانی دارد. آنها سه گونه اصلی نماتد

نتایج بدست آمده از شناسایی این گونه‌ها از ریشه انار با نتایج بشیری و همکاران (۷) که برای اولین بار با استفاده از این آغازگر گونه *M. incognita* را از ریشه درختان کیوی شناسایی کرده بودند، همخوانی دارد. آغازگر ar یک قطعه ۴۲۰ جفت بازی را برای گونه

کاری استان کرمان و مزارع داوران رفسنجان را جمع‌آوری کرده و پس از خالص‌سازی و شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم، DNA ژنومی کلیه جمعیت‌ها را استخراج کرده و با کمک جفت آغازگرهای Mjavf / Mjavr و OPAFjav / OPARjav تکثیر دادند. در کلیه جمعیت‌های گونه *M. javanica* یک قطعه ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر OPAFjav / OPARjav و یک قطعه ۱۶۰۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر Mjavf / Mjavr تکثیر داد، این قطعات در گونه *M. incognita* و *M. arenaria* و آب که به عنوان کنترل منفی در آزمایش گنجانده شده بودند تکثیر نشد. لذا به نظر می‌رسد کاربرد این جفت آغازگرها در قیاس با خصوصیات ریخت‌شناسی به تشخیص سریع‌تر گونه *M. javanica* منجر شود.



ریشه گرهی را از بین ۲۱ جمعیت توتون با استفاده از نشانگر SCAR با موفقیت شناسایی کردند. همچنین توصیه کردند که با استفاده ترکیبی از توالی DNA و SCAR می‌توان گونه‌های دیگر نماتد ریشه گرهی را بطور دقیق شناسایی کرد. میره کی و همکاران (۲۵) با استفاده از کیت‌های مولکولی، DNA را از مخلوط کیسه تخم و لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی از گلخانه‌های خیار استان کهگیلویه و بویر احمد جدا کرده و با استفاده از سه جفت آغازگر inc, ar و jav مورد شناسایی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که در هر ۱۰ جمعیت مورد مطالعه تنها قطعه ۶۷۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر javf/javr تکثیر گردیده و در نهایت *M. javanica* را به عنوان گونه شایع در این منطقه گزارش کردند. همچنین عسکریان و همکاران (۴) ۱۰۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه گرهی از نقاط مختلف پسته



شکل ۳- A) تکثیر باند ۴۲۰ جفت بازی با استفاده از نشانگر اختصاصی ar جهت شناسایی *M. arenaria* به ترتیب نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، جدایه های مناطق: Neh: نهبندان، F: فردوس و B: بجستان، cont- کنترل منفی. B) تکثیر باند ۶۷۰ جفت بازی با استفاده از نشانگر Jav جهت شناسایی *M. javanica* به ترتیب نشانگر مولکولی، جدایه ها از مناطق M-1 مانه برج زنگانلو و M-2 مانه، J: جاجرم و F: فردوس، کنترل منفی بدون باند

Figure 3- A) Amplification of 420 bp bands using specific primer ar for identification of *M. arenaria* respectively Molecular marker 100 bp, isolated of areas from: Neh: Nehbandan, F: Ferdows and B: Bajestan, control -. B) Amplification of 420 bp bands using specific primer Jav for identification of *M. javanica* respectively Molecular marker 100 bp, isolated of areas from: M-1 : Maneh- Bourj zankanlu, M-2: Maneh, J: Jajarm, F: Ferdows and control – no band

بردسکن در بخش انابد در روستای فاطمیه چاه شماره ۱ با ۵/۵ درصد مشاهده گردید. بالا بودن شدت آلودگی و خسارت نماتد در تعدادی از باغ‌های این منطقه بسیار زیاد بوده بطوری که تمام درختان در حال خشک شدن می‌باشند. در شهرستان‌های مانه و جاجرم برخلاف تصور بخش کشاورزی در منطقه مبنی بر عاری بودن باغ های انار از نماتد ریشه گرهی، این نماتد استخراج گردید ولی کمترین میزان آلودگی را نشان داد. بیشترین درصد آلودگی باغات به ترتیب در استان‌های خراسان رضوی در شهرستان‌های بردسکن ۱۹/۹۳٪، بجستان ۱۲/۳٪، خلیل آباد ۶/۹٪، کاشمر ۴/۳٪، تربت

با مقایسه نتایج به دست آمده از این بررسی و نتایج تحقیقات مشابه، می‌توان استفاده از آغازگرهای اختصاصی را برای شناسایی سه گونه اصلی نماتد ریشه گرهی، به عنوان یک روش سریع، دقیق و قابل اطمینان پیشنهاد نمود.

پس از شناسایی گونه‌های غالب در هر منطقه، درصد آلودگی هر منطقه از سه استان خراسان رضوی، جنوبی و شمالی به نماتد ریشه گرهی محاسبه گردید (جدول ۳). بیشترین میزان آلودگی باغ‌ها به این نماتد در شهرستان‌های بردسکن و بجستان مشاهده شد. بالاترین درصد آلودگی به نماتد ریشه گرهی در باغ انار شهرستان

حیدریه ۳/۵٪، خراسان جنوبی در شهرستان‌های فردوس ۵/۴٪ و نهبندان ۱/۳٪، و در شهرستان‌های مانه ۱/۱٪ و جاجرم ۰/۸٪ از خراسان شمالی گزارش گردید (جدول ۳). استان خراسان رضوی با توجه به بالا بودن سطح کشت انار، آلودگی بیشتری را نشان داد. بنظر می‌رسد نماتد ریشه گرهی برخلاف تصور در اغلب باغ‌های انار

استان در حال گسترش و خسارت می‌باشد. لذا با توجه به ارزش غذایی و صادراتی انار و جهت جلوگیری از گسترش بیشتر این نماتد توصیه می‌گردد کنترل و مبارزه با این نماتد در دستور کار مدیران قرار گیرد.

جدول ۳- مناطق نمونه‌برداری آلوده به نماتد ریشه گرهی، درصد آلودگی و گونه‌های استخراج شده از هر منطقه به تفکیک استان، شهرستان و بخش

Table 3- Sampling area infected of root-knot nematode, Infection percentage and species extracted from each area by province, city and district.

گونه‌های نماتد شناسایی شده Identified nematode species	درصد آلودگی باغ Percentage of infection	بخش District	شهرستان City	مناطق نمونه‌برداری - استان Sampling region-province
<i>M. incognita</i>	1.5	فیض آباد (Feyzabad)	تربت حیدریه (Torbat Heydarieh)	
<i>M. incognita</i>	2.4	مه ولات (Mahvelat)		
<i>M. incognita</i>	2.7	سه راه مهنه ۱ (Serah Mehne 1)		
<i>M. incognita</i>	7.5	سه راه مهنه ۲ (Serah Mehne 2)		
<i>M. incognita</i>	2.08	ابراهیم آباد (Ebrahimabad)	خلیل آباد (Khalilabad)	
<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>	11.8	حاشیه جاده (Roadside)	کاشمر (Kashmar)	
<i>M. incognita</i>	1.6	بالا ولایت (Balavelayat)		
<i>M. incognita</i>	7.08	حاشیه جاده (Roadside)		
<i>M. incognita</i>	16.9	انابد- فاطمیه چاه ۴ (Anabad-Fatemiye 4)	بردسکن (Bardaskan)	خراسان رضوی (Razavi Khorasan)
<i>M. incognita</i>	57.5	انابد- فاطمیه چاه ۱ (Anabad-Fatemiye 1)		
<i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i>	0.8	انابد- باب الحکم (Anabad-Babolhekam)		
<i>M. incognita</i>	21.16	انابد-محمدخان (Anabad-Mohammadkhan)		
<i>M. incognita</i>	37.5	انابد- فاطمیه چاه ۶ (Anabad-Fatemiye 6)		
<i>M. incognita</i>	3.25	انابد (Anabad)		
<i>M. incognita</i>	2.4	شفیع آباد (Shafie Abad)		
<i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i>	32	چاه پالیز (Chahpaliz)		
<i>M. incognita</i>	9.4	جزین (Jazin)	بجستان (Bajestan)	
<i>M. incognita</i>	4.3	صلح آباد (Solhabad)		
<i>M. incognita</i> , <i>M. arenaria</i>	17.2	انارستان حومه شهر (Pomegranate Roadside)		

<i>M. incognita</i>	2.5	چاه نظم (Chahnazm)		
<i>M. incognita, M. arenaria</i>	8.6	بجستان (Bajestan)		
<i>M. incognita</i>	6.8	باغستان علیا (Baghestan Olya)		
<i>M. incognita</i>	5.3	باغستان (Baghestan)		
<i>M. incognita</i>	3.1	دهستان (Dehestan)	فردوس (Ferdows)	خراسان جنوبی (Southern Khorasan)
<i>M. incognita, M. javanica</i>	6.5	فردوس (Ferdows)		
<i>M. arenaria</i>	1.3	محمد آباد (Mohammadabad)		
<i>M. incognita, M. arenaria</i>	2.1	شوسف (Shousf)	نهبندان (Nehbandan)	
<i>M. incognita</i>	0.7	نهبندان (Nehbandan)		
<i>M. javanica</i>	1.1	برج زنگانلو (Borj Zankanlu)	مانه (Maneh)	خراسان شمالی (Northern Khorasan)
<i>M. javanica, M. incognita</i>	1.2	مانه (Maneh)		
<i>M. javanica, M. arenaria</i>	0.8	جاجرم (Jajarm)	جاجرم (Jajarm)	

سیاسگزاری

کشاوری مشهد، بردسکن، کاشمر، تربت حیدریه، بجستان، بجنورد و نهبندان و سایر بخش‌های شهرستان‌ها، جهت اطلاعات و تسهیل در فرایند نمونه‌برداری، ابراز می‌دارند.

بدین وسیله نگارندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد جهت فراهم نمودن امکانات برای انجام این تحقیق، مرکز تحقیقات و جهاد

منابع

- 1- Adam M.A.M., Phillips M.S., and Blok V.C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathology 56: 190–197
- 2- Akhyani A. 1987. Important pest and diseases of pomegranates in Yazd and Isfahan provinces. Introduction to the Articles of the First Seminar on Pomegranate Problems in Iran. College of agriculture and natural resource of Tehran, Karaj. (In Persian)
- 3- Anonymous. 2005. Statistical Book of Agricultural of Iran. Iranian Statistical Centre, Tehran, Iran. (In Persian)
- 4- Askariyan H., Sharifnabi B., Oliya M., Mahdikhani Moghadam E., and Akhavan E. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* with use of morphometric and morphologic characterize and specific primer in Kerman Province. Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources. 47: 279-289. (In Persian)
- 5- Behzadi Shahrabaki H. 1997. Genetic diversity of pomegranate genotypes in Iran. Agriculture Education Pub. (In Persian)
- 6- Barker K.R., Carter C.C., and Sasser J.N. 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*, Plant. Pathology 4: 212-233
- 7- Bashiri S., Jamali S., and Gol Mohamadi M. 2012. Molecular Identification of *Meloidogyne incognita* nematode isolated from kiwifruit roots in northern Iran. 3rd Iranian agricultural Biotechnology Conference. Ferdowsi University of Mashhad.
- 8- De Ggrisse AT. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilisees dans letude des nematodes phytoparasitaires. Meddelingen Rijksfauculteit landbouwwetenschappen Bull 34: 351-356.
- 9- De Ley I.T., Karssen G., De Ley P., Vierstraete A., Waeyenberge L., Moens M., and Vanfleteren J. 1999. Phylogenetic analyses of internal transcribed spacer region sequences within *Meloidogyne*. Journal of Nematology 31: 530–531.

- 10- Esser R.P., Perry V.G., and Taylor A.L. 1976. A diagnostic compendium of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae). Proceedings of Helminthological Society of Washington 43: 138–150.
- 11- Fourie H., Zijlstra C., and McDonald A.H. 2001. Identification of root knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. Journal Nematology 3: 675-680.
- 12- Jain R.K., Mathur K.N., and Singh R.V. 2010. Estimation of losses due to plant parasitic nematodes on different crops in India. Indian Journal of Nematology 37(2): 219-221.
- 13- Janssen T., Karssen G., Verhaeven M., Coyne D., and Bert W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. Scientific Reports 6: 22591.
- 14- Jepson S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes *Meloidogyne* species. CABI Publishing.
- 15- Jeyaprakash A., Tigano M.S., Brito J.A., and Dickson D.W. 2006. Differentiation of *Meloidogyne floridensis* from *M. arenaria* using high-fidelity PCR amplified mitochondrial AT-rich sequences. Nematropica 36(1): 1-12
- 16- Hatamabadi Farahani M. 2015. Final report of research in determine distribution, severity of infection and identification of root knot nematode species in pomegranate orchards in Saveh city. Natural research and education center of Iran, Tehran. 31 p. (In Persian)
- 17- Hatamabadi Farahani M., Ghalandar M., and Hoseininezhad A. 2018. Investigation of Distribution Root knot nematode in pomegranate orchards in Saveh city. 23rd Iranian plant protection congress, Gorgan. P 725. (In Persian)
- 18- Hartman K.M., and Sasser J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. Pp. 69–77 in J. N. Sasser and Carter C.C., An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. II. Biology and control. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics
- 19- Harris T.S., Sandal L.J., Powers T.O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. Journal of Nematology 22: 518–527
- 20- Hunt D.J., and Hundoo Z.A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. Pp: 55-97. In: R. N. Perry, M. Moens and J. L. Starr. Root-knot nematodes. CABI, Wallingford, UK.
- 21- Kargar Bideh A. 1989. Investigation of survey plant parasitic nematode in fruit trees (pomegranate, pistachio and almond) in Yazd province. MSc Thesis. Tarbiat Modarres University Faculty of Agriculture. 140 p. (In Persian)
- 22- Kheiry A., and Baruti SH. 1987. Introducing plant parasitic nematodes collected from soil around pomegranate roots. Introduction to the Articles of the First Seminar on Pomegranate Problems in Iran. College of agriculture and natural resource of Tehran, Karaj. P19. (In Persian)
- 23- Kiewnick S., Holterman M., van den Elsen S., van Megen H., Frey J.E., Helder J. 2014. Comparison of two short DNA arcoding loci (COI and COII) and two longer ribosomal DNA genes (SSU & LSU rRNA) for specimen identification among quarantine root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and their close relatives. European Journal of Plant Pathology 140: 97–110.
- 24- Lunt D.H., Kumar S., Koutsovoulos G., and Blaxter M.L. 2014. The complex hybrid origins of the root knot nematodes revealed through comparative genomics. Peer Journal 2: 1-25.
- 25- Mireh Ki K., Abdollahi M., Mohaghegh Dolat abadi M., and Ghezelbash N. 2014. Application of Morphological Characters and PCR- SCAR Markers for Identification of Dominant Species of Root-knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) in Glasshouses of Cold Region of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, Iran .Agricultural biotechnology. (In Persian with English abstract)
- 26- Palomares Ruis J.E., Vovlas N., Troccoli A., LieBanas G., Landa B.B., and Castillo P. 2007. A new root-knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean coastal sand dunes: *Meloidogyne dunesis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae). Journal of Nematology 39:190–202.
- 27- Powers T.O., and Harris T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. Journal of Nematology 25: 1–6.
- 28- Powers T.O., Mullin P.G., Harris T.S., Sutton L.A., and Higgins R.S. 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. Journal of Nematology 37: 226–235.
- 29- Silva A.T., Penna J.C.V., Goulart L.R., Santos M.A., and Arantes N.E. 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* ichinohe assessed by RAPD markers. Genet. Mol. Biology 23: 323-329.
- 30- Shakeri M. 2003. Disease and Pest of Pomegranate. Tasbih Pub. 126 p. (In Persian)
- 31- Verma N., Mohanty A., and Lal A. 2010. Pomegranate genetic resources and germplasm conservation: a Review. Fruit Vegetable Cereal Sci Biotechnol 4(2): 120-125.
- 32- Whitehead A.G., and Hemming J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annual Applied Biology 55: 25-38.
- 33- Ye W., Zeng Y., and Kerns J. 2015. Molecular characterization and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. PLoS ONE 10(1 1), e0143556.
- 34- Ye W., Robbins R.T., and Kirkpatrick T. 2019. Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Arkansas, USA. Scientific Reports. 9:15680
- 35- Zeng Y., Ye W., and Kerns J. 2015. Molecular characterization and phylogenetic relationships of plant-parasitic nematodes associated with turfgrasses in North Carolina and South Carolina, USA. Plant Disease 99: 982–993.

- 36- Zeng J., Zhang Z., Wu X., Zeng Y., and Li Y. 2017. Distribution and Molecular Identification of *Meloidogyne* spp. Parasitizing Flue-cured Tobacco in Yunnan, China. Plant Protect. Sci.
- 37- Zijlstra C., Donkers-venne D., and Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assay. Nematology 2(8): 847-853.



Morphological and Molecular Identification of Major Species of *Meloidogyne* and Distribution there in Pomegranate Orchards in Khorasan Provinces

N. Katooli¹- E. Mahdikhani Moghadam^{2*}- R. Aghnoum³

Received: 11-11-2019

Accepted: 13-01-2020

Introduction: Pomegranate is one of the most popular fruit trees and one of the most important export productions in Iran. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are the most damaging plant-parasitic nematodes of pomegranate, which cause root galls and disrupt the absorption and transfer of water and food, and eventually decrease the fruit growth. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are economically important plant parasites affecting a broad range of host plants, and thus far, 100 nominal species have been described. The development of molecular methods to identify the four major Root-knot nematodes including *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* and *M. hapla* has been the goal of numerous studies. These species are morphologically similar, making identification difficult for the non-specialist. However, distinguishing them is important for utilizing appropriate crop rotations, managing resistance effectively and plant quarantine requirements. Therefore, some molecular methods for identification of Root-knot nematodes (RKN) species have been developed. Recently, a PCR method based on DNA has been widely used for the identification of nematodes. SCAR- Primers (Sequence characterized amplified region) were developed and are used routinely on a large number of samples with high sensitivity and specificity.

Materials and Methods: In order to investigate the infection of pomegranate orchards to *Meloidogyne* species, 115 soil and root samples were collected from major areas of pomegranate cultivation from Khorasan Razavi, Northern Khorasan and Southern Khorasan provinces, during 2015-2016. The highest area of pomegranate cultivation is located in Torbat Heydariyeh, Bardaskan, Kashmar, Khalil Abad, Bajestan and Ferdows cities. After extraction of nematodes from root and surrounding soil, species identification was performed according to morphological and morphometric characteristics of second-stage juveniles, mature females and perineal pattern of females, and also using molecular methods and specific SCAR primers. For DNA extraction, the procedure proposed by Silva *et al*, who extracted DNA of second stage juvenile, was applied. In addition, the Atkin methods were employed for extracting DNA of mature female. The DNA was added into the PCR reaction with specific primer (SCAR), and then loaded in gel for further analyses.

Results and Discussion: Major species of root knot nematode were *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* in Khorasan provinces identified based on morphological and morphometric studies as well as SCAR primers. *M. incognita* showed a band about 399 bp with Inc-14 primer, *M. javanica* exhibited a band about 670 bp with Jav primer and *M. arenaria* showed a band about 420 bp with a ar primer. Infection of root knot nematode pomegranate was observed in almost all cities but the intensity of infection varied considerably. The highest percentage of infection on root-knot nematodes pomegranate orchards was observed in Bardaskan (Anabad section of Fatemiyeh village) with 57.5% and Bajestan (Chah Paliz village) with 32%. *M. incognita* has the highest distribution in pomegranate orchards. The highest percentage of infected orchards was estimated in Bardaskan (19.93%), Bajestan (12.3%), Khalil Abad (6.9%), Kashmar (4.3%), and Torbat Heidariyeh (3.5%) located in Khorasan Razavi provinces, Ferdows (5.4%) and Nehbandan (1.3%) in Southern Khorasan provinces, and Maneh (1.1%) and Jajarm (0.8%) situated in Northern Khorasan. *M. incognita* has the highest distribution in Khorasan Razavi and Southern Khorasan provinces, and *M. javanica* has the highest distribution in Northern Khorasan provinces. The differential host shows the race 2 of *M. incognita* in area.

Conclusion: Infection of root knot nematode pomegranate is growing and there is a need for accurate identification. Using molecular methods especially SCAR primers for identification of major species of root knot nematode is fast, accurate and reliable.

Keywords: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, Pomegranate, SCAR-Primer

1 and 2- Ph.D. Student of Plant Pathology and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.

(*- Corresponding Author Email: mahdikhani-e@um.ac.ir)

3- Seed and Plant Improvement Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran



مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌سازی روش‌های مولکولی شناسایی نماتد عامل ریشه‌گره‌ای
(*Meloidogyne javanica*)

رحمان کشاورز کوهجردی^{۱*} - علی پاک نیت جهرمی^۲ - مهرزاد هنرور^۳ - مجید پاک نیت جهرمی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۵

چکیده

به منظور شناسایی سریع مراحل مختلف رشدی گونه *Meloidogyne javanica* که در ایران به عنوان یکی از خسارت‌زاترین نماتدهای گیاهی شناخته شده، تعداد ۴۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه‌گره‌ای از نقاط مختلف جالیزکاری استان فارس (داراب، جنت شهر، استهبان، نورآباد، کوار و شیراز) جمع‌آوری گردید. پس از خالص‌سازی به روش تک کیسه تخم روی ریشه گوجه فرنگی رقم Rutgers و شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی (مورفولوژی) و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لارو سن دوم، DNA ژنومی کلیه مراحل رشدی از مرحله تخم، لارو سن دوم و ماده‌های بالغ نماتد، به سه روش ژانگ، سیلوا و لیوا استخراج شد. DNA استخراج شده با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی گونه Fjav/Rjav، Mj-MF/Mj-MR، Mj-MF/Mj-MR و یک قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی توسط جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR و یک قطعه ۵۱۷ جفت بازی توسط جفت آغازگر Fjav/Rjav تکثیر شد ولی این قطعات با جفت آغازگر MI-R و MI-F، مربوط به نماتد *M. incognita* و آب که به عنوان کنترل منفی در آزمایش استفاده شده بودند تکثیر نشدند. لذا به نظر می‌رسد کاربرد این جفت آغازگرها در قیاس با خصوصیات ریخت‌شناسی در مراحل مختلف رشدی نماتد به تشخیص سریع تر گونه *M. javanica* منجر می‌شود. در بهینه‌سازی PCR برای تشخیص نماتد *M. javanica* بهترین دما برای آغازگرهای Mj-MR و MF ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای Mj-DF و Mj-DR ۵۰ درجه سانتی‌گراد و برای Fjav و Rjav ۵۴ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید، میزان DNA الگو حاصل از روش‌های مختلف استخراج در آزمون PCR در خصوص ماده کامل و کیسه تخم از یک میکرولیتر به دو میکرولیتر و لارو سن دوم از دو میکرو لیتر به چهار میکرولیتر بهترین نتیجه حاصل شد. در خصوص MgCl₂ با افزایش میزان آن از ۱/۵ میلی‌مولار به ۲ میلی‌مولار در واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR بهترین نتیجه حاصل گردید. بهترین روش استخراج که قادر به ردیابی تک لارو سن دوم نماتد بود روش لیوا در نظر گرفته شد. بهترین آغازگرها که قادر به ردیابی نماتد *M. javanica* در تمام مراحل رشدی بودند، جفت آغازگر Mj-MR/Mj-MF و Rjav/Fjav بودند.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی، بهینه‌سازی PCR، نماتد ریشه‌گره‌ای، *M. javanica*

مقدمه

نماتدهای ریشه‌گره‌ای متعلق به جنس *Meloidogyne* می‌باشند. این نماتدها یک گروه بسیار پلی فاژ با اهمیت اقتصادی بسیار زیاد می‌باشند که در سراسر دنیا گسترش یافته‌اند و تقریباً به تمام گیاهان عالی حمله می‌کنند. شدت خسارت وارده توسط نماتدهای ریشه‌گره‌ای به گونه نماتد، گیاه میزبان، تناوب زراعی، فصل زراعی و نوع خاک بستگی دارد (۱۴).

روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر^۵ باعث ایجاد انقلابی در تاکسونومی نماتدها و مطالعه ژنتیک آن‌ها شده است، چرا که این روش‌ها حساسیت بالایی دارند و امکان تکثیر ژن‌های مختلف را در این

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، رشته مهندسی کشاورزی علوم باغبانی، بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد استهبان

(*)- نویسنده مسئول: Email: rahman.keshavarz64@gmail.com

۲ و ۴- استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زرقان، ایران

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد استهبان، گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، استهبان، ایران

استان کرمان از تکنیک رپید استفاده کردند. نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف هر گونه بود. جمعیت‌های *M. javanica* حدود ۹۱٪، و جمعیت‌های *M. incognita* حدود ۸۶٪ به هم شباهت داشتند (۲).

فدوی خلاجو و همکاران (۱۳۸۹) تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بین جمعیت‌های مختلف *M. javanica* در مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی با استفاده از نشانگر PCR-RAPD بررسی کردند. آن‌ها برای به دست آوردن جمعیت خالص، یک توده تخم از ریشه‌های آلوده مناطق مختلف جداسازی و به گوجه فرنگی تلقیح کردند. در مطالعه آن‌ها استخراج DNA بر اساس روش سیلوا و همکاران بود. نتایج آن‌ها نشان داد روش رپید نمی‌تواند جمعیت‌ها را بر اساس مناطق جغرافیایی جدا کند و همچنین تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های مختلف *M. javanica* مشاهده نشد (۶). مکرم حصار و همکاران (۲۰۱۰) تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی بین جمعیت‌های گونه *M. javanica* روی میزبان‌های مختلف در مزارع استان خراسان رضوی بررسی کردند. مطالعات مورفومتریکی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتدهای ماده و نیز خصوصیات مورفومتریکی لاروهای سن دوم شناسایی شدند. برای تایید مطالعات مورفولوژیکی از آغازگرهای اختصاصی گونه *M. javanica* به نام‌های OPAFjav و OPAFjav استفاده شد. تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها از طریق نشانگر رپید با استفاده از ۱۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی بررسی شد. بر اساس نتایج این مطالعه تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف گونه *M. javanica* اثبات شد اما ارتباط کاملی بین این دو روش گروه‌بندی مشاهده نشد (۱۵).

زیجلاسترا (۲۰۰۰) با استفاده از روش اسکار-پی‌سی‌آر^۳ به عنوان یک روش قدرتمند برای شناسایی مطمئن جمعیت‌ها و افراد گونه‌های *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla* که دارای صفات مشترک هستند استفاده کرد. این گونه‌ها با کاربرد این روش چندگانه با استفاده از سه جفت آغازگر آشیانه‌ای شناسایی و توصیف شد. در این مطالعه آزمون‌های تشخیصی بهینه‌سازی شد و همچنین فایده تبدیل کردن مارکرهای رپید به مارکرهای اسکار مورد بحث قرار گرفت (۱۹).

دونگ و همکاران (۲۰۰۱) بعد از انجام واکنش رپید و با استفاده از توالی‌یابی باندهای اختصاصی که برای هر گونه پیدا کردند، جفت آغازگرهای اختصاصی اسکار را برای گونه‌های *M. incognita*, *M. javanica* و *M. arenaria* طراحی کردند. آن‌ها همچنین با استفاده از اسکار-پی‌سی‌آر برای گونه‌های *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* و *M. javanica* آغازگرهای اختصاصی اسکار را طراحی کردند (۴). در پژوهشی فارگت و همکاران (۲۰۰۵) تنوع ژنتیکی

موجودات فراهم آورده‌اند. همچنین غالباً بدست آوردن مقدار کافی از DNA، حداقل در مورد بعضی از نماتدها یا در بعضی از مراحل زندگی آن‌ها، کاری سخت و اغلب غیر ممکن است که روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر این مشکل را بر طرف کرده‌اند (۸). هم اکنون روش‌های کلاسیک تاکسونومی تا حد زیادی توسط روش‌های مولکولی کامل شده‌اند. در بعضی از نقاط دنیا، روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های سخت و وقت گیر میکروسکوپی شده‌اند، هر چند که تقریباً اجماع جهانی بر این است که در کنار روش‌های مولکولی، روش‌های کلاسیک نیز باید انجام شوند و این دو روش نواقص همدیگر را پوشش می‌دهند (۳).

اسبنشاد و همکاران (۱۹۸۵) ۳۰۰ جمعیت از ۱۶ گونه *Meloidogyne* را که از چند کشور دنیا جمع‌آوری شده بود مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی از آنزیم‌های استراز، مالات دهیدروژناز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتامات اگزوالواستات ترانس آمیناز استفاده شد و در میان آن‌ها استرازها به عنوان نشانگر بیوشیمیایی مطلوب برای شناسایی گونه‌های اصلی *Meloidogyne* مفید تشخیص داده شدند (۵).

مهدیخانی مقدم و همکاران (۲۰۰۶) پس از خالص‌سازی جمعیت‌های مختلف دو گونه مهم نماتد ریشه‌گرهای در ایران، *M. javanica* و *M. incognita* از ماده‌های بالغ و لارو سن دوم پروتئین استخراج کردند و برای تفکیک پروتئین‌های محلول از روش SDS-PAGE استفاده نمودند. نقوش پروتئینی مربوط به جمعیت‌های مختلف هر یک از دو گونه که از میزبان‌های مختلف جدا شده بودند، سطح بالایی از تشابه را نشان دادند. در این بررسی شش فنوتیپ پروتئینی برای جمعیت‌های گونه *M. javanica* و چهار فنوتیپ پروتئینی برای جمعیت‌های گونه *M. incognita* مشاهده گردید. این تحقیق نشان داد که با استفاده از پروتئین کل سلولی می‌توان دو گونه مذکور را از هم تفکیک کرد اما جمعیت‌های درون گونه‌ای از هم قابل تفکیک نیستند (۱۱).

آدام و همکاران (۲۰۰۵) برای شناسایی گونه‌ها مختلف *Meloidogyne* در لیبی از چهار روش بررسی مورفولوژیکی، ایزوایم، اسکار^۱ و رپید^۲ استفاده کردند و در میان این روش‌ها، رپید را برای تفکیک گونه‌های این جنس مطلوب‌تر از بقیه روش‌ها ارزیابی کردند و حتی توانستند تعدادی از جمعیت‌های ناشناخته این جنس را که از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت بودند در سطح گونه شناسایی کنند (۱).

عسکریان و همکاران (۱۳۸۴) برای بررسی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف *M. javanica* و *M. incognita* در باغات پسته

1- SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)
2- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

استفاده قرار گرفت.

استخراج به روش CTAB

روش ژانگ و همکاران (۱۸) همراه با تغییرات به شرح زیر انجام گرفت. ابتدا روی یک لام سه قطر آب استریل گذاشته و ماده‌های کامل و دیگر مراحل رشدی نماتد که از بافت استخراج شده بودند در این سه قطره آب شستشو شد. سپس داخل اپندروف‌های ۵/۰ میلی‌لیتری به تعداد ۱۰ عدد نماتد داخل ۵۰ میکرولیتر CTAB گذاشته و یک سانتریفوژ کوتاه انجام شد. با کمک سرتیپ در زیر بینکولر نماتدها له شدند و سپس ۵ میکرولیتر لیزوزیم بافر (۲۰ میلی گرم لیزوزیم در ۱۰ میلی مولار Tris-HCL با pH=8) اضافه شد و در حمام بنماری و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. نمونه‌ها هر ۵ دقیقه یک بار ورتکس شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر کلروفرم ایزامیل الکل به نسبت (۲۴:۱) اضافه و به مدت ۵ تا ۱۵ دقیقه شیک گردید سپس سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. فاز رویی با دقت برداشته و داخل اپندورف جدید ریخته شد. دو برابر حجم فاز رویی ایزوپروپانل سرد اضافه گردید و چند بار با دست تکان داده شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مواد رویی بیرون ریخته و با ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به آرامی عمل شستشو انجام گرفت. سپس بر روی دستگاه هات پلیت در دمای ۶۵ درجه گذاشته تا الکل خشک شود. بعد از خشک شدن ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترن اضافه و نیم ساعت در هوای آزاد گذاشته شد تا DNA خوب حل گردد، برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از مراحل رشدی مختلف از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید (۱۸).

استخراج به روش سیلوا

روش سیلوا همراه با تغییرات به شرح زیر انجام گرفت. در این روش ابتدا سه قطر آب استریل روی یک لام قرار داده شد و ماده‌های کامل که از بافت بیرون آورده شدند در این قطره‌های آب شستشو شدند و به داخل اپندروف‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل می‌باشد قرار داده شد. این اپندورف‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. اپندورف‌ها به مدت ۵ دقیقه در ازت مایع نگهداری شدند. با سرتیپ که قبلاً روی شعله منفذ آن مسدود شده بود، نماتدهای مورد نظر له شد و مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Tris 0.25gr, EDTA 0.15gr, NaCl 1.6gr, β -mercaptoethanol 50 μ l, Water 20ml) به آنها اضافه شد و ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

گونه‌های *incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. chitwoodi* را با استفاده از نشانگر AFLP بررسی کردند و تنوع ژنتیکی بالایی را برای دو گونه اخیر گزارش نمودند (۷).

مهدیخانی مقدم و همکاران (۲۰۰۶) برای تفکیک دو گونه عمده نماتد ریشه‌گره‌ای در ایران از روش پی‌سی‌آر استفاده کردند. آنها پس از استخراج DNA از تخم و لاروهای سن دوم جمعیت‌های مختلف دو گونه *M. incognita* و *M. javanica* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی قسمتی از DNA میتوکندریایی را تکثیر دادند. در مطالعه آنها قطعات تکثیری با آنزیم‌های برشی *DraI*, *AluI* و *HinfI* برش داده شدند. دو آنزیم برشی *DraI*, *AluI* هیچ گونه برشی در قطعه DNA تکثیر شده ایجاد نکردند اما آنزیم *HinfI* نقوش مشخصی را برای جمعیت‌های *M. incognita* و *M. javanica* ایجاد نمود (۱۲). در پژوهشی شکوهی و همکاران (۱۳۹۱) بر اساس توالی یابی ناحیه ITS دی‌ان‌اِ ریبوزومی نماتد ریشه‌گره‌ای *Melodgyne spp.* نشان دادند این گونه مشابه گونه *M. javanica* است. (۱۶).

شناسایی دقیق نماتدها با استفاده از روش مرفولوژیکی، مولکولی، میزبان و همه‌گیرشناسی^۱ لازم و کاربردی است. همچنین استفاده از روش‌های موثر کنترل نیز مستلزم شناسایی صحیح آن‌ها می‌باشد. شناسایی نماتدها غالباً بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و مرفومتربیک انجام می‌شود و در بعضی موارد نوع میزبان و میزبان‌های افترقی نیز در شناسایی آن‌ها دخالت دارند. خصوصیات بیوشیمیایی و نیز روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک، روش‌های جدیدتری است که می‌تواند ابهامات روش مرفولوژیک را برطرف نماید (۸). هدف از این مطالعه بهینه‌سازی روش‌های مولکولی برای شناسایی سریع مراحل مختلف رشدی گونه *M. javanica* است.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۱ طی بازدیدهایی که به مناطق مختلف جالیزی کاری استان فارس صورت گرفت تعداد ۴۰ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد ریشه‌گره‌ای جمع‌آوری گردید (جدول ۱). برای بدست آوردن جمعیت خالص از هر نمونه، یک کیسه تخم بزرگ که حاوی تعداد تخم بیشتری بود، انتخاب گردید. سپس به تعداد گلدان‌هایی که از قبل آماده شده بودند، کیسه تخم جدا شده در مجاورت نشاء گوجه فرنگی رقم Rutgers قرار گرفت، بعد از گذشت ۷۰-۶۰ روز ریشه‌ها از گلدان خارج و برای نمونه‌برداری به منظور تشخیص گونه و تکثیر مجدد نماتدها آماده شدند. جهت استخراج DNA و شناسایی نماتد ریشه‌گره‌ای با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سه روش مورد

جدول ۱- مناطق نمونه‌برداری شده و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر منطقه از جالیزکاری استان فارس

Table 1- Sampled areas and the number of samples collected in each area of Fars Province

کد نمونه Sample code	نام شهرستان Name of county	مناطق نمونه‌برداری sampling areas	گلخانه Greenhouse	مزرعه Farm	تعداد نمونه Number of samples
R	نورآباد Nourabad	رستم Rostam	خیار Cucumber		3
K	داراب Darab	فسارود Fasaroud		خیار Cucumber	5
N	داراب Darab	فسارود Fasaroud		گوجه فرنگی Tomato	5
G	داراب Darab	فسارود Fasaroud		بادمجان Eggplant	5
J	داراب Darab	جنت شهر Janatshahr	خیار Cucumber		10
F	استهبان Estahban	ایج Ij	خیار و ریحان Cucumber and Basil		5
P	کوار Kavar	کوار Kavar		گوجه فرنگی Tomato	3
H	شیراز Shiraz	باجگاه Bajgah	گوجه فرنگی Tomato		2
B	شیراز Shiraz	منزل مسکونی House		بادمجان Eggplant	2

سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه با ۶۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و فاز رویی برداشته و به میکرو تیوپ جدید منتقل شد و هم حجم آن، مخلوط کلروفرم- ایزوامیل الکل به نسبت (۲۴:۱) اضافه و پس از یک تکان شدید و مخلوط شدن کامل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام این مرحله فاز رویی به اپندورف جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و ۵ دقیقه شیک شد و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۰- درجه قرار می‌دهیم. سپس محتویات اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد. فاز رویی به آرامی بیرون ریخته و رسوب حاصله با الکل ۷۰ درصد شستشو شد. سپس اپندورف مورد نظر روی دستگاه هات پلیت با دمای ۶۵ °C درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا کاملاً خشک شود. ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون اضافه شد و ۳۰ دقیقه در هوای اتاق نگهداری شد تا DNA کاملاً حل شود و پس از چند بار ورتکس در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۱۸).

رقیق‌سازی آغازگرها

برای هر جفت آغازگر جدول ۲ بر طبق برگ اطلاعات شرکت سازنده که شامل اطلاعات مانند OD می‌باشد و مولاریته هر آغازگر محاسبه و آب دیونیز تزریقی برای رقیق‌سازی اضافه گردید. آغازگرها به صورت لایفولایز Lypholyse بوده و جامدکه باید رقیق‌سازی شود. ابتدا توسط سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه میانگین‌سازی گردیده و سپس هر جفت آغازگر ۱۰ برابر رقیق گردیدند. رقت آن برابر ۱۰ میلی‌مولار در هر میکرولیتر تنظیم و دما اتصال هر آغازگر بر اساس فرمول زیر محاسبه شد

$$T_{anneal} = (4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)) - 5$$

روش لیوآ همراه با تغییرات در این روش تک ماده خارج شده از بافت پس از شستشو در میکرو تیوپ ۰/۲ میلی لیتری که ۱۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون شده بود قرار گرفت و با سرتیپ زرد که منفذ آن روی شعله مسدود شده بود زیر بینکولر نماتد مورد نظر له گردید. سپس ۲۰ میکرو لیتر بافر استخراج (0.2M NaCl, 0.2M

استخراج به روش لیوآ

روش لیوآ همراه با تغییرات در این روش تک ماده خارج شده از بافت پس از شستشو در میکرو تیوپ ۰/۲ میلی لیتری که ۱۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون شده بود قرار گرفت و با سرتیپ زرد که منفذ آن روی شعله مسدود شده بود زیر بینکولر نماتد مورد نظر له گردید. سپس ۲۰ میکرو لیتر بافر استخراج (0.2M NaCl, 0.2M

جدول ۲- نام آغازگرها همراه با توالی و دمای Tm آنها و دمای اتصال بر اساس فرمول

Table 2- The names of the primers along with their sequence and temperature Tm and connection temperature according to the formula

ردیف Row	نام آغازگر Primer name	توالی Sequence	منبع Reference	طول قطعه Fragment length	دمای Tm براساس شرکت تولید کننده Temperature Tm based on the manufacturer	دمای Annealing براساس فرمول Annealing temperature according to the formula
1	MJ-DF	5'CCTTAATGTCAACACTAGAGCC3'	Dong et al., 2001b	1650bp	60	59
	MJ-DR	3'GGCCTTAACCGACAATTAGA5'			56	
2	MJ-MF	5'ACGCTAGAATTCGACCCTGG3'	Meng et al., 2004	517bp	60	57
	MJ-MR	3'GGTACCAGAAGCAGCCATGC5'			63	
3	Fjav	5'GGTGCGCGATTGAAGTGAAGC3'	Zijlstra et al., 2000	670bp	63	59
	Rjav	3'CAGGCCCTTCAGTGGAAGTATAC5'			65	
4	MI-F	5'GTGAGGATTCAGCTCCCCAG3'	Meng et al., 2004	955bp	63	59
	MI-R	3'ACGAGGAACATACTTCTCCGTC5'			65	

آغازگر MJ-MF و MJ-MR (۱۳) که باند اختصاصی 517bp ایجاد می‌کند و آغازگر Fjav و Rjav (۲۰) که یک قطعه اختصاصی 670bp ایجاد می‌کند استفاده گردید. آغازگر MI-F و MI-R (۱۳) که یک قطعه اختصاصی 955bp ایجاد می‌کند و مربوط به گونه *M. incognita* می‌باشد نیز استفاده گردید. توالی این آغازگرها در جدول ۲ آورده شده است. مخلوط واکنش پی‌سی‌آر، بر اساس جدول ۳ تنظیم و سپس بهینه گردید.

برای شناسایی نماتدها از روش‌های مورفولوژیکی و مورفومتریک با کمک آغازگرهای اختصاصی گونه *M. javanica* از روش‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون PCR

برای شناسایی گونه *M. javanica* و تایید شناسایی مورفولوژیکی، از سه جفت آغازگر اختصاصی به نام‌های MJ-DF و MJ-DR (۴) که یک قطعه اختصاصی 1650 bp ایجاد می‌کند،

 جدول ۳- اجزای واکنش PCR برای جفت آغازگرهای اختصاصی *M. javanica*

 Table 3- PCR reaction components for specific primer pairs of *M. javanica*

مواد مصرفی Consuming materials	مقدار مورد استفاده
PCR(10X) بافر	2.5µl
PCR buffer (10X)	
کلورید منیزیم 50mM (MgCl ₂)	0.75µl
Magnesium Chloride 50 mM (MgCl ₂)	
آغازگر رفت (10mM)	1µl
Forward Primer	
آغازگر برگشت (10mM)	1µl
Reverse Primer	
DNA الگو	1µl
DNA template	
آب مقطر استریل	18µl
Sterile distilled water	
DNTP 10mM	0.5µl
آنزیم Taq	0.25µl
Taq enzyme	
حجم نهایی	25µl
the final Volume	

بر اساس Tm شرکت سازنده، فرمول، دمای منابع و بهترین دمایی که در این تحقیق به آن دست یافتیم بهینه شد.

مخلوط واکنش درون یک تیوپ 0.2ml ریخته شد. برنامه پی‌سی‌آر برای هر جفت آغازگر بهینه گردید (جدول ۴). دمای اتصال بر اساس هر آغازگر به طور جداگانه بهینه‌سازی گردید که هر آغازگر

جدول ۴- برنامه پی‌سی‌آر برای جفت آغازگرها مختلف
Table 4- PCR program for different primer pairs

مرحله Stage	زمان Time	تعداد سیکل Number of cycles	دما Temperature
واسرشت اولیه Initial denaturation	۱۰ دقیقه 10 min	1	95
واسرشت Denaturation	۱ دقیقه 1 min	38	95
اتصال Annealing	۱ دقیقه 1 min	38	*
گسترش Extension	۱/۳۰ دقیقه 1.5 min	38	72
Final Extension	۱۵ دقیقه 15 min	1	72

* دمای اتصال برای هر جفت آغازگر که با ستاره مشخص شده است بر طبق دمای محاسبه شده و سپس بهینه گردیده است. الکتروفورز نمونه‌ها در ژل آگارز ۱٪ با ولتاژ ۷۵ و آمپر ۷۵ به مدت یک ساعت نیم الکتروفورز گردید و سپس در تانک حاوی اتادیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و به مدت یک دقیقه در آب شستشو داده شد. سپس در دستگاه ژل داکيومنت مدل GBOX قرار گرفت و عکس‌برداری گردید.

*The annealing temperature for each pair of primers marked with an asterisk is used according to the temperature calculated and then optimized. Electrophoresis of the samples was electrophoresed in 1% agarose gel with 75 volts and 75 amps for half an hour and then stained in a tank containing ethidium bromide for 10 minutes and washed in water for one minute. Then it was placed in GBOX document gel system and photographed.

نتایج و بحث

برای این منظور اندازه‌گیری خصوصیات میکرومتری با توجه به صفات مورد نیاز برای شناسایی گونه‌های مختلف این نماتدها از ۸ منطقه ماده‌های کامل و لارو سن دوم مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های بدست آمده در جدول ۶ تنظیم گردید. از اطلاعات این جدول می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های ماده‌ها بالغ و لارو سن دوم که در این مطالعه بررسی شدند می‌تواند متعلق به گونه *M. javanica* باشند که با نتایج مولکولی مطابقت دارد.

بهینه سازی استخراج DNA

در روش‌های توصیه شده سه گانه استخراج DNA مربوط به ژانگ، سیلوا و لیوا تنها با ۲۰ نماتد بالغ در آزمون پی‌سی‌آر قادر به ردیابی نماتد بودند. اما در روش‌های بهینه شده هم با تعداد ۱۰ نماتد بالغ و هم با تک نماتد بالغ و همچنین در مراحل مختلف رشدی با کمک تک کیسه تخم نماتد و تک لارو نماتد قادر به ردیابی بودند (جدول ۷). به منظور بهینه سازی استخراج DNA در روش‌های مورد استفاده تغییراتی به شرح زیر صورت پذیرفت. در روش ژانگ و همکاران (۱۸) به جای استفاده از ۵ میکرولیتر Proteinase K برای حذف پروتئین از ۵ میکرولیتر لیزوزیم استفاده شد. نتایج نشان دهنده

نتایج حاکی از این بود که تمامی نمونه‌ها از گونه *M. javanica* بود بجز نمونه B که از لحاظ مرفولوژیکی و مولکولی با آغازگرهای موجود شناسایی نشد. نتایج در جدول ۵ تنظیم شده است. نتایج حاصل از پی‌سی‌آر نمونه‌های مناطق مختلف روی نماتد ماده بالغ با جفت آغازگر Fjav/Rjav جهت ردیابی نماتد *M. javanica* و جفت آغازگر Mi-F/Mi-R جهت ردیابی نماتد *M. incognita* در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه شیراز با کد (B) با جفت آغازگرهای Fjav/Rjav و Mi-F/Mi-R نتایج منفی بود که در شکل ۱ و ۲ قابل مشاهده می‌باشد. نمونه B همچنین با جفت آغازگرهای دیگر که مربوط به گونه *M. incognita* بود آزمایش شد که نتایج منفی بود. این امکان وجود دارد که این نمونه یک گونه جدید از نماتد ریشه‌گرهی برای منطقه شیراز باشد. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد نتایج حاکی از این است که عامل نماتد ریشه‌گرهی در اکثر مناطق استان گونه *M. javanica* می‌باشد. در مورد جفت آغازگر Mi-F/Mi-R که قادر به ردیابی گونه *M. incognita* از نماتد ریشه‌گرهای می‌باشد هیچ بانندی در کل نمونه‌ها حاصل نگردید. همچنین در مطالعات مرفولوژی نمونه B شناسایی نشد.

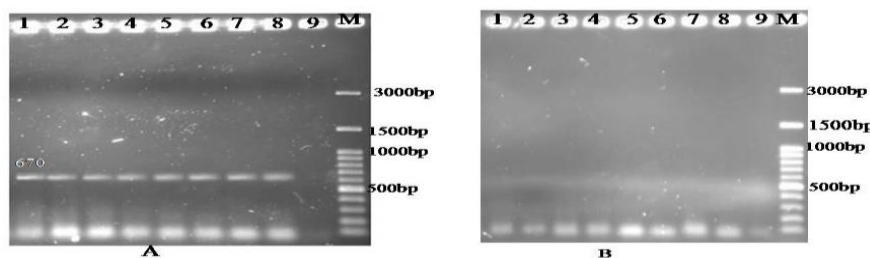
کار آمد بودن لیزوزیم در استخراج DNA بود. در روش سیلوا و همکاران (۱۷) نحوه خرد کردن نماتدها تغییر کرد. در روش لیو و همکاران (۱۰)، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر پیشنهادی در سه مرحله رشدی نماتد به ۱۶ میکرولیتر کاهش یافت از بافر استخراج که در روش لیو عبارت بود از 2.5 mM DTT, 1.25% Tween20, 0.025% gelatin, (125mM KCL, 25mM Tris HCL (pH

۳.75 mM MgCl₂) 8.3 که به جای این بافر استخراج بافری با فرمول-1% (V/V) β، (0.2M NaCl, 0.2M Tris-HCl (pH8)، استفاده گردید همچنین به جای ۸ میکرولیتر از بافر لیو میزان ۲۰ میکرولیتر از بافر جدید استفاده گردید.

جدول ۵- اطلاعات مربوط به کد نمونه، مناطق مختلف، تعداد نمونه و نتایج مرفولوژیکی و مولکولی با آغازگرهای مختلف *M. javanica* و *M. incognita*

Table 5- Information about sample code, different regions, number of samples and morphological and molecular results with different primers of *M. javanica* and *M. incognita*

کد نمونه Sample code	شهرستان County	منطقه نمونه برداري Sampled region	گلخانه Greenhouse	مزرعه Field	تعداد نمونه Number of samples	نتایج Results		
						مورفولوژیکی Morphological	آغازگرهای M.J M.J Primers	آغازگرهای M.I M.I Primers
R	نورآباد Nourabad	رستم Rostam	خیار Cucumber		3	<i>M. javanica</i>	+	-
K	داراب Darab	فسارود Fasaroud		خیار Cucumber	5	<i>M. javanica</i>	+	-
N	داراب Darab	فسارود Fasaroud		گوجه فرنگی Tomato	5	<i>M. javanica</i>	+	-
G	داراب Darab	فسارود Fasaroud		بادمجان Eggplant	5	<i>M. javanica</i>	+	-
J	داراب Darab	جنت شهر Janatshahr	خیار Cucumber		10	<i>M. javanica</i>	+	-
F	استهبان Estahban	ایج Ij	خیار و ریحان Cucumber and Basil		5	<i>M. javanica</i>	+	-
P	کوار Kavar	کوار Kavar		گوجه فرنگی Tomato	3	<i>M. javanica</i>	+	-
H	شیراز Shiraz	باجگاه Bajgah	گوجه فرنگی Tomato		2	<i>M. javanica</i>	+	-
B	شیراز Shiraz	منزل مسکونی House		بادمجان Eggplant	2	نا شناس Unknown	-	-



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی حاصل از نتایج پی‌سی‌آر

A: نماتدهای جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان فارس که همه آنها بجز نمونه شماره ۹ باند 670bp ایجاد نمودند (در این الکتروفورز جفت آغازگر Fjav/Rjav که مربوط به ماده کامل گونه *M. javanica* است استفاده شد)، B: نماتدهای جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان که هیچ یک باند 955bp نشان ندادند (در این الکتروفورز جفت آغازگر MI-F/MI-R که مربوط به گونه *M. incognita* است استفاده شد). کد نمونه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. M مارکر مولکولی شرکت سیناژن است.

Figure 1- Electrophoresis patterns of PCR products

A: Nematodes collected from different parts of Fars province, all of which formed 670bp band except for sample No. 9 (in this electrophoresis, Fjav / Rjav primer pair, which is related to the adult female of *M. javanica*, was used), B: Nematodes collected from different parts of the province that did not show any 955 bp band (MI-F / MI-R primer pair belonging to *M. incognita* species was used in this electrophoresis). The sample code is given in Table 2. M is a molecular marker of Sinagen Company.

جدول ۶- مشخصات مورفومتریک ماده‌های بالغ و لاروهای سن دوم در جمعیت‌های *M. javanica*
 Table 6- Morphometric characteristics of adult females and second instar larvae in *M. javanica* populations

مشخصات Characteristics	ماده‌ها (به میکرومتر) Females (in micrometers)	لاروهای سن دوم (به میکرومتر) Second instar larvae (in micrometers)
طول بدن Body length	690-964 (828.3)	395-420 (410.8)
عرض بدن Body width	350-530 (436)	9-11 (10.8)
طول استایلت Style length	15.5-18 (16)	10.5-13 (11.4)
ارتفاع گره استایلت Style knot height	2-3 (2.6)	1-1.6 (1.4)
عرض گره استایلت Style knot width	2-5 (4)	2.5-4 (2.2)
محل ریزش محتوای غده پشتی Valve of the dorsal gland	3-6 (4.6)	2.5-4 (3.2)
فاصله سر تا روزنه ترش‌چی Distance from head to the secretory orifice	42-47 (45)	-
حد فاصل انتهایی بالایی تا مرکز حباب میانی The distance from the top end to the center of the middle bubble	90-96 (93.2)	-
طول شکاف فرج The length of the vaginal cleft	18-30 (25)	-
فاصله فرج تا منخرج The distance from the vulva to the anus	12-32 (17.5)	-
فاصله بین دو فازمید The distance between the two phasmids	20-30 (25)	-
طول دم Tail length	-	46-57 (52.4)
طول بخش شفاف انتهایی دم The length of the transparent part of the tail end	-	11-16 (13)
طول بدن/طول دم Body length / tail length	-	7-9 (8.3)

لیوآ با تعداد ۱۰ عدد نماتد و تک فرد از مراحل مختلف جواب مثبت حاصل شده است که می‌توان این روش را به عنوان بهترین روش استخراج قلمداد نمود.

بهینه‌سازی آغازگرها در تشخیص نماتد ریشه‌گرهی

با توجه به اینکه در اکثر مناطق نماتد ردیابی شده *M. javanica* بوده است بنابراین آغازگرهای مربوط به این گونه که در مناطق مختلف مورد استفاده قرار گرفته بود (جدول ۷) استفاده شد. بدین منظور در بین سه جفت آغازگر مورد استفاده آغازگر Fjav/Rjav که یک قطعه 670bp و Mj-MF/Mj-MR که یک قطعه 517bp ایجاد

همچنین با جایگزینی لیزوزیم به میزان ۴ میکرولیتر (۲۰ میلی گرم لیزوزیم در ۱۰ میلی مولار Tris-HCL با pH=8) به جای پروتئیناز K نتایج مطلوب‌تری حاصل شد. همچنین به منظور خرد کردن نماتدها به جای دمای -70°C درجه سانتی‌گراد از دمای -196°C درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در ادامه همانند روش لیوآ سیکل دمای 65°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در حمام بنماری و 10°C دقیقه در دمای 95°C درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه هات پلیت استفاده گردید کارآیی روش‌های استخراج در ردیابی مولکولی نماتد در جدول ۷ تنظیم شده است. همان طور که در جدول ۷ مشاهده می‌گردد در روش بهینه شده

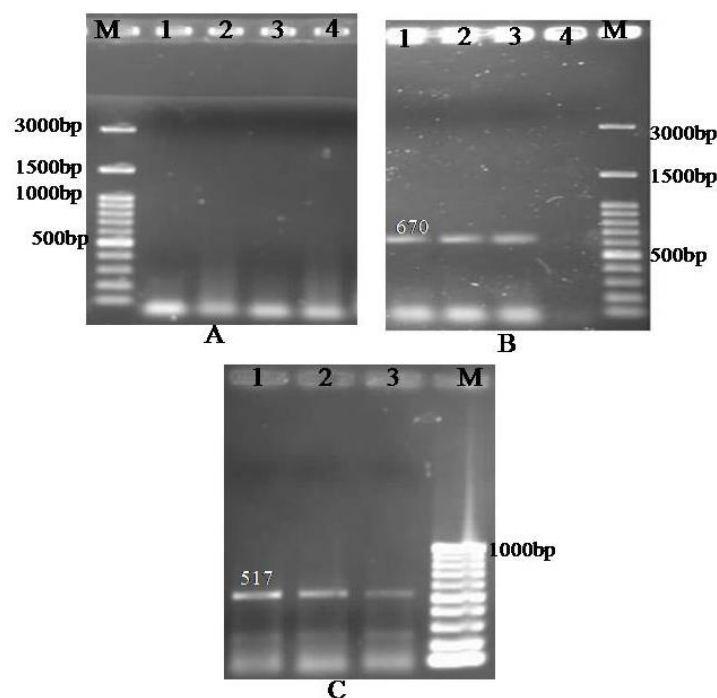
قطعه مورد نظر را ایجاد نکرد. مقایسه توان آغازگرها در ردیابی نماتد ریشه‌گره‌ای گونه *M. javanica* در جدول ۸ تنظیم گردیده است. همچنین در شکل ۲ نتایج آزمون پی‌سی‌آر آورده شده است.

می‌نمود عملکرد بهتری داشتند این آغازگرها با روش‌های مختلف استخراج و با مراحل رشدی و در جمعیت‌های مختلف و تک فرد نماتد آزمایش شد که نتایج مطلوبی بدست آمد. آغازگر Mj-DF/Mj-DR که یک قطعه 1650bp می‌نمود در مرحله رشدی تک لارو سن دوم

جدول ۷- مقایسه روش‌های بهینه استخراج در ردیابی مولکولی نماتد ریشه‌گره‌ای

Table 7- Comparison of optimal extraction methods in molecular tracing of root knot nematode

روش‌های استخراج Extraction methods	ماده کامل Adult female	کیسه تخم Egg sac	لارو سن دوم Larvae of the second instar
روش بهینه شده ژانگ و همکاران (۱۹۹۸) Optimized method of Zhang et al. (1998)	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individuals	۱۰ عدد 10 individuals
روش بهینه شده سیلوا و همکاران (۲۰۰۰) Optimized method of Silva et al. (2000)	۱ عدد 1 individuals	۱۰ عدد 10 individuals	۱۰ عدد 10 individuals
روش بهینه شده لیوا و همکاران (۲۰۰۱) Optimized method of Liwa et al. (2001)	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individuals	۱۰ عدد 10 individuals



شکل ۲- نقش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر

A: با جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR باند حاصله 1650bp، چاهک ۱ تک لارو سن دوم، چاهک ۲ تک ماده بالغ، چاهک ۳ تک کیسه تخم، چاهک ۴: کنترل منفی، B: با جفت آغازگر Fjav/Rjav باند حاصله 670bp، چاهک ۱: تک لارو سن دوم، چاهک ۲: تک ماده بالغ، چاهک ۳: تک کیسه تخم، چاهک ۴: کنترل منفی C: با جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR باند حاصله 517bp، چاهک ۱ تک لارو سن دوم، چاهک ۲: تک ماده بالغ، چاهک ۳: تک کیسه تخم، M: مارکر مولکولی شرکت سیناژن 100bp - 3000bp

Figure 2- Electrophoresis patterns of PCR products

A: using Mj-DF / Mj-DR primer pair formed 1650bp band, well 1: single second instar larvae, well 2: single adult female, well 3: single egg sac and well 4: negative control, B: using Fjav / Rjav primer pair formed 670bp band, well 1: single second instar larvae, well 2: single adult female, well 3: single egg sac and well 4: negative control C: using Mj-MF / Mj-MR primer pair formed 517bp band, well 1: single second instar larvae, Well 2: single adult female, Well 3: single egg sac, M: molecular marker of Sinagen 100bp - 3000bp

جدول ۸- مقایسه توان آغازگرها در ردیابی *M. javanica*
Table 8. Comparison of primer power in tracking *M. javanica*

نام آغازگر Primer name	ماده کامل Adult female	Egg sac	کیسه تخم Second instar larvae	لارو سن دوم
	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individual	۱۰ عدد 10 individuals	۱ عدد 1 individual
Mj-DF/R	+	+	+	-
Fjav/Rjav	+	+	+	+
Mj-MF/R	+	+	+	+
Mi-F/R	-	-	-	-

+ : آغازگرها قادر به تکثیر هستند

+: Primers are able to reproduce

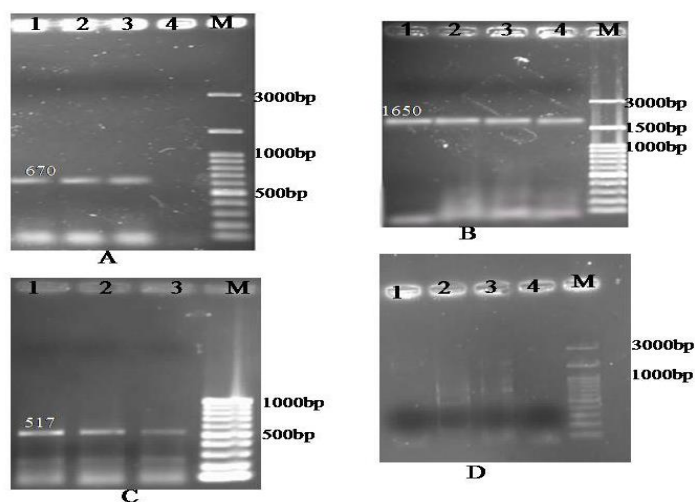
- : آغازگرها قادر به تکثیر نیستند

-: Primers are not able to reproduce

بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها

بدین منظور در این تحقیق از دماهای مختلف و با سیکل‌های مختلف برای هر آغازگر با تعداد ۱۰ نماتد ماده بالغ استفاده شد که دمای بهینه شده مربوط به هر آغازگر در جدول ۷ آورده شده است. تعداد سیکل بهینه هر کدام ۳۸ سیکل بدست آمد (جدول ۴).

همان طور که در جدول ۸ مشاهده می‌گردد جفت آغازگر Mj-DF/R قادر به ردیابی تک لارو سن دوم نبوده است. جفت آغازگر Mi-F/R مربوط به شناسایی گونه *M. incognita* است در تمام موارد منفی ارزیابی گردید. این نشان از خالص بودن جمعیت‌های نماتد مورد استفاده می‌باشد.



شکل ۳- نقش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر

A: جفت آغازگر Fjav/Rjav با دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد B: جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد C: جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد D: چاهک یک: جفت آغازگر Mj-DF/Mj-DR با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، چاهک دو: جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، چاهک سه: جفت آغازگر Fjav/Rjav با دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، چاهک چهار: کنترل منفی.

Figure 3- Electrophoresis patterns of PCR products

A: Fjav / Rjav primer pair at 54 ° C B: Mj-DF / Mj-DR primer pair at 50 ° C, C: Mj-MF / Mj-MR primer pair at 56 ° C and D: Well 1, Mj-DF / Mj-DR primer pair at 53 ° C, well 2: Mj-MF / Mj-MR primer pair at 53 ° C, well 3: Fjav / Rjav primer pair at 53 ° C and well 4: negative control

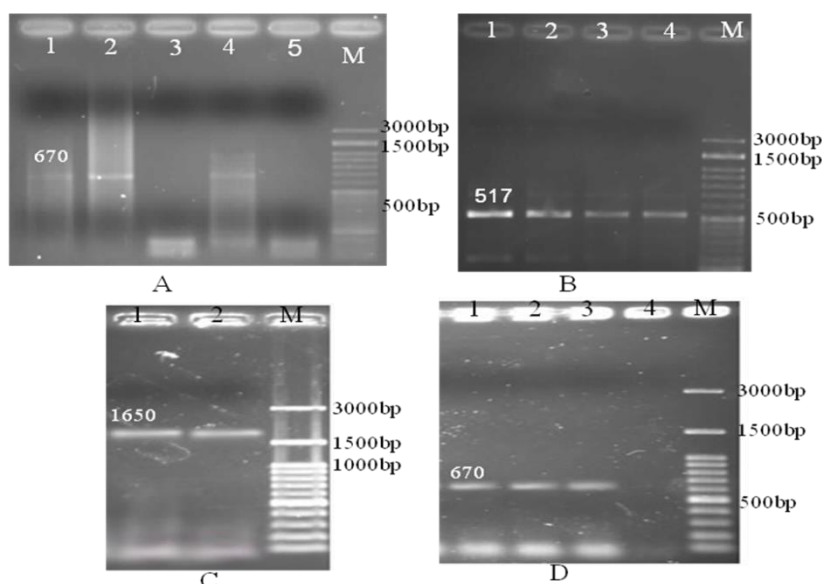
جدول ۹- دمای بهینه شده اتصال هر آغازگر

Table 9- Optimized annealing temperature of each primer		
نام جفت آغازگر	دمای بهینه‌سازی شده	اندازه باند مورد انتظار
Name of the primer pair	Optimized temperature	Expected band size
Fjav/Rjav	54	670bp
Mj-DF/Mj-DR	50	1650bp
Mj-MF/Mj-MR	56	517bp
MI-F/MIR	55	955bp

واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد، نتایج نشان داد که این میزان از مواد ذکر شده برای هر سه جفت آغازگر کار آمد بود (شکل ۴). در مورد لارو سن دوم مقدار DNA الگو استخراجی به روش لیو و همکاران (۱۰) به ۴ میکرولیتر و $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار به ۱/۵ میکرولیتر افزایش یافت که برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری تنظیم گردید و برای هر سه جفت آغازگر کار آمد بود (شکل ۵).

بهینه‌سازی اجزای پی‌سی‌آر

به منظور بهینه‌سازی اجزای پی‌سی‌آر از تغییر میزان DNA الگو و تغییر غلظت $MgCl_2$ در روش‌های مختلف استخراج DNA و مراحل مختلف رشدی نماتد با آغازگرهای مختلف نماتد ریشه‌گره‌ای گونه *M. javanica* استفاده شد که در روش استخراج از ماده کامل و کیسه تخم با استفاده از هر سه روش استخراج برای پی‌سی‌آر از ۲ میکرولیتر DNA الگو و یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار در یک



شکل ۴- نقوش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر با افزودن میزان $MgCl_2$ از ۰/۷۵ μ به ۱ μ و افزایش DNA الگو از ۱ μ به ۲ μ

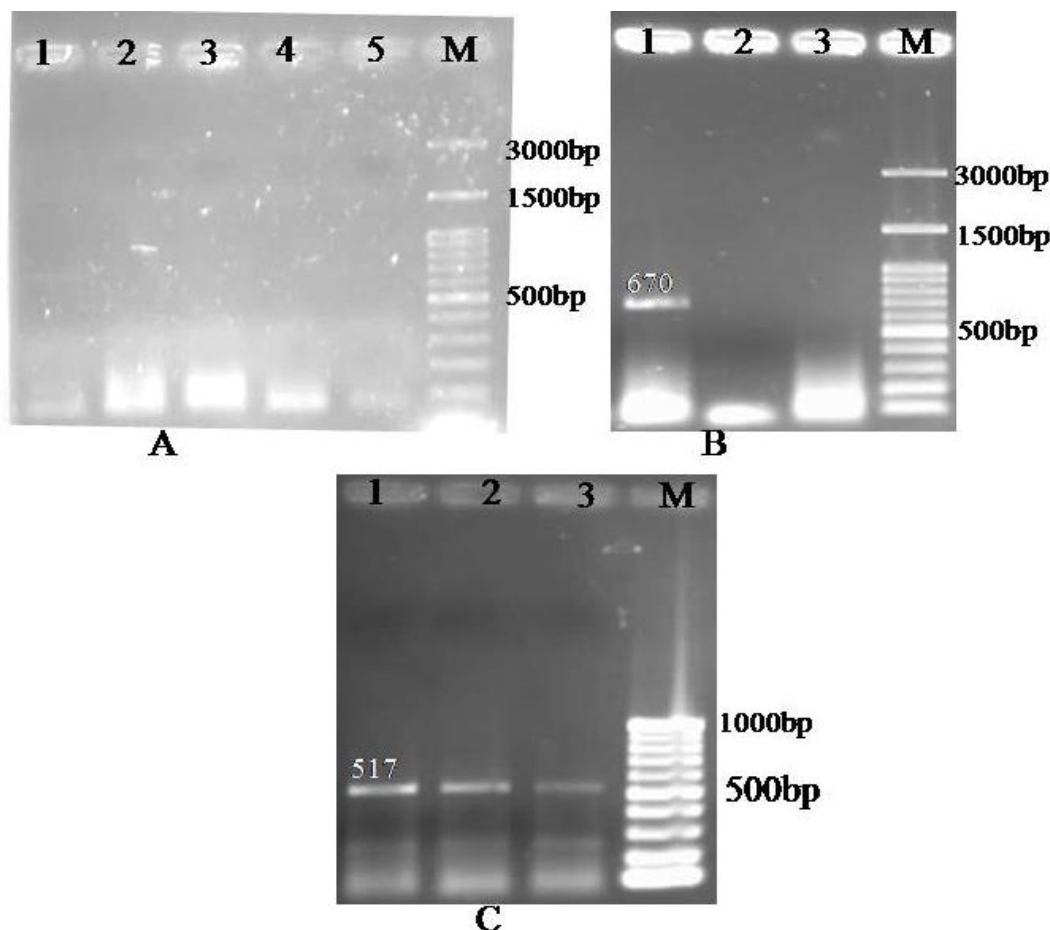
A: چاهک ۱ و ۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش سیلوا و همکاران (۲۰۰۰)، چاهک ۳ کنترل منفی، چاهک ۴ و ۵ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش ژانگ و همکاران (۱۹۹۸) با جفت آغازگر Fjav و Rjav، باند 670bp با استفاده از ۰/۷۵ μ $MgCl_2$ و میزان ۱ μ DNA الگو، B: چاهک ۱ و ۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش سیلوا، چاهک ۳ و ۴ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش ژانگ با جفت آغازگر Mj-MF و Mj-MR با استفاده از میزان ۱ μ $MgCl_2$ و میزان ۲ μ DNA الگو، C: چاهک ۱ و ۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم استخراج به روش سیلوا با جفت آغازگر Mj-DF/R با استفاده از میزان ۱ μ $MgCl_2$ و میزان ۲ μ DNA الگو، D: چاهک ۱ و ۲ تعداد ۱۰ کیسه تخم، چاهک ۳: ماده بالغ، چاهک ۴: لارو سن دوم، روش استخراج سیلوا و چاهک ۵: کنترل منفی، با جفت آغازگر Fjav و Rjav باند 670bp با استفاده از میزان ۱ μ $MgCl_2$ و میزان ۲ μ DNA الگو و M: مارکر مولکولی شرکت سیناژن 100bp-3000bp.

Figure 4- Electrophoresis patterns of PCR products while increasing the amount of $MgCl_2$ from 0.75 μ to 1 μ and increasing the template DNA from 1 μ to 2 μ .

A: Wells 1 and 2: 10 egg sacs extracted by Silva et al. (2000), wells 3 negative control, wells 4 and 5: 10 egg sacs extracted by Zhang et al. (1998) with Fjav and Rjav primers, 670bp band formed by using 0.75 μ $MgCl_2$ and 1 μ template DNA, B: wells 1 and 2, 10 egg sacs extracted by Silva method, wells 3 and 4, 10 egg sacs extracted by Zhang method with Mj-MF and Mj-MR primers, 517 bp band formed by using 1 μ $MgCl_2$ and 2 μ template DNA, C: wells 1 and 2 includes 10 egg sacs extracted by Silva method with Mj-DF / R primer pair, 1650bp band formed using 1 μ $MgCl_2$ and 2 μ template DNA, D: well 1: 10 egg sacs, well 2: 10 adult females, well 3: 10 Second instar larvae extracted by Silva method, well 4: negative control, with Fjav and Rjav primer pairs, 670bp band formed using 1 μ $MgCl_2$ and 2 μ template DNA, and M is molecular marker of Sinagen 100bp-3000bp.

مواردی عدم ردیابی نماتد گردیده است.

همانطور که در شکل ۴- A مشاهده می‌گردد، عدم افزایش میزان $MgCl_2$ و DNA الگو سبب ایجاد باندهای ضعیف تر و در



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی حاصل از پی‌سی‌آر با افزودن میزان $MgCl_2$ از 0.75μ به 1.5μ و افزایش DNA الگو از 1μ به 2μ و 4μ : A: هر ۵ چاهک DNA استخراج شده از تک لارو سن دوم باروش لیوا و همکاران (۲۰۰۱) با کمک جفت آغازگر Fjav/Rjav با استفاده از میزان $1/5$ میکرو لیتر $50 MgCl_2$ میلی‌مولار و ۲ میکرو لیتر DNA الگو B: چاهک ۱ تک لارو سن دوم روش استخراج لیوا با جفت آغازگر Fjav/Rjav با $1/5$ میکرو لیتر $50 MgCl_2$ میلی‌مولار و ۴ میکرو لیتر DNA الگو، C: ۳ چاهک تک لاروسن دوم روش استخراج لیوا با جفت آغازگر Mj-MF/Mj-MR517bp که غلظت ۴ میکرو لیتر DNA الگو و $1/5$ میکرو لیتر $50 MgCl_2$ میلی‌مولار استفاده شده است.

Figure 5- Electrophoresis patterns of PCR products while increasing the amount of $MgCl_2$ from 0.75μ to 1.5μ and increasing the template DNA from 1μ to 2μ and 4μ

A: All 5 wells including DNA extracted from the second-instar larvae based on Liao et al. (2001) using Fjav / Rjav primer pair and applying 1.5μ of $50 mM MgCl_2$ and 2μ of template DNA, B: well 1 includes single second instar larvae by Liao extraction method with Fjav / Rjav primer pair applying 1.5μ of $250 mM MgCl_2$ and 4μ of template DNA, C: 3 wells including single second instar larvae extracted based on Liao Method with Mj-MF / Mj-MR primer pair using 4μ of template DNA and 1.5μ of $50 mM MgCl_2$.

ریشه گرهی در اکثر مناطق نمونه‌برداری شده استان از گونه *M. javanica* می‌باشد. برای تایید شناسایی مورفولوژیکی، از آغازگرهای اختصاصی این گونه که توسط زیج‌لسترا و همکاران (۲۰) و بر اساس روش اسکار طراحی شده است استفاده شد. نتایج نشان داد در تمام مراحل رشدی براساس جمعیت و تک فرد، باند اختصاصی ۶۷۰ جفت بازی تولید می‌شود. آغازگر اختصاصی که توسط دونگ و همکاران (۴)

همانطور در شکل ۵ مشاهده می‌گردد با افزودن میزان $MgCl_2$ و DNA الگو و روش پهبینه شده استخراج لیوا و همکاران (۱۰) قادر به ردیابی کوچکترین واحد نماتد یعنی تک لارو آن گردیده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی نشان داد نماتد

که شناسایی گونه *M. javanica* بر اساس خصوصیات شبکه کوتیکولی انتهایی بدن و مورفومتریکی لاروهای سن دوم می‌تواند مفید و کار آمد باشد و برای تایید شناسایی مولکولی لازم می‌باشد. در این تحقیق که اجزای واکنش پی‌سی‌آر نسبت به روش استخراج DNA تغییر نمود و بهترین میزان موادی که در یک میکس پی‌سی‌آر استفاده شد بهینه گردید، که برای روش‌های بهینه شده استخراج ژانگ و همکاران (۱۸) و سیلوا و همکاران (۱۷) در تمام مراحل رشدی و در روش لیوآ و همکاران (۱۰) در مرحله رشدی ماده کامل و کیسه تخم صدق می‌کند. در مورد لارو سن دوم به روش لیوآ و همکاران (۱۰) غلظت $MgCl_2$ و مقدار DNA الگو افزایش یافت و از مقدار آب موجود در میکس کاسته شد. لذا می‌توان جهت شناسایی گونه *M. javanica* در کنار روش‌های ریخت شناسی که مشکل، وقت گیر و نیازمند مهارت و توانایی زیاد می‌باشد از روش‌های استخراج DNA و آغازگرهای اختصاصی و مواردی که در این تحقیق بهینه گردید استفاده کرد. لذا در مورد نمونه B که متعلق به شهر شیراز می‌باشد جفت آغازگرهای گونه *M. javanici* و جفت آغازگر گونه *M. incognita* نتوانستند آن را ردیابی کنند جای تحقیق بیشتر دارد.

بر اساس روش اسکار طراحی کرده‌اند نیز بررسی شد که نتایج نشان داد تمام مراحل رشدی نماتد، جمعیت، تک ماده بالغ و تک کیسه تخم باند اختصاصی ۱۶۵۰ جفت بازی تولید می‌کند. این آغازگر بر اساس تک لارو سن دوم نتوانست نماتد را ردیابی کند. بررسی‌ها در زمینه بهینه‌سازی روش‌های استخراج نشان داد استفاده از لیزوزم بافر به جای *Protenase K* بسیار کارآمد می‌باشد. نتایج نشان داد بهترین روش استخراج مخصوصا در مورد تک فرد نماتد در مراحل لارو سن دوم، تک ماده بالغ و تک کیسه تخم روش لیوآ و همکاران (۱۰) است. این می‌تواند بخاطر استفاده از سیکل دمایی در استخراج DNA باشد که نسبت به روش‌های دیگر قابل اطمینان‌تر است. در مورد دمای اتصال آغازگرها در محدوده ۴۸ تا ۶۴ درجه سانتی‌گراد امتحان شد که بهترین دما برای جفت آغازگر *Rjav* و *Fjav* ۵۴ درجه سانتی‌گراد بود. بهترین دما برای جفت آغازگر *Mj-MR* و *Mj-MF* ۵۶ درجه سانتی‌گراد و بهترین دما برای جفت آغازگر *Mj-DF* و *Mj-DR* ۵۰ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. آغازگر اختصاصی طراحی شده توسط منگ و همکاران (۱۳) بر اساس روش اسکار قادر به شناسایی نماتد در تمام مراحل رشدی آن و براساس جمعیت و تک فرد نماتد باند اختصاصی ۵۱۷ جفت بازی تولید نمود. این نتایج نشان می‌دهد

منابع

- Adam M.A.M., Phillips M.A., and Blok V.C. 2005. Identification of *Meloidogyne* spp. from North East Libya and comparison of their inter and intra-specific genetic variation using RAPDs. *Nematology* 7(4): 599-609.
- Askarian H., Sharif Nabi A., Mehdikhani Moghaddam E., and Akhavan A. 2009. Identification of *Meloidogyne javanica* species using morphological and morphometric properties and species specific primers in Kerman province. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 10(47): 279-289.
- Decraemer W., and Hunt D.J. 2006. Structure and Classification. In: *Plant nematology*. Perry, N. R, and Moens, M. (ed.). CABI International. pp. 4-32.
- Dong K., Dean R.A., Fortnum B.A., and Lewis S.A. 2001. Development of PCR primer to identify species of root knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. *Nematropica* 31: 273-282.
- Esbenshade P.R., and Triantaphyllow A.C. 1985. Use of enzyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 17: 6-20.
- Fadavi Khalajloo Gh., Mehdikhani Moghaddam E., and Rouhani H. 2014. Intra-species genetic diversity of different populations of *Meloidogyne javanica* in tomato fields of North Khorasan province using RAPD-PCR marker. *Journal of Plant Protection* 6(1): 55-70.
- Fargette M., Lollier V., Philips M., Blok V., and Frutos R. 2005. AFLP analysis of the genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, major agricultural pests. *Genetics* 328: 455-462.
- Gasser R.B. 2001. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variability using PCR approaches. *Parasitic Nematodes Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*. CAB international, pp 53-82.
- Holterman M., van der Wurff A., van den Elsen S., van Megen H., Bongers T., Holovachov O., and Helder J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23(9): 1792-1800.
- Liao J., Yang W., Feng Z., and Karssen G. 2005. Description of *Meloidogyne panyuensis* sp. n. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitic on peanut. *Russian Journal of Nematology* 13(2): 107-114.
- Mehdikhani Moghaddam E., Kheiri A., and Mohammadi M. 2006. Protein motifs of different populations of two species, *M. javanica* and *M. incognita* in Iran by the SDS-PAGE method. 17th Iranian Congress of Plant Protection, p. 489. (In Persian with English abstract)
- Mehdikhani Moghaddam E., Kheiri A., and Mohammadi M. 2006. Molecular comparison of populations of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* in Iran by PCR-RFLP method. *Journal of Water and Soil*

- Science 10(4): 405-410.
- 13- Meng Q.P., Long H., and Xu J.H. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica 34(3): 204-210.
- 14- Moens M., Perry R.N., and Starr J.L. 2009. Meloidogyne species—a diverse group of novel and important plant parasites. Root-knot nematodes, p 483.
- 15- Mokaram Hesar A., Mehdikhani Moghaddam E., and Tanha Maafi Z. 2010. Morphological and genetic variation among different populations of *M. javanica* on different hosts in fields of Khorasan Razavi province. 19th Iranian Plant Protection Congress, p. 603.
- 16- Shokouhi A., Mirzaei M., and Amini M. 2012. Molecular investigation of root knot nematode, *M. javanica*, from Kerman using ribosomal DNA ITS sequencing. 20th Iranian Congress of Plant Protection, p 654. (In Persian with English abstract)
- 17- Silva A.T., Peena J.C., Goulart L.R., Santos M.A., and Arantes N.E. 2000. Genetic variability among and within races of *Heterodera glycines* Ichinohe assessed by RAPD markers. Genetics and Molecular Biology 23(2): 323-329.
- 18- Zhang Y.P., Uymoto J.K., and Kirkpatrick B.C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. Journal of Virological Methods 71: 45-50.
- 19- Zijlstra C. 2000. Identificatin of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology 106: 238-290.
- 20- Zijlstra C., Donkers-Venne D.T.H.M., and Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterize amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology 2: 847-853.



Improving Molecular Diagnosis of Root Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*)

R. Keshavarz Kuhjerdi^{1*} - A. Pakniat Jahromi² - M. Honarvar³ - M. Pakniat Jahromi⁴

Received: 28-12-2019

Accepted: 24-02-2020

Introduction: Root-knot nematodes are the most common and destructive plant-parasitic nematode group worldwide and adversely influence many economically important crops, ornamental plants, and fruit trees. They are obligate parasites of the roots of many plant species, including herbaceous and woody plants. Symptoms associated with Root-knot nematodes infection include root galls, shoot chlorosis, stunted growth, nutrient deficiencies, and secondary infections by other pathogens. A high level of damage can lead to serious crop loss. Due to the considerable morphological similarity between species of *Meloidogyne* and high intraspecies variation, it is difficult to differentiate species from each other based on the morphology of their perineal patterns alone. Molecular techniques are used for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of species. Polymerase chain reaction (PCR) is a method widely used to rapidly make millions to billions of copies of a specific DNA sample, allowing scientists to take a very small sample of DNA and amplify it to a large enough amount to study in detail. The objective of this study was to improve molecular diagnosis of root knot nematode in vegetable crops in Fars province to enhance our diagnostic knowledge and allow species identification of root knot nematode through PCR by species-specific primers.

Materials and Methods: In 2012, in order to identify the different stages of growth of *Meloidogyne javanica* species, 40 soil and root samples infected with the nematode were collected from different cultivation sites of Fars province (Darab, Jannatshahr, Estahban, Nurabad, Qavar, and Shiraz). The roots of plants were flushed with water to remove soil and then washed with soap for 10 min. To obtain the pure population of each sample, a large egg bag containing more eggs was selected. The isolated egg bag was placed adjacent to Rutgers tomato transplant. After 70-60 days, the roots were removed from the pot and prepared to identify species of the nematode. After purification of nematodes using single egg method on Rutgers tomato root and diagnosis of them on the morphological basis, the DNA was extracted at different growth stage of nematode using three optimized methods of Zhang, 1998, Silva, 2000, and Liao, 2005. PCR products (5 µl) were separated on standard agarose gels. A DNA ladder (Sinagen 100bp-3000bp) was used to determine the molecular sizes of the bands. Band patterns were photographed under UV light using the GBOX document gel system. The PCR was optimized by varying the reaction components and cycling conditions. The annealing temperature was optimized separately for each primer based on the manufacturer's T_m and formula. The roots were flushed with water to remove soil and then washed with a 0.52% NaClO soap for 10 min. Individual root knots were obtained after three to five washes. Furthermore, DNA extraction was performed using four methods.

Results and Discussion: The root-knot nematodes were recovered from the vegetable crop soil samples. Species identification in this study was based on the PCR by species-specific primers. Specific primers of Fjav/Rjav, Mj-MF/Mj-MR and Mj-DF/Mj-DR could detect *M. javanica* with 670 bp, 517bp and 1650bp, respectively, proving their usefulness for PCR on root-knot nematodes. No band was detected using specific primer of *M. incognita* (MI-F/R primers) from the samples in PCR. During optimizing PCR method, it was revealed that the best annealing temperature is 54°C for Mj-MF and Mj-MR primers, 56°C for Mj-DF and Mj-DR primers, and 50°C and for Fjav and Rjav primers. Adding the DNA extracted template from 1µ to 2µ for single female and single egg cist and from 2µ to 4µ for single juvenile made the best result for detection of root-knot nematode based on PCR. Changing the MgCl₂ concentration from 1.5 mmol to 2 mmol in a 25µl PCR reaction made the best PCR result. The Liao optimized method was the best DNA extraction for monitoring *M. javanica*. Fjav/Rjav and Mj-MF/Mj-MR primers were the best primers in detecting *M. javanica*.

Conclusion: The results of this study showed a remarkable ability of DNA extraction methods, specific primers and the cases optimized in this study in identifying root knot nematode. Identifying *M. javanica* species

1- Former M.Sc. Student, Agricultural Engineering Horticultural Sciences, Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Estahban Branch, Islamic Azad University, Estahban, Iran

(* - Corresponding Author Email: rahman.keshavarz64@gmail.com)

2 and 4- Assistant Professors of Research, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Zarghan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Estahban Branch, Islamic Azad University, Estahban, Iran

based on morphological methods is time consuming and difficult, and requires high skills and also needs to be examined for a particular stage of nematode growth. In addition, identifying of this species based on biochemical methods is time consuming, affected by environmental conditions, requires relatively large amounts of living organism and a particular stage of the nematode's life cycle. Given these difficulties, DNA extraction methods, specific primers and the cases optimized in this study can be used to identify *M. javanica* species. However, as *M. javanica* and *M. incognita* primer pairs were not detected for a sample taken from Shiraz, more researches are needed to be carried out on this case.

Keywords: *M. javanica*, PCR optimizing, Root-knot nematode, Specific primers

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های ویروس کوتولگی سبزردهندوانه (WmCSV) استان

سیستان و بلوچستان بر اساس توالی ژن رمز کننده پروتئین پوششی

مجید جعفری^{۱*} - زهرا صادقی^۲ - سعید نصراله نژاد^۳ - احمد رضا شاهرخی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۴

چکیده

ویروس کوتولگی سبزردهندوانه (*Watermelon chlorotic stunt virus*, WmCSV) به جنس *Begomovirus* از خانواده *Geminiviridae* تعلق دارد که بیشترین تعداد گونه را در مقایسه با سایر جنس‌های آلوده‌کننده گیاهان در خانواده *Geminiviridae* دارد و از طریق سفید بالک منتقل می‌شود. به منظور شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی WmCSV در محصولات کدوپیان جنوب شرق کشور در سال‌های ۹۵ و ۹۶ بازدیدهایی از مزارع شهرستان‌های زابل، زهک، هامون، هیرمند، نیمروز، زاهدان، سراوان، ایرانشهر، نیک‌شهر، سرباز، کنارک و چابهار در استان سیستان و بلوچستان انجام گرفت و از محصولات مختلف کدوپیان شامل خربزه، طالبی، هندوانه، کدو مسمایی و حلوایی نمونه‌برداری شد. از گیاهان دارای نشانه‌های زردی رگبرگ، کوتولگی گیاه، سبزدی و پیسکی‌شدن برگ‌ها، بدشکلی شدید و کوچک شدن اندازه میوه نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و سپس استخراج دی‌ان‌ای کل گیاه انجام شد. جهت شناسایی WmCSV از آغازگرهای اختصاصی '5'-CP-Gem و '3'-CP-Gem شناسایی‌کننده جنس بگوموویروس در کدوپیان استفاده شد. محصولات پی سی آر مورد انتظار، به طول ۵۵۰ جفت باز از ژن رمز کننده پروتئین پوششی، مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی مربوط به ۱۶ نمونه از محصولات پی سی آر متعلق به مناطق مختلف استان آلودگی نمونه‌ها را به WmCSV تأیید کرد. آنالیز فیلوژنتیکی نتایج توالی‌یابی، در این پژوهش با برنامه MEGA 5، جدایه‌های WmCSV از استان سیستان و بلوچستان را در دو گروه مجزا تفکیک کرد. نتایج نشان داد که این گروه‌بندی ارتباطی با نوع میزبان و یا منطقه جغرافیایی نداشته و برخی جدایه‌های استان ارتباط نزدیکی با جدایه‌های کشورهای عمان و عربستان داشتند.

واژه‌های کلیدی: بگوموویروس، پروتئین پوششی، درخت فیلوژنتیکی، سیستان و بلوچستان، ویروس کوتولگی سبزردهندوانه

مقدمه

بیماری‌زای گیاهان است و دارای نه جنس است که ژنوم تمام آنها از نوع دی‌ان‌ای است. در میان جنس‌های خانواده *Geminiviridae*، جنس *Begomovirus*، بزرگ‌ترین جنس از ویروس‌های گیاهی از نظر تعداد گونه است که از نظر اقتصادی می‌توانند خسارات مهم و قابل توجهی به محصولات گیاهی وارد کنند. بگوموویروس‌ها دارای ژنومی یک بخشی و یا دو بخشی هستند. گونه‌هایی که ژنوم آنها دو بخشی است دارای دو قطعه دی‌ان‌ای تک‌لا و حلقوی به نام DNA-A و DNA-B هستند. هر دو قطعه دی‌ان‌ای به طور مستقل توسط پروتئین پوششی پوشیده می‌شوند. در شرایط طبیعی، جهت بیان پروتئین‌ها و ایجاد بیماری‌زایی به انتقال هر دو پیکره ویروسی توسط سفید بالک نیاز است. بگوموویروس‌هایی که دوی بخشی هستند هشت نوع پروتئین مختلف را رمزگذاری می‌کنند که پروتئین پوششی (Coat Protein, CP) توسط ژن AV1 روی DNA A رمزگذاری می‌شود (۱۷).

استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرقی ایران، به عنوان وسیع‌ترین استان کشور، بیش از ۱۱ درصد وسعت کشور را دربر می‌گیرد. سطح زیرکشت جالیز در ایران بالغ بر ۲۹۶ هزار هکتار و میزان تولید حدود ۸ میلیون تن برآورد گردیده است که از این مقدار، استان سیستان و بلوچستان با ۶/۶ درصد رتبه پنجم از میزان تولید محصولات جالیزی کشور را به خود اختصاص داده است (۲). اعضای خانواده کدوپیان حساسیت بالایی به بیماری‌های ویروسی دارند. خانواده *Geminiviridae* یکی از خانواده‌های مهم ویروسی

۱ و ۴- استادیاران گروه گیاهپزشکی، مجتمع آموزش عالی سراوان

(*)- نویسنده مسئول: (Email: majafari59@yahoo.com)

۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار،

گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.85959

DNA-A و DNA-B از جدایه‌های مختلف WmCSV نشان داده است که جدایه‌های ایرانی به صورت خوشه‌ای مجزا تفکیک می‌شوند که با ارزش بوت استرپ بالایی حمایت می‌شوند. نتایج مشابه از مقایسه بخش‌هایی از توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های ایرانی و سایر نقاط دنیا به دست آمده است (۱۸). آنالیز توالی این ویروس نشان داده است که جدایه‌های ایران، عمان و عربستان سعودی در یک کلاستر قرار می‌گیرند درحالی‌که جدایه‌های اسرائیل، اردن، لبنان، فلسطین، کرانه غربی در یک کلاستر مجزا قرار می‌گیرند. همچنین جدایه‌های ایران و عربستان سعودی نسبت به مناطق دیگر دارای بیشترین تنوع هستند (۱۱).

مواد و روش‌ها

بازدید و نمونه‌برداری

به منظور شناسایی ویروس کوتولگی سبزد هندوانه از مزارع مختلف محصولات هندوانه، خربزه، طالبی، کدو و خیار از شهرستان‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان مانند زابل، هامون، زاهدان، نیمروز، سراوان، ایرانشهر، سرباز، نیکشهر، کنارک، چابهار بازدیدهایی در طول سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ انجام شد (شکل ۱) و از گیاهان دارای نشانه‌های مشکوک به این ویروس نمونه‌برداری شد. سپس نمونه‌ها جهت استخراج دی‌ان‌ای به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج دی‌ان‌ای و واکنش زنجیره‌ای پلیمران

استخراج دی‌ان‌ای از نمونه‌ها به روش دلاپورتا و همکاران انجام شد (۸). سپس دی‌ان‌ای استخراجی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی '3'-Gem-CP-V و '5'-Gem-CP-V، تکثیرکننده بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی گونه‌های متعلق به جنس بگوموویروس در آزمون پی‌سی‌آر مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). برنامه پی‌سی‌آر طبق جدول ۱ جهت تکثیر قطعه دی‌ان‌ای مورد انتظار (۵۵۰ جفت بازی) برای دستگاه ترموسایکلر تعریف گردید.

از میان ویروس‌های آلوده‌کننده گیاهی، ویروس کوتولگی سبزد هندوانه (WmCSV) به عنوان یکی از عوامل اصلی محدودکننده تولید کدویان از آسیای میانه و آفریقای شمالی گزارش شده است. این ویروس اولین بار از یمن و سپس سودان شناسایی و گزارش شد (۷، ۱۵، ۲۱). این ویروس از کشورهای عربستان سعودی و همچنین لبنان، اردن، سودان، ایران و یمن، فلسطین، فلسطین اشغالی، شناسایی شده است و در این کشورها تهدیدی جدی برای کدویان می‌باشد (۳، ۴، ۱۵، ۱۹ و ۲۳).

در سال ۱۹۹۸ آلودگی شدیدی از ارقام خربزه و هندوانه به یک بیماری ویروسی در ارتباط با سفید بالک از جنوب ایران گزارش شد که نشانه‌های آن مشابه با نشانه‌های ویروس کوتولگی سبزد هندوانه بود که سپس با روش‌های بیولوژیکی و مولکولی شناسایی شد (۸ و ۱۶). گیاهان هندوانه آلوده به این ویروس نشانه‌هایی مانند موزاییک، زردی رگبرگ، پیسکی‌شدن و سبزدی، کوتولگی، بدشکلی و کاهش اندازه میوه را نشان می‌دهند (۵ و ۷). ویروس کوتولگی سبزد هندوانه تاکنون از مناطق جنوب، جنوب شرق و شمال کشور شامل استان‌های بوشهر، فارس، گیلان، هرمزگان، کرمان گزارش شده است (۵، ۱۱، ۱۲ و ۱۳).

این ویروس از میزبان‌های مختلفی مانند هندوانه، خربزه، خیار، کدو، هندوانه ابوچهل و تعدادی از علف‌های هرز شناسایی شده است (۱، ۵، ۹، ۱۶ و ۲۰).

همچنین چندین گونه علف هرز متعلق به خانواده‌های Boraginaceae، Brassicaceae، Chenopodiaceae، Euphorbiaceae، Fabaceae، Malvaceae، Myrsinaceae و Papilionaceae در شرایط طبیعی می‌توانند توسط این ویروس آلوده شوند. در زمینه اپیدمیولوژی ویروس، این علف‌های هرز می‌توانند به عنوان میزبان‌های تناوبی ویروس کوتولگی سبزد هندوانه در پراکنش آن اهمیت داشته باشند. همچنین بسیاری از این علف‌های هرز در صورت آلودگی با ویروس نشانه‌های خاصی را نشان نمی‌دهند (۹ و ۱۳).

بررسی‌های فیلوژنتیکی توالی‌های کامل نوکلئوتیدی قطعات

جدول ۱- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمران جهت تکثیر ژن رمزکننده پروتئین پوششی WmCSV
Table 1- Polymerase chain reaction program to replicate WmCSV coat protein gene

زمان	دمای چرخه	مرحله	تعداد چرخه
Times	Cycle temperature	Step	Cycle numbers
5 min	95 °C	Primery Denaturation	1
1min	92 °C	Denaturation	
30 s	55 °C	Annealing	35
45 s	72 °C	Extention	
10 min	72 °C	Final Extention	1



شکل ۱- نقشه جغرافیایی شهرستان‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان

(مناطق نمونه‌برداری شده با دایره مشخص شده است).

Figure 1- Geography map of cities in Sistan and Baluchestan province (Sampling area are marked by circles).

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی

محصول پی‌سی‌آر مورد انتظار، مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج تعیین توالی دی‌ان‌ای تکثیر یافته حاصل از پی‌سی‌آر، توسط بلاست نوکلئوتیدی در NCBI GenBank مورد بررسی قرار گرفت. سپس توالی‌ها در NCBI GenBank ثبت شدند. توالی نوکلئوتیدی جهت آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه MEGA5 مورد تحلیل و بررسی قرار گرفتند. در آنالیز فیلوژنتیکی از توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده مربوط به ژن پروتئین پوششی جدایه‌های به دست آمده حاصل از این پژوهش (جدایه‌های ردیف‌های ۱-۱۶ در جدول ۲) و برخی از جدایه‌های ایرانی ثبت شده از سایر استان‌های کشور (جدایه‌های ردیف‌های ۱۷-۳۱ در جدول ۲) و همچنین جدایه‌های ثبت شده سایر کشورها (ردیف‌های ۳۲-۵۵ در جدول ۲) در NCBI GenBank استفاده شد. جهت رسم درخت فیلوژنتیکی از

روش Neighbor-joining و مدل Jukes Cantor با بوت استرپ ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. شاخه‌هایی با بوت استرپ کمتر از ۴۰ درصد ادغام شدند. از گونه *African cassava mosaic virus* (ACMV) با رس شمار J02057 به عنوان عضو خارج از گروه استفاده شد. همچنین درصد شباهت جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان با یکدیگر و همچنین با سایر جدایه‌های مناطق دیگر کشور با برنامه MegAlign مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است جدایه‌های ثبت شده مربوط به این ویروس در GenBank محدود به کشورهای خاورمیانه می‌باشد و توالی‌هایی از کشورهای همسایه شرق ایران مانند پاکستان و هند که دارای شرایط آب و هوایی نظیر جنوب شرق کشور می‌باشند جهت درک بهتری از روابط فیلوژنتیکی برای این ویروس در دست نیست.

جدول ۲- مشخصات توالی‌های ویروس کوتولگی سبزد هندوانه که از GenBank دریافت شدند

Table 2- Properties of Watermelon chlorotic stunt virus sequences retrieved from GenBank

سال Year	میزبان Host	کشور Country	رس شماره Accession number	جدایه Isolate	ردیف Row
2015	<i>Cucumis melo</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Zabol)	MH220206	Zb	1
2016	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupo</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Nikshahr)	MH244447	NIC	2
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Nikshahr)	MH244448	NIC2	3
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Sarbaz)	MH244449	Sar	4
2016	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupo</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Sarbaz)	MH244450	Sar2	5

2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Konarak)	MH244451	Kon	6
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Konarak)	MH244452	Kon2	7
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Konarak)	MH244453	Kon3	8
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Chabahar)	MH244454	Chb	9
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Hamun)	MH244455	Hm	10
2016	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Hamun)	MH244456	Hm2	11
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Saravan)	MH244457	Sav	12
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Saravan)	MH244458	Sav2	13
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Zahedan)	MH244459	Zh	14
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Zahedan)	MH244460	Zh2	15
2017	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Sistan and Baluchestan-Iranshahr)	MH244461	IRS	16
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Fars-Khonj)	KT272769	W-Kh-A4	17
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	Iran (Fars- Mamassani)	KT272767	W-Ma-A	18
2012	<i>Brassica sp.</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480486	IR:Jir:61-1:Wat:12	19
2012	<i>Anagallis arvensis L.</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480488	IR:Jir:43-6:Wat:12	20
2012	<i>Medicago polymorpha L.</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480481	IR:Jir:27-2:Wat:12	21
2012	<i>Melilotus indicus</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480483	IR:Jir:34-4:Wat:12	22
2012	<i>Melilotus dentatus</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480485	IR:Jir:5-9:Wat:12	23
2012	<i>Chrozophora hierosolymitana</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480479	IR:Jir:45-1:Wat:12	24
2012	<i>Chenopodium murale L.</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480482	IR:Jir:32-4:Wat:12	25
2012	<i>Heliotropium szovitsii</i>	Iran (Kerman-Jiroft)	JX480487	R:Min:17-4:Wat:12	26
2015	<i>Brassica rapa var. rapa L.</i>	Iran (Kerman-Bagherabad)	KY825715	IR/Ker/TBa3/Tur:15	27
1999	<i>Citrullus vulgaris</i>	Iran (Hormozgan)	AJ245652	WmCSV-IR-A	28
2012	<i>Malva parviflora L.</i>	Iran (Hormozgan-Minab)	JX480489	IR:Min:30-7:Wat:12	29
2012	<i>Suaeda aegyptiaca</i>	Iran (Hormozgan-Minab)	JX480480	IR:Min:28-1:Wat:12	30
2012	<i>Brassica sp.</i>	Iran (Hormozgan-Minab)	JX480484	IR:Min:18-2:Wat:12	31
1999	<i>Citrullus vulgaris</i>	Sodan	AJ245650	WmCSV-SD-A	32
2011	<i>Cucurbita pepo</i>	Oman	JN618984	Als-4	33
2011	<i>Cucurbita pepo</i>	Oman	JN618983	Als-3	34
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	Palestine	KC462552	PAL	35
2009	<i>Cucumis melo</i>	Lebanon	HM368371	LB1	36
2010	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KJ854911	J40	37
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KM820282	PA2-Q14	38
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KM820278	PA1-J68	39
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KJ854914	J56	40
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	West Bank	KM820271	PA1-J44	41
2006	Not reported	Israel	EF201809	IL	42
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820260	IL3-69	43
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820269	IL3-84	44
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820240	IL1-12	45
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Israel	KM820257	IL2-118	46
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820211	JO2-413	47
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820234	JO3-628	48
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820225	JO3-613	49
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Jordan	KM820229	JO3-619	50
2018	<i>Cucumis sativus</i>	Saudi Arabia	MH025643	Cu1	51
2018	<i>Citrullus lanatus</i>	Saudi Arabia	MH025644	10Wt	52
2013	<i>Citrullus lanatus</i>	Saudi Arabia	KJ958911	Jizan101-SA	53
2014	<i>Citrullus lanatus</i>	Saudi Arabia	KJ939448	Leith	54
2012	<i>Cucurbita pepo</i>	Saudi Arabia	KJ958912	Alahsaa02-SA (ACMV-West	55
2013	<i>Manihot sculenta</i>	Kenya	J02057	Kenyan 844) Out of group	56

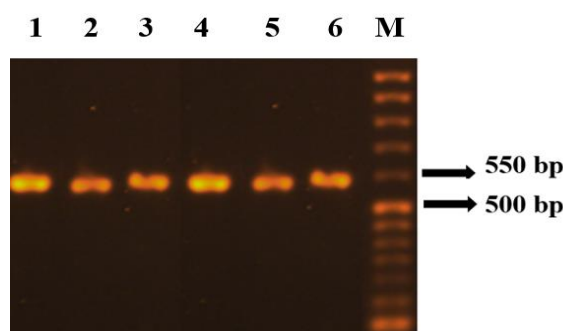
نتایج

نتایج آلودگی نمونه‌ها در نمونه‌برداری

به طور کلی نتایج آلودگی نمونه‌ها توسط آزمون PCR در نمونه‌های مختلف کدویان در شمال (زابل، هامون و زاهدان) و جنوب (سراوان، ایرانشهر، سرباز، نیکشهر، کنارک و چابهار) استان سیستان و بلوچستان تأییدکننده حضور ویروس کوتولگی سبزردهندوانه در محصولات هندوانه و خربزه در مناطق مورد نمونه‌برداری می‌باشد.

نتایج توالی‌یابی محصولات PCR

نتایج تفکیک محصولات PCR روی ژل آگارز در الکتروفورز بیانگر تکثیر قطعه مورد نظر (باند ۵۵۰ جفت بازی) مربوط به بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی در بگوموویروس‌ها بود. جهت تأیید آلودگی نمونه‌ها به WmCSV، نتایج توالی‌یابی قطعه تکثیر یافته در PCR مورد بررسی قرار گرفت که پس از بلاست توالی‌ها در GenBank تأیید کننده حضور WmCSV در تمام نمونه‌های دارای قطعه تکثیر یافته در PCR بود.



شکل ۲- شناسایی ویروس کوتولگی سبزردهندوانه در نمونه‌های مزارع استان سیستان و بلوچستان

علامه لکه‌های سبزرده و بدشکلی برگ (تصویر راست) در هندوانه و تکثیر قطعه حدود ۵۵۰ جفت بازی از ژن رمز کننده پروتئین پوششی (تصویر چپ). راهک M مربوط به نشانگر اندازه ۵۰ bp، Generuler DNA ladder، شرکت فرمنتاس، لیتوانی، و راهکهای ۱-۶ مربوط به نمونه‌های آلوده به WmCSV

Figure 2- Identification of watermelon chlorotic stunt virus in field samples from Sistan and Baluchestan province
Chlorotic spots and leaf malformation symptoms in watermelon (right image) and the amplified 550 bp fragments from coat protein gene (left image), (M: GeneRuler DNA ladder 50 bp marker, Fermentas, 1-6: Infected samples to WmCSV)

خوشه قرار گرفتند (A, B) به طوریکه جدایه‌های گروه A شامل جدایه‌های کشورهای ایران، عمان و عربستان می‌باشد و جدایه‌های گروه B شامل جدایه‌های کشورهای اردن، لبنان، فلسطین، کرانه غربی، اسرائیل و عربستان می‌باشد. از طرفی دیگر جدایه‌های گروه A نیز خود به دو گروه خوشه‌بندی شدند (خوشه AI و AII) به طوری که تعدادی از جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان در خوشه AI و برخی دیگر در خوشه AII قرار گرفتند.

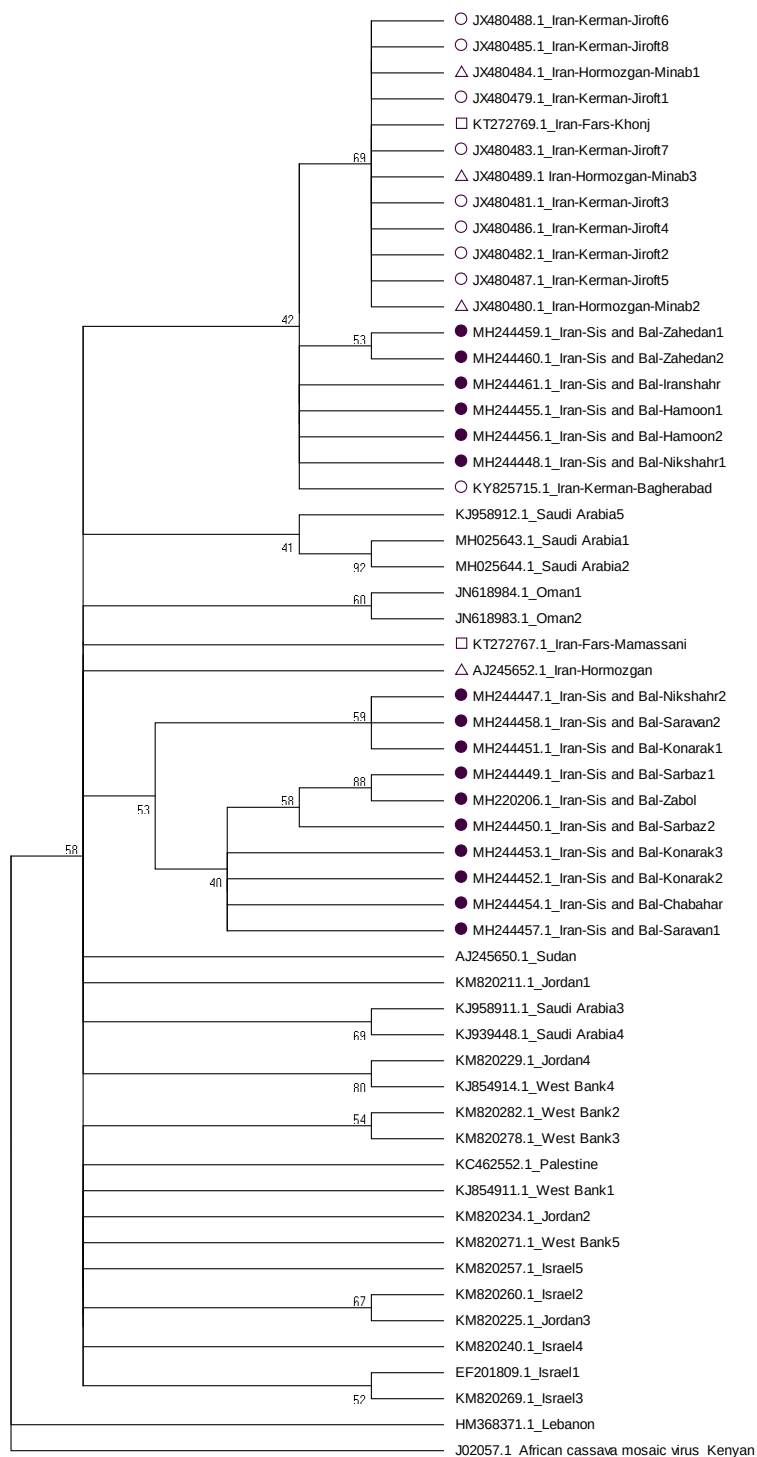
نتایج این پژوهش نشان داد جدایه‌های کشورهای عمان و عربستان نزدیک‌ترین جدایه‌ها از کشورهای دیگر به جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان و ایران می‌باشد. الگوی ترسیم شده درخت فیلوژنی ترسیم شده برای توالی اسیدنوکلئیکی بخشی از ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس با درخت فیلوژنی ترسیم شده برای داده‌های اسید آمینی یکسان بود.

نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی

نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی مربوط به توالی اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه تقریباً مشابه یکدیگر می‌باشد. حداکثر و حداقل تشابه جدایه‌های مورد بررسی در ۱۶ نمونه مربوط به مناطق مختلف استان سیستان و بلوچستان با یکدیگر در این پژوهش در سطح نوکلئوتیدی ۱۰۰ و ۹۸/۱ درصد می‌باشد. همچنین بیشترین و کمترین درصد تشابه نمونه‌های این استان با نمونه‌های سایر استان‌های کشور که از پیش تعیین توالی شده‌اند در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب ۹۹/۶ (جدایه‌های زاهدان و کرمان) و ۹۷/۷ (جدایه‌های سرباز و باقربادکرمان) بود.

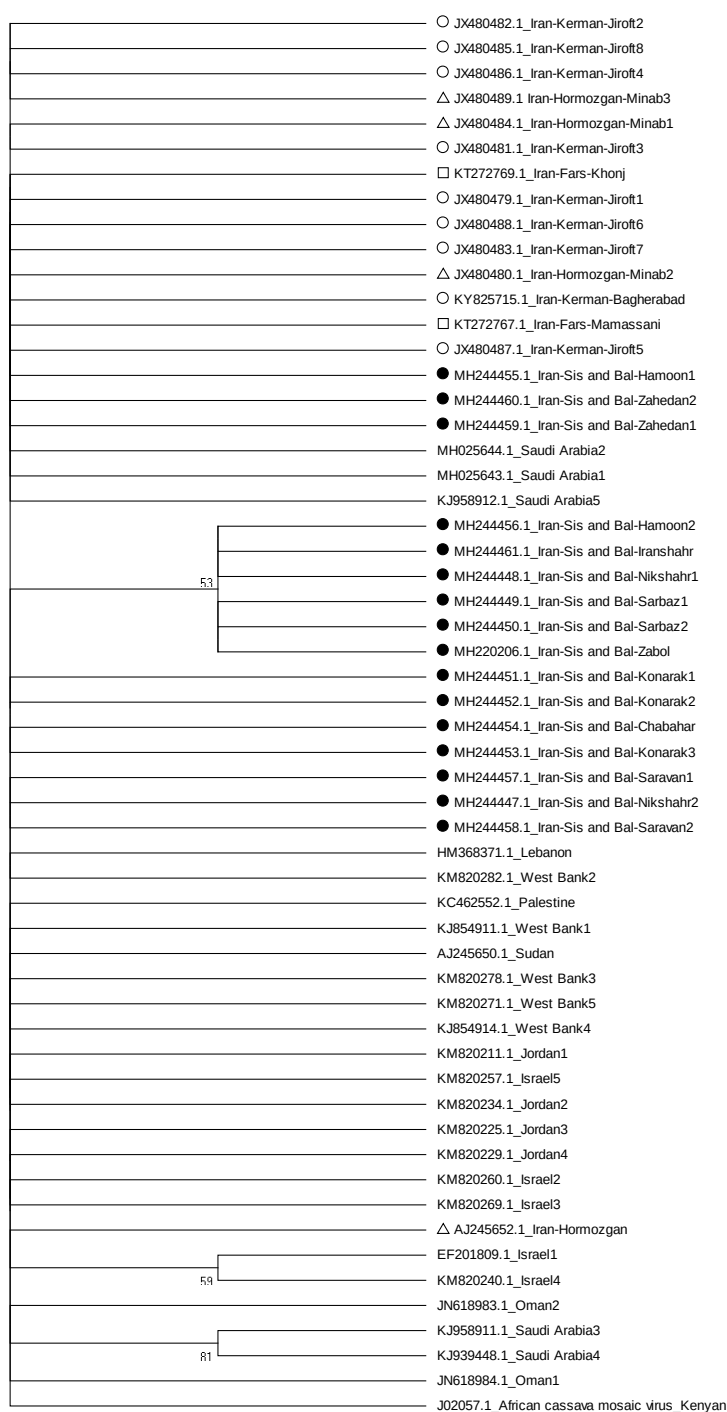
درخت فیلوژنی ترسیم شده نشان داد که جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان در دو خوشه قرار گرفتند که البته ارتباط مستقیمی به منشأ جغرافیایی آن ندارد.

در این گروه‌بندی کلیه جدایه‌های کشورهای دنیا نیز در دو



شکل ۳- درخت فیلوژنی ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه‌های WmCSV شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۴۰ درصد ادغام شدند. جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش (جدایه‌های سیستان و بلوچستان) به شکل ● جدایه‌های کرمان به شکل ○ جدایه‌های فارس به شکل □ و جدایه‌های هرمزگان به شکل ▲ مشخص شده‌اند.

Figure 3- Phylogeny tree of WmCSV isolates based on coat protein gene sequence at nucleic acid level. Branches with bootstrap support less than 40% are collapsed. WmCSV subgroups are shown in the right. Different shapes are used to indicated geographical origin for different provinces of Iran: Sistan and Baluchestan isolates in this research in ●, Kerman isolates in ○, Fars isolates in □ and Hormozghan isolates in ▲ shapes have been shown.



شکل ۴- درخت فیلوژنی ترسیم شده WmCSV بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی شاخه‌های با بوت استرپ کمتر از ۵۰ درصد ادغام شدند. جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش (جدایه‌های سیستان و بلوچستان) به شکل ● جدایه‌های کرمان به شکل ○ جدایه‌های فارس به شکل □ و جدایه‌های هرمزگان به شکل △ مشخص شده‌اند.

Figure 4- Phylogeny tree of WmCSV isolates based on coat protein gene sequence at nucleic acid level. Branches with bootstrap support less than 40% are collapsed. WmCSV subgroups are shown in the right Different shapes are used to indicate geographical origin for different provinces of Iran: Sistan and Baluchestan isolates in this research in ●, Kerman isolates in ○, Fars isolates in □ and Hormozghan isolates in △ shapes.

Divergence	Percent Identity																																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31				
1	█	98.9	99.2	100.0	100.0	100.0	99.0	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	1	KT272769.1		
2	1.8	█	99.0	98.9	98.9	98.9	98.8	98.8	98.9	98.9	98.8	99.1	98.6	98.9	98.8	98.3	98.9	98.5	98.7	99.0	98.7	98.5	98.3	98.7	98.7	98.8	98.1	98.3	98.1	98.8	98.7	2	KT272767.1		
3	0.8	1.0	█	99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.1	99.2	99.2	99.2	99.1	98.9	99.2	99.1	98.7	99.0	98.7	98.9	99.4	99.0	98.8	98.5	99.0	99.0	99.2	98.5	98.7	98.5	99.0	98.8	3	AJ245652.1	
4	0.0	1.1	0.8	█	100.0	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	4	JX480480.1		
5	0.0	1.1	0.8	0.0	█	100.0	99.2	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	5	JX480480.1		
6	0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	█	99.2	99.8	100.0	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	6	JX480480.1		
7	1.0	1.2	1.0	0.8	0.8	0.8	█	99.1	99.2	99.2	99.2	99.1	98.9	99.2	99.1	97.9	99.2	98.9	99.0	98.7	98.3	98.1	98.7	98.3	98.3	98.5	97.7	97.7	97.8	99.2	99.0	7	KY825715.1		
8	0.2	1.2	0.9	0.2	0.2	0.2	0.9	█	99.8	99.8	99.8	99.7	99.5	99.8	99.7	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	8	JX480479.1		
9	0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.2	█	100.0	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	9	JX480482.1		
10	0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.2	0.0	█	100.0	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	10	JX480481.1		
11	0.0	1.1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.8	0.2	0.0	0.0	█	99.8	99.7	100.0	99.8	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	11	JX480486.1		
12	0.2	0.9	0.9	0.2	0.2	0.2	0.9	0.3	0.2	0.2	0.2	█	99.5	99.8	99.7	98.3	99.6	99.2	99.4	99.0	98.7	98.5	99.0	98.7	98.7	98.8	98.5	98.3	98.5	99.6	99.4	12	JX480487.1		
13	0.3	1.4	1.1	0.3	0.3	0.3	1.																												

Figure 5- Identity and differences percentage of *Watermelon chlorotic stunt virus* nucleic acid sequence from Sistan and Baluchestan province isolates with together and other area of Iran

ژن رمزکننده پروتئین پوششی جدایه‌های استان‌های فارس و کرمان با جدایه‌های کشورهای دیگر نتایج مشابهی با رسم این درخت با توالی کامل DNA-A این ویروس برای همین جدایه‌ها توسط اسماعیلی و همکاران (۱۱) نشان داد. نتایج فیلوژنی توالی کامل DNA-A جدایه‌های کشور عربستان با سایر جدایه‌های کشورهای دنیا، جدایه‌های این کشور را در دو زیر گروه قرار داد (۱۹) که نتایجی مشابه با نتایج این پژوهش حاصل از آنالیز توالی پروتئین پوششی ویروس به دست آمد. از این جهت می‌توان بیان کرد که جهت بررسی درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های WmCSV می‌توان از توالی رمزکننده پوششی پروتئینی به جای توالی کامل DNA-A استفاده کرد. به طور کلی نتایج این پژوهش و سایر پژوهش‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌های کشورهای ایران و عربستان نسبت به سایر کشورها از تنوع ژنتیکی بیشتری برخوردارند (۱۱ و ۱۹).

به منظور مدیریت این بیماری ویروسی استفاده از ارقام مقاوم کدو بیان به WmCSV و یا سفید بالک بهترین روش مبارزه می‌باشد. تغییر تاریخ کشت و یا روش کشت به دلیل کاهش آلودگی گیاهان گوجه‌فرنگی باعث کاهش میزان خسارت بگومو ویروس TYLCV در استان سیستان و بلوچستان شده است (۱۴). تلاش‌های اولیه انجام شده به منظور شناسایی ارقام مقاوم تجاری هندوانه در ایران نسبت به WmCSV منجر به شناسایی رقم مقاوم به این ویروس نشده است اما ارقامی با حساسیت کمتر نسبت به

بحث

گسترده‌ی شناسایی و ثبت توالی اسیدهای نوکلئیکی و اسیدهای آمینی جدایه‌های گزارش شده WmCSV از دنیا در GenBank NCBI محدود به کشورهای خاورمیانه می‌باشد و از سایر کشورهای آسیا، اروپا، آفریقا و یا قاره‌های اقیانوسیه و آمریکا توالی‌ای به ثبت نرسیده است. کشور ایران از طریق بخش جنوبی استان سیستان و بلوچستان و به واسطه دریای عمان با کشورهای عمان و عربستان و سایر کشورهای خاورمیانه ارتباط می‌یابد. با توجه به اهمیت گسترده‌ی و وسعت زیاد استان سیستان و بلوچستان (حدود ۱۱ درصد کل مساحت کشور) تحقیق حاضر اولین پژوهش کاملی است که به بررسی شناسایی و تنوع ژنتیکی WmCSV بر اساس ژن رمز کننده پروتئین پوششی WmCSV در این استان می‌پردازد.

نتایج این پژوهش ارتباط نزدیک جدایه‌های استان سیستان و بلوچستان را با جدایه‌های کشورهای عمان و عربستان تأیید می‌کند. در واقع این مطلب بیانگر این واقعیت است که جدایه‌های ایران با جدایه‌های عمان و عربستان با وجود موقعیت دریا با کمترین فاصله دریایی حدود ۲۱۵ کیلومتری نیز در حال جابه‌جایی بین دو کشور می‌باشند. روش انتقال ویروس احتمالاً از طریق انتقال با سفیدبالک‌های ناقل ویروس از طریق وسایل ارتباطی بین دو کشور می‌باشد.

در این پژوهش، رسم درخت فیلوژنتیکی و ارتباط توالی بخشی از

داده‌های پژوهشی کافی در زمینه تعیین توالی نوکلئوتیدی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های کشورهای همسایه شرق ایران مانند پاکستان و هند نیز می‌تواند احتمال ایجاد القای مقاومت در گیاهان تراریخت با مکانیسم خاموشی آر آن ای را افزایش دهد.

سیاسگزاری

بدین وسیله از مجتمع آموزش عالی سراوان به دلیل تأمین هزینه طرح پژوهشی مصوب، به شماره طرح ۹۶۰۳ قدرانی می‌گردد.

ارقام تجاری هندوانه معرفی شده‌اند (۱۰ و ۱۳). منابع مقاومت کامل به این ویروس در تعدادی از لاین‌های خربزه از کشور سودان گزارش شده است (۲۳)، از این جهت تولید کدویان تراریخت مقاوم با مکانیسم‌های القاکننده خاموشی RNA از قبیل استفاده از سازه‌های hpRNA و یا miRNA و یا استفاده از مکانیسم‌های ویرایش ژنی مانند مقاومت حاصل از سیستم کریسپر جهت ایجاد مقاومت به این ویروس پیشنهاد می‌گردد. توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در این پژوهش از استان سیستان و بلوچستان به همراه سایر داده‌های ثبت شده از مناطق مختلف ایران و کشورهای خاورمیانه می‌تواند در طراحی سازه مناسب خاموشی و تولید گیاهان تراریخت مقاوم نسبت به اکثر جدایه‌های این ویروس مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- 1- Abudy A., Sufrin-Ringwald T., Dayan-Glick C., Guenoune-Gelbart D., Livneh O., Zaccari M., and Lapidot M. 2009. Watermelon chlorotic stunt and Squash leaf curl begomoviruses new threats to cucurbit crops in the Middle East. *Israel Journal of Plant Science* 58: 33-42.
- 2- Ahmadi K., Ebadzadeh H.R., Abdi Shah H., Kazemian A., and Rafiei M. 2017. Agricultural statistics crop year 2016-2017. Ministry of Agriculture jahad, Iran. (In Persian)
- 3- Al-Musa A., Anfoka G., Al-Abdulat A., Misbeh S., Haj Ahmed F., and Otri I. 2011. Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): A serious disease threatening watermelon production in Jordan. *Virus Genes* 43: 79-89.
- 4- Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Hussein E.Y., Mallah, O.B. and Abu-Zaitoun, S.Y. 2012. First report of Watermelon chlorotic stunt virus in watermelon in the Palestinian authority. *Plant Disease*, 96,149.
- 5- Bananej K., Ahoonmanesh A., and Kheyr-Pour A. 2002. Host range of an Iranian isolate of watermelon chlorotic stunt virus as determined by whitefly-mediated inoculation and agroinfection, and its geographical distribution. *Journal of Phytopathology* 150: 423-430.
- 6- Bananej K., Kheyr-Pour A., and Ahoonmanesh A. 1998. Identification of Watermelon chlorotic stunt virus, WmCSV in Iran. In: *Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress*. Karaj, p 194. (In Persian with English abstract)
- 7- Bedford I.D., Briddon R.W., Jones P., Al-Kaff N., and Markham P.G. 1994. Differentiation of three whitefly-transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology* 100: 243-257.
- 8- Dellaporta S.L., Wood J., and Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- 9- Esmaeili M., and Heydarnejad J. 2014. Identification of wild hosts of Watermelon chlorotic stunt virus in south and southeastern Iran. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1:1-18.
- 10- Esmaeili M., and Heydarnejad J. 2016. Evaluation of reaction of watermelon cultivars to Watermelon chlorotic stunt virus by agroinoculation with an infectious clone of the virus. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52(1): 99-107. (In Persian with English abstract)
- 11- Esmaeili M., Heydarnejad J., Massumi H., and Varsani A. 2015. Analysis of Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato leaf curl Palampur virus mixed and pseudo-recombination infections. *Virus Genes* 51: 408-416.
- 12- Gholamalizadeh R., Vahdat A., Keshavarz T., Elahinia S.A., Shahrane N., and Bananej K. 2008. Occurrence, distribution, and relative incidence of viruses infecting cucurbit crops in Guilan province (Iran). In: *Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress*. Hamedan, p 503. (In Persian with English abstract)
- 13- Heydarnejad J., Khosrowfar F., Razavinejad S., Massumi H., and Tabatabaei Fard S.J. 2010. Incidence of Watermelon chlorotic stunt virus in Fars and Kerman provinces. In: *Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress*. Tehran, p 672. (In Persian with English abstract)
- 14- Jafari M., Valizadeh M., Valizadeh J., Ertiaei F., and Beigomi M. 2010. The effect of sowing date and sowing method on damage reduction of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in greenhouses of Baluchestan region. In: *Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress*. Tehran, Iran, p 667. (In Persian with English abstract)
- 15- Jones P., Sattar M.H.A., and Al-Kaff N. 1988. The incidence of virus disease in watermelon and sweet melon crops in the People's Republic of Yemen and its impact on cropping policy. *Aspects of Applied Biological* 17: 203-207.
- 16- Kheyr-Pour A., Bananej K., Dafalla G.A., Caciagli P., Noris E., Ahoonmanesh A., Lecoq H., and Gronenborn B. 2000. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: sequence comparisons and identification of a

- whitefly transmission determinant. *Phytopathology* 90: 629-635.
- 17- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., and Lefkowitz E.J. 2012. Virus Taxonomy classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.
- 18- Mohammed H.S., Zicca S., Mangli A., Mohamed M.E., E.L., Siddig M.A., Tomassoli L., and EL Hussein A.A. 2014. Identification and pathogenetic analysis of common pumpkin viruses in Sudan. *Journal of Plant Pathology* 96: 77-84.
- 19- Rezk A.A., Sattar M.N., Alhudaib K.A., and Soliman A.M. 2019. Identification of Watermelon chlorotic stunt virus from watermelon and zucchini in Saudi Arabia. *Canadian Journal of Plant Pathology* 412: 1-6.
- 20- Sufrin-Ringwald T., and Lapidot M. 2011. Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology* 101: 281-289.
- 21- Walkey D.G.A., Alhubaishi A.A., and Webb M.J.W. 1990. Plant virus diseases in the Yemen Arab Republic. *Tropical Pest Management*, 36:195-206.
- 22- Wyatt S.D., and Brown J.K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86: 1288-1293.
- 23- Yousif M.T., Kheyr-pour A., Gronenborn B., Pitrat M., and Dogimont C. 2007. Sources of resistance to Watermelon chlorotic stunt virus in melon. *Plant Breeding* 126: 422-427.



Phylogenetic Relation of *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) Isolates of Sistan and Baluchestan Province by Sequencing of Coat Protein Gene

M. Jafari^{1*}- Z. Sadeghi²- S. Nasrollanejad³- A.R. Shahrokhi⁴

Received: 18-04-2020

Accepted: 25-07-2020

Introduction: Cucurbits are among the main vegetable crops that are extensively grown in commercial greenhouses, plastic tunnels, and open farms in many areas of Iran. Many begomoviruses are known to cause serious damages in economically important cucurbit crops such as watermelon and melon. Among these viruses, WmCSV has been quoted as one of the major limiting factors for cucurbit production throughout the south of Iran. *Begomovirus* genus is a member of *Geminiviridae* family that has the most species in comparison to other viral genus infecting plants. *Begomoviruses* are notorious pathogens infecting dicotyledonous plants globally. There are transmitted exclusively by the whitefly, *Bemisia tabaci*. Whitefly is one of the most important and prevalent pests in the warm south and southeast provinces of Iran and infects cucurbits fields in Sistan and Baluchestan province with a widespread population. *Begomoviruses* are single-stranded circular DNA viruses and have been observed in a wide host range of plants. There are different reports of infectious *Begomoviruses* species such as *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) from a world that can damage the cucurbits. The purpose of this study is to find the phylogenetic relation of WmCSV isolates from Sistan and Baluchestan province, which is located southeast of Iran, together and other isolates from the world, too. Because of this province is the largest area, with about 11.4% of the total area of Iran.

Materials and Methods: To identify the WmCSV infecting cucurbits in the southeast of Iran, several surveys in different regions of Sistan and Baluchestan were selected for the study, including Saravan, Iranshahr, Nikshahr, Sarbaz, Konarak, Chabahar, Zabol, Zahak, Hamoon, Hirmand, Nimroz, and Zahedan. Sampling has been taken from different cucurbits, such as different kinds of melons, watermelon, and squash, in 2015-2017. The samples were taken from plants showing viral symptoms such as vein yellowing, stunting, chlorotic, and mottling, deformation and severe reduction of fruit size and co-infection with whiteflies. The collected samples were transformed into the laboratory and the total DNA was extracted. To identify WmCSV were used from specific primers, Gem-CP-V-5' and Gem-CP-V-3' detecting *Begomovirus* genus in cucurbits. PCR products have been sequenced and blasted in the GenBank NCBI database and submitted there. Then, carried out the Alignment of acid nucleotide sequences and description of the phylogenetic tree by MEGA5 software. The Identity and differences percentage of *Watermelon chlorotic stunt virus* nucleic acid sequence from Sistan and Baluchestan province isolates with together and other areas of Iran carried out by MegAlign software too.

Results and Discussion: All areas of sample collection of Sistan and Baluchestan province were infected with WmCSV in this study. Positive PCR watermelon samples have been infected to WmCSV, severity. The expected PCR products, 550 bp size, from 16 amplified partial CP genes from different areas of Sistan and Baluchestan province in Iran were done sequencing. Phylogenetic sequencing analysis results of isolates from other countries and other regions of Iran also WmCSV isolates in this research from Sistan and Baluchestan province, classified them in two apart groups involves A and B. The A group was divided into 2 groups, that were named AI and AII. Isolates of Sistan and Baluchestan province from this research involved both of them. These findings seem to indicate Sistan and Baluchestan as of the possible origins of WmCSV in Iran. There was no relationship between geographical source and host in this province. Some isolates of this province had a near relationship to Oman and Saudi Arabia isolates.

Conclusion: WmCSV can be considered as a serious disease threatening watermelon production, in Sistan and Baluchestan province in the southeast of Iran as severe symptoms. On another hand, individually or in interaction with other begomoviruses, WmCSV can cause severe damage in farms infected by whiteflies. Probably, the spread of isolates belong Sistan and Baluchestan province and Oman or Saudi Arabia has been taken by whiteflies that transformed via between Iran and these countries, because of the most relationships between the WmCSV isolates of these countries. More importantly, performing collaborative studies with neighboring countries such as Pakistan and India, seems necessary. Also, further studies on Iranian isolates of

1 and 4- Assistant Professors, Department of Plant Protection, Higher Educational Complex of Saravan

(*- Corresponding Author Email: majafari59@yahoo.com)

2 and 3- Former Ph.D. Student of Plant Pathology and Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, respectively.

WmCSV that occurred on either cultivated or wild plants are essential to have a better understanding of the viral epidemics in the country. The results of sequencings will be used to design constructs inducing RNA silencing as a resistant strategy, against WmCSV isolates that were classified in both two groups.

Keywords: *Begomovirus*, Coat protein, Phylogeny tree, Sistan and Baluchestan, *Watermelon chlorotic stunt virus*

مقاله علمی-پژوهشی

تأثیر *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* بر بیماری زایی *Meloidogyne javanica* در سه رقم هلو در شرایط گلخانه

اکرم عبداللهی ارجنکی^۱ - ناصر پنجه که^۲ - علی اکبر فدایی تهرانی^{۳*} - محمد سالاری^۴ - عبدالحسین طاهری^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴

چکیده

تعدادی از باکتری‌های غیربیماری‌زای گیاهی می‌توانند فعالیت‌های مختلف میکروارگانیسم‌هایی همچون نماتدهای بیماری‌زای گیاهی را تحت تأثیر قرار دهند. در این تحقیق، جهت بررسی اثر این باکتری‌ها بر بیماری‌زایی و خسارت نماتد *Meloidogyne javanica* روی هلو، از دو گونه باکتری *Bacillus cereus* IPRI95 و *B. subtilis* VUPF52 و سه نوع پایه هلو استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار در شرایط گلخانه انجام پذیرفت. ارزیابی نتایج سه ماه بعد از مایه‌زنی گیاهان با نماتد با استفاده از شاخص‌های رشدی گیاهان سالم و آلوده به نماتد و پارامترهای رشدی نماتد در گیاهان آلوده انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج بیانگر اثر مثبت باکتری‌های مورد استفاده در افزایش شاخص‌های رشدی ارقام مختلف هلو و کاهش پارامترهای رشد و نمو نماتد ریشه‌گرهی بود. با اینحال میزان افزایش در تیمارهای مختلف متفاوت بود. برای مثال بیشترین و کمترین میزان رشد شاخه به ترتیب در رقم هلندری غیرآلوده در حضور *B. subtilis* (۴۳/۵) و رقم GF677 آلوده به نماتد و بدون باکتری (۸/۳) مشاهده شد. همچنین حضور باکتری *B. subtilis* باعث کاهش ۴۸/۴ و ۴۶/۸ درصدی به ترتیب در میانگین تعداد گال و تعداد کیسه تخم نماتد در گرم ریشه رقم GF677 نسبت به شاهد (بدون باکتری) کاهش گردید.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، پایه هلو، مهار زیستی، نماتد ریشه‌گرهی

مقدمه

نماتدهای ریشه‌گرهی متعلق به جنس *Meloidogyne* است (۸). نماتد ریشه‌گرهی با کاهش رشد و قدرت گیاه، باعث زوال زودرس درختان هلو (دو سال بعد از کاشت) می‌شوند (۲۰). میزان خسارت ناشی از حمله نماتد ریشه‌گرهی وابسته به عوامل متعددی چون نوع رقم، شرایط آب و هوایی، نوع خاک و مهمتر از همه میزان جمعیت نماتد در خاک می‌باشد مهار نماتد ریشه‌گرهی به دلایل مختلف از جمله دامنه میزبانی وسیع، سرعت بالای تکثیر و کوتاه بودن سیکل زندگی، مشکل می‌باشد (۱۳). از طرفی طیف وسیعی از باکتری‌ها نظیر *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* و *Enterobacter* در فراریشه گیاهان زندگی می‌کنند که فعالیت آنها سبب تقویت رشد گیاهان در شرایط مختلف تنش از جمله حمله عوامل بیماری‌زا می‌شوند (۱۱). در این بین گونه‌های تشکیل دهنده اسپور (گونه‌های باسیلوس) و باکتری سودوموناس فلورسنت غالب ترین باکتری‌های هستند که قادر به کنترل نماتدها می‌باشند (۱۶). بررسی‌های گسترده‌ای درباره رایزوباکتری‌های فراریشه انجام شده است و نتایج حاصل، تأثیرپذیری بالای جدایه‌های جنس باسیلوس را در کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی نشان می‌دهد (۲۷). استفاده از گونه‌های *B. mycoides*, *Bacillus amyloliquefaciens* و *B.*

هلو با نام علمی *Prunus persica* L. Batsch به عنوان یکی از مهمترین محصولات باغی از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای در بین محصولات کشاورزی برخوردار است میزان تولید سالانه آن در جهان حدود ۲۱/۵ میلیون تن است که ایران با تولید ۵۹۱ هزار تن، رتبه پنجم دنیا و مقام اول منطقه خاورمیانه را به خود اختصاص داده است (۱۴). پرورش و تولید هلو مانند سایر محصولات باغی با عوامل محدودکننده متعددی روبه‌رو می‌باشد. نماتدها گروهی از جانوران پر سلولی هستند که برخی از گونه‌های آنها با تغذیه از گیاهان سبب ایجاد بیماری می‌شوند (۲۶). نماتدهای انگل گیاهی سالیانه خسارت زیادی به محصولات مختلف وارد می‌کنند که بیشترین خسارت مربوط به

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیاران گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

*- نویسنده مسئول: (Email: ma_fadaei@yahoo.com)

۳- دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۵- دانشیار مرکز هیات‌های امانا و هیات‌های ممیزه وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
DOI: 10.22067/jpp.v34i3.87579

تهیه مایه تلقیح نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*

به منظور تهیه مایه تلقیح نماتد، ابتدا از باغات هلو مشکوک به آلودگی واقع در شهرستان سامان استان چهارمحال و بختیاری تعدادی نمونه‌ی ریشه‌ی آلوده همراه خاک اطراف آنها جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس توده‌های تخم موجود روی ریشه جدا و در ظروف جداگانه قرار داده شدند جهت تکثیر و تولید جمعیت خالص نماتد، تخم‌های هر یک از توده‌های تخم جدا شده مطابق روش هوسی و بیکر (۱۹۷۳) استخراج و یک هفته بعد از نشا گیاهچه گوجه‌فرنگی حساس رقم فلات، در کنار ریشه آن قرار گرفت (۱۰). گیاهان مذکور در شرایط گلخانه در دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس و ۱۴ ساعت روشنایی با آبیاری مناسب (دوره سه روزه) نگهداری و اجازه داده شد حداقل سه نسل نماتد طی شود تا جمعیت کافی برای آزمایش از یک توده تخم حاصل گردد. برای تعیین گونه نماتد، بعد از گذشت سه ماه بعضی از ریشه‌های آلوده از خاک خارج و پس از شستشو با آب، در زیر میکروسکوپ تشریح تعدادی از ماده‌های بالغ از بافت خارج و پس از تثبیت و آبگیری، از آنها اسلایدهای دائمی تهیه گردید. سپس خصوصیات ریخت سنجی و ریخت شناسی آنها بررسی و اندازه گیری شد. جهت بررسی الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن پس از آماده سازی ماده‌ها در اسید لاکتیک از قسمت انتهایی آنها برش عرضی تهیه گردید (۳۱).

تهیه پایه‌های مختلف هلو

به منظور یکسان‌سازی مراحل رشدی پایه‌های بذری هلو با قلمه های ریشه‌دار شده سایر پایه‌ها، بذور هلو ابتدا ضدعفونی سطحی و به مدت یک هفته در آب خیسانده شدند و بعد از خشک کردن آنها در دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت یک ماه سرمادهی شد و سپس بذرها در عمق ۶ تا ۸ سانتی‌متری گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۳ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، حاوی مخلوط خاک، ماسه و پرلایت با نسبت حجمی ۱:۱:۲ که قبلاً با گاز متیل بروماید به میزان ۱۵۰ گرم در متر مکعب خاک ضدعفونی شده بود کشت گردید. هنگامی که نهال‌ها به ارتفاع حدود ۳۰ سانتی‌متر رسیدند قلمه‌های ریشه‌دار شده رقم GF677، هیبرید محلی هلو*بادام شورابی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر از مرکز تولید پایه‌های رویشی بادام در منطقه سامان استان چهارمحال و بختیاری تهیه و به گلدان‌های مشابه منتقل شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه دانشگاه شهرکرد با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰-۸۰ درصد و دوره نوری ۱۳ ساعت روشنایی، ۱۱ ساعت تاریکی نگهداری و آبیاری منظم دو بار در هفته انجام گرفت.

بررسی تأثیر باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus*

cereus بر بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی در پایه‌های هلو
بررسی تأثیر عوامل باکتریایی *B. cereus* و *B. subtilis* بر نماتد

عوامل کنترل بیولوژیک، نشان دادند که این گونه‌ها به طور موثری می‌توانند نماتدهای متعلق به جنس‌های *Meloidogyne* و *Heterodera* را کنترل کنند (۶). مطالعات ناگش و همکاران در سال ۲۰۰۵، بر اهمیت استفاده از جنس باسیلوس تأکید دوباره دارند. براین اساس کشت فیلتره شده سوسپانسیون باکتری *Bacillus cereus*، تفریخ تخم نماتد را به میزان ۹۰ درصد کاهش می‌دهد و در مرگ و میر لاروها تأثیر قابل توجهی نیز دارد (۱۹). کاربرد استرین *B. subtilis* 7612 به تنهایی یا در ترکیب با قارچ‌های آنتاگونیست نتایج معنی‌داری در افزایش طول و وزن خشک اندام هوایی در گوجه‌فرنگی در حضور نماتد *M. incognita* در قیاس با تیمار شاهد بدون تلقیح نشان داد به طوری که این باکتری به تنهایی سبب افزایش ۳۲/۴ درصدی وزن خشک اندام هوایی گیاه و در ترکیب با قارچ آنتاگونیست *Aspergillus niger* سبب افزایش بیشتر ۶۰/۹ درصدی در وزن خشک اندام هوایی گیاهان آلوده به نماتد ریشه‌گرهی گردید (۲۸). تحقیقات زیادی بر روی اثر بازدارندگی گونه‌های مختلف جنس باسیلوس علیه گونه‌های بیمارگر *Meloidogyne* بر روی گیاهان مختلف انجام پذیرفته است (۹، ۱۱ و ۲۹). استفاده از باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه برای کشاورزی پایدار به طور گسترده و چشمگیری در نقاط مختلف جهان در حال گسترش می‌باشد. افزایش قابل توجه در رشد و بازده محصولات کشاورزی به دنبال مایه‌زنی آن‌ها با باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه گزارش شده است، لذا با توجه به خسارت گسترده نماتد ریشه‌گرهی در باغات کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک در برنامه تلفیقی ضروری به نظر می‌رسد برای این منظور تأثیر دو گونه *B. subtilis* VUPF52 و *B. cereus* IPRI95 در کنترل نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* و فاکتورهای رشدی در سه رقم پایه رویشی هلو (GF677 و هلندری و رقم محلی شورابی) در شرایط گلخانه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح باکتری

در این تحقیق از دو گونه باکتری *Bacillus cereus* IPRI95 و *Bacillus subtilis* VUPF52 (اهدا شده توسط کلکسیون آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه شهرکرد) استفاده گردید. برای خالص‌سازی و تکثیر باکتری، از کشت استرین‌های باکتریایی در محیط آگار غذایی (NA) Nutrient Agar به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد. باکتری‌ها زیر پارافین مایع و در دمای ۵ درجه یخچال نگهداری شدند. و تهیه سوسپانسیون با جمعیت مورد نظر (CFU/ml) 10^7 با استفاده از آب مقطر استریل و کدورت‌سنجی با اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

مورد بررسی و پارامترهای تکثیری نماتد انجام شد:

شاخص‌های رشدی گیاه: نتایج حاصل از تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی پایه‌های مورد بررسی ناشی از حضور باکتری‌های بیوکنترلی در گیاهان غیرآلوده و آلوده به نماتد بیانگر اثر معنی‌دار باکتری‌های مذکور بود (جدول ۱). مقایسه میانگین شاخص‌های مختلف نیز نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین اکثر تیمارهای مورد بررسی است بدین ترتیب که آلودگی به نماتد در شرایط عدم حضور عوامل بیوکنترل باعث کاهش معنی‌دار شاخص رشدی در تمام پایه‌های رویشی نسبت به تیمارهای دیگر گردید. به طوری که مایه زنی پایه‌های هلو با نماتد سبب کاهش طول ساقه به میزان ۳۴ و ۳۰ درصد به ترتیب در رقم‌ها GF677 و رقم محلی شورابی در مقایسه با تیمار شاهد گردید. نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها در رقم GF677 نشان داد، طول ساقه در گیاهان مذکور تیمار شده با دو استرین باکتریایی افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد دارند. به طوری که بیشترین طول ساقه (۴۳/۵ سانتی‌متر) و کمترین آن (۸/۳ سانتی‌متر) به ترتیب در رقم هلندری غیرآلوده به نماتد و حضور باکتری و رقم GF677 آلوده بدون حضور باکتری به دست آمد. کواریوم و همکاران نیز نتایج مشابهی را گزارش دادند به طوری که در چغندر قند ژنوتیپ‌های حساس‌تر به نماتد ریشه‌گرهی دارای رنگدانه فتوستتزی و رشد کمتر در مقایسه با ژنوتیپ مقاوم بودند (۱۸). طول ریشه نیز به دنبال آلوده شدن با نماتد در مقایسه با تیمار شاهد، ۱۴ و ۵۰ درصد به ترتیب در رقم‌های هلندری و GF677 کاهش نشان داد. این در حالی است که به دنبال تیمار ریشه‌های هلو با استرین‌های باکتریایی افزایش معنی‌داری در طول ریشه شاهد بودیم به طوری که حداکثر طول ریشه در رقم هلندری در تیمار با استرین *B. subtilis* و در رقم GF677 به دنبال تیمار با *B. cereus* حاصل شد. میزان این افزایش برابر با ۲۶/۶ و ۶۵/۱ درصد به ترتیب در رقم‌های هلندری و GF677 در مقایسه با تیمار شاهد به دست آمد. افزایش قابل توجه طول ریشه در رقم GF677، شاید به دلیل ترشحات ریشه و کلنیزاسیون بیشتر ریشه‌های این رقم باشد به طوری که والتر و همکاران عقیده دارند که عکس‌العمل ریزوباکتری‌های به ترشحات ریشه گیاهان مختلف متفاوت است (۳۵). باکتری *Bacillus* قادر به تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و هورمون‌های افزایش‌دهنده رشد است (۴ و ۳۰). به نظر می‌رسد ترکیبات هورمونی مترشحه از باکتری اثر چشمگیری در فعالیت‌های رشدی گیاه دارد چرا که ترکیبات رشدی نقش مهمی در متحمل کردن گیاه به بیماری‌های ریشه داشته و باعث می‌شوند ریشه‌های آسیب دیده به سرعت توسط ریشه‌های جدید جایگزین شده و به این ترتیب ریشه‌های آسیب دیده به سرعت با ریشه‌های جدید جایگزین شوند و خسارت بیماری کاهش یابد. همچنین تغییرات کمتری در طول سیستم ریشه در رقم شورابی که با استرین‌های مختلف مایه‌زنی شده بودند نسبت به رقم GF677

ریشه‌گرهی روی پایه‌های رویشی هلو بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. بدین صورت که خاک گلدان‌ها قبل از کاشت نهال ضدعفونی شده، و سپس نهال‌ها کاشته شد پس از استقرار پایه‌ها کشت مایع سه روزه جدایه‌ی هر باکتری با غلظت 10^7 واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در میلی‌لیتر (CFU/ml) تهیه شده و میزان ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون از هر باکتری همراه آب مورد نیاز برای اشباع خاک اطراف گیاهچه در هر تیمار اضافه شد. دو روز بعد از تیمار گیاهان با باکتری، مایه‌زنی نماتد با ۲۰۰۰ تخم به همراه لارو نماتد به ازای هر کیلوگرم خاک، از طریق حفره‌های ایجاد شده در اطراف نهال‌ها انجام شد. گیاهان آزمایشی برای سپری شدن حداقل سه نسل نماتد، مدت سه ماه در شرایط مناسب گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰-۸۰ درصد و دوره نوری (۱۳ ساعت روشنایی، ۱۱ ساعت تاریکی) نگهداری و آبیاری منظم دو مرتبه در هفته انجام گرفت. در پایان آزمایش شاخص‌های رشد و نمو مربوط به گیاه (ارتفاع اندام‌های هوایی، طول ریشه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه) و شاخص رشدی نماتد (تعداد گال، تعداد لارو سن دوم، تعداد توده تخم در ریشه گیاه و تعداد تخم در هر توده تخم و همچنین فاکتور تولیدمثلی از طریق فرمول $Rf = \frac{Pf}{Pi}$ که در آن Rf برابر فاکتور تولیدمثلی، Pf برابر جمعیت نهایی (تعداد کل تخم‌ها و لاروها موجود در ریشه گیاه و خاک گلدان) و Pi جمعیت اولیه نماتد است محاسبه گردید (۲۲) و به کمک نرم‌افزار SAS 9.4 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها در تمام حالات توسط آزمون محافظت شده LSD و در سطح ۵٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

تشخیص گونه نماتد

انحنای نسبتاً کم کمان پشتی و مشاهده شیارهای مشخص جانبی در الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده و طول استابیل ماده (متوسط ۱۶ میکرون) با شرح اصلی گونه *M. javanica* تطابق نشان داد. بلندی دو میکرونی ناحیه سر و هم‌تراز بودن آن با بدن، طول بدن ۵۳۵ (۴۱۰-۵۶۰) میکرومتری، استابیل ۱۱ (۱۰-۱۲) میکرومتری با گره‌های مشخص و دم ۵۲ میکرومتری با بخش روشن انتهایی ۱۳ میکرومتری از جمله خصوصیات ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی لاروهای سن دوم نماتد مورد بررسی بودند که با شرح گونه مذکور مطابقت نشان دادند (۱۲).

تأثیر باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus* بر بیماری زایی و

خسارت نماتد ریشه‌گرهی روی پایه‌های رویشی هلو

ارزیابی نتایج این بررسی بر اساس شاخص‌های رشدی پایه‌های

هلندری در شرایط عدم حضور و همچنین حضور نماتد مشاهده گردید (جدول ۲). نتایج نشان دهنده تأثیر حضور نماتد بر کاهش وزن تر ساقه بود به طوری که به دنبال تیمار با عوامل بیوکنترلی این شاخص را افزایش داد. نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از کاهش وزن تر ساقه در پایه‌های هلو مایه‌زنی شده با نماتد برابر با ۳۵، ۴۰/۵۹ و ۷۵/۱ درصد به ترتیب برای ارقام هلندری، GF677 و شورابی بود. در رقم حساس GF677 نیز گیاهان آلوده و تیمار شده با باکتری *B. cereus* نه تنها کاهش رشد دیده نشد بلکه میزان وزن تر ساقه ۷۰/۸۵ درصد افزایش داشت. گرچه بین دو جدایه‌های باکتری در اکثر شاخص‌های رشدی تفاوت معنی‌داری نبود. همچنین نتایج نشان دهنده معنی‌دار بودن اثر رقم، تیمار باکتریایی و نماتد و برهم‌کنش آنها در سطح پنج درصد بر وزن تر ریشه پایه‌های هلو می باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که مایه‌زنی با نماتد سبب افزایش وزن تر ریشه هلو نسبت به گیاهان شاهد گردید که این میزان برابر با ۲۷/۶، ۸۷/۸ و ۴۶/۱ به ترتیب برای ارقام هلندری، GF677 و رقم محلی شورابی بود که احتمالاً در نتیجه تشکیل گال فراوان در ریشه این تیمارها بود. همچنین نتایج این مطالعات نشان داده است که همزمان با ورود لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی در ریشه، آنزیم پروتئاز ترشح می‌گردد که سبب شکستن پروتئین‌های گیاه میزبان به اسیدهای آمینه می‌شود. تمرکز اسید آمینه به خصوص تریپتوفان که پیش نیاز تولید ایندول استیک اسید است موجب تجمع اکسین و عدم

تبادل هورمونی در محل تغذیه‌ای نماتد می‌گردد. در این مکان به جای رشد طولی سلول‌های پارانشیمی پوست، رشد عرضی اتفاق می‌افتد و موجب هیپرتروفی و ایجاد گال در محل ورود لارو سن دوم می‌شود. بنابراین افزایش وزن تر و وزن خشک ریشه در اثر حمله نماتد ریشه‌گرهی به دلیل تشکیل گال می‌باشد (۲۳). همچنین نتایج مطالعات نشان داد اس‌ترین‌های *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens* برخی مواد افزایش‌دهنده رشد گیاهی چون جیبرلین، اندول استیک اسید را در محیط فرا ریشه ترشح می‌نمایند (۳۳). نتایج این بررسی مطابق با دیگر نتایج تحقیقات انجام شده در این زمینه است (۲، ۲۵ و ۳۰).

شاخص‌های تکثیری نماتد: آنالیز آماری انجام شده نشان داد که دو جدایه باکتری نام برده شده علاوه بر تأثیر بر فاکتورهای رشدی پایه‌های رویشی، روی شاخص‌های تکثیری نماتد و کاهش بیماری نیز تأثیر بسزایی داشتند. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین پارامترهای رشدی نماتد ریشه‌گرهی در تیمارهای مختلف نشان دهنده اثر معنی‌دار کاربرد عوامل باکتریایی مهار زیستی بر بیماری‌زایی نماتد در همه پایه‌های رویشی بود (جداول ۳ و ۴). به طوری که تعداد گال و کیسه تخم در هر سه رقم کاهش نشان داد. میانگین تعداد گال در یک گرم ریشه در رقم GF677 تیمار شده با باکتری *B. subtilis* و *B. cereus* به ترتیب ۴۸/۴ و ۴۰/۶۸ درصد در مقایسه با شاهد بدون باکتری کاهش یافت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی سه پایه هلو در تیمارهای مختلف مایه‌زنی شده با *B. cereus* و *B. subtilis* و نماتد

Meloidogyne javanica

Table 1- The results of analysis of variance of the growth parameters in three peach rootstocks in different treatments inoculated with *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and *Meloidogyne javanica*

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean of square					
		اندام هوایی			ریشه		
		طول Shoot length (cm)	وزن تر Shoot fresh weight (gr)	وزن خشک Shoot dry weight (gr)	طول Root length (cm)	وزن تر Root fresh weight(gr)	وزن خشک Root dry weight (gr)
باکتری Bacteria	2	233.3*	31.7*	12.9*	369.5*	66.7*	17.4 ^{ns}
نماتد Nematode	1	718.2*	155.5*	64.1*	139.5*	75.1 ^{ns}	99.6*
رقم Variety	1	3460*	13.9*	8.8*	2295.2*	558.2*	175.2*
باکتری* نماتد Bacteria* nematode	2	52	13.3*	4.7*	196.4*	262.3*	76.2*
باکتری* رقم Bacteria* Variety	2	13.2 ^{ns}	20.9*	7.7*	76.6*	122.9*	44*
رقم* نماتد Variety* Nematode	4	213.4*	11.6*	5.3*	1.6 ^{ns}	31.3 ^{ns}	14.7 ^{ns}
رقم* نماتد* باکتری	2	12.8 ^{ns}	14.7*	6.9*	171.3*	220.7*	52.9*
باکتری* نماتد* رقم Variety* nematode* bacteria	4	5.9 ^{ns}	1.1	۰.6	8.4	11.5	4.2
خطای آزمایش error	72	14.9					
CV%		14.6	24.6	32.8	13.4	30.1	32.7

Data are means of five replicates

*: significant difference at 5%, ns: no significant difference

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی سه پایه هلو در تیمارهای مختلف مایه‌زنی شده با باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus* آلوده به *M. javanica* در شرایط گلخانه

Table 2- Mean comparison of the growth indices in three peach rootstocks in different treatments inoculated with *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* infected to *Meloidogyne javanica* in greenhouse conditions

تیمار Treatment			میانگین Mean of square					
رقم Variety	باکتری Bacteria	نماتد Nematodea	طول ساقه Shoot length (Cm)	وزن تر ساقه Shoot fresh weight (gr)	وزن خشک ساقه Shoot dry weight (gr)	طول ریشه Root length (Cm)	وزن تر ریشه Root fresh weight (gr)	وزن خشک ریشه Root dry weight (gr)
هلندری Helendri	.	-	36.8 ^c	3.6 ^{fe}	1.8 ^{hijg}	24 ^{fge}	9.9 ^{edgf}	4.8 ^{egf}
		+	32.2 ^{ec}	2.3 ^{hig}	1.7 ^{hijg}	20.6 ^g	13.7 ^{edc}	8.9 ^{bc}
		-	43.5 ^a	9.8 ^a	6.4 ^a	32.7 ^b	14.1 ^{dc}	7.9 ^{dc}
		+	40 ^a	3.1 ^{hfg}	1.7 ^{hijg}	28.1 ^{dc}	16.5 ^{bc}	10.9 ^b
	BC	-	34.3 ^c	6.5 ^{bc}	4.6 ^b	28.2 ^{dc}	9.5 ^{ehgf}	4.7 ^{egf}
		+	26.5 ^f	2.6 ^{hfg}	1.5 ^{hijk}	28.2 ^{dc}	13.3 ^{edc}	8.5 ^{bc}
		-	12.1 ^{kj}	3.6 ^{fe}	2.2 ^{hefg}	13.4 ^{hi}	2.3 ^k	1.5 ⁱ
		+	8.3 ^l	2.1 ^{hig}	1.09 ^{ijk}	26.9 ^{de}	19.5 ^b	10.7 ^b
GF677	.	-	16 ^{kj}	5 ^{dc}	3.2 ^{dec}	31.2 ^{bc}	13 ^{edc}	5.4 ^{edf}
		+	11.7 ^k	1.9 ^{hi}	1 ^{jk}	22.6 ^{fg}	10.3 ^{edgf}	6.5 ^{edc}
		-	22.3 ^h	6 ^c	3.6 ^{dbc}	38.4 ^a	28.1 ^a	14.8 ^a
		+	16.8 ^j	7.4 ^b	3.9 ^{bc}	25 ^{fde}	12.1 ^{edf}	7.1 ^{edc}
	BC	-	29.6 ^{ef}	4.7 ^{de}	2.6 ^{defg}	10.1 ⁱ	14.01 ^{jk}	2.06 ^{ih}
		+	20.5 ^h	1.1 ⁱ	.66 ^k	10.2 ⁱ	7.4 ^{ihgj}	4.5 ^{eghf}
		-	33 ^c	5.7 ^{dc}	2.9 ^{defc}	13.06 ^{hi}	5.6 ^{ihjk}	2.6 ^{igh}
		+	28.1 ^{ef}	3.5 ^{fe}	2.1 ^{hfg}	10.9 ^{hi}	8.6 ^{ihgf}	5.3 ^{edf}
شورابی Shorabi	BC	-	34.6 ^c	4.6 ^{de}	2.1 ^{hifg}	14.2 ^h	5.02 ^{ijk}	2.9 ^{ighf}
		+	27.3 ^f	1.2 ⁱ	.69 ^k	10.3 ⁱ	6.5 ^{ihgjk}	3.3 ^{ighf}

BS: *B. subtilis*

BC: *B. cereus*

با استفاده از آزمون LSD میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند، هر تیمار نیز میانگین پنج تکرار می‌باشد.

Values followed by the same letter are not significantly different using LSD test ($P \leq 0.05$, $n = 5$)

هلندری، GF677 و رقم محلی شورابی نسبت به شاهد کاهش نشان دادند. این نتایج با مطالعات اخیر که نشان‌دهنده توانایی بالای باکتری *Bacillus* در کنترل نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد مطابقت دارد (۳۰ و ۳۲). در بررسی مشخص شد که باکتری *B. cereus* دارای اثر نماتدکشی روی لاروها و تخم نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* می‌شود و سبب محافظت از ریشه‌های گوجه‌فرنگی در برابر این نماتد شده است (۲۱). گونه‌های مختلف از جنس باسیلوس مانند *B. megatrium*، *B. cereus amyloliquefaciens*، *Heterodera* و *Meloidogyne* آنتاگونیستی علیه نماتدهای جنس *B. subtilis* نشان داده‌اند (۳). کاهش نماتدهای انگل گیاهی توسط *B. subtilis* ممکن است از طریق مکانیزم‌های مختلفی مثل پارازیتسم مستقیم، تولید آنزیم‌های خارج سلولی و هورمون‌های گیاهی، تحریک واکنش‌های دفاعی میزبان باشد که موجب کاهش در فعالیت فاکتورهای

بیشترین توده تخم نیز در پایه GF677 بدون عامل مهار زیستی و کمترین آن در پایه هلندری تیمار شده با باکتری *B. subtilis* مشاهده شد. سایر شاخص‌ها (تعداد تخم در توده تخم، تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک و فاکتور تولید مثل) نیز اثرات مشابهی نشان دادند (جدول ۲). در این میان تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم کاهش بیشتری نشان دادند به عبارت دیگر استفاده از باکتری مختلف زیستی روی تمام مراحل رشدی نماتد موثر بودند البته توانایی باکتری‌ها در کاهش فاکتورهای تکثیر نماتد در رقم حساس به نماتد (Gf) با ارزش بود. نتایج این بررسی همچنین نشان داد که متوسط جمعیت لارو سن دوم در بستر تیمارهای همراه با نماتد به تنهایی در مقایسه با تیمارهای دارای باکتری دارای اختلاف معنی‌داری هستند. تعداد لارو سن دوم نماتد در حضور باکتری‌ها *B. subtilis* به میزان ۶۷/۷۳، ۵۲/۵۲ و ۱۲/۶ درصد به ترتیب در ارقام

تفریح تخم، کاهش گال، تغییر ترشحات ریشه، جلوگیری از نفوذ نماتد به ریشه می‌گردد (۱۵). فسفونو- الیگوپتید ریزوکتسین^۱ تولید شده توسط *B. subtilis* دارای فعالیت نماتدکشی است. باکتری *B. subtilis* با تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند گلوکاناز، پروتئاز و آنتی بیوتیک‌های مانند لیپوپتید سورفاکتین، فنجاسین و ایتورین A قادر به فعالیت علیه قارچ‌ها و نماتدها هستند (۳۰). چنان‌که در سال ۲۰۱۳، باکتری *B. subtilis* را در کنترل نماتد *M. incognita* مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که این باکتری موجب کاهش فاکتورهای تکثیری و نفوذ نماتد به داخل بافت می‌گردد. همچنین میزان فعالیت نماتدکشی باکتری با فعالیت پروتئولیتیک آن در ارتباط است (۳). این نتایج با تحقیق رویز و همکاران نیز مطابقت داشت که نشان دادند که باکتری *B. subtilis* با تولید متابولیت‌های سمی علیه نماتد ریشه گریه *M. incognita* موثر است (۳۴). در تحقیق دیگر مشخص شده است که استرین‌های باکتریایی مانند *B. mycoides* اثر معنی-داری روی کاهش تعداد گال و نرخ تکثیر نماتد ریشه‌گریه *M. ethiopica* دارند و این بازدارندگی را مرتبط با متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط باکتری می‌دانستند که احتمالاً سبب لیز شدن تخم

نماتد و از بین رفتن آنها می‌شود (۱). داور نیز نشان داد که باکتری *B. subtilis* به طور قابل توجهی تفریح تخم نماتد *M. javanica* را در شرایط آزمایشگاه کاهش می‌دهد (۵). نحوه تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست علیه نماتدهای گیاهی، نشان‌دهنده دخالت آنزیم‌های خارج سلولی باکتری در این پدیده است و از آن به عنوان فاکتور بیماریزایی موثر در نفوذ باکتری به داخل کوتیکول نماتد یاد شده است (۷). همچنین باکتری *B. subtilis* سبب کاهش تولید گال *M. incognita* بر روی فلفل و خربزه شده است (۱۷). آنزیم‌ها، متابولیت‌ها و مواد سمی تولید شده توسط گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل نماتدها موثر شناخته شدند که مهمترین عامل، آنزیم‌های خارج سلولی نظیر پروتئازها می‌باشند (۳۲). تحقیقات زیادی بر روی اثر بازدارندگی گونه‌های مختلف جنس باسیلوس علیه گونه‌های بیمارگر *Meloidogyne* بر روی گیاهان مختلف انجام پذیرفته است (۹، ۲۹، ۲۴) که میزان فعالیت باکتری همچنین میزان کنترل عوامل بیماری‌زا توسط آنها به کلینزاسیون موثر ریشه توسط این باکتری بستگی دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص رشدی *M. javanica* در سه پایه هلو مایه‌زنی شده با باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus cereus* در شرایط گلخانه

Table 3- Mean comparison of the growth parameters of *M. javanica* on three peach rootstocks inoculated with *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* in greenhouse conditions

رقم Treatment	باکتری Bacteria	تعداد گال در ۱ گرم ریشه No. gall/1 gr root	تعداد کیسه تخم در ۱ گرم ریشه No. egg masses/1gr root	تعداد تخم در هر کیسه تخم No. eggs/ egg mass	تعداد لارو سن ۲ در ۱۰۰ گرم خاک No. J2 n/100 gr soil	فاکتور تولید مثل Reproductive factor
هلندری	.	45.4 ^b	46.4 ^b	42.8 ^{ab}	28.6 ^b	4.6 ^b
Helendri	BS	23.6 ^e	20 ^f	31.8 ^c	9.8 ^d	1.8 ^c
	BC	23.4 ^e	24.8 ^{fe}	32.6 ^c	16.4 ^c	1.9 ^c
GF677	.	69.8 ^a	70 ^a	82.2 ^a	51.8 ^a	19.3 ^a
	BS	36 ^c	37.2 ^{dc}	38.2 ^{bc}	23.6 ^b	2.5 ^{bc}
	BC	41.4 ^b	41.2 ^{bc}	39.6 ^{bc}	25.8 ^b	3.3 ^{bc}
شورابی	.	42.8 ^b	42 ^{bc}	39.4 ^{bc}	24.4 ^b	2.1 ^{bc}
	BS	29.4 ^d	27.6 ^{fe}	34.4 ^c	16.4 ^c	1.4 ^c
	BC	26.8 ^d	31.2 ^{de}	34.6 ^c	15.6 ^c	1.1 ^c

BS: *B. subtilis*

BC: *B. cereus*

$$Rf = \frac{Pf}{Pi}$$

نسبت جمعیت نهایی به اولیه نماتد

RF : The ratio of the final population to the initial population of the nematode

با استفاده از آزمون LSD میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند، هر تیمار نیز میانگین پنج تکرار می‌باشد.

Values followed by the same letter are not significantly different using LSD test ($P \leq 0.05$, $n = 5$)

کننده و حتی کودهای دامی در سطح باغات هلو لازم به نظر می‌رسد. یافته‌های این تحقیق نشان دهنده‌ی اثر کنترلی باکتری‌های بیوکنترلی مورد استفاده بر تکثیر و خسارت نماتد ریشه‌گرهی بود. به طوری که با افزایش شاخص‌های رشدی گیاه سبب کاهش خسارت نماتد گردید. هرچند باکتری‌های مورد استفاده روی هر سه پایه مؤثر بودند ولی به دلیل حساسیت بیشتر GF677 به نماتد ریشه‌گرهی نسبت به ارقام هلندری و رقم محلی شورابی اثر عوامل باکتریایی روی پایه مذکور کمتر از دو پایه دیگر ظاهر شد.

در تحقیق حاضر بررسی فاکتور تولیدمثل که شاخص مهمی در برآورد میزان خسارت نماتد می‌باشد نشان داد که بین تیمار مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی با دیگر تیمارهای مایه‌زنی شده با عوامل باکتری‌های بیوکنترلی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با توجه به بالا بودن جمعیت نماتد ریشه‌گرهی و خسارت شدید آن در باغات هلو، و مقرون به صرفه نبودن و خطرات مصرف نماتدکش‌ها، دامنه میزبانی گسترده آنها می‌توان استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک را در برنامه مدیریت تلفیقی با نماتد ریشه‌گرهی قرار داد. البته بررسی‌های آینده در خصوص کاربرد ترکیبی این باکتری‌ها با یکدیگر و با قارچ‌های کنترل

منابع

- 1- Aballay E., Ordenes P., Martensson A., Persson P. 2013. Effects of rhizobacteria on parasitism by *Meloidogyne ethiopica* on grapevines. *European Journal of Plant Pathology* 135(1): 137-145.
- 2- Agrawal D.P.K. and Agrawal Sh. 2013. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. *International Journal of Current Microbiology Applied Science* 2(10): 406-417.
- 3- Chin Ann Y. 2013. Screening for Nematicidal Activities of *Bacillus* Species Against Root Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). *American Journal of Experimental Agriculture* 3(4): 794-805.
- 4- Custódio C.C., de Araújo F.F., Ribeiro A.M., Filho N.V., and Machado-Neto N.B. 2013. Seed treatment with *Bacillus subtilis* or indol butyric acid: germination and early development of bean seedlings. *Interciencia* 38(4): 273-279.
- 5- Dawar S., Tariq M., and Zaki M.J. 2008. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (Treub) chitwood on cowpea and mash bean. *Pakistan Journal of Botany* 40: 439-444.
- 6- Gardener BBM. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In agricultural systems. *Phytopathology* 94: 1252-125.
- 7- Huang X., Niu Q., Yang J., and Zhang K. 2005. *Bacillus nematocida* sp. Nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 323-327.
- 8- Huang Y., Xu C., Ma L., Zhang K., Duan C., and Mo M. 2009. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* *European Journal of Plant Pathology* 26: 417-422.
- 9- Huang Y., Xu C.K., Ma L., Zhang K.Q., Duan C.Q., and Mo M.H. 2010. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* 126: 417-422.
- 10- Hussey R.S., and Barker K.R. 1973. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.
- 11- Hashema M., and Abo-Elyousr K.M. 2011. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms, *Crop Protection* 30: 285-292.
- 12- Jepson S.B. 1987. Identification of root Knot nematode (*Meloidogyne* species). CAB. International, Wallingford, Oxon, United kingdom, 265 pp.
- 13- Jones J.T., Haegeman A.D., Danchin E.G., Gaur H.S., Helder M.G., Jones T., Kikuchi R., Manzanilla R., Lopez J.E., Palomares-Rius W.I.M.M.L., Wesemael R.N., and Perry O. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology *Mol. Plant Pathology* 14: 946-961.
- 14- Faostat. 2012. Available in <http://faostat.fao.org/>
- 15- Khalil M.S., Kenawy A., Gohrab M.A., and Mohammed E.E. 2012. Impact of microbial agents on *Meloidogyne incognita* management and morphogenesis of tomato. *Journal Biopest* 5(1): 28-35.
- 16- Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmiedeknecht G., and Hain R. 2000. Mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 1: 72-93.
- 17- Kokalis-Burelle N., and Samac D.A. 2003. Use of gram-positive bacteria as biological control agents for plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 35: 347-348. (Abst.)
- 18- Korayem A.M., El-Bassiouny HMS., El-Monem AAA., and Mohamed MMM. 2012. Physiological and biochemical changes in different sugar beet genotypes infected with root-knot nematode. *Acta Physiologiae Plantarum* 34(5): 1847-1861.

- 19- Nagesh M., Asokan R., and Mohan K. 2005. Partial characterization of novel nematocidal toxins from *Bacillus cereus* Frankland 1887 and their effect on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Journal of Biological Control* 19:65-69.
- 20- Nyczepir A.P., Riley M.B., and Sharpe R.R. 1993. Dynamics of concomitant populations of *Meloidogyne incognita* and *Cticonemella xenoplax* on peach. *Journal of Nematology* 25: 659-665.
- 21- Oka Y., Chet I., and Spiegel Y. 1993. Control of the root knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science and Technology* 3(2): 115-126.
- 22- Oostenbrink M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 66(4): 1-46.
- 23- Oyekanmi E.O., Coyneb D.L., Fagadea O.E., and Osonubia O. 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Protection* 26: 1006–1012.
- 24- Poi SC., and Kabi MC. 1979. Effect of *Azotobacter* inoculation on the growth and yield of jute and wheat. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 49(6): 478-480.
- 25- Pegard A., Brizzard G., Fazari A., Soucaze O., Abad P., and Djian- Caporalino C. 2004. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related phenolics accumulation in *Capsium annum*. *Phytopathology* 95: 158-165.
- 26- Sasser JN., and Freckman DW. 1987. Aword perspective on nematology: the role of the society. In: Veech, J A, Dickson DW (ed.), *Vistas on Nematology*, Society of Nematologists, Hyatsville. 7-14 pp.
- 27- Siddiqui ZA., and Mahmood I. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology* 69: 167-179.
- 28- Siddiqui ZA., and Akhtar MS. 2009. Effects of antagonistic fungi, plant growth-promoting rhizobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi alone and in combination on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Journal of General Plant Pathology* 75(2): 144-153.
- 29- Siddiqui Z.A., Qureshi A., and Akhtar M.S. 2009. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*, *Arch. Phytopathol. Plant Protection* 42: 1154-1164.
- 30- Singh P., and Siddiqui Z.A. 2010. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Bacillus* on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43(6): 552-561.
- 31- Taylor D.P., and Netscher C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. *Nematologica* 20: 268-269.
- 32- Tian B., Li N., Lian L., Liu J., Yang J., and Zhang K.Q. 2006. Cloning, expression and deletion of the cuticle degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4. *Arch. Microbiology* 186: 297–305.
- 33- Reva O.N., Dixelius C., Meijer J., and Priest F.J. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria elated to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Ecology* 48: 249–259.
- 34- Ruiz SE., Cristóbal AJ., Reyes RA., Tun SJ., García RA., and Pacheco AJ. 2014. In vitro antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soils of the Yucatan Peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita* . *FYTON* ISSN, 83: 45-47.
- 35- Walters DR., Ratsep J., and Havis ND. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64(5): 1263-1280.



The Effect of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* on Pathogenicity of *Meloidogyne javanica* in Three Rootstocks of Peach under Greenhouse Condition

A. Abdollahi Arjenaki¹- N. Panjehkeh²- A.A. Fadaei Tehrani^{3*}- M. Salari⁴- A.H. Taheri⁵

Received: 29-07-2020

Accepted: 14-09-2020

Introduction: Plant-parasitic nematodes, especially root-knot nematodes, cause a lot of damage to most agricultural products and a lot of efforts are made to control them. Biological control is one of the most widely studied methods to reduce nematode damage. This study aimed to evaluate the effect of two bacteria including *Bacillus cereus* IPRI95 and *B. subtilis* VUPF52 on the infection of *Meloidogyne javanica* on three rootstocks under greenhouse conditions.

Materials and Methods: This study was performed as a factorial experiment in a completely randomized design with five replications. In this way, the soil of the pots was disinfected before planting the seedlings, and then the seedlings were planted. After the establishment of the rootstocks, a three-day liquid culture peach for each bacterial isolate was prepared with a concentration of 10^7 colony-forming units in milliliters (CFU / ml) and 15 ml of suspension from each bacterium to the soil around the seedlings were added in each treatment. Two days after treating the plants with bacteria in the pots, inoculation with 2000 eggs with larvae of nematodes per kilogram of soil, entered into 3 holes created around the seedlings and then covered with soil these holes. Experimental plants to pass at least three generations of nematodes, three months in suitable greenhouse conditions with a temperature of 20 to 25 degrees, relative humidity 60-80% and optical period (13 hours of light, 11 hours of darkness) maintenance and regular watering twice in the week was over. At the end of the experiment, plant growth indices include (length, fresh and dry weight of shoots, length, fresh and dry weight of roots) and nematode growth parameters including (number of galls, number of second larvae (J₂), number of egg mass in plant roots and number Eggs per egg mass, as well as a reproductive factor (RF), were measured and statistically analyzed using SAS 9.4 software. A comparison of mean treatments in all cases was performed by LSD-protected test at 5%.

Results and Discussion: Nematode contamination in the absence of biocontrol agents significantly reduced the growth index at all levels compared to other treatments. So the peeling of peach bases with nematode reduces the stem length by 34% and 30% in GF677 and Shorabi local cultivars, respectively, compared to the control treatment. The results of comparing the means between treatments in GF677 showed that stem length in these plants treated with two bacterial strains increased significantly compared to the control. Root length also decreased by 14 and 50 percent in Helendri and GF677 cultivars, respectively, following infection with nematode compared to control treatment. However, following the treatment of peach roots with bacterial strains, we saw a significant increase in root length, so that the maximum root length in Helendri cultivar in treatment with *B. subtilis* strain and GF677 cultivar followed by treatment with *B. cereus* was obtained. Statistical analysis showed that the two bacterial isolates mentioned, in addition to affecting the growth factors of vegetative bases, also had a significant effect on nematode growth and development indicators and disease reduction. So that the number of eggs and egg mass decreased in all three cultivars. The mean number of galls per gram of root in GF677 treated with *B. subtilis* and *B. cereus* bacteria decreased by 48.4% and 40.68%, respectively, compared to the non-bacterial control. The results of this study also showed that the J₂ population in treatments with nematodes alone compared with treatments with bacteria have a significant difference. The number of J₂ larvae in the presence of *B. subtilis* bacteria decreased by 67.73, 52.52 and 12.6% in Helendri cultivars, GF677 and local cultivar Shorabi compared to the control. The use of biological bacteria affected all stages of nematode growth and development. However, the ability of bacteria to reduce nematode reproductive factors was significant in the nematode-sensitive cultivar (Gf). The findings of this study showed the controlling effect of

1, 2 and 4- Ph.D. Student of Plant Pathology and Associate Professors, Plant Protection Department, Faculty of Science and Agricultural Engineering, University of Zabol, Zabol, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: ma_fadaei@yahoo.com)

3- Associate Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

5- Associate Professor of the Center for Board of Trustees and Audit Boards of the Ministry of Science, Research and Technology

biocontrol bacteria used on the propagation and damage of root-knot nematodes. So that by increasing plant growth indices, nematode damage was reduced. Although the bacteria used were effective on all three rootstocks, due to GF677 being more sensitive to root-knot nematodes than Helendri cultivars and the local cultivar Shorabi, the effect of bacterial agents on the rootstock was less than the other two rootstocks.

Keywords: *Bacillus*, Biocontrol, Root-knot nematode, Peach rootstocks

مقاله علمی-پژوهشی

تأثیر ارقام مختلف سیب‌زمینی روی جمعیت تریپس پیاز، *Thrips tabaci* Lindeman و دشمنان طبیعی آن در شرایط مزرعه‌ای استان اردبیل

سید علی اصغر فتحی^{۱*} - مهدیه جعفری جاهد^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵

چکیده

تریپس پیاز، *Thrips tabaci* Lindeman یکی از آفات مهم سیب‌زمینی در استان اردبیل می‌باشد که با تغذیه از شیره سلولی و انتقال عوامل بیمارگر به محصول سیب‌زمینی خسارت می‌زند. در این پژوهش تراکم جمعیت این آفت تنوع گونه‌ای دشمنان طبیعی آن و نیز تراکم جمعیت دشمنان طبیعی غالب آن روی چهار رقم سیب‌زمینی به نام‌های Agria, Savalan, Fantasia و Arensa در شرایط مزرعه‌ای طی دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ مطالعه شد. در هر دو سال، کمترین تراکم لاروها و حشرات کامل روی رقم Agria مشاهده گردید. در این تحقیق، ۲۱ گونه شکارگر جمع‌آوری و شناسایی شدند که از میان آن‌ها *Aeolothrips intermedius* Bagnall و *Orius niger* (Wolff) بیشترین درصد فراوانی نسبی را روی هر چهار رقم سیب‌زمینی مورد مطالعه داشتند. بیشترین شاخص تنوع شانون برای جامعه‌ی شکارگرها روی رقم Agria محاسبه گردید. همچنین، بیشترین شاخص شباهت تنوع گونه‌ای موربیتا-هورن (۰/۹۸۹ در سال ۱۳۹۰ و ۰/۹۸۶ در سال ۱۳۹۱) شکارگرها روی رقم‌های Arensa و Fantasia و کمترین مقدار این شاخص (۰/۹۴۸ در هر دو سال) روی رقم‌های Agria و Savalan مشاهده شد. در هر دو سال، تراکم دو گونه شکارگر *O. niger* و *intermedius* روی رقم‌های Agria و Savalan به طور معنی‌داری از رقم‌های Arensa و Fantasia بیشتر بود. همچنین، بیشترین درصد ماده‌های هر دو گونه شکارگر روی بوته‌های رقم Agria مشاهده گردید. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کشت رقم Agria می‌تواند در کاهش جمعیت تریپس پیاز و حفاظت و حمایت از دشمنان طبیعی در مزارع سیب‌زمینی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: تریپس پیاز، دشمنان طبیعی، تراکم جمعیت، سیب‌زمینی، تنوع زیستی

مقدمه

بیمارگر به محصول سیب‌زمینی خسارت می‌زند (۲۱). این تریپس دامنه‌ی میزبانی گسترده‌ای داشته و به بیش از ۳۰۰ گونه گیاه میزبان زراعی و گلخانه‌ای در سراسر دنیا خسارت می‌زند (۱۴، ۲۰ و ۲۸). در ایران خسارت تریپس پیاز روی محصولات زراعی مختلف نظیر سیب‌زمینی، پیاز، خیار و تنباکو گزارش شده است (۱۵، ۲۷ و ۳۴). تریپس پیاز با قطعات دهان سوزن‌مانند خود سلول‌های برگ‌ها و جوانه‌های میزبان را سوراخ کرده و شیریه‌ی آن‌ها را می‌مکد. سلول‌های خالی در سطح برگ‌های آلوده ایجاد لکه‌های ریز نقره‌ای رنگی می‌کند و موجب کاهش سطح فتوسنتزکننده گیاه و در نهایت عملکرد گیاهان خسارت دیده می‌شود (۱۲، ۲۰ و ۲۱). همچنین، این تریپس ناقل چند ویروس بیمارگر گیاهی نظیر ویروس پژمردگی گوجه‌فرنگی (TSWV) در سیب‌زمینی و سایر گیاهان زراعی است (۲۷ و ۳۱). در ایران، پوررحیم و همکاران (۲۷) برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ آلودگی به این ویروس را در مزارع سیب‌زمینی همزمان با آلودگی شدید به تریپس پیاز گزارش کردند که باعث کاهش عملکرد

سیب زمینی، *Solanum tuberosum* L. گیاهی از تیره Solanaceae و یکی از محصولات زراعی مهم در ایران می‌باشد که بعد از گندم، برنج و ذرت در رتبه‌ی چهارم اهمیت قرار دارد. استان اردبیل یکی از قطب‌های تولید سیب‌زمینی در ایران می‌باشد که طبق آمارنامه سازمان جهاد کشاورزی، سطح زیر کشت سیب‌زمینی در این استان در سال زراعی ۱۳۹۰، ۲۹۰۰ هکتار و میزان تولید آن در حدود ۸۳۱۰۰ تن بود.

تریپس پیاز، *Thrips tabaci* Lindeman یکی از آفات مهم سیب‌زمینی می‌باشد که با تغذیه از شیره سلولی و انتقال عوامل

۱ و ۲- به ترتیب استاد و دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه محقق اردبیلی

(*)- نویسنده مسئول:

(Email: fathi@uma.ac.ir

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.42196

در گیاهان آلوده شده بود. میزان خسارت تریپس پیاز روی گیاهان میزبان به عوامل مختلفی نظیر تراکم جمعیت تریپس، طول زمان آلودگی گیاه به تریپس، شرایط محیطی و رقم گیاه میزبان وابسته است (۱۲، ۱۴ و ۳۵).

استفاده از حشره کش‌ها روش رایج برای کنترل تریپس پیاز است ولی رفتار پنهان شدن تریپس پیاز در پناهگاه‌های مخفی گیاهان در اکثر مواقع باعث می‌شود تا کنترل شیمیایی به تنهایی علیه این آفت از کارایی لازم برخوردار نباشد (۱۹). همچنین، به دلیل باروری بالا و طول دوره نسلی کوتاه تریپس پیاز پتانسیل مقاوم شدن آن به حشره کش‌ها در اثر مصرف بی‌رویه سموم وجود دارد (۳ و ۲۲).

دشمنان طبیعی به خصوص شکارگرها در کنترل جمعیت تریپس پیاز نقش قابل توجهی دارند (۱۳ و ۲۱). یکی از اصول اساسی در کنترل این آفت، حفظ و حمایت از دشمنان طبیعی به منظور افزایش تنوع گونه‌ای دشمنان طبیعی (تعداد و فراوانی گونه‌ها) روی گیاهان مورد مطالعه می‌باشد (۵، ۱۳، ۳۸ و ۳۹). ویژگی‌های فیزیکی و بیوشیمیایی رقم‌های گیاهان میزبان در تراکم جمعیت تریپس پیاز و دشمنان طبیعی آن تاثیر مهمی دارند (۱۲، ۱۴ و ۲۱). رقم‌های مختلف گیاهان میزبان به طور مستقیم با ترشح مواد شیمیایی فرار و نیز تاثیر غیرمستقیم روی زیست‌شناسی آفت در کارایی دشمن طبیعی تاثیر دارند (۲۸). تعاملات سه جانبه گیاه میزبان - آفت - دشمن طبیعی ممکن است مثبت بوده و باعث افزایش کارایی دشمن طبیعی شوند و یا اینکه ممکن است منفی بوده و کارایی دشمن طبیعی را کاهش دهند. کشت رقم‌هایی از گیاهان میزبان که باعث افزایش تنوع و کارایی دشمنان طبیعی شوند، در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات روش سالمی بوده و مشکلات مربوط به باقیمانده حشره‌کش‌ها در محیط زیست را نیز کاهش می‌دهند (۲۸، ۲۹ و ۳۷). بوم‌شناسان جمعیت، تنوع زیستی و پیچیدگی روابط بین گونه‌ها را لازمه پایداری یک جامعه می‌دانند. در نتیجه، اطلاع از تنوع گونه‌ای و فراوانی جمعیت آفت در هر منطقه از مسائل بنیادی در مدیریت آفت است. اگر چه غنای گونه‌ای یا تعداد گونه‌ها ممکن است اطلاعات مفیدی را برای مقایسه دو یا چند جامعه در یک زمان یا یک جامعه در زمان‌های مختلف ارائه می‌کند (۲۸)، اما در شرایطی که دو جامعه دارای غنای گونه‌ای یکسانی باشند، فراوانی نسبی یا یکنواختی توزیع گونه‌ها نیز باید اندازه‌گیری شود. به عبارت دیگر، غنای گونه‌ای معیار کاملی برای مقایسه تنوع زیستی و پایداری جوامع محسوب نمی‌شود. از این رو، بوم‌شناسان فراوانی نسبی را نیز در اندازه‌گیری تنوع زیستی لحاظ کرده و این دو جزء را با فرمول‌های مختلفی نشان داده‌اند. یکی از رایج‌ترین این فرمول‌ها، شاخص تنوع شانون است که تنوع زیستی را بر مبنای دو جزء غنای گونه‌ای و یکنواختی یا فراوانی گونه‌ها اندازه‌گیری می‌کند (۱۰ و ۲۳).

در تحقیق حاضر فرض بر آن است که رقم‌های مختلف

سیب‌زمینی بر تراکم جمعیت تریپس پیاز و نیز تنوع و فراوانی گونه‌های دشمنان طبیعی آن تاثیر دارند. لذا این پژوهش با اهداف (الف) ارزیابی تراکم جمعیت تریپس پیاز روی چهار رقم سیب‌زمینی (Savalan، Agria و Fantasia)، (ب) شناسایی دشمنان طبیعی تریپس پیاز و تعیین درصد فراوانی نسبی آن‌ها، و (ج) ارزیابی تنوع گونه‌ای دشمنان طبیعی تریپس پیاز و نیز تراکم جمعیت گونه‌های غالب آن‌ها روی ارقام مورد مطالعه تحت شرایط مزرعه‌ای انجام شد. نتایج این تحقیق می‌تواند در انتخاب رقم مناسب سیب‌زمینی (با کمترین آلودگی به تریپس پیاز و بیشترین تراکم و تنوع گونه‌ای دشمنان طبیعی) در کاهش جمعیت تریپس پیاز و نیز حفاظت و حمایت از دشمنان طبیعی در مزارع سیب‌زمینی مفید باشد.

مواد و روش‌ها

محل تحقیق

این تحقیق در دشت اردبیل (با ارتفاع از سطح دریا ۱۳۳۲ متر؛ عرض جغرافیایی ۳۸° ۱۵' N؛ طول جغرافیایی ۴۸° ۱۷' E) طی سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ انجام شد.

گیاهان میزبان

در این پژوهش، تراکم جمعیت تریپس پیاز و فراوانی و تنوع گونه‌ای دشمنان طبیعی آن روی چهار رقم سیب‌زمینی رایج در این منطقه شامل Arensa (با رشد رویشی خوب، عملکرد بالا و با خاستگاه آلمان)، Agria (با رشد رویشی خیلی خوب، عملکرد بالا و با خاستگاه آلمان)، Fantasia (با رشد رویشی خوب، عملکرد بالا و با خاستگاه هلند)، و Savalan (رقم تازه معرفی شده‌ی ایرانی و دارای رشد رویشی و عملکرد خیلی خوب) مطالعه شد. غده‌های رقم‌های مورد مطالعه از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. در هر دو سال غده‌های این رقم‌ها در چهار رویشگاه مختلف (به عنوان تکرارهای آزمایش) در دشت اردبیل (در مزارع آزمایشی به مساحت تقریبی ۵۰۰ متر مربع) به روش جوی‌وپشته کشت شدند، طوریکه فاصله بین ردیف‌های کشت ۷۵ سانتی‌متر و فاصله بین بوته‌های سیب‌زمینی روی هر ردیف ۲۵ سانتی‌متر بود. کاشت مزارع در اواسط اردیبهشت صورت گرفت و عملیات پس از کاشت شامل وجین علف‌های هرز همزمان با به ساقه رفتن گیاهان سیب‌زمینی مطابق با عرف رایج در منطقه به صورت دستی انجام شد. آبیاری مزارع به فواصل منظم ده روز یکبار صورت گرفت و از مصرف حشره‌کش‌ها اجتناب گردید.

تراکم جمعیت تریپس پیاز و دشمنان طبیعی آن

نمونه‌برداری‌ها از مرحله رشدی به ساقه رفتن بوته‌ها آغاز شد و

گونه i ام روی رقم B ، $d_a = \sum a_i^2 / N_a^2$ و $d_b = \sum b_i^2 / N_b^2$ می باشند. شاخص شباهت مورسیتا-هورن بین صفر تا یک متغیر است. عدد صفر نشان دهنده‌ی نبود شباهت ترکیب گونه‌ای دشمنان طبیعی بین چهار رقم سیب زمینی مورد مطالعه است و عدد یک نشان می‌دهد که ترکیب گونه‌ای دشمنان طبیعی بین چهار رقم سیب زمینی مورد مطالعه کاملاً همگن است.

تجزیه آماری داده‌ها

شاخص تنوع شانون و شاخص یکنواختی پیلو برای جامعه شکارگرهای تریپس پیاز روی هر یک از چهار رقم سیب زمینی با استفاده از نرم‌افزار SDR-IV محاسبه و مقایسه شدند (۳۳). قبل از تجزیه آماری، به منظور یکنواخت کردن واریانس داده‌های تراکم جمعیت تریپس پیاز و شکارگرهای غالب آن، از تبدیل داده $\text{Log}(X+2)$ استفاده گردید. داده‌های مربوط به تراکم جمعیت تریپس پیاز و شکارگرهای غالب آن روی ارقام مورد مطالعه در هر یک از سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ به طور جداگانه و با آزمون یک طرفه با چهار تکرار آنالیز واریانس شدند. اختلافات بین میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند (۳۲).

نتایج

تراکم جمعیت تریپس پیاز

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در هر دو سال مورد مطالعه، تراکم جمعیت لاروهای تریپس پیاز روی چهار رقم سیب زمینی اختلاف معنی‌داری داشتند ($F=678/71$ ، $P=0/0001$ ، $df=3, 12$ ، سال ۱۳۹۰ و $F=457/43$ ، $P=0/0001$ ، $df=3, 12$ در سال ۱۳۹۱). در هر دو سال مورد مطالعه کمترین تراکم جمعیت لاروهای تریپس پیاز (۵۱/۱) در سال ۱۳۹۰ و ۳۰/۱ (در سال ۱۳۹۱) روی رقم Agria و بیش‌ترین تراکم روی رقم ساوالان (۸۲/۶) در سال ۱۳۹۰ و ۵۳/۷ (در سال ۱۳۹۱) مشاهده گردید. تراکم لاروهای تریپس پیاز در سال ۱۳۹۰ روی رقم Savalan به طور معنی‌داری بیشتر از رقم‌های Arensa و Fantasia بود و در سال ۱۳۹۱ تراکم لاروهای تریپس پیاز روی رقم‌های Savalan و Arensa به طور معنی‌داری از رقم Fantasia بیشتر بود (جدول ۱).

همچنین در هر دو سال مورد مطالعه، تراکم حشرات کامل تریپس پیاز روی چهار رقم سیب زمینی مورد آزمایش به طور معنی‌داری متفاوت بود ($F=419/25$ ، $P=0/0001$ ، $df=3, 12$ در سال ۱۳۹۰ و $F=394/18$ ، $P=0/0001$ ، $df=3, 12$ در سال ۱۳۹۱). در هر دو سال مورد مطالعه، کمترین تراکم حشرات کامل تریپس پیاز روی رقم Agria مشاهده گردید. در بین رقم‌های باقیمانده در سال ۱۳۹۰ تراکم حشرات کامل روی رقم‌های Arensa و Savalan به

به فواصل هر ده روز یکبار تا مرحله رشدی زرد و خشک شدن بوته‌ها ادامه یافت. واحد نمونه‌برداری یک بوته‌ی سیب زمینی انتخاب شد. ابتدا نمونه‌برداری‌های اولیه برای تعیین تعداد نمونه مناسب انجام شد. تعداد نمونه مناسب برای تخمین جمعیت تریپس پیاز با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (۳۷).

$$N = \left(\frac{1.96}{D} \right)^2 \left(\frac{S}{\bar{x}} \right)^2 \quad (1)$$

در این رابطه: N تعداد نمونه مناسب، S انحراف معیار داده‌های حاصل از نمونه‌برداری اولیه و $\bar{x}$ میانگین داده‌های نمونه‌برداری اولیه می‌باشد (۱۵). D نیز سطح دقت آزمایش بود که مقدار آن ۰/۲۵ در نظر گرفته شد (۳۴).

سپس، در هر نوبت نمونه‌برداری چهار بوته از هر رقم در هر یک از چهار مزرعه (در مجموع شانزده بوته برای هر رقم) به طور تصادفی در الگوی Z شکل انتخاب شدند. در بوته‌های نمونه‌برداری شده، تعداد لارو و حشرات کامل تریپس پیاز و نیز فراوانی هر یک از دشمنان طبیعی آن (با یادداشت کردن مشخصاتی همچون نام مزرعه، نام رقم سیب زمینی، تاریخ نمونه‌برداری و مرحله رشدی گیاه) با استفاده از ذره‌بین $20\times$ شمارش و یادداشت شدند. همچنین، برای اطمینان از شناسایی صحیح گونه‌ها، تعدادی از نمونه‌های تریپس و دشمنان طبیعی با استفاده از قلم مو از روی برگ بوته‌های سیب زمینی جداسازی شده و پس از قرار گرفتن داخل شیشه‌های حاوی الکل اتیلیک ۷۵ درصد و چسباندن برچسب حاوی نام رویشگاه، نام رقم، تاریخ نمونه‌برداری و مرحله رشدی گیاه به آزمایشگاه منتقل شدند و با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر و با استفاده از استرئومیکروسکوپ یا میکروسکوپ شناسایی شدند (۲، ۴، ۶، ۱۸، ۱۹، ۲۴، ۲۵ و ۲۶).

با استفاده از داده‌های حاصل از نمونه‌برداری‌ها تراکم جمعیت تریپس پیاز و دشمنان طبیعی غالب آن، درصد فراوانی هر کدام از گونه‌های دشمنان طبیعی، شاخص تنوع شانون (H') با رابطه (۲)، شاخص یکنواختی پیلو (J') با رابطه (۳) و شاخص شباهت تنوع گونه‌ای مورسیتا-هورن (C_{MH}) با رابطه (۴) روی هر یک از چهار رقم سیب زمینی محاسبه شدند (۲۳).

$$H' = -\sum p_i \ln p_i \quad (2)$$

در این رابطه: H' شاخص تنوع شانون و p_i فراوانی نسبی گونه‌ی i (نسبت افراد گونه‌ی i به فراوانی کل گونه‌ها n_i/N).

$$J' = H' / \ln S \quad (3)$$

در این رابطه J' شاخص یکنواختی پیلو، H' شاخص تنوع شانون و S تعداد گونه در نمونه می‌باشد.

$$C_{MH} = 2 \sum (a_i b_i) / (d_a + d_b) * (N_a * N_b) \quad (4)$$

در این رابطه: N_a تعداد کل افراد روی رقم A ، N_b تعداد کل افراد روی رقم B ، a_i تعداد افراد گونه i ام روی رقم A ، b_i تعداد افراد

روی چهار رقم سیبزمینی مورد مطالعه در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در منطقه اردبیل در جدول ۲ ارائه شده‌اند. در هر دو سال مورد مطالعه، تریپس شکارگر *Bagnall Aeolothrips intermedius* و سن شکارگر *Orius niger* (Wolff) بیش‌ترین درصد فراوانی را در بین شکارگرهای تریپس پیاز روی چهار رقم سیبزمینی به خود اختصاص دادند.

طور معنی‌داری بیشتر از رقم Fantasia بود و در سال ۱۳۹۱، تراکم جمعیت حشرات کامل تریپس پیاز روی رقم Savalan به طور معنی‌داری از رقم‌های Fantasia و Arensa بیشتر بود (جدول ۱).

درصد فراوانی نسبی و شاخص تنوع دشمنان طبیعی

گونه‌های دشمنان طبیعی تریپس پیاز و درصد فراوانی نسبی آن‌ها

جدول ۱- میانگین ($\pm$ SE) تراکم جمعیت لاروها و حشرات کامل *Thrips tabaci* روی چهار رقم سیبزمینی در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در منطقه اردبیل

Table 1- Mean ($\pm$ SE) density of larvae and adults of *Thrips tabaci* on the four potato cultivars in the two years 2011 and 2012 in Ardabil region

رقم‌های سیبزمینی Potato cultivars	تراکم لاروها به ازای بوته Density of larvae per plant		تراکم حشرات کامل به ازای بوته Density of adults per plant	
	2011	2012	2011	2012
Agria	51.1 $\pm$ 4.1 c	30.1 $\pm$ 2.8 c	52.5 $\pm$ 4.9 c	28.5 $\pm$ 2.1 c
Savalan	82.6 $\pm$ 5.7 a	53.7 $\pm$ 5.6 a	88.1 $\pm$ 7.1 a	49.2 $\pm$ 5.1 a
Fantasia	65.9 $\pm$ 4.6 b	38.6 $\pm$ 2.4 b	74.2 $\pm$ 4.8 b	34.4 $\pm$ 4.2 b
Arensa	71.2 $\pm$ 5.1 b	47.2 $\pm$ 3.4 a	84.9 $\pm$ 5.1 a	36.5 $\pm$ 3.2 b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$)

Mean values in each column followed by the same letters are not significantly different ($P \leq 0.05$)

جدول ۲- درصد فراوانی نسبی گونه‌های دشمنان طبیعی *Thrips tabaci* روی چهار رقم سیبزمینی در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در منطقه اردبیل

Table 2- The relative abundance (%) of natural enemies of *Thrips tabaci* on the four potato cultivars in the two years 2011 and 2012 in Ardabil region

دشمنان طبیعی Natural enemies	رقم‌های سیبزمینی Potato cultivars							
	Agria		Savalan		Fantasia		Arensa	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
<i>Aeolothrips intermedius</i> Bagnall (Thys.: Aeolothripidae)	29.7	31.4	45.3	39.7	37.9	36.1	39.1	39.9
<i>Orius niger</i> (Wolff) (Hem.: Anthocoridae)	22.8	23.9	21.4	20.1	19.7	20.8	21.8	22.9
<i>Orius minutus</i> (L.) (Hem.: Anthocoridae)	5.2	3.9	4.1	5.1	6.1	5.2	4.9	3.2
<i>Chrysoperla carnea</i> (Stephens) (Neu.: Chrysopidae)	9.6	9.9	5	6.2	7.1	7.9	9.4	8.5
<i>Macrolophus</i> sp. (Hem.: Miridae)	5.2	6	2.7	3.9	4	5	1.5	2.6
<i>Scymnus</i> sp. (Col.: Coccinellidae)	3.9	2.9	1.8	2.9	4.1	4.9	2.5	1.9
<i>Anystis baccarum</i> (Linnaeus) (Acari: Anystidae)	3.9	2.9	3.2	2.7	5.1	1.4	6.9	5.9
<i>Spinibdella</i> sp. (Acari: Bdellidae)	3.5	2.6	2.3	1.8	6.1	5.2	2.5	0.9
<i>Episyrphus balteatus</i> (De Geer) (Dip.: Syrphidae)	2	2.7	2.9	2.4	2.6	3.1	3.2	2.9
<i>Haplothrips subtilissimus</i> Haliday (Thys.: Phlaeothripidae)	1.7	1.8	3.6	3.9	1.5	1.5	1.9	2.7
<i>Scolothrips sexmaculatus</i> Pergande (Thys.: Thripidae)	0.4	1.2	0.4	1.9	1	1.1	1.5	1.9
<i>Nabis pseudoferus</i> Remane (Hem.: Nabidae)	2.2	1.4	1.8	2.8	0.5	0	0.9	0
<i>Deraeocoris lutescens</i> (Schilling) (Hem.: Miridae)	1.8	1.9	0	1.9	0	0	0.6	0.8
<i>Deraeocoris punctulatus</i> Fallen (Hem.: Miridae)	1.4	1	1.8	0.5	0	0.2	0.9	1.4
<i>Geocoris</i> sp. (Hem.: Geocoridae)	1.3	0.6	0	0.3	1.1	1	1	0.8
<i>Hippodamia convergens</i> (Guerin) (Col.: Coccinellidae)	1.8	2.3	1.4	0	1	1.6	0.5	1.8
<i>Propylea quatuordecimpunctata</i> (L.) (Col.: Coccinellidae)	0.8	0.9	0.9	0	0.5	0.6	0	0
<i>Coccinella septempunctata</i> (L.) (Col.: Coccinellidae)	0.9	1	0	1	0.7	0.3	0	0.6
<i>Lathrobium</i> sp. (Col.: Staphylinidae)	1	0.3	0	0.2	0.6	0	0.9	0.4
<i>Tetralaucopora</i> sp. (Col.: Staphylinidae)	0.9	0.9	0	0.9	0	0.3	0	0.1
<i>Hexagonia</i> sp. Kirby (Col.: Staphylinidae)	0	0.5	1.4	1.8	0.4	1.1	0	0.8

جدول ۳- میانگین ($\pm SE$) مقادیر شاخص تنوع شانون و شاخص یکنواختی پیلو برای گونه‌های دشمنان طبیعی *Thrips tabaci* روی چهار رقم سیب‌زمینی در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در منطقه اردبیل

Table 3- Mean ($\pm SE$) values of the Shannon diversity index and the Pielou's evenness index for the natural enemies of *Thrips tabaci* on the four potato cultivars in the two years 2011 and 2012 in Ardabil region

رقم‌های سیب‌زمینی Potato cultivars	شاخص تنوع شانون (H') Shannon diversity index (H')		شاخص یکنواختی پیلو (J') Pielou's evenness index (J')	
	2011	2012	2011	2012
Agria	1.98 $\pm$ 0.05 a	2.05 $\pm$ 0.07 a	0.66 $\pm$ 0.03 a	0.67 $\pm$ 0.04 a
Savalan	1.87 $\pm$ 0.07 b	1.92 $\pm$ 0.08 ab	0.67 $\pm$ 0.03 a	0.65 $\pm$ 0.02 a
Fantasia	1.66 $\pm$ 0.04 c	1.73 $\pm$ 0.06 c	0.59 $\pm$ 0.02 b	0.59 $\pm$ 0.03 b
Arensa	1.8 $\pm$ 0.06 b	1.86 $\pm$ 0.05 bc	0.62 $\pm$ 0.04 ab	0.64 $\pm$ 0.02 ab

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری ندارند ($P \leq 0.05$)

Mean values in each column followed by the same letters are not significantly different ($P \leq 0.05$)

جدول ۴- مقادیر شاخص شباهت مورسیتا-هورن برای ترکیب گونه‌های دشمنان طبیعی *Thrips tabaci* روی چهار رقم سیب‌زمینی در منطقه اردبیل در سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱

Table 4- Values of Morisita-Horn index for the complex of natural enemies of *Thrips tabaci* on the four cultivars of potato in the two years 2011 and 2012 in Ardabil region

رقم‌های سیب‌زمینی Potato cultivars	سال year	رقم‌های سیب‌زمینی Potato cultivars			
		Agria	Savalan	Fantasia	Arensa
Agria	2011				
	2012				
Savalan	2011	0.948			
	2012	0.948			
Fantasia	2011	0.986	0.972		
	2012	0.982	0.976		
Arensa	2011	0.983	0.977	0.989	
	2012	0.980	0.974	0.986	

مورد مطالعه در جدول ۴ ارایه شده است. نتایج نشان داد که در هر دو سال، بیشترین مقدار این شاخص (۰/۹۸۹) در سال ۱۳۹۰ و ۰/۹۸۶ در سال ۱۳۹۱) بین رقم‌های Arensa و Fantasia و کمترین مقدار آن (۰/۹۴۸) در هر دو سال) بین رقم‌های Agria و Savalan مشاهده شد (جدول ۴).

تراکم جمعیت شکارگرهای غالب

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تریپس شکارگر *A. intermedius* و سن شکارگر *O. niger* بیشترین درصد فراوانی نسبی را در بین شکارگرهای تریپس پیاز داشتند (جدول ۲). تراکم جمعیت سن *O. niger* روی بوته‌های چهار جدول ۵- مقایسه میانگین ($\pm SE$) تراکم جمعیت دو گونه شکارگر غالب *Thrips tabaci* و نیز درصد ماده‌های آن‌ها روی چهار رقم سیب‌زمینی در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در منطقه اردبیل

رقم سیب‌زمینی مورد مطالعه در سال‌های ۱۳۹۰ ($P = ۰/۰۰۰۱$)، $F = ۹/۹۷$ ، $df = ۳, ۱۲$ و ۱۳۹۱ ($P = ۰/۰۰۰۱$)، $F = ۹/۴۱$ ، $df = ۳, ۱۲$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند (جدول ۵). در هر دو سال، جمعیت این شکارگر روی رقم‌های Agria و Savalan به طور معنی‌داری از رقم‌های Arensa و Fantasia بیش بود (جدول ۵).

همچنین، گونه‌های شکارگر *Orius minutus* (L.)، *Macrolophus* sp.، *Chrysoperla carnea* (Stephens)، *Spinibdella* sp.، *Anystis baccarum* L.، *Scymnus* sp. و *Episyrphus balteatus* (De Geer) با فراوانی نسبی متوسط روی هر چهار رقم سیب‌زمینی مورد مطالعه مشاهده شدند (جدول ۲). سایر شکارگرها درصد فراوانی نسبی خیلی پایینی داشتند و حتی روی برخی رقم‌ها در یکی از دو سال مورد مطالعه مشاهده نشدند (جدول ۲). بیشترین مقدار شاخص تنوع شانون در سال ۱۳۹۰ روی رقم Agria مشاهده شد و مقدار این شاخص روی رقم‌های Savalan و Arensa به طور معنی‌داری بیشتر از رقم Fantasia بود. همچنین، در سال ۱۳۹۱، مقدار شاخص تنوع شانون روی رقم Agria به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم‌های Arensa و Fantasia بود، ولی در مقایسه با رقم Savalan معنی‌دار نبود (جدول ۳). شاخص یکنواختی پیلو برای گونه‌های شکارگر تریپس پیاز در هر دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ روی رقم‌های Agria و Savalan به‌طور معنی‌داری بیشتر از رقم Fantasia بود ولی در مقایسه با رقم Arensa اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳).

شاخص شباهت تنوع گونه‌ای مورسیتا-هورن برای ترکیب گونه‌های شکارگر تریپس پیاز روی چهار رقم سیب‌زمینی در دو سال

جدول ۵- میانگین ($\pm$ SE) تراکم جمعیت *Orius niger* و *Aeolothrips intermedius* روی چهار رقم سیب‌زمینی در دو سال ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ در

منطقه اردبیل

Table 5- Mean ($\pm$ SE) density of *Orius niger* and *Aeolothrips intermedius* on the four potato cultivars in the two years 2011 and 2012 in Ardabil region

رقم‌های سیب‌زمینی Potato cultivars	<i>O. niger</i>		<i>A. intermedius</i>		درصد ماده‌های <i>O. niger</i> Females (%) of <i>O. niger</i>		درصد ماده‌های <i>A. intermedius</i> Females (%) of <i>A. intermedius</i>	
	2011	2012	2011	2012	2011	2012	2011	2012
Agria	3.9 $\pm$ 0.5 a	4 $\pm$ 0.4 a	12.5 $\pm$ 0.9 a	12.4 $\pm$ 1.1 a	59	57	85	88
Savalan	4.6 $\pm$ 0.6 a	4.4 $\pm$ 0.6 a	13.1 $\pm$ 1 a	12.7 $\pm$ 1 a	56	56	83	86
Fantasia	3.1 $\pm$ 0.6 b	3.3 $\pm$ 0.4 b	10 $\pm$ 0.8 a	10.8 $\pm$ 1 a	50	51	79	80
Arensa	3.2 $\pm$ 0.5 b	3.4 $\pm$ 0.4 b	8.9 $\pm$ 0.9 a	9.7 $\pm$ 1 a	51	53	80	83

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$)

Mean values in each column followed by the same letters are not significantly different ($P \leq 0.05$)

Trialeurodes و *T. tabaci* در کنترل *septempunctata* L. *vaporariorum* (West.) در محصولات گلخانه‌ای کارایی بالایی دارد. همچنین آن‌ها گزارش کردند که این کفشدوزک تغذیه از تریپس پیاز را نسبت به سفیدبالک گلخانه ترجیح می‌دهد. همچنین، لاروهای بالتوری سبز از شکارگرهای موثر تریپس پیاز گزارش شده است (۲۱). همچنین، چندین گونه از کنه‌های خانواده‌های *Anystidae* و *Bdellidae* از شکارگرهای مهم تریپس پیاز معرفی شده‌اند (۲، ۱۹ و ۳۶). برای مثال، سورنسون و همکاران (۳۶) کنه شکارگر *Anystis astripus* (Karsch) را به عنوان یکی از شکارگرهای مهم *T. tabaci* گزارش کرده‌اند.

در پژوهش حاضر مشخص گردید که تراکم جمعیت تریپس پیاز و تنوع گونه‌ای شکارگرهای آن روی ارقام مختلف سیب‌زمینی متفاوت بود. به طوری که، کمترین و بیشترین تراکم لاروها و حشرات کامل تریپس پیاز به ترتیب روی رقم *Agria* و *Savalan* مشاهده شد. در مقابل، بیشترین و کمترین مقدار شاخص تنوع شانون برای جامعه‌ی شکارگرهای تریپس به ترتیب روی رقم *Agria* و *Fantasia* مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که به احتمال بالا بودن تنوع گونه‌ای شکارگرهای تریپس پیاز روی رقم *Agria* موجب کاهش جمعیت تریپس پیاز روی این رقم شدند. افزایش تنوع گونه‌ای شکارگرها روی رقم *Agria* با تعداد گونه‌های بیشتر شکارگر و یکنواخت بودن فراوانی نسبی گونه‌های شکارگر در ارتباط بود. در مقابل، دلیل پایین بودن تنوع گونه‌ای شکارگرها روی رقم *Fantasia* با تعداد کمتر گونه‌های شکارگر و شاخص یکنواختی کمتر گونه‌های شکارگر در ارتباط بود. چراکه کمترین مقدار شاخص یکنواختی پیلو برای جامعه شکارگرها روی رقم *Fantasia* مشاهده شد. بنابراین، به دلیل تنوع گونه‌ای پایین شکارگرها روی رقم *Fantasia* تریپس پیاز جمعیت بالاتری روی این رقم ایجاد کرد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که جمعیت *A. intermedius* و *O.*

در هر دو سال مورد مطالعه بیش‌ترین درصد ماده‌های این شکارگر به ترتیب روی رقم‌های *Agria*، *Savalan*، *Arensa* و *Fantasia* مشاهده شد (جدول ۵). همچنین، جمعیت تریپس شکارگر *A. intermedius* روی چهار رقم سیب‌زمینی آلوده به تریپس پیاز به طور معنی‌داری متفاوت بود ($F=26/43$ ، $P=0/0001$ ، $df=3$ ، 12) و ($F=10/85$ ، $P=0/0001$ ، $df=3$ ، 12) به ترتیب در سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ (جدول ۵). در هر دو سال، جمعیت *A. intermedius* روی ارقام *Agria* و *Savalan* به طور معنی‌داری از رقم‌های *Arensa* و *Fantasia* بیش‌تر بود (جدول ۵). همچنین، بیشترین درصد ماده‌های این شکارگر در هر دو سال روی رقم *Agria* مشاهده گردید و رقم‌های *Savalan*، *Arensa* و *Fantasia* در رتبه‌های بعدی قرار داشتند (جدول ۵).

بحث

در این پژوهش، ۲۱ گونه شکارگر از روی بوته‌های سیب‌زمینی آلوده به تریپس پیاز جمع‌آوری شدند که از میان آن‌ها گونه‌های *A. intermedius* و *O. niger* بیشترین درصد فراوانی نسبی را به خود اختصاص دادند. تریپس شکارگر *A. intermedius* به دلیل جثه کوچک، قابلیت نفوذ در پناهگاه‌های مخفی (که محل استقرار تریپس‌های گیاهخوار هستند) و نرخ نشوونما و باروری بالا اهمیت زیادی در کنترل تریپس‌های گیاهخوار دارد (۲۱). به علاوه، گزارش شده است که سن‌های شکارگر متعلق به جنس‌های *Orius* و *Macrolophus* نیز در کنترل تریپس پیاز نقش مهمی دارند (۷، ۱۱، ۱۳ و ۲۱). برای مثال، دریمانوف و دیمیتروف (۹) گزارش کردند که سن شکارگر *M. rubi* Wood از شکارگرهای مهم تریپس پیاز در بلغارستان می‌باشد. کفشدوزک‌ها نیز در کنترل تریپس‌های گیاهخوار نقش مهمی دارند. برای مثال، نتایج مطالعه‌ی دلیجورجیدیس و همکاران (۸) نشان داد که حشرات کامل *Coccinella*

گونه‌های مختلف گیاهان میزبان می‌توانند به طور مستقیم از طریق ویژگی‌های ریخت‌شناختی یا ترشح مواد شیمیایی فرار جلب‌کننده و یا غیر مستقیم از طریق تأثیر کیفیت غذایی گیاه میزبان بر ویژگی‌های زیستی آفت در کارایی دشمنان طبیعی تأثیرگذار باشند (۲۱ و ۲۸). برای مثال، گزارش شده است که نرخ شکارگری کنه شکارگر *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans) از تریپس پیاز روی گیاه فلفل شیرین در مقایسه با گیاهان خیار و بادمجان بیشتر است (۲۱). در تحقیقات قبلی، گزارش شده است که هرگاه درصد ماده‌های یک شکارگر روی گیاهان آلوده به آفت افزایش یابد، آن شکارگر کارایی بالایی در کنترل جمعیت آفت خواهد داشت (۱۶ و ۲۸). در تحقیق حاضر بیشترین درصد شکارگرهای ماده روی رقم *Agria* مشاهده گردید و رقم‌های *Savalan*، *Arensa* و *Fantasia* به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. بنابراین، می‌توان احتمال داد که حضور پرتعداد افراد ماده‌ی هر دو شکارگر *A. intermedius* و *O. niger* روی بوته‌های رقم *Agria* با تولید نتایج بیشتر در نسل‌های متوالی، کارایی کنترل تریپس پیاز روی این رقم را افزایش داد. در مجموع، بر اساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان جمع‌بندی کرد که کشت رقم *Agria* در مزارع سیب‌زمینی با کاهش جمعیت تریپس پیاز و افزایش تنوع گونه‌ای شکارگرها می‌تواند در کاهش جمعیت تریپس پیاز و حفاظت و حمایت از دشمنان طبیعی در مزارع سیب‌زمینی مفید باشد.

niger (به عنوان گونه‌های غالب شکارگر) روی ارقام مختلف سیب‌زمینی متفاوت بود. به طوری که، در هر دو سال، تراکم جمعیت این دو شکارگر روی رقم *Agria* بیشتر بود. این نتیجه نشان می‌دهد که این دو گونه شکارگر جلب‌شوندگی بالایی روی بوته‌های سیب‌زمینی رقم *Agria* آلوده به تریپس پیاز دارند و می‌توانند جمعیت این تریپس را روی این رقم کاهش دهند. در مقابل، علی‌رغم تراکم بالای دو گونه شکارگر غالب روی رقم *Savalan*، تراکم تریپس پیاز روی این رقم بالا بود. این نتیجه نشان می‌دهد که بوته‌های سیب‌زمینی رقم *Savalan* نیز جلب‌شوندگی بالایی به این شکارگرها دارند. ولی به احتمال زیاد این رقم حساس به تریپس پیاز بوده و در نتیجه افزایش جمعیت تریپس پیاز روی این رقم بالاتر از قدرت کنترل‌کنندگی این شکارگرها بود. لذا، روی رقم *Savalan* علاوه بر حفاظت و حمایت از دشمنان طبیعی باید از روش‌های کنترل دیگر نیز در کنترل تریپس پیاز استفاده شود. در رقم‌های *Arensa* و *Fantasia* به دلیل پایین بودن تراکم جمعیت تریپس شکارگر و سن شکارگر، تریپس پیاز جمعیت بالایی را داشت. دلیل پایین بودن این شکارگرها روی این دو رقم به احتمال با جلب‌شوندگی کمتر این شکارگرها روی بوته‌های آلوده به تریپس پیاز در این دو رقم در ارتباط بود. متفاوت بودن تراکم جمعیت تریپس پیاز و شکارگرهای غالب آن روی ارقام مختلف سیب‌زمینی می‌تواند با ویژگی‌های ریخت‌شناسی، نوع و ترکیب مواد شیمیایی فرار جلب‌کننده و کیفیت تغذیه‌ای آن‌ها در ارتباط باشد. در تحقیقات قبلی نیز گزارش شده است که ارقام یا

منابع

- 1- Alston D.G., and Drost D. 2008. Onion thrips (*Thrips tabaci*). Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory, USA.
- 2- Aukema B., and Rieger C. 1995. Catalogue of the Heteroptera of the palaearctic region. Netherlands Entomological Society.
- 3- Babaei M.R., Fathi S.A.A., Gilasian G., and Varandi H.B. 2018. Floral preferences of hoverflies (Diptera: Syrphidae) in response to the abundance and species richness of flowering plants. *Zoology in the Middle East* 64: 1-10. (In Persian with English abstract)
- 4- Bei-Bienko G.Y., Blagoveshchenskii D.I., Chernova O.A., Dantsing E.M., Emilianov A.F., Kerzhner I.M., Loginova M.M., Martinova E.F., Shaposhnikov G.K., Sharov A.G., Spuris Z.D., Yaczewski T.L., Yakhontov V.V., and Zhiltsoo L.A. 1967. Keys to the insects of the European USSR. Academy of Sciences of the USSR, Zoological Institute.
- 5- Deligeorgidis P.N. 2002. Predatory effect of *Orius niger* (Wolff) (Hem., Anthocoridae) on *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and *Thrips tabaci* Lindeman (Thys., Thripidae). *Journal of Applied Entomology* 126: 82-85.
- 6- Deligeorgidis P.N., Ipsilandis C.G., Vaiopoulou M., Kaltsoudas G., and Sidiropoulos G. 2005. Predatory effect of *Coccinella septempunctata* on *Thrips tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Applied Entomology* 129: 246-249.
- 7- Dirimanov M., and Dimitrov A. 1975. Role of useful insects in the control of *Thrips tabaci* Lind. and *Myzus persicae* Sulz. on tobacco. VIII International Plant Protection Congress, Moscow, pp. 71-72.
- 8- Disney R.H.L. 1999. Insect biodiversity and demise of alpha taxonomy. *Antenna* 23: 84-88.
- 9- Fathi S.A.A. 2009. The abundance of *Orius niger* (Wolf.) and *O. minutus* (L.) in potato fields and their life table parameters when fed on two prey species. *Journal of Pest Science* 82: 267-272.
- 10- Fathi S.A.A. 2014. Screening of the susceptibility of newly released genotypes of potato to thrips infestation under

- field conditions in northwest Iran. *Crop Protection* 62: 79-85.
- 11- Fathi S.A.A. 2017. Effect of intercropping systems of green bean and clover on biodiversity of natural enemies of *Thrips tabaci* Lindeman. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 40: 13-25. (In Persian with English abstract)
- 12- Fathi S.A.A., Gholami F., Nouri-Ganbalani G., and Mohiseni A. 2011. Life history parameters of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on six commercial cultivars of canola. *Applied Entomology and Zoology* 46: 505-510.
- 13- Fekrat L., Shishehbor P., Manzari S., Soleiman-Nejadian E. 2009. Comparative development, reproduction and life table parameters of three populations of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on onion and tobacco. *Journal of Entomological Society of Iran* 29: 11-23. (In Persian with English abstract)
- 14- Fellowes M.D.E., van Alphen J.J.M., and Jervis M.A. 2005. Foraging behaviour. In: Jervis M.A. (ed.). *Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective*. Springer, Netherlands, pp: 1-71.
- 15- Hsu J.C., Horng S.B., and Wu W.J. 2001. Spatial distribution and sampling of *Aulacaspis yabunikkei* (Homoptera: Diaspididae) in camphor trees. *Plant Protection* 43: 69-81.
- 16- Kelton L.A. 1978. The Anthocoridae of Canada and Alaska: Heteroptera, Anthocoridae, part 4. Agriculture Canada: available from Print. and Pub., Supply and Services Canada.
- 17- Kethley J. 1990. Acarina: Prostigmata (Actinedida). In: Dindal D. L. (ed.). *Soil biology guide*. John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 667-753.
- 18- Koschier E.H., Sedy K.A., and Novak J. 2002. Influence of plant volatiles on feeding damage caused by the onion thrips *Thrips tabaci*. *Crop Protection* 21: 419-425.
- 19- Lewis T. 1997. *Thrips As Crop Pests*. CAB International, Wallingford, UK.
- 20- Loomans A.J.M., Van-Lenteren J.C., Tommasini M.G., Maini S., and Riudavets J. 1995. *Biological Control of Thrips Pests*. Wageningen Agricultural University, USA.
- 21- Magurran A.E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Oxford, Blackwell publishing, 254 pp.
- 22- Minaei K., and Mound L.A. 2008. The Thysanoptera Haplothripini (Insecta: Phlaeothripidae) of Iran. *Journal of Natural History* 42: 2617-2658.
- 23- Mound L.A., and Gillespie P.S. 1997. *Identification Guide To Thrips Associated With Crops In Australia*. CSIRO Entomology, Canberra, Australia.
- 24- Mound L.A., and Kibby G. 1998. *Thysanoptera: An Identification Guide*, 2nd edition. CAB International, Wallingford, UK.
- 25- Pourrahim R., Golnaraghi A.R., and Farzadfar S. 2012. Occurrence of Impatiens necrotic spot virus and Tomato spotted wilt virus on potatoes in Iran. *Plant disease* 96: 771-778.
- 26- Price P.W. 1997. *Insect Ecology*, Third edition. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 27- Price P.W., Bouton C.E., Gross P., McPherson B.A., Thompson J.N., and Weis A.E. 1980. Interactions among three trophic levels: influence of plants on interaction between insect herbivores and natural enemies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 11: 41-65.
- 28- Raspudic E., Ivezic M., Brmez M., and Trdan S. 2009. Distribution of Thysanoptera species and their host plants in Croatia. *Acta agriculturae Slovenica* 93: 275-283.
- 29- Riley D.G., Joseph S.V., Srinivasan R., and Diffie S. 2011. Thrips vectors of tospoviruses. *Journal of Integrated Pest Management* 22: 1-10.
- 30- SAS Institute, 1999. *SAS/Stat user guide*. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- 31- Seaby R.M.H., and Henderson P.A. 2007. *SDR-IV Help Measuring and Understanding Biodiversity*. Pisces Conservation Ltd., Lymington, Hampshire.
- 32- Sedaratian A., Fathipour Y., Talebi A.A., and Farahani S. 2010. Population density and spatial distribution pattern of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on different soybean varieties. *Journal of Agricultural Science and Technology* 12: 275-288.
- 33- Shelton A.M., Plate J., and Chen M. 2008. Advances in control of onion thrips (Thysanoptera: Thripidae) in cabbage. *Journal of Economic Entomology* 101: 438-443.
- 34- Sorenson J.T., Kinn D.N., Doutt R.L., and Cate J.R. 1976. Biology of the mite, *Anystis agilis* (Acari: Anystidae): a California vineyard predator. *Annals of the Entomological Society of America* 69: 905-910.
- 35- Southwood T.R.E., and Henderson P.A. 2000. *Ecological Methods*. Blackwell Science, USA.
- 36- Tajmiri P., Fathi S.A.A., Golizadeh A., and Nouri-Ganbalani G. 2017. Strip-intercropping canola with annual alfalfa improves biological control of *Plutella xylostella* (L.) and crop yield. *International Journal of Tropical Insect Science* 37: 208-216.
- 37- Zarei E., Fathi S.A.A., Hassanpour M., and Golizadeh A. 2019. Assessment of intercropping tomato and sainfoin for the control of *Tuta absoluta* (Meyrick). *Crop Protection* 120: 125-133.



Effect of Different Cultivars of Potato on Population Density of the Onion Thrips, *Thrips tabaci* Lindeman and its Natural Enemies under Field Condition in Ardabil Province

S.A.A. Fathi^{1*}- M. Jafari Jahed²

Received: 25-01-2018

Accepted: 26-09-2020

Introduction: In Iran, potato *Solanum tuberosum* L. is an important crop, and its cultivation extends over more than 186,000 ha annually. The onion thrips, *Thrips tabaci* Lindeman, is a highly polyphagous species and a serious pest of a wide range of economically important crops. In Iran, *T. tabaci* causes damage on different agricultural crops including: potato, onion, cucumber and tobacco. Onion thrips feeds by piercing the surface of the tissues (leaves and leaf buds) and sucking up the exuded cellular contents. On infested leaves, the empty cells create silvery-white spots, silver damage, which cause yield loss. Use of insecticides for controlling *T. tabaci* has low efficacy because females lay eggs within leaf tissues, larvae hide in leaf domatia and between the inner leaves of plants, and pupae rest in the soil. Therefore, it is necessary to use alternative management approaches for control of *T. tabaci* such as resistant cultivars integrated with natural enemies. The interactions between natural enemies and resistant cultivars have a direct effect on the pest by effecting its developmental rate, fecundity and survival rate. They may also have an indirect effect on natural enemies by increasing generation time of the pest and, as a result, increasing exposure time of the pest to its natural enemies. In this study, we assumed that the different potato cultivars affect population density of *T. tabaci* and diversity of its natural enemies. Therefore, the present research was designed to evaluate the onion thrips density and species diversity of its natural enemies on four potato cultivars under field condition.

Materials and methods: Tubers of four potato cultivars including Agria, Savalan, Arensa and Fantasia (commonly cultivated in Ardabil region) were selected for evaluation of population density of *T. tabaci* and diversity of its natural enemies under field condition during 2011-2012. The tubers were obtained from the Seed and Plant Improvement Institute of Karaj, Iran. Tubers of four tested cultivars of potato were planted in four experimental fields, each of 500 m², at four different locations in the Ardabil plain. The fields were managed according to the local practice with flood irrigation and hand weeding once every ten days. No insecticides were applied in these fields.

The onion thrips populations were monitored on the four cultivars of potato from late stem elongation to petal fall stages by examining four plants from each cultivar chosen randomly from each of four fields (16 plants per cultivar). The numbers of thrips larvae and adults and each of natural enemies per plant were counted using a 20X hand lens. Moreover, onion thrips and its natural enemies were collected from each of potato cultivars, transferred to the laboratory, and identified to species by morphological characteristics under a stereomicroscope or a microscope according to the valid identification keys. The Shannon diversity index (*H*), Shannon evanescence index (*E*), and Morisita-Horn index (*C_{MH}*) were then calculated for each of four potato cultivars by use of EstimateS Win 8.20 software (6). Data on population densities of onion thrips and its dominant natural enemies were analyzed using one-way ANOVA and significant differences among cultivars were compared using Tukey's HSD test.

Results and Discussion: In two years, the lowest densities of onion thrips larvae and adults were observed on Agria. In this study, 21 species of onion thrips predator were collected and identified. Amongst the predator species, *Aeolothrips intermedius* Bagnall and *Orius niger* (Wolff) had the highest relative abundance on each of four potato cultivar. The predator *A. intermedius* with small size and ability to penetrate into leaf domatia, faster development rate and higher fecundity is effective in control of herbivore thrips on host plants (19). Moreover, previous researches have reported that the species of *Orius* are efficient in control of onion thrips. The Shannon diversity index for the complex of predators was greatest on Agria. Species richness and their relative abundance are two main factors for measuring Shannon diversity index in each ecosystem. Moreover, the values of Morisita-Horn index for the complex of predators between the four cultivars of potato ranged from 0.948 to 0.989. The value of this index varies between 0 and 1. When the value of this index increases from 0 to 1, the species complex of predators between two cultivars becomes more identical. In two years, densities of two

1 and 2- Professor and Ph.D. Student in Department of Plant Protection, University of Mohaghegh Ardabili, respectively.

(* - Corresponding Author Email: fathi@uma.ac.ir)

predator species *A. intermedius* and *O. niger* on Agria and Savalan were significantly higher than on Arensa and Fantasia. Furthermore, the greatest percentage of females of two predator species was observed on the thrips-infested plants of Agria. These results indicated that the preference and performance of two mentioned predators were higher on Agria and Savalan among the tested cultivars.

Conclusion: Based on the results of our study, it can be concluded that the cultivation of Agria could be useful in reduction of *T. tabaci* population and conservation of its predators in potato fields.

Keywords: Biodiversity, Natural enemies, Population density, Potato, The onion thrips



مقاله کوتاه علمی-پژوهشی

مورچه‌های (Hymenoptera: Formicidae) همیار با شپشک *Paracoccus ficus* در انجیرستان‌های استان فارس

مهدی اسفندیاری^{۱*} - شیمیا محمدی^۲ - مسلم جعفری^۳ - معصومه مقدم^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

چکیده

عسلک ماده شیرینی است که به ویژه توسط حشرات راسته جوربالان مانند شپشک‌های گیاهی ترشح شده و موجب جلب برخی از گونه‌های مورچه و در نتیجه ایجاد نوعی رابطه همیاری میان آنها می‌گردد. در این رابطه معمولاً مورچه‌ها از عسلک حشرات مکنده شیره گیاهی استفاده و در عوض، از آنها در برابر دشمنان طبیعی مانند پارازیتوئیدها و شکارگرها محافظت می‌کنند. همیاری در مورچه و شپشک غالباً اختیاری است. تاکنون گزارش‌هایی از رابطه همیاری بین مورچه‌ها و شپشک‌ها در ایران منتشر شده است. در یک بررسی در سالهای ۹۳-۱۳۹۲ در کلنی‌های شپشک آردالود با نام علمی *Paracoccus ficus* Moghaddam, 2014، مورچه‌های همیار که در حال تغذیه از عسلک این شپشک بودند در شهرهای نیریز، استهبان و شیراز در استان فارس جمع آوری و مطالعه شد. در مجموع ۶ گونه از ۳ زیر خانواده از مورچه‌ها به شرح زیر جمع آوری شدند.

Myrmicinae: *Monomorium abeillei* Andre, 1881; *Tetramorium* sp.; *Pheidole pallidula* Nylander, 1849; *Crematogaster antaris* Forel, 1894; **Formicinae:** *Cataglyphis lividus* Andre, 1881; **Dolichoderinae:** *Tapinoma simrothi* Krausse, 1911.

لازم است مطالعه رفتاری و اکولوژیکی روی مورچه‌ها در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات مورد توجه قرار گیرد و در صورت وجود نقش منفی آنها در مبارزه بیولوژیک، اقدام به کنترل آنها گردد.

واژه‌های کلیدی: شپشک آردالود، مورچه، همیاری، Formicidae

شده است (۸ و ۱۴).

مقدمه

عسلک ماده شیرینی است که توسط حشرات راسته‌های مختلف به ویژه راسته جوربالان مانند شپشک‌های گیاهی و شته‌ها ترشح می‌شود. دفع عسلک در حشرات غالباً دارای جنبه‌های مهم بیولوژیکی است و موجب جلب برخی از گونه‌های مورچه و در نتیجه ایجاد نوعی رابطه همیاری میان آنها می‌گردد (۱۵). همیاری مورچه‌ها با حشرات تولید کننده عسلک تروفوبیوسیس (Trophobiosis) نام دارد (۳). در این رابطه مورچه‌ها از عسلک حشرات مکنده شیره گیاهی استفاده و در عوض، از آنها در برابر دشمنان طبیعی مانند پارازیتوئیدها و شکارگرها محافظت می‌کنند (۱۵).

همیاری در مورچه و شپشک غالباً اختیاری است. همیاری اجباری فقط در گروه‌های معدودی از شپشک‌های نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری وجود دارد که در این موارد شپشک فقط می‌تواند در لانه یا پناهگاه مورچه‌ها زنده بماند. همیاری اجباری منجر به تغییرات مورفولوژیکی و رفتاری برای سازش با زندگی همراه با مورچه‌ها شده است (۵).

مورچه‌ها به دلیل قدرت تولید مثل زیاد و پراکندگی وسیع، دارای تراکم جمعیتی بسیار بالایی در مناطق مختلف دنیا می‌باشند (۶). تاکنون از خانواده Formicidae بیش از ۱۲۰۰۰ گونه در سرتاسر جهان شناسایی شده که در ۲۱ زیرخانواده طبقه بندی شده‌اند (۱۷). پاکستان و همکاران (۱۱) فهرست مورچه‌های ایران را به چاپ رسانده اند و از آن زمان تاکنون بیش از ۱۷۰ گونه مورچه از ایران گزارش

۱ و ۲- به ترتیب دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(Email: esfandiari@scu.ac.ir) (*- نویسنده مسئول)

۳- پژوهشگر ایستگاه تحقیقات انجیر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، استهبان، ایران

۴- پژوهشگر بخش تحقیقات رده‌بندی حشرات، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

DOI: 10.22067/jpp.v34i3.85862

(شهریور ۹۳، تعدادی کارگر از باجگاه)

Formicinae:

Cataglyphis lividus Andre, 1881

(شهریور ۹۲، یک کارگر از استهبان)

Dolichoderinae:

Tapinoma simrothi Krausse, 1911

(شهریور ۹۲ و ۹۳ - تعداد زیادی کارگر از نی ریز و استهبان)

از بین نمونه های جمع آوری شده گونه های *T. simrothi* و *P. pallidula* از انبوهی بیشتری برخوردار بودند. شیران و همکاران (۱۴) نیز گونه *T. simrothi* را به عنوان فراوان ترین گونه همیار با شته ها معرفی نموده اند.

دشمنان طبیعی راه کارهایی نیز برای بکارگیری جوربالان تحت حفاظت مورچه ها به نفع خودشان دارند. به عنوان مثال برخی زنبورهای پارازیتوئید طی کاوشگری در لکه های میزبان نوعی از شاخک زدن را برای کسب عسلک از شته های میزبان به کار می برند. در این نوع رفتار، شاخک ها مشابه شاخک مورچه های همیار روی شته ها ضربه می زنند (۱۲).

محققین شرط موفقیت در کنترل بیولوژیک حشرات مولد عسلک از جمله شپشک های آردآلود را دور نگه داشتن مورچه ها از کلنی این شپشک ها می دانند. البته باید این نکته را مد نظر داشت که همه مورچه ها در کنترل بیولوژیکی آفات نقش منفی ندارند. برخی با داشتن رژیم غذایی شکارگری کمتر به عسلک جلب می شوند و بیشتر از تخم، لارو و حشرات کامل آفات تغذیه می کنند. افزون بر این برخی مورچه ها در گرده افشانی و یا دگرگون ساختن خاک که سبب بهبود کیفیت آن می شود، نقش مهمی را ایفا می کنند (۱۶). بنابراین قبل از هر گونه اقدام علیه مورچه ها باید مطالعه روی شناسایی مورچه ها و سپس مطالعه رفتاری و اکولوژیکی روی آنها در برنامه های مدیریت تلفیقی آفات مورد توجه قرار گیرد و در صورت وجود نقش منفی آنها در مبارزه بیولوژیک، اقدام به کنترل آنها گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی از این پژوهش به شماره پژوهانه (SCU.AP98.671) تشکر و قدردانی می گردد.

رابطه مورچه با جوربالان همواره از نوع همیاری نیست و می تواند به شکل آنتاگونیستی نیز بروز کند. به عنوان مثال سانچز و همکاران (۱۳) رابطه گونه ای مورچه و پسپیل گلابی (*Cacopsylla pyri* L. را مطالعه نموده و متوجه شدند که انبوهی آنها با هم نسبت منفی دارد به طوری که مورچه ها اثر منفی روی نرخ رشد پسپیل ها داشتند و حتی از پسپیل ها تغذیه می کردند و از این طریق تاثیر مثبتی روی مهار بیولوژیک آفت پسپیل گلابی داشتند. تاکنون گزارش های مختلفی از رابطه همیاری بین مورچه ها و شپشک ها (۱، ۴، ۸ و ۱۰) و مورچه ها و شته ها (۹ و ۱۳) در ایران منتشر شده است.

مواد و روش ها

در یک بررسی در سالهای ۹۳-۱۳۹۲ که منجر به شناسایی و توصیف گونه ای جدید از شپشک های آردآلود با نام *Paracoccus ficus* Moghaddam, 2014 روی درختان انجیر در استان فارس گردید (۷)، ضمن بررسی کلنی های شپشک، مورچه های همیاری که درحال تغذیه از عسلک این شپشک بودند در شهرهای نی ریز (منطقه پلنگان)، استهبان (ایستگاه تحقیقات انجیر) و شیراز (دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، باجگاه) جمع آوری و به الکل ۷۵٪ جهت بررسی های بعدی منتقل شدند. نمونه ها با استفاده از کلیدهای شناسایی مانند کالینگوود و آگوستی (۲) و نمونه های موجود در مجموعه حشرات و کنه های اهواز، واقع در گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی و به تایید متخصص رسیدند. گونه های شناسایی شده در محل مجموعه حشرات مذکور نگهداری می شوند.

نتایج و بحث

در مجموع ۶ گونه از ۳ زیر خانواده از مورچه ها به شرح زیر جمع آوری شدند.

Myrmicinae:

Monomorium abeillei Andre, 1881

(شهریور ۹۲، دو کارگر از استهبان)

Tetramorium sp.

(شهریور ۹۲، یک کارگر از استهبان)

Pheidole pallidula Nylander, 1849

(شهریور ۹۲ و شهریور ۹۳ - تعداد زیادی کارگر از استهبان)

Crematogaster antaris Forel, 1894

منابع

- 1- Asadeh Gh. 1991. The fauna of Khuzestan's *Pseudococcus* spp. and their parasitoids and predators. MSc thesis, Shahid Chamran University of Ahvaz. (In Persian)
- 2- Collingwood C.A., and Agosti D. 1996. Formicidae (Insecta: Hymenoptera) of Saudi Arabia (Part 2). Fauna of Saudi Arabia, 15:300-385.

- 3- Delabie J.H.C. 2001. Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an Overview. *Neotropical Entomology* 30(4): 501-516.
- 4- Dezhakam M., and Soleyman-Nejadian E. 2002. Fauna of symbiotic ants with the southern mealybug *Nipaecoccus viridis* New. (Hom: Pseudococcidae), on citrus in Khuzestan. *Scientific Journal of Agriculture* 24(2): 75-100. (In Persian)
- 5- Gullan P.J., and Kosztarab M. 1997. Adaptations in scale insects. *Annual Review of Entomology* 42: 23-50.
- 6- Hölldobler B. and Wilson E.O. 1990. The ants. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- 7- Moghaddam M., and Esfandiari M. 2014. A new species of the genus *Paracoccus* (Hem.: Coccoomorpha: Pseudococcidae) from Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 34(3): 57-61.
- 8- Mohammadi Sh., Mossadegh M.S., and Esfandiari M. 2012. Eight ant species (Hym: Formicidae) new for the fauna of Iran. *Munis Entomology and Zoology* 7(2): 847-851.
- 9- Mortazavi Z.S., Sadeghi H., Aktac N., Depa L., and Fekrat L. 2015. Ants (Hymenoptera: Formicidae) and their aphid partners (Homoptera: Aphididae) in Mashhad region, Razavi Khorasan Province, with new records of aphids and ant species for Fauna of Iran. *Halteres* 6: 4-12.
- 10- Mossadegh M.S., Esfandiari M., and Heidari Z. 2008. The relationship effects of symbiotic ants on biological control of *Nipaecoccus viridis* (New.) by *Cryptolaemus montrouzier* (Mul.) in citrus orchards of North Khuzestan. *Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress*, Hamedan, p. 36.
- 11- Paknia O., Radchenko A.G., Alipanah H., and Pfeiffer M. 2008. A preliminary checklist of the ants (Hymenoptera: Formicidae) of Iran. *Myrmecological News* 11: 151-159.
- 12- Rasekh A., Kharazi Pakdel A., Allahyari H., Michaud J.P., and Farhadi R. 2011. The Effect of hunger on foraging behavior of an aphid parasitoid, *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) on *Aphis fabae* Scopoli. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 41(2): 261-270. (In Persian)
- 13- Sanchez J.A., López-Gallego E., and La-Spina M. 2020. The impact of ant mutualistic and antagonistic interactions on the population dynamics of sap-sucking hemipterans in pear orchards. *Pest Management Science* 76(4): 1422-1434.
- 14- Shiran E., Mossadegh M.S., and Esfandiari M. 2013. Mutualistic ants (Hymemnoptera: Formicidae) associated with aphids in central and southwestern parts of Iran. *Journal of Crop Protection* 2(1): 1-12.
- 15- Stedler B., and Dixon A.F.G. 2008. *Mutualism Ants and their Insect Partners*. Cambridge University Press. New York.
- 16- Way M.J., and Khoo K.C. 1992. Role of ants in pest management. *Annual Review of Entomology* 37: 479-503.
- 17- Ward P.S. 2007. Phylogeny, classification and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa* 1668: 549-563.



Mutualistic Ants (Hymenoptera: Formicidae) Associated with *Paracoccus ficus* in Fig Orchards of Fars Province, Iran

M. Esfandiari^{1*} - Sh. Mohammadi² - M. Jafari³ - M. Moghaddam⁴

Received: 18-04-2020

Accepted: 10-10-2020

Introduction: Ants are the most ubiquitous insects on the earth with more than 12000 species which are classified into 21 subfamilies. Until now, more than 170 ant species have recorded in Iran. Mutualistic relationship between ants and scale insects have been reported in Iran. Such relationships between ants and insects are known as trophobiosis which is due to attraction of ants to honeydew of scale insects. Honeydew is a sugar-rich sticky liquid, secreted by aphids and some scale insects as they feed on plant sap. Ants provide protection from predators and parasitoids by building shelters around scale insect colonies. Such a relationship is mostly facultative and only a few taxa of mostly tropical or subtropical scale insects have obligate mutualism with ants. The coccoids with obligate mutualism display obvious behavioral and morphological adaptations for living with ants. Ants are also able to establish antagonistic interaction with honeydew-producing hemipterans and contribute positively to biological control by the suppression of pests.

Materials and Methods: In a study during 2013-2014, colonies of the mealybug *Paracoccus ficus* Moghaddam, 2014 were investigated for mutualistic ants feeding on honeydew of the mealybug in fig orchards of Neyriz, Estahban and Shiraz cities of Fars province, South Iran. Samples were collected by hand, forceps and soft brush. The specimens were preserved in 75% alcohol in small glass vials and were transferred to the laboratory. The morphological keys were used for identification. Specimens were deposited in Insect and Mite Collection of Ahvaz, at Department of Plant Protection, Shahid Chamran University of Ahvaz.

Results and Discussion: Totally, 6 species belonging to 3 subfamilies of ants were identified as follows:

Myrmicinae: *Monomorium abeillei* Andre, 1881; *Tetramorium* sp.; *Pheidole pallidula* Nylander, 1849; *Crematogaster antaris* Forel, 1894; Formicinae: *Cataglyphis lividus* Andre, 1881; Dolichoderinae: *Tapinoma simrothi* Krausse, 1911.

Among collected species, *T. simrothi* and *P. pallidula* were more frequent. *T. simrothi* has also recorded as most frequent mutualistic ants with aphids in Central Iran. Natural enemies exploit hemipterans which receive ant protection for their benefit. For example, some parasitoid wasps soliciting honeydew directly from aphids by antennation and mimicking ants during foraging in host patches. Researchers believe that preventing ants from colonies of Pseudococcidae scale insects is necessary for success in biological control of such pests. However, not all of ants have negative effects in biological control of pests. Predatory ants are less attracted to the honeydew and mostly feed on egg, larvae and adult insects. Moreover, some ants are important in pollination, soil improvement, and nutrient cycling.

Conclusion: Behavioral and ecological should be carried on ants in pest management programs, and only if they have a negative influence on biological control of scale insects, then perform control measures for ants.

Keywords: Ants, Formicidae, Mutualism, Mealybug

1 and 2- Associate Professor and Former M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, respectively.

(* - Corresponding Author Email: esfandiari@scu.ac.ir)

3- Researcher, Fig Research Station, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (Areco), Estahban, Iran

4- Researcher, Insect Taxonomy Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

مقاله علمی-پژوهشی

اثر روغن های گیاهی بر کارایی علف کش ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی (*Avena ludoviciana* Durieu.)

حسین حمامی^{۱*} - محمد حسن راشد محصل^۲ - مهدی پارسا^۳ - محمد بنایان اول^۴ - اسکندر زند^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۲۵

چکیده

به منظور بهبود کارایی علف کش ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی، آزمایش گلخانه ای پاسخ به مقدار با نه روغن گیاهی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۱ انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل غلظت های صفر، ۴۶/۸۷، ۹۳/۷۵، ۱۸۷/۵، ۲۸۱/۲۵ و ۳۷۵ گرم ماده موثره در هکتار علف کش ستوکسیدیم با و بدون روغن های گیاهی منداب، زیتون، سویا، ذرت، آفتابگردان، کلزا، کنجد، کرچک و پنبه دانه انجام شد. علاوه بر این یک آزمایش دیگر برای تعیین ترکیب اسیدهای چرب روغن های گیاهی انجام شد. همه روغن های گیاهی کارایی ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی را بهبود دادند و آن ها را می توان بر اساس مقادیر پتانسیل نسبی به ترتیب منداب < زیتون < سویا < ذرت < آفتابگردان < کلزا < کنجد < کرچک < پنبه دانه درجه بندی کرد. نتایج کلی نشان داد که با افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع روغن های گیاهی کارایی علف کش ستوکسیدیم بهبود می یابد. منداب و پنبه دانه به ترتیب با بیش ترین (۷۱/۱۷) و کمترین (۲۰/۶۵) درصد اسیدهای چرب غیراشباع بیش ترین و کمترین کارایی را دارا بودند. در میان اسیدهای چرب غیراشباع تشکیل دهنده روغن های گیاهی، محتوای اسید چرب لینولئیک نقش کلیدی در کارایی داشت. همچنین یک رابطه منفی بین محتوای اسید لینولئیک و کارایی روغن های گیاهی وجود داشت. کاربرد ستوکسیدیم روی چغندر قند و پیاز اثرات سمی معنی داری نداشت.

واژه های کلیدی: اسیدهای چرب غیراشباع، روغن های گیاهی، ستوکسیدیم، لینولئیک اسید

مقدمه

جهان به شمار می روند. نتایج بررسی ها نشان می دهد که با وجود اقدامات مدیریتی گسترده از دهه های قبل هنوز کاهش ۱۰ درصدی عملکرد ناشی از حضور علف های هرز توسط محققین تایید می شود (۱۰). از مهم ترین علف های هرز باریک برگی که در ایران منجر به بروز خسارت در محصولات زراعی مختلف می شوند می توان به یولاف وحشی اشاره کرد. گونه های مختلف یولاف وحشی از جمله مهم ترین علف های هرز خانواده گندمیان بوده که در محصولات زراعی مختلف (زمستانه و بهاره) بسیار مشکل ساز می باشند. در جهان بیش از ۵۰ گونه ی یولاف وحشی وجود دارد که در بیش از ۲۰ محصول زراعی در ۵۵ کشور جهان به عنوان گیاه هرز مسئله ساز شناخته شده اند (۳۲). گزارش های کاظمی و شیمی (۱۶) و کوزنس و همکاران (۷) به ترتیب حاکی از خسارت های ۳۰ و ۵۰ درصدی ناشی از این گیاه هرز در محصولات زراعی است.

جلوگیری از تولید بذر، رعایت تناوب زراعی، بوجاری بذور، شخم و استفاده از علف کش ها از جمله مهم ترین روش های مدیریت این علف هرز است. در میان روش های مدیریت یولاف وحشی در ایران،

جمعیت جهان به شدت رو به افزایش است. به طوری که از ۲/۵ میلیارد در سال ۱۹۵۰ به ۶/۱ میلیارد نفر در سال ۲۰۰۰ رسیده است. این اطلاعات حاکی از افزایش بیش از ۲/۴ برابری جمعیت بین این سال ها است. حتی با توجه به کاهش سرعت رشد جمعیت در سال های اخیر باید به این نکته توجه داشت که پیش بینی ها نشان می دهد که جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ به ۹/۱ میلیارد نفر می رسد (۶). بنابراین یکی از مهم ترین چالش های پیش روی انسان ها تامین غذا است. علف های هرز به عنوان یکی از مهم ترین موانع تولید در

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
(*) نویسنده مسئول: Hhamami@birjand.ac.ir

۲، ۳ و ۴- به ترتیب استاد، دانشیار و استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۵- استاد مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مدیریت شیمیایی رایج‌ترین روش است (۳). علف‌کش‌های زیادی به منظور کنترل این علف‌هرز در ایران به ثبت رسیده‌اند که از آن جمله می‌توان به هالوکسی‌فوپ اتوکسی‌اتیل، هالوکسی‌فوپ‌آرمتیل، فنوکسپروپ‌پی‌اتیل، پروپاکوئیزافوپ، سولفوسولفورون، دیفنزوکوات، دیکلوفوپ متیل، ستوکسیدیم، سیکلوکسیدیم، ترالکوکسیدیم و غیره اشاره کرد (۴۲، ۴۳، ۴۴). کاربرد زیاد این علف‌کش‌ها منجر به بروز مشکلاتی همچون بروز مقاومت و آلودگی‌های زیست‌محیطی شده است. پیامدهای ناگوار زیست‌محیطی کاربرد علف‌کش‌ها بسیار زیاد است. بنابراین با توجه به نیاز به تولید غذا و از طرفی دیگر وجود اثرات زیست‌محیطی مخرب زیاد در نتیجه کاربرد علف‌کش‌ها به نظر می‌رسد که بهینه‌سازی کاربرد علف‌کش‌ها یکی از مهم‌ترین مسائلی است که باید به آن توجه کرد. با توجه به آمار مصرف آفت‌کش‌ها در جهان که بیش از سه میلیون تن ماده فعال گزارش شده (۳۶) و این مطلب که کمتر از ۱/۰ درصد از مواد بکار رفته به جایگاه عمل واقعی می‌رسند و در واقع سهم بسیار زیادی از این مواد به محل‌های غیر هدف می‌رسند (۲۳) و با توجه به اینکه بیش از ۴۸ درصد این مواد را علف‌کش‌ها تشکیل می‌دهند، ضرورت بهینه‌سازی کاربرد علف‌کش‌ها بسیار مهم به نظر می‌رسد (۴۴).

کاربرد مواد افزودنی یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین روش‌های بهینه‌سازی کارایی علف‌کش‌ها است. امروزه روغن‌های گیاهی به عنوان یکی از مهم‌ترین مواد افزودنی، با اثرات سمی کمتر نسبت به سایر مواد افزودنی (۱۴) شناخته شده و به همراه علف‌کش‌ها بکار می‌روند. خصوصیات ترکیبات موجود در روغن‌های گیاهی می‌تواند بر خصوصیات محلول پاششی مانند کشش سطحی، قدرت نفوذ و عبور محلول علف‌کش از کوتیکول و در نهایت کارایی کنترلی علف‌کش اثر بگذارد (۱۴ و ۳۰). بنابراین تعیین رابطه بین خصوصیات روغن‌های گیاهی و کارایی آن‌ها می‌تواند عامل کلیدی در انتخاب روغن مناسب برای افزایش کارایی علف‌کش‌ها باشد. هدف از انجام مطالعه فوق تعیین بهترین روغن گیاهی از نظر افزایش کارایی ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی و بیان دلایل اثرگذاری متفاوت روغن‌های گیاهی به کمک ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌ها و تعیین مهم‌ترین ترکیب موثر موجود در روغن‌های گیاهی بر کارایی ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی بود.

مواد و روش‌ها

روش تهیه، آماده‌سازی و تعیین ترکیب روغن‌ها

به منظور تعیین درصد اسیدهای چرب روغن‌های گیاهی منداب، سویا، پنبه، آفتابگردان، زیتون، کرچک، کنجد، ذرت و کلزا ابتدا همه روغن‌ها به استثنای روغن زیتون به روش مکانیکی استخراج شدند (۱۷). روغن زیتون با استفاده از روش سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در

دقیقه) و از میوه تهیه شد (۳۱).

برای آماده‌سازی نمونه‌ها ابتدا از هر یک از روغن‌ها ۱۵ قطره جدا کرده و به لوله‌های آزمایش درب دار مجزا منتقل گردیده و سپس به هر کدام از نمونه‌ها ۷ میلی‌لیتر آن - هگزان نرمال اضافه کرده و لوله را خوب تکان داده تا ترکیبات فوق با یکدیگر مخلوط شوند و سپس ۲ میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکسید متانولی (۱۱/۲ m/v) به هر یک از لوله‌های آزمایش اضافه گردید. سپس از هر کدام از نمونه‌های فوق ۴ نمونه تهیه و به مدت ۱ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد. لوله‌های آزمایش حاوی نمونه به بن ماری با دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در طی این مدت لوله‌ها ۲ تا ۳ بار تکان داده شدند. در نهایت لوله‌های آزمایش را در ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و فاز رویی را برداشته و پس از عبور از سولفات سدیم جهت رطوبت‌گیری، نمونه‌ها صاف شده و جهت تزریق به دستگاه GC آماده شدند (۳۹). پس از تبدیل اسیدهای چرب به مشتق متیل استر، نمونه‌ها به دستگاه GC مدل Acme 6000 برای تفکیک تزریق شدند. دتکتور^۲ یونش شعله‌ای در دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با نسبت هوا : هیدروژن : هلیوم: ۲۰:۳۰:۳۰۰ میلی‌لیتر بود. جداسازی ترکیبات در ستون موئین Fused silica نوع DBX5 با قطر داخلی ۰/۲۲ میکرومتر، ضخامت فیلم نازک ۰/۲۵ میکرومتر به طول ۳۰ متر صورت گرفت. از گاز هلیوم با خلوص بسیار بالا (۹۹/۹۹۹٪) به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای جداسازی اسیدهای چرب از برنامه دمایی زیر استفاده شد: دما ابتدا به مدت ۵ دقیقه ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد بوده و سپس با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد رسیده و سپس از ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و در دمای ۲۸۰ درجه به مدت ۳ دقیقه ثابت نگه داشته شد. دمای آشکارساز ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محل تزریق ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت شکافت ۴۰:۱ و سرعت جریان گاز هلیوم به داخل ستون ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه انتخاب شدند. حجم تزریق نمونه ۱ میکرولیتر بوده و برای شناسایی اسیدهای چرب، زمان بازداری هر یک از نمونه‌ها با زمان بازداری استانداردهای متیل استر تحت شرایط آزمایشی یکسان مقایسه شده و زمان بازداری هر یک از گونه‌ها مشخص شد (۲۳).

آزمایش‌های پاسخ به مقدار علف‌کش

بذرهای یولاف وحشی در بهار ۱۳۹۱ از محوطه پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری شدند. پس از انجام آزمایش مقدماتی

1-Gas chromatography Acme 6000 (Younglin, South Korea)

2- Detector

درصد از مویان سیتوگیت^۱ به عنوان امولسیون کننده به روغن‌های گیاهی قبل از اضافه شدن به محلول علف‌کش اضافه شد. هر یک از روغن‌های گیاهی حاوی امولسیون کننده به میزان پنج درصد حجمی (پنج در هزار) مورد استفاده قرار گرفتند.

اندام‌های هوایی گیاهان شاهد و تیمار شده چهار هفته پس از اعمال تیمارها از روی سطح خاک گلدان برداشت شدند و وزن تر و خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد و از میانگین وزن خشک در هر گلدان برای برازش منحنی‌های پاسخ به غلظت به کمک نرم‌افزار R استفاده شد.

پاسخ وزن خشک یولاف وحشی به مقدار محلول علف‌کش در حضور روغن‌های گیاهی مختلف با تکنیک رگرسیون غیرخطی و با استفاده از نرم‌افزار R آنالیز شد. تمامی داده‌ها به طور همزمان با مدل چهار پارامتری لجستیک (معادله ۲) برازش داده شدند (۴، ۵):

$$U_{ij} = \frac{D - C}{1 + \exp[b_i(\log(z_{ij}) - \log(ED_{50i}))]} \quad (1)$$

که در آن U_{ij} بیانگر وزن خشک j ام که موجب پاسخ در غلظت i ام فرمولاسیون (z_{ij}) می‌شود، D حد مجانب بالا و C حد مجانب پایین وزن خشک در غلظت‌های صفر (شاهد) و توصیه‌شده فرمولاسیون (بیش‌ترین غلظت) علف‌کش، $ED_{50(i)}$ مقدار فرمولاسیون، i ، لازم برای ۵۰ درصد کاهش وزن خشک علف‌هرز و b_i متناسب با شیب منحنی در محدوده $ED_{50(i)}$ می‌باشند (۴ و ۵). بخش میانی منحنی که بیانگر ویژگی موسوم به فعالیت ذاتی علف‌کش در گیاه است اهمیت علمی خاصی را دارد. استفاده از ED_{50} از روش‌های مهم نشان دادن تمایز بین اثرات علف‌کش‌ها و مواد افزودنی است (۲۸). مقادیر علف‌کش و علف‌کش بعلاوه روغن‌های گیاهی که موجب پاسخ یکسانی می‌شوند را می‌توان با استفاده از اختلاف جابجایی افقی منحنی‌های پاسخ به غلظت مورد مقایسه قرار داد. در این مورد تفاوت جابجا شدگی افقی دو منحنی نشان‌دهنده تاثیر تیمار آزمایشی در مقایسه با فرمولاسیون است. جابجا شدگی افقی، بیانگر نسبت بین مقادیر علف‌کشی است که منتهی به پاسخ یکسان می‌شود. این نسبت، پتانسیل نسبی یا (R) نامیده می‌شود که بر اساس معادله ۲ محاسبه می‌شود (۲۸):

$$R = \frac{ED_{50a}}{ED_{50b}} \quad (2)$$

در معادله فوق ED_{50a} و ED_{50b} به ترتیب نشانگر مقادیری از (ED_{50}) تیمارهای علف‌کش و علف‌کش بعلاوه روغن‌های گیاهی با اثرات مشابه محسوب می‌شوند. پتانسیل نسبی مشخص‌کننده این است که چه مقدار از فرمولاسیون مورد آزمون در مقایسه با علف‌کش به همراه روغن‌های گیاهی، بیشتر یا کمتر، باید به کار رود (۱۹). اگر

(آزمایش جوانه‌زنی در درون پتری دیش بدون اعمال تیمارهای خواب شکنی) به منظور جوانه‌دار کردن بذور مشخص شد که بذرها جمع‌آوری شده دارای خواب هستند. به منظور ضد عفونی کردن و شکستن خواب بذرها از روش‌های زیر استفاده شد، پس از جداسازی پوسته اطراف بذرها، ضد عفونی سطحی آن‌ها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۵٪ v/v) به مدت ۵ دقیقه صورت گرفته و سپس ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. بذرها درون پتری دیش‌های شیشه‌ای با قطر ۱۱ سانتیمتر که حاوی یک لایه کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) بودند، قرار داده شده و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۲ گرم در لیتر نیتрат پتاسیم (KNO_3) به هر یک از پتری دیش‌ها اضافه شد. پتری دیش‌های حاوی بذر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد (در درون یخچال) در تاریکی مطلق (پتری دیش‌های حاوی بذور به وسیله یک لایه فویل آلومینیومی ضخیم و دو لایه پلاستیک مشکی پوشانده شدند) نگهداری شدند. پس از اعمال سرما، پتری دیش‌ها به ژرمیناتور با دوره دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت در تاریکی مطلق، به ترتیب با رطوبت نسبی ۴۵ و ۶۵ درصد، برای شکستن خواب، جوانه‌دار شدند (۱، ۱۱ و ۲۵).

یک روز قبل از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها، هر گلدان به وسیله شیر آب آبیاری که دارای هدایت الکتریکی برابر با ۹۱۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود تا حد غرقابی آبیاری شدند. پس از اینکه بذور در ژرمیناتور جوانه‌دار شدند، پتری دیش‌ها به گلخانه منتقل شدند و تعداد ده گیاهچه یولاف وحشی با ریشه‌چه یکسان و سالم به سطح خاک گلدان‌های ۱/۵ لیتری به قطر ۱۴ سانتی‌متر حاوی خاک (لومی رسی)، خاک برگ و ماسه بادی با نسبت حجمی مساوی منتقل شدند. سپس روی گیاهچه‌های یولاف وحشی خاک پاشیده شد (روی سطح بذرها به طور کامل پوشانده شد). گلدان‌ها هر روز آبیاری می‌شدند. در مرحله یک برگی گیاهچه‌ها به چهار گیاهچه در هر گلدان تنک شدند و به میزان ۳۰ میلی‌لیتر از محلول ۳ گرم در لیتر کود $N:P:K$ (۲۰:۲۰:۲۰) به هر یک از گلدان‌ها اضافه شد (۱۳). دمای گلخانه در مدت رشد، بین ۲۷ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد در طول روز و ۱۸ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد در طول شب متغیر بود. گیاهان در مرحله چهار برگی با استفاده از سمپاش متحرک ریلی مجهز به نازل بادبزی معمولی با خروجی ۲۳۸ لیتر در هکتار با فشار پاشش ۲۰۰ کیلو پاسکال تحت تیمار قرار گرفتند. تیمارهای آزمایش شامل غلظت‌های صفر، ۲۳/۴۴، ۴۶/۸۷، ۹۳/۷۵، ۱۸۷/۵، ۲۸۱/۲۵ و ۳۷۵ گرم در هکتار ماده موثره علف‌کش ستوکسیدیم در ده سطح (۱) بدون روغن گیاهی، و روغن‌های گیاهی: (۲) منداب (۳) سویا، (۴) پنبه‌دانه، (۵) آفتابگردان، (۶) زیتون، (۷) کرچک، (۸) کنجد، (۹) ذرت و (۱۰) کلزا در سه تکرار بودند. به منظور آماده‌سازی هر یک از روغن‌های گیاهی بالا، میزان پنج

برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. داده‌ها از طریق نرم‌افزار SAS در سطح احتمال ۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

اثر نوع و درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌های گیاهی بر افزایش کارایی ستوکسیدیم

نتایج آنالیز رگرسیونی به کمک معادله چهار پارامتره لجستیک (معادله ۱) و پتانسیل نسبی (معادله ۲) در جدول ۱ نشان داده شده است. با استفاده از معادله ۲ مقادیر پتانسیل نسبی برای روغن‌ها محاسبه شده و در مقایسه بهبود کارایی توسط روغن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. هنگامی که هر کدام از روغن‌های گیاهی به محلول علف‌کش ستوکسیدیم افزوده شد پتانسیل نسبی به مقدار قابل توجهی افزایش پیدا کرده و در نهایت کارایی ستوکسیدیم افزایش یافت.

روغن منداب با پتانسیل نسبی $4/0.28$ بیش‌ترین و روغن پنبه‌دانه با $1/2.45$ کمترین میزان پتانسیل نسبی برای افزایش کارایی را داشتند. میزان تاثیر روغن‌های گیاهی بر افزایش کارایی به ترتیب از زیاد به کم منداب، زیتون، سویا، ذرت، آفتابگردان، کلزا، کنجد، کرچک و پنبه بود (جدول ۱). مطالعات دیگری که توسط سایر محققین انجام شده است نشان‌دهنده افزایش کارایی علف‌کش‌های ستوکسیدیم (۸؛ ۲۰)، دیکلوفوپ و فلوزایفوپ بوتیل (۲۱)، فن مدیفام (۸)، ایزوکسافلوتول (۳۸)، نیکوسولفورون (۲۴)، کلتودیم (۱۵)، اسی فلورفن (۲۴)، ریم سولفورون (۳۸)، دیکلوفوپ متیل، سیکلوسیدیم و کلودینافوپ پروپازیل (۲۹) در نتیجه کاربرد روغن‌های گیاهی بود.

در منابع متنوع دلایل مختلفی برای افزایش کارایی علف‌کش در حضور روغن‌های گیاهی مانند کاهش کشش سطحی (۳۰، ۳۳)، بهبود تشکیل اسپری پاششی پس از خروج از نازل (۹)، نشست بهتر و یکنواخت تر پاشش (۳۹) و افزایش نفوذ علف‌کش از طریق افزایش حلالیت پذیری کوتیکول (۳۰) شناخته شده است.

جدول ۲ خلاصه‌ای از نتایج ارزیابی نوع و درصد اسیدهای چرب مختلف به کمک دستگاه GC را نشان می‌دهد. ترکیب روغن‌های گیاهی که به عنوان عامل اصلی تعیین‌کننده خصوصیات روغن‌ها شناخته می‌شود به عوامل متعددی نظیر گونه گیاهی و شرایط محیطی که گیاه در آن رشد کرده است وابسته است. از جمله مهم‌ترین عوامل محیطی که بر کمیت و کیفیت ترکیبات موجود در روغن‌های استحصال‌شده از گیاهان تاثیر می‌گذارد می‌توان به نور، درجه حرارت، بارندگی، طول روز، عرض جغرافیایی، خصوصیات خاک، ارتفاع محل و تغذیه گیاه اشاره کرد (۲). با توجه به تاثیر بسیار زیاد عوامل محیطی یادشده بر خصوصیات کمی و کیفی روغن‌های گیاهی، برای دست یافتن به نتایج دقیق در مورد روغن‌های گیاهی نیاز به تعیین دقیق

R برابر یک باشد، تیمارها دارای پتانسیل نسبی یکسانی خواهند بود. اگر R بزرگ‌تر از یک باشد، کاربرد علف‌کش به همراه روغن‌های گیاهی دارای فعالیت شاخ و برگ بیشتری نسبت به کاربرد علف‌کش به تنهایی خواهد بود و اگر R کوچک‌تر از یک باشد، نشان‌دهنده اثر منفی کاربرد روغن‌های گیاهی بر کارایی علف‌کش مورد آزمایش خواهد بود. به عبارتی دیگر، اگر پتانسیل نسبی کوچک‌تر و یا بزرگ‌تر از یک باشد، استفاده از روغن‌های گیاهی موجب کاهش و یا افزایش کارایی یا فعالیت شاخ و برگ علف‌کش شده‌اند (۱۳).

بررسی اثر سمی ستوکسیدیم به همراه روغن‌های گیاهی بر زیست توده چغندر قند و پیاز

پس از پایان آزمایش پاسخ به غلظت این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد با استفاده از گیاهان زراعی چغندر قند (رقم لاتیا فرانسوی) و پیاز (رقم سپیدان) انجام گرفت. یک روز قبل از کاشت بذور، خاک (لومی رسی) گلدان‌ها آماده‌شده و گلدان‌های ۳ لیتری پر شدند و به صورت کامل تا حد غرقاب گلدان‌ها به وسیله آب شیر آبیاری شدند. بذور گیاهان زراعی فوق، در گلدان‌های حاوی خاک (لومی رسی) در سطح خاک کشت شده و سپس روی بذرها تا پوشیده شدن کامل آن‌ها خاک ریخته شد. سپس به منظور کاهش تبخیر آب از روی خاک سطح گلدان‌ها و یکنواختی جوانه زنی و سبز شدن بذرها، از پلاستیک نایلونی برای پوشاندن سطح گلدان‌ها استفاده شد. ۴ روز پس از کاشت گلدان‌ها پلاستیک نایلونی سطح آن‌ها برداشته شد. پس از آن در مرحله ۲ برگه حقیقی گیاهان هر گلدان تنک شده و در دو مرحله به ۴ بوته در هر گلدان رسید. آبیاری هر ۲ روز یکبار بر اساس نیاز گیاه توسط شیر آب انجام می‌گردید. از آنجایی که پذیرش ۱۰ درصد خسارت به محصول (در شرایطی که ۹۰ درصد علف هرز کنترل شود) از جانب علف‌کش به منظور ارزیابی ویژگی انتخابی بودن هر علف‌کشی مورد قبول است (۳۷)، از این‌رو، برای اجرای این آزمایش از مقادیری از علف‌کش با و بدون هر یک از مواد افزودنی مذکور که برای کاهش ۹۰ درصد وزن خشک علف‌هرز یولاف وحشی لازم بود و غلظت‌های بیشتر استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل غلظت موثر ۹۰ درصد (ED_{90}) بر حسب گرم در هکتار ماده موثره علف‌کش ستوکسیدیم در ده سطح (۱ بدون روغن گیاهی، و روغن‌های گیاهی: ۲ منداب (۳ سویا، ۴ پنبه‌دانه، ۵ آفتابگردان، ۶ زیتون، ۷ کرچک، ۸ کنجد، ۹ ذرت و ۱۰ کلزا و گیاه زراعی در دو سطح (پیاز و چغندر قند) بودند. ۴ هفته پس از اعمال تیمارها، اندام‌های هوایی گیاهان زراعی موجود در هر یک از گلدان‌ها از روی سطح خاک برداشت شدند و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. از میانگین وزن خشک در هر گلدان

اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده آن‌ها و درصد هر کدام است. ترکیب شده است (۱۲، ۱۸، ۲۷، ۳۴، ۳۵ و ۴۰). اسیدهای چرب و درصد هر کدام توسط سایر محققین نیز گزارش

جدول ۱- نتایج آنالیز رگرسیونی، پارامترهای معادله چهار پارامتره لجستیک و پتانسیل نسبی

Table 1- Results of regression analysis, equation parameters of four logistic parameters and relative potential

تیمارها Treatments	حد بالا Upper limit	حد پایین Lower limit	شیب منحنی Curve slope	دز موثر ۵۰ درصد ED ₅₀ (g ai L ⁻¹)	آزمون عدم برازش Lack of fit test	پتانسیل نسبی Relative potency
ستوکسیدیم Sethoxydim	0.7664 (± 0.0166)	0.0826 (± 0.0189)	1.0067 (± 0.0622)	110.144 (± 6.300)	0.646 (NS)	1
ستوکسیدیم + روغن منداب Sethoxydim+Turnip oil	0.7831 (± 0.0201)	0.0700 (± 0.0230)	0.7311 (± 0.1072)	27.344 (± 2.946)	0.4106 (NS)	4.028
ستوکسیدیم + روغن ذرت Sethoxydim+Corn oil	0.7869 (± 0.0192)	0.0929 (± 0.0168)	0.9765 (± 0.0168)	37.629 (± 2.987)	0.4910 (NS)	2.927
ستوکسیدیم + روغن زیتون Sethoxydim+Olive oil	0.7692 (± 0.0740)	0.1011 (± 0.0130)	1.0139 (± 0.0132)	31.810 (± 2.312)	0.2291 (NS)	3.463
ستوکسیدیم + روغن سویا Sethoxydim+Soybean oil	0.7790 (± 0.0180)	0.0701 (± 0.0160)	0.9886 (± 0.1013)	35.003 (± 2.578)	0.6290 (NS)	3.147
ستوکسیدیم + روغن آفتابگردان Sethoxydim+Sunflower oil	0.7869 (± 0.0146)	0.0794 (± 0.0308)	0.9707 (± 0.0488)	39.998 (± 2.541)	0.2308 (NS)	2.754
ستوکسیدیم + روغن کنجد Sethoxydim+Sesame oil	0.7843 (± 0.0144)	0.0592 (± 0.0167)	1.2457 (± 0.0590)	55.751 (± 2.852)	0.5530 (NS)	1.976
ستوکسیدیم + روغن کلزا Sethoxydim+Canola oil	0.7799 (± 0.0159)	0.0837 (± 0.0264)	1.1233 (± 0.0589)	52.856 (± 3.247)	0.6701 (NS)	2.084
ستوکسیدیم + روغن کرچک Sethoxydim+Castor oil	0.7942 (± 0.0203)	0.0941 (± 0.0189)	1.3511 (± 0.0897)	61.439 (± 4.0704)	0.4085 (NS)	1.793
ستوکسیدیم + روغن پنبه‌دانه Sethoxydim+Cottonseed oil	0.7721 (± 0.0191)	0.0851 (± 0.0258)	1.2480 (± 0.0821)	88.449 (± 6.217)	0.0756 (NS)	1.245

اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشند.

Data in parentheses showed standard errors

NS: معنی‌دار نبودن آزمون عدم برازش نشان‌دهنده برآورد مناسب پارامترهای معادله چهار پارامتره لجستیک است.

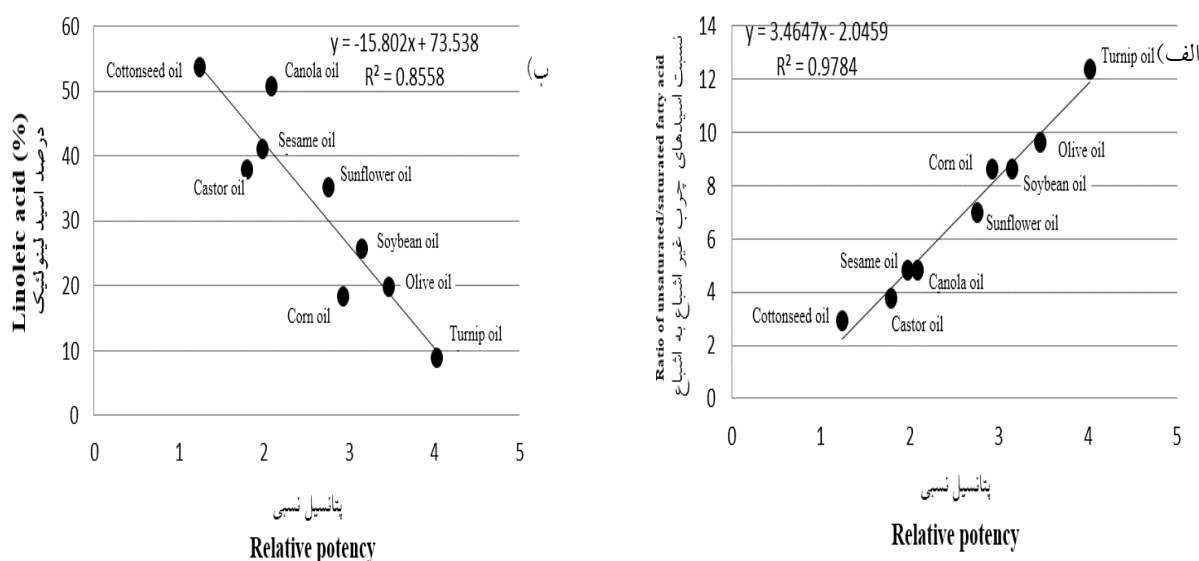
NS: Non-significant lack of fit test showed proper estimate of parameters in four logistic equation.

اسیدهای چرب در هر کدام از این گروه‌ها است. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که میزان تاثیر روغن‌های گیاهی بر افزایش کارایی به مقدار زیادی وابسته به ترکیب اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع (شکل ۱، جدول ۲) است. با توجه به شکل ۱ می‌توان به این نتیجه رسید که با افزایش میزان اسیدهای چرب غیراشباع نسبت به اسیدهای چرب اشباع در روغن‌های گیاهی بر میزان پتانسیل نسبی ستوکسیدیم در کنترل یولاف‌وحشی افزوده می‌شود. یکی از دلایلی که ممکن است باعث افزایش کارایی بیشتر روغن‌های دارای محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع شود مربوط به افزایش قدرت نفوذ در کوتیکول و حلالیت بیشتر موم کوتیکولی است (۲).

بتی و همکاران (۲) نشان دادند که روغن‌های گیاهی که از گیاهان پرورش‌یافته در عرض‌های جغرافیایی بالا که دمای هوا در آنجا پایین بوده و کمتر از عرض‌های جغرافیایی پایین است استخراج شدند دارای درصد اسیدهای چرب غیراشباع بیشتری هستند. با توجه به نتایج منتشرشده توسط ایزدی دربندی و همکاران (۱۴) کاربرد روغن‌های گیاهی می‌تواند منجر به افزایش کارایی علف‌کش‌ها در کنترل علف‌های هرز شده و در نتیجه مقادیر مصرفی علف‌کش‌ها به شدت کاهش یابد. این محققین علاوه بر بیان افزایش کارایی علف‌کش‌های به کار رفته با فرمولاسیون امولسیون به حدود ۶ برابر (برای کاربرد روغن‌های منداب و سویا) نشان دادند که میزان تاثیر روغن‌های گیاهی بر افزایش کارایی علف‌کش‌های مورد مطالعه به شدت وابسته به ترکیب اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع و نوع

روغن‌های گیاهی در این تحقیق نشان داده شده است (شکل ۱). افزایش محتوای اسید چرب لینولئیک منجر به کاهش کارایی روغن در افزایش کارایی ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی شد. گزارش ایزدی و همکاران (۱۴) رابطه منفی کارایی علف‌کش‌های سولفوسولفورون و ایمازامتابنزمیتیل را با میزان اولئیک اسید (C18:1) و رابطه مثبت کارایی علف‌کش‌های سولفوسولفورون و ایمازامتابنزمیتیل را با میزان پالمیتیک اسید (C16:0) نشان داد. همچنین آن‌ها نشان دادند که بین میزان افزایش کارایی علف‌کش‌های سولفوسولفورون و ایمازامتابنزمیتیل و میزان اسیدهای چرب استئاریک اسید (C18:0)، پالمیتولئیک اسید (C16:1)، لینولئیک اسید (C18:2) و لینولئیک اسید (C18:3) رابطه‌ای وجود نداشت. عوامل مختلف دیگری نیز می‌تواند بر کارایی کاربرد علف‌کش‌ها به همراه روغن‌های گیاهی تاثیرگذار باشد. به عنوان مثال ایزدی و همکاران (۱۴) گزارش کردند که اثر روغن‌های گیاهی بر کارایی سولفوسولفورون بسیار کمتر از ایمازامتابنزمیتیل بود. اختلاف عمده این دو علف‌کش مربوط به فرمولاسیون آن‌ها بود. فرمولاسیون ایمازامتابنزمیتیل از نوع امولسیون بود درحالی‌که فرمولاسیون سولفوسولفورون از نوع گرانوله و قابل بود.

نتایج بررسی انجام‌شده توسط ایزدی و همکاران (۱۴) عکس نتایج این مطالعه بود و آن‌ها بیان داشتند که با افزایش نسبت اسیدهای چرب اشباع به غیراشباع بر میزان کارایی علف‌کش‌ها در کنترل یولاف وحشی افزوده می‌شود. بتی و همکاران (۲) در آزمایش انجام‌شده در شرایط موم شبیه‌سازی شده، نشان دادند که به ترتیب روغن متیله شده گیاهی، روغن گیاهی و روغن نفتی سبب حلالیت موم کوتیکولی از زیاد به کم شدند. نتایج مانتی و نالوجوا (۲۲) نشان داد که روغن متیله شده آفتابگردان بیشتر از روغن آفتابگردان و روغن سان اسپری ۱۱ ان موجب حلالیت موم اپی کوتیکولاری شد. بنابراین به نظر می‌رسد قدرت حلالیت و نرم کردن موم کوتیکولی مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده میزان افزایش کارایی در نتیجه کاربرد روغن‌های گیاهی باشد (۳۳، ۴۱). نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که در میان اسیدهای چرب غیراشباع اهمیت و تاثیرگذاری انواع اسیدهای چرب غیراشباع بیش‌ترین اهمیت و تاثیرگذاری مربوط به اسید چرب لینولئیک است (شکل ۱) در حالی‌که در گزارش دیگری محتوای اسید اولئیک (رابطه منفی) و پالمیتیک (رابطه مثبت) اهمیت بیشتری در تاثیرگذاری بر کارایی علف‌کش‌ها داشتند (۱۴). رابطه منفی قوی موجود بین پتانسیل نسبی و درصد اسید چرب لینولئیک موجود در



شکل ۱- رابطه بین نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع (الف) و درصد اسید لینولئیک (ب) با پتانسیل نسبی روغن‌های گیاهی در افزایش کارایی ستوکسیدیم در کنترل یولاف وحشی

Figure 1- Relationship between ratio of unsaturated/saturated fatty acid (a) and linoleic acid (b) with relative potency of vegetable oil in increasing sethoxidim performance on wild oat control

اثر ستوکسیدیم به همراه روغن‌های گیاهی بر زیست توده چغندر قند و پیاز

اختلاف معنی‌داری بین وزن خشک بوته‌های پیاز و چغندر قند شاهد و غلظت‌های بهینه‌شده (ED_{90}) علف‌کش ستوکسیدیم با و بدون مواد افزودنی مورد آزمایش مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده عدم تغییر در خاصیت انتخابی علف‌کش ستوکسیدیم در نتیجه استفاده از روغن‌های گیاهی بود. همان‌طور که زند و باغستانی (۴۲ و ۴۴) بیان کردند عدم وجود آنزیم حساس به این علف‌کش در گیاهان زراعی پهن‌برگ عامل عمل انتخابی این علف‌کش‌ها و کاربرد آن‌ها به عنوان باریک‌برگ‌کش در محصولات زراعی پهن‌برگ است. بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان بیان کرد که در غلظت (ED_{90}) علف‌کش ستوکسیدیم (در حضور روغن‌های گیاهی) هیچ اثری بر گیاهان زراعی پهن‌برگ نداشتند.

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که کاربرد روغن‌های گیاهی به مقدار

منابع

زیادی پتانسیل نسبی ستوکسیدیم را افزایش داد. بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات انجام‌شده توسط سایر محققین (۱۳، ۱۹، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۹، ۳۲، ۴۰ و ۴۴) به نظر می‌رسد که کاربرد روغن‌های گیاهی به عنوان یک ابزار بسیار مناسب می‌تواند جایگزین مواد افزودنی مصنوعی شود. یافته‌های ما در این تحقیق نشان داد که نوع و ترکیب اسیدهای چرب نقش بسیار مهمی در افزایش کارایی ستوکسیدیم داشت بطوریکه با افزایش میزان اسیدهای چرب غیراشباع بر میزان پتانسیل نسبی روغن‌ها بر افزایش کارایی ستوکسیدیم در کنترل یولاف‌وحشی افزوده شد. نوع اسیدهای چرب غیراشباع موجود در روغن نیز بر کارایی ستوکسیدیم بسیار موثر بود بطوریکه روغن‌هایی که دارای محتوای اسید لینولئیک کمتری بودند باعث افزایش بیشتر پتانسیل نسبی شدند. نتایج این مطالعه حاکی از عدم تاثیر مشخص و بارز توسط سایر اسیدهای چرب بر کارایی ستوکسیدیم بودند. تحقیقات بیشتر در زمینه تعیین مکانیسم عمل روغن‌های گیاهی در افزایش کارایی علف‌کش‌ها نیاز است.

- 1- Andersen R.N. 1968. Germination and Establishment of Weeds for Experimental Purposes. A Weed Science Society of America Handbook. Urbana, USA.
- 2- Beattie A., Watson D., Stevens M., Rae D., and Spooner- Hart R. 2012. Sustainable pest and disease Management.
- 3- Baghestani M.A., Zand E., Soufizadeh S., Jamali M., and Maighani F. 2007. Evaluation of sulfosulfuron for broadleaved and grass weed control in wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. Crop Protection 26: 1385-1389.
- 4- Cabanne F., Gaudry J., and Streibig J.C. 1999. Influence of alkyl oleates on efficacy of phenmedipham applied as an acetone:water solution on *Galium aparine*. Weed Research 39: 57-67.
- 5- Cabanne F. 2000. Increased efficacy of clodinafop-propargyl by terpeneols and synergistic action with esterified fatty acids. Weed Research 40: 181-189.
- 6- Carvalho F.P. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. Environmental Science and Policy 9: 685-692.
- 7- Cousens R.D., Weaver S.E., Martin T.D., Blair A.M., and Wilson J. 1991. Dynamic of competition between wild oat (*Avena fatua*) and winter cereals. Weed Research 31: 203-210.
- 8- DeRuiter H., Uffing A.J.M., and Meinen E. 1997. Influence of emulsifiable oils and emulsifier on the performance of phenmedipham, metoxuron, sethoxydim, and quizalofop. Weed Technology 11: 290-297.
- 9- Ejim C.E., Fleck B.A., and Amirfazli A. 2007. Analytical study for atomization of biodiesels and their blends in a typical injector: surface tension and viscosity effects. Fuel 86: 1534-1544.
- 10- Ghorbani R., Rashed Mohasel M.H., Hosseini A., Mosavi K., and Haj Mohammadnia ghalibaf K. 2009. Sustainable weed management. Published by Ferdowsi university of Mashhad.
- 11- Hammami H., Rashed Mohassel M.H., and Aliverdi A. 2011. Surfactant and rainfall influenced clodinafop-propargyl efficacy to control wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu.). Australian Journal of Crop Science 5: 39-43.
- 12- Hazen J.L. 2000. Adjuvants terminology, classification and chemistry. Weed Technology 14: 773-784.
- 13- Hsiao A.I., Liu S.H., and Quick W.A. 1996. Effect of ammonium sulfate on the phytotoxicity, foliar uptake, and translocation of Imazamethabenz in wild oat. Plant Growth Regulation 15: 115-120.
- 14- Izadi-Darbandi E., Aliverdi A., and Hammami H. 2013. Behavior of vegetable oils in relation to their influence on herbicides' effectiveness. Industrial Crops and Products 44: 712-717.
- 15- Jordan D.L., Vidrine P.R., Griffin J.L., and Reynolds D.B. 1996. Influence of adjuvants on efficacy of clethodim. Weed Technology 10: 738-743.
- 16- Kazemi H., and Shimi P. 2005. Determination of the host range of *Fusarium moniliforme* isolated from winter wild oat (*Avena ludoviciana*) in Iran. Iranian Journal of Weed Science 1: 67-72.
- 17- Kemper T.G. 2005. Industrial Oil and Fat Products, Oil Extraction. Sixth Edition, John Wiley & Sons, Inc.

- 18- Kim J., Kim D.N., Lee S.H., Yoo S.H., and Lee S. 2010. Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behavior and oil uptake. *Food Chemistry* 118: 398-402.
- 19- Kudsk P., and Mathiasen S.K. 2004. Joint action of amino acid biosynthesis inhibiting herbicides. *Weed Research* 44: 313-322.
- 20- Matysiak R., and Nalewaja J.D. 1999. Temperature, adjuvants, and UV light affect sethoxydim phytotoxicity. *Weed Technology* 13: 94-99.
- 21- Manthey F.A., Nalewaja J.D., and Szeleziank E.F. 1989. Esterified seed oils with herbicides. In: *Adjuvants and Agrochemicals*, Vol. II (eds Chow, P.N.P., Ggrant, C.A., Hinshalwood, A.M. and Simundsson, E.). 139-148 pp. CRC Press, Boca Roton, FL.
- 22- Manthy F.A., and Nalewaja J.D. 1992. Relative wax solubility and phytotoxicity of oil to green foxtail. In: foy CL,ed, *Adjuvants for Agrochemical*. Boca Raton, Florida, USA: CRC press. 463-471.
- 23- Mehmood S., Orhan I., Ahsan Z., Aslan S., and Gulfraz M. 2008. Fatty acid composition of seed oil of different *Sorghum bicolor* varieties. *Food Chemistry* 109: 855-859.
- 24- Nandula V.K., Curran W.S., Roth G.W., and Harting N.L. 1995. Effectiveness of adjuvants with nicosulfuron and primisulfuron for wirestem muhly (*Muhlenbergia frondosa*) control in no-till corn (*Zea mays*). *Weed Technology* 9: 525-530.
- 25- Nandula V.K., and Messersmith C.G. 2003. Imazamethabenz-resistant wild oat (*Avena fatua* L.) is resistant to diclofop-methyl. *Pesticide Biochemistry and Physics* 74: 53-61.
- 26- Nalewaja J.D., Praczyk T., and Matysiak R. 1995. Surfactants and oils adjuvants with nicosulfuron. *Weed Technology* 9: 689-695.
- 27- Rafalowski R., Zegarska Z., Kuncewicz A., and Borejszo Z. 2008. Fatty acid composition, tocopherols and beta-carotene content in polish commercial vegetable oils. *Pakistan Journal of Nutrition* 7: 278-282.
- 28- Rashed- Mohassel M.H., Rastgo M., Mousavi S.K., Valiollahpour R., and Haghighi A. 2006. *Principles of weed science* (translation). Ferdowsi University of Mashhad Press. (In Persian)
- 29- Rashed-Mohassel M.H., Aliverdi A., Hammami H., and Zand E. 2010. Optimizing the performance of diclofop-methyl, cycloxydim, and clodinafop-propargyl on littleseed canarygrass (*Phalaris minor*) and wild oat (*Avena ludoviciana*) control with adjuvants. *Weed Biology and Management* 10: 57-63.
- 30- Rashed-Mohassel M.H., Aliverdi A., and Rahimi S. 2011. Optimizing dosage of sethoxydim and fenoxaprop-p-ethyl with adjuvants to control wild oat. *Industrial Crops and Products* 34: 1583-1587.
- 31- Rubio J.C. 2008. *Olive Oil History and Facts*. Acites Toledo SA. Pp 20.
- 32- Salehian H., and Eshaghi O. 2012. Growth analysis some weed species. *International Journal of Agriculture Crop Science* 4: 730-734.
- 33- Sharma S.D., and Singh M. 2000. Optimizing foliar activity of glyphosate on *Bidens frondosa* and *Panicum maximum* with different adjuvant types. *Weed Research* 40: 523-533.
- 34- Shibahara A., Yamamoto K., and Kinoshita A. 2008. High-speed analysis of the major components of fatty acid methyl esters by capillary gas chromatography. *Lipid Technology* 20: 88-90.
- 35- Soler L., Caiellias J., and Saura-Calixto F. 1988. Oil content and fatty acid composition of developing almond seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36: 695-697.
- 36- Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R., and Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418:671- 677.
- 37- Tind T., Mathiesen T.J., Jensen J.E., Ritz C., and Streibig J.C. 2009. Using a selectivity index to evaluate logarithmic spraying in grass seed crops. *Pest Management Science* 65: 1257-1262.
- 38- Tonks D.J., and Eberlein C.V. 2001. Postemergence weed control with rimsulfuron and various adjuvants in potato (*Solanum tuberosum*). *Weed Technology* 15: 613-616.
- 39- Tu Y.Q., Lin Z.M., and Zhang J.Y. 1986. The effect of leaf shape on the deposition of spray droplets in rice. *Crop Protection* 5: 3-7.
- 40- Were B.A., Onkware A.O., Gudu S., Welander M., and Carlsson A.S. 2006. Seed oil content and fatty acid composition in east African sesame (*Sesamum indicum* L.) accessions evaluated over 3 years. *Field Crop Research* 97: 254-260.
- 41- 46-Young B.G., and Hart S.E. 1998. Optimizing foliar activity of isoxaflutole on giant foxtill (*Setaria faberi*) with various adjuvants. *Weed Science* 46: 397-402.
- 42- Zand, E. and Baghestani M. A. 2002. *Weed Resistance to Herbicide*. Published by Jahad Daneshgahi of Mashhad, Mashhad.
- 43- Zand A., Mosavi K., and Heidari A. 2015. *Herbicides and their Application*. Published by Jahad Daneshgahi of Mashhad, Mashhad.
- 44- Zand E., Nezamabadi N., Baghestani M.A., Shimi P., and Mousavi S.K. 2017. *A Guide to Chemical Control of Weeds in Iran*. Published by Jahad Daneshgahi of Mashhad, Mashhad.



Effect of Vegetable Oils on Sethoxydim Efficacy on the Control of Wild Oat (*Avena ludoviciana* Durieu.)

H. Hammami^{1*}- M.H. Rashed Mohassel²- M. Parsa³- M. Bannayan-Aval⁴- E. Zand⁵

Received: 05-01-2014

Accepted: 16-07-2014

Introduction: Sethoxydim is a post emergence graminicide that control annual and perennial grasses such as wild oat (*Avena ludoviciana* Durieu.) and littleseed canarygrass (*Phalaris minor* Retz.) by inhibitory activity on acetyl coenzyme A carboxylase enzyme and disrupt fatty acid biosynthesis. It belongs to the cyclohexanone chemical family. It was registered for weed management in broad leaf crops. Using an adjuvant (e.g. vegetable oils and surfactants) that can increase the foliar activity of post emergence herbicides by cuticle destruction and increase leaf wetting is an acceptable way to achieve this approach. Applying vegetable oils increased graminicide penetrate to leaf and post emergence herbicides performance. Some synthetic adjuvants have been shown a side effect on wildlife, similar to agrochemicals therefore using safe and reproducible adjuvants is essential. The objective of this research is to determine the best vegetable oil on biological activity of sethoxydim on wild oat and relation between compounds of vegetable oils (fatty acids) and their effects on sethoxydim performance.

Materials and Methods: The dose response experiment was conducted in Research Greenhouse of Ferdowsi University of Mashhad in 2012. The seeds of wild oat were collected from plants in the fields of the Mashhad Agricultural and Natural Resources Research Center, in Mashhad, Iran and preserved at room temperature in paper bag. The seeds were surface sterilized by immersing in sodium hypochlorite for 5 minutes. Then seeds were rinsed by distilled water for 15 minutes. To increase seed germination before the start of experiment, the seeds were dehulled and placed in Petri dishes on top of a single layer of Whatman no. 1 filter paper. Then, 10 mL of 0.2% KNO₃ solution were added to each Petri dish for breaking dormancy, then the seeds were incubated for 72 h at 4–5°C in the dark. The germinated seeds were sown in pot (1.5 L). One week after sowing plants were thinned to four plant in each pot. The pots were irrigated every days. At four leaf stage of wild oat plants the herbicide treatment were applied. The treatments included sethoxydim concentration at seven levels (0, 23.4, 46.8, 93.75, 187.5, 281.25 and 375 g ai ha⁻¹ of sethoxydim) and vegetable oils at ten levels (without oil and with turnip, olive, soybean, corn, sunflower, canola, sesame, castor, and cotton oil). The response of wild oat biomass were analyzed by non-linear regression by R software. To determine toxicity of sethoxydim plus vegetable oils on sugar beet and onion an experiment by recommended dose of sethoxydim was conducted. Moreover, an experiment was carried out to determine the fatty acid content and quantity of each vegetable oil. To determine the chemical nature of fatty acid oils, 15 drops of each vegetable oil were added to 7 mL N-hexane plus 2 mL of potassium hydroxide in methanol (11.2% m/v). Then, four replications of the supplied compounds were shaken for 1 min and heated to 55°C for 5 min until the solution was separated into two phases. The upper phase was desiccated with sodium lauryl sulfate and filtered to analyze with gas chromatography. The fatty acid content was determined using gas chromatography Acme 6000 (Younglin, South Korea) equipped with a flame ionization detector and a CP-Sil 88 Wcot fused silica column (100 m × 0.25 mm i.d. × 0.2 µm film thickness; Chrompack, Middleburg, Netherlands). The carrier gas was ultrahigh-purity helium; we used a 1:100 split mode and a flame-ionization detector. The GC oven temperature was maintained at 140 °C for 5 min, then ramped to 240°C at the rate of 4°C/min and maintained at 240°C for 15 min. The flow rate of helium was 20 mL/min. The injector and detector temperatures were 250 and 280°C, respectively. The volume of injected sample was 1 µL. Fatty acids were identified by matching their retention times with those of their relative standards.

Results and Discussion: Results of this study showed that sethoxydim performance improved in the presence of vegetable oils whereas relative potency were higher than 1 in the presence of vegetable oils compared to sethoxydim alone. The vegetable oil could be ranked based on their relative potency value as: turnip

1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

(*- Corresponding Author Email: Hhammami@birjand.ac.ir)

2, 3 and 4- Professor, Associated Professor and Professor, Department of Agronomy, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

5- Professor, Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

> olive > soybean > corn > sunflower > canola > sesame > castor > cotton. The overall results showed that the efficacy of sethoxydim was improved by increasing the content of unsaturated fatty acids in vegetable oils. Turnip and cottonseed oils with 71.17 and 20.65 percentages of unsaturated fatty acids had the highest and lowest performance, respectively. Among the polyunsaturated fatty acids compounds, linoleic acid content had a key role in the efficiency. There was a negative relationship between linoleic acid content and the performance of vegetable oils. Moreover, non-significant toxicity effects on sugar beet and onion was observed.

Conclusion: Based on this work, when the vegetable oils used the performance of sethoxydim on wild oat control based on relative potency were improved. Therefore, synthetic adjuvants can be replaced by vegetable oils as adjuvants in herbicide application. Based on results of this work, composition of fatty acids in vegetable oil is a very effective factors for increasing sethoxydim performance on wild oat control. By increasing unsaturated fatty acids, the sethoxydim performance showed more performance whereas turnip oil with higher unsaturated fatty acids was showed the highest performance. Further research is needed to determine the mechanism of action of vegetable oils in increasing the effectiveness of herbicides.

Keywords: Linoleic acid, Sethoxydim, Unsaturated fatty acids, Vegetable oils

مقاله علمی-پژوهشی

تأثیر توالی و فاصله زمانی افزودن ماده افزودنی و سولفوسولفورون به آب سخت در کنترل یولاف وحشی زمستانه (*Avena sterilis ssp. ludoviciana* Durieu.)

اکبر علی وردی^{۱*} - سمیه پدرخانی^۲ - گودرز احمدوند^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۴

چکیده

اینکه آیا توالی و فاصله زمانی افزودن ماده افزودنی و علف کش به آب سخت می تواند کارایی علف کش را تحت تاثیر قرار دهد یا خیر تاکنون بدون پاسخ مانده بود. در آزمایش دُر-پاسخ که در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه بوعلی سینا اجرا شد، شش مقدار از سولفوسولفورون با آب مقطر و آب سخت حاوی کاتیون های Ca^{++} ، Na^{+} و Fe^{+++} (۶۰۰ میلی گرم در لیتر از نمک کربناتی) با و بدون افزودن اسیدسیتریک (۵۰۰ میلی گرم در لیتر) یا سولفات آمونیوم (۲۰ گرم در لیتر) نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن علف کش به حامل های پاشش بر روی یولاف وحشی زمستانه در مرحله چهار برگی پاشیده شد. نتایج تجزیه و تحلیل رگرسیون غیرخطی نشان داد که برعکس سولفات آمونیوم که بر کارایی سولفوسولفورون بی تاثیر بود، افزودن اسیدسیتریک به آب مقطر با هر توالی و فاصله زمانی نسبت به سولفوسولفورون باعث بهبود کارایی سولفوسولفورون شد. حضور کاتیون های Ca^{++} ، Na^{+} و Fe^{+++} در حامل پاشش مقدار سولفوسولفورون لازم برای کاهش ۹۰ درصدی وزن خشک یولاف وحشی زمستانه را به ترتیب از ۹/۸۰ به ۲۷/۶۰، ۴۷/۴۸ و ۵۰/۳۲ گرم در هکتار افزایش داد. بین شدت ناسازگاری کاتیون های Ca^{++} و Fe^{+++} اختلاف معنی داری مشاهده نشد. افزودن هر دو ماده افزودنی نیم ساعت بعد از افزودن سولفوسولفورون به آب مقطر حاوی کاتیون ها هیچ تاثیری در رفع اثر ناسازگار کاتیون ها بر کارایی سولفوسولفورون نداشت. برعکس، افزودن سولفوسولفورون نیم ساعت بعد از افزودن مواد افزودنی به آب مقطر حاوی کاتیون ها بهترین کارایی سولفوسولفورون را رقم زد. بنابراین، موضوع توالی صحیح افزودن ماده افزودنی و علف کش به آب سخت حایز اهمیت است. عدم اطلاع از این موضوع، نه تنها سبب عدم کنترل علف هرز بلکه هزینه های اضافی به کشاورز تحمیل خواهد کرد.

واژه های کلیدی: املاح آب سخت، علف کش اسیدی ضعیف، کیفیت آب سمپاشی

مقدمه

توسعه علف کش ها در دهه ۱۹۴۰، روش شیمیایی کنترل علف های هرز همیشه به عنوان مهمترین روش شناخته شده است. زیرا کاربرد این روش آسان، مؤثر و مقرون به صرفه است (۴۶). کارایی علف کش ها در مهار علف های هرز تحت تاثیر عوامل متعددی مانند مرحله رشدی علف هرز، فرمولاسیون علف کش، شرایط آب و هوایی در قبل، حین و بعد از کاربرد علف کش و فناوری کاربرد علف کش قرار دارد. علاوه بر این، از آنجایی که برای کاربرد علف کش ها اغلب به آب احتیاج است؛ لذا، ویژگی کمی آن مانند حجم پاشش (۳۸) و ویژگی کیفی آن مانند سختی، اسیدیته، کدورت و دما نقش مؤثری در کارایی آنها ایفا می کنند (۸). کشاورزان معمولاً از همان آبی که برای آبیاری استفاده می کنند برای کاربرد علف کش ها استفاده می کنند (۲). بخشی از کیفیت منابع آب کشاورزی مربوط به میزان بارش آسمانی و بخشی دیگر مربوط به جنس بستر زمین (حضور لایه های آهکی و نمکی در آن) است. این دو عامل سبب شده است تا در مناطق خشک جهان

در سیستم های زراعی، علف های هرز به عنوان مهمترین نگرانی کشاورزان مطرح هستند. آنها برای کسب منابعی مانند آب، مواد غذایی و نور با گیاهان زراعی رقابت می کنند و سبب کاهش شدید عملکرد گیاهان زراعی می شوند (۹). تاکنون، روش های متعددی برای کنترل علف های هرز معرفی شده است. با این وجود، از زمان کشف و

۱- استادیار علوم علف های هرز، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(*) نویسنده مسئول: (Email: a.aliverdi@basu.ac.ir)

۲- کارشناسی ارشد شناسایی و مبارزه با علف های هرز، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳- دانشیار فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

می‌تواند کارایی سولفوسولفورون را تحت تاثیر قرار دهد یا خیر وجود ندارد. پاسخ‌دهی به این سوال، دومین و مهمترین هدف آزمایش حاضر بود.

مواد و روش‌ها

در اواخر بهار ۱۳۹۷، بذرهای یولاف وحشی زمستانه از حاشیه مزرعه‌ای در شهرستان مریانج استان همدان جمع‌آوری و تا شروع آزمایش درون یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مزرعه، سابقه کاربرد علف‌کش سولفوسولفورون وجود نداشت. در اوایل پاییز ۱۳۹۷، لما و پالئی بذرها به صورت دستی از آنها جدا شد تا شرایط برای ایجاد یکنواختی در جوانه‌زنی فراهم شود. به منظور تسریع در جوانه‌زنی، بذرها پیش‌تیمار شدند. برای این کار ابتدا، بذرها درون محلول هیپوکلرید سدیم پنج درصد به مدت پنج دقیقه غوطه‌ور، با آب مقطر شستشو و سپس، درون پتری‌دیش‌هایی با قطر ۱۱ سانتی‌متری حاوی یک لایه کاغذ صافی خیس شده با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۲ گرم نیترات پتاسیم در لیتر قرار داده شدند. پتری‌دیش‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در تاریکی درون یخچال و سپس به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شدند (۲). با این کار، جوانه‌زنی حدوداً ۱۰۰ درصدی بذرها حاصل شد. با مشاهده اولین علائم خروج ریشه‌چه، بذرها برای کشت درون گلدان‌ها به گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان منتقل شدند. تعداد هشت گیاهچه با طول ریشه‌چه یک سانتی‌متری و طول کولتوپتیل نیم سانتی‌متری در هر گلدان سه لیتری به ابعاد ۱۱×۱۳×۱۳ سانتی‌متر از جنس پلاستیکی با مقطع مربعی شکل قهوه‌ای رنگ حاوی خاک:ماسه بادی:کود دامی به ترتیب با نسبت ۱:۱:۴ در عمق یک سانتی‌متری خاک کشت شدند. بر حسب نیاز، گلدان‌ها به صورت برابر آبیاری و علف‌های هرز داخل آنها در زمان پرورش یولاف وحشی زمستانه به طور مستمر وجین دستی شدند.

آزمایش به صورت واکنش به مقدار علف‌کش به صورت فاکتوریل ($4 \times 4 \times 7$) در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل مقدار سولفوسولفورون (آپیروس، گرانول وتابل ۷۵ درصد) در شش سطح صفر، ۱/۲۵، ۲/۵۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ گرم سولفوسولفورون در هکتار بود. بر اساس دستورالعمل برچسب علف-کش، مقدار ۲۶/۶ گرم سولفوسولفورون در هکتار برای کاربرد در شرایط مزرعه توصیه شده است. با این وجود، براساس تجربه قبلی (۳) مبنی بر حساسیت بالاتر یولاف وحشی زمستانه پرورش یافته در شرایط گلخانه به سولفوسولفورون در مقایسه با شرایط مزرعه، حداکثر مقدار سولفوسولفورون در این آزمایش برابر ۲۰ گرم در هکتار انتخاب و بکار برده شد. فاکتور دوم شامل نوع حامل پاشش در چهار سطح آب مقطر، آب مقطر حاوی کلرید سدیم (NaCl، مرک آلمان)، آب

مانند ایران، کیفیت منابع آب کشاورزی با چالش‌های جدی روبرو شود. بررسی‌ها نشان می‌دهند که وضعیت نامطلوب کمیت منابع آب کشاورزی کشور در سال‌های آتی تشدید خواهد شد (۲۶). از این‌رو، استفاده از آب‌هایی با کیفیت پایین (سخت و شور) برای کاربرد علف‌کش‌ها در حال حاضر و آینده اجتناب‌ناپذیر خواهد بود (۱).

اثر ناسازگار حضور املاح کاتیونی سدیم، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، منگنز و آهن در آب سخت بر کارایی علف‌کش‌های اسیدی ضعیف (ضریب تفکیک اسیدی (pKa) اینگونه علف‌کش‌ها کمتر از هفت است) به وسیله محققان متعددی به اثبات رسیده است. برای مثال، گلایفوسیت (۲، ۲۳، ۴۱ و ۴۶)، گلو فوسینات (۴۳)؛ دایکامبا (۸)، توفوردی (۳۴)، کلتودیم (۳۰)، ستوکسیدیم (۲۹)، سالفونازیل (۳۹)، ایمازاتاپیر (۱)، تمبوتریون (۴۸)، مزوتریون (۹)، نیکوسولفورون (۱۵) و سینوسولفورون (۱۸). این اثر ناسازگار به علت تشکیل نمک علف‌کش-کاتیون است که به دلیل حالیت پایین آن در آب قادر به عبور (جذب) از کوتیکول برگ علف هرز نیست؛ لذا، سبب افت شدید کارایی علف‌کش می‌شود. علاوه براین، رسوب این نمک‌ها در مجاری، صافی‌ها، نازل‌ها و مخزن سمپاش سبب انسداد آنها می‌شوند (۲۷). راهکارهای متعددی جهت تقلیل اثر ناسازگار حضور املاح کاتیونی در آب سخت بر کارایی علف‌کش‌ها ابداع و معرفی شده است که عبارتند از کاهش حجم پاشش (۲)، افزودن مواد افزودنی مانند اسید سیتریک (۴۵)، سولفات آمونیوم (۸، ۴۳)، نیترات آمونیوم (۳۵)، فسفات پتاسیم (۴۸)، استات تترا دی‌آمین اتیلن (۷)، گلوکوهیپونات و لیگنین سولفونات (۶)، سولفات تیوآمونیم (۳۱) به مخزن سمپاش، مغناطیسی کردن آب سخت (۱ و ۲) و اسمز معکوس کردن آب سخت (۲۳).

براساس طبقه‌بندی کمیته کاری مقاومت به علف‌کش، سولفوسولفورون یکی از اعضای علف‌کش‌های گروه B، بازدارنده بیوستنز اسیدهای آمینه، است که دارای ویژگی اسیدی ضعیف با pKa برابر ۳/۵ است (۴) که برای مهار علف‌های هرز باریک برگی مانند یولاف وحشی زمستانه (*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana*) (Durieu). در مزارع گندم کشور به ثبت رسیده است. با این حال، هیچ گزارشی مبنی بر اینکه آیا کارایی سولفوسولفورون همانند سایر علف‌کش‌های اسیدی ضعیف تحت تاثیر املاح کاتیونی موجود در آب سخت قرار می‌گیرد یا خیر وجود ندارد. پاسخ‌دهی به این سوال، اولین هدف آزمایش حاضر بود. علاوه براین، در منابع و در عمل مشاهده می‌شود که در روش افزودن مواد افزودنی به مخزن سمپاش برای تقلیل اثر ناسازگار حضور املاح کاتیونی در آب سخت بر کارایی علف‌کش‌ها، "بالافاصله" بعد از افزودن ماده افزودنی به حامل پاشش (آب مخزن سمپاش)، علف‌کش به حامل پاشش اضافه می‌شود. لذا، هیچ گزارشی مبنی بر اینکه آیا توالی افزودن ماده افزودنی و علف‌کش و نیز فاصله زمانی بین افزودن آنها به حامل پاشش حاوی آب سخت

واکنش وزن خشک تک بوته یولاف وحشی زمستانه به تیمارها با روش تجزیه و تحلیل رگرسیون غیرخطی با کمک مدل چهار پارامتری لجستیک (معادله ۱) و با استفاده از نرم افزار R نسخه ۲٫۶٫۲ تخمین زده شد (۳۶). براساس نتایج آزمون عدم برازش ($p > 0.05$) (value)، این مدل برازش قابل قبولی روی داده‌ها فراهم کرد. همچنین، با بررسی نمودار باقی‌مانده‌ها، توزیع مستقل، تصادفی و یکنواخت آنها محرز گردید.

$$Y = \frac{C + (D - C)}{1 + \exp[B(\log X - \log ED)]} \quad \text{معادله ۱}$$

در این معادله: Y بیانگر وزن خشک تک بوته یولاف وحشی زمستانه، D و C به ترتیب حدود مجانب‌های بالا و پایین وزن خشک یولاف وحشی زمستانه در مقادیر صفر و بی‌نهایت سولفوسولفورون، پارامتر ED₅₀ بیانگر مقدار سولفوسولفورون لازم (X) برای کاهش ۵۰ درصدی وزن خشک یولاف وحشی زمستانه بین حدود مجانب‌های بالا و پایین (D و C) است، و B متناسب با شیب منحنی در محدوده ی پارامتر ED₅₀ می‌باشد. با کمک کدهای دستوری نرم‌افزار، مقادیر پارامتر ED₉₀ منحنی‌های واکنش به مقدار علف‌کش نیز تخمین زده شد (۳۶)؛ لذا، از این پارامتر برای بیان نتایج این آزمایش استفاده شد. برای مقایسه آماری بین مقادیر پارامتر ED₉₀ از خطای استاندارد آنها استفاده شد.

نتایج و بحث

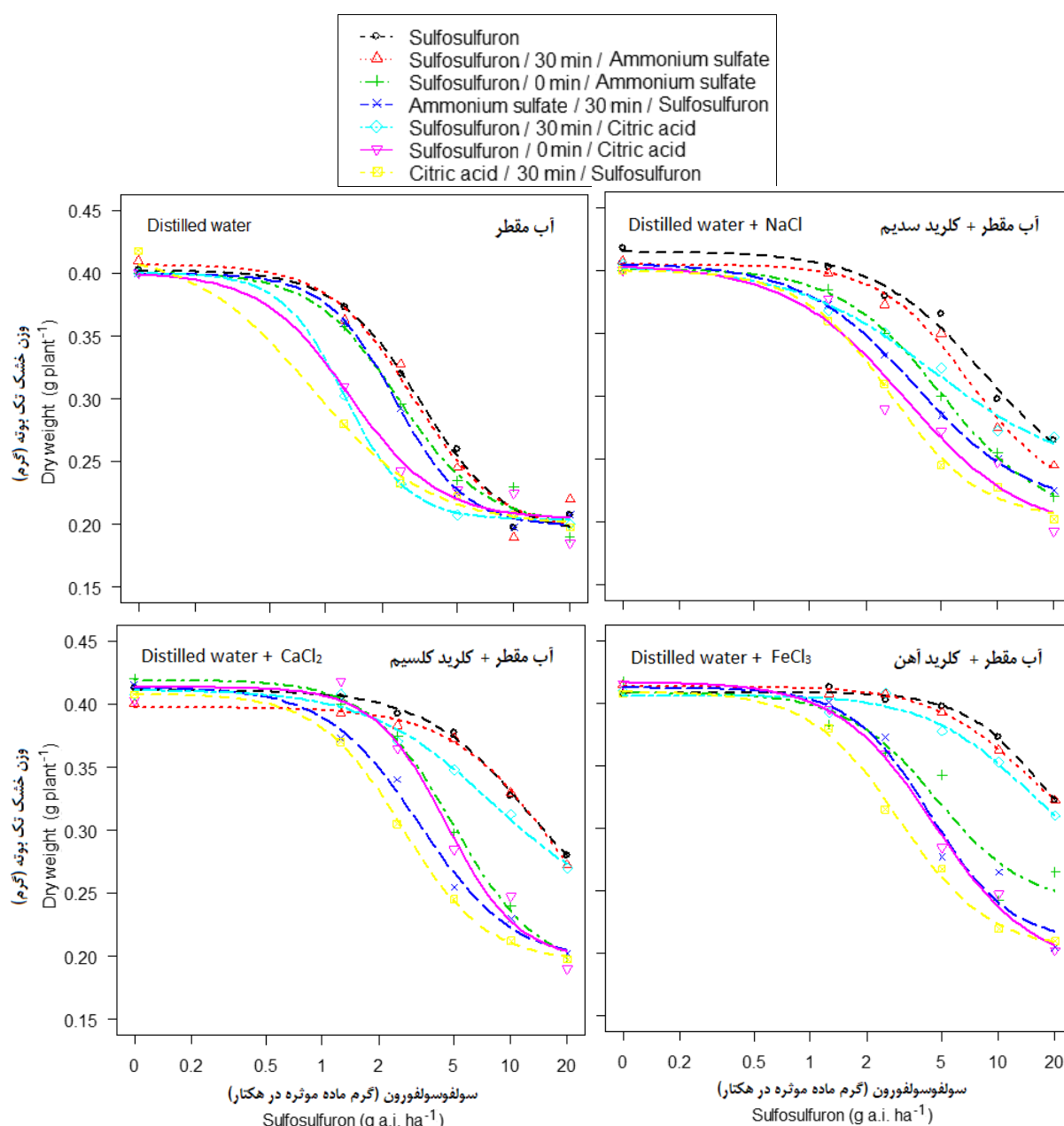
علایم ناشی از مصرف سولفوسولفورون به صورت توقف در رشد بوته‌ها متناسب با مقدار علف‌کش مشاهده شد. رگرسیون چهارپارامتری لجستیک برازش مناسبی به روند پاسخ وزن خشک یولاف وحشی زمستانه به دزهای علف‌کش سولفوسولفورون تحت نوع آب سخت و ماده افزودنی نشان داد (آزمون عدم برازش بیشتر از ۰/۰۵). در منحنی‌های واکنش به مقدار سولفوسولفورون که مجموعاً ۲۸ منحنی بود (شکل ۱)، دامنه حد بالا بین ۰/۳۹ تا ۰/۴۲ گرم در نوسان بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. همچنین، دامنه حد پایین این منحنی‌ها بین ۰/۱۹ تا ۰/۲۸ گرم در نوسان بود که تفاوت آماری معنی‌دار با یکدیگر نداشتند. همچنین، شیب منحنی‌ها در نقطه ED₅₀ بین ۱/۰۹ تا ۲/۱۶ در نوسان بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

نتایج نشان داد که وقتی از آب مقطر به عنوان حامل پاشش استفاده شد، افزودن سولفات آمونیوم با هر توالی و ترتیب زمانی نسبت به سولفوسولفورون، تأثیر معنی‌داری بر کارایی آن در کنترل یولاف وحشی زمستانه نداشت (جدول ۱). در حالی که، افزودن اسیدسیتریک به حامل پاشش آب مقطر با هر توالی و ترتیب زمانی نسبت به سولفوسولفورون، سبب بهبود معنی‌دار کارایی سولفوسولفورون در کنترل یولاف وحشی زمستانه شد.

مقطر حاوی کلرید کلسیم (CaCl₂، مرک آلمان) و آب مقطر حاوی کلرید آهن سه ظرفیتی (FeCl₃، مرک آلمان) بود. برای آماده‌سازی حامل‌های پاشش حاوی املاح کاتیونی، مقدار ۶۰۰ میلی گرم از نمک های کلرید سدیم، کلرید کلسیم و کلرید آهن سه ظرفیتی به طور جداگانه در یک لیتر آب مقطر حل شد (۳۴). فاکتور سوم شامل توالی و ترتیب زمانی افزودن ماده افزودنی و علف‌کش به حامل پاشش در هفت سطح بدون ماده افزودنی، افزودن اسیدسیتریک (C₆H₈O₇، مرک آلمان) نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفوسولفورون به حامل پاشش، افزودن سولفات آمونیوم (NH₄)₂SO₄، مرک آلمان) نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفوسولفورون به حامل پاشش بود. از طریق پیش آزمایشی، مقدار ۵۰۰ میلی گرم اسید سیتریک در لیتر انتخاب و بکار برده شد. در آزمایشگاه، این مقدار اسید سیتریک توانسته بود تا pH آب مقطر را به pKa سولفوسولفورون که برابر ۳/۵ است (۴) برساند. سولفات آمونیوم به مقدار ۲۰ گرم در لیتر بکار برده شد (۳۴). براساس دستورالعمل برچسب علف‌کش، حامل پاشش تمامی تیمارها به میزان یک میلی لیتر در لیتر مویان غیریونی با نام تجاری رست قبل از پاشش آنها اضافه شد. تمامی محلول‌ها در مدت انتظارشان قبل پاشش آنها به طور دائم تکان داده می‌شدند.

تیمارها در مرحله چهار برگی یولاف وحشی زمستانه توسط سمپاش دستی فشاری پنج لیتری با نازل بادبزی دوقلوی استاندارد پلاستیکی زرد رنگ با شماره ۱۱۰۰۲ (ASJ، ایتالیا) در فشار پاشش سه بار با یک حجم پاشش ۲۲۰ لیتر در هکتار انجام گرفتند. عملیات سمپاشی در هیجدهم آبان ۱۳۹۷ و در بیرون از محیط گلخانه و در هوای آزاد انجام گرفت؛ در شرایطی که رطوبت نسبی ۵۵ ± ۶ درصد و دما ۱۷ ± ۳ درجه سانتی‌گراد بود. در روز سمپاشی، به طور تصادفی بوته‌های چهار گلدان، که مازاد بر نیاز آزمایش کشت شده بودند، برداشت و وزن خشک تک بوته آنها به دست آمد (نتیجه: ۰/۱ گرم در هر بوته). این عدد به عنوان وزن خشک تک بوته یولاف وحشی زمستانه در زمان اعمال تیمارها در نظر گرفته شد. پس از سمپاشی، گلدان‌ها مجدداً در درون گلخانه قرار داده شدند.

پنج هفته پس از سمپاشی، زیست توده هوایی بوته‌های درون گلدان‌ها از یک سانتی‌متری سطح خاک برداشت و در درون پاکت های کاغذی قرار داده شدند. سپس، وزن خشک آن‌ها بعد از خشک کردن در درون آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. داده‌های وزن خشک به دست آمده از هر گلدان بر عدد هشت (تعداد بوته در هر گلدان) تقسیم و سپس، از آنها ۰/۱ (وزن‌های تک بوته در روز سمپاشی) کسر گردید. نهایتاً، از داده‌های وزن خشک تک بوته در تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.



شکل ۱- منحنی‌های واکنش وزن خشک تک بوته یولاف وحشی زمستانه به مقادیر سولفوسولفورون پاشیده شده با حامل‌های پاششی آب مقطر، آب مقطر حاوی کلرید سدیم، کلرید کلسیم و کلرید آهن با و بدون افزودن اسیدسیتریک یا سولفات آمونیوم نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفوسولفورون به حامل‌های پاششی

Figure 1- The dose-response curves for winter wild oat dry weight to sulfosulfuron sprayed with distilled water, distilled water containing NaCl, CaCl₂ and FeCl₃ with and without adding citric acid or ammonium sulfate at 30 min before, simultaneous, and 30 min after adding sulfosulfuron to the spray carrier

باشد. محققان زیادی تلاش کرده‌اند تا مکانیسم بهبود کارایی علف-کش‌های اسیدی ضعیف (توفوردی (۱۰)، کلروسولفورون (۱۲)، گلایفوسیت (۲۵)، کلوپیرالید، پیکلورم (۳۳)، بنتازون (۲۱)، نیکوسولفورون (۱۳) و بسیاری از علف‌کش‌های اسیدی ضعیف دیگر

براساس مقادیر ED₉₀، افزودن اسید سیتریک نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفوسولفورون به حامل پاششی آب مقطر به ترتیب سبب بهبود ۳/۲، ۲/۳ و ۲/۴ برابری کارایی سولفوسولفورون شد که احتمالاً دلیل آن فرآیندی به نام تله یونی

(۴۴) ناشی از کاهش pH محلول پاشش را تعیین کنند. آنها اعتقاد دارند که کاهش pH سبب نفوذپذیری بیشتر علف‌کش‌های اسیدی ضعیف به درون کوتیکول در طی فرآیند تله یونی می‌شود. در محیط قلیایی، علف‌کش‌های اسیدی ضعیف دارای بار الکتریکی منفی در ساختار خود هستند؛ لذا، دارای خاصیت آب‌دوستی بیشتری هستند. در محیط اسیدی، این علف‌کش‌ها با دریافت یون H^+ به حالت بدون بار

الکتریکی تبدیل و خاصیت آب‌گریزی بیشتری پیدا می‌کنند (شکل ۲) (۴۴). حالیت در آب سولفوسولفورون در $pH = 5$ برابر $17/6$ ، در pH برابر $16/27$ و در $pH = 9$ برابر 482 میلی‌گرم در لیتر در دمای 20 درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شده است (۱۶). با کاهش pH حامل پاشش با افزودن اسیدسیتریک، مولکول‌های سولفوسولفورون بدون بار الکتریکی (آب‌گریز) می‌شوند. لذا، قادرند

جدول ۱- تأثیر حامل پاشش، توالی و فاصله زمانی افزودن ماده افزودنی و علف‌کش به حامل پاشش بر مقدار سولفوسولفورون (گرم ماده موثره در هکتار) لازم برای کاهش ۵۰ و ۹۰ درصدی وزن خشک یولاف وحشی زمستانه

Table 1- The effect of spray carrier, sequence and time interval of adding adjuvant and herbicide to spray carrier on the dose of sulfosulfuron (g active ingredient ha^{-1}) required for 50 and 90 % reduction in dry weight of winter wild oat

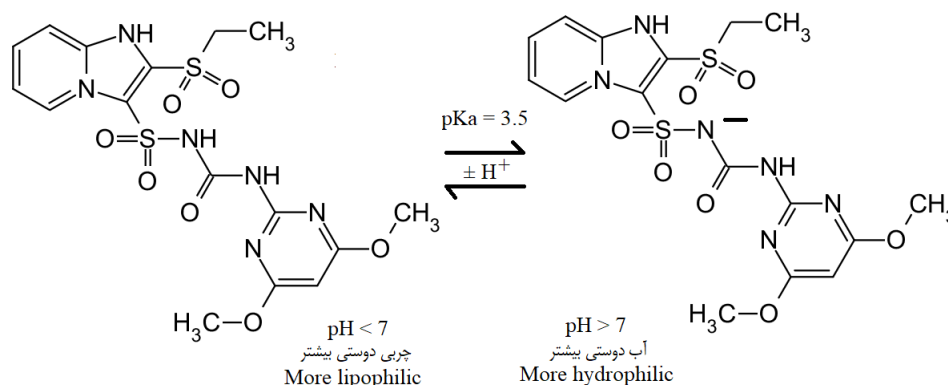
حامل پاشش Spray carrier	ترتیب افزودن مواد شیمیایی به حامل پاشش Sequence of adding chemicals to spray carrier	ED ₅₀ (g a.i. ha^{-1})	ED ₉₀ (g a.i. ha^{-1})
آب مقطر Distilled water (DW)	Sulfosulfuron	3.18 (0.29) ^{de}	9.80 (2.07) ^{bc}
	Sulfosulfuron / 30 min / $(NH_4)_2SO_4$	2.88 (0.30) ^d	8.83 (1.05) ^b
	Sulfosulfuron / 0 min / $(NH_4)_2SO_4$	2.40 (0.24) ^{cd}	7.47 (0.98) ^b
	$(NH_4)_2SO_4$ / 30 min / Sulfosulfuron	2.31 (0.29) ^{cd}	7.73 (1.05) ^b
	Sulfosulfuron / 30 min / $C_6H_8O_7$	1.25 (0.16) ^b	3.06 (0.56) ^a
	Sulfosulfuron / 0 min / $C_6H_8O_7$	1.33 (0.14) ^b	4.27 (1.00) ^a
	$C_6H_8O_7$ / 30 min / Sulfosulfuron	0.83 (0.29) ^{ab}	4.11 (1.20) ^a
آب مقطر + کلرید سدیم DW + NaCl	Sulfosulfuron	7.61 (2.31) ^g	27.60 (4.83) ^f
	Sulfosulfuron / 30 min / $(NH_4)_2SO_4$	7.11 (2.14) ^{fg}	23.54 (3.02) ^{ef}
	Sulfosulfuron / 0 min / $(NH_4)_2SO_4$	5.02 (0.71) ^f	20.22 (1.77) ^e
	$(NH_4)_2SO_4$ / 30 min / Sulfosulfuron	3.61 (0.40) ^e	16.49 (2.08) ^d
	Sulfosulfuron / 30 min / $C_6H_8O_7$	4.90 (0.59) ^f	36.35 (4.90) ^{fg}
	Sulfosulfuron / 0 min / $C_6H_8O_7$	2.47 (0.65) ^{cd}	9.01 (3.55) ^{bc}
	$C_6H_8O_7$ / 30 min / Sulfosulfuron	2.70 (0.42) ^{cd}	7.37 (1.38) ^b
آب مقطر + کلرید کلسیم DW + $CaCl_2$	Sulfosulfuron	11.91 (2.24) ^h	47.48 (4.16) ^h
	Sulfosulfuron / 30 min / $(NH_4)_2SO_4$	15.44 (4.36) ^h	58.50 (12.04) ^{hi}
	Sulfosulfuron / 0 min / $(NH_4)_2SO_4$	4.94 (0.86) ^f	15.34 (3.40) ^{cd}
	$(NH_4)_2SO_4$ / 30 min / Sulfosulfuron	3.30 (0.41) ^{de}	11.83 (0.81) ^c
	Sulfosulfuron / 30 min / $C_6H_8O_7$	7.53 (1.18) ^g	39.72 (5.14) ^h
	Sulfosulfuron / 0 min / $C_6H_8O_7$	4.69 (0.80) ^{ef}	13.28 (2.14) ^{cd}
	$C_6H_8O_7$ / 30 min / Sulfosulfuron	2.64 (0.30) ^{cd}	8.42 (2.27) ^b
آب مقطر + کلرید آهن DW + $FeCl_3$	Sulfosulfuron	17.13 (5.2) ^h	50.32 (7.30) ^{hi}
	Sulfosulfuron / 30 min / $(NH_4)_2SO_4$	12.11 (2.71) ^h	48.73 (8.74) ^h
	Sulfosulfuron / 0 min / $(NH_4)_2SO_4$	5.24 (1.12) ^{fg}	27.63 (5.63) ^{fg}
	$(NH_4)_2SO_4$ / 30 min / Sulfosulfuron	4.28 (0.85) ^{ef}	12.05 (1.46) ^c
	Sulfosulfuron / 30 min / $C_6H_8O_7$	14.79 (5.24) ^h	59.53 (10.35) ⁱ
	Sulfosulfuron / 0 min / $C_6H_8O_7$	4.59 (0.82) ^{ef}	17.42 (3.68) ^{de}
	$C_6H_8O_7$ / 30 min / Sulfosulfuron	2.98 (0.32) ^{de}	9.98 (2.49) ^{bc}

اعداد داخل پرانتز پراش خطای استاندارد هستند. مقادیر ED₉₀ دارای حرف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری براساس خطاهای استاندارد ندارند.

$(NH_4)_2SO_4$: سولفات آمونیوم. $C_6H_8O_7$: اسیدسیتریک.

Standard errors are in parentheses. The ED₉₀ values with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$) based on the standard errors. $(NH_4)_2SO_4$: ammonium sulfate. $C_6H_8O_7$: citric acid.

سبب بهبود کارایی آنها می‌شود. این علف‌کش‌ها با دریافت آنیون NH_4^+ از سولفات آمونیوم خاصیت آب‌گریزی بیشتری پیدا می‌کنند که نفوذپذیری آنها برای عبور از علف کوتیکول و غشاء سلولی بیشتر است. پس از عبور از کوتیکول و غشاء سلولی، یون NH_4^+ از مولکول علف‌کش جدا می‌شود. از اینرو، مجدداً مولکول‌های علف‌کش دارای بار الکتریکی منفی و خاصیت آب‌دوستی بیشتر می‌شوند و دیگر قادر به خروج از سلول نیستند. از اینرو، کارایی علف‌کش با افزودن سولفات آمونیوم افزایش می‌یابد. با این وجود، افزودن سولفات آمونیوم به محلول پاشش علف‌کش‌های گروه B گاهی بی‌تاثیر (نیکوسولفورون (۱۳) و ایمازامتابنز (۱۷)) و گاهی با تاثیر منفی (متسولام (۱۱)) بر کارایی آنها گزارش شده است.



شکل ۲- ساختار و خاصیت سولفوسولفورون در شرایط اسیدی و قلیایی

حلالیت در آب سولفوسولفورون در $\text{pH} = 5$ برابر ۱۷/۶ و در $\text{pH} = 9$ برابر ۴۸۲ میلی‌گرم در لیتر در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شده است (۱۶).

Figure 2- Structure and property of sulfosulfuron under acidic and alkaline conditions

Water solubility of sulfosulfuron has been measured up to 17.6 mg L^{-1} at $\text{pH} = 5$ and 482 mg L^{-1} at $\text{pH} = 9$ in 20°C (16).

آب پیوند برقرار کند. در نتیجه، نمک علف‌کش-کاتیون بلوری شکل (۱) تشکیل می‌شود که به دلیل حلالیت پایین آن در آب قادر به عبور (جذب) از کوتیکول برگ علف هرز نیست؛ لذا، سبب افت شدید کارایی علف‌کش می‌شود. هافمن و همکاران (۱۴) گزارش کردند که حضور کاتیون Ca^{++} در حامل پاشش سبب افزایش اندازه قطره‌های پاشش می‌شود. در نتیجه، نشست قطره‌ها روی برگ به شدت کاهش می‌یابد. آنها این پدیده را دومین دلیل افت کارایی علف‌کش پاشیده شده با آب سخت دانستند. شدت اثر ناسازگار کاتیون‌ها بر کارایی سولفوسولفورون به ظرفیت کاتیونی آنها بستگی داشت. به عبارتی دیگر، شدت اثر ناسازگار کاتیون‌های دو و سه ظرفیتی بیشتر از کاتیون تک ظرفیتی بود. این نتایج با یافته‌های نالوجا و ماتیسیاک (۲۸) با گلایفوسیت علی وردی و همکاران (۱) با ایمازتابنز تطابق دارد.

از نظر آماری، مقادیر ED_{90} بدست آمده برای تیمارهای افزودن

تا از عرض کوتیکول و غشاء سلولی با سهولت بیشتری عبور کنند. سپس، سولفوسولفورون بدون بار الکتریکی در داخل سلول (جایی که یون H^+ به دلیل پمپاژ آن به بیرون سلول نسبتاً کمیاب است) یک یون H^+ از دست می‌دهد و مجدداً مولکول‌های سولفوسولفورون بار الکتریکی (آبدوست) تشکیل می‌شوند که خاصیت آب‌دوستی بیشتری پیدا می‌کند و دیگر قادر به خروج از سلول نیستند. به این طریق، علف‌کش‌های اسیدی ضعیف درون سلول (یا درون آوندهای آبکش) به دام افتاده و به طور کارآمدی منتقل می‌شوند (۴۴).

محققان متعددی گزارش کرده‌اند که افزودن سولفات آمونیوم به محلول پاشش علف‌کش‌های گروه A (۲۰ و ۴۲)، گروه C (۱۹ و ۴۷)، گروه G (۳۲، ۳۸، ۴۳ و ۴۹)، گروه H (۲۴، ۴۳) و گروه O (۵ و ۴۰)

نتایج نشان داد که حضور کاتیون‌های Na^+ ، Ca^{++} و Fe^{+++} در حامل پاشش توانست مقدار ED_{90} را از ۹/۸۰ گرم ماده موثره در هکتار به ترتیب ۲۷/۶۰، ۴۷/۴۸ و ۵۰/۳۲ گرم ماده موثره در هکتار افزایش دهد (جدول ۱) که نشان دهنده به ترتیب کاهش ۶۴/۵، ۷۹/۳ و ۸۰/۵ درصدی کارایی سولفوسولفورون در کنترل یولاف وحشی زمستانه با حضور املاح کاتیونی در حامل پاشش است. بین شدت اثر ناسازگار املاح کاتیونی Ca^{++} و Fe^{+++} اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همانطور که در بخش مقدمه اشاره شد، اثر ناسازگار حضور انواع کاتیون‌های (Na^+ ، K^+ ، Ca^{++} ، Mg^{++} ، Zn^{++} ، Mn^{++} و Fe^{+++}) در حامل پاشش بر کارایی علف‌کش‌های اسیدی ضعیف به وسیله محققان متعددی به اثبات رسیده است. همانند سایر علف‌کش‌های اسیدی ضعیف، سولفوسولفورون نیز در شرایط قلیایی به بخش‌های آنیونی (با بار الکتریکی منفی) و کاتیونی (H^+) تفکیک می‌شود (شکل ۲). بخش آنیونی سولفوسولفورون با کاتیون‌های شبه فلزی موجود در

موجود در آب سخت بر کارایی سولفوسولفورون شد. به نظر می‌رسد که وقتی مواد افزودنی قبل از علف‌کش به آب سخت افزوده شود، کاتیون‌های آب سخت می‌توانند آنیون‌های H^+ از اسیدسیتریک و NH_4^+ از سولفات آمونیوم را دریافت کنند. سپس، با تشکیل و رسوب نمک کاتیون-آنیون، آب سخت به آب نرم تبدیل می‌شود که مشکلی در کارایی علف‌کش ایجاد نمی‌کند. تاکنون، آزمایش مشابهی به اجرا در نیامده بود، ولی در یک آزمایش که با هدف تأثیر توالی افزودن مویان و علف‌کش به آب نرم (نه آب سخت) انجام گرفته است، راموس و همکاران (۳۷) گزارش کردند که افزودن مویان قبل از افزودن علف‌کش‌های آمینوپیرالید و فلورکسی‌پیر در مقایسه حالت برعکس سبب کنترل بهتر *Senna obtusifolia* می‌شود.

نهایتاً، با مقایسه تیمارهای افزودن علف‌کش نیم ساعت بعد از افزودن مواد افزودنی به حامل‌های پاشش حاوی Na^+ و Ca^{++} ، کارایی اسیدسیتریک در مقایسه با سولفات آمونیوم در رفع اثر ناسازگار املاح کاتیونی موجود در آب سخت بر کارایی سولفوسولفورون بیشتر بود. دلیل احتمالی این موضوع قبلاً بحث شد.

نتیجه‌گیری

آزمایش حاضر نشان می‌دهد که رمز بهینه‌سازی کارایی مواد افزودنی نرم‌کننده آب سخت در توالی صحیح افزودن آنها نسبت به علف‌کش به آب سخت است. اگر توالی افزودن صحیح انجام نگیرد، یعنی اگر علف‌کش نیم ساعت قبل از ماده افزودنی به آب سخت افزوده شود، هیچ تأثیری در رفع اثر ناسازگار املاح کاتیونی موجود در آب سخت بر کارایی علف‌کش ندارد. این بدین معنی است که نه تنها علف‌های هرز به خوبی کنترل نخواهند شد بلکه هزینه‌های اضافی (علف‌کش + ماده افزودنی + کاربرد) را متحمل کشاورز خواهد کرد. لذا، در شرایطی که کشاورز قصد استفاده از آب سخت برای کاربرد علف‌کش اسیدی ضعیفی مانند سولفوسولفورون دارد، افزودن ترجیحاً اسیدسیتریک و اگر در دسترس نبود سولفات آمونیوم نیم ساعت قبل از افزودن سولفوسولفورون به حامل پاشش توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان قدردان معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا همدان برای تخصیص گرنت برای اجرای این آزمایش هستند که در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد شناسایی و مبارزه با علف‌های هرز به انجام رسیده است.

سولفوسولفورون نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفات آمونیوم به حامل پاشش حاوی کاتیون Na^+ به ترتیب برابر $23/54 < 20/22 < 16/49$ گرم ماده موثره در هکتار؛ برای تیمارهای افزودن سولفوسولفورون نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفات آمونیوم به حامل پاشش حاوی کاتیون Ca^{++} به ترتیب برابر $58/50 < 15/34 \leq 11/83$ گرم ماده موثره در هکتار و برای تیمارهای افزودن سولفوسولفورون نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن سولفات آمونیوم به حامل پاشش حاوی کاتیون Fe^{+++} به ترتیب برابر $48/73 < 27/63 < 12/05$ گرم ماده موثره در هکتار بود. مقادیر ED_{90} بدست آمده برای تیمارهای افزودن سولفوسولفورون نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن اسیدسیتریک به حامل پاشش حاوی کاتیون Na^+ به ترتیب برابر $36/35 < 9/01 \leq 7/37$ گرم ماده موثره در هکتار؛ برای تیمارهای افزودن سولفوسولفورون نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن اسیدسیتریک به حامل پاشش حاوی کاتیون Ca^{++} به ترتیب برابر $39/72 < 13/28 < 8/42$ گرم ماده موثره در هکتار و برای تیمارهای افزودن سولفوسولفورون نیم ساعت قبل، همزمان و نیم ساعت بعد از افزودن اسیدسیتریک به حامل پاشش حاوی کاتیون Fe^{+++} به ترتیب برابر $59/53 < 17/42 < 9/98$ گرم ماده موثره در هکتار بود. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که توالی و فاصله زمانی افزودن ماده افزودنی و سولفوسولفورون به آب سخت بر کارایی سولفوسولفورون در کنترل یولاف وحشی زمستانه تأثیر معنی‌داری دارد. با مقایسه این نتایج با تیمار کاربرد سولفوسولفورون به تنهایی با حامل آب مقطر (مقدار ED_{90} برابر $9/80$ گرم ماده موثره در هکتار) می‌توان چنین استنتاج کرد که افزودن مواد افزودنی نیم ساعت بعد از افزودن سولفوسولفورون به آب سخت هیچ تأثیری در رفع اثر ناسازگار املاح کاتیونی موجود در آب سخت بر کارایی سولفوسولفورون نداشته است. به نظر می‌رسد که وقتی علف‌کش قبل از مواد افزودنی به آب سخت افزوده شود، نمک علف‌کش - کاتیون تشکیل می‌شود. لذا، کاتیون‌های آب سخت امکان دریافت آنیون‌های H^+ از اسیدسیتریک و NH_4^+ از سولفات آمونیوم را از دست می‌دهند. به همین دلیل، این توالی افزودن مواد شیمیایی به آب سخت هیچ تأثیری در رفع اثر ناسازگار املاح کاتیونی موجود در آب سخت بر کارایی سولفوسولفورون نداشته است. این در حالی است که بهترین کارایی سولفوسولفورون زمانی حاصل شد که نیم ساعت بعد از افزودن مواد افزودنی به آب سخت اضافه شود. چنین رفتاری در آماده سازی محلول پاشش سبب حذف کامل اثر ناسازگار املاح کاتیونی

منابع

- Aliverdi A., Ganbari A., Rashed-Mohassel M.H., Nassiri-Mahallati M., and Zand E. 2014a. Overcoming the antagonistic effect from spray carrier minerals on imazethapyr activity. *Agronomy Journal* 106(5): 1569–1573.

- 2- Aliverdi A., Ganbari A., Rashed-Mohassel M.H., Nassiri-Mmahanlati M., and Zand E. 2014b. Overcoming hard water antagonistic to glyphosate or imazethapyr with water conditioners. *Notulae Scientia Biologicae* 6(2): 244–249.
- 3- Aliverdi A., and Hammami H. 2016. The effect of cationic and nonionic surfactants on the efficacy of ALS-inhibitor herbicides against *Avena sterilis*. *Zemdirbyste-Agriculture* 103(3): 289–296.
- 4- Anonymous. 2019. Sulfosulfuron. In: Pesticide Properties Data Base, University of Hertfordshire. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/603.htm>
- 5- Asif M., Tanveer A., Safdar M.E., Ali A., and Ahmad S. 2019. Effect of dicamba and adjuvant combination on *Parthenium* control, fodder yield and yield components of forage sorghum (*Sorghum bicolor*). *Planta daninha*, 37. <https://doi.org/10.1590/s010083582019370100036>
- 6- Bailey W.A., Poston D.H., Wilson H.P., and Hines T.E. 2002. Glyphosate interactions with manganese. *Weed Technology* 16(4): 792–799.
- 7- Bernards M.L., Thelen K.D., and Penner D. 2005. Glyphosate efficacy is antagonized by manganese. *Weed Technology* 19(1): 27–34.
- 8- Devkota P., Spaunhorst D.J., and Johnson W.G. 2016a. Influence of carrier water pH, hardness, foliar fertilizer, and ammonium sulfate on mesotrione efficacy. *Weed Technology* 30(3): 617–628.
- 9- Devkota P., Whitford F., and Johnson W.G. 2016b. Influence of spray-solution temperature and holding duration on weed control with premixed glyphosate and dicamba formulation. *Weed Technology* 30(1): 116–122.
- 10- Devkota P., and Johnson W.G. 2019. Influence of carrier water pH, foliar fertilizer, and ammonium sulfate on 2,4-D and 2,4-D plus glyphosate efficacy. *Weed Technology* 33(4): 562–568.
- 11- El-Metwally I.M., El-Rokiek K.G., Ahmed S.A., El-Desoki E.R., and Abd-Elsamad E.E.H. 2010. Effect of adding urea or ammonium sulphate on some herbicides efficiency in controlling weeds in onion plants. *Journal of American Science* 6(11): 536–543.
- 12- Fahl G.M., Kreft L., Altenburger R., Faust M., Boedeker W., and Grimme L.H. 1995. pH-dependent sorption, bioconcentration and algal toxicity of sulfonylurea. *Aquatic Toxicology* 31(2): 175–187.
- 13- Green J.M., and Cahill W.R. 2003. Enhancing the biological activity of nicosulfuron with pH adjusters. *Weed Technology* 17(2): 338–345.
- 14- Hoffmann W.C., Bagley W.E., Fritz B.K., Lan Y., and Martin D.E. 2008. Effects of water hardness on spray droplet size under aerial application conditions. *Applied Engineering in Agriculture* 24(1): 11–14.
- 15- Hajmohammadnia Ghalibaf K., Mathiassen S., Kudsk P., and Hosseini S.A. 2013. Effect of soluble ions in water in spray tank on nicosulfuron performance. *Iranian Weed Science Congress* 5: 608–611. (In Persian with English abstract)
- 16- HSDB. 2020. Sulfosulfuron. In: PubChem, CID: 86426. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfosulfuron>
- 17- Hsiao A.I., Liu S.H., and Quick W.A. 1996. Effect of ammonium sulfate on the phytotoxicity, foliar uptake, and translocation of imazamethabenz in wild oat. *Journal of Plant Growth Regulation* 15(3): 115–120.
- 18- Izadi-Darbandi E., Nessari N., and Azarian F. 2013. Effect of water hardness on sinusulfuron efficiency for controlling weeds. *Iranian Weed Science Congress* 5: 714–717. (In Persian with English abstract)
- 19- Izadi-Darbandi E., Aliverdi A., Anabestani M., and Shamsabadi A. 2019. Adjuvants to improve phenmedipham + desmedipham + ethofumesate efficacy against weeds in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Planta daninha*, 37. <https://doi.org/10.1590/s010083582019370100021>
- 20- Harker K.N. 1995. Ammonium sulfate effects on the activity of herbicides for selective grass control. *Weed Technology* 9(2): 260–266.
- 21- Liu Z.Q. 2004. Bentazone uptake into plant foliage as influenced by surfactants and carrier pH. *Australian Journal of Agricultural Research* 55(9): 967–971.
- 22- Mahoney K.J., Nurse R.E., and Sikkema P.H. 2014. The effect of hard water, spray solution storage time, and ammonium sulfate on glyphosate efficacy and yield of glyphosate-resistant corn. *Canadian Journal of Plant Science* 94(8): 1401–1405.
- 23- Manuchehri M.R., Dotray P.A., Keeling J.W., Morris T.S., Morgan G.D., and Woodward J.E. 2018. Influence of water quality and ammonium sulfate on glyphosate efficacy. *Journal of Experimental Agriculture International* 23(5): 1–7.
- 24- Maschhoff J.R., Hart S.E., and Baldwin J.L. 2000. Effect of ammonium sulfate on the efficacy, absorption, and translocation of glufosinate. *Weed Science* 48(1): 2–6.
- 25- Molin W.T., and Hirase K. 2004. Comparison of commercial glyphosate formulations for control of prickly side, purple nutsedge, and sicklepod. *Weed Biology and Management* 4(3): 136–141.
- 26- Moridi A., Kerachian R., and Zokaei M. 2017. Assessment of Iran's Water Resources Quality (2004-2014). *Iran-Water Resources Research* 12(4): 23–35. (In Persian with English abstract)
- 27- Nalewaja J.D., Woznica Z., and Matysiak R. 1991. 2,4-D Amine antagonism by salts. *Weed Technology* 5(4): 873–880.

- 28- Nalewaja J.D., and Matysiak R. 1991. Salt antagonism of glyphosate. *Weed Science* 39(4): 622–628.
- 29- Nalewaja J.D., Matysiak R., and Szelenzaniak E. 1994. Sethoxydim response to spray carrier chemical properties and environment. *Weed Technology* 8(3): 591–597.
- 30- Nandula V.K., Poston D.H., Reddy K.N., and Koger C.H. 2007. Formulation and adjuvant effects on uptake and translocation of clethodim in bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Weed science*, 55(1):6–11.
- 31- Nosratti I., Alizade H., and Mashhadi H.R. 2012. Effect of some adjuvants in reducing antagonistism of spray carrier water cations to 2,4-D + MCPA efficacy on licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Annals of Biological Research*, 3(1):2631–2635.
- 32- Nurse R.E., Hamill A.S., Kells J.J., and Sikkema P.H. 2008. Annual weed control may be improved when AMS is added to below-label glyphosate doses in glyphosate-tolerant maize (*Zea mays* L.). *Crop Protection* 27: 452–8.
- 33- Palma G., Demanet R., Jorquera M., Mora M.L., Briceño G., and Violante A. 2015. Effect of pH on sorption kinetic process of acidic herbicides in a volcanic soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrient* 15(3). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000023>
- 34- Patton A.J., Weisenberger D.V., and Johnson W.G. 2016. Divalent cations in spray water influence 2,4-D efficacy on dandelion (*Taraxacum officinale*) and broadleaf plantain (*Plantago major*). *Weed Technology* 30(2): 431–440.
- 35- Penner D. 2000. Activator adjuvants. *Weed Technology* 14(4): 785–791.
- 36- Ritz C., Baty F., Streibig J.C., and Gerhard D. 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 10(12): e0146021.
- 37- Ramos M.F.T., Santos R.T.S., Griesang F., Almeida D.P., and Ferreira M.C. 2019. Does the sequence of addition of herbicide and adjuvants to the spray solution influence sicklepod control? *Arquivos do Instituto Biológico* 86: 1-7.
- 38- Ramsdale B.K., Messersmith C.G. and Nalewaja J.D. 2003. Spray volume, formulation, ammonium sulfate, and nozzle effects on glyphosate efficacy. *Weed Technology* 17: 589–598.
- 39- Roskamp J.M., Turco R.F., Bischoff M., and Johnson W.G. 2013a. The influence of carrier water pH and hardness on saflufenacil efficacy and solubility. *Weed Technology* 27(3): 527–533.
- 40- Roskamp J.M., Chahal G.S., and Johnson W.G. 2013b. The effect of cations and ammonium sulfate on the efficacy of dicamba and 2,4-D. *Weed Technology* 27(1): 72–77.
- 41- Simarmata M., Taufik M., and Peranginangin Z.Z. 2017. Efficacy of paraquat and glyphosate applied in water solvents from different sources to control weeds in oil palm plantation. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science* 12(2): 58–64.
- 42- Smith A.M., and Born, W.H.V. 1992. Ammonium sulfate increases efficacy of sethoxydim through increased absorption and translocation. *Weed Science* 40(3): 351–358.
- 43- Soltani N., Nurse R., Robinson D., and Sikkema P. 2011. Effect of ammonium sulfate and water hardness on glyphosate and glufosinate activity in corn. *Canadian Journal of Plant Science* 91(6): 1053–1059.
- 44- Sterling T.M. 1994. Mechanisms of Herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Science* 42(2): 263–276.
- 45- Thelen K.D., Jackson E.P., and Penner D. 1995. The basis for the hard-water antagonism of glyphosate activity. *Weed Science* 43(4): 541–548.
- 46- Travlos I., Cheimona N., and Bilalis D. 2017. Glyphosate efficacy of different salt formulations and adjuvant additives on various weeds. *Agronomy* 7(3): 60–69.
- 47- Wanamarta G., Penner D., and Kells J.J. 1989. The basis of bentazon antagonism on sethoxydim absorption and activity. *Weed Science* 37(3): 400–404.
- 48- Zollinger R.K., Howatt K., Bernards M.L., and Young B.G. 2016. Ammonium sulfate and dipotassium phosphate as water conditioning adjuvants. In: *Pesticide Formulation and Delivery Systems* (ed. Goss G.). 42–51.
- 49- Zollinger R.K., Nalewaja J.D., Peterson D.E., and Young B.G. 2010. Effect of hard water and ammonium on weak acid herbicide activity. *Journal of ASTM International* 7(6): 1–10.



The Effect of Sequence and Time Interval of Adding Adjuvant and Sulfosulfuron to Hard Water in the Control of Winter Wild Oat (*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* Durieu.)

A. Aliverdi^{1*} - S. Badrkhani² - G. Ahmadvand³

Received: 29-04-2020

Accepted: 14-07-2020

Introduction: In arid regions such as Iran, water hardness, as a result of existence of calcium- and magnesium-containing minerals, is a serious challenge for irrigation practice. The irrigation systems are often applied to spray herbicides. Therefore, using hard water having high cations for herbicide application is inevitable. Such water can adversely affect the activity of some herbicides particularly weak acid ones. A solution for overcoming this problem is the addition of an adjuvant to the tank. It is well established that the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (43) and $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (45) will efficiently remove the cations of hard water from the spray solution of weak acid herbicides. However, there is no report on whether the efficacy of sulfosulfuron (a weak acid herbicide, $\text{pK}_a = 3.5$) is affected by the cations of hard water. Furthermore, it is observed in literature and practice that the addition of herbicide to the tank is immediately done after adding the adjuvant to the tank. Thus, there is no report on whether the sequence and time interval of adding adjuvant and herbicide to hard water could be affected by the efficacy of weak acid herbicide.

Materials and Methods: The seeds of winter wild oat (*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* Durieu.) were primed in the same method which was already described (3). Then, eight seedlings with a 1-cm radicle and 0.5-cm coleoptile were transplanted at a 1-cm depth within each 3-liter pot filled with a 1:1:4 ratio of sand: animal manure: clay loam soil, respectively. The experiment was carried out as a dose-response study in a completely randomized design with three factorial ($6 \times 4 \times 7$) and four replications. The 1st factor was the dose of sulfosulfuron (0, 1.25, 2.5, 5, 10, and 20 g a.i. ha^{-1}). The 2nd factor included the type of spray carrier (distilled water, hard water containing sodium chloride (NaCl), calcium chloride (CaCl_2) and iron chloride (CaFe_3) at 600 mg L^{-1}). The 3rd factor was also the sequence and time interval of adding adjuvant and herbicide to the spray carrier (with and without adding 500 mg citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) L^{-1} or 20 g ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) L^{-1} at 30 min before, simultaneous, and 30 min after adding sulfosulfuron to the spray carrier). Five weeks after spraying, the response of individual dry weight of winter wild oat to treatments was analyzed as a nonlinear regression. This was carried out by using a four parametric logistic model (36) to estimate the values of ED_{50} and ED_{90} which are the doses of sulfosulfuron causing a 50 and 90% reduction in the dry weight as compared to the control, respectively.

Results and Discussion: In contrast to ammonium sulfate which was ineffective, the addition of citric acid to distilled water under each sequence and time interval improved the efficacy of sulfosulfuron. Decreasing the pH can permit the weak acidic herbicides to pass through the cuticle and then cell membrane during the ionic trap process. The presence of Na^+ , Ca^{++} and Fe^{+++} cations in the spray carrier increased the amount of sulfosulfuron required for 90% reduction in the dry weight of winter wild oat from 9.80 to 27.60, 47.48, and 50.32 g ha^{-1} , respectively. There was no significant difference between the intensity of the incompatibility of Ca^{++} and Fe^{+++} cations. Similar to other weak acid herbicides, sulfosulfuron can also be ionized into anionic (a negatively charged form) and cationic (H^+) fragments under alkaline conditions. The anionic part of sulfosulfuron bonds with the cations in hard water. As a result, a crystalline herbicide-cation salt is formed which is not able to pass through the cuticle due to its low solubility in water. The addition of both adjuvants 30 min after the addition of sulfosulfuron to distilled water containing the cations had no effect on removing the adverse effect of cations on the efficacy of sulfosulfuron. Conversely, adding sulfosulfuron 30 min after the addition of both adjuvants to the distilled water containing the cations provided the best efficacy of sulfosulfuron. When the adjuvants are added to hard water before herbicide, the cations of hard water can receive the cation of H^+ from citric acid or NH_4^+

1- Assistant Professor in Weed Science, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(*- Corresponding Author Email: a.aliverdi@basu.ac.ir)

2- Master of Science in Weed Science, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3- Associate Professor in Crop Physiology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

from ammonium sulfate. Then, the formation and sediment of the cation-anion salt turns hard water into soft water, having no problem with the efficacy of sulfosulfuron.

Conclusion: The issue of correct sequence for adding adjuvant and herbicide to hard water is important. Lack of knowledge about this issue can lead to not only the lack of weed control but also the imposition of additional costs on the farmer.

Keywords: Spray carrier quality, Hard water cations, Weak acid herbicide



مقاله علمی-پژوهشی

بررسی مقاومت بیوتیپ‌های یولاف وحشی زمستانه به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase در مزارع گندم شهرستان رامیان

مهتاب هروی^۱ - جاوید قرخلو^{۲*} - آسیه سیاهمرگویی^۳ - حسین کاظمی^۴ - سعید حسن پور بورخیلی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴

چکیده

به منظور بررسی بروز مقاومت یولاف وحشی زمستانه (*Avena ludoviciana* Dur.) به علف‌کش‌های بازدارنده ACCase، آزمایش‌هایی در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. بیوتیپ‌های مشکوک به مقاومت از مزارع گندم شهرستان جمع‌آوری گردید. یک بیوتیپ حساس نیز از مزارعی که هیچ‌گونه سابقه سمپاشی نداشتند جمع‌آوری شد. ابتدا بیوتیپ‌های مشکوک با غلظت تفکیک‌کننده به دست آمده، مورد غربال قرار گرفتند. سپس واکنش بیوتیپ‌های مقاوم و حساس این علف هرز در مقابل دزهای مختلف علف‌کش بررسی شد. نتایج این تحقیق، بروز مقاومت به علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپاژیل، فنوکسپروپیل اتیل و دیکلوفوپ متیل در ۵۸ بیوتیپ را تأیید نمود. درجه مقاومت به علف‌کش‌های فنوکسپروپیل اتیل، دیکلوفوپ متیل و کلودینافوپ پروپاژیل به ترتیب بین ۴۸/۶۹ تا ۸۵۱/۳۳، ۵۲/۵۷ تا ۷۵۲/۵۷ و ۳۱۰/۲۷ تا ۱۴۴۳/۹۰ بود. جهت بررسی بیشتر واکنش بیوتیپ‌های مقاوم، سه علف‌کش هالوکسی‌فوپ-آر متیل استر، کلتودیم و پینوکسادن جهت آزمون پتری دیش انتخاب شدند. دو مورد از بیوتیپ‌های با شاخص مقاومتی بالا (ram1, ram18) و دو مورد از بیوتیپ‌های با کمترین شاخص مقاومتی (ram15, ram4) به عنوان نمونه مورد مطالعه قرار گرفتند. در تیمار هالوکسی‌فوپ-آر متیل استر، بیشترین و کمترین درجه مقاومت در بیوتیپ ram1 به میزان ۴۲۴/۳۵ و بیوتیپ ram 15 به میزان ۲۸۴/۵۰ به دست آمد. در دو علف‌کش دیگر درجه مقاومت تفاوت معنی‌داری با ۱ نداشت. نقشه پراکنش مزارع آلوده به علف‌های هرز مقاوم با استفاده از سامانه اطلاعات جغرافیایی ترسیم و مشخص شد. برآورد بالای درجات مقاومت گویای مدیریت انفعالی در کنترل یولاف وحشی زمستانه می‌باشد. نتایج این تحقیق می‌تواند جهت اجرای برنامه‌های مدیریت علف‌های هرز مقاوم و ممانعت از توسعه آن‌ها به سایر مناطق به کار رود.

واژه‌های کلیدی: آزمایش غلظت-پاسخ، درجه مقاومت، مقاومت به علف‌کش، نقشه پراکنش

(*ludoviciana* Dur.) است.

مقدمه

در ۴۰ سال گذشته، ۱۰۸ علف‌کش با جایگاه‌های عمل مختلف در ایران به ثبت رسیده است که ۲۸ مورد برای کنترل انتخابی علف‌های هرز گندم و جو می‌باشد (۵) عمومی‌ترین روش برای کنترل علف‌های هرز باریک‌برگ در مزارع گندم، استفاده از بازدارنده‌های آنزیم استیل کو آنزیم آکربوکسیلاز می‌باشد. سه گروه شناخته‌شده از این علف‌کش‌ها عبارتند از آریلوکسی فنوکسی پروپیونات (APP)، سیکلوهاگزان دیون (CHD) و فنیل پیرازولین‌ها که علیرغم ساختمان متفاوت، مکانیسم عمل مشابهی داشته و هر دو مانع عمل ACCase کلروپلاستی می‌شوند (۹).

مقاومت به علف‌کش عبارت است از توانایی وراثتی یک بیوتیپ علف هرز در زنده ماندن، پس از کاربرد مقداری از علف‌کش که باعث از بین رفتن گونه‌های وحشی می‌شود (۱۴). اولین مورد مقاومت به علف‌کش در سال ۱۹۷۰ از یک نهالستان کاج در کشور آمریکا گزارش

علف‌های هرز اغلب گونه‌های گیاهی وحشی هستند که تهدیدی جدی برای تولید پایدار محصولات کشاورزی به حساب می‌آیند (۲۳). در مزارع گندم و جو کشور متجاوز از ۴۰۰ گونه علف هرز متعلق به ۴۴ خانواده گیاهی وجود دارد که ۷۴ درصد این گونه‌ها در ۶ خانواده گیاهی قرار دارند (۲۲). یولاف وحشی به عنوان یکی از دردسرسازترین علف‌های هرز پاییزه در مزارع کشاورزی غلات گزارش شده است (۱۱) که گونه غالب در ایران، یولاف وحشی زمستانه (*Avena*

۱، ۲، ۳ و ۵- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد شناسایی و مبارزه با علف‌های هرز، دانشیار، استادیار، دانشیار و دانش‌آموخته دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(Email: gherekhloo@gau.ac.ir)
(*) - نویسنده مسئول

شکل ۱- موقعیت جغرافیایی شهرستان رامیان در استان گلستان و نقشه پراکنش مزارع گندم مورد بررسی در این شهرستان

Figure 1- Geographical position of Ramiyan in Golestan Province and distribution map of surveyed wheat fields in this Township

جدول ۱- برخی مشخصات سموم علف‌کش مورد آزمایش در مطالعه
Table 1- Common properties of the herbicides applied in the experiment

نام عمومی Common name	نام تجاری Trade name	خانواده شیمیایی Chemical family	فرمولاسیون Formulation	دوز توصیه شده (گرم ماده مؤثر در هکتار) Recommended dose (g ai.ha ⁻¹)
کلودینافوپ پروپارژیل Clodinafop propargyl	تاپیک Topik	آریلوکسی فنوکسی پروپیونات (فوپ) Aryloxyphenoxypropionate (Fop)	EC (8%)*	0.8-1
دیکلوفوپ متیل Diclofop methyl	ایلوکسان Iloxan	آریلوکسی فنوکسی پروپیونات (فوپ) Aryloxyphenoxypropionate (Fop)	EC (36 %)	2.5
فنوکسپروپ‌پ‌ایتل Fenoxaprop-P ethyl	پوماسوپر Puma super	آریلوکسی فنوکسی پروپیونات (فوپ) Aryloxyphenoxypropionate (Fop)	EC (7.5 %)	0.8-1
پینوکسادن Pinoxaden	آکسیال Axial	فنیل پیرازولین (دن) Phenyl pirazoline (Den)	EC (4.5%)	1.5
کلتودیم Clethodim	سلکت سوپر Select super	سیکلو هگزاندیون (دیم) Cyclohexanedione (Dim)	EC (12%)	0.8-1
هالوکسی فوپ- آر متیل استر Haloxypop-R methyl ester	گالانت سوپر Gallant super	آریلوکسی فنوکسی پروپیونات (فوپ) Aryloxyphenoxypropionate (Fop)	EC (10.8%)	0.75

* مایع امولسیون شونده
* Emulsifiable concentrate

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر طی سالهای ۹۷-۱۳۹۶ در گلخانه و آزمایشگاه پژوهش علف‌های هرز دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. مواد گیاهی این پژوهش شامل بذر ۸۰ توده یولاف وحشی وحشی زمستانه مشکوک به مقاومت بود که از سطح ۱۰۰ مزرعه گندم شهرستان رامیان جمع‌آوری شد. موقعیت جغرافیایی شهرستان رامیان و مزارع مورد نمونه برداری در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنین یک بیوتیپ به عنوان بیوتیپ حساس از مناطقی در شهرستان رامیان که هیچ‌گونه سابقه سمپاشی نداشتند (مناطق غیرزراعی نظیر حاشیه جاده‌ها و دامنه تپه‌ها)، جمع‌آوری شد. پس از نمونه‌برداری، بذور جمع‌آوری شده، در داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شده و تا زمان شروع آزمایش در دمای اتاق نگهداری شدند.

در این پژوهش از سه علف‌کش بازدارنده استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز (ACCCase) شامل کلودینافوپ پروپارژیل، دیکلوفوپ متیل و فنوکسپروپ‌پ‌ایتل، که از باریک‌برگ‌کش‌های رایج در مزارع گندم کشور می‌باشند، برای بررسی بروز مقاومت در بیوتیپ‌های یولاف وحشی زمستانه استفاده شد. از سه علف‌کش پینوکسادن، کلتودیم و هالوکسی فوپ- آر متیل استر جهت بررسی امکان استفاده به عنوان علف‌کش‌های جایگزین در بیوتیپ‌های مقاوم استفاده گردید.

برخی مشخصات سموم علف‌کش مورد آزمایش در مطالعه در جدول ۱ خلاصه شده است.

ابتدا بذور یولاف وحشی زمستانه با دست پوست‌کنی شدند. برای این کار درون پوشینه و برون پوشینه از بذور جدا شدند. برای تحریک جوانه‌زنی، بذور به پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری حاوی یک لایه کاغذ صافی منتقل شده و پس از مرطوب شدن با ۲/۵ میلی‌متر آب مقطر به مدت ۳ روز در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی (داخل یخچال معمولی) قرار گرفتند (۲۰). بعد از تیمار پیش‌سرما، پتری‌دیش‌های حاوی بذور جهت جوانه‌زنی در دمای اتاق نگهداری شدند.

برای مطالعه مقاومت بیوتیپ‌های علف‌های هرز باریک‌برگ نسبت به علف‌کش‌های بازدارنده ACCCase از روش زیست‌سنجی در پتری دیش استفاده شد. زیست‌سنجی بذور در پتری‌دیش شامل سه مرحله تعیین غلظت تفکیک‌کننده، غربال بیوتیپ‌های مشکوک به مقاومت با استفاده از غلظت تفکیک‌کننده و آزمایش غلظت-پاسخ در بیوتیپ‌های مقاوم بود. به‌منظور تعیین غلظت تفکیک‌کننده برای علف‌هرز یولاف وحشی وحشی غلظت‌هایی طبق جدول ۲ برای هر علف‌کش در نظر گرفته شد. غلظت‌ها بر اساس آزمایش‌های اولیه و آزمون و خطا انتخاب شدند.

جدول ۲- غلظت‌های مورد استفاده از علف‌کش‌های اعمال شده بر بیوتیپ حساس یولاف وحشی وحشی

Table 2- Concentrations of the herbicides applied on the susceptible winter wild oat biotype		غلظت (mg a.i.L ⁻¹)									
علف‌کش	Herbicide	Concentration (mg a.i.L ⁻¹)									
کلودینافوپ پروپارژیل	Clodinafop propargyl	0	0.005	0.02	0.08	0.32	1.28	5.12	10.24	-	-
دیکلوفوپ متیل	Diclofop methyl	0	0.1	0.5	1	2	4	8	16	-	-
فنوکساپروپ‌پی‌اتیل	Fenoxaprop-P ethyl	0	0.25	0.5	1	2	4	8	-	-	-
پینوکسادن	Pinoxaden	0	0.01	0.08	0.16	0.32	0.64	1.28	-	-	-
کتلودیم	Clethodim	0	0.001	0.005	0.01	0.02	0.04	0.08	-	-	-
هالوکسی‌فوپ-آر متیل استر	Haloxypop-R methyl ester	0	0.0001	0.001	0.005	0.01	0.02	0.04	0.08	0.16	0.32

۹.۷ انجام شد.

برای تجزیه آماری منحنی واکنش به غلظت علف‌کش از آنالیز رگرسیون و مدل لگ لجستیک چهار پارامتره (۱۸) استفاده شد (تابع ۱). که پارامترهای ارائه شده در این تابع عبارتست از: a، شیب منحنی در نقطه e؛ d، حد بالای منحنی پاسخ؛ c، حد پایین منحنی پاسخ و e، غلظت بیان‌کننده GR₅₀ در مواردی که c=0 باشد، این پارامتر از تابع ۱ حذف و در حالت جدید، تابع سه پارامتره (تابع ۲) به داده‌های مربوطه برازش داده می‌شود تا برآورد دقیق‌تری از سایر پارامترها به دست آید (۱۷).

تابع (۱)

$$f(x, b, d, e) = c + \frac{d - c}{1 + \exp \{b(\log(x) - \log(e))\}}$$

مدل فوق با استفاده از محیط نرم‌افزاری R و بسته نرم‌افزاری drc که به همین منظور طراحی شده است به داده‌های حاصل، برازش و اختلاف نمودارهای برازش داده شده با نمودار حاصل از داده‌های مربوط به بیوتیپ حساس مورد بررسی قرار می‌گیرد. درجه و یا فاکتور مقاومت یعنی نسبت GR₅₀ بیوتیپ مقاوم به GR₅₀ بیوتیپ حساس شاخصی است که برای بررسی و مقایسه میزان مقاومت به علف‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرد.

برای تهیه نقشه پراکنش بیوتیپ‌های مقاوم به علف‌کش مورد نظر ابتدا مختصات جغرافیایی محل مورد نظر با استفاده دستگاه GPS map6 ثبت گردید. داده‌های ثبت شده به فرم قابل اجرا در نرم‌افزار GIS توسط نرم‌افزار mapsource تبدیل شدند. جهت اطمینان از صحت محدوده نمونه‌برداری، مختصات نقاط ثبت شده با نقشه های Google earth تطبیق داده شد. پس از ایجاد پایگاه داده‌ها در محیط ArcMap10.3، تهیه نقشه‌های پراکنش بر اساس سیستم مختصات UTM صورت پذیرفت.

برای انجام آزمون، ده بذر پیش‌جوانه‌دار از بیوتیپ حساس علف‌هرز روی یک لایه کاغذ صافی در پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری قرار گرفت و سپس کاغذهای صافی با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول از هر غلظت علف‌کش مرطوب شدند. برای هر غلظت، سه پتری‌دیش به منزله سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین از آب‌مقطر به عنوان محلول شاهد استفاده شد. پتری‌دیش‌ها در دمای اتاق قرار داده شدند. بعد از گذشت ۷ روز طول ساقچه اندازه‌گیری شد.

غلظت تفکیک‌کننده بر روی تمامی توده‌های جمع‌آوری شده اعمال شد و مشابه با آزمون اعمال غلظت تفکیک‌کننده، طول ساقچه بعد از ۷ روز اندازه‌گیری شد. بعد از قرارگیری در معرض غلظت تفکیک‌کننده، توده‌هایی که اختلاف معنی‌داری از نظر متوسط طول ساقچه با بیوتیپ حساس داشتند جهت تعیین درجه مقاومت در مرحله بعدی مورد آزمایش قرار گرفتند.

پس از آزمون غربال، بیوتیپ‌های مقاوم و حساس در معرض چندین غلظت مختلف از هر علف‌کش که بر اساس غلظت تفکیک‌کننده انتخاب شده بود، قرار گرفتند تا درجه مقاومت آنها تعیین شود. بر این اساس غلظت‌های مورد استفاده از هر علف‌کش برای بیوتیپ‌های مقاوم علف‌هرز در جدول ۳، خلاصه شده است. غلظت‌ها برای بیوتیپ‌های حساس، مشابه غلظت‌های استفاده شده برای تعیین غلظت تفکیک‌کننده بودند (جدول ۲). در جدول ۳ غلظت‌های مورد استفاده علف‌کش‌های مختلف برای بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی ذکر شده است.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در مرحله غربال اجرا شد که در آن هر پتری (در آزمون سریع) یا هر گلدان (آزمایش گلخانه‌ای) به منزله یک تکرار بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS

جدول ۳- غلظت‌های مورد استفاده از علف‌کش‌های اعمال شده بر بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی وحشی
Table 3- Concentrations of the herbicides applied on the resistant winter wild oat biotypes

علف‌کش Herbicide	غلظت (mg a.i.L ⁻¹) Concentration (mg a.i.L ⁻¹)							
کلودینافوپ پروپارژیل Clodinafop propargyl	0	0.64	2.56	10.24	20.48	40.96	81.92	-
دیکلوفوپ متیل Diclofop methyl	0	20	40	80	160	320	640	-
فنوکسaproپ پی اتیل Fenoxaprop-P ethyl	0	1.6	3.2	6.4	12.8	25.6	51.2	102.4
پینوکسادن Pinoxaden	0	0.08	0.32	1.28	12.5	10.24	20.48	-
کتودیم Clethodim	0	0.001	0.005	0.01	0.02	0.04	0.08	-
هالوکسی فوپ-آر متیل استر Haloxyp-R methyl ester	0	5.12	10.24	20.48	40.96	81.92	163.84	512

جدول ۵- غلظت تفکیک‌کننده کلودینافوپ پروپارژیل، دیکلوفوپ متیل و فنوکسaproپ پی اتیل برای بیوتیپ‌های حساس یولاف وحشی وحشی زمستانه

Table 5- Discriminating concentration of clodinafop propargyl, diclofop methyl and fenoxaprop-P ethyl for the susceptible winter wild oat biotype

علف‌کش Herbicide	حد پایین (c) Lower limit (c)	حد بالا (d) Upper limit (d)	شیب منحنی (b) Slope (b)	EC ₅₀ mg a.i.L ⁻¹	EC ₈₀ mg a.i.L ⁻¹
کلودینافوپ پروپارژیل Clodinafop propargyl	-	99.14(5.04)	0.81(0.12)	0.01(0.00)**	0.05 (0.01) **
فنوکسaproپ پی اتیل Fenoxaprop-P ethyl	-	98.85(5.86)	0.66(0.66)	0.13(0.05) **	1.7 (0.48) **
دیکلوفوپ متیل Diclofop methyl	-	99.41 (5.84)	1.06 (0.18)	0.3 (0.05) **	1.08 (0.18) **

** معنی داری در سطح احتمال $p \leq 0.01$

** Significant at $p \leq 0.01$

اعداد داخل پرانتز نمایانگر خطای معیار می‌باشد.

The values in the parentheses denote standard error.

علف‌کش فنوکسaproپ پی اتیل

نتایج و بحث

جهت کنترل ۵۰ درصدی بیوتیپ‌های حساس طبق نتایج نیاز به ۰/۱۳ میلی گرم ماده مؤثره در لیتر از علف‌کش فنوکسaproپ پی اتیل می‌باشد (جدول ۷). برای ۵۰ درصد کاهش طول گیاهچه بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی زمستانه نسبت به شاهد، غلظت‌های مختلفی از علف‌کش فنوکسaproپ پی اتیل لازم بود. به‌طوری که مقادیر EC₅₀ برای بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی زمستانه از ۶/۴۳ میلی گرم ماده مؤثره در لیتر با شاخص درجه مقاومت ۴۸/۶۹ تا بیش از ۱۰۲/۴ میلی گرم ماده مؤثره در لیتر با شاخص درجه مقاومت ۸۵۱/۳۳ متفاوت می‌باشد (جدول ۷). بیوتیپ‌هایی که EC₅₀ آنها بزرگتر از ۱۰۲/۴ میلی گرم ماده مؤثره بر لیتر می‌باشد، بیوتیپ‌هایی هستند که توانسته‌اند در بالاترین غلظت اعمال شده طول گیاهچه خود را حفظ کنند و ۸۵۱/۳۳ شاخص مقاومت به دست آمده برای بیوتیپ ram 20 است، این بیوتیپ بالاترین شاخص مقاومتی را در بین بیوتیپ‌هایی دارد که با غلظت‌های اعمال شده حداقل طول گیاهچه را داشته‌اند.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر برای غربال توده‌های مشکوک به مقاومت علف هرز یولاف وحشی زمستانه بر مبنای EC₈₀ از علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپارژیل، دیکلوفوپ متیل و فنوکسaproپ پی اتیل به ترتیب به میزان ۰/۰۵، ۱/۰۸ و ۱/۷ میلی گرم ماده مؤثره در لیتر استفاده شد (جدول ۵). از ۱۰۰ مزرعه نمونه برداری شده، ۸۰ مزرعه آلوده به علف هرز یولاف وحشی زمستانه بوده که نتایج آزمون غربال اولیه نشان داد با فراوانی ۷۲/۵ درصد، ۵۸ بیوتیپ قادر به حفظ بیش از ۸۰ درصد رشد گیاهچه در حضور غلظت تفکیک‌کننده علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپارژیل، فنوکسaproپ پی اتیل و دیکلوفوپ متیل می‌باشند (جدول ۶).

۱- به دلیل زیاد بودن تعداد اشکال و جداول، از ارائه اشکال خودداری شد.

جدول ۶- نتایج حاصل از غربال بیوتیپ‌های مشکوک به مقاومت یولاف وحشی وحشی با غلظت تفکیک‌کننده علف‌کش‌های فنوکساپروپ پی اتیل، دیکلوفوپ متیل و کلودینافوپ پروپارژیل (نتایج بر اساس طول گیاهچه برحسب درصد از شاهد محاسبه شده است)

Table 6- Results obtained from the screening of putatively resistant winter wild oat biotypes with the discriminating concentrations of fenoxaprop-P ethyl, diclofop methyl and clodinafop propargyl (The results are calculated as percent of control)

علف‌کش Herbicide				علف‌کش Herbicide			
کلودینافوپ پروپارژیل Clodinafop propargyl	دیکلوفوپ متیل Diclofop methyl	فنوکساپروپ پی اتیل Fenoxaprop-P ethyl	بیوتیپ Biotype	کلودینافوپ پروپارژیل Clodinafop propargyl	دیکلوفوپ متیل Diclofop methyl	فنوکساپروپ پی اتیل Fenoxaprop-P ethyl	بیوتیپ Biotype
12.76(S)	8.83(S)	12.05(S)	ram41	85.55(R)	84.05(R)	90.54(R)	ram1
91.03(R)	90.54(R)	91.87(R)	ram42	91.55(R)	91.43(R)	87.44(R)	ram2
87.06(R)	84.33(R)	84.67(R)	ram43	86.04(R)	91.05(R)	85.03(R)	ram3
85.12(R)	91.43(R)	90.54(R)	ram44	90.33(R)	83.34(R)	87.70(R)	ram4
85.17(R)	84.54(R)	87.33(R)	ram45	88.87(R)	91.54(R)	88.65(R)	ram5
89.22(R)	90.45(R)	90.43(R)	ram46	86.90(R)	88.06(R)	86.76(R)	ram6
91.43(R)	86.06(R)	87.56(R)	ram47	90.00(R)	85.07(R)	91.87(R)	ram7
91.67(R)	88.30(R)	86.77(R)	ram48	12.06(S)	9.78(S)	10.09(S)	ram8
90.54(R)	91.55(R)	88.87(R)	ram49	90.54(R)	91.43(R)	90.01(R)	ram9
90.43(R)	91.89(R)	88.90(R)	ram50	12.67(S)	10.13(S)	15.43(S)	ram10
90.39(R)	85.90(R)	83.09(R)	ram51	91.98(R)	86.07(R)	87.43(R)	ram 11
91.65(R)	83.08(R)	86.12(R)	ram52	85.09(R)	87.09(R)	84.07(R)	ram12
91.73(R)	83.08(R)	85.10(R)	ram53	83.32(R)	91.32(R)	86.09(R)	ram 13
13.23(S)	11.05(S)	17.54(S)	ram54	90.65(R)	91.05(R)	83.43(R)	ram 14
16.23(S)	10.22(S)	9.87(S)	ram55	87.07(R)	90.07(R)	90.55(R)	ram15
14.44(S)	12.04(S)	11.09(S)	ram56	9.08(S)	16.32(S)	14.67(S)	ram16
86.32(R)	88.56(R)	88.06(R)	ram57	88.54(R)	90.12(R)	90.06(R)	ram17
91.07(R)	90.02(R)	84.03(R)	ram58	84.43(R)	91.04(R)	85.08(R)	ram 18
7.11(S)	11.22(S)	14.54(S)	ram59	90.23(R)	89.44(R)	89.81(R)	ram 19
86.06(S)	84.02(S)	83.56(S)	ram60	86.22(R)	87.54(R)	87.90(R)	ram 20
13.66(S)	12.04(S)	9.75(S)	ram61	86.78(R)	87.06(R)	88.50(R)	ram 21
88.87(R)	85.34(R)	13.43(s)	ram62	89.98(R)	86.56(R)	90.05(R)	ram 22
91.08(R)	88.45(R)	83.35(R)	ram63	89.11(R)	90.78(R)	85.08(R)	ram 23
83.05(R)	88.78(R)	91.56(R)	ram64	86.12(R)	89.90(R)	90.40(R)	ram24
7.57(S)	16.09(S)	12.09(S)	ram65	87.43(R)	86.08(R)	85.54(R)	ram25
86.90(R)	88.76(R)	85.50(R)	ram66	12.89(S)	14.55(S)	8.90(S)	ram26
9.01(S)	10.77(S)	12.98(S)	ram67	7.05(S)	13.78(S)	11.08(S)	ram27
84.45(R)	88.08(R)	83.07(R)	ram68	90.04(R)	83.98(R)	90.04(R)	ram28
13.23(S)	16.00(S)	11.11(S)	ram69	91.23(R)	88.45(R)	86.89(R)	ram29
10.44(S)	12.00(S)	9.45(S)	ram70	89.12(R)	86.65(R)	83.09(R)	ram30
87.65(R)	86.00(R)	91.67(R)	ram71	83.16(R)	85.87(R)	83.65(R)	ram 31
9.07(S)	13.00(S)	16.09(S)	ram72	90.45(R)	87.56(R)	83.77(R)	ram 32
86.06(R)	88.00(R)	88.65(R)	ram73	14.32(R)	11.08(R)	15.89(R)	ram33
11.11(S)	6.00(S)	10.05(S)	ram74	90.12(R)	90.76(R)	83.90(R)	ram34
85.43(R)	83.00(R)	85.10(R)	ram75	90.11(R)	91.63(R)	86.76(R)	ram35
6.33(S)	7.00(S)	5.23(S)	ram76	91.11(R)	88.45(R)	91.66(R)	ram36
85.06(R)	85.00(R)	91.23(R)	ram77	85.32(R)	83.09(R)	89.08(R)	ram37
12.07(S)	12.00(S)	14.04(S)	ram78	7.34(S)	9.06(S)	13.31(S)	ram38
88.60(R)	85.00(R)	90.45(R)	ram79	87.43(R)	85.06(R)	84.65(R)	ram39
87.11(R)	86.00(R)	87.45(R)	ram80	11.45(S)	14.67(S)	10.98(S)	ram40
13.50	10.80	12.11	LSD	13.50	10.80	12.11	LSD

(R) Resistant (R) مقاوم

(S) Susceptible (S) حساس

جدول ۷- پارامترهای برآورد شده از برازش تابع لگ- لجستیک به طول گیاهچه بیوتیپ‌های مقاوم و حساس علف هرز یولاف وحشی وحشی در پاسخ به علف‌کش فنوکساپروپ پی اتیل (نتایج بر اساس طول گیاهچه برحسب درصد از شاهد محاسبه شده‌است).

Table 7- Parameters estimated from the fitting of log-logistic function to coleoptile length of susceptible and resistant biotypes of winter wild oat in response to of fenoxaprop-P ethyl herbicide (The results are calculated as percent of control).

درجه مقاومت	GR ₅₀ (mg a.i.L ⁻¹)	کد بیوتیپ	درجه مقاومت	GR ₅₀ (mg a.i.L ⁻¹)	کد بیوتیپ
Resistance factor		Biotype code	Resistance factor		Biotype code
133.85(55.29)**	>102.4**	ram37	-	0.13(0.05)**	(S) حساس
63.28(30.41)**	30.36(7.02)**	ram38	491.39(249.07)**	64.88(21.47)**	ram1
360.89(176.2)**	57.82(15.03)**	ram39	331.54(162.13)**	43.78(13.46)**	ram2
309.04(112.74)**	40.80(4.90)**	ram40	48.69(24.05)**	6.43(2.03)**	ram3
>851.33**	>102.4**	ram43	131.26(60.57)**	17.33(4.53)**	ram4
147.26(68.62)**	7.65(1.70)**	ram44	>851.33**	>102.4**	ram5
>851.33**	>102.4**	ram45	367.46(173.39)**	>102.4**	ram6
62.25(26.78)**	8.22(1.43)**	ram46	355.62(141.72)**	48.52(13.55)*	ram7
57.96(26.20)**	19.44(4.85)**	ram47	256.43(113.12)**	46.95(5.59)**	ram9
457.40(193.98)**	60.39(13.42)**	ram48	515.04(210.35)**	33.86(8.52)**	ram11
85.86(32.61)**	11.34(1.33)**	ram49	>851.33**	68.00(12.81)**	ram12
74.695(31.12)**	11.14(1.27)**	ram50	>851.33**	>102.4**	ram13
762.33(398.01)**	100.65(37.94)**	ram51	68.25(28.08)**	>102.4**	ram14
333.21(156.79)**	44.00(10.32)**	ram52	168.57(77.19)**	9.01(1.41)**	ram15
127.69(52.47)**	16.86(3.30)**	ram53	>851.33**	22.26(5.68)**	ram17
649.09(382.90)**	85.70(36.52)**	ram54	97.17(36.50)**	>102.4**	ram18
>851.33**	>102.4**	ram57	84.33(31.87)**	12.83(1.27)**	ram19
229.93(106.01)**	30.36(7.53)**	ram58	851.33(420.08)**	11.14(1.18)**	ram20
94.56(2.84)**	12.48(2.91)**	ram60	304.71(118.76)**	>102.4**	ram21
136.78(60.68)**	18.06(4.65)**	ram62	127.8(52.62)**	40.23(7.33)**	ram22
134.57(55.49)**	17.77(3.53)**	ram63	288.29(116.96)**	16.86(3.31)**	ram23
>851.33**	>102.4**	ram64	811.28(342.07)**	38.06(8.16)**	ram24
72.75(33.75)**	9.61(2.12)**	ram66	229.93(98.82)**	38.06(8.16)**	ram25
378.19(186.66)**	49.93(13.88)**	ram68	80.46(31.08)**	10.62(1.83)**	ram29
64.941(29.64)**	8.57(1.75)**	ram71	133.85(55.29)**	>102.4**	ram30
752.33(298.01)**	100.69(36.07)**	ram73	63.28(30.41)**	30.36(7.02)**	ram31
170.79(89.49)**	73.58(25.77)**	ram75	360.89(176.2)**	57.82(15.03)**	ram32
159.44(75.23)**	21.89(4.42)**	ram77	309.04(112.74)**	40.80(4.90)**	ram33
170.79(89.49)**	22.55(7.42)**	ram79	>851.33**	>102.4**	ram35
159.44(75.23)**	51.92(13.24)**	ram80	147.26(68.62)**	7.65(1.70)**	ram36

** معنی‌داری در سطح احتمال p<0.01

** Significant at p<0.01

اعداد داخل پرانتز نماینگر خطای معیار می‌باشد.

The values in the parentheses denote standard error.

غلظت‌های مختلف علف‌کش، مقادیر EC₅₀ متفاوتی برای بیوتیپ‌های مقاوم به دست آمد. این مقادیر از ۴۳/۲۲ میلی گرم ماده موثره در لیتر با شاخص مقاومت ۵۲/۵۷ تا بیش از ۶۴۰ میلی گرم ماده موثره در لیتر با شاخص مقاومت ۷۵۲/۵۷ متفاوت بود (جدول ۸). بیوتیپ‌هایی که EC₅₀ آنها بزرگتر از ۶۴۰ میلی گرم ماده موثره می‌باشد، بیوتیپ‌هایی هستند که توانسته‌اند در بالاترین غلظت اعمال شده طول گیاهچه خود را حفظ کنند و ۷۵۲/۵۷ شاخص مقاومت به دست آمده برای بیوتیپ ram 60 می‌باشد، این بیوتیپ بالاترین شاخص مقاومتی را در بین بیوتیپ‌هایی دارد که با غلظت‌های اعمال شده حداقلی از طول گیاهچه را حفظ کرده‌اند.

علف‌کش دیکلوفوپ متیل

نتایج آزمون غلظت-پاسخ حاکی از بروز مقاومت به علف‌کش دیکلوفوپ متیل در بیوتیپ‌های یولاف وحشی وحشی زمستانه جمع‌آوری شده از مزارع گندم شهرستان رامیان بود. EC₅₀ به دست آمده برای بیوتیپ حساس، ۳/۰ میلی گرم ماده موثره از علف‌کش دیکلوفوپ متیل می‌باشد مقادیر EC₅₀ برآورد شده برای بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی زمستانه بین ۲/۸۲ تا بیشتر از ۸۱/۹۲ میلی گرم ماده موثره در لیتر متفاوت بود. از میان بیوتیپ‌های جمع‌آوری شده از شهرستان رامیان، ۵۸ بیوتیپ یولاف وحشی وحشی زمستانه به این علف‌کش مقاومت نشان دادند. بر اساس برازش تابع لگ لجستیک به داده‌های طول گیاهچه بیوتیپ‌های یولاف وحشی زمستانه در برابر

جدول ۸- پارامترهای برآورد شده از برازش تابع لگ-لجستیک به طول گیاهچه بیوتیپ‌های مقاوم و حساس علف هرز یولاف وحشی وحشی در پاسخ به علف کش دیکلوفوپ متیل (نتایج بر اساس طول گیاهچه برحسب درصد از شاهد محاسبه شده است).

Table 8- Parameters estimated from the fitting of log-logistic function to coleoptile length of susceptible and resistant biotypes of winter wild oat in response to diclofop methyl herbicide (The results are calculated as percent of control).

درجه مقاومت	GR ₅₀ (mg a.i.L ⁻¹)	کد بیوتیپ	درجه مقاومت	GR ₅₀ (mg a.i.L ⁻¹)	کد بیوتیپ
Resistance factor		Biotype code	Resistance factor		Biotype code
>752.57**	403.66(117.28)**	ram37	-	0.3 (0.05)	(S) حساس
>752.57**	>640**	ram38	>752.57**	>640**	ram1
>752.57**	442.73(157.77)**	ram40	>752.57**	>640**	ram2
144.79(91.33)**	43.23(6.72)**	ram43	174.26(51.29)**	52.021(10.97)**	ram3
>752.57**	499.43(10.00)**	ram44	592.53(181.35)	176.88(44.49)**	ram4
>752.57**	>640**	ram45	>752.57**	>640**	ram5
258.49(68.17)**	77.16(11.08)**	ram46	>752.57**	>640**	ram6
>752.57**	>640**	ram47	>752.57**	442.73(175.38)**	ram7
450.61(123.94)**	134.50(21.99)**	ram48	652.99(168.95)**	194.93(30.68)**	ram9
>752.57**	374.33(136.13)**	ram49	>752.57**	372.09(55.78)**	ram11
529.60(146.52)**	158.1(9.60)**	ram50	>752.57**	>640**	ram12
731.33(200.00)**	218.32(9.60)**	ram51	>752.57**	>640**	ram13
>752.57**	264.14(10.00)**	ram52	>752.57**	>640**	ram14
>752.57**	>640**	ram53	234.20(52.99)**	69.92(6.64)**	ram15
>752.57**	>640**	ram54	>752.57**	317.53(111.86)**	ram17
310.59(65.89)**	92.72(9.50)**	ram57	>752.57**	>640**	ram18
>752.57**	>640**	ram58	>752.57**	323.74(56.81)**	ram19
752.57(174.52)**	224.65(31.56)**	ram60	481.62(125.66)**	143.78(23.14)**	ram20
286.00(68.47)**	85.37(13.03)**	ram62	>752.57**	>640**	ram21
365.63(118.68)**	109.15(22.78)**	ram63	>752.57**	>640**	ram22
356.25(81.40)**	106.35(14.34)**	ram64	623.06(186.8)	186.00(45.36)**	ram23
>752.57**	>640**	ram66	>752.57**	387.98(77.09)**	ram24
>752.57**	463.81(78.70)**	ram68	>752.57**	349.00(44.62)**	ram25
>752.57**	561.53(146.73)**	ram71	>752.57**	400.95(79.34)**	ram29
>752.57**	>640**	ram73	365.62(83.26)**	109.15(15.98)**	ram30
>752.57**	278.68(49.90)**	ram75	354.81(75.736)**	105.92(13.03)**	ram31
553.50(476.06)**	165.23(49.88)**	ram77	274.83(72.71)**	82.04(15.86)**	ram32
365.63(118.68)**	142.11(31.51)**	ram79	534.88(158.35)**	159.66(31.42)**	ram33
>752.57**	451.35(193.85)**	ram80	175.62(62.42)**	52.43(8.80)**	ram35
			646.95(280.83)**	193.11(72.13)**	ram36

** معنی داری در سطح احتمال $p \leq 0.01$

** Significant at $p \leq 0.01$

اعداد داخل پرانتز نماینگر خطای معیار می‌باشد.

The values in the parentheses denote standard error.

علف کش کلودینافوپ پروپارژیل

واکنش طول گیاهچه بیوتیپ‌های حساس و مقاوم یولاف وحشی وحشی زمستانه به غلظت‌های مختلف علف کش کلودینافوپ پروپارژیل با استفاده از برازش مدل لگ-لجستیک بررسی شد. نتایج آزمایش غلظت- پاسخ حاکی از بروز مقاومت به علف کش کلودینافوپ پروپارژیل در بیوتیپ‌های مورد آزمون بود. با این حال پاسخ بیوتیپ‌ها به غلظت‌های مختلف علف کش کلودینافوپ پروپارژیل و در نتیجه میزان مقاومت آن‌ها به این علف کش متفاوت بود. برای کنترل ۵۰ درصدی بیوتیپ حساس یولاف وحشی وحشی زمستانه ۰/۰۱ میلی گرم ماده موثره در لیتر از علف کش کلودینافوپ پروپارژیل لازم بود.

مقادیر EC50 برآورد شده برای بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی

زمستانه بین ۲/۸۲ تا بیشتر از ۸۱/۹۲ میلی گرم ماده موثره در لیتر متفاوت بود. بر این اساس، شاخص درجه مقاومت متفاوتی برای بیوتیپ‌های مورد آزمون به دست آمد. شاخص‌های به دست آمده از مقدار ۳۱۰/۲۷ تا بیش از ۱۴۴۳/۹۰ متغیر بوده است (جدول ۹). بیوتیپ‌هایی که EC50 آنها بزرگتر از ۸۱/۹۲ میلی گرم ماده موثره می‌باشد، بیوتیپ‌هایی هستند که توانسته‌اند در بالاترین غلظت اعمال شده طول گیاهچه خود را حفظ کنند و ۱۴۴۳/۹۰ شاخص مقاومت به دست آمده برای بیوتیپ ram 63 می‌باشد، این بیوتیپ بالاترین شاخص مقاومتی را در بین بیوتیپ‌هایی دارد که با غلظت‌های اعمال شده حداقل طول گیاهچه را داشته‌اند.

جدول ۹- پارامترهای برآورد شده از برازش تابع لگ-لجستیک به طول گیاهچه بیوتیپ‌های مقاوم و حساس علف هرز یولاف وحشی وحشی در پاسخ به علف‌کشی کلودینافوپ پروپاژیل (نتایج بر اساس طول گیاهچه برحسب درصد از شاهد محاسبه شده‌است).

Table 9- Parameters estimated from the fitting of log-logistic function to coleoptile length of susceptible and resistant biotypes of winter wild oat in response to of clodinafop propargyl herbicide (The results are calculated as percent of control).

درجه مقاومت	GR ₅₀ (mg a.i.L ⁻¹)	کد بیوتیپ	درجه مقاومت	GR ₅₀ (mg a.i.L ⁻¹)	کد بیوتیپ
Resistance factor		Biotype code	Resistance factor		Biotype code
1386.4(371.27)**	12.25(1.38)**	ram37	-	0.01(0.00)**	(S) حساس
>1443.9**	>81.92**	ram38	>1443.9**	>81.92**	ram1
>1443.9**	17.03(3.45)**	ram40	>1443.9**	>81.92**	ram2
1302.90(429.37)**	11.86(2.59)**	ram43	310.27(104.52)**	2.82(0.67)**	ram3
>1443.9**	58.01(11.97)**	ram44	942.24(348.10)**	8.58(2.42)**	ram4
>1443.9**	44.84(17.54)**	ram45	>1443.9**	65.88(15.82)**	ram5
409.48(185.10)**	3.73(1.24)**	ram46	>1443.9**	>81.92**	ram6
>1443.9**	>81.92**	ram47	>1443.9**	25.41(6.69)**	ram7
405.04(128.28)**	3.68(0.71)**	ram48	992.12(305.68)	9.03 (1.62)**	ram9
>1443.9**	34.00(7.48)**	ram49	>1443.9**	33.31(6.34)**	ram11
945.31(391.01)**	8.61(2.40)**	ram50	>1443.9**	>81.92**	ram12
1209.5(292.12)	11.01(1.07)**	ram51	>1443.9**	>81.92**	ram13
>1443.9**	36.26(8.24)**	ram52	>1443.9**	>81.92**	ram14
>1443.9**	18.27(1.55)**	ram53	656.91(224.63)**	5.98(1.47)**	ram15
>1443.9**	>81.92**	ram57	>1443.9**	15.01(3.41)**	ram17
>1443.9**	>81.92**	ram58	>1443.9**	13.26(3.32)**	ram18
>1443.9**	19.53(3.13)**	ram60	1400.00(388.25)**	12.74(2.11)**	ram19
>1443.9**	79.48(17.90)**	ram62	>1443.9**	40.44(5.72)**	ram20
1443.90(497.68)**	13.14(2.97)**	ram63	>1443.9**	31.04(4.93)**	ram21
1162.4(335.89)**	10.58(1.74)**	ram64	>1443.9**	>81.92**	ram22
>1443.9**	32.83(6.57)**	ram66	>1443.9**	19.53(3.74)**	ram25
>1443.9**	23.55(4.99)**	ram68	>1443.9**	>81.92**	ram23
>1443.9**	56.42(21.65)**	ram71	>1443.9**	75.36(24.15)**	ram24
>1443.9**	>81.92**	ram73	>1443.9**	>81.92**	ram29
>1443.9**	20.52(3.75)**	ram75	>1443.9**	13.25(2.54)**	ram30
>1443.9**	19.31(3.95)**	ram77	>1443.9**	13.88(3.70)**	ram31
>1443.9**	32.38(4.56)**	ram79	>1443.9**	20.32(4.63)**	ram 32
>1443.9**	>81.92**	ram80	>1443.9**	21.31(4.44)**	ram 33
			310.26(108.44)**	2.82(0.70)**	ram35
			983.48(377.37)**	8.95(2.63)**	ram36

** معنی‌داری در سطح احتمال p≤0.01

** Significant at p≤0.01

اعداد داخل پرانتز نمایشگر خطای معیار می‌باشد.

The values in the parentheses denote standard error.

مقاومت در یولاف وحشی و وحشی زمستانه نسبت به بازدارنده‌های ACCase توسط زرد و باغستانی (۲۱)، بناکاشانی و همکاران (۱)، راستگو (۱۵) تأیید و گزارش شده‌است. مقاومت عرضی یولاف وحشی وحشی را در استان گلستان توسط نجاری (۱۳) در شهرستان آق قلا ۳۰ درصد، کلامی (۷) در شهرستان کردکوی ۲۱ درصد، طاطاری (۲۰) در شهرستان گنبد ۶ درصد، رازقندی (۱۶) در شهرستان علی‌آباد ۴۹ درصد و صوفی‌زاده (۱۹) در کلاله ۱۱/۴۳ درصد گزارش کردند. باتوجه به نتایج شهرستان رامیان، ۵۸ بیوتیپ یولاف وحشی و وحشی زمستانه به هر سه علف‌کش کلودینافوپ پروپاژیل، فنوکسپروپ پی اتیل و دیکلوفوپ متیل دارای مقاومت عرضی بودند که بیانگر تکوین پدیده مقاومت این شهرستان در سال‌های گذشته می‌باشد. با توجه به بالا بودن شاخص‌های مقاومتی در بیوتیپ‌های یولاف

نتایج این تحقیق بروز مقاومت به علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپاژیل، فنوکسپروپ پی اتیل و دیکلوفوپ متیل در ۵۸ بیوتیپ یولاف وحشی زمستانه جمع‌آوری شده از مزارع گندم شهرستان رامیان را تأیید می‌کند. در میان بیوتیپ‌های مقاوم یولاف وحشی وحشی زمستانه، شاخص درجه مقاومت متفاوتی به علف‌کش‌های کلودینافوپ پروپاژیل، فنوکسپروپ پی اتیل و دیکلوفوپ متیل به دست آمد.

برخی از بیوتیپ‌ها در هر سه علف‌کش دارای شاخص مقاومتی بسیار بالایی بوده‌اند. در علف‌کش کلودینافوپ پروپاژیل ۴۲ بیوتیپ دارای شاخص مقاومتی بالاتر از ۱۴۴۳/۹۰ بوده و همچنین در علف‌کش‌های دیکلوفوپ متیل و فنوکسپروپ به ترتیب ۳۸ و ۱۱ بیوتیپ شاخص مقاومتی بالای ۷۵۲/۵۷ و ۸۵۱/۳۳ داشته‌اند.

برای بیوتیپ ram 15 به دست آمد. در دو علف کش دیگر شاخص های مقاومتی پایین بوده و EC₅₀ بیوتیپ های مورد بررسی تفاوت معناداری با بیوتیپ حساس نداشتند (جدول ۱۱ و ۱۲).

غلظت تفکیک کننده براساس EC₅₀ در آزمون سریع در بیوتیپ مقاوم قیاق (*Sorghum halepense* L.) با استفاده از علف کش کلتودیم معادل ۰/۰۹ میلی گرم در لیتر به دست آمد (۳). این غلظت برای علف کش ستوکسیدیم و در علف هرز دم روباهی (*Setaria faberi* Herrm.) برابر با ۱۰ میلی گرم در لیتر بود (۱۶). مطالعه اثر چند علف کش متعلق گروه های شیمیایی مختلف از خانواده بازدارنده های ACCase روی یولاف وحشی وحشی (*Avena fatua* L.) نشان داد که غلظت تفکیک کننده برای علف کش های فنوکساپروپ پی اتیل، کلودینافوپ پروپارژیل، کلتودیم، ستوکسیدیم و ترالوکسیدیم که موجب ۸۰٪ کاهش طول گیاهچه نسبت به شاهد می شود به ترتیب برابر با ۱۰، ۳، ۵، ۱ و ۵ میکرومول در لیتر بود (۲).

وحشی برای داشتن یک برنامه مدیریتی، نیازمند اطلاعات بیشتر از واکنش بیوتیپ های یولاف وحشی زمستانه در برابر سایر علف کش ها می باشد. به این منظور و در جهت بررسی واکنش بیوتیپ های مقاوم، سه علف کش هالوکسی فوپ-آر متیل استر، کلتودیم و پینوکسادن از خانواده آریلوکسی فنوکسی پروپیونات، سیکلو هگزاندیون و فنیل پیرازولین ها جهت تست پتری انتخاب شدند. دو بیوتیپ از بین بیوتیپ هایی با شاخص مقاومتی بالا ram 18، ram 1 و دو بیوتیپ از بین بیوتیپ هایی با کمترین شاخص مقاومتی ram 4 و ram 15 به عنوان نمونه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج در جداول (۱۰، ۱۱، ۱۲) گنجانده شده است.

در ۴ بیوتیپ مورد بررسی باتوجه به برازش تابع لگ-لجستیک به داده ها، طول گیاهچه بیوتیپ یولاف وحشی زمستانه در برابر غلظت های مختلف هالوکسی فوپ-آر متیل استر مقدار EC₅₀ برای بیوتیپ حساس ۰/۰۱۳ میلی گرم ماده موثره در لیتر برآورد شد (جدول ۱۰). در بیوتیپ ram 1 مقدار EC₅₀ برابر ۳/۵۸ با شاخص مقاومتی معادل ۴۵۴/۳۵ و کمترین مقدار شاخص مقاومتی معادل ۲۸۴/۵۰

جدول ۱۰- پارامترهای برآورد شده از برازش تابع لگ-لجستیک به طول گیاهچه بیوتیپ های مقاوم و حساس علف هرز یولاف وحشی وحشی زمستانه در پاسخ به هالوکسی فوپ-آر متیل استر

Table 10- Parameters estimated from the fitting of log-logistic function to coleoptile length of susceptible and resistant biotypes of winter wild oat in response to haloxyfop-R methyl ester

کد بیوتیپ Biotype code	حد بالا (d) Upper limit (d)	شیب منحنی (b) Slope (b)	EC ₅₀ mg a.i.L ⁻¹	شاخص مقاومت Resistance factor
حساس (S)	98.84(2.14)	0.65(0.05)	0.013(0.0007)	-
ram1	99.97(3.67)	1.23(0.23)	3.58(0.62)	424.35(69.45)
ram15	100.05(3.67)	0.92(0.11)	5.35(0.81)	284.50(52.27)
ram4	100.12(3.67)	1.33(0.28)	3.69(0.62)	292.93(53.03)
ram18	99.92(3.68)	0.93(0.12)	5.08(0.79)	403.11(67.31)

** معنی داری در سطح احتمال p≤0.01

() اعداد داخل پرانتز نماینگر خطای معیار می باشد.

** Significant at p≤0.01

() values in parentheses denote standard error.

جدول ۱۱- پارامترهای برآورد شده از برازش تابع لگ-لجستیک به طول گیاهچه بیوتیپ های مقاوم و حساس علف هرز یولاف وحشی وحشی زمستانه در پاسخ به کلتودیم

Table 11- Parameters estimated from the fitting of log-logistic function to coleoptile length of susceptible and resistant biotypes of winter wild oat in response to clethodim

کد بیوتیپ Biotype code	حد بالا (d) Upper limit (d)	شیب منحنی (b) Slope (b)	EC ₅₀ mg a.i.L ⁻¹	شاخص مقاومت Resistance factor
حساس (S)	99.52(6.35)	0.64(0.12)	0.0011(0.0004)	-
ram1	99.05(6.40)	0.68(0.12)	0.0021(0.0007)	1.96(1.07)
ram15	99.25(6.38)	0.69(0.12)	0.0016(0.0006)	1.48(0.81)
ram4	99.43(6.36)	0.55(0.11)	0.0012(0.0006)	1.16(0.71)
ram18	99.47(6.35)	0.55(0.11)	0.0013(0.0006)	1.20(0.73)

** معنی داری در سطح احتمال p≤0.01

() اعداد داخل پرانتز نماینگر خطای معیار می باشد.

** Significant at p≤0.01

() values in parentheses denote standard error.

جدول ۱۲- پارامترهای برآورد شده از برازش تابع لگ-لجستیک به طول گیاهچه بیوتیپ‌های مقاوم و حساس علف هرز یولاف وحشی زمستانه در پاسخ به پینوکسادن

Table 12- Parameters estimated from the fitting of log-logistic function to coleoptile length of susceptible and resistant biotypes of winter wild oat in response to pinoxaden

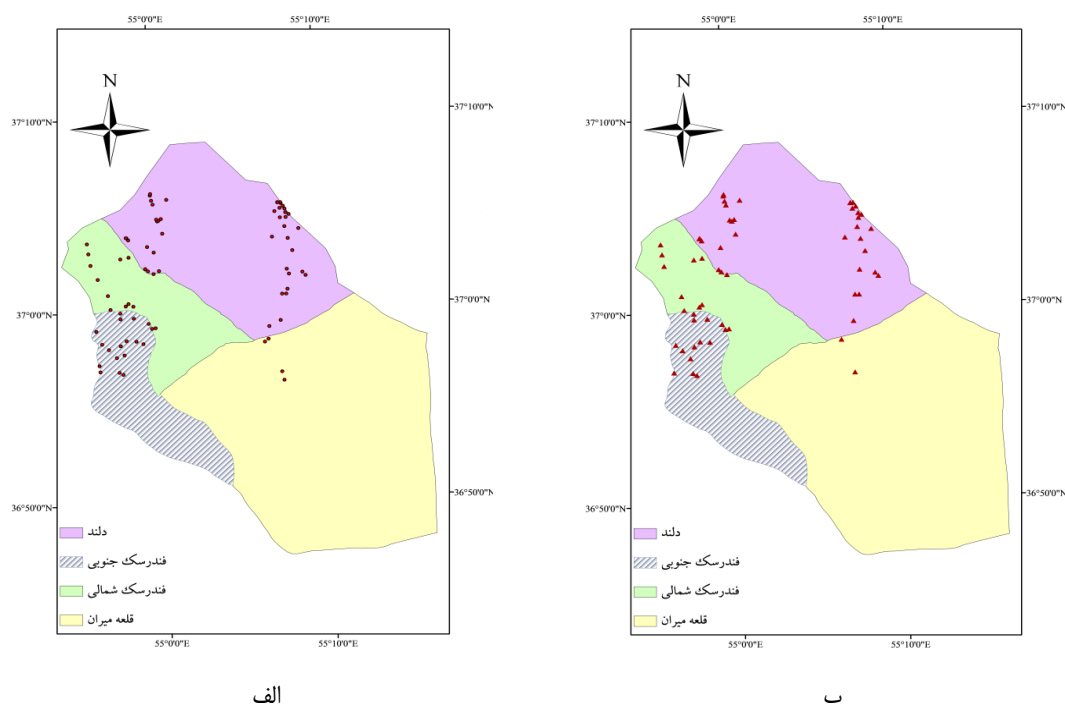
کد بیوتیپ Biotype code	حد بالا (d) Upper limit (d)	شیب منحنی (b) Slope (b)	EC ₅₀ mg a.i.L ⁻¹	شاخص مقاومت Resistance factor
حساس (S)	94.68(4.32)	1.71(0.34)	0.10(0.01)	-
ram1	100.71(5.48)	0.75(0.14)	0.14(0.04)	1.34(0.40)
ram15	100.56(5.51)	1.18(0.32)	0.11(0.02)	1.10(0.25)
ram4	100.29(5.53)	1.384(0.32)	0.12(0.02)	1.15(0.26)
ram18	100.30(5.53)	1.30(0.29)	0.12(0.02)	1.16(0.25)

** معنی‌داری در سطح احتمال $p \leq 0.01$

() اعداد داخل پرانتز نمایگر خطای معیار می‌باشد.

** Significant at $p \leq 0.01$

() values in parentheses denote standard error.



شکل ۲- (الف) نقشه پراکنش بیوتیپ‌های یولاف وحشی زمستانه مشکوک به مقاومت جمع‌آوری شده از مزارع شهرستان رامیان (ب) نقشه پراکنش بیوتیپ‌های یولاف وحشی مقاوم به کلودینافوپ پروپازیل، فنوکساپروپ پی اتیل و دیکلوفوپ متیل

Figure 2- a) Distribution map of the fields putatively infested with winter wild oat
b) Distribution map of winter wild oat biotypes resistant to fenoxaprop-P ethyl, diclofop methyl and clodinafop propargyl

بررسی نتایج، بیانگر درجه مقاومت بالا نسبت به علف‌کش‌های خانواده ACCase در این شهرستان می‌باشد. همچنین سعی شد با بیان نتایج تحقیقاتی که در استان گلستان در این سطح انجام شده است دیدی از کل استان پیش رو باشد. این نکته قابل‌الذکر است در آزمون تست پتری نسبت به آزمایش‌های گلدانی همواره شاخص‌های مقاومتی بالاتری از مقاومت برآورد می‌شود. برآورد بالای درجات مقاومت گویای دیرینه بودن و داشتن نگاه مدیریت انفعالی در کنترل

علف‌های هرز می‌باشد. مدیریت انفعالی^۱ مدیریتی است که از یک ابزار تا زمان داشتن کارایی استفاده می‌شود و سپس با شکسته شدن کارایی این ابزار به فکر جایگزینی با ابزار دیگر می‌شود. اما مدیریت غیر انفعالی^۲ مدیریتی است که با اجتناب از شکستن ابزار سعی در حفظ اثر ابزار دارد (۱۲). جهت داشتن یک برنامه برپایه مدیریت غیر

1- Reactive management
2- Proactive management

انفعالی نکات بسیاری باید بررسی و مدنظر قرار گرفته شود.

در مزارع شهرستان رامیان، تناوب زراعی شامل گندم، کلزا، توت فرنگی، نخودفرنگی، باقلا، گوجه فرنگی، خیار و... می‌باشد. شاید بدون در نظر گرفتن نوع سموم علف‌کشی مصرفی در محصولات ذکر شده برنامه تناوبی مناسبی در دست اجرا باشد. اما با بررسی‌های میدانی و پرسش و پاسخ از کشاورزان منطقه در می‌یابیم در محصولاتی که در برنامه تناوبی با گندم قرار گرفته‌اند برخلاف انتظار، کشاورزان جهت مبارزه با علف‌های هرز باریک‌برگ استفاده از سموم شیمیایی را بدون توجه به نوع خانواده شیمیایی جایگزین روش‌های مکانیکی و زراعی نموده‌اند. به صرفه بودن روش‌های شیمیایی در کنار سهولت استفاده نسبت به روش‌های مکانیکی و زراعی کاربرد علف‌کش‌های بازدارنده ACCase را در این محصولات پررنگ‌تر کرده است. هم‌چنین عدم برنامه‌ریزی کشاورزان در مدیریت علف‌های هرز محصولات سبب شده است به عنوان استراتژی دقیقه آخر، مبارزه شیمیایی انتخاب شده و بدون در نظر گرفتن تناوب علف‌کشی اجرا شود. همین عامل سبب فشار گزینشی شدیدی شده بطوری‌که تک بوته‌های باقیمانده از کنترل شیمیایی قادر به تغییر نسبت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی فلور علف‌های هرز منطقه می‌باشند. تداوم این فشار باعث افزایش فراوانی آلل‌های مقاوم نسبت به

حساس می‌شود (۱۰ و ۵). استفاده از علف‌کش‌هایی که نحوه عمل متفاوت دارند، می‌تواند منجر به از بین رفتن بوته‌های حساس و مقاوم شود، ولی از سوی دیگر این امر به منزله اعمال فشار گزینشی جدیدی خواهد بود که در نهایت باعث تشدید مقاومت و حتی بروز مقاومت‌های عرضی و چندگانه خواهد شد (۴) و به همین دلیل توجه به سایر اجزای مدیریت تلفیقی از اهمیت به سزایی برای جلوگیری و یا به تاخیر انداختن پدیده مقاومت به علف‌کش‌ها برخوردار می‌باشد.

نقشه‌های پراکنش رسم شده توسط نرم‌افزار GIS به مدیران کشاورزی این توانایی را می‌دهد که با در نظر گرفتن مزارع آلوده به علف‌های هرز مقاوم برنامه‌های مدیریتی در جهت کاهش فشار گزینشی داشته باشند. عدم توزیع سموم علف‌کشی که باعث توسعه مقاومت در مناطق آلوده می‌شود از دسترس کشاورزان در کنار روش‌های زراعی سبب کاهش فشار گزینشی می‌شود. به کارگیری اصل تنوع گیاهان زراعی در حقیقت ابزاری است جهت برهم زدن تعادل و ثبات جوامع علف‌های هرز و نیز افزایش توان رقابتی گیاه زراعی که این فرایند در دراز مدت موجب کاهش حضور و به حداقل رسانیدن تعداد و میزان خسارت ناشی از حضور علف‌های هرز مقاوم و جلوگیری از افزایش آلل‌های مقاوم خواهد شد.

منابع

- 1- Banakashani F., Zand E., and Alizadeh H.M., 2007. Resistance of wild oat (*Avena ludoviciana*) biotypes to clodinafop-propargil herbicide. Applied Entomology and Phytopathology 74: 127-149. (In Persian with English abstract)
- 2- Bourgeois L., and Morrison I.N. 1997. Mapping risk areas for resistance to ACCase inhibitor herbicides in Manitoba. Canadian Journal of Plant Science 77: 173-179.
- 3- Burke I.C., Thomas W.E., Burton J.D., Spears J.F., and Wilcut J.W. 2006. A seedling assay to screen aryloxyphenoxypropionic acid and cyclohexanedione resistance in johnsongrass (*Sorghum halepense*). Weed Technology 20(4): 950-955.
- 4- Gherekhloo J., Osuna M.D., and De Prado R. 2012. Biochemical and molecular basis of resistance to ACCase-inhibiting herbicides in Iranian *Phalaris minor* populations. Weed Research 52: 367-372.
- 5- Gherekhloo J., Oveisi M., Zand E., and De Prado R. 2016. A review of herbicide resistance in Iran. Weed Science 64:551-561.
- 6- Heap I. 2020. International survey of herbicide resistance weeds. www.weedscience.com. Accessed: 10 Jan 2019.
- 7- Kalami R. 2014. Identification of resistant weeds to ACCase and ALS inhibitors in wheat fields of Kordkuy. MSc Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)
- 8- Koller M., and Lanini W.T. 2005, Site-specific herbicide applications based on weed maps provide effective control. California Agriculture 59: 182-187.
- 9- Manechote C., Preston C., and Powles S.B. 1997. A diclofop-methyl-resistant *Avena sterilis* biotype with a herbicide-resistant acetyl-coenzyme a carboxylase and enhanced metabolism of diclofop-methyl. Pesticide Science 49: 105-114.
- 10- Maxwell B.D., Roush M.L., and Radosevich S.R. 1990. Predicting the evolution and dynamics of herbicide resistance in weed populations. Weed Technology 4: 2-13.
- 11- Montazeri M., Zand E., and Baghestani M.A. 2005. Weeds and their control in wheat fields of Iran. Advances in Agronomy 58: 57-93.
- 12- Mueller T.C., Mitchell P.D., Young B.G., and Culpepper A.S. 2005. Proactive versus reactive management of glyphosate-resistant or -tolerant weeds. Weed Technology 19(4): 924-933.
- 13- Najjari Kalantari. 2013. Identification of resistant weeds to ACCase and ALS inhibitors in wheat fields of Aq Qala and preparing their distribution map. MSc Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural

- Resources. (In Persian)
- 14- Prather T.S., Ditomaso J.M., and Holt J.S. 2000. Herbicide resistance, definition and management strategies. Publication of Division of Agriculture and Natural Resources. UC Davis USA. Publication 8012.
- 15- Rastgoo M. 2007. Detecting of *Avena ludoviciana* resistant to aryloxyphenoxypropionate herbicides in wheat fields of Khuzestan province. PhD Thesis, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian)
- 16- Razghandi A. 2016. Identification of resistant biotypes to aryloxy phenoxy propionate and asetolactate synthase inhibitors in wheat fields of Aliabad-e katool and preparing their distribution map. MSc Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)
- 17- Retrum J., and Forcella F. 2002. Giant foxtail (*Setaria faberi*) seedling assay for resistance to sethoxydim. Weed Technology 16(2): 464-466.
- 18- Ritz C., and Streibig J.C. 2005. Bioassay analysis using R. Journal of Statistical Software 12(5): 1-22.
- 19- Soofizadeh T. 2015. Identification of resistant biotypes to aryloxy phenoxy propionate and asetolactate synthase inhibitors in wheat fields of Kalaleh and preparing their distribution map. MSc Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)
- 20- Tatari S., Gherekhloo J., Siahmarguee A., and Kazemi H. 2018. Identification of resistant *Avena ludoviciana* Dur accessions to ACCase inhibitor herbicides in Gonbad-E Kavus wheat fields and mapping their distribution. Plant Productions 41(2): 103-116.
- 21- Zand E., and Baghestani M.A. 2002. Weed resistance to herbicides. Jihad-e-Daneshgahi Press, 176pp.
- 22- Zand E., Baghestani M., Nezamabadi N., and Shimi P. 2017. Application guide of registered herbicides in Iran. Jihade-e-Daneshgahi Press, Mashhad, 223 pp.
- 23- Zhang Y., Li W., Zhou W., Jia H., Liu L., Li B., Han Y., and Qi S. 2020. Dissipation dynamics and dietary risk assessment of pyraclonil residues in rice (*Oryza sativa* L.). Microchemical Journal 152: 104440.



Investigating the Resistance of Winter Wild Oat Biotypes to ACCase Inhibitor Herbicide in Wheat Fields of Ramian County

M. Heravi¹- J. Gherekhloo^{2*}- A. Siahmarguee³- H. Kazemi⁴- S. Hassanpour- Bourkheili⁵

Received: 11-05-2020

Accepted: 14-09-2020

Introduction: Weeds are wild plant species which grow in agricultural ecosystems and compete with crops for resources such as water, nutrients, light, and space. Wild oat is reported as one of the most troublesome autumn weeds in croplands and its dominant species in Iran is winter wild oat (*Avena ludoviciana* Dur.). Herbicide resistance is the inherent ability of a weed biotype in survival after being exposed to a rate of herbicide which would be lethal to the wild type species. In the recent years, there have been several reports on the occurrence of herbicide resistance in Golestan province. The following research was conducted to identify the ACCase- resistant winter wild oat biotypes and generation of distribution map for the resistant biotypes in wheat fields of Ramian Township.

Materials and Methods: The present study was conducted in 2017-2018 at the greenhouse and Weed Science laboratory of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Plant material included 80 putatively resistant winter wild oat biotypes which were collected from 100 wheat fields of Ramian Township. The susceptible biotype was also collected from the regions with no history of herbicide spray. Three Acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides including clodinafop propargyl, fenoxaprop-P ethyl, and diclofop methyl which are common graminicides applied in wheat fields of the country were used to confirm the occurrence of resistance in winter wild oat biotypes. Three herbicides including pinoxaden, clethodim, and haloxyfop-R methyl ester were also applied on the biotypes as the possible alternative herbicides. First the winter wild oat seeds were hulled by hand. To obtain a more uniform germination, the seeds were placed in 9 cm Petri dishes topped with a filter paper and 2.5 mL of distilled water was added to the Petri dishes. Then, the Petri dishes were transferred to a refrigerator with a temperature of 4-5°C under darkness conditions. After pre-chilling, the petri dishes were incubated at the room temperature to germinate. To perform the discriminating concentration, pre- screening and concentration- response assays, 10 pre- germinated seeds from each biotype were placed on the Petri dishes as described above, then were treated with various concentrations of the mentioned herbicides. Three Petri dishes were used for each concentration, with each Petri dish serving as a replicate. Also, the Petri dishes treated with distilled water were regarded as control. The Petri dishes were kept at the room temperature for seven days and then the length of their coleoptile was measured. Four parametered log-logistic function was fitted to the data using R software (drc package). ArcGis V.10.3 was used to generate the distribution map of the herbicide- resistant biotypes.

Results and Discussion: Results of the present study indicate the confirmation of resistance to clodinafop propargyl, fenoxaprop-P ethyl, and diclofop methyl herbicides in 58 out of 80 winter wild oat biotypes gathered from wheat fields of Ramian Township. Resistance factor to clodinafop propargyl, fenoxaprop-P ethyl, and diclofop methyl herbicides were 48.69 to >851.33, 52.57 to >752.57, and 310.27 to >1443.90, respectively. For further investigation on the response of these resistant biotypes, three herbicides including pinoxaden, clethodim, and haloxyfop-R methyl ester were applied on the biotypes as a Petri dish assay. Two biotypes with the highest resistance factors (ram1, ram18) and two with the lowest resistance factors (ram15, ram4) were selected for this assay. In the haloxyfop-R methyl ester treatment, the highest and lowest resistance factors were observed in ram1 with 423.35 and ram15 with 284.50, respectively. In the other two herbicide however, resistance factor had no significant difference with the value 1. Application of herbicides possessing different modes of action may lead to elimination of both susceptible and resistant biotypes. However, this will serve as a new selective pressure which will eventually result in intensification of resistance and furthermore, evolution of cross and multiple- resistant species. Thus, meticulous application of integrated weed management methods are of great importance to prevent or delay the evolution of resistance to herbicides.

Conclusion: Implementation of cultural methods for weed management and preventing the distribution of

1, 2, 3, 4 and 5- M.Sc. Graduate of Weed Science, Associate Professor, Assistant Professor, Associate Professor and Ph.D. Graduate of Crop Ecology, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: gherekhloo@gau.ac.ir)

herbicides to which the weeds have readily developed resistance will lead to reduction of selective pressure. Adoption of crop and herbicide rotation principles will serve as a tool to debilitate the weed in competition with the crop, which in long term may contribute to reduced frequency of resistant alleles.

Keywords: Concentration-response assay, Distribution map, Herbicide resistance, Resistance factor

Contents

Biological Control of <i>Fusarium fujikuroi</i>, the Causal Agent of Bakanae Using Some Antagonistic Bacteria in Guilan Province	295
M.R. Safari Motlagh - M. Dashti	
Morphological and Molecular Identification of Major Species of <i>Meloidogyne</i> and Distribution there in Pomegranate Orchards in Khorasan Provinces	308
N. Katooli - E. Mahdikhani Moghadam - R. Aghnoum	
Improving Molecular Diagnosis of Root Knot Nematode (<i>Meloidogyne javanica</i>)	324
R. Keshavarz Kuhjerdi - A. Pakniat Jahromi- M. Honarvar- M. Pakniat Jahromi	
Phylogenetic Relation of <i>Watermelon chlorotic stunt virus</i> (WmCSV) Isolates of Sistan and Baluchestan Province by Sequencing of Coat Protein Gene	336
M. Jafari - Z. Sadeghi - S. Nasrollanejad- A.R. Shahrokhi	
The Effect of <i>Bacillus cereus</i> and <i>Bacillus subtilis</i> on Pathogenicity of <i>Meloidogyne javanica</i> in Three Rootstocks of Peach under Greenhouse Condition	346
A. Abdollahi Arjenaki - N. Panjehkeh- A.A. Fadaei Tehrani- M. Salari- A.H. Taheri	
Effect of Different Cultivars of Potato on Population Density of the Onion Thrips, <i>Thrips tabaci</i> Lindeman and its Natural Enemies under Field Condition in Ardabil Province	356
S.A.A. Fathi - M. Jafari Jahed	
Mutualistic Ants (Hymenoptera: Formicidae) Associated with <i>Paracoccus ficus</i> in Fig Orchards of Fars Province, Iran	360
M. Esfandiari - Sh. Mohammadi- M. Jafari- M. Moghaddam	
Effect of Vegetable Oils on Sethoxydim Efficacy on the Control of Wild Oat (<i>Avena ludoviciana</i> Durieu.)	371
H. Hammami - M.H. Rashed Mohassel - M. Parsa- M. Bannayan-Aval- E. Zand	
The Effect of Sequence and Time Interval of Adding Adjuvant and Sulfosulfuron to Hard Water in the Control of Winter Wild Oat (<i>Avena sterilis</i> ssp. <i>ludoviciana</i> Durieu.)	383
A. Aliverdi - S. Badrkhani- G. Ahmadvand	
Investigating the Resistance of Winter Wild Oat Biotypes to ACCase Inhibitor Herbicide in Wheat Fields of Ramian County	399
M. Heravi - J. Gherekhloo- A. Siahmarguee- H. Kazemi - S. Hassanpour- Bourkheili	

Plant Protection

(AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY)

Vol . 34

No.3

2020

Published by: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
Editor in charge: Valizadeh, R. (Ruminant Nutrition) Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
General Chief Editor: Rashed- Mohassel, M.H. (Weed Science) Prof. Ferdowsi University of Mashhad.

Editorial Board:

Izadi Darbandi, E.	Weed Science	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Pourjam, E.	Plant Pathology	Asso. Prof. Tarbiat Modarres University.
Hosseini, M.	Agricultural Entomology	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Rashed- Mohassel, M.H.	Weed Science	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Rashed- Mohassel, A.	Insect ecology	Post-Doctoral Research Associate ,Texas A&M AgriLife Extension Service
Razi, H.	Crop Production & Plant Breeding	Asso. Prof. Shiraz University
Rajaei, H.	Entomologist	Assis, Department Entomology State Museum of Natural History Stuttgart Rosenstein 1, 70191 Stuttgart, Germany
Saboori, A.	Agricultural Entomology	Prof. Tehran University
Sadeghi Namaghi, H.	Agricultural Entomology	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Sahragard, A.	Agricultural Entomology	Prof. Guilan University.
Mahdikhani Moghadam, E	Plant Pathology	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Marashi, S.H.	Biotechnology & Plant Breeding	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad.

Address: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

P.O.BOX: 91775- 1163

Fax: +98 -0511- 8787430

E-Mail: Jpp1@um.ac.ir

Web Site: <http://jm.um.ac.ir>