



عنوان مقالات

- ارزیابی واکنش ارقام مختلف لوبیا به قارچ‌های *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium solani* در شرایط آزمایشگاهی ۱۴۳
صدیقه محمدی - مسلم آتش پنجه
- بررسی توانایی کنترل کنندگی قارچ *Trichoderma harzianum* BI به تنهایی و در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی تیمین، ریبوفلاوین و هگزائونیک اسید علیه نماتد ریشه گوجه فرنگی ۱۵۵
مجتبی کواری - عصمت مهدیخانی مقدم - حمید روحانی
- تأثیر سیلیکات سدیم در القاء مقاومت سیستمیک در خیار مبتلا به پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه ۱۷۱
سمیرا رئیسی دهکردی - ناصر رادمان - عبدالحسین طاهری - سید کاظم صباغ
- ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره نانوکپسوله زیست‌سازگار *Trichoderma harzianum* ۱۸۵
مانده شهری طبرستانی
- مطالعه شب پره‌های زیرخانواده Xyleninae (Lep.: Noctuidae) در بخش‌هایی از غرب زاگرس در استان‌های خوزستان و ایلام ۱۹۹
محمد احمدی - مهدی اسفندیاری - اصغر شیروانی
- تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *Hippodamia variegata* (Goeze) در تغذیه از *Myzus persicae* (Sulzer) ۲۱۵
طیبه علی زمانی - جهانگیر شاکرمی - مژگان مردانی طلایی - آرش زیبایی
- موقعیت آرایه‌شناختی یک گونه‌ی بومی از جنس *Feltiella* Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) در ایران ۲۲۹
مانده ملانی - حسین صادقی نامقی
- پویایی بانک بذر و گیاهچه علف‌های هرز در پاسخ به نوع تناوب در اکوسیستم‌های زراعی ۲۴۱
نیوشا ولایی - محمدحسن راشدمحصل - محمد بنایان
- جداسازی ژن‌های کاندید در میاتکنش میزبان - گل جالیز (*Phelipanche aegyptiaca*) با استفاده از روش پیمایش ژنوم ۲۶۱
محمدرضا رضائی - امین میرشمسی کاخکی - علیرضا سیفی
- اثر مالچ زنده و کلش در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین بر عملکرد و اجزای عملکرد شوید (*Anethum graveolens* L.) ۲۷۱
مریم عباس زاده - روح اله امینی - عادل دباغ محمدی نسب
- بررسی اثر اختلاط علف‌کش کلوپیرالید با علف‌کش‌های اگزادیازون و اگزادیا رجیل بر کنترل علف‌های هرز پهن برگ کلزا (*Brassica napus* L.) ۲۸۵
امین رشیدی - الهام الهی فرد - محمدحسین طیب

Contents

- Evaluating the Reaction of different Species of Beans to *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* In Vitro 141
S. Mohammadi, M. Atashpanjeh
- Evaluation of the *Trichoderma harzianum* BI alone and in Combination with Thiamine, Riboflavin and Hexanoic Acid Effects on Resistance Induction against *Meloidogyne javanica* in Tomato Plants 153
M. Kavari, E. Mahdikhani- Moghaddam, H. Rouhani
- The Effect of Sodium Silicate in Inducing Systemic Resistance in Cucumber *Fusarium* Stem and Root Rot 169
S. Reisi Dehkordi, N. Radman, A.H. Taheri, S.K. Sabbagh
- Evaluation of Antifungal Effect of Biodegradable Nano Encapsulated Extract of *Trichoderma harzianum* 183
M. Shahiri Tabarestani
- Study on the Moths of the Subfamily Xyleninae (Lep.: Noctuidae) in Parts of Western Zagros in Khuzestan and Ilam Provinces 197
M. Ahmadi, M. Esfandiari, A. Shirvani
- Effect of Micronutrient Fertilizers on Digestive Enzymes Activity of *Hippodamia variegata* (Goeze) Fed on *Myzus persicae* (Sulzer) 213
T. Alizamani, J. Shakarami, M. Mardani Talaei, A. Zibae
- Taxonomic Status of a Native Species of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) in Iran 227
M. Mollaei, H. Sadeghi Namaghi
- Weed Seed Bank and Seedling Dynamics in Response to Crop Rotation in Conventional Agroecosystems 239
N. Valaie, M.H. Rashed Mohassel, M. Bannayan
- Isolation of Candidate Genes in Host- *Phelipanche aegyptiaca* Interaction by Genome Walking 259
M.R. Rezaei, A. Mirshamsi Kakhki, A.R. Seifi
- Effect of Living and Straw Mulch in Integration with Reduced Doses of Trifluralin on Yield and Yield Components of Dill (*Anethum graveolens* L.) 269
M. Abbaszadeh, R. Amini, A. Dabbagh Mohammadi Nassab
- Evaluating the Effect of Mixing Clopyralid with Oxadiazon and Oxadiargyl on Control of Broadleaf Weeds in Rapeseed (*Brassica napus* L.) 285
A. Rashidi, E. Elahifard, M.H. Tabib

نشریه پژوهش های حفاظت گیاهان ایران

(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

تابستان 1401

شماره 2

جلد 36

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	استاد - علوم علف های هرز (دانشگاه فردوسی مشهد)
بقائی راوری، ساره	دانشیار - بیماری شناسی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)
پور جم، ابراهیم	استاد - 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 بالهولکداران، 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)
کریم مجنی، حسن	دانشیار - تولید و ژنتیک گیاهی (دانشگاه صنعتی اصفهان)
مرعشی، سید حسن	استاد - بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)
مهدیخانی مقدم، عصمت	استاد - بیماری شناسی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)

ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

نشانی: مشهد - کد پستی 91775 صندوق پستی 1163

دانشکده کشاورزی - دبیرخانه نشریات علمی

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

مقالات این شماره در سایت <https://jpp.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

- 143 ارزیابی واکنش ارقام مختلف لوبیا به قارچ‌های *Macrophomina phaseolina*،
Rhizoctonia solani و *Fusarium solani* در شرایط آزمایشگاهی
 صدیقه محمدی - مسلم آتش پنجه
- 155 بررسی توانایی کنترل کنندگی قارچ *Trichoderma harzianum* BI به تنهایی و در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی تیمین،
 ریبوفلاوین و هگزانوئیک اسید علیه نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی
 مجتبی کواری - عصمت مهدیخانی مقدم - حمید روحانی
- 171 تأثیر سیلیکات سدیم در القاء مقاومت سیستمیک در خیار مبتلا به پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه
 سمیرا رئیسی دهکردی - ناصر رادمان - عبدالحسین طاهری - سید کاظم صباغ
- 185 ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره نانوکپسوله زیست‌سازگار *Trichoderma harzianum*
 مانده شهری طبرستانی
- 199 مطالعه شب پره‌های زیرخانواده Xyleninae (Lep.: Noctuidae) در بخش‌هایی از غرب زاگرس در استان‌های خوزستان و ایلام
 محمد احمدی - مهدی اسفندیاری - اصغر شیروانی
- 215 تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *Hippodamia variegata* (Goeze) در تغذیه از *Myzus persicae*
 (Sulzer)
 طیبه علی زمانی - جهانشیر شاکرمی - مژگان مردانی طلایی - آرش زیبایی
- 229 موقعیت آرایه‌شناختی یک گونه‌ی بومی از جنس *Feltiella Rübsaamen* (Dip.: Cecidomyiidae) در ایران
 مانده ملائی - حسین صادقی نامقی
- 241 پویایی بانک بذر و گیاهچه علف‌های هرز در پاسخ به نوع تناوب در اکوسیستم‌های زراعی
 نیوشا ولایی - محمدحسن راشد محصل - محمد بنایان
- 261 جداسازی ژن‌های کاندید در میاتکنش میزبان - گل جالیز (*Phelipanche aegyptiaca*) با استفاده از روش پیمایش ژنوم
 محمدرضا رضائی - امین میرشمسی کاخکی - علیرضا سیفی
- 271 اثر مالچ زنده و کلش در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین بر عملکرد و اجزای عملکرد شویید (*Anethum graveolens* L.)
 مریم عباس زاده - روح اله امینی - عادل دباغ محمدی نسب
- 285 بررسی اثر اختلاط علف کش کلوپیرالید با علف کش‌های اگزادiazون و اگزادiazیل بر کنترل علف‌های هرز پهن برگ کلزا
 (*Brassica napus* L.)
 امین رشیدی - الهام الهی فرد - محمدحسین طیب



Evaluating the Reaction of different Species of Beans to *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* In Vitro

S. Mohammadi^{1*}, M. Atashpanjeh²

Received: 29-07-2020

Revised: 26-04-2021

Accepted: 28-02-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Mohammadi, S., & Atashpanjeh, M. (2022). Evaluating the Reaction of Different Species of Beans to *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* In Vitro. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 141-151. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/JPP.2022.32784.0](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.32784.0)

Introduction

Every year, soli-borne pathogens of beans cause a lot of damage to this crop. Caudex and root rot of beans caused by *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium solani* are among the most common diseases of this plant. Cultivating resistant species and maintaining shifting cultivation are among the most effective methods of controlling this disease. Disease caused by *Rhizoctonia solani* include seedling death and in some cases cause rot of aerial parts. *Macrophomina phaseolina* is a plant-borne pathogen that has a wide range of hosts and causes extensive damage to farmers around the world each year. This fungus is a polyphage and causes disease in more than 500 different plant species such as soybeans, peas, pines, kiwis, cotton and sesame, peanuts, cotton, sunflower, melon. *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* Burk, is a fungus isolated from peas and red beans, it is present in most soils and causes disease on legumes and plants that grow in hot and humid conditions.

Materials and Methods

A factorial experiment in the form of Completely Randomized Design is conducted in order to evaluate the resistance level of beans species to these fungi. The factors consisted of species (five levels, containing Sadri, Shazand, Saleh, Dorsa, and Goli species) and fungi species (8 levels: each of three fungi alone, combined with each other, and a control sample without any fungus). The reaction of beans species was by calculating the severity of disease and evaluating dry and fresh weight of aerial organs and root and height of the bushes. Steps to perform the test: 1- Preparation of seedbed for planting and sowing seeds of bean cultivars 2- Planting seeds and start growing seedlings 3- Inoculation of seedlings 4- Determining the severity of the disease 5- Measuring the height of aerial parts of seedling

Results and Discussion

Plants are equipped with several defense mechanisms to resist the attack of various pathogens. These include pre-existing structural or biochemical defenses that prevent pathogens from invading, or a series of induced structural and biochemical defenses after an attack. In natural ecosystems, most of the existing pathogenic models are the result of long-term evolution of both the host and the pathogen, and there is usually a high genetic diversity between plants and microbial populations. Today, with the widespread cultivation of cultivars with a uniform genetic background, it has led to the increasing development of susceptible strains of pathogens and the occurrence of widespread epidemics of plant diseases. Therefore, there is a great need to produce lasting resistance to pathogens in plants. *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani* are fungi with widespread global damage to crops. Therefore, strategies to reduce the quantitative and qualitative damage of these fungi should be studied. In this study, it was observed that beans infected with *Macrophomina phaseolina*, the first symptoms after about four weeks, were yellowing of leaves, wilting of the plant and

1 and 2- Assistant Professor and M.Sc. Student in Department of Plant Pathology, College of Science, Agriculture and Modern Technologies, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: Mohammadi.pp@gmail.com)

discoloration of root vascular tissue to reddish-black brown. Also, plants infected with *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* turned the root skin brown. With the spread of disease-causing fungi, necrosis of the crown and roots of tissues was observed. In this case, the color of the vessels changed and turned yellow to brown. Restriction of root development, slow growth of plant shoots, symptoms of leaf yellowing and paleness similar to the symptoms of nutrient deficiency and wilting and leaf fall were the obvious symptoms of these diseases. The results of this study showed that Sadri and Darsa cultivars had relative resistance to all three fungi alone, but Sadri cultivar also showed relative resistance to binary combinations of fungi. But none of the cultivars used were resistant to all three fungi. The experimented species reacted differently to the pathogenic fungi. The maximum and minimum severity of the disease was observed in Goli and Sadri species respectively. The maximum height of seedling was observed in Sadri and Shazand species infected with *R. solani* and *M. phaseolina* pathogenic fungi and the combination of these two fungi with Shazand. The maximum dry and fresh weight of aerial organs and roots of infected seedlings was observed in Sadri species infected with *F. solani* fungus.

Conclusion

The research results indicated that Sadri species, with minimum severity of disease and maximum height and fresh and dry weight of aerial organs and root, was the most resistant species to all three fungi solely and combined.

Keywords: Resistance evaluation, Rot, Pathogenesis severity, Species



مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۱۵۱-۱۴۱

ارزیابی واکنش ارقام مختلف لوبیا به قارچ‌های *Macrophomina phaseolina**Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* در شرایط آزمایشگاهیصدیقه محمدی^{۱*} - مسلم آتش پنجه^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۹

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا ناشی از قارچ‌های *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium solani* از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه می‌باشد. به کارگیری ارقام مقاوم و رعایت تناوب چند ساله از موثرترین روش‌های کنترل این بیماری محسوب می‌شود. به منظور بررسی میزان مقاومت ارقام لوبیا نسبت به قارچ‌های مذکور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل انجام گردید. فاکتورها عبارت بودند از رقم (دارای ۵ سطح، شامل ارقام صدری، شازند، صالح، درسا و رقم گلی) و گونه قارچ (دارای ۸ سطح سه قارچ به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر و شاهد بدون قارچ). واکنش ارقام لوبیا با محاسبه شدت بیماری و ارزیابی متغیرهای وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و ارتفاع پوته‌ها صورت گرفت. ارقام مورد آزمون واکنش‌های متفاوتی نسبت به قارچ‌های عامل بیماری از خود نشان دادند به طوری که کمترین و بیشترین شدت بیماری به ترتیب مربوط به رقم صدری و رقم گلی بود. بیشترین ارتفاع گیاهچه به ترتیب در ارقام صدری و شازند آلوده به قارچ‌های بیمارگر *R. M. phaseolina* و *solani* و ترکیب این دو قارچ با رقم شازند مشاهده شد. بیشترین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه گیاهچه‌های بیمار در رقم صدری آلوده به قارچ *F. solani* مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد رقم صدری با داشتن کمترین شدت بیماری و بیشترین ارتفاع و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه مقاومترین رقم نسبت به هر یک از سه قارچ به تنهایی و بصورت ترکیبی بود.

واژه‌های کلیدی: ارزیابی مقاومت، ارقام، پوسیدگی، شدت بیماری‌زایی

مقدمه

لوبیا با نام علمی *Phaseolus vulgaris* (L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی می‌باشد که به علت دارا بودن ارزش غذایی زیاد و قابلیت نگهداری آسان از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (Mijatovic et al., 2005). امروزه تنش‌های محیطی غیرزیستی (خشکی، شوری و سرما و ...) و زیستی (آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز) محصولات کشاورزی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بیماری‌ها از مهم‌ترین عوامل زیستی هستند که مستقیماً بر عملکرد کمی و کیفی

تولیدات کشاورزی مؤثر می‌باشند (Obala et al., 2012). بیش از ۱۰ درصد منابع غذایی مستقیماً توسط عوامل بیماری‌زا از بین می‌رود (Carvalho et al., 2014). بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا توسط مجموعه‌ای از بیمارگرهای قارچی خاکزاد نظیر *Rizoctonia solani* Kuhn، *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.، *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* Burk و *Pythium* spp. ایجاد می‌شود (Belete et al., Bohlooli and Farhangian, 2009)؛ قارچ‌های بیمارگر خاکزی *R. solani*، *F. solani* و *M. phaseolina* میزبان‌های خود را در مرحله ابتدایی رشد مانند بذر و گیاهچه آلوده کرده و در نهایت باعث کاهش شدید عملکرد می‌شوند (Behroozi et al., 2015). گسترده بودن دامنه میزبانی، انتشار وسیع جغرافیایی، بالا بودن قدرت بیماری‌زایی، دوام و قدرت بقاء ساپروفیتی، این قارچ‌ها را از نظر بیماری‌زایی با اهمیت کرده و از طرفی، پیچیدگی

۱ و ۲- به ترتیب استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

(*) - نویسنده مسئول: (Email: Mohammadi.pp@gmail.com)

از *M. phaseolina* IRAN1281c و *solani* IRAN2a5ac کلکسیون قارچ‌های مرکز تحقیقات گیاه پزشکی کشور تهیه شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورها شامل رقم گیاه لوبیا (دارای پنج سطح، ارقام درس، صالح، صدی، شازند و گلی)، و نوع قارچ (دارای هشت سطح، سه قارچ خاکزاد *R. solani*، *F. solani* و *M. phasolina* به تنهایی و بصورت ترکیب‌های دو تایی و سه تایی به همراه شاهد بدون قارچ) بودند.

مایه تلقیح

برای تهیه مایه تلقیح قارچ‌های بیمارگر فوق ابتدا بذور گندم به مدت ۲۰ ساعت در آب خیسانده و بعد مقدار ۱۰۰ گرم از آن در یک ارلن ۵۰۰ لیتری ریخته شد. سپس بذور درون ارلن‌ها در دو روز متوالی توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت یک ساعت سترون شدند. سپس محتویات هر یک از ارلن‌ها با قطعاتی از قارچ‌های مذکور به قطر ۷ میلی‌متر، مایه زنی شدند و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته نگهداری شدند (Majnoun Hosseini, 2008).

بررسی میزان حساسیت چند رقم لوبیا نسبت به عوامل بوته میری

ابتدا بستر کشت شامل ترکیبی از خاک زراعی و خاک برگ به نسبت ۱:۲ تهیه شد. سپس بذر لوبیا در هر گلدان کشت و در آزمایشگاه (اتاق کشت) با شرایط کنترل شده (دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد) نگهداری شد. پس از اینکه گیاه به مرحله دو برگه رسید، خاک اطراف ریشه کنار زده شد و دانه‌های گندم آغشته به بیمارگرهای ذکر شده فوق (به ازای نیم کیلوگرم خاک، دو گرم مایه تلقیح) در خاک قرار داده شد (Mohammadi and Banihashemi, 2005). پس از ظهور علائم بیماری (سه هفته بعد)، میزان خسارت حاصل از جدایه قارچ ریزوکتونیا و فوزاریوم بر اساس روش مایولو و همکاران به صورت زیر تعیین شد (Mengisto and Paris, 2003): صفر: هیچگونه خسارت و لکه‌ای روی طوقه پدید نمی‌آید= ایمنی، یک: لکه‌های سوخته سطحی و جدا از هم= مقاوم، دو: لکه‌های سوخته سطحی و جدا از هم و ساقه را دور نمیزند= نیمه مقاوم، سه: پوسیدگی توسعه یافته و ساقه را دور میزند= نیمه حساس، چهار: مرگ گیاهچه= حساس و همچنین شدت بیماری حاصل از قارچ ماکروفومینا روی ریشه لوبیا به صورت زیر محاسبه گردید (Maurhofer et al., 1995): صفر: هیچ میکروسکلرتی در بافت دیده نمیشود.

محیط خاک و عدم کارایی روش‌های متداول شیمیایی، مدیریت بیماری‌های خاکزاد را مشکل می‌سازد (Philips, 2009). به طور کلی روش‌های متنوعی برای کنترل بیماری‌های پاتولوژیک مهم در مطالعات مختلف برشمرده شده است که این روش‌ها شامل تناوب زراعی (Yang et al., 1995)، کاربرد ارقام مقاوم (Bohlooli and Farhangian, 2009)، روش‌های شیمیایی مبتنی بر کاربرد ترکیبات با ماهیت قارچ کشی و استفاده از ترکیبات گیاهی یا متابولیت‌های ثانویه شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی همچنین قارچ‌های مفید می‌باشد (Boyd et al., 2013). برخی مطالعات مصرف و کاربرد ترکیبات شیمیایی را فاقد هر گونه اثر بخشی می‌دانند (Raja Sekar and Chand, 2001). مصرف سموم شیمیایی و ترکیبات گوناگون قارچ کش باعث خسارات در موجودات زنده و ایجاد اثرات منفی در خاک، گیاه و اکوسیستم می‌شود، بنابراین افزایش نگرانی در رابطه با اثرات منفی سموم و محدودیت استفاده از آن‌ها باعث ایجاد انگیزه برای یافتن جایگزین‌هایی برای آن‌ها شده است که در این زمینه شناسایی منابع ژنتیکی مقاوم حائز اهمیت می‌باشد (Ruuhola and Yang-Annals, 2005). در پژوهشی ده ژنوتیپ آفتابگردان در مقابل سه جدایه *M. phasolina* ارزیابی و دو ژنوتیپ IMP ۱۱۴۱ و IMP ۱۰۲-۹۵۳ به عنوان ژنوتیپ‌های نیمه مقاوم معرفی شدند (Asad, 2017). پژوهشگران با بررسی مقاومت ۴۶ ژنوتیپ لوبیا در برابر *R. solani* گزارش کردند ۲۰ ژنوتیپ به بیماری ذکر شده مقاومت نشان دادند ولی در شرایط آزمایشگاهی (ارزیابی درون شیشه ای) این ژنوتیپ‌ها هیچ مقاومتی به ریزوکتونیا سولانی از خود نشان ندادند (Shamim et al., 2014). انتخاب ارقام مناسب برای کشت در یک منطقه ویژه از اهمیت زیادی برخوردار است (Gheshm and Kafi, 1999). در همین راستا این پژوهش با هدف بررسی میزان مقاومت ارقام مختلف لوبیا نسبت به قارچ‌های خاکزاد (*F. solani*، *R. solani* و *M. phaseolina*) به صورت جداگانه و توأم با یکدیگر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی شیراز در بهمن ماه ۱۳۹۵ در شرایط اتاقک کشت اجرا گردید. در این تحقیق میزان مقاومت پنج رقم لوبیا (ارقام رایج قابل کشت در منطقه) به نام‌های صدی، شازند، صالح، درس و گلی در برابر حمله سه قارچ *Macrophomina phaseolina*، *Fsarium solani*، *Rhizoctonia solani* مورد مطالعه قرار گرفت. ارقام لوبیا مورد مطالعه، از مرکز تحقیقات کشاورزی شیراز، بخش گواهی بذر تهیه گردید. همچنین قارچ‌های بیمارگر *R. solani*، *F. solani* و *M. phasolina* IRAN1724c

استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم شاخص‌های مورد نظر اندازه گیری شدند.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ درصد انجام شد.

نتایج

شدت بیماری

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از شدت بیماری ارقام لوبیا تحت تأثیر قارچ‌های مختلف نشان داد، اختلاف بین تیمارهای اثر متقابل نوع قارچ و ارقام لوبیا در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۱) (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تأثیر قارچ‌های بیماریزا عامل بوته میری بر شدت بیماریزایی، وزن خشک و تر اندام‌های هوایی، ریشه و ارتفاع گیاهچه لوبیا

Table 1- The analysis of variance of the data gathered from the effect of pathogenic fungi causing damping off on pathogenesis severity, dry and fresh weight of aerial organs and root, and height of beans plant

منابع تغییرات Sources of changes	درجه آزادی DF	میانگین مربعات Mean Square					
		وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر اندام هوایی Shoot fresh weight	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	ارتفاع Height	شدت بیماری severity of disease
Bean cultivars (A)	4	0.0034**	0.4341**	0.16236**	23.50500**	184.116**	8.45000**
Pathogen (B)	7	0.0013**	0.0438**	0.01657**	1.7400**	208.8654**	24.1892**
(A× B)	28	0.0038**	0.0160**	0.00361**	0.3222**	57.8595**	0.826190**
Experimental error	80	0.0001	0.0008	0.0001	0.02183	10.2166	0.29166
Cv	-	22.19	15.86	10.44	12.95	9.32	18.67

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent.

نتایج تجزیه واریانس بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در حضور قارچ‌های عامل بیماری و ارقام لوبیا از نظر اثر بر شاخص‌های رشدی بود (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن نشان داد کمترین ارتفاع گیاهچه لوبیا به ترتیب در ارقام شازند، گلی و صالح آلوده به قارچ *F. solani* و *M. phaseolina* و همچنین ترکیب سه قارچ *R. solani*، *M. phaseolina* و *F. solani* با رقم‌های درسا و صالح مشاهده شد. بیشترین ارتفاع گیاهچه به ترتیب در ارقام صدری و شازند آلوده به قارچ *M. phaseolina*، *R. solani* و ترکیب این دو قارچ با رقم شازند مشاهده شد.

یک: وجود تعداد بسیار کمی میکرواسکلرت در بافت آوندی یا انتهای ریشه اصلی یا محل اتصال ریشه فرعی
دو: وجود تعداد کمی اسکلرت در آندودرم، بافت آوندی یا زیر اپیدرم

سه: تغییر رنگ نسبی بافت آوندی و پوشیده شدن بخشی از بافت با میکرواسکلرت‌ها

چهار: تغییر رنگ کامل بافت آوندی و ظهور تعداد زیادی میکرواسکلرت در بافت، میکرواسکلرت‌ها زیر اپیدرم خارجی همچنین شاخص‌های رشدی گیاه لوبیا شامل ارتفاع، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه گیاه لوبیا ابتدا گیاهان به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و سپس با

مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×قارچ نشان داد کمترین شدت بیماری مربوط به رقم صدری با هر سه قارچ به صورت تنهایی و ترکیب دوتای مشاهده شد. همچنین رقم درسا همراه با هر سه قارچ به تنهایی و ترکیب *M. phaseolina* + *F. solani* نیز کمترین شدت بیماری را نشان دادند. بیشترین شدت بیماری مربوط به تیمار هر سه قارچ بصورت ترکیبی برای تمام ارقام بود. همچنین در رقم گلی غیر از تیمار *R. solani* سایر تیمارهای قارچی بیشترین شدت بیماری را نشان دادند (جدول ۲).

ارتفاع گیاهچه لوبیا

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام لوبیا و قارچ‌های عامل بیماری بوته میری بر شدت بیماری

Table 2- The comparison of the average of the mutual effect of beans species and fungi causing damping off disease on the severity of disease

تیمارها Treatment	Goli	Shazand	Sadri	Saleh	Dorsa
<i>F. solani</i>	3 ^{ac}	1.66 ^{de}	1 ^e	1.66 ^{de}	1 ^e
<i>M. phaseolina</i>	3 ^{ac}	2.33 ^{bd}	1 ^e	2.33 ^{bd}	2 ^{ce}
<i>R. Solani</i>	2 ^{ce}	2.33 ^{bd}	2 ^{ce}	2 ^{ce}	2 ^{ce}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i>	4 ^a	2.66 ^{bd}	1 ^e	2.66 ^{bd}	1 ^e
<i>F. solani</i> + <i>R. Solani</i>	3.33 ^{ab}	2 ^{ce}	1 ^e	2 ^{ce}	2 ^{ce}
<i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	4 ^a	2.66 ^{bd}	1 ^e	2 ^{ce}	2.33 ^{bd}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	4 ^a	3 ^{ac}	3 ^{ac}	4 ^a	3 ^{ac}
Control	0 ^f	0 ^f	0 ^f	0 ^f	0 ^f

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent.



شکل ۱- مقایسه شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه لوبیا در ارقام مختلف

Figure 1- The severity of caudex and root rot disease of beans in different species, compared

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام لوبیا و قارچ‌های عامل بیماری بوته میری بر ارتفاع گیاهچه‌های لوبیا

Table 3- The comparison of the average of the mutual effect of beans species and fungi causing damping off disease on the height of beans seedlings

تیمارها Treatment	Goli	Shazand	Sadri	Saleh	Dorsa
<i>F. solani</i>	29.6 ^{lo}	24 ^o	40 ^{bf}	31 ^{jn}	33.3 ^{gl}
<i>M. phaseolina</i>	28.3 ^{lo}	29.6 ^{ko}	45.3 ^{ab}	26 ^{mo}	39.0 ^{cg}
<i>R. Solani</i>	32 ^{hm}	43.6 ^{ab}	36.3 ^{ei}	30.6 ⁱⁿ	32.3 ^{hl}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i>	35 ^{fk}	36 ^{ek}	35.3 ^{fk}	32 ^{hm}	38.3 ^{eh}
<i>F. solani</i> + <i>R. Solani</i>	30.6 ⁱⁿ	35.3 ^{ek}	32.3 ^{hl}	33 ^{gl}	36 ^{ek}
<i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	28.3 ^{lo}	41.6 ^{ab}	32.6 ^{hl}	36.3 ^{ej}	33.3 ^{gl}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	30.3 ⁱⁿ	30 ^{jn}	30.3 ^{jn}	25 ^{no}	28.3 ^{lo}
Control	35.6 ^{ej}	47 ^a	44.3 ^{ac}	36.6 ^{ei}	45.6 ^{ab}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent.

قارچ *R. solani* مشاهده شد. بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی گیاهچه‌های بیمار در تیمار رقم صدری با قارچ *F. solani* مشاهده شد (جدول ۴).

وزن تر اندام‌های هوایی گیاهچه لوبیا

نتایج مقایسه میانگین نشان داد کمترین وزن تر اندام‌های هوایی گیاهچه نسبت به شاهد در رقم گلی و شازند تحت تأثیر تمام تیمارهای انفرادی و ترکیبی قارچ‌های مذکور، همچنین رقم درسا با

وزن خشک اندام‌های هوایی گیاهچه لوبیا

انفرادی و ترکیبی قارچ بجز *F. solani* به تنهایی و ترکیب این قارچ با *R. solani* بود. بیشترین وزن خشک اندام‌های هوایی گیاهچه‌های بیمار در تیمار رقم صدری با قارچ *F. solani* مشاهده شد (جدول ۵).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد کمترین وزن خشک اندام‌های هوایی گیاهچه نسبت به شاهد در رقم گلی تحت تأثیر تمام تیمارهای انفرادی و ترکیبی قارچ‌ها و رقم شازند تحت تأثیر تمام تیمارهای

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام لوبیا و قارچ‌های عامل بیماری بوته میری بر وزن تر اندام هوایی گیاهچه لوبیا
Table 4- The comparison of the average of the mutual effect of beans species and fungi causing damping off Disease on the fresh weight of aerial organ of beans seedling

تیمارها Treatment	Goli	Shazand	Sadri	Saleh	Dorsa
<i>F. solani</i>	0.10 ⁿ	0.16 ^{mn}	3 ^b	1.26 ^{de}	0.91 ^j
<i>M. phaseolina</i>	0.15 ^{mn}	0.13 ^{mn}	2.50 ^c	1.35 ^{bd}	1.20 ^{hi}
<i>R. Solani</i>	0.35 ^{ln}	0.20 ^{mn}	1.90 ^e	1.32 ^{gh}	0.29 ^{mn}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i>	0.12 ^{mn}	0.15 ^{mn}	2.30 ^c	1.25 ^{ji}	1.52 ^{fg}
<i>F. solani</i> + <i>R. Solani</i>	0.10 ⁿ	0.21 ^{mn}	2.40 ^c	1.46 ^{fh}	1.70 ^f
<i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	0.14 ^{mn}	0.22 ^{mn}	2.23 ^{cd}	1.28 ^{gh}	1.32 ^{jh}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	0.12 ^{mn}	0.10 ⁿ	2.40 ^c	1 ^{ij}	0.84 ^{kj}
Control	0.40 ^{lm}	0.60 ^{kl}	3.62 ^a	2.90 ^b	2.05 ^{de}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام لوبیا و قارچ‌های عامل بیماری بوته میری بر وزن خشک اندام هوایی گیاهچه لوبیا

Table 5- The comparison of the average of the mutual effect of beans species and fungi causing damping off disease on the dry weight of aerial organ of beans seedling

تیمارها Treatment	Goli	Shazand	Sadri	Saleh	Dorsa
<i>F. solani</i>	0.011 ^q	0.010 ^q	0.25 ^c	0.21 ^{de}	13 ⁱ
<i>M. phaseolina</i>	0.012 ^q	0.011 ^q	0.17 ^{fg}	0.19 ^{ef}	0.11 ^{jk}
<i>R. Solani</i>	0.029 ^{pq}	0.010 ^q	0.20 ^e	0.20 ^e	0.12 ^{jk}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i>	0.012 ^q	0.011 ^q	0.23 ^d	0.11 ^{jk}	0.086 ^{lm}
<i>F. solani</i> + <i>R. Solani</i>	0.012 ^q	0.086 ^{lm}	0.17 ^{fg}	0.11 ^{jk}	0.086 ^{lm}
<i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	0.019 ^q	0.017 ^q	0.18 ^f	0.11 ^{jk}	0.096 ^{kl}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	0.010 ^q	0.010 ^q	0.13 ⁱ	0.15 ^{gh}	0.073 ^{mn}
Control	0.04 ^{ap}	0.055 ^{no}	0.32 ^a	0.30 ^b	0.15 ^h

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent.

وزن خشک ریشه گیاهچه لوبیا

نتایج مقایسه میانگین نشان داد کمترین وزن خشک ریشه گیاهچه نسبت به شاهد در رقم گلی تحت تأثیر تمام تیمارهای انفرادی و ترکیبی قارچ‌ها و رقم شازند در حضور تمام تیمارهای انفرادی و ترکیبی بجز *F. solani* به تنهایی و *R. solani* + *F. solani* بصورت ترکیبی رقم درسا تحت تأثیر سه قارچ بصورت ترکیب سه تایی مشاهده شد. بیشترین وزن خشک ریشه گیاهچه‌های بیمار در رقم صدری تحت تأثیر تمام تیمارهای انفرادی و ترکیبی قارچ‌ها بجز ترکیب سه تایی مشاهده شد (جدول ۷).

وزن تر ریشه گیاهچه لوبیا

نتایج مقایسه میانگین نشان داد کمترین وزن تر ریشه گیاهچه نسبت به شاهد در رقم گلی تحت تأثیر تمام تیمارهای انفرادی و ترکیبی قارچ‌ها بجز *R. solani* و رقم شازند تحت تأثیر تمام تیمارهای هر سه قارچ با هم و همچنین ترکیب دو تایی *R. solani* + *F. solani* و *M. phaseolina* + *R. solani* مشاهده شد. بیشترین وزن تر ریشه گیاهچه‌های بیمار در تیمار رقم صدری تحت تأثیر ترکیب سه قارچ مشاهده شد (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام لوبیا و قارچ‌های عامل بیماری بوته میری بر وزن تر ریشه گیاهچه لوبیا

Table 6- The comparison of the average of the mutual effect of beans species and fungi causing damping off disease on the fresh weight of beans seedling root

تیمارها Treatment	Goli	Shazand	Sadri	Saleh	Dorsa
<i>F. solani</i>	0.020 ^r	0.05 ^{pq}	0.40 ^{cd}	0.19 ^{ij}	0.12 ^{kl}
<i>M. phaseolina</i>	0.021 ^r	0.04 ^{pq}	0.27 ^h	0.16 ^{jm}	0.24 ^{hi}
<i>R. Solani</i>	0.11 ^{mp}	0.06 ^{pq}	0.29 ^{gh}	0.18 ^{jk}	0.09 ^{nq}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i>	0.032 ^r	0.04 ^{pq}	0.33 ^{eg}	0.20 ^{ij}	0.33 ^{fg}
<i>F. solani</i> + <i>R. Solani</i>	0.02 ^r	0.07 ^{ar}	0.36 ^{df}	0.25 ^h	0.26 ^h
<i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	0.019 ^r	0.07 ^{ar}	0.29 ^{gh}	0.17 ^{jl}	0.28 ^{gh}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i> + <i>R. Solani</i>	0.041 ^r	0.036 ^r	0.60 ^a	0.11 ^{mp}	0.13 ^{nk}
Control	0.13 ^{kn}	0.15 ^{jn}	0.47 ^b	0.42 ^c	0.38 ^{ce}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent.

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل ارقام لوبیا و قارچ‌های عامل بیماری بوته میری بر وزن خشک اندام هوایی گیاهچه لوبیا

Table 7- The comparison of the average of the mutual effect of beans species and fungi causing damping off disease on the dry weight of aerial organ of beans seedling

تیمارها Treatment	Goli	Shazand	Sadri	Saleh	Dorsa
<i>F. solani</i>	0.002±0.00 ^{lm}	0.016±0.03 ^{eh}	0.027±0.015 ^{cd}	0.26±0.002 ^{cd}	0.021±0.002 ^{cf}
<i>M. phaseolina</i>	0.003±0.00 ^{km}	0.002±0.00 ^{lm}	0.020±0.00 ^{cg}	0.21±0.00 ^{cf}	0.027±0.002 ^{cd}
<i>Rh. Solani</i>	0.003±0.00 ^{km}	0.0017±0.00 ^m	0.026±0.002 ^{cd}	0.022±0.005 ^{ce}	0.022±1.00 ^{ce}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i>	0.0019±0.00 ^{im}	0.0019±0.00 ^{im}	0.026±0.005 ^{cd}	0.019±0.001 ^{dh}	0.028±0.006 ^c
<i>F. solani</i> + <i>Rh. Solani</i>	0.002±0.00 ^{lm}	0.01±0.001 ^{hl}	0.020±0.005 ^{cg}	0.011±0.00 ^{gk}	0.022±0.002 ^{ce}
<i>M. phaseolina</i> + <i>Rh. Solani</i>	0.003±0.00 ^{lm}	0.0047±0.00 ^{jm}	0.021±0.003 ^{cf}	0.012±0.001 ^{fj}	0.014±0.001 ^{ei}
<i>F. solani</i> + <i>M. phaseolina</i> + <i>Rh. Solani</i>	0.0017±0.00 ^m	0.0015±0.00 ^m	0.017±0.001 ^{eh}	0.017±0.002 ^{eh}	0.10±0.00 ^{im}
Control	0.015±0.001 ^{eh}	0.006±0.00 ^{im}	0.1±0.01 ^a	0.031±0.01 ^b	0.04±0.01 ^b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون و ردیف تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column and row do not have a significant difference in the Duncan test at the probability level of one percent.

بحث

F. solani و *phasolina* به تنهایی داشتند این درحالیست که رقم صدری نسبت به ترکیب‌های دوتایی قارچ‌ها نیز مقاومت نسبی نشان داد. هیچ کدام از ارقام مورد استفاده نسبت به ترکیب سه قارچ با یکدیگر مقاوم نبودند. عدم پایداری مقاومت ارقام مختلف گیاهان نسبت به بیماری بوته میری امری شناخته شده است به‌طوری‌که بعضی ظهور مستمر نژادهای جدید بیماریزا را علت عدم پایداری مقاومت می‌دانند (Vilgalys and Cubeta, 1994). تمام ارقام مورد استفاده بجز رقم گلی نسبت به پوسیدگی رایزوکتونایی حساس بودند. با وجودیکه رقم گلی در مجموع حساسترین رقم بود ولی نسبت به قارچ *R. solani* نسبتاً مقاوم بود. قارچ بیمارگر *R. solani* یکی از مهمترین عوامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و طوقه لوبیا بوده و تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش شده است (Vilgalys and Cubeta, 1994). مقایسه مقاومت ژنوتیپ‌های لوبیا در مقابل *R. solani* بیانگر این نظر است که مقاومت ارقام به صورت پیوسته تغییر می‌کند، بنابراین نمی‌توان یک ژنوتیپ را در مقابل این

امروزه، کشت وسیع ارقام دارای زمینه ژنتیکی یکنواخت، باعث تکامل فزاینده سویه‌های پرازار^۱ بیمارگرها و بروز همه‌گیری‌های^۲ گسترده بیماری‌های گیاهی شده است (Boyd et al., 2013). بنابراین نیاز فراوانی به تولید مقاومت با دوام به بیمارگرها در گیاهان وجود دارد. گیاهان با چندین ساز و کار دفاعی شامل دفاع‌های ساختمانی یا بیوشیمیایی از پیش موجود یا القایی در برابر حمله بیمارگرهای مختلف مقاومت نشان می‌دهند (Rajabi, 2002). قارچ‌های *F. solani*، *M. phaseolina*، *R. solani* و *M. phaseolina* بیماری‌های خاکزی با گستردگی و خسارت جهانی روی محصولات کشاورزی هستند (Manafi et al., 2012). نتایج پژوهش حاضر نشان داد ارقام صدری و درسا مقاومت نسبی به هر سه قارچ (*M. R. solani*)

- 1- Virulent strains
- 2- Epidemics

گیاه در این پژوهش در نتیجه کاهش فاصله بین گره‌ها و کوتاه شدن ساقه، در اثر قارچ بیماری‌زا بود. بیشترین ارتفاع گیاهچه در تیمارهای *M. phaseolina* و رقم صدری، *R. solani* و رقم شازند و ترکیب این دو قارچ با رقم شازند مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد آلودگی ریشه گیاهچه تأثیر به سزایی در کاهش وزن تر و خشک قسمت‌هایی مختلف گیاه به خصوص در ارقام گلی و شازند داشته است. این ارقام بیشترین شدت بیماری و کمترین ارتفاع گیاه را تحت تأثیر بیماری نشان داده بودند که با مشاهدات هیل و همکارانش (Hill and Blunt, 1994) مطابقت دارد. بیشترین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی گیاهچه‌های بیمار در تیمار رقم صدری با قارچ *F. solani* مشاهده شد. علت این مسئله بیماری‌زایی کمتر این قارچ روی ژنوتیپ‌های مورد استفاده لوبیا بود. بیماری‌زایی کمتر این قارچ باعث شده بود ارتفاع گیاهچه کاهش پیدا نکرده باشد بنابراین این تیمارها با کاهش وزن چندان مواجه نبود. با افزایش شدت آلودگی و خسارت وارده به ریشه و طوقه توسط قارچ ریزوکتونیا، سیستم ریشه گیاه رشد کمتری داشته و این کاهش باعث ایجاد اختلال بین سیستم ریشه و قسمت هوایی گیاه می‌شود که به دنبال آن مواد غذایی به قسمت‌های بالا نرسیده، در نتیجه کاهش رشد و کاهش وزن در گیاه مشاهده می‌شود (Dubin and Ginkel, 2008). همچنین نتایج نشان داد در شرایط بدون آلودگی، تفاوت معنی‌داری بین ارقام از نظر وزن تر اندام هوایی بود که قطعاً به ژنتیک ارقام مرتبط است. بررسی‌های صورت گرفته روی غلات نشان دهنده امکان انتقال ژن‌های مقاوم به *R. solani* از ارقام متحمل یا مقاوم به ارقام تجاری و امکان ایجاد مقاومت و کاهش خسارت در این ارقام نسبت به بیماری می‌باشد (Dubin and Ginkel, 2008). بررسی‌های صورت گرفته روی ارقام مختلف جو، گندم و ذرت نشان داد که یا این ارقام به قارچ حساس هستند و یا مقاومت محدودی از خود نشان می‌دهند، هرچند ارقام مختلف ذرت بیشترین حساسیت را در مقایسه با ارقام جو و گندم در بررسی آماری از خود نشان داد، در مطالعه صورت گرفته از سه رقم جو NDB1445، RD2503 و Grand mean استفاده شد که هیچکدام از ارقام به قارچ مقاوم نبود و تنها رقم NDB1445 حساسیت کمتری نسبت به بقیه ارقام داشت (Sharma and Pande, 2013). که این گزارش با نتایج پژوهش حاضر کاملاً مطابقت دارد. در این آزمایش، رقم صدری حساسیت کمتری نسبت به بقیه ارقام در برابر قارچ‌های مذکور نشان دادند. در مورد علت مقاومت گیاهان مختلف به *R. solani* می‌توان به موارد متعددی اشاره نمود، در گیاه برنج بلوغ دیررس گیاه باعث مقاومت می‌شود (Banniza et al., 2011). در نخود مقاومت گیاه به ضخامت اپیکوتیل بستگی دارد (Yang and Verma, 1992). گروهی از دانشمندان تجمع لیگنین و مواد فنلی را در قسمت‌های آسیب دیده دلیل مقاومت به این قارچ‌ها می‌دانند (De Alwis et al., 2009). در آزمایشی پس از بررسی ارقام

گونه کاملاً مقاوم دانست و به نظر می‌رسد که مقاومت ژنوتیپ‌های لوبیا نسبت به قارچ *R. solani* حالت نسبی داشته و یکنوع مقاومت پلی‌ژنتیک باشد (Bohlooli and Farhangian, 2009). ترکیب سه تایی قارچ *R. solani* در مرحله گیاهچه با قارچ‌های *M. phaseolina* و *F. solani* باعث نابودی کامل گیاه گردید. ولی زمانی که این قارچ در ترکیب دو تایی با فوزاریوم و ماکروفومینا استفاده شد علی‌رغم ظهور علائم آلودگی بر روی گیاهان، رشد گیاه تا انتهای آزمایش ادامه داشت. همچنین نتایج نشان داد بیماری‌زایی قارچ *F. solani* بر روی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش کمتر از قارچ *R. solani* بود. بنیزاو همکاران (Banniza et al., 2011) نیز این امر را در پژوهش‌های خود مشاهده نمودند و بیان کردند که این پدیده نشان دهنده این است که بعضی از روابط متقابل رقم-بیمارگر برای بروز علائم نیازمند دوره طولانی‌تر است. از اینرو ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به دو گروه می‌توان تقسیم نمود، یک دسته آن ژنوتیپ‌هایی که زود علائم نشان می‌دهند و زود از بین می‌روند (به عبارت دیگر درصد آلودگی و شدت بیماری در آنها بیشترین مقدار را دارا بود) و دسته دیگر، ژنوتیپ‌هایی که دیر علائم را نشان می‌دهند. در این پژوهش، قارچ ریزوکتونیا و ماکروفومینا خسارت بیشتری نسبت به قارچ‌های فوزاریوم ایجاد کردند و گسترش بیماری تحت تأثیر قارچ فوزاریوم کندتر بود که علت آن را می‌توان تغییر pH مناسب جهت رشد و توسعه میسلیم‌های قارچ و مدت زمان لازم برای ظهور علائم بیان کرد. این پدیده نشان می‌دهد که عامل یا عوامل مقاومت به تدریج اثرات خود را در طول دوره رشد گیاه ظاهر می‌سازند. دو ناحیه از ژنوم لوبیا با کنترل جایگاه پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در مقاومت به *F. solani* دخالت دارند که در همین راستا پیشنهاد شده است برای افزایش سطح مقاومت به این قارچ از انتقال چندین ژن مقاومت به چندین وارسته و سپس تلاقی بین این وارسته‌ها برای کسب وارسته‌ای با چندین ژن مقاومت استفاده شود (Panella and Ruppel, 1996). چنانچه از نتایج این آزمایش استنباط می‌گردد، رقم گلی که در مرحله دو برگی در مقابل قارچ *R. solani* مقاومتی نشان داد، در برابر قارچ‌های *F. solani* و *M. phaseolina* نیز کاملاً از بین نرفت. لذا چنین استنباط می‌شود که تنوع ژنتیکی برای مقاومت به بیماری در ژنوتیپ‌ها وجود دارد. بهلولی و همکاران با مقایسه ۱۵ رقم اصلاح شده لوبیا چیتی، قرمز، سفید، سبز و چشم بلبلی در برابر ۵ جدایه *R. solani* در شرایط گلخانه گزارش کردند هیچ کدام از این ارقام مقاومت کاملی به این بیماری نداشتند و تمامی این ارقام به این بیماری حساس و نیمه حساس و دو رقم لوبیای قرمز گلی و لوبیای صیاد نسبت به بیماری نیمه مقاوم بودند (Bohlooli and Farhangian, 2009). مقایسه نتایج حاصل از ارتفاع گیاهچه در ژنوتیپ‌های مختلف و مقایسه هر رقم با شاهد مربوطه نشان داد، رقم گلی کمترین ارتفاع را نسبت به شاهد خود داشت. علت کاهش ارتفاع

متحمل و حساس چند علف چندساله به *R. solani* وجود برگ‌های پهن‌تر و گسترش‌کننده زخم‌ها در روی گیاه را دو عامل مقاومت به *R. solani* معرفی نمودند (Glen and Brown, 1998).

طوری که رقم صدری با داشتن کمترین شدت بیماری و بیشترین ارتفاع و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه، مقاومترین رقم نسبت به هر یک از سه قارچ به تنهایی و بصورت ترکیبی بود.

نتیجه‌گیری

بطور کلی نتایج تحقیق نشان داد ارقام مورد آزمون واکنش‌های متفاوتی نسبت به قارچ‌های عامل بیماری از خود نشان دادند به

سیاسگزاری

بدینوسیله از حمایت‌های مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان اقلید قدردانی می‌گردد.

منابع

- Asad, S., Shafiallah, R., & Ahmed, I. (2017). Differential reaction of sunflower genotypes to isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Proceeding of the 13th International sunflower Conference*. Pisa, Italy, 2: 977_979.
- Boyd, L.A., Ridout, C., O'Sullivan, D.M., Leach, J.E., & Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics* 29(4): 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>.
- Banniza, S., Sy, A.A., Bridge, P.D., Simons, S.A., & Holderness, M. (2011). Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* in paddy rice fields in Cote d'Ivoire. *Phytopathology* 89(5): 414-420. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.5.414>.
- Belete, E., Ayalew, A., & Ahmed, S. (2013). Associations of biophysical factors with faba bean root rot (*Fusarium solani*) epidemics in the northeastern highlands of Ethiopia. *Crop Protection* 52: 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.003>.
- Behrooz, R., Jafari, N., Akbari Noghani, K., Ahmadian, G.R., Rahimzadeh, K., Rigi, G., & Forouzan, A. (2015). Biological control of *Macrophomina phaseolina* pathogenic fungus using *Streptomyces* sampled from deposits of northern Iran. 12th genetics convention of Iran 14(6): 107-112. (In Persian with English abstract)
- Bohlooli, A.S., & Farhangian, K. (2009). The assessment of different species of beans reacting to five samples of *R. solani* in greenhouse. *Giah va Zistboom Scientific Journal* 25(7): 85-97.
- Carvalho, D.D., Lobo Junior, M., Martins, I., Inglis, P.W., & Mello, S. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology* 39(5): 384-391. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500005>.
- Dubin, H.J., & Ginkel, M.V. (2008). The status of wheat diseases and disease research in warmer areas. In *Wheat for the nontraditional warm areas: a proceedings of the International Conference July 29-August 3 1990 Foz do Iguaçu, Brazil*, 125-45.
- De Alwis, R., Fujita, K., & Ashitani, T. (2009). Induced monoterpene and lignin production in mechanically stressed and fungal elicited cultured *Cupressus lusitanica* cells. *Plant Biotechnology Reports* 3: 57-65.
- Glenn, E., & Brown, J. (1998). Effects of soil salt levels on the growth and water use efficiency of *Atriplex canescens* (Chenopodiaceae) varieties in drying soil. *American Journal of Botany* 85(1): 10-10. <https://doi.org/10.2307/2446548>.
- Gheshm, R., & Kafi, M. (1999). Industrial tomato from planting to harvest. *Iranian Student Book Agency Journal* 21: 80-85.
- Hill, J.P., & Blunt, D.L. (1994). Wheat seedling response to root infection by *Cochliobolus sativus* and *Fusarium acuminatum*. *Plant Disease* 78(12): 1150-1152.
- Mengistu, A., & Paris, R.L. (2003). Comparison of disease assessments of soybean genotypes in the presence of charcoal rot. *Phytopathol* 14: 93-61.
- Maurhofer, M., Keel, C., & Défago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology* 44(1): 40-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02714.x>.
- Mohammadi, H., & Banihashemi, Z. (2005). Propagation, pathogenicity and stability of *fusarium* producing wilt and root rot of chickpea in Fars province. *Plant Diseases* 41: 687-708. (In Persian with English abstract)
- Majnoun Hosseini, N. (2008). *Grain legume production*. University of Tehran, Iran, 9: 15-34. (In Persian with English abstract)
- Mijatovic, M., Zecevic, B., Ivanovic, M., & Obradovic, A. (2005). Diseases of pepper in Serbia and results of breeding for resistance. *Folia Hort* 17: 53-60.
- Manafi, R., Banai Ahari, A.A., Arzanloo, M., & Valizadeh, M. (2012). The assessment of the resistance of common species of greenhouse tomato to *Fusarium* Wilt disease in East Azerbaijan Province and the evaluation of the possibility of biological control of this disease. *Sustain Agriculture Journal* 22(1): 145-158.

19. Obala, J., Mukankusi, C., Rubaihayo, P.R., Gibson, R., & Edema, R. (2012). Improvement of resistance to *Fusarium* root rot through gene pyramiding in common bean. *African Crop Science Journal* 20: 1-13. <https://hdl.handle.net/10568/96296>.
20. Panella, L., & Ruppel, E.G. (1996). Availability of Germplasm for resistance against *Rhizoctonia* Spp. In *Rhizoctonia* species: *Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* 14(10): 515-527.
21. Philips, A.K. (2009). Toxicity and repellency of essential oils to the German Cockroach (*Dictyoptera:Blattellidae*) [MS thesis]. Auburn University, Auburn, Albama.
22. Ruuhola, T., & Yang – Annals, S. (2005). Wound-induced oxidative responses in mountain birch leaves. *Annals of Botany* 97(1): 29–37. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj005>.
23. Rajabi, A. (2002). Tomato diseases (translation). Academic publication center, 352- 354. (In Persian with English abstract)
24. Raja Sekhar, N., & Chand, H. (2001). Effect of host nutrition on *Mungbean Yellow Mosaic Virus*, Anthracnose, Root Rot and Leaf Crinkle of Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Indian Journal of Plant Protection* 29: 88-91.
25. Shamim, M.D., Kumar, D.E.E., Srivastava, D.I., Pandey, P.A., & Singh, K.N. (2014). Evaluation of major cereal crops for resistance against *Rhizoctonia solani* under green house and field conditions. *Indian Phytopathol* 67: 42-48.
26. Sharma, M., & Pande, S. (2013). Unravelling effects of temperature and soil moisture stress response on development of dry root rot (*Rhizoctonia bataticola* (Taub). Butler in Chickpea. *American Journal Plant Science* 4: 584-589. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.43076>.
27. Vilgalys, R., & Cubeta, M.A. (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review Phytopathology* 32: 135–155.
28. Yang, J., & Verma, P.R. (1992). Screening genotype for resistance to Pre-emergence damping-off and Post-emergence seedling root rot of oilseed rape and canola caused by *Rhizoctonia solani* AG2-1. *Crop Protection* 11: 443–448.



Evaluation of the *Trichoderma harzianum* BI alone and in Combination with Thiamine, Riboflavin and Hexanoic Acid Effects on Resistance Induction against *Meloidogyne javanica* in Tomato Plants

M. Kavari¹, E. Mahdikhani- Moghaddam^{2*}, H. Rouhani³

Received: 26-08-2021

Revised: 28-09-2021

Accepted: 22-10-2021

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Kavari, M., Mahdikhani- Moghaddam, E., & Rouhani, H. (2022). Evaluation of the *Trichoderma harzianum* BI alone and in Combination with Thiamine, Riboflavin and Hexanoic Acid Effects on Resistance Induction against *Meloidogyne javanica* in Tomato Plants. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 153-167. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/JPP.2021.72002.1045](https://doi.org/10.22067/JPP.2021.72002.1045)

Introduction

One of the most important problems facing modern agriculture is soil born plant pathogens control, especially root-knot nematodes. Chemical control, crop rotation and using resistance cultivar are common methods in control of most plant pathogens; however, there are low efficacy in control of root-knot nematodes regarding host wide range, long-term survival ability in soil and plant residual even in absence of host. One of the new methods in the management of root-knot nematodes is resistance induction in host using chemical compounds and microorganisms. In this method there are not any side effect. The aim of this study was to investigate the effectiveness and mechanisms involved in induced resistance by three chemical compounds (Hexanoic acid, Thiamin and Riboflavin) accompanied by *Trichoderma harzianum* BI in tomato plants against *Meloidogyne javanica*. The objectives of this study were addressed by monitoring the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, catalase, phenylalanine ammonia lyase, accumulation of total phenolic compounds and nematode disease indexes.

Materials and methods

This study was conducted in the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad and was performed with susceptible cultivar to root knot nematode (Early Urbana). 2-4 leaf stage tomato seedlings were transferred to 3 Liter pots filled with 2 liter sterile soil and maintained under greenhouse condition to the end of experiment. 2000 *Meloidogyne javanica* J2 larvae (N) were added to each pot. Tomato plants were treated with *Trichoderma harzianum* BI (TH) with a population of 1×10^7 spores/mL, Hexanoic acid (HX), thiamine (TI) and riboflavin (RB) with a concentration of 20 mM. Distilled water was used as control treatment. Sampling was performed at specific time points from each pot and the samples were transferred to the laboratory. Enzyme extract was extracted from tomato roots to assay the Peroxidase (POD), Poly phenol oxidase (PPO), Catalase (PAL) and Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity. Also total phenol content and nematode pathogenicity indexes were measured at the end of the growing season.

Results and Discussion

Based on the results, the highest POD and PPO enzyme activities were measured in TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N treatments, respectively, at a time point of 72 hours after treatment. The highest CAT enzyme activity was also recorded in the treatments TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N, respectively, at 96 hours after treatment application, the highest PAL enzyme activity was recorded in TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N treatments, respectively, at a time point of 120 hours after treatment. The highest total phenol content of roots were measured, respectively, in TH + RB + N, TH + HX + N and TH + TI + N

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Professors in Plant Pathology Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

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

treatments with values of 125.33, 114.67 and 109.33 mg gallic acid per gram roots. Also, nematode pathogenicity indexes including gall index, number of egg sacs and number of eggs in each egg sac were measured 45 days after the start of the experiment and a significant difference was observed in all treatments compared to the control treatment. The lowest values of pathogenicity indices were recorded in TH + HX + N, TH + RB + N and TH + TI + N treatments, respectively. Systemic resistance in plants can be induced with biotic and abiotic agents. The effects of chemical and microorganisms on plants resistance induction were investigated in many studies. However, effect of these agents on plant parasitic nematodes were considered less than other pathogens. Capability of different *Trichoderma* isolates on nematodes damage reduction are reported in many different studies. Several biocontrol mechanisms are reported for *Trichoderma*. As biocontrol ability of an isolate can be different mechanisms consequence. Effect of different chemical such as Hexanoic Acid, Thiamin and Riboflavin on plant disease have been investigated, however, there are little known about the effects of these chemicals on plant parasitic nematodes. The use of these chemicals as an enhancer of plant resistance to pathogens, due to their low risk to humans and the environment has been increasingly welcomed by researchers.

Conclusion

The results showed significant effect of used treatments on the reduction of root-knot nematode damage in tomato plants. These results justify further studies to investigate and identify the mechanisms of these compounds mode of action on increasing host resistance against this pathogen.

Keywords: Hexanoic acid, Root-knot nematode, Riboflavin, Thiamin, Tomato

بررسی توانایی کنترل کنندگی قارچ *Trichoderma harzianum* BI به تنهایی و در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی تیامین، ریوفلاوین و هگزانوئیک اسید علیه نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی

مجتبی کواری^۱ - عصمت مهدیخانی مقدم^{۲*} - حمید روحانی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۳۰

چکیده

از مهمترین مسایل پیش روی کشاورزی مدرن، کنترل بیمارگرهای خاکزاد گیاهی به ویژه نماتدهای ریشه گرهی می‌باشد. این نماتدهای انگل اجباری، سالانه خسارت قابل توجهی را به محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان وارد می‌کنند. روش‌های مرسوم در کنترل سایر بیمارگرها مانند کنترل شیمیایی، تناوب زراعی، استفاده از ارقام مقاوم با توجه به دامنه وسیع میزبانی، توانایی بقا طولانی مدت در خاک و بقایای گیاهی حتی در عدم حضور میزبان و همچنین گذراندن بیشتر مراحل زندگی درون بافت گیاه، در کنترل این بیمارگر کارایی چندانی ندارد. القای مقاومت در میزبان در برابر این بیمارگر با کاربرد ترکیبات شیمیایی و میکروارگانیسم‌های مفید با توجه به نداشتن مضرات استفاده از آفت‌کش‌ها یکی از روش‌هایی است که به تازگی در جهت مدیریت این بیمارگر مورد توجه فراوان قرار گرفته است. در این پژوهش تاثیر استفاده از جدایه BI قارچ *Trichoderma harzianum* به تنهایی و همچنین به همراه هگزانوئیک اسید، تیامین و ریوفلاوین بر میزان فعالیت آنزیمی، محتوی فنل کل ریشه و همچنین کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد در گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، تیمار قارچ تریکودرما به همراه هگزانوئیک اسید بیشترین تاثیر را بر افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، پلی فنیل آلانین آمونیلیاز و کاتالاز و همچنین کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد نشان داد. نتایج این بررسی نشان دهنده پتانسیل بالای استفاده از این ترکیبات شیمیایی و همچنین قارچ تریکودرما در جهت مدیریت تلفیقی این بیمارگر در برنامه‌های کشاورزی پایدار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، تیامین، ریوفلاوین، گوجه فرنگی، نماتد ریشه گرهی، هگزانوئیک اسید

مقدمه

که خسارات سنگینی را به تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان وارد می‌کنند (Ghareeb et al., 2019).

در بین محصولات کشاورزی، گوجه فرنگی یکی از محصولاتی است که در سراسر جهان به صورت مزرعه‌ای و گلخانه‌ای کشت می‌شود که به شدت تحت تاثیر نماتدهای بیمارگر گیاهی و بخصوص نماتدهای ریشه گرهی می‌باشد. کشور ایران رتبه نهم را در تولید این محصول در دنیا دارا می‌باشد (FAOSTAT).

مدیریت نماتدهای بیمارگر گیاهی از طریق تناوب زراعی، کنترل زیستی با استفاده از عوامل بیوکنترل، ارقام مقاوم و متحمل، ضدعفونی خاک (از طریق سموم تدخینی یا آفتاب‌دهی خاک) و القای مقاومت صورت می‌پذیرد. محدودیت‌ها و مضرات زیست محیطی کنترل شیمیایی نماتدها سبب توجه ویژه به روش‌های جایگزین کنترل نماتدها شده است (Bernard et al., 2017) که یکی از این

یکی از بزرگترین چالش‌ها در کشاورزی مدرن، مدیریت بیمارگرهای خاکزاد گیاهان بخصوص نماتدهای انگل گیاهی می‌باشد. نماتدهای بیمارگر گیاهی هر ساله معادل ۸۰ میلیارد دلار آمریکا به صورت مستقیم و غیر مستقیم به محصولات کشاورزی خسارت وارد می‌کنند (Navia et al., 2017). در بین نماتدهای بیمارگر گیاهی، نماتدهای ریشه گرهی (RKNs*) گونه‌های جنس *Meloidogyne* یکی از مهم‌ترین بیمارگرها در طیف وسیعی از محصولات می‌باشند

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه فردوسی

مشهد، مشهد، ایران

(*)- نویسنده مسئول

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

DOI: 10.22067/JPP.2021.72002.1045

4- Root- Knot nematodes

روش‌های جایگزین، القای مقاومت در گیاهان با استفاده از عوامل زنده و غیر زنده می‌باشد که به دلیل نداشتن مضرات زیست محیطی، به صورت گسترده مورد توجه محققین قرار گرفته است (Sahebani et al., 2011). واژه مقاومت در نمادشناسی، به توانایی گیاه در جلوگیری و یا کاهش میزان تولید مثل یک گونه از نماتد و یا کاهش خسارت آن اطلاق می‌شود. رابطه‌ی پیچیده بین نماتدهای بیمارگر و گیاه طی یک تکامل پیچیده، پیش رفته است؛ به منظور توسعه مکان‌های غذایی، نماتدهای بیمارگر گیاهی استراتژی‌های متعددی را جهت سرکوب سیستم‌های دفاعی و ایمنی گیاهان به کار می‌گیرند؛ در مقابل گیاهان نیز طیف وسیعی از مکانیسم‌های دفاعی مکانیکی و شیمیایی را در جهت تشخیص و جلوگیری از نفوذ و محدود کردن بیماری‌زایی نماتدها به کار می‌گیرند (Aryal et al., 2011). فعال سازی سیستم ایمنی گیاهان به وسیله عوامل زنده و غیر زنده، که محرک نامیده می‌شوند، در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین در جهت مدیریت بیماری‌های گیاهی قرار گرفته است. مقاومت ایجاد شده در گیاه علیه یک بیمارگر تحت تاثیر عوامل محرک زنده یا غیر زنده، مقاومت سیستمیک القایی (ISR^۱) و مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR^۲) نامیده می‌شوند. عوامل محرک متعددی به عنوان القاگر مقاومت در گیاهان علیه نماتدهای بیمارگر گیاهی گزارش شده است (Fatma et al., 2014). از مهمترین این عوامل، جدایه‌های متعددی از قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) می‌باشند که گزارش‌های فراوانی مبتنی بر توانایی گونه‌های این قارچ در کاهش میزان بیماری‌های نماتدی در گیاهان ارائه شده است. گونه‌های این قارچ به چندین روش میزان خسارت نماتدها را کاهش می‌دهند که می‌توان به پارازیتسم مستقیم قارچ بر روی نماتد و تخم نماتد، القای مقاومت علیه نماتد در گیاه، افزایش رشد گیاه با تولید مواد شبه هورمونی و همچنین تجزیه دیواره تخم نماتد با تولید ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده مانند کیتیناز و پروتئیناز اشاره کرد. (Feyisa et al., 2015; Herrera-Al-Hazmi et al., 2016; Parra et al., 2018; Sharon et al., 2009; Szabó et al., 2012; Zhang et al., 2013).

علاوه بر عوامل زنده، برخی از ترکیبات شیمیایی نیز به منظور القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرند. از این ترکیبات می‌توان تیامین (ویتامین B1) و ربیوفلاوین (ویتامین B2) را نام برد که به عنوان ترکیباتی جهت تحریک مقاومت در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Taheri and Tarighi, 2010; Ahn et al., 2007). مطالعات نشان داده است که مقاومت ایجاد شده توسط تیامین، یک مقاومت طولانی مدت و پایدار بوده و در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی صورت می‌پذیرد. تیامین ژن‌های

مرتبط با SAR را فعال کرده و سبب جلوگیری و کاهش میزان بیماری در گیاهان می‌شود (Asensi-Fabado and Munné-Kato and Shimizu, 1987; Bosch, 2010). یکی از این مطالعات نشان داده است که تیامین سبب فعال کردن ژن PR-1 در توتون شده که سبب ایجاد مقاومت علیه ویروس موزاییک توتون از مسیر وابسته به سالیسیلیک اسید می‌گردد (Malamy et al., 1996). همچنین تحقیقات بعدی نشان داد که تیامین از طریق افزایش بیان فنیل آلانین آمونیالاز (PAL) سبب افزایش سطح رسوب کالوس در آراییدوپسیس می‌شود (Ahn et al., 2007). نتایج تحقیقی در رابطه با تاثیر استفاده از تیامین بر میزان کاهش خسارت نماتد ریشه گری در گیاه برنج نشان داد که این ترکیب سبب تجمع هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و لیگنین در ریشه گیاه می‌شود که این امر با افزایش میزان بیان ژن‌های موثر در مسیر فنیل پروپانویید (*OsC4H* و *OsPAL1*) مرتبط می‌باشد (Huang et al., 2016).

بررسی‌های صورت گرفته در زمینه تاثیر استفاده از ربیوفلاوین بر کاهش خسارت بیماری‌های گیاهی نشان دهنده تاثیر این ویتامین محلول در آب بر این امر می‌باشد. به عنوان نمونه، تاثیر این ویتامین بر القای مقاومت سیستمیک در گیاه آراییدوپسیس علیه قارچ *Peronospora parasitica* و باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* و در گیاه توتون علیه قارچ *Alternaria alternata* و ویروس موزاییک توتون (TMV) به اثبات رسیده است (Dong and Zhang et al., 2009; Beer, 2000). همچنین تاثیر ربیوفلاوین و مشتقات آن در القای مقاومت علیه قارچ *Pyricularia oryzae* در گیاه برنج گزارش شده است (Aver'Yanov et al., 2000). بوبکری و همکاران (Boubakri et al., 2013) گزارش کردند که استفاده از ربیوفلاوین سبب کاهش خسارت سفیدک کرکی ناشی از *Plasmopara viticola* در یک رقم حساس انگور (Pinot meunier) می‌شود (Boubakri et al., 2013).

هگزانوئیک اسید یکی دیگر از ترکیبات شیمیایی است که اخیراً در زمینه القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد توجه قرار محققین قرار گرفته است. تحقیقات زیادی در این زمینه نشان داده است که این ترکیب سبب القای مقاومت در گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی می‌شود. همچنین این ترکیب طبیعی زنجیره کوتاه مونوکربوکسیلیک اسید دارای خواص آنتی میکروبیال نیز می‌باشد. نتایج یک بررسی در این زمینه نشان داد که این ترکیب سبب افزایش مقاومت گوجه فرنگی در برابر حمله قارچ *Botrytis cinerea* می‌شود (Leyva et al., 2008). پژوهشی دیگر در این زمینه نشان داد که تیمار گیاه گوجه فرنگی با این ترکیب سبب افزایش میزان بیان ژن‌های PR1 و PR5 می‌شود و سطح مقاومت این گیاه به باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 تیمار شده با این ترکیب نسبت به گیاهان شاهد بالاتر می‌باشد

- 1- Induced Systemic Resistance
- 2- Systemic acquired Resistance

جمعیت خالص نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* بر روی رقم حساس گوجه تکثیر گردید. لاروهای سن دوم (J₂) این نماتد با نگهداری تخم نماتد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته تفریخ گردید و جهت مایه‌زنی به نشاهای گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گرفت (Kayani et al., 2001).

ترکیبات شیمیایی

مواد شیمیایی مورد نیاز در این پژوهش شامل هگزانوئیک اسید (Hexanoic Acid)، تیامین (Thiamin) و ریبوفلاوین (Riboflavin) از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich) تهیه شدند. در این پژوهش از غلظت ۲۰ میلی‌مولار این ترکیبات شیمیایی به همراه ۰/۰۲ درصد حجمی توئین ۲۰ (Tween 20- Merck) در آب مقطر استریل استفاده شد.

روش تیمار

سه عدد نشا گوجه فرنگی به ازا هر تیمار و هر نقطه زمانی در مرحله ۲-۴ برگی با سوسپانسیون اسپوری قارچ تریکودرما مایه‌زنی شدند. جهت مایه‌زنی قارچ به گیاه از روش غوطه ور نمودن ریشه در سوسپانسیون اسپوری به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پس از آن مواد شیمیایی تهیه شده بر روی برگ‌های گیاهان اسپری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، تعداد ۲۰۰۰ عدد لارو سن دوم نماتد به هر گلدان مایه‌زنی گردید و در شرایط گلخانه نگهداری گردید. همچنین در تیمار شاهد مثبت، آب مقطر استریل به جای عامل بیوکنترل و ترکیب شیمیایی استفاده شد و گیاه با ۲۰۰۰ عدد لارو نماتد مایه‌زنی شد. در گیاهان شاهد منفی از آب مقطر استریل به جای تمامی تیمارها و بدون مایه‌زنی لارو نماتد استفاده شد.

نمونه‌برداری

پس از مایه‌زنی نماتد به ریشه گیاهان، نمونه‌برداری ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت (همچنین ۱۹۲ ساعت فقط برای آنزیم Phenyl alanine ammonia lyase) پس از مایه‌زنی نماتد از ریشه گیاهان انجام شد. ریشه‌ها شسته و سپس خشک گردید و سپس در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. از این نمونه‌ها جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید. همچنین ۴۵ روز پس از مایه‌زنی نماتد نیز به منظور بررسی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد و همچنین تعیین میزان محتوای فنل کل نمونه‌برداری از گیاهان صورت گرفت.

(Scalschi et al., 2013). پژوهش دیگری در این رابطه نشان داد که تیمار گیاه گوجه فرنگی با هگزانوئیک اسید سبب افزایش رسوب کالوس و همچنین بالا رفتن سطح کافئیک اسید در گیاه پس از حمله قارچ نکرتروف *Botrytis cinerea* شده که سبب کاهش توسعه این بیماری می‌شود (Vicedo et al., 2009).

این پژوهش به منظور بررسی تاثیر یک جدایه از قارچ تریکودرما (*T. harzianum* BI) به تنهایی و همچنین در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی ریبوفلاوین، تیامین و هگزانوئیک اسید بر کاهش میزان بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در گیاه گوجه فرنگی صورت پذیرفت. این پژوهش با تمرکز بر تغییرات میزان آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایز و پلی فنل اکسیداز، اندازه‌گیری محتوای فنل کل ریشه گیاه گوجه فرنگی و همچنین شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه فرنگی تحت تاثیر تیمارهای ذکر شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

گیاه

این تحقیق در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. آزمایش در قالب اسپلیت پلات (Split plot) فاکتوریل با سه تکرار انجام گرفت که نقطه‌های زمانی (Time points) به عنوان پلات اصلی و تیمارهای مورد استفاده به عنوان پلات فرعی در نظر گرفته شدند. جهت انجام این پژوهش از یک رقم گوجه فرنگی حساس به نماتد ریشه گرهی (Early Urbana) استفاده شد. بدین منظور بذر گوجه فرنگی در بستر کشت شامل کوکوپیت و پیت ماس (نسبت ۲ به ۱ حجمی) درون سینی نشاء کشت شد و نشاء گوجه فرنگی در مرحله ۲-۴ برگی به گلدان‌های ۳ لیتری حاوی ۲ لیتر خاک استریل (رس، ماسه و ماده آلی به نسبت ۱:۱:۲) انتقال یافتند و در شرایط گلخانه با دمای ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد و رژیم نوری به تاریکی ۱۶ به ۸ ساعت نگهداری و دو بار در هفته آبیاری شدند.

تهیه مایه تلقیح

در این پژوهش از جدایه BI قارچ *Trichoderma harzianum* استفاده شد. کشت تک اسپور این قارچ از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و بر روی محیط کشت PDA^۱ کشت داده شد و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس سوسپانسیون اسپوری قارچ به غلظت ۱×۱۰^۷ اسپور بر میلی‌لیتر به روش Jansson و همکاران تهیه شد (Jansson et al., 1985).

سنجش فعالیت آنزیمی**استخراج منبع آنزیمی**

جهت استخراج آنزیم، یک گرم از بافت ریشه در چهار میلی‌لیتر از بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم ($\text{pH}=6.8$) حاوی ۴ درصد (وزن به حجم) PVP و همچنین یک میلی‌مولار EDTA هموژنیزه شد و سپس با سرعت ۱۴۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و جهت تعیین میزان پروتئین کل و همچنین سنجش آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت. سنجش میزان پروتئین کل با روش برادفورد انجام شد و از سرم گاوی (Bovine serum) جهت ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد (Bradford, 1976).

سنجش آنزیم پراکسیداز (POD)

سنجش آنزیم پراکسیداز به روش Dias و Costa صورت گرفت. بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به محلول واکنش شامل ۲/۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با $\text{pH}=7$ ، ۰/۱ میلی‌لیتر گایکول ۲۰ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۵۰ میلی‌مولار افزوده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز با اندازه‌گیری و ثبت میزان تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۷۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر سنجش شد. تمامی اندازه‌گیری‌های آنزیمی این پژوهش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/Visible spectrophotometer Biochrom Biowave II انجام گرفت. یک واحد از فعالیت آنزیمی به معنای میزان آنزیمی که برای تولید یک میکرومول تترایکول در هر دقیقه مورد نیاز می‌باشد، تعریف شد (DIAS and COSTA., 1983).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO)

سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز به روش Liu و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (Liu et al., 2005). ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به مخلوطی از ۰/۳ میلی‌لیتر کتکول (Catechol) ۰/۲ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار ($\text{pH}=6.8$) اضافه شد. سپس تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ۴۲۰ نانومتر طی دو دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی به عنوان تغییرات در جذب در هر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

سنجش فعالیت کاتالاز با روش Shimizu و Kato با اندکی تغییر انجام شد. بدین منظور، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به ترکیبی شامل ۰/۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) ۵۰ میلی‌مولار و ۲/۸

میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار ($\text{pH}=7$) افزوده شد و میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری و ثبت شد. کاهش در میزان جذب نوری به عنوان کاهش محتوای H_2O_2 که ناشی از فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد، تلقی گردید. فعالیت آنزیمی با تغییرات در میزان جذب محلول واکنش در هر دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد گردید (Kato and Shimizu, 1987).

سنجش آنزیم phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

جهت استخراج عصاره آنزیمی، یک گرم از بافت ریشه پودر شده به دو میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار ($\text{pH}=7.2$) حاوی دو درصد (حجم به وزن) PVP، یک میلی‌مولار EDTA و ۵ میلی‌مولار مرکاپتواتانول افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز رویی به عنوان عصاره آنزیمی جهت سنجش آنزیم PAL مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش فعالیت آنزیم از روش Gomez و همکاران استفاده شد. بدین منظور، ۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر ۲۵ میلی‌مولار Tris-HCl ($\text{pH}=8.8$) و ۰/۵ میلی‌لیتر فنیل آلانین (L-Phenylalanine) ۱۰۰ میلی‌مولار افزوده شد. ترکیب واکنش به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. میزان جذب مشتقات trans-cinnamic در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. هر واحد آنزیم به عنوان مقداری از آنزیم که جهت تولید یک میکروگرم سینامیک اسید (Cinnamic acid) در یک میلی‌لیتر از محلول واکنش مورد نیاز می‌باشد، تعریف می‌شود (Gómez et al., 2004).

سنجش محتوای فنل کل

سنجش محتوای فنل با استفاده از معرف فولین - سیکالتیو (Folin-Ciocalteu) و به روش Singleton و Rossi با کمی تغییر انجام شد. ۴۵ روز پس از مایه زنی نماتد به گیاهان، سه عدد گیاه گوجه فرنگی به ازاء هر تیمار جمع‌آوری شد و یک گرم از ریشه در ۴ میلی‌لیتر از ترکیب متانول و آب (به نسبت حجمی ۴ به ۱) هموژنیزه شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار گرفت. سپس به مدت ده دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز رویی جهت تعیین میزان فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین میزان فنل کل، یک میلی‌لیتر از رانشین مرحله قبل به نسبت یک به پنج رقیق شد و سپس به ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیکالتیو ۲۰۰ میلی‌مولار افزوده شد و به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس دو میلی‌لیتر سدیم کربنات اشباع (۸۵ گرم بر لیتر) به محلول واکنش افزوده شد و به مدت یک ساعت

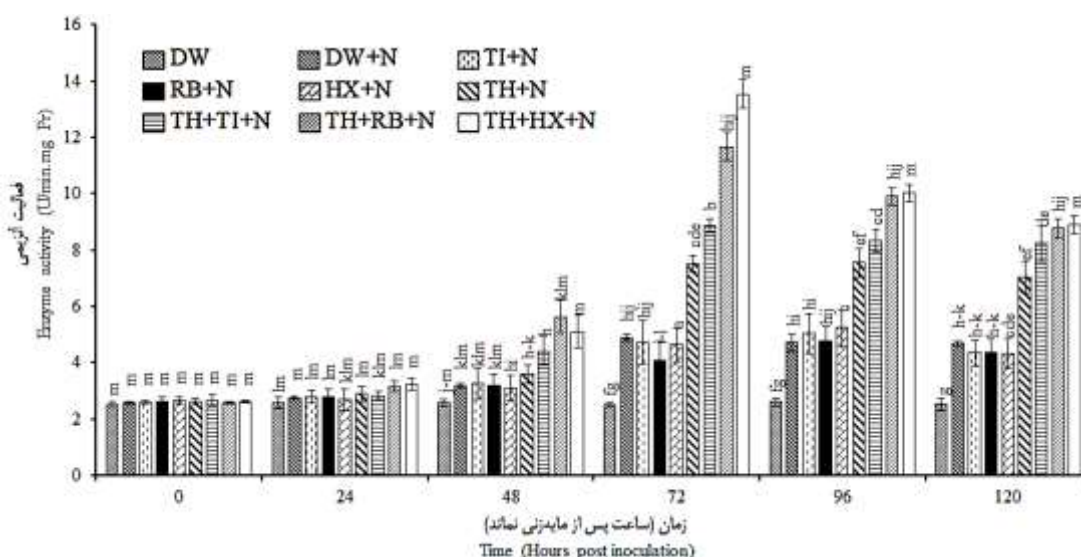
است. در این پژوهش، تاثیر جدایه BI قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) به تنهایی و در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی هگزانوئیک اسید (HX)، ریبوفلاوین (RB) و تیامین (TI) بر القای مقاومت علیه نماتد ریشه گری در گیاه گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیمی

در این بررسی، فعالیت آنزیمی چهار آنزیم موثر در مقاومت به بیمارگرهای گیاهی شامل کاتالاز (Catalase)، پراکسیداز (Peroxidase)، پلی فنل اکسیداز (Polyphenol Oxidase) و فنیل آلانین آمونیالاز (Phenylalanin Amonia Lyase) مورد بررسی قرار گرفت.

آنزیم پراکسیداز

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده در شکل ۱ آورده شده است. در تمامی تیمارهای مورد بررسی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز پس از ۲۴ ساعت از مایه زنی نماتد افزایش پیدا کرد و با روند صعودی تا ۷۲ ساعت پس از مایه زنی نماتد ادامه پیدا کرد و پس از آن روند نزولی به خود گرفت. بر اساس این نتایج، بالاترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تحت تیمار با تریکودرما و هگزانوئیک اسید (TH+HX) و در نقطه زمانی ۷۲ ساعت (۱۳/۵۳) واحد بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) پس از مایه زنی نماتد اتفاق افتاد.



شکل ۱- فعالیت آنزیمی پراکسیداز؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گری: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 1- Peroxidase Enzyme Activity: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

در دمای اتاق انکوبه شد و پس از آن میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری و ثبت شد. جهت ترسیم منحنی استاندارد فنل، از غلظت های مختلف گالیک اسید استفاده شد و نتایج بر حسب میلی گرم گالیک اسید بر گرم ریشه بیان گردید (Singleton and Rossi, 1965).

اندازه گیری شاخص های بیماری زایی نماتد

۴۵ روز پس از مایه زنی نماتد، شاخص های بیماری زایی در گیاهان تیمار شده اندازه گیری شد. بدین منظور تعداد کیسه تخم، تعداد تخم درون هر کیسه تخم و شاخص گال نماتد اندازه گیری شد (Bridge and Page, 1980).

تجزیه و تحلیل آماری

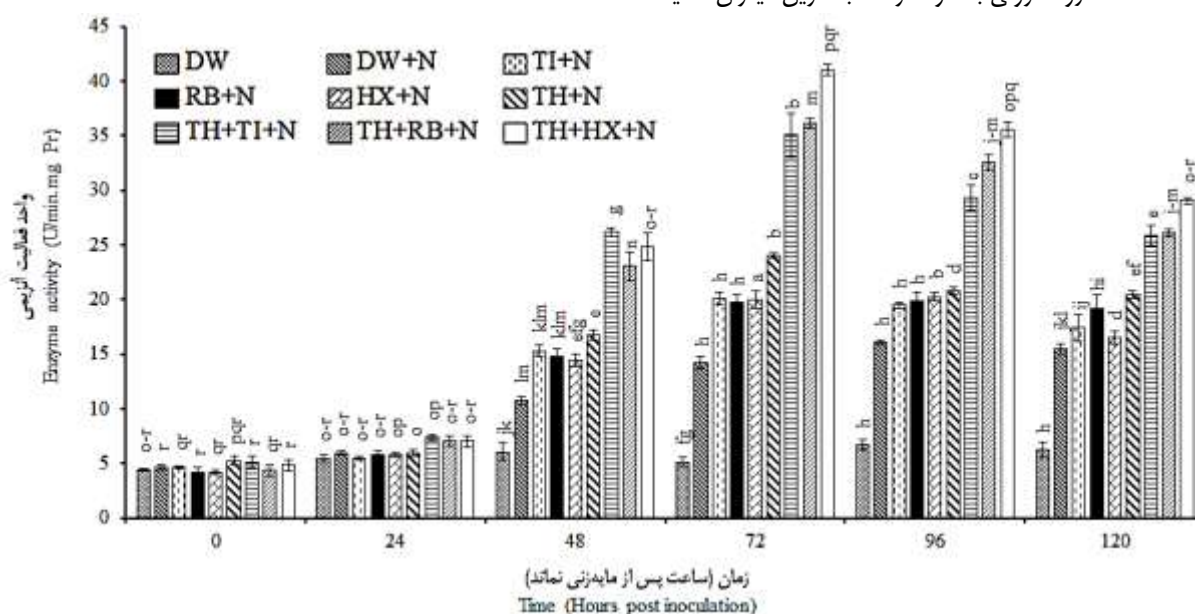
این بررسی یک بار و با سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزارهای IBM SPSS STATISTICS v.23.0 و STATISTICA v.7.0 انجام شد.

نتایج

القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی یکی از استراتژی های مدیریت بیماری های گیاهی در برنامه های مدیریت تلفیقی بیماری ها می باشد. مطالعات فراوانی در زمینه استفاده از عوامل زنده و غیر زنده بر القای مقاومت در گیاهان علیه نماتدهای بیمارگر گیاهی انجام شده

آنزیم پلی فنل اکسیداز

میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهان مورد بررسی پس از مایه‌زنی نماد تا ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی نماد با شیب ملایم افزایش پیدا کرد ولی از نقطه زمانی ۲۴ ساعت تا ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی نماد، با یک شیب تند روند صعودی پیدا کرد و پس از گذشت ۷۲ ساعت روند نزولی به خود گرفت. بالاترین میزان فعالیت



شکل ۲- فعالیت آنزیمی پلی فنل اکسیداز؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانونیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماد ریشه گری: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 2- Polyphenol oxidase Enzyme Activity: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

آنزیم کاتالاز

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز پس از گذشت ۴۸ ساعت از مایه‌زنی نماد روند صعودی پیدا کرد و در گام زمانی ۹۶ ساعت به بالاترین میزان خود رسید. بالاترین میزان فعالیت کاتالاز در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانونیک اسید (TH+HX)، تریکودرما و ریبوفلاوین (TH+RB) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) و به ترتیب با مقادیر ۲۱/۳۹، ۱۷/۷۰ و ۱۷/۲۷ واحد بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین در نقطه زمانی ۹۶ ساعت مشاهده گردید (شکل ۳).

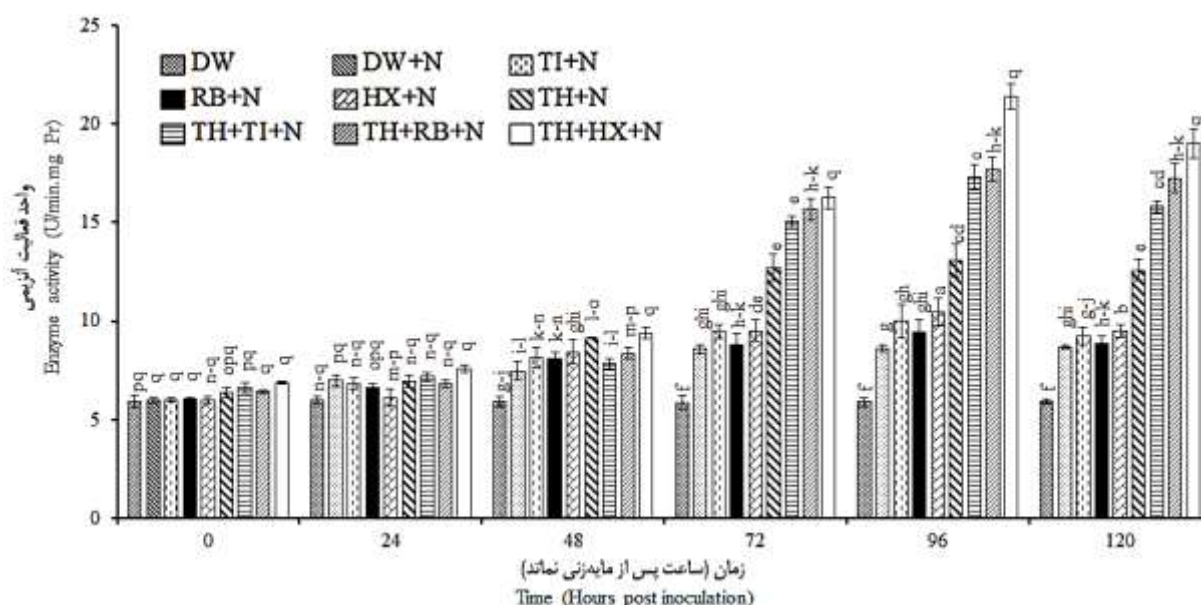
آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز

میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیز پس از ۱۲۰ ساعت از ایجاد آلودگی در گیاهان تحت تیمار به بالاترین میزان خود رسید و پس از آن روند نزولی پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در

آنزیمی در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانونیک اسید (TH+HX)، تریکودرما و ریبوفلاوین (TH+RB) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) (به ترتیب ۴۱/۰۴، ۳۶/۱۴ و ۳۵/۰۴ واحد بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) در نقطه زمانی ۷۲ ساعت پس از آلودگی مشاهده گردید (شکل ۲).

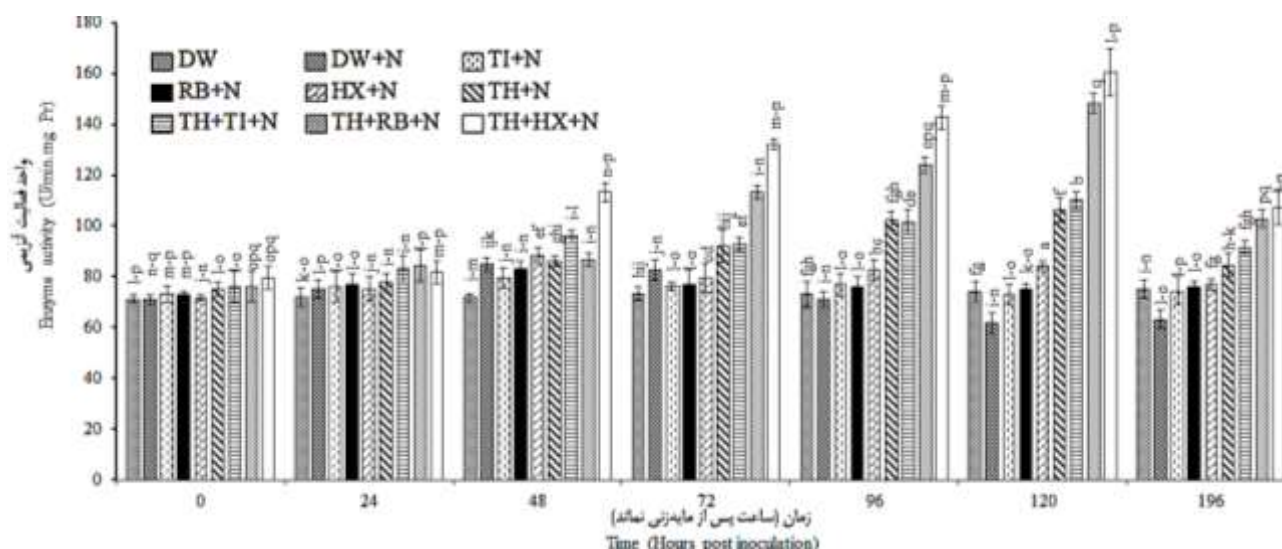
میزان فنل کل

پس از ۴۵ روز از مایه‌زنی نماد به گیاهان تحت تیمار، میزان فنل کل در ریشه این گیاهان اندازه‌گیری شد. بر اساس این نتایج، بالاترین میزان فنل کل (۱۲۵/۳۳ میلی گرم گالیک اسید بر یک گرم ریشه) در ریشه گیاهان تیمار شده با قارچ تریکودرما و ماده شیمیایی ریبوفلاوین (TH+RB) مشاهده گردید و پس از آن در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانونیک اسید (TH+HX) و تریکودرما و تیامین (TH+TI) بالاترین میزان فنل کل به ثبت رسید (شکل ۵).



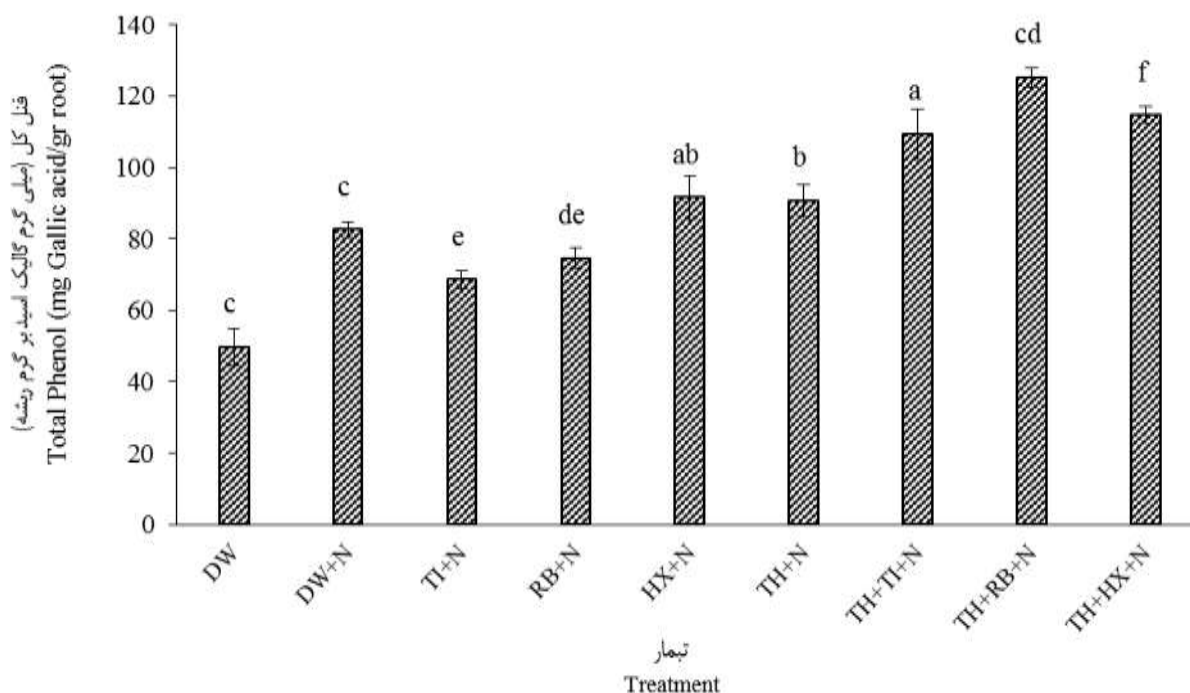
شکل ۳- فعاليت آنزيمى کاتالاز: اعداد ميانگين سه تکرار بيولوژيک و سه تکرار تکنیکال می باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند. جدایه BI قارچ تريکودرما: TH، هگزانونیک اسيد: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استريل: DW

Figure 3- Catalase Enzyme Activity: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۴- فعاليت آنزيمى فنيل آلانين آمونيا لياز: اعداد ميانگين سه تکرار بيولوژيک و سه تکرار تکنیکال می باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند. جدایه BI قارچ تريکودرما: TH، هگزانونیک اسيد: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گرهی: N، آب مقطر استريل: DW

Figure 4- Phenyl Alanin ammonia Lyase: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۵- میزان محتوای کل در ریشه گوجه فرنگی؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانونیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گری: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 5- Total Phenol Content in tomato root: Data are means of three biological Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است و سطوح متفاوتی از مقاومت به بیمارگرهای گیاهی تحت تاثیر این عوامل مشاهده شده است. با این وجود، تاثیر این عوامل بر القای مقاومت علیه نماتدهای انگل گیاهی کمتر از سایر بیمارگرهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش تاثیر جدایه BI قارچ *Trichoderma harzianum* به تنهایی و همچنین در ترکیب با سه ترکیب شیمیایی تیامین، ریبوفلاوین و هگزانونیک اسید بر میزان مقاومت گیاه گوجه فرنگی علیه نماتد ریشه گری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد بیشترین تاثیر قارچ تریکودرما بر کاهش شاخص‌های بیماری در استفاده همزمان این قارچ با ترکیب شیمیایی هگزانونیک اسید به دست می‌آید. توانایی جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما بر کاهش خسارت بیماری‌های نماتدی در پژوهش‌های فراوانی گزارش شده است. مکانیسم‌های بیوکنترلی متعددی برای قارچ تریکودرما در شرایط طبیعی ذکر شده است، بطوری که اثر بیوکنترلی یک جدایه را می‌توان نتیجه‌ای مجموعه‌ای مکانیسم‌هایی دانست که به صورت: اثر مستقیم روی بیمارگر، افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر، اثر بر رابطه‌ی متقابل میزبان و بیمارگر و همچنین تاثیر بر رشد گیاه از طریق تولید مواد شبه هورمونی و بهبود جذب مواد غذایی صورت می‌پذیرد، اعمال

شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد

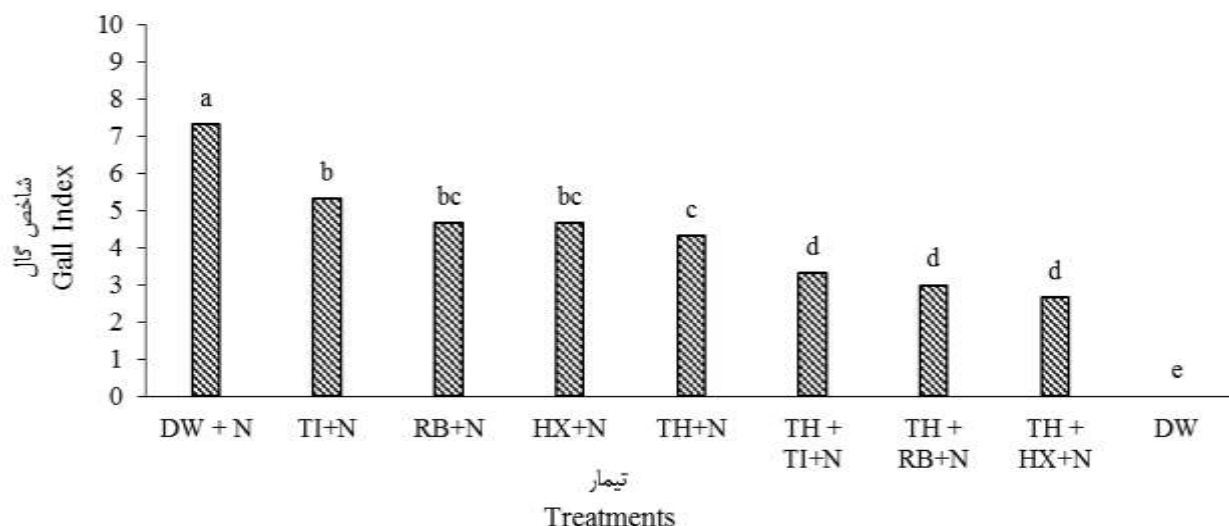
شاخص‌های بیماری‌زایی در گیاهان مورد بررسی با تیمارهای ذکر شده پس از ۴۵ روز از مایه‌زنی نماتد اندازه‌گیری شد. در گیاهان تیمار شده با تریکودرما و هگزانونیک اسید به صورت همزمان بیشترین میزان کاهش در شاخص‌های بیماری مشاهده گردید. در تمامی تیمارها، شاخص گال نسبت به گیاهان شاهد (۷/۳۳)، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌داد. پایین‌ترین میزان شاخص گال (۲/۶۷) در گیاهان تحت تیمار تریکودرما و هگزانونیک اسید به صورت همزمان مشاهده گردید (شکل ۶). همچنین کمترین تعداد کیسه تخم و تعداد تخم درون هر کیسه تخم به ترتیب در گیاهان تیمار شده $TH+TI+N$ و $TH+RB+N$ مشاهده گردید (شکل ۷ و ۸).

بحث

القای مقاومت سیستمیک در گیاهان می‌تواند از طریق کاربرد عوامل زنده و غیرزنده صورت پذیرد. تاثیر ترکیبات شیمیایی و میکروارگانیسم‌های متعددی بر القای مقاومت علیه بیمارگرهای

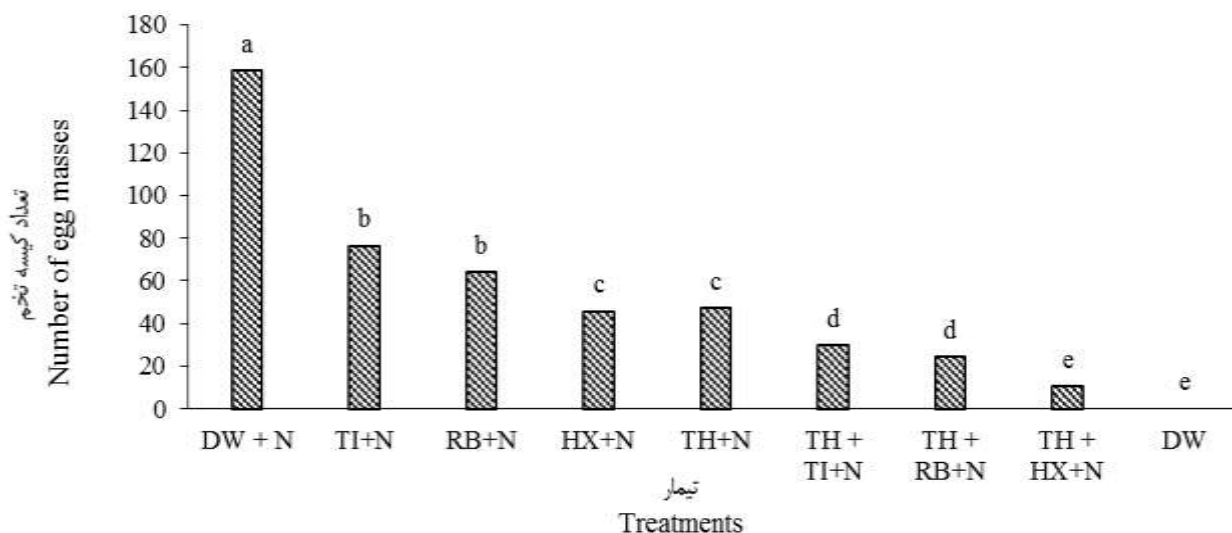
های این قارچ علیه نماتد ریشه گری به اثبات رسید که با توجه به میزان بالای کیتین موجود در دیواره تخم این نماتد، قابل درک می باشد (Kavari et al., 2014).

می شود (Zhang et al., 2009) در پژوهشی که توسط کواری و همکاران انجام شد، تاثیر مستقیم میزان تولید آنزیم کیتیناز خارج سلولی توسط جدایه های قارچ تریکودرما بر توانایی بیوکنترلی جدایه



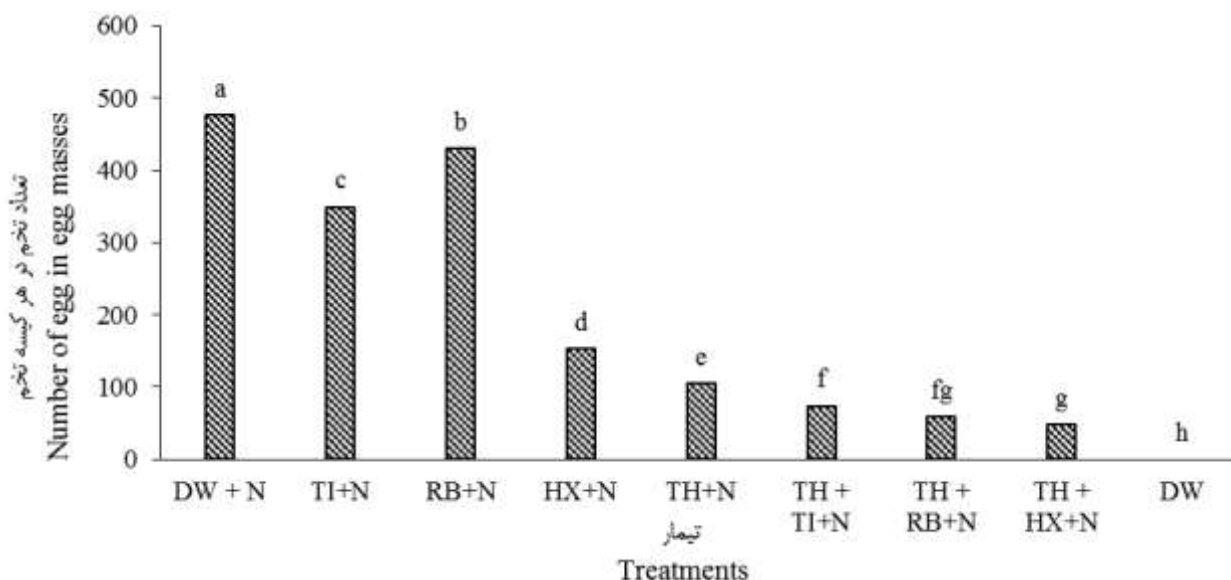
شکل ۶- شاخص گال نماتد در گیاهان تحت تیمار: اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانونیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گری: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 6- Gall Index in treated tomato root: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۷- تعداد کیسه تخم در ریشه گوجه فرنگی؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانونیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گری: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 7- Number of egg masses in tomato root: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water



شکل ۸- تعداد تخم درون هر کیسه تخم؛ اعداد میانگین سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال می‌باشند و تیمارهای با حروف مشابه فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند. جدایه BI قارچ تریکودرما: TH، هگزانوئیک اسید: HX، تیامین: TI، ریبوفلاوین: RB، نماتد ریشه گری: N، آب مقطر استریل: DW

Figure 8- Number of eggs in egg masses in tomato root: Data are means of three biological and three technical replications Means, in each column, followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$). TH: *Trichoderma harzianum*, HX: Hexanoic Acid, TI: Thiamine, RB: Riboflavin, N: *Meloidogyne javanica*, DW: Distilled Water

گزارش‌چندانی در دست نمی‌باشد. در پژوهشی که بر روی تاثیر ترکیب شیمیایی هگزانوئیک اسید بر القای مقاومت در گیاه گوجه فرنگی علیه قارچ *Botrytis cinerea* انجام شد مشخص گردید این ترکیب شیمیایی سبب تشکیل زخم‌های کوچکتر و رسوب کالوس بیشتر نسبت به گیاهان شاهد می‌شود در حالی که رسوب کالوس در گیاهان غیر آلوده به *Botrytis cinerea* و تیمار شده با هگزانوئیک اسید صورت نپذیرفت که این امر یکی از نمودهای القای مقاومت در گیاهان تیمار شده با هگزانوئیک اسید علیه این قارچ می‌باشد. همچنین در گیاهان تیمار شده با این ترکیب و آلوده به قارچ میزان تجمع کافیک اسید نسبت به گیاهان شاهد به طرز معناداری افزایش پیدا کرد که در ارتباط مستقیم با محتوای فنل کل گیاه می‌باشد. این پژوهش همچنین بیان داشت که هگزانوئیک اسید در غلظت ۲ میلی‌مولار فاقد هر گونه اثر میکروب‌کشی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (Zhang et al., 2009). همچنین پژوهشی دیگر در این زمینه نشان داد که هگزانوئیک اسید با فعال کردن مسیرهای مقاومتی وابسته به جاسمونیک اسید و سالیسیلیک اسید سبب القای مقاومت در گیاه گوجه فرنگی علیه باکتری *Pseudomonas syringae* از طریق افزایش میزان بیان ژن‌های JMT (Jasmonic acid carboxyl methyltransferase) و PR1 و PR5 می‌گردد.

گروه دیگری از ترکیبات شیمیایی که اخیرا در زمینه القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است،

پژوهشی دیگر در این زمینه تاثیر چهار جدایه از قارچ تریکودرما بر کاهش شاخص گال نماتد، کاهش تعداد کیسه تخم و همچنین تعداد تخم موجود در هر کیسه تخم برابر با کاربرد ترکیب شیمیایی اکسامیل را نشان داد (Herrera-Parra et al., 2018). همچنین در پژوهشی که توسط صاحبانی و هادوی انجام شد، توانایی کنترل زیستی جدایه BI قارچ تریکودرما علیه نماتد ریشه گری مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد این قارچ سبب کاهش معنادار شاخص‌های بیماری و همچنین افزایش میزان تولید آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیلایز در گیاهان تیمار شده با این قارچ می‌گردد که همسو با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد (Sahebani and Hadavi, 2008). آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز از آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانویید می‌باشد که در تولید لیگنین در ساختار گیاه موثر می‌باشد. افزایش میزان تولید لیگنین در ریشه گیاه، میزان مقاومت گیاه به نماتدها را افزایش می‌دهد. در ارقام حساس به نماتد سطح تولید این آنزیم تحت تاثیر حمله نماتد کاهش می‌یابد. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تیمار گیاهان حساس به نماتد با جدایه‌های قارچ تریکودرما سبب بالا رفتن سطح آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در ریشه گیاه و افزایش مقاومت به نماتد می‌شود.

پژوهش‌های زیادی در زمینه تاثیر ترکیبات شیمیایی نظیر هگزانوئیک اسید، تیامین و ریبوفلاوین بر بیمارگرهای گیاهی انجام شده است اما در زمینه تاثیر این ترکیبات بر نماتدهای بیمارگر گیاهی

سویا با تیمامین و ریوفلاوین بر میزان القای مقاومت علیه قارچ ساق سیاه با عامل *Macrophomina phaseolina* صورت گرفت نشان داد که تیمار این گیاه با ترکیبات ذکر شده سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های (PO) peroxidase، polyphenol oxidase (PPO)، (PAL) phenylalanine ammonia lyase و (PR) pathogenesis related protein (chitinase) نسبت به تیمار شاهد می‌گردد. این بررسی نشان داد که افزایش میزان فعالیت آنزیمی دو روز پس از مایه‌زنی تیمامین و ریوفلاوین آغاز می‌گردد و هشت روز پس از تیمار به حداکثر سطح خود می‌رسد و پس از آن روند کاهشی دارد. همچنین بیشترین میزان فنل کل و لیگنین به ترتیب شش و ده روز پس از تیمار گیاهان ثبت گردید (Abdel-Monaim, 2011). بررسی دیگری که در زمینه تاثیر استفاده از ریوفلاوین بر کاهش میزان بیماری سفیدک داخلی انگور صورت پذیرفت نشان داد که تیمار ریوفلاوین با غلظت ۲ میلی‌مولار یک تا سه روز قبل از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، سبب کاهش ۸۶ درصدی میزان پیشروی بیماری می‌گردد که این کاهش بیماری ناشی از تاثیر مستقیم قارچ‌کشی این ترکیب نمی‌باشد بلکه به دنبال افزایش تولید H_2O_2 ، افزایش بیان ژن‌های بالادستی موثر در دفاع گیاه و همچنین افزایش میزان تولید کالوس ناشی از تیمار ریوفلاوین در گیاه میزبان می‌باشد (Boubakri et al., 2013).

القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی یکی از روش‌های مدیریت بیماری‌های گیاهی می‌باشد که در کنار سایر روش‌های مدیریتی می‌تواند خسارت بیمارگرهای گیاهی را به مقدار قابل توجهی کاهش دهد. استفاده از میکروارگاناسم‌هایی همچون تریکودرما در بالا بردن سطح مقاومت گیاهان خطرات استفاده از ترکیبات شیمیایی جهت کنترل بیمارگرهای گیاهی را ندارد و یکی از کم خطرترین استراتژی‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی در یک کشاورزی پایدار می‌باشد. همچنین کاربرد ترکیبات شیمیایی که توانایی ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی را دارند نیز می‌تواند به عنوان راهکاری کم خطر در مدیریت بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. شناخت مسیرهای مقاومتی متاثر از این ترکیبات شیمیایی یکی از ملزومات افزایش کارایی این ترکیبات در القای مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان دهنده تاثیر قبول و چشمگیر استفاده از ترکیبات شیمیایی ذکر شده به همراه جدایه BI قارچ تریکودرما بر میزان کاهش خسارت نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه فرنگی می‌باشد. این نتایج انجام مطالعات بیشتر به منظور بررسی و شناخت مکانیسم‌های تاثیر این ترکیبات بر افزایش مقاومت میزبان علیه این بیمارگر را توجیه می‌نماید.

ویتامین‌های گروه B شامل تیمامین (ویتامین B1) و ریوفلاوین (ویتامین B2) می‌باشند. نتایج پژوهشی که به منظور بررسی تاثیر چند ترکیب شیمیایی شامل هیومیک اسید، تیمامین، هیدروژن پراکسید، گلوتامیک اسید و فنیل الانین با غلظت‌های مختلف بر کاهش خسارت نماتد *Meloidogyne incognita* در چغندر قند انجام شد، نشان داد که دو تیمار تیمامین و هیومیک اسید با غلظت ۲۰۰۰ppm بیشترین تاثیر را در افزایش شاخص‌های رشدی و میزان آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز و همچنین کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد دارند (Dina et al., 2013). همچنین نتایج پژوهش دیگری که در جهت بررسی تاثیر تیمامین بر القای مقاومت علیه نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne graminicola*) در گیاه برنج صورت گرفت نشان داد که تیمامین با افزایش تولید و تجمع H_2O_2 در گیاه سبب بالا بردن مقاومت شیمیایی گیاه در برابر نماتد می‌گردد و از طرفی با افزایش تولید آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیز سبب افزایش تولید لیگنین در گیاه از مسیر فنیل پروپانویید و به دنبال آن افزایش مقاومت ساختاری گیاه برنج به این بیمارگر می‌شود. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد تیمامین به صورت مستقیم فاقد سمیت بر روی سنن مختلف این نماتد می‌باشد و تاثیر آن بر کاهش خسارت نماتد از طریق القای مقاومت می‌باشد (Huang et al., 2016). همچنین نتایج یک بررسی که در سال ۲۰۰۵ در زمینه بررسی تاثیر تیمامین بر القای مقاومت در گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی انجام شد، نشان داد که این ترکیب سبب القای مقاومت علیه باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در گیاه برنج، القای مقاومت علیه قارچ *Colletotrichum lagenarium* و *Sphaerotheca fuliginea* در گیاه خیار و همچنین القای مقاومت علیه باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در گیاه گوجه فرنگی می‌گردد (Ahn et al., 2005).

در پژوهشی که به منظور بررسی تاثیر چندین تیمار شیمیایی موثر بر مقاومت سیستمیک اکتسابی بر میزان تولید مثل دو نماتد *Meloidogyne javanica* و *Rotylenchulus reniformis* در آناناس انجام شد، تیمار ریوفلاوین سبب کاهش معنی‌دار شاخص‌های بیماری‌زایی این دو نماتد و همچنین افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه میزبان نسبت به تیمار شاهد گردید (Chinnasri and Schmitt, 2006). همچنین در یک بررسی دیگر مشخص شد تیمار گیاه برنج با ریوفلاوین با افزایش سطح بیان ژن لیپواکسی ژناز (LOX) به عنوان یک ژن کلیدی در مسیر اکتادکانوئید سبب بالا بردن سرعت تولید لیگنین و به دنبال آن افزایش مقاومت به بیماری شیت بلایت ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* می‌شود (Taheri and Tarighi, 2010).

پژوهشی دیگر که در سال ۲۰۱۱ با هدف بررسی تاثیر تیمار گیاه

1. Abdel-Monaim, M.F. (2011). Role of riboflavin and thiamine in induced resistance against charcoal rot disease of soybean. *Egyptian Journal of Phytopathology* 39(1): 1-23. <https://doi.org/10.21608/EJP.2011.158587>.
2. Ahn, I.P., Kim, S., & Lee, Y.H. (2005). Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiology* 138(3): 1505-1515. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058693>.
3. Ahn, I.P., Kim, S., Lee, Y.H., & Suh, S.C. (2007). Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology* 143(20): 838-848. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092627>.
4. Al-Hazmi, A.S., & TariqJaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(2): 288-292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>.
5. Aryal, S.K., Davis, R.F., Stevenson, K.L., Timper, P., & Ji, P. (2011). Influence of infection of cotton by *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on the production of enzymes involved in systemic acquired resistance. *Journal of Nematology* 43(3-4): 152-159.
6. Asensi-Fabado, M.A., & Munné-Bosch, S. (2010). Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. *Trends in Plant Science* 15(10): 582-592. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.07.003>.
7. Aver'Yanov, A.A., Lapikova, V.P., Nikolaev, O.N., & Stepanov, A.I. (2000). Active oxygen-associated control of rice blast disease by riboflavin and roseoflavin. *Biochemistry. Biokhimiia* 65(11): 1292-1298.
8. Bernard, G.C., Egnin, M., & Bonsi, C. (2017). The Impact of Plant-Parasitic Nematodes on Agriculture and Methods of Control. *Nematology-Concepts, Diagnosis and Control* 1: 121-151. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.68958>.
9. Boubakri, H., Chong, J., Poutaraud, A., Schmitt, C., Bertsch, C., Mliki, A., Masson, J.E., & Soustre-Gacougnolle, I. (2013). Riboflavin (Vitamin B₂) induces defence responses and resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 136(4): 837-855. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0211-x>.
10. Bradford, Marion M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72.1(2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
11. Bridge, J., & Page, S.L.J. (1980). Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *International Journal of Pest Management* 26(3): 296-298. <https://doi.org/10.1080/09670878009414416>.
12. Chinnasri, B., Sipes, B.S., & Schmitt, D.P. (2006). Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. *Journal of Nematology* 38(3): 319. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.666.22>.
13. Dias, M.A., & Manuela Costa, M. (1983). Effect of low salt concentrations on nitrate reductase and peroxidase of sugar beet leaves. *Journal of Experimental Botany* 34(5): 537-543. <https://doi.org/10.1093/jxb/34.5.537>.
14. Dina, S.S., Ibrahim, A.H., Nour El-Deen, A.E.K., & Fatma, A.M.M. (2013). Induction of systemic resistance in sugar-beet infected with *meloidogyne incognita* by humic acid, hydrogen peroxide, thiamine and two amino acids. *Egypt Journal Agronematol* 12: 22-41.
15. Dong, H., & Beer, S.V. (2000). Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology* 90(8): 801-811. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.801>.
16. FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
17. Fatma, M.A., Khalil, A.E., El Deen, N.A., & Dina, S. (2014). Induction of systemic resistance in sugar-beet against root-knot nematode with commercial products. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 5(3): 37-43. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000236>.
18. Feyisa, B., Lencho, A., Selvaraj, T., & Getaneh, G. (2015). Evaluation of some botanicals and *Trichoderma harzianum* for the management of tomato root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chit Wood). *Advances in Crop Science and Technology* 4(1): 2-10. <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000201>.
19. Ghareeb R.Y., Adss I.A., Bayoumi, S.R., & El-Habashy, D.E. (2019). The nematicidal potentiality of some algal extracts and their role in enhancement the tomato defense genes against root knot-nematodes. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 29(1): 53-63.
20. Gomez-Vasquez, R.O.C.Í.O., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J.R., & Cooper, R.M. (2004). Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany* 94(1): 87-97.
21. Herrera-Parra, E., Ramos-Zapata, J., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suarez, J., & Reyes-Ramírez, A. (2018). Species of *Trichoderma* antagonistic to the root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in habanero peppers. *FYTON* 87: 7-13.
22. Huang, W.K., Ji, H.L., Gheysen, G., & Kyndt, T. (2016). Thiamine-induced priming against root-knot nematode infection in rice involves lignification and hydrogen peroxide generation. *Molecular Plant Pathology* 17(4): 614-624. <https://doi.org/10.1111/mpp.12316>.

23. Jansson, H.B., Jeyaprakash, A., & Zuckerman, B.M. (1985). Control of root-knot nematodes on tomato by the endoparasitic fungus *Meria coniospora*. *Journal of Nematology* 17(3): 327-329.
24. Kato, M., & Shimizu, S. (1987). Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Canadian Journal of Botany* 65(4): 729-735. <https://doi.org/10.1139/b87-097>.
25. Kavari, M., Mahdikhani Moghadam, E., & Rouhani, H. (2014). Survey on chitinase production by several isolates of *Trichoderma* and its biological control effect on tomato root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection* 29(1): 123-133.
26. Kayani, M.Z., Sarwar, G., & Muhammad, S. (2001). Control of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato plants by using root extracts of plants. *Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics* 102(2): 143-146. <https://doi.org/10.30486/IJROWA.2021.1937252.1307>.
27. Leyva, M.O., Vicedo, B., Finiti, I., Flors, V., Del Amo, G., Real, M.D., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2008). Preventive and post-infection control of *Botrytis cinerea* in tomato plants by hexanoic acid. *Plant Pathology* 57(6): 1038-1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01891.x>.
28. Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., & Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. *Jiubao*) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology* 35(3): 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.08.006>.
29. Malamy, J., Sanchez-Casas, P., Hennig, J., Guo, A., & Klessig, D.F. (1996). Dissection of the salicylic acid signaling pathway in tobacco. *Molecular plant-microbe interactions*: MPMI (USA). <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9173>.
30. Navia, D., Delgado, A., Viera, W., Báez, F., & Trevor, J. (2017). Application of Bio-Products in Ecuadorian Agriculture: Case Banana. *International Journal of Clinical and Biological Sciences* 2 (2): 37-43. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120384>.
31. Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry* 40(8): 2016-2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011>.
32. Sahebani, N., Hadavi, N.S., & Zade, F.O. (2011). The effects of β -amino-butyric acid on resistance of cucumber against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(2):443-450. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0564-0>.
33. Scalschi, L., Vicedo, B., Camañes, G., Fernandez-Crespo, E., Lapeña, L., González-Bosch, C., & García-Agustín, P. (2013). Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology* 14(4): 342-355. <https://doi.org/10.1111/mpp.12010>.
34. Sharon, E., Chet, I., Bar-Eyal, M., & Spiegel, Y. (2009). Biocontrol of root-knot nematodes by *Trichoderma*-modes of action. *International Organisation for Biological and Integrated Control Bulletin* 42: 159-163.
35. Singleton, V.L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16(3): 144-158.
36. Szabó, M., Csepregi, K., Gálber, M., Virányi, F., & Fekete, C. (2012). Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. *Biological Control* 63(2): 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.013>.
37. Szabó, M., Urbán, P., Virányi, F., Kredics, L., & Fekete, C. (2013). Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during in vitro nematode egg-parasitism. *Biological Control* 67(3): 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.002>.
38. Taheri, P., & Tarighi, S. (2010). Riboflavin induces resistance in rice against *Rhizoctonia solani* via jasmonate-mediated priming of phenylpropanoid pathway. *Journal of Plant Physiology* 167(3): 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.003>.
39. Vicedo, B., Flors, V., de la O Leyva, M., Finiti, I., Kravchuk, Z., Real, M.D., García-Agustín, P., & González-Bosch, C. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(11): 1455-1465. <https://doi.org/doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1455>.
40. Zhang, S., Yang, X., Sun, M., Sun, F., Deng, S., & Dong, H. (2009). Riboflavin-induced priming for pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(2): 167-174. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00763.x>.
41. Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2014). Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. *BioControl* 59(3): 319-331. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01491>.



The Effect of Sodium Silicate in Inducing Systemic Resistance in Cucumber *Fusarium* Stem and Root Rot

S. Reisi Dehkordi^{1*}, N. Radman², A.H. Taheri³, S.K. Sabbagh⁴

Received: 09-11-2021

Revised: 08-01-2022

Accepted: 06-02-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Reisi Dehkordi, S., Radman, N., Taheri, A.H., & Sabbagh, S.K. (2022). The Effect of Sodium Silicate in Inducing Systemic Resistance in Cucumber *Fusarium* Stem and Root Rot. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 169-182. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/jpp.2022.73517.1059](https://doi.org/10.22067/jpp.2022.73517.1059)

Introduction

One of the most important diseases of cucumber is cucumber stem and root rot by agent *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. The use of resistance inducers, which on the one hand activate the plant's defense mechanisms before confronting the pathogen and on the other hand do not pose environmental risks, has been considered by researchers in recent years. Recently, the use of sodium silicate as a potential activator of acquired resistance is being developed. Sodium silicate plays an important role not only in systemic acquired resistance but also in the expression of genetic resistance and stimulates the production of pathogen-related proteins (markers of systemic acquired resistance). The use of sodium silicate increases the tolerance of plants to environmental stresses and increases the quality and quantity of agricultural products. Hence it modulates the time and amount of plant defense responses and acts as a secondary messenger in induced systemic resistance. The effect of sodium silicate was investigated in order to induce defense reactions in cucumber cultivars and control the disease.

Materials and Methods

First, different concentrations of sodium silicate were applied on the growth of the pathogen in the laboratory. The effect of different concentrations of sodium silicate on pathogen growth was tested by mixing with culture medium. Different concentrations of sodium silicate (1, 2, 4 mM) are each combined in 100 ml of PDA culture medium and poured into 9 cm culture dishes. The percentage of sodium silicate inhibition on fungi is calculated according to the following formula: $N = A - B / A$. The effects of different concentrations of sodium silicate were applied in the soil on cucumber in the greenhouse. At time intervals of 0, 48, 72 and 96 hours after inoculation with pathogen, sampling of treated seedlings was performed to measure secondary metabolites and enzymatic activity. Disease severity, growth factors, production of secondary metabolites and activity of defense enzymes in cucumber plant and thus disease control were evaluated. Disease severity and growth factors were studied in a completely randomized design and Biochemical factors in a completely randomized design with factorial arrangement in which the main factors are the applied treatments and the sub-factors are the sampling times with three replications.

Results and Discussion

Sodium silicate showed a direct antifungal effect on fungal growth after 5 days and by increasing its concentration up to 4 mM caused a significant increase in antifungal effects. A significant decrease in colony diameter compared to the control was observed only at concentrations of 2 and 4 mM. This effect was observed as termination the growth of fungi at 72 hours after cultivation of fungi in culture medium containing sodium silicate. This effect remained stable with increasing incubation time. *Fusarium* fungi are root pathogens and

1 and 2- Ph.D. Student and Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran, respectively.

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

3- Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Associate Professor of Plant Biotechnology, Department of Biolog, University of Yazd, Yazd, Iran

reduce the absorption of water and minerals and clog the vessels, thus directly affecting the growth parameters in the roots and green parts of the plant. Infected control compared to healthy control showed a significant decrease in all growth parameters measured. Disease severity and growth factors were significantly affected by the effects of sodium silicate at a probability level of 1%. Application of sodium silicate in all concentrations had favorable results in significantly reducing the symptoms of the disease. Application of sodium silicate in diseased plants improved growth parameters. The mean value of growth parameters in different treatments and their treatment grouping based on LSD test is done at 5% probability level. Based on the results of this study, a decrease in chlorophyll and carotenoids and an increase in phenolic compounds and antioxidant enzymes and proline were observed in infected control plants compared to healthy controls. In this study, in the presence of sodium silicate in diseased plants, the amounts of pigments, phenol, flavonoids, anthocyanins, proline, protein and the activity of oxidative enzymes were significantly increased compared to the infected control.

Conclusion

According to the results, sodium silicate had direct antifungal effects in culture medium. In addition, a reduction in disease severity was observed in plants treated with sodium silicate in the greenhouse. Sodium silicate can be used as a chemical stimulant of plant defense and plant growth enhancer, for effective protection of cucumber plant against disease. Therefore, induction of resistance has found its place as a new technology for controlling plant diseases and its effect has been proven in laboratories and some farms.

Keywords: Defense enzymes, Disease control, Secondary metabolites, Soil born disease, Systemic resistance



مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۱۸۲-۱۶۹

تأثیر سیلیکات سدیم در القاء مقاومت سیستمیک در خیار مبتلا به پوسیدگی فوزاریومی ساقه و

ریشه

سمیرا رئیسی دهکردی^{۱*} - ناصر رادمان^۲ - عبدالحسین طاهری^۳ - سید کاظم صباغ^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۷

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خیار، پوسیدگی ساقه و ریشه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* می‌باشد. به منظور القای واکنش‌های دفاعی در ارقام خیار و کنترل بیماری فوق اثر سیلیکات سدیم مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا غلظت‌های متفاوتی از سیلیکات سدیم در آزمایشگاه به روی قارچ بیمارگر استفاده شد. اثرات غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم به صورت کاربرد در خاک روی خیار در گلخانه به کار رفت. در بازه‌های زمانی صفر، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از مایه‌زنی با بیمارگر، نمونه‌برداری از گیاهچه‌های تیمار شده برای اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیمی انجام شد. شدت بیماری، فاکتورهای رشدی، تولید متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیم‌های دفاعی در گیاه خیار و در نتیجه کنترل بیماری بررسی شد. بررسی شدت بیماری و فاکتورهای رشدی در قالب طرح کاملاً تصادفی و فاکتورهای بیوشیمیایی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل که در آن فاکتورهای اصلی تیمارهای اعمال شده و فاکتورهای فرعی زمان‌های نمونه‌برداری هستند با سه تکرار انجام شد. سیلیکات سدیم تأثیر ضدقارچی مستقیم بر رشد قارچ بعد از گذشت ۵ روز داشته و با افزایش غلظت آن تا ۴ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌دار اثرات ضد قارچی شد. کاهش قطر پرگنه نسبت به شاهد به صورت معناداری تنها در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌مولار مشاهده شد. قارچ‌های فوزاریومی بیمارگر ریشه بوده و باعث کاهش میزان جذب آب و مواد معدنی و مسدود شدن آوندها می‌شوند، در نتیجه مستقیماً بر پارامترهای رشدی در ریشه و قسمت‌های سبز گیاه اثر می‌گذارند. شاهد آلوده نسبت به شاهد سالم در تمامی پارامترهای رشدی اندازه‌گیری شده کاهش معناداری نشان داد. شدت بیماری و فاکتورهای رشدی تحت تأثیر معنی‌دار اثرات سیلیکات سدیم در سطح احتمال ۱ درصد قرار گرفتند. کاربرد سیلیکات سدیم در تمامی غلظت‌ها نتایج مطلوبی در کاهش معنی‌دار علائم بیماری در پی داشت. کاربرد سیلیکات سدیم در گیاهان بیمار سبب بهبود پارامترهای رشدی شد. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی کاهش میزان کلروفیل و کارتنوئید و افزایش ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و پرولین در شاهد آلوده در مقایسه با شاهد سالم مشاهده شد. در این پژوهش در گیاهان بیمار در حضور سیلیکات سدیم مقادیر رنگدانه‌ها، آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید، پرولین، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی به شکل معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده افزایش یافته است. طبق نتایج به دست آمده، سیلیکات سدیم به عنوان یک محرک شیمیایی دفاع گیاه و افزایش‌دهنده رشد گیاه، برای حفاظت موثر گیاه خیار در برابر عامل بیماری می‌تواند استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های دفاعی، بیماری خاکزاد، کنترل بیماری، متابولیت‌های ثانویه، مقاومت سیستمیک

۱ و ۲- دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

(Email: reisi_samira@yahoo.com)

(*)- نویسنده مسئول

۳- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

مقدمه

خيار یکی از مهم‌ترین گیاهان جالیزی در ایران و بسیاری از کشورها محسوب می‌شود. این محصول چهارمین سبزی مهم جهان پس از گوجه فرنگی، کلم و پیاز است (Eifediya and Remison, 2010). با توجه به شرایط آب و هوایی مناطق مختلف ایران، کشت مداوم این گیاه و همچنین شرایط خاص گلخانه‌ها، این گیاه مورد حمله عوامل مختلف بیماریزا از جمله قارچ‌های خاکزاد قرار می‌گیرد (Tolaei, 2013). بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خيار با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های خيار به شمار می‌آید (Etebarian, 2012). در این بیماری، بیمارگر از ناحیه ریشه و طوقه نفوذ کرده و ضمن پیشروی از طریق آوندهای چوبی باعث پژمردگی و زردی شده و با پیشرفت پوسیدگی در ریشه‌ها، طوقه و ساقه، نهایتاً مرگ گیاه اتفاق می‌افتد.

موفقیت در صادرات محصولات کشاورزی بدون باقیمانده سموم شیمیایی از یک طرف، خطرات زیست محیطی این ترکیبات و کاهش تأثیر آن‌ها به علت ظهور نژادهای مقاوم و هزینه‌های اقتصادی، سبب محدودیت کاربرد آن‌ها به خصوص در کنترل بیماری‌های خاکزاد شده است (Khan et al., 2011). به همین دلیل دستیابی به روش‌های سالم‌تر و ارزان‌تر برای کنترل بیماری‌های گیاهی یک چالش جدی فراروی محققان است. در سال‌های اخیر محققان توجه خود را به سمت تحقیق در باره استفاده از مواد محرک ایجاد مقاومت در گیاه معطوف کرده‌اند (Justyna and Ewa, 2013). استفاده از القاکننده‌های مقاومت که از یک سو سبب فعال سازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه قبل از رویارویی با بیمارگر شوند و از سوی دیگر خطرات زیست محیطی نداشته باشند، در سال‌های اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است.

سیلیسیوم یک عنصر چهار ظرفیتی و دومین عنصر فراوان بعد از اکسیژن در زمین است. سیلیسیوم از عناصر ضروری برای گیاه محسوب نمی‌شود اما کمبود آن سبب کاهش رشد گیاه می‌شود. اثرات مفید این عنصر به دلیل افزایش مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد (Wang et al., 2016). برای اولین بار در گیاه خيار آلوده به بیمارگر و تیمار شده با یون سیلیسیوم افزایش فعالیت کیتینازها، پراکسیدازها، پلی فنل اکسیدازها، فیتوالکسین‌های فلاونوئید گزارش شده است (Chérif et al., 1994). سیلیسیوم بعد از جذب به دلیل رسوب در پهنک برگ، سبب افزایش استحکام برگ، افزایش غلظت کلروفیل در واحد سطح، افزایش توانایی گیاه برای استفاده از نور و در نتیجه باعث افزایش عملکرد می‌گردد (Cameron et al., 2002). اخیراً کاربرد سیلیکات سدیم به عنوان یک فعال کننده بالقوه مقاومت اکتسابی در حال توسعه است. سیلیکات سدیم نه تنها در

مقاومت اکتسابی سیستمیک، بلکه در بیان مقاومت ژنتیکی نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند و تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (نشانگر مقاومت اکتسابی سیستمیک) را تحریک می‌کند (Vlot et al., 2008). کاربرد سیلیکات سدیم تحمل گیاهان به استرس‌های محیطی را افزایش می‌دهد و باعث افزایش کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی می‌شود. از این رو سبب تعدیل زمان و مقدار پاسخ‌های دفاعی گیاه شده و به عنوان یک پیام رسان ثانویه در مقاومت سیستمیک القایی عمل می‌کند (Ma et al., 2013). سیلیسیوم می‌تواند باعث افزایش تولید و کیفیت محصول، افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی، افزایش تولید برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و کاهش حساسیت به بعضی از بیماری‌های قارچی در خيار شود (Kaya et al., 2006). همچنین این عنصر باعث افزایش رشد گیاه، افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت و کاهش میزان ROS در سلول گیاهی می‌شود (Epstein, 1994). در بررسی تیمارهای مختلف زئولیت، سلتیوم و سیلیسیوم مشخص شد که سیلیسیوم می‌تواند در بسیاری از شاخص‌های فیزیولوژیکی پیاز خوراکی مانند کلروفیل، فتوسنتز، درصد ماده خشک و غیره تأثیر مثبت داشته باشد (Bybordi et al., 2018). سیلیکات سدیم سبب القای مقاومت سیستمیک در گیاه خيار علیه بلایت باکتریایی با افزایش آنزیم‌های دفاعی می‌شود (Safdarpour et al., 2013). تعیین اثر سیلیکات سدیم روی خيار در جهت کاهش وقوع بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه و تعیین و اندازه‌گیری تغییرات شاخص‌های بیماری، عملکردی، متابولیت‌های ثانویه، آنزیم‌های دفاعی در مقابل این بیماری از دیگر اهداف این تحقیق است.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های آزمایشگاهی اثرات مستقیم سیلیکات سدیم

روی قارچ عامل بیماری

آزمون اثر غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر رشد بیمارگر به روش اختلاط با محیط کشت انجام شد. غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم (۱، ۲، ۴ میلی‌مولار) هر کدام در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA ترکیب و در ظروف‌های کشت ۹ سانتی‌متری ریخته شد (Safdarpour et al., 2013). سپس یک قطعه ۵ میلی‌متری از کشت ۴ روزه قارچ در وسط هر کدام از آن‌ها قرار داده شد. آزمایش زمانی که پرگنه قارچ تمام سطح تشتک پتری شاهد را فرا گرفته بود، متوقف شد و درصد بازدارندگی سیلیکات سدیم روی قارچ طبق فرمول زیر محاسبه گردید. $N = A - B/A$ = درصد بازدارندگی
A = قطر یا شعاع رشد پرگنه شاهد =
B = قطر یا شعاع رشد پرگنه بیمار
این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای

هر غلظت، انجام و ارزیابی شد (Safdarpour et al., 2013).

بررسی‌های گلخانه‌ای القای مقاومت توسط سیلیکات سدیم در برابر بیماری

از بذور خیار رقم نگین برای کاشت در گلدان استفاده شد. گیاهان از مرحله‌ای که اولین برگ اصلی به خوبی رشد کرده بود تا-پایان آزمایش (مرحله‌ی ۴ برگ‌ی) با محلول سیلیکات سدیم (۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار) تیمار شدند (Safdarpour et al., 2013). سیلیکات سدیم هر دو روز یک بار همراه آب آبیاری به هر گلدان اضافه شد. بعد از استفاده از هر کدام از تیمارها مایه زنی گیاهان با قارچ صورت گرفت. جهت مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار با بیمارگرها ابتدا خاک کنار طوقه و ریشه گیاهچه‌ها در مرحله دو تا سه برگ‌ی حقیقی کنار زده شده و مطابق روش بنهامو و بلانجر یک پلاک قارچ به قطر نیم سانتی متر از محیط کشت پنج روزه قارچ بیماریزا در تماس مستقیم با طوقه و ریشه گیاه قرار داده شد و در گلدان‌های شاهد نیز به همین روش یک پلاک محیط کشت بدون قارچ به قطر نیم سانتی متر در تماس مستقیم با طوقه و ریشه گیاهان قرار داده شد (Benhamou and Blanger, 1998).

ارزیابی شدت بیماری و شاخص‌های عملکردی

بعد از مایه‌زنی، با بازدیدهای مرتب، علائم مشاهده شده بررسی و یادداشت برداری شدند. سی روز پس از آلوده سازی و ظهور کامل علائم شاخص شدت بیماری، وزن تازه و خشک ساقه و ریشه، طول گیاهچه در تیمارهای مختلف ارزیابی شد. شاخص شدت بیماری بر علیه قارچ پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه بر اساس امتیاز دهی صفر تا ۴ تعیین می‌شود (Vakalounakis, 1996). بررسی‌های آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های مقاومت القایی گیاه در شرایط آزمایشگاه

طبق بررسی‌های وون لون و همکاران بین تیمار القا کننده و فعال شدن واکنش‌های دفاعی فاصله زمانی ۲۴ تا ۴۸ ساعت وجود دارد. از این رو نمونه برداری‌ها دو روز بعد از مایه زنی شروع می‌شود. نمونه برداری در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح با بیمارگر از گیاهان صورت گرفت (Van Loon et al., 1998).

اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: استخراج کلروفیل و کارتنوئید با استون ۸۰ درصد و اندازه‌گیری آن طبق روش آرنون (Arnon, 1967) انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین استخراج با متانول اسیدی و از روش وگنر استفاده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از رابطه $A = \varepsilon BC$ استفاده گردید. در

این فرمول A میزان جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر، (ε) ضریب خاموشی برابر ۱-1cm-1 mM-۳۳۰۰۰، B قطر کوت (۱cm) و C غلظت آنتوسیانین بر حسب mM می‌باشد (Wagner, 1979). به منظور سنجش مواد فنولی بر اساس گالیک اسید در هر گرم وزن تر برگ از معرف کربنات سدیم و فولین که روش پیشنهادی سیورز و همکاران است استفاده گردید (Seevers et al., 1971). به‌منظور اندازه‌گیری پرولین از روش بیتس استفاده شد (Bates et al., 1973). برای رسم منحنی استاندارد از پرولین خالص با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکرومولار استفاده و تمام مراحل کار روی آن انجام گردید. سپس منحنی استاندارد پرولین رسم و مقدار پرولین محلول با کمک این نمودار و بر اساس فرمول زیر بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ بدست آمد $X = [(A * B) / C] / (D / 5)$. مقدار پرولین به‌دست آمده از منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر B: مقدار تولون استفاده شده بر حسب میلی‌لیتر، C: عدد مولکولی پرولین و D: مقدار نمونه گیاهی بر حسب گرم. اندازه‌گیری فلاونوئیدها با اسپکتروفتومتر و با استفاده از روش کریزک و همکاران انجام شد. میزان فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس میلی گرم معادل کوئرستین بر گرم وزن تر گیاه گزارش گردید. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین متانولی در غلظت‌های $100-250 \mu\text{g. ml}^{-1}$ تهیه شد (Krizek et al., 1993).

روش عصاره‌گیری برای اندازه‌گیری میزان پروتئین و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

جهت عصاره‌گیری از بافر فسفات پتاسیم استفاده شد و نمونه تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Reuveni, 1995).

روش اندازه‌گیری میزان پروتئین کل: جهت تعیین فعالیت آنزیم به واحد میلی گرم پروتئین موجود در بافت گیاه، میزان پروتئین کل موجود در عصاره نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد محاسبه گردید. غلظت تام پروتئینی بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد تهیه شده، محاسبه شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD): ابتدا بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میکرو مولار به مقدار ۴۸۰ میکرولیتر، ۱ سی سی گایاکول ۱٪، ۱ سی سی آب اکسیژنه ۰/۳ میلی مولار و یا ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ترتیب با یکدیگر مخلوط شدند (Fielding and Hall 1978). میزان جذب آب اکسیژنه در عصاره آنزیمی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر در زمان یک دقیقه قرائت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک

جهت بررسی تغییرات بیوشیمیایی از پنج تیمار شامل غلظت‌های ۱، ۲ و ۴ میلی‌مولار سیلیکات سدیم، شاهد سالم و شاهد آلوده در قالب طرح فاکتوریل 4×5 بر پایه کاملاً تصادفی که شامل ۵ تیمار و ۴ روز نمونه‌برداری بود، استفاده شد. هر تیمار شامل ۳ تکرار بود. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفته و مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید.

نتایج

اثر سیلیکات سدیم بر رشد قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه

سیلیکات سدیم تاثیر ضدقارچی مستقیم بر رشد قارچ بعد از گذشت ۵ روز داشته و با افزایش غلظت آن تا ۴ میلی‌مولار موجب افزایش معنی‌دار اثرات ضد قارچی گردید. کاهش قطر پرگنه نسبت به شاهد به صورت معناداری تنها در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۱). این تاثیر به صورت توقف رشد قارچ در ۷۲ ساعت بعد از کشت قارچ‌ها در محیط کشت حاوی سیلیکات سدیم بود و با افزایش زمان نگهداری این تاثیر همچنان پایدار ماند. سیلیکات سدیم دارای اثر مستقیم ضد قارچی است. سیلیکات سدیم به علت افزایش PH محیط کشت از رشد قارچ جلوگیری می‌کند (Shen et al., 2010). مطالعات قبلی نشان داده است که سیلیکون به هر دو فرم سدیم سیلیکات و پتاسیم سیلیکات، قادر است از رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کند (Wang et al., 2017). در شکل ۱ اثر غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم در محیط کشت روی قارچ عامل بیماری مشاهده می‌شود.

تاثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر شدت بیماری و فاکتورهای رشدی در شرایط گلخانه

قارچ‌های فوزاریومی بیمارگر ریشه بوده و باعث کاهش میزان جذب آب و مواد معدنی و مسدود شدن آوندها می‌شوند، در نتیجه مستقیماً بر پارامترهای رشدی در ریشه و قسمت‌های سبز گیاه اثر می‌گذارند. شاهد آلوده نسبت به شاهد سالم در تمامی پارامترهای رشدی اندازه‌گیری شده کاهش معناداری نشان داد. شدت بیماری و فاکتورهای رشدی تحت تاثیر معنی‌دار اثرات سیلیکات سدیم در سطح احتمال ۱ درصد قرار گرفتند. کاربرد سیلیکات سدیم در تمامی غلظت‌ها نتایج مطلوبی در کاهش معنی‌دار علائم بیماری در پی داشت (شکل ۲).

دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $1\text{mM}-1\text{Cm}-1$ است تقسیم شد (Nakano and Asada, 1981).

ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPO^۱): ابتدا بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میکرو مولار به میزان ۲/۵۰ سی سی با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و سپس با ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل ۲۰ میلی‌مولار مخلوط شد. میزان جذب نوری در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت گردید (Janovitz-Klapp et al., 1990).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز (PAL^۲): مخلوط واکنش با حجم نهایی دو میلی‌لیتر شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم، ۴۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۶ مولار واکنش فوق متوقف شده و میزان جذب در ۲۹۰ نانومتر خوانده شد (Sahebani, 2004).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT^۳): ابتدا ۲/۸ سی سی از بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میکرو مولار را با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و سپس با ۳۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار مخلوط می‌کنیم. سپس جذب محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها بلافاصله بعد از قرار داده شدن در دستگاه و بعد از گذشت یک دقیقه برای بار دوم ثبت شد. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر $39/4\text{mM}-1\text{Cm}-1$ تقسیم شد (Beers and Sizer, 1952).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX^۴): ابتدا بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میکرو مولار به حجم ۲/۵ سی سی را با ۳۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار مخلوط کرده و به محلول حاصل ۳۰ میکرولیتر EDTA^۵ ۰/۱ میلی‌مولار اضافه نمودیم. ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و سپس ۳۰ میکرولیتر آب اکسیژنه-۰/۱۵ میلی‌مولار به محلول حاصل اضافه گردید. جذب محلول در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از یک دقیقه توقف دوباره جذب خوانده شده و اختلاف جذب محاسبه و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8\text{mM}-1\text{Cm}-1$ عدد نهایی گزارش گردید (Yoshimura et al., 2000).

تجزیه آماری داده‌ها

- 1- Polyphenol oxidase
- 2- phenyle alanin amonylyase
- 3- Catalase
- 4- Ascorbate peroxidase
- 5- Ethylenediaminetetraacetic acid

جدول ۱- تاثیر سیلیکات سدیم بر رشد قارچ در محیط کشت

Table 1- The effect of sodium silicate on fungal growth in culture medium

غلظت سیلیکات سدیم Sodium silicate Concentration (mM)	قطر پرگنه Colony Diameter (cm)
0	8.3a
1	8.1a
2	6.8b
4	5.6c

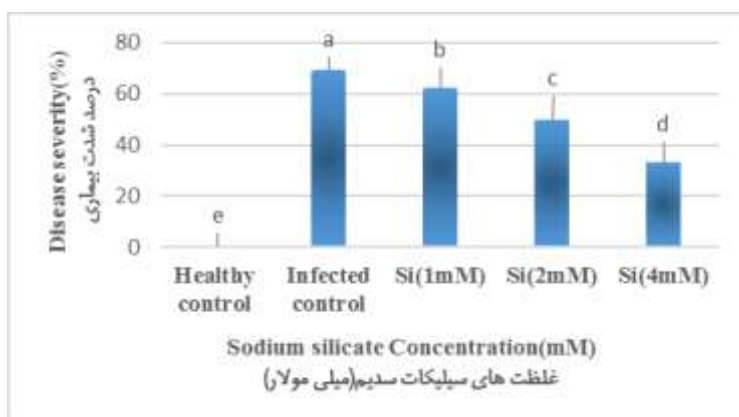


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر رشد قارچ در محیط کشت

تشک‌های پتری شاهد (A)، سیلیکات سدیم ۱mM (B)، سیلیکات سدیم ۲mM (C)، سیلیکات سدیم ۴mM (D)

Figure 1- Effect of different concentrations of sodium silicate on fungal growth in culture medium

Control (A), 1mM Sodium silicate (B), 2mM Sodium silicate (C), 4mM Sodium silicate (D).



شکل ۲- مقایسه میانگین شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه در غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم

Figure 2- Comparison of mean severity of *Fusarium* wilt disease of stem and root in different concentrations of sodium silicate

تفاوت معنی‌دار در تمام پارامترهای اندازه‌گیری با شاهد آلوده بود و روند افزایشی را نشان داد. تمامی فاکتورهای اندازه‌گیری در غلظت ۲ میلی‌مولار میزان بیشتری را نسبت به غلظت ۱ میلی‌مولار نشان دادند و دارای تفاوت‌های معنی‌داری بودند. در غلظت ۴ میلی‌مولار به غیر از وزن تر ریشه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، همین شرایط نسبت به غلظت ۲ میلی‌مولار حاکم است. بیشترین تاثیر در تیمار ۴ میلی‌مولار این ماده مشاهده شد.

کاربرد سیلیکات سدیم در گیاهان بیمار سبب بهبود پارامترهای رشدی شد. میانگین مقدار پارامترهای رشدی در تیمارهای مختلف و گروه‌بندی تیماری آن‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد نشان داده شده است (جدول ۲). مطابق نتایج به دست آمده، تیمار ۱ میلی‌مولار سیلیکات سدیم تنها در وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه اختلاف معنی‌دار با شاهد آلوده نشان داد و روند افزایشی مشاهده شد. تیمار ۲ و ۴ میلی‌مولار سیلیکات سدیم باعث ایجاد

جدول ۲- تاثیر کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر فاکتورهای رشدی در شرایط گلخانه

Table 2- The effect of application of different concentrations of sodium silicate on growth factors in greenhouse conditions

Treatments	ارتفاع اندام هوابی Shoot height (cm)	ارتفاع ریشه Root height(cm)	ارتفاع گیاهچه Seedling height (cm)	وزن تر اندام هوابی Shoot wet weight (gr)	وزن تر ریشه Root wet weight (gr)	وزن خشک اندام هوابی Shoot dry weight (gr)	وزن خشک ریشه Root dry weight (gr)
شاهد سالم Healthy control	28.53 ^b	13.33 ^b	41.87 ^b	29.04 ^b	4.75 ^b	2.86 ^b	0.71 ^a
شاهد بیمار Infected control	17.77 ^d	7.70 ^d	25.47 ^d	15.29 ^e	2.22 ^d	1.61 ^c	0.34 ^b
سیلیکات سدیم (۱ میلی مولار) Si(1mM)	18.47 ^d	8.30 ^d	26.77 ^d	19.13 ^d	2.77 ^c	1.75 ^c	0.40 ^b
سیلیکات سدیم (۲ میلی مولار) Si(2mM)	24.50 ^c	12.10 ^c	36.60 ^c	26.83 ^c	4.97 ^{ab}	2.95 ^{ab}	0.74 ^a
سیلیکات سدیم (۴ میلی مولار) Si(4mM)	31.00 ^a	15.17 ^a	46.17 ^a	30.43 ^a	5.27 ^a	3.14 ^a	0.78 ^a

میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD اختلاف معنی داری ندارند.

Means within each column followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.05$, using LSD test.

بررسی اثر کاربرد غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر واکنش‌های دفاع بیوشیمیایی و تغییرات میزان متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها

میزان رنگدانه‌ها: در زمان تلقیح قارچ عامل بیماری (اولین زمان نمونه‌برداری) در گیاهان شاهد سالم و آلوده مقدار برابری در میزان رنگدانه‌ها مشاهده شد. اما کاهش مقدار کلروفیل بر اثر مایه‌زنی بیمارگر در مقایسه با شاهد سالم در زمان‌های نمونه‌برداری مشاهده گردید. در شاهد سالم با گذر زمان میزان هر سه نوع کلروفیل و کارتنوئید افزایش یافت که به دلیل ادامه روند رشد و تکامل در گیاه می باشد اما در شاهد آلوده با گذشت زمان میزان آن‌ها کاهش پیدا کرد که دلیل این امر گسترش بیماری در گیاه است. در گیاهان بیمار تیمار شده با سیلیکات سدیم، میزان این پارامترها نسبت به شاهد بیمار در تمامی غلظت‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری (غیر از زمان تلقیح) بیشتر بود و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. در تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم در حضور بیمارگر با افزایش غلظت سیلیکات سدیم با گذشت زمان مانع از کاهش میزان رنگدانه‌ها می شود و در مواردی افزایش میزان آن‌ها مشاهده گردید (جدول ۳).

میزان کلروفیل کل در گیاهان تیمار در حضور بیمارگر به همراه غلظت‌های ۴- میلی‌مولار سیلیکات سدیم در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ ساعت نمونه‌برداری نسبت به شاهد سالم به شکل معنی‌داری کاهش داشت. همین روند در مورد کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید در غلظت ۴ میلی‌مولار و زمان ۹۶ ساعت مشاهده شد. در تیمار با غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم در حضور بیمارگر با افزایش غلظت سیلیکات سدیم با گذشت زمان مانع از کاهش میزان رنگدانه‌ها

می‌شود و در مواردی افزایش میزان آن‌ها مشاهده شد (جدول ۳). بررسی میزان ترکیبات فنلی (ترکیبات فنلی کل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین): اثرات متقابل زمان و غلظت سیلیکات سدیم بر میزان تولید این سه ترکیب در گیاه نشان داده شده است (جدول ۳).

فنل: بین تیمارهای مختلف، بین روزهای نمونه‌برداری و اثر متقابل آنها از نظر مقدار ترکیبات فنلی کل در برگ‌ها تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ وجود داشت. میزان ترکیبات فنولی در گیاهان تیمار شده با سیلیکات سدیم بطور معنی‌داری بیشتر از میزان آن در شاهد آلوده و سالم بود اما بیشترین مقدار آن در غلظت ۴ میلی‌مولار در تمامی زمان‌ها گزارش شد. مقدار این ترکیبات در شاهد آلوده با گذشت ۴۸ ساعت از زمان تلقیح نسبت به شاهد سالم افزایش معنی‌داری نشان داد. بیشترین تجمع ترکیبات فنلی در شاهد آلوده، در روز چهارم بود. در تمام زمان‌های نمونه‌برداری (غیر از زمان تلقیح) میزان ترکیبات فنلی در شاهد آلوده بیشتر از شاهد سالم بود و اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در تمام گیاهان بیمار همراه با سیلیکات سدیم با گذر زمان تا ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، مقدار این ترکیبات افزایش یافت و اما در زمان ۹۶ ساعت کاهش نسبت به زمان قبلی دیده شد.

فلاونوئید: بیشترین تجمع فلاونوئیدها در شاهد آلوده، در روز سوم و در گیاهان آلوده همراه با سیلیکات سدیم در روز چهارم بعد از تلقیح بیمارگر بود. افزایش غلظت سیلیکات سدیم تاثیری در تجمع فلاونوئید در زمان‌های ابتدایی بعد از تلقیح نداشت، تنها با گذشت ۹۶ ساعت از تلقیح میزان فلاونوئید با افزایش غلظت تیمار تا ۴ میلی‌مولار افزایش یافت که میزان فلاونوئید در هر غلظت پس از ۹۶ ساعت نسبت به ۷۲ ساعت اختلاف معناداری نشان داد (جدول ۳).

اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳). بالاترین میزان پرولین در تیمار سیلیکات سدیم ۴ میلی‌مولار و ۹۶ ساعت بعد از تلقیح قارچ عامل بیماری گزارش شد. پرولین در همه تیمارها جز تیمار شاهد سالم، ۴۸ ساعت پس از تلقیح قارچ عامل بیماری افزایش یافت اما تنها در غلظت ۲ و ۴ میلی‌مولار این افزایش معنی‌دار بود. میزان پرولین در گیاهان تیمار شده با سیلیکات سدیم بطور معنی‌داری بیشتر از میزان آن در شاهد آلوده و سالم بود.

آنتوسیانین: نتایج نشان داد که بیشترین مقدار آنتوسیانین در زمان ۹۶ ساعت بعد از تلقیح قارچ و غلظت ۴ میلی‌مولار بوده است. غلظت‌های مختلف در زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۳).

پرولین: نتایج ارزیابی مقدار پرولین در بوته‌های آلوده خیار تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم نشان داد که بین تیمارها و نیز فواصل زمانی نمونه‌برداری و میزان پرولین در سطح ۵ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر صفات فیزیولوژیک در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری
Figure 3- Comparison of mean effects of different concentrations of sodium silicate on physiological characteristics at different sampling times

Treatment	زمان Time (h)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg g ⁻¹ F.w)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg g ⁻¹ F.w)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg g ⁻¹ F.w)	کارتنوئید Carotenoid (mg g ⁻¹ F.w)	آنتوسیانین Anthocyanin (μmol g ⁻¹ F.w.)	پرولین Prolin (μmol g ⁻¹ F.w.)	فنل Phenol (mg g ⁻¹ F.w)	فلاونوئید Flavonoid (mg g ⁻¹ F.w)
شاهد سالم Healthy control	0	0.98900g	0.41300fge	1.4030ehfg	0.46867fg	3.3630p	2.42000jhi	0.24500l	1.6507gfe
	48	1.15233c	0.41767fde	1.5700ecd	0.46667hg	3.5753n	2.40000j	0.25633l	1.5950gfh
	72	1.25833b	0.42967cb	2.3550b	0.48233cd	3.5857n	2.44967h	0.27900lk	1.6340gf
	96	1.33033a	0.44233a	2.7733a	0.55433a	3.6863m	2.41000ji	0.30167jk	1.3063i
شاهد بیمار Infected control	0	0.98700g	0.41200fge	1.3993ehfg	0.45933i	3.4540 o	2.43967hi	0.26767lk	1.6010gfh
	48	0.88667h	0.40067h	1.2877hfg	0.43067j	4.2723k	2.44967h	0.59533i	1.6787fe
	72	0.86067h	0.37100i	1.2323hg	0.42800jk	4.8077i	2.49933g	0.80467h	1.9173b
	96	0.85500h	0.35167j	1.2073h	0.42367k	5.3027g	2.50900g	1.08733f	1.8620bc
Si(1mM)	0	0.99233g	0.42967cb	1.4227ehfg	0.47900ed	3.6460mn	2.55900efd	0.27900lk	1.5453h
	48	0.96400g	0.42667cd	1.3917ehfg	0.46067hi	4.4943j	2.56900ecd	1.03633g	1.7230de
	72	0.95533g	0.41033fg	1.3660ehfg	0.45900i	4.7673i	2.50933g	1.38667d	1.6507gfe
	96	1.09967ed	0.40733gh	1.5077ecfd	0.46700hg	5.5147f	2.54900ef	1.26767e	1.9007b
Si(2mM)	0	0.99600g	0.43867ab	1.4350ehfdg	0.46033hi	3.9087l	2.57900ecd	0.31867j	1.7783dc
	48	1.04267f	0.42000de	1.4630ecfdg	0.46100hi	5.1307h	2.67900b	1.05333fg	1.6563fe
	72	1.08133fed	0.41667fe	1.4987ecfd	0.47433ef	5.8077e	2.52900fg	1.56733b	1.5673gh
	96	1.07967fe	0.41300fge	1.4930ecfd	0.48567cd	6.6663c	2.67900b	1.35833d	2.1897a
Si(4mM)	0	1.12667cd	0.44367a	1.5710ecd	0.47900ed	4.4337j	2.59900c	0.32433j	1.7330de
	48	1.16400c	0.43500cab	1.5990ecd	0.48667c	6.1103d	2.82900a	1.23400e	1.6340gf
	72	1.25000b	0.43033cb	1.6807cd	0.48067ecd	6.9490b	2.58933cd	1.63500a	1.5177h
	96	1.27000b	0.43167cb	1.7023c	0.50667b	8.2117a	2.83900a	1.52200c	2.2063a
LSD (P =0/05)		0.0456	0.009	0.2528	0.0069	0.0877	0.0358	0.0373	0.087

میزان تغییرات برای غلظت ۴ میلی‌مولار روند افزایشی بیشتری داشته است. در تمام غلظت‌ها میزان پروتئین کل مربوط به نمونه‌های شاهد سالم و آلوده کمتر از تیمارهای مربوط به کاربرد سیلیکات سدیم مشاهده گردید. با افزایش غلظت سیلیکات سدیم در تمام زمان‌های نمونه‌برداری میزان پروتئین بیشتری در گیاهان بیمار گزارش شد. در تحقیق حاضر افزایش میزان پروتئین در گیاهان بیمار نسبت به شاهد سالم مشاهده شد.

بررسی میزان پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم
نتایج ارزیابی میزان پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در جدول ۴ آمده است.

پروتئین کل: بیشترین مقدار پروتئین کل در گیاهان بیماری که با سیلیکات سدیم تلقیح شده بودند در غلظت ۴ میلی‌مولار و در ۹۶ ساعت پس از تلقیح عامل بیماریزا بود، ولی در تمام بازه‌های زمانی

نمونه‌هایی که فقط با عامل بیماری‌زا مایه‌کوبی شده بودند پایین‌تر از نمونه‌هایی که هم با سیلیکات سدیم و هم با بیمارگر تلقیح شده بودند است. با افزایش غلظت تیمار و دفعات نمونه‌برداری مقدار این آنزیم نیز افزایش می‌یابد.

بحث

تنوع بالای مسیر پاسخ‌های دفاعی گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا و پیچیدگی و ابهامات جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دفاع گیاهان باعث شده است که همچنان بسیاری از زوایای پاسخ‌های دفاعی گیاهان و مسیرهای مستقیم آن ناشناخته باقی بماند. بنابراین القا مقاومت به عنوان یک تکنولوژی جدید جهت کنترل بیماری‌های گیاهی جایگاه خود را پیدا کرده و تاثیر آن در آزمایشگاه و برخی مزارع به اثبات رسیده است. سیستم یک پارچه دفاعی توسط تحریک همزمان چندین آنزیم دفاعی توسط تحریک کننده‌های به کاررفته آغاز می‌شود. در ارتباط با کاهش و افزایش این ترکیبات در میزبان‌ها نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به دست آمده است که این می‌تواند ناشی از طبیعت و نحوه تحریک متفاوت سیستم‌های دفاعی میزبان به وسیله عوامل القا کننده مقاومت باشد (*Agrawal et al., 2002*). در این تحقیق نقش سیلیکات سدیم به عنوان یک محرک خارجی در القا مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه مورد بررسی قرار گرفت. رنگدانه‌ها، ترکیبات فنلی، پرولین و آنزیم‌های دفاعی در طول فعل و انفعالات میزبان-بیمارگر دستخوش تغییرات شده و این مقاومت سیستمیک گیاه را در بر خواهد داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که سیلیکات سدیم دارای اثرات ضد قارچی مستقیمی در محیط کشت بوده است که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (*Shen et al., 2010*). کاهش شدت بیماری در گیاهان تیمار شده با سیلیکات سدیم در گلخانه می‌تواند به علت رسوب سیلیسیوم در دیواره سلول‌های اپیدرمی (*Shahrtash, 2018*) یا به دلیل خاصیت ضد میکروبی روی بیمارگر و یا فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی وابسته به پروتئین‌های بیماری‌زایی در گیاه باشد. تیمار گیاه سالم و آلوده با سیلیکون رشد گیاه خیار را بهبود می‌بخشد. بهبود رشد گیاه به توانایی یون‌های سیلیسیوم در متعادل کردن جذب، افزایش انتقال و پخش مواد غذایی بر می‌گردد (*Marschner et al., 1990*). در تحقیق حاضر کاهش در میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش در ترکیبات فنلی، پرولین و آنزیم‌های دفاعی در گیاهان بیمار نسبت به گیاهان سالم مشاهده شد. کاهش مشاهده شده در میزان کلروفیل و کارتنوئید گیاهان خیار بیمار احتمالاً به علت صدمه به ساختارهای غشایی مانند غشای تیلاکوئیدی و تغییر در بیان پروتئین‌های متصل به کلروفیل است (*Bonfig et al., 2006*). در شرایط تنش، غلظت تنظیم کننده‌های رشد مانند اسید آبسسیک و

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت این آنزیم در حضور بیمارگر نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته بود. در حالی که فعالیت پراکسیداز در نمونه‌هایی که فقط با عامل بیماری‌زا مایه‌کوبی شده بودند پایین‌تر از نمونه‌هایی که هم با سیلیکات سدیم و هم با بیمارگر تلقیح شده بودند است. با افزایش غلظت سیلیکات سدیم فعالیت پراکسیداز در تمام تیمارهای آزمایش افزایش یافت. فعالیت پراکسیداز در تیمارهایی که سیلیکات سدیم دریافت کرده بودند به تدریج با گذشت زمان افزایش یافت و به بالاترین سطح خود در ۷۲ ساعت پس از تلقیح رسید. تنها در تیمار ۴ میلی‌مولار سیلیکات سدیم حداکثر مقدار فعالیت پراکسیداز در ۹۶ ساعت بعد از تلقیح عامل بیماری‌زا مشاهده شد.

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز: بیشترین مقدار آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاهان بیماری که با سیلیکات سدیم تلقیح شده بودند در غلظت ۴ میلی‌مولار و در ۹۶ ساعت پس از تلقیح عامل بیماری‌زا بود. ولی در تمام بازه‌های زمانی میزان تغییرات برای غلظت ۴ میلی‌مولار روند افزایشی بیشتری داشته است. در تمام غلظت‌ها میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز مربوط به نمونه‌های شاهد سالم و آلوده کمتر از تیمارهای مربوط به کاربرد سیلیکات سدیم در حضور بیمارگر مشاهده گردید. با افزایش غلظت سیلیکات سدیم در تمام زمان‌های نمونه‌برداری میزان آنزیم پلی فنل اکسیداز بیشتری در گیاهان بیمار گزارش شد.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایاز: میزان فعالیت این آنزیم در شاهد آلوده بیشتر از شاهد سالم مشاهده شد. در گیاهان بیمار با گذشت زمان و پیشرفت بیماری مقدار این آنزیم زیاد می‌شود. در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت با افزایش غلظت سیلیکات سدیم فعالیت آن افزایش می‌یابد اما در زمان ۹۶ ساعت با افزایش غلظت الیسیستور مقدار آنزیم کاهش می‌یابد. با افزایش رسوب مواد فنلی و لیگنین در دیواره سلولی گیاه، تولید این مواد به دلیل عدم توسعه این بیماری و عدم ایجاد سیگنال‌های محرک بعد از روز سوم کاهش می‌یابد و این کاهش بیانگر این است که محدود شدن عامل بیماری سبب عدم تحریک فعالیت‌های دفاعی شده است.

فعالیت آنزیم کاتالاز: تغییر فعالیت این آنزیم در تمام تیمارها در نمونه‌برداری‌های مختلف از روند مشخص کاهشی یا افزایشی پیروی نمی‌کند و دارای نوسان است اما بعد از گذشت ۹۶ ساعت از تلقیح عامل بیماری‌زا به حداکثر مقدار خود در تمامی تیمارهای آزمایشی رسید. بیشترین مقدار این آنزیم در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری در غلظت ۴ میلی‌مولار مشاهده شد. بین شاهد سالم و آلوده تفاوت معنی‌داری در مقدار آنزیم مشاهده نشد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت این آنزیم در حضور بیمارگر تنها بعد از گذشت ۹۶ ساعت از تلقیح عامل بیماری‌زا نسبت به گیاهان سالم افزایش یافته بود. در حالی که فعالیت این آنزیم در

گیاهان بیمار مشاهده شد که افزایش میزان کلروفیل و کارتنوئید در گیاهان بیمار شده با یون سیلیسیم بخصوص همراه بیمارگر ممکن است به علت رسوب سیلیکون در دیواره‌ی سلول‌ها و استحکام بیشتر سلول‌ها، قرار گیری بهتر برگ‌ها در برابر نور و افزایش دریافت نور در واحد سطح، دوام سطح برگ و حفظ کلروفیل برگ باشد.

اتیلن افزایش می‌یابد که تحریک کننده آنزیم کلروفیل‌لاز هستند و به این ترتیب کلروفیل تحت تأثیر این آنزیم تجزیه می‌شود (Orabi et al., 2010). افزایش سایر شاخص‌ها در گیاهان بیمار به علت نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان است. در گیاهان بیمار تیمار شده با سیلیکات سدیم افزایش در میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی نسبت به

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات غلظت‌های مختلف سیلیکات سدیم بر پروتئین و آنزیم‌های اکسیدانی در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری
Figure 4- Comparison of mean effects of different concentrations of sodium silicate on protein and oxidative enzymes at different sampling times

Treatment	زمان Time (h)	پروتئین کل Total Protein (mg g ⁻¹ F.w)	پلی فنل اکسیداز PPo (unit/min/mg protein)	گایاکول پراکسیداز GPX (μm min ⁻¹ g ⁻¹ FM)	آسکوربات پراکسیداز APX (μm min ⁻¹ g ⁻¹ FM)	کاتالاز CAT (μmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	فنیل آلانین آمونیا لیاژ PAL (unit/mg protein)
شاهد سالم Healthy control	0	0.98900n	17.147kl	0.88000m	0.32267jk	3.5360i	12.713l
	48	0.96067n	18.170k	0.94667lk	0.36833fe	3.7967gh	12.627l
	72	1.09400ml	18.003kl	0.98400jk	0.38567d	3.8093gh	15.917jki
	96	1.16400k	19.350j	1.06400hi	0.33167jki	3.8027gh	14.997k
شاهد بیمار Infected control	0	1.06567m	17.790kl	0.88533m	0.31867k	3.7453gh	13.287l
	48	1.12900kl	22.573i	1.10667h	0.33300jki	3.7070ih	15.743jk
	72	1.16900k	26.770h	1.25600g	0.36433fg	3.7623gh	16.837jhi
	96	1.35733j	31.017g	1.36267f	0.35033hg	3.8817gh	16.837jhi
Si(1mM)	0	1.65233i	17.037l	1.01333ji	0.33233jki	3.9140g	15.563k
	48	1.67067ih	26.233h	1.33333f	0.32767jki	4.3050fe	16.883hi
	72	1.74733g	32.307f	1.56533d	0.33600jhi	4.3390fe	19.293ef
	96	1.7173gh	37.737e	1.47467e	0.36833fe	4.2177f	20.697cd
Si(2mM)	0	1.62233i	17.900kl	1.07800hi	0.34167hi	4.5550dc	17.627hg
	48	1.84900f	31.610fg	1.36533f	0.33533jhi	4.4763de	19.820ed
	72	2.00233e	37.738e	1.74400c	0.38100de	4.2753fe	22.147b
	96	2.05567d	42.900c	1.72533c	0.41333c	4.7390bc	20.170ecd
Si(4mM)	0	1.83567f	19.563j	1.30933fg	0.40700c	4.8050b	18.020g
	48	2.22067c	39.510d	1.33333f	0.41200c	5.1897a	20.960c
	72	2.47067b	47.147b	1.85067b	0.48733b	4.6940bc	24.863a
	96	2.81567a	54.563a	2.10133a	0.5493a	5.1983a	19.160ef
LSD (P = 0/05)		0.0511	1.0689	0.0652	0.0153	0.205	1.1001

فنیل پروپانویید سنتز می‌شود. تغییر در مسیر سنتز این ترکیب نیز در طی پیش تیمار سیلیکات سدیم می‌تواند یکی از دلایل تغییر در مقدار ترکیبات فنلی باشد. فنل‌ها دارای اثرات ضد میکروبی هستند و در فرایند چوبی شدن، ساخت فیتوآلکسین‌ها، پیش ماده پلیمرهای ساختاری و یا مولکول‌های علامت دهنده نقش دارند (Alonso-Villaverde et al., 2011). در گیاهان پیش از آنکه سیستم آنزیمی وارد عمل شود، فلاونوئیدها دست به کار شده و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی به طور مستقیم در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کند. خواص آنتی اکسیدانی فلاونوئیدها به اثر بازدارندگی

در این پژوهش در گیاهان بیمار در حضور سیلیکات سدیم مقادیر رنگدانه‌ها، آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید، پرولین، پروتئین و فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی به شکل معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده افزایش یافته است. در گیاهان بیمار همراه با سیلیکات سدیم کاهش فنل در روز چهارم بعد از تلقیح (بعد از روند افزایش تا روز سوم) دیده شد. دلیل این امر را می‌توان رسوب مواد فنلی و لیگنین در دیواره‌ی سلولی گیاه دانست، در نتیجه تولید مواد فنلی به دلیل عدم توسعه قارچ و عدم ایجاد سیگنال‌های محرک بعد از روز سوم کاهش می‌یابد. از طرف دیگر لیگنین نیز به عنوان یکی از ترکیبات فنلی در مسیر

آنتی اکسیدانی است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند بنابراین گیاه را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی سیستم‌های غشایی و آسیب‌های اکسیداتیو در حمله بیمارگرها محافظت می‌نماید (Mittler, 2002). در نتیجه فعالیت آنزیم PAL دو مسیر بیوسنتزی فعال می‌شود که یکی از این مسیرها مربوط به سنتز SA است. این هورمون در مراحل آغازین مسیر فنیل پروپانویید ساخته می‌شود و باعث فعال شدن مسیر SAR و القای مقاومت اکسایشی سیستمیک در گیاه خواهد شد (Chen et al., 2009). فنیل آلانین آمونیلایز در واقع یک آنزیم کلیدی در متابولیسم فنیل پروپانویید است و منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه مانند لیگنین، فیتوالکسین‌ها و فلاونوئیدها می‌گردد (Campos et al., 2003). بنابراین، افزایش میزان ترکیبات فنلی کل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌تواند به افزایش میزان فعالیت PAL مربوط باشد. افزایش در میزان این آنزیم در گیاهان بیمار همراه با سیلیکات سدیم بیشتر از گیاهان شاهد سالم و آلوده گزارش شد. نکته قابل بحث در اینجا این است که کاهش فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در بعضی زمان‌ها ممکن است نتیجه‌ای از غیر فعال شدن آنزیم، از طریق مولکول‌های تاثیر گذار مرتبط با تنش باشد. از طرفی احتمال دارد که کاهش فعالیت این آنزیم‌ها به دلیل نیاز کمتر سلول‌ها برای متابولیسم آنتی اکسیداتیو پس از اعمال تیمار با سیلیکات سدیم باشد. همچنین تغییرات القا شده در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به شدت و مدت تیمار و همچنین گونه و سن گیاه وابسته می‌باشد. ممکن است سیلیکات سدیم به طور مستقیم در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش داشته باشد و با پاکسازی این گونه‌های فعال، از افزایش فعالیت آنزیم جلوگیری کند. از صفات فیزیولوژیکی می‌توان نتیجه گرفت که صفات آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی توانسته‌اند به عنوان اولین سد دفاعی خسارات اکسیداتیو را کاهش و نیاز سلول را به منظور متابولیسم آنتی اکسیداتیو کاهش دهد. کاهش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به واسطه افزایش میزان فلاونوئید (Sangtarash et al., 2009) و پرولین (Trovato et al., 2008) در گزارشات به اثبات رسیده است.

آن‌ها در تنفس میتوکندریایی مربوط می‌شود (Sangtarash et al., 2009) و به طور غیر مستقیم به وسیله شلاته کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (Seyoum et al., 2006). میزان آنتوسیانین در گیاهان آلوده به بیمارگر نسبت به شاهد سالم افزایش یافت که این افزایش ناشی از صدمه اکسیداتیو ناشی از این تنش زیستی است. آنتوسیانین به عنوان جارو کننده‌ی گونه‌های فعال اکسیژن به وجود آمده، عمل می‌کند (Apel and Hirt, 2004). پرولین اسیدآمینه آنتی اکسیدانی است که در پاسخ به تنش، به عنوان یک اسمولیت در نفوذپذیری غشای ریشه، تثبیت پروتئین و مهار پراکسیداسیون چربی عمل می‌کند (Berbara and García, 2014). اسیدآمینه پرولین در تشکیل ساختار ثانویه برخی پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی موثر است. برگ‌های خیار آلوده شده به قارچ در حضور یون سیلیسیوم با افزایش مقدار پرولین مقاومت بیشتری کسب می‌کنند (Kauss et al., 2003). گلیکوپروتئین‌های سرشار از هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلولی گیاه در یک فرایند مقاومتی غیرمحلول می‌گردند. ضخیم شدن دیواره سلولی مانع از نفوذ عوامل بیماری‌زا به گیاه می‌شود. افزایش میزان پروتئین در گیاهان بیمار ممکن است به علت پاسخی باشد که گیاه با افزایش بیان ژن و تولید پروتئین‌های بیشتری مرتبط با بیماری‌زایی به حمله بیمارگرها پاسخ می‌دهند. گسترش بیماری در حضور سیلیکات سدیم با فعالیت بیشتر پلی فنل اکسیدازها (سبب اکسیداسیون دی هیدروکسی فنل‌ها به کینون‌ها که برای عوامل بیماری‌زا سمی تر هستند) متوقف می‌شود (Mayer and Harel, 1979). افزایش فعالیت آنزیمی پراکسیداز در کاهش شدت بیماری‌هایی مانند پژمردگی فوزاریومی هندوانه و پوسیدگی قهوه‌ای نخود گزارش شده است (Ma et al., 2012; 2013). آسکوربات پراکسیداز با جمع‌آوری پراکسید هیدروژن از کلروپلاست یا سیتوزول، می‌تواند سطح تنش‌های اکسیداتیو را کاهش دهد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش مهمی در فعالیت روزنه‌ها از طریق تنظیم غلظت H₂O₂ در سلول گیاهان تحت تنش دارند و در گیاهان بیمار با حضور سیلیکات سدیم فعالیت بالاتری را دارد (Chen and Gallie, 2004). کاتالاز

منابع

1. Agrawal, A.A., Tuzun, S., & Bent, E. (2002). Maternal effects associated with herbivory: mechanisms and consequences of transgenerational induced plant resistance. *Ecology* 83: 3408-3415. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[3408:HAMEMA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[3408:HAMEMA]2.0.CO;2).
2. Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J., & Gindro, K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola*. *Physiology and Biochemistry* 49: 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.010>.
3. Apel, A., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 55: 373-99. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
4. Arnon, A.N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal* 23: 112- 121.
5. Bates, L.S., Walderen, R.D., & Taere, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies.

- Plant and Soil* 39: 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
6. Beers, G.R., & Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Biological Chemistry* 195(1): 133-140.
7. Benhamou, N., & Blanger, R.R. (1998). Benzothiadiazole-Mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiology* 118: 1203-1212. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.118.4.1203>.
8. Berbara, R.L., & García, A.C. (2014). Humic substances and plant defense metabolism. *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants under Changing Environment* 1: 297-319. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8591-9_11.
9. Bonfig, K.B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., & Berge S. (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0303-3>.
10. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principal of protein - dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
11. Bybordi, A., Saadat, A., & Zargaripour, P. (2018). The effect of zeolite, selenium and silicon on qualitative and quantitative traits of onion grown under salinity conditions. *Archives of Agronomy and Soil Science* 64(4). 520-530. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1373278>.
12. Cameron, K.D., Teece, M.A., Bevilacqua, E., & Smart, L.B. (2002). Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Journal of Phytochemistry* 60: 715-72. <https://doi.org/10.1016/S0031-9422%2802%2900198-X>.
13. Campos, A.D., Ferreira, A.G., & Vozari Hampe, M.M. (2003). Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15: 129-134. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202003000300001>.
14. Chen, C., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling & Behavior* 4: 493-496. <https://doi.org/10.4161%2Fpsb.4.6.8392>.
15. Chen, Z., & Gallie, D.R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomata movement. *The Plant Cell* 16: 1143-1162. <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.021584>.
16. Chérif, M., Asselin, A., & Bélanger, R.R. (1994). Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Molecular Plant Pathology* 236-242. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-236>.
17. Eifediyi, E.K., & Remison, S.U. (2010). Growth and yield of cucumber (*Cucumis sativum* L.) influenced by farm yard manure and inorganic fertilizer. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 2: 216-220.
18. Epstein, E. (1994). The anomaly of silicon in plant biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 1. 11-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.11>.
19. Etebarian, H.R. (2012). *Diseases of vegetable and cucurbit and their control*. University of Tehran press. 600 pp.
20. Fielding, J.L., & Hall, J.L. (1978). A Biochemical and Cytochemical Study of Peroxidase Activity in Roots of *Pisum sativum* L. Distribution of enzymes in relation to root development. *Journal of Experimental Botany* 29(4): 983-991. <https://doi.org/10.1093/jxb/29.4.983>.
21. Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M., & Nicolas, J.J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38: 926-931. <https://doi.org/10.1021/jf00094a002>.
22. Justyna, P.G., & Ewa, K. (2013). Induction of resistance against pathogens by β -aminobutyric acid. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1735-1748. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1215-z>.
23. Kaus, H., Seehaus, K., Franke, R., Gilbert, S., Dietrich, R., & Kröger, N. (2003). Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 33(1):87-95. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01606.x>.
24. Kaya, C., Tuna, L., & Higgs, D. (2006). Effect of silicon on plant growth and mineral nutrition of maize grown under water-stress conditions. *Journal of Plant Nutrition* 29: 1469-1480. <https://doi.org/10.1080/01904160600837238>.
25. Khan, Sh., Bagwan, N.B., Iqbal, M.A., & Tamboli, R.R. (2011). Mass multiplication and shelf life in liquid fermentation final product of *Trichoderma viride* in different formulations. *Advances in BioResearch* 2(1): 178-182.
26. Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadaya, A., & Mirecki, R.M. (1993). UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Plant Physiology* 88: 350-358. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb05509.x>.
27. Ma, Z., Yang, L., Yan, H., Kennedy, J.F., & Meng, X. (2013). Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydrate Polymers* 94: 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.012>.
28. Madadkhah, E., Lotfi, M., Nabipour, A., Rahmanpour, S., Banihashemi, Z., & Shoorooei, M. (2012). Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race1. *Scientia Horticulturae* 135: 171-176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.020>.
29. Marschner, H., Oberle, H., Cakmak, I., & Romheld, V. (1990). Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. *Plant and Soil* 124: 211-219.

- <https://doi.org/10.1007/BF00009262>.
30. Mayer, A.M., & Harel, E. (1979). Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80057-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80057-6).
 31. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9).
 32. Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
 33. Orabi, S.A., Salman, S.R., & Shalaby, M.A. (2010). Increasing resistance to oxidative damage in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants by exogenous application of salicylic acid and paclobutrazol. *Journal of Agricultural Sciences* 6(3): 252-259.
 34. Reuveni, R. (1995). *Biochemical marker of disease resistance*, In RP Singh. and US Singh (eds). Molecular methods in Plant Pathology. Boca Raton .CRC Press, Florida.
 35. Safdarpour, F., Khodakaramian, Gh., & Solimani Pari, M.J. (2013). Induction of systemic resistance against cucumber marginal leaf blight disease by using silicon application. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 36(1): 29-38 (In Persian with English abstract)
 36. Sahebani, N. (2004). *Interaction M. javanica with Fusarium oxysporum f. sp lycopersici and evaluation some defense biochemical mechanisms*. PhD thesis, University of Tehran, Tehran, Iran.
 37. Sangtarash, M.H., Qaderi, M.M., Chinnappa, C.C., & Reid, D.M. (2009). Carotenoid differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany* 66: 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.004>.
 38. Seevers, D.M., Daly, J.M., & Catedral, F.F. (1971). The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. *Journal of Plant Physiology* 48: 353-360. <https://doi.org/10.1104/2Fpp.48.3.353>.
 39. Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F.K. (2006). Structure– radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 67: 2058-2070. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002>.
 40. Shahrtash, M. (2018). Silicon fertilization as a sustainable approach to disease management of agricultural crops. *Journal of Plant Protection Research* 58(4): 317–320. <https://doi.org/10.24425/jppr.2018.124645>.
 41. Shen, G.-H., Xue, Q.-H., Tang, M., Chen, Q., Wang, L.-N., Duan, C.-M., Xue, L., & Zhao, J. (2010). Inhibitory effects of potassium silicate on five soil-borne phytopathogenic fungi in vitro. *Journal of Plant Diseases and Protection* 117(4):180-184.
 42. Shen, X., Zhou, Y., Duan, L., Li, Zh., Eneji, E., & Li, J. (2010). Silicon effects on photosynthesis and antioxidant parameters of soybean seedlings under drought and ultraviolet-B radiation. *Journal of Plant Physiology* 67(15): 1248-52. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.011>.
 43. Tolaei, M. (2013). *The compendium of cucumber and tomato soil cultur in greenhous condition*. Ministry of Jihad-keshavarzi press, Tehran. 97 pp.
 44. Trovato, M., Mattioli, R., & Costantino, P. (2008). Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Lincei* 19: 325-346. <http://dx.doi.org/10.1007%2Fs12210-008-0022-8>.
 45. Vakalounakis, D.J. (1996). Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum*.f.sp. *radicis-cucumerium* f. sp. nov. *Plant Disease* 80: 313-316. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0313>.
 46. Van Loon, L.C., Bakker, P.A., & Pieters, C.M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>.
 47. Vlot, A.C., Fkhassig, D., & Park, S.W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11: 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.003>.
 48. Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Journal of Plant Physiology* 64: 88-93. <https://doi.org/10.1104/2Fpp.64.1.88>.
 49. Wang, M., Gao, L., Dong, S., Sun, Y., Shen, Q., & Guo, Sh. (2017). Role of Silicon on Plant–Pathogen Interactions. *Plant Science* 8: 701. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00701>.
 50. Wang, Y., Hu, Y., Duan, Y., Feng, R., & Gong, H. (2016). Silicon reduces long-term cadmium toxicities in potted garlic plants. *Acta Physiology Plant* 38: 211-219.
 51. Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223-233. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.223>.



Evaluation of Antifungal Effect of Biodegradable Nano Encapsulated Extract of *Trichoderma harzianum*

M. Shahiri Tabarestani ^{1*}

Received: 06-03-2022

Revised: 09-04-2022

Accepted: 10-05-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:Shahiri Tabarestani, M. (2022). Evaluation of Antifungal Effect of Biodegradable Nano Encapsulated Extract of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 183-195. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/jpp.2022.75620.1081](https://doi.org/10.22067/jpp.2022.75620.1081)

Introduction

Chemical fungicides are widely used as effective control agents on a great diversity of fungal plant diseases. However, their excessive use, causes environmental pollution and health problems. Biological control as an environmentally friendly method can be a good alternative for chemical fungicides. *Trichoderma* is one of the antagonistic fungi with rapid adaptation to a wide variety of habitats. *Trichoderma harzianum* is a powerful agent for biocontrol of plant pathogens. It also can be used as a plant growth stimulant. However, its efficacy can be affected by biotic and abiotic factors, and encapsulation has been used to maximize its efficacy. Encapsulation process provides a protective barrier around the biocontrol agent, so the harmful external factors such as pH, humidity, and ultraviolet radiation do not damage its action. Encapsulation of the bioactive agents has been developed in recent years as a new potential tool for ecological and sustainable plant production. Encapsulation in biopolymer matrices has been recognized as an effective method for controlled release of a bioactive agent used for plant protection. Chitosan, the deacetylated derivative of chitin polysaccharide is one of the most important biopolymers that is widely used in biological and medical sciences especially for encapsulating essential oils and extracts due to its biocompatibility, low toxicity and biodegradability into safe byproducts. In this study, antifungal effects of nano capsulated *Trichoderma* extract (NCTE) and *Trichoderma* extract (TE) against *Macrophomina phaseolina* have been investigated.

Materials and Methods

The nanocapsules were prepared by ionic gelation method. This is one of the most advantageous techniques for the production of nanocapsules. This technique is easy to perform and avoids the use of organic solvents. The biocompatible and biodegradable polymer, chitosan, was used as a capsule coating agent. After extraction of *T. harzianum* secondary metabolites, encapsulation process was carried out. Tripolyphosphate was used as cross-linking agent in the encapsulation process. The surface morphology of the nanoparticles was considered using Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM). The mean particle sizes of the prepared nanoparticles were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) technique. For consideration of the antifungal effects of nano encapsulated *Trichoderma* extract (NCTE) and *Trichoderma* extract (TE) against *Macrophomina phaseolina*, sterile potato dextrose agar (PDA) containing different concentrations of NCTE and TE were prepared. After 5 days, colony diameter of the pathogen was measured in all treatments. The inhibitory effect was calculated compared with the control. Data were statistically analyzed by SAS software.

Results and Discussion

The obtained results indicated that the prepared nanoparticles were spherical in shape and the average size was equal to 77.91 nm with poly dispersity index (PDI) 0.23554. PDI value indicated the physical stability of the nanoparticles and prevented aggregation of the particles. Antifungal effects of NCTE and TE were observed in all treatments, however nanocapsules contains *Trichoderma* extract were more effective than *Trichoderma* extract. In each treatment containing TE and NCTE, maximum inhibitory effect was related to concentration of

1- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

(*- Corresponding Author Email: maedeshahiri@pnu.ac.ir)

30 percent. In consideration of inhibition percent of NCTE and TE on *M. phaseolina* within 5 days, it was found that on the first and second days, inhibitory effect of TE was more than NCTE. However, on the third, fourth and fifth days, there were no statistically significant difference between treatments in TE while in NCTE, a significant increasing was observed. The reason for the high inhibition percent in TE treatment in the first and second days was related to rapid release of active ingredients in the culture medium and the passage of time had no effect on improving its yield. According to the results in this research, it can be concluded that chitosan nanoparticles will be a good carrier for *Trichoderma* extract encapsulation. It also improves their antifungal activity against *M. phaseolina*.

Conclusion

Nano-encapsulation of the bioactive compounds enhances physical stability, protects them from oxidation process, controlling their release, improves water dispersion of hydrophobic compounds and enhances their bioactivity efficacy. In this study, nano encapsulation of *Trichoderma* extract, increased its antifungal effects over time. Nano encapsulated particles containing antagonistic fungi were able to control the pathogenic fungus more effectively and in a longer period of time due to the controlled release of the fungal extract. Results showed that antifungal efficiency of *T. harzianum* was increased by nano encapsulation procedure. Since chitosan is a biodegradable polymer without any harms for safety, this technique can be suggested as a good candidate for biological control. Our future investigations are directed to test nanocapsules simultaneously loaded with biological agents on *M. phaseolina* under greenhouse and field conditions.

Keywords: Antifungal effects, Chitosan, *Macrophomina phaseolina*, Nanocapsulation, *Trichoderma harzianum*



مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۱۹۵-۱۸۳

ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره نانوکپسوله زیست‌سازگار *Trichoderma harzianum*مائه شهری طبرستانی^{۱*}

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۰

چکیده

قارچ *Trichoderma harzianum* به‌عنوان یک عامل شناخته شده کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی و همچنین افزایش دهنده رشد گیاهان، در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اثرات تخریب‌کننده عوامل زنده و غیرزنده بر کارایی این قارچ، کپسوله کردن عوامل زیستی با پلیمرهای زیست‌تخریب پذیر می‌تواند سد محافظتی اطراف این قارچ ایجاد نماید. در سال‌های اخیر، این فناوری زیست‌سازگار، مورد توجه محققین قرار گرفته است. در این پژوهش اثرات ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های کیتوسان حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* در برابر قارچ بیمارگر *Macrophomina phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا) مورد بررسی قرار گرفت. تهیه نانوکپسول‌ها به روش ژلاسیون یونی انجام شد. مطالعات ریخت‌شناسی نانوذرات کپسوله شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی انجام گرفت. میانگین اندازه نانوذرات و همچنین پایداری آنها با روش طیف‌سنجی پراکندگی نور هیدرودینامیکی اندازه‌گیری شد. جهت بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های کیتوسان حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست، محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) سترون حاوی غلظت‌های مختلف هر یک از تیمارها تهیه گردید. قطر پرگنه قارچ بیمارگر پس از ۵ روز، اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری نسبت به شاهد محاسبه شد. نتایج حاصل از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد، نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست به‌صورت ذرات کروی یکنواخت با میانگین قطر ۷۷/۹۱ نانومتر می‌باشند. اثرات ضدقارچی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد، نانوکپسوله کردن عصاره قارچ آنتاگونیست، سبب افزایش معنی‌داری در قدرت بازدارندگی قارچ عامل بیماری گردید. عصاره نانوکپسوله شده با گذشت زمان به دلیل رهایش کنترل شده عصاره، به‌طور موثرتر و در مدت زمان بیشتری می‌تواند قارچ بیمارگر را کنترل نماید. بنابراین، به‌نظر می‌رسد کپسوله کردن عصاره *T. harzianum*، در حفظ اثرات ضدقارچی آنتاگونیست در برهمکنش با محیط اطراف نقش دارد.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضدقارچی، کیتوسان، نانوکپسول، *Trichoderma harzianum*، *Macrophomina phaseolina*

مقدمه

زیستی^۳ بیمارگرهای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. در بین عوامل کنترل زیستی، قارچ تریکودرما، از قدرت ساپروفیتی بالایی برخوردار است. گونه‌های مختلف این قارچ به‌خصوص گونه‌ی *Trichoderma harzianum* به‌دلیل توانایی تولید مقادیر بالای آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه، جهت کنترل بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌شوند (Heydari and Evidente et al., 2003; Pessarakli, 2010; Hung, 2015; Jelen et al., 2013; Kucuk and Kivanc, 2005; Vinale et al., 2008; Vinale et al., 2014). گونه‌های تریکودرما از طریق مایکوپارازیتسم، تولید ترکیبات ضد میکروبی، آنزیم‌های خاص (کیتیناز، بتا گلوکاناز، سلولاز و پروتئاز)،

سال‌های متمادی جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی از سموم شیمیایی استفاده شده است. این ترکیبات آلودگی زیست محیطی، کاهش تنوع زیستی و مقاومت بیمارگرها را موجب گردید. بدین جهت، استفاده از ترکیبات طبیعی زیست‌سازگار^۲ جهت کنترل

۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

Email: maedeshahiri@pnu.ac.ir

*) نویسنده مسئول

DOI: 10.22067/JPP.2022.75620.1081

2- Biocompatible

آنتی‌بیوز، رقابت و تحریک مقاومت در گیاه میزبان، قارچ بیمارگر را کنترل می‌نمایند. آنزیم‌های تولید شده توسط این قارچ می‌توانند با تجزیه دیواره سلولی به درون هیف قارچ‌های بیمارگر گیاهی، نفوذ و آنها را کلونیزه نمایند (Howell, 2003; Harman, 2006). با توجه به اثرگذاری شرایط محیطی (از جمله اشعه ماوراء بنفش نور خورشید، دما و رطوبت نسبی محیط) بر خاصیت آنتاگونیستی این قارچ، توسعه فرمولاسیون‌های تجاری که بتواند فعالیت ضدقارچی تریکودرما را در طی زمان حفظ نماید، ضروری است. یکی از این روش‌ها، استفاده از فناوری کپسوله کردن ترکیبات زیستی است که در سال‌های اخیر به عنوان یک روش قدرتمند در صنعت کشاورزی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. کپسوله کردن، یک سد دفاعی اطراف عامل زیست فعال ایجاد می‌نماید به‌طوری‌که آن را در برابر عوامل زیان‌بار محیطی محافظت می‌نماید. با فرایند کپسوله‌سازی در پلیمر زیستی^۱، آزادسازی ماده زیست فعال به‌صورت کنترل شده صورت پذیرفته و به تدریج مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد (Abdelkader et al., Wu et al., 2017; 2018).

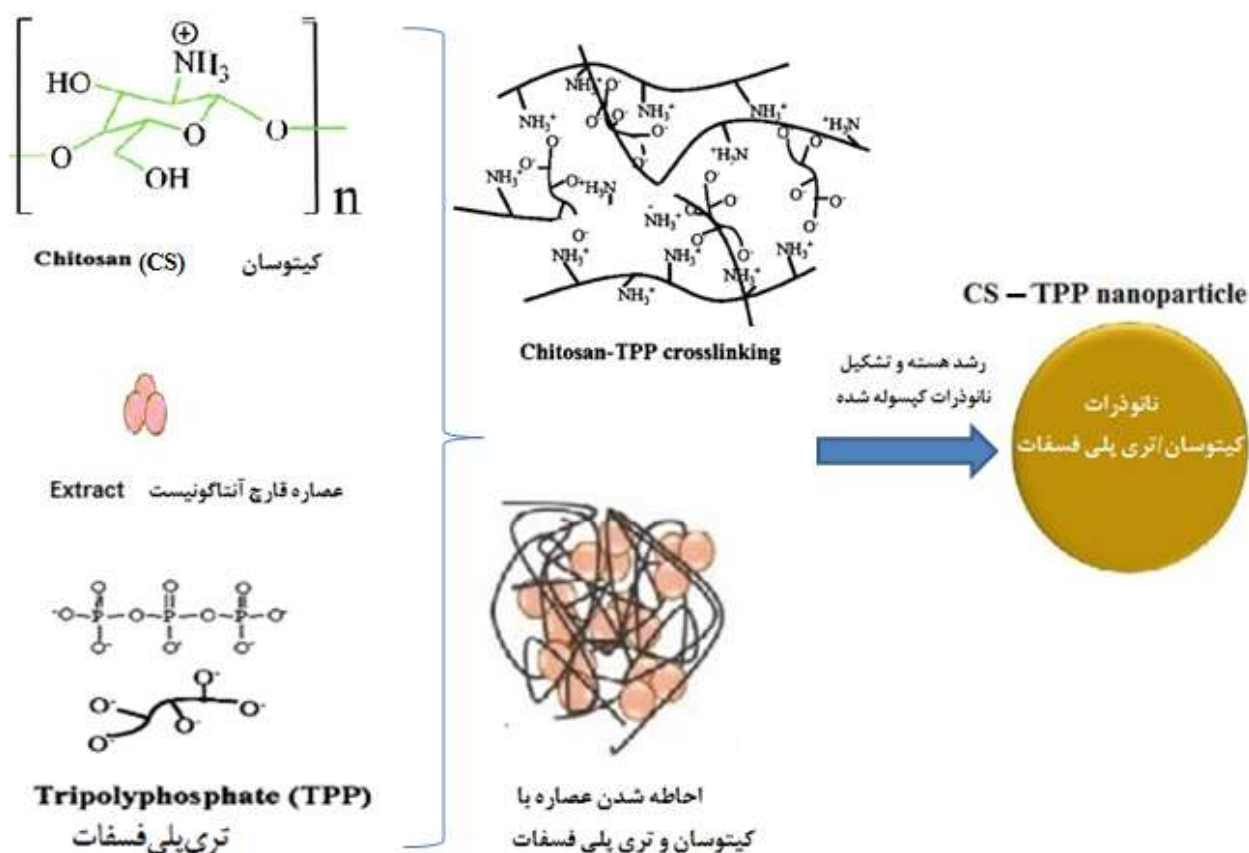
کیتوسان یک پلیمر زیستی با خاصیت ضد میکروبی است که از پلی‌ساکارید دیگری به نام کیتین مشتق می‌شود (Kumar et al., 2020). کیتین در طبیعت پس از سلولز، فراوان‌ترین پلیمر است. با استیل‌دار شدن ساختار شیمیایی کیتین، پلیمری با ساختار پیچیده‌تر و کاربردهای گسترده‌تر حاصل می‌شود که کیتوسان نام دارد. عمده‌ترین منبع تأمین کیتوسان، بافت بیرونی و ضخیم بدن بی‌مهرگان آبزی است که نژادهایی از میگو و خرچنگ بیشترین سهم را در تولید کیتوسان دارند. برخی از سبزیجات، مخمرها و قارچ‌های خاکی نیز منابع دیگر کیتوسان در طبیعت هستند. این پلی‌ساکارید طبیعی، در آب نامحلول است اما در محیط اسیدی قابلیت انحلال آن افزایش می‌یابد. بنابراین با افزایش مقدار کمی استیک اسید و یا سیتریک اسید می‌توان قابلیت انحلال کیتوسان را تنظیم نمود (Naskar et al., 2015; Sarvaiya and Agrawal, 2015). کیتوسان با ساختار پلی‌کاتیونی، زمانی که در کنار ماده شیمیایی دیگر با بار منفی قرار می‌گیرد، می‌تواند با ایجاد یک زنجیره کاتیونی-آنیونی، موجب سنتز نانو ذرات شود. در این فرایند، ماده مؤثره موجود در عصاره بدون تشکیل پیوند شیمیایی در ساختار نانوذرات قرار می‌گیرد و می‌تواند با سرعت رهایش کنترل شده، آزاد شود (Abdelkader et al., 2018; Akbari et al., 2021; Wu et al., 2014). در بین روش‌های سنتز نانوذره با کیتوسان، روش ژلاسیون یونی به‌روزترین و از لحاظ بازدهی و کیفیت، روش مناسبی برای دستیابی به نانوذرات می‌باشد. در این روش، تشکیل پیوند شیمیایی، عامل اتصال عرضی

بین گروه‌های عاملی کیتوسان و تری‌پلی‌فسفات^۲ نمی‌باشد بلکه نیروهای الکترواستاتیکی که میان یون‌های مثبت (کیتوسان) و منفی (تری‌پلی‌فسفات) ایجاد می‌شود، سبب اتصال عرضی خواهد شد (Sreekumar et al., 2018; Agnihotri et al., 2004). شکل ۱، خلاصه‌ای از مراحل تشکیل نانوذرات کپسوله شده عصاره قارچ آنتاگونیست به روش ژلاسیون یونی را نشان می‌دهد.

وینسکوویچ و همکارانش (Vincekovic et al., 2016) میکروکپسول‌هایی با سیستم کیتوسان - آلزینات سنتز نمودند که به‌صورت هم‌زمان توسط یون‌های مس و گونه *T. viride* بارگذاری شد. طبق این مطالعه، ذرات مس و متابولیت‌های گونه‌ی تریکودرما تأثیر منفی بر روی فعالیت یکدیگر نداشتند و متابولیت‌های *T. viride* به علت داشتن اسپور، سرعت رهایش کمتر و قابل قبول‌تری داشتند. مانسرا-لوپز و همکارانش (Mancera-López et al., 2019)، تأثیر فرآیند کپسوله کردن در افزایش نرخ رشد و کیفیت قدرت کنترل زیستی گونه *T. harzianum* را بر چند قارچ بیمارگر گیاهی به اثبات رساندند.

اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌های کیتوسان حاوی منبع قارچی و نانوذرات نقره توسط ساتیاسیلان و همکارانش (Sathiyaseelan et al., 2020) مشاهده شد.

در این پژوهش اثر ضدقارچی قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* در برابر قارچ بیمارگر خاکزی *M. phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا) در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه تاکنون اثرات ضدقارچی گونه‌های تریکودرما بر بسیاری از قارچ‌های بیمارگر به اثبات رسیده است، اما در این تحقیق سعی شد تا با استفاده از فناوری نانو و تهیه نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست، افزایش اثرات ضدقارچی آنتاگونیست مورد مطالعه انجام گیرد. در این فناوری، با کاهش اندازه ذرات در حد نانومتر، فعالیت ذره‌ای و سطح فعال افزایش می‌یابد. بنابراین به‌نظر می‌رسد اگر متابولیت‌های ثانویه قارچ آنتاگونیست به‌صورت نانوذرات با بیمارگرها مواجه شوند، اثر کنترل زیستی بیشتری خواهند داشت. با توجه به حساسیت متابولیت‌های ثانویه به عوامل محیطی و به‌منظور کاهش سرعت رهایش ماده مؤثره در محیط میزبان و در نتیجه افزایش کارایی فرآیند کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی، تولید نانوکپسول‌های قارچ آنتاگونیست، هدف اصلی این پژوهش می‌باشد.



شکل ۱- شماتیک مراحل تشکیل نانو ذرات کپسوله شده عصاره قارچ *T. harzianum*

Figure 1- Schematic processes formation of encapsulated nanoparticles of *T. harzianum* fungal extract

قارچ بیمارگر (NCBI GeneBank accession No. KY549686) *Macrophomina phaseolina* که از ساقه‌های سویای آلوده به بیماری پوسیدگی ذغالی جداسازی شده بود از مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران- بخش آفات و بیماری‌های گیاهی، تهیه گردید. به‌منظور کشت دوباره، یک حلقه از حاشیه پرگنه قارچ برداشته و روی محیط کشت PDA کشت داده شد و پس از آزمون بیماریزایی روی سویا، مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی عصاره قارچ آنتاگونیست

جهت تهیه عصاره قارچ آنتاگونیست، از حاشیه پرگنه ۵ روزه قارچ *T. harzianum* روی محیط کشت PDA^۱، دو دیسک ۷ میلی‌متری برداشته شد و در شرایط سترون به ارلن مایر یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB^۲ یک‌پنجم قدرت سترون، افزوده شد. محیط کشت در شرایط سکون و دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس و

مواد و روش‌ها

مواد

کیتوسان با وزن مولکولی پایین، استیک اسید، سدیم هیدروکسید و سدیم تری پلی فسفات (STPP) از تولیدات شرکت سیگما آلدריך (Sigma-Aldrich) تهیه گردید.

تهیه گونه‌های قارچی

قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* (NCBI GeneBank accession No. JX173852.1) از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دریافت گردید. این جدایه از خاک مزارع کلزا گرگان (استان گلستان) جداسازی و توسط رهنما و همکاران شناسایی شده بود (Shahiri et al., 2016a). کشت تک اسپور این جدایه بر روی محیط کشت PDA تهیه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و به‌عنوان منبع ماده بیولوژیک استفاده شد.

1- Potato dextrose agar
2- Potato dextrose broth

بررسی خصوصیات ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

جهت بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره خام (TE)^۷ و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست (NCTE)^۸، محیط کشت PDA سترون حاوی غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد هر یک از تیمارها تهیه گردید. جهت تیمار شاهد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد آب مقطر سترون با محیط کشت PDA سترون استفاده شد (Shahiri et al., 2016b). پس از انعقاد محیط کشت، قرص‌هایی به قطر ۷ میلی‌متر از پرگنه ۵ روزه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* جدا گردید و در مرکز هر یک از تشتک‌های فوق، قرار داده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. قطر پرگنه قارچ ۵ روز پس از نگهداری در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری نسبت به شاهد، طبق رابطه یک محاسبه گردید. به‌منظور بررسی رهایش کنترل‌شده NCTE و مقایسه آن با TE، قطر پرگنه قارچ بیمارگر در غلظت ۳۰ درصد تیمارهای فوق، ۲، ۳، ۴ و ۵ روز پس از کشت نیز اندازه‌گیری شد. بررسی اثرات ضدقارچی تیمارها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایشات، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد به نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (Vinale et al., 2006).

$$IG = [(C-T)/C] \times 100 \quad [۱]$$

IG = درصد بازدارندگی از رشد میسلیمی بیمارگر

C = قطر پرگنه قارچ بیمارگر در شاهد

T = قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار

نتایج

ریخت‌شناسی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

تصویر سطوح خارجی نانوذرات کپسوله شده حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست در شکل ۳ قابل مشاهده است. در این شکل نانوذرات کپسوله شده به‌صورت ذرات کروی یکنواخت با تقارن نسبی و قطر زیر ۱۰۰ نانومتر به‌وضوح دیده می‌شود. لازم به ذکر است قبل از انجام تصویربرداری (FE-SEM)، فرآیند اولتراسونیک جهت جداسازی نانوذرات و جلوگیری از تجمع آنها انجام پذیرفت.

شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۳۰ روز نگهداری شد. پس از طی این مدت، جهت همگن‌سازی محلول حاوی عصاره قارچی، از سیستم یکنواخت‌ساز^۱ (سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) استفاده گردید. محلول حاصل تحت شرایط خلأ از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ و فیلتر سرسرنگی با اندازه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد تا به‌طور کامل، عاری از اسپور شود. محلول عصاره حاصل در دستگاه تبخیرکننده چرخشی^۲ تحت خلأ تغلیظ گردید. جهت آماده‌سازی عصاره خشک قارچ آنتاگونیست، از دستگاه خشک‌کن انجمادی تحت خلأ^۳ (مدل FDE-350 Korea) و دمای ۵۰- درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. عصاره خشک شده، جهت استفاده در مراحل بعدی در یخچال و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید (Vinale et al., 2006).

آماده‌سازی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

در این مرحله نانوکپسول‌های کیتوسان-تری‌پلی‌فسفات، به‌روش ژلاسیون یونی سنتز شده و عصاره قارچ آنتاگونیست در فضای خالی بین شبکه ایجاد شده، محبوس شد (Fan et al., 2012). شکل ۲ فرایند آزمایشگاهی سنتز نانوکپسول را نشان می‌دهد. پس از انجام واکنش، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا رسوب ژلاتینی نانوکپسول، ته‌نشین شود (شکل ۲).

بررسی ریخت‌شناسی نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی^۴ (FE-SEM) (مدل MIRA3TESCAN-XMU) جهت مطالعات ریخت‌شناسی^۵ نانوذرات کپسوله شده، استفاده گردید.

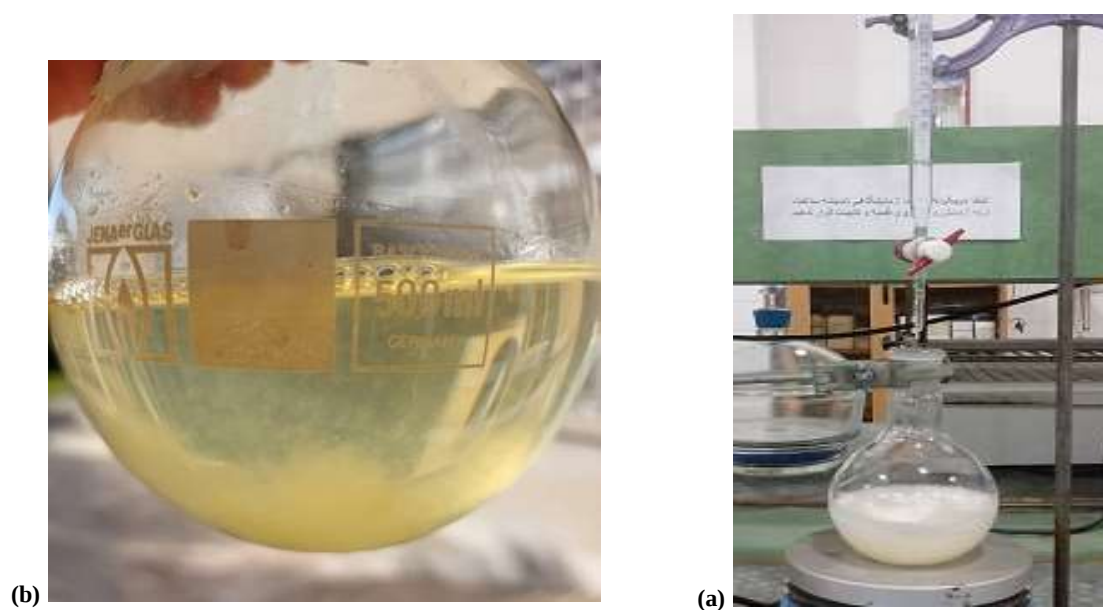
اندازه‌گیری قطر نانوذرات کپسوله شده

میانگین اندازه نانوذرات و همچنین پایداری ذرات در محلول به روش پراکندگی هیدرودینامیکی نور با استفاده از دستگاه DLS^۶ (مدل VASCO شرکت Cordouan Tech ساخت کشور فرانسه) اندازه‌گیری شد.

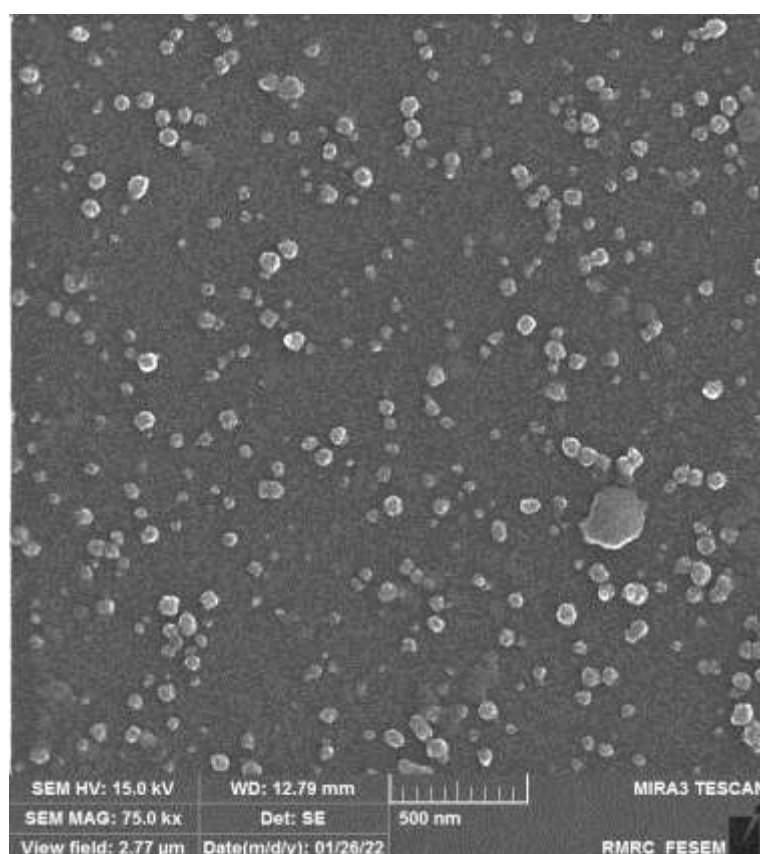
- 1- Homogenizer
- 2- Rotary evaporator
- 3- Vacuum freeze dryer
- 4- Field Emission Scanning Electron Microscopy
- 5- Morphology
- 6- Dynamic Light Scattering

7- Trichoderma Extract (TE)

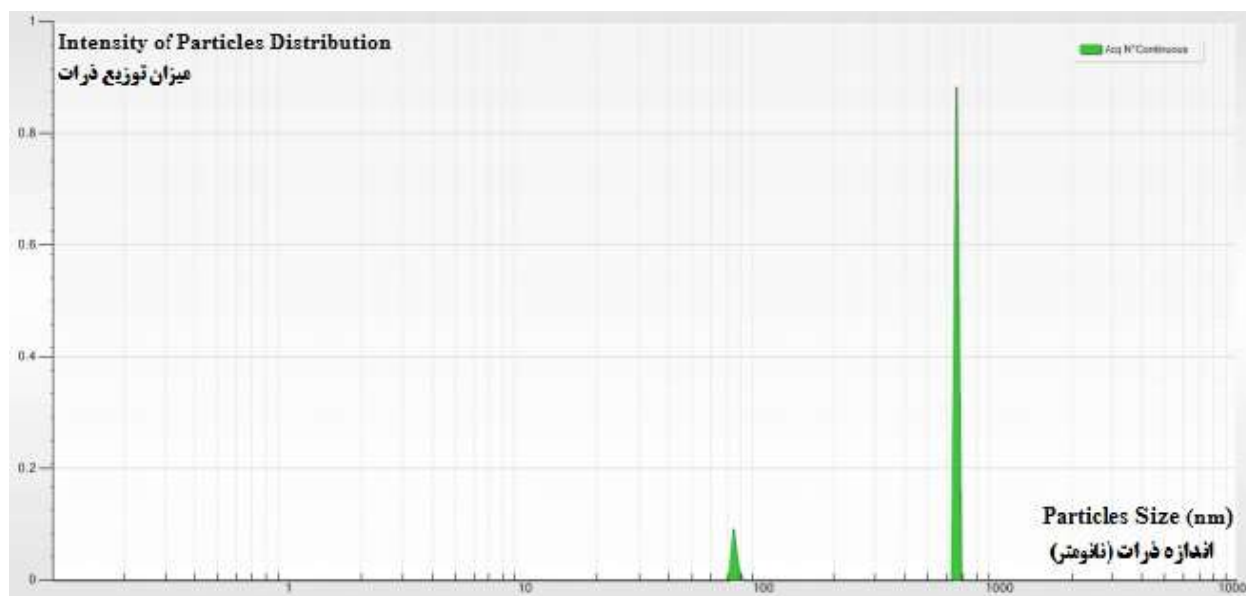
8- Nano Capsulated Trichoderma Extract (NCTE)



شکل ۲- (a) فرآیند کپسوله‌کردن عصاره *T. harzianum* به روش ژلاسیون یونی (b) رسوب ژله‌ای نانوکپسول عصاره *T. harzianum*
 Figure 2- (a) Encapsulation process of *T. harzianum* extract by ionic gelation method
 (b) Nanocapsule gel precipitation of *T. harzianum* extract



شکل ۳- تصویر سطوح خارجی نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* به روش میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی
 Figure 3- Image of external surfaces of nanocapsules containing *T. harzianum* extract by field emission scanning electron microscopy



شکل ۴- میزان تفکیک و توزیع اندازه نانوذرات براساس اندازه‌گیری به روش پراکندگی نور هیدرودینامیکی
Figure 4- The amount of separation and size distribution of nanoparticles based on measurement by hydrodynamic light scattering method

اندازه‌گیری قطر نانوذرات کپسوله شده

قطر نانوذرات کپسوله شده به روش پراکندگی هیدرودینامیکی نور، اندازه‌گیری شد. **شکل ۴**، میزان توزیع ذرات را بر اساس اندازه (قطر) آنها نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، میانگین قطر نانوذرات کپسوله شده حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست، در پیک اول برابر ۷۷/۹۱ نانومتر بود که این عدد با تصویر به‌دست آمده با میکروسکوپ الکترونی روبشی مطابقت دارد. پیک دوم به شکل توده‌های به هم چسبیده ذرات بود که در اثر وجود بار الکتریکی یون‌های تری پلی فسفات (بار الکتریکی منفی) و کیتوسان (بار الکتریکی مثبت) تشکیل گردید. به‌طوری‌که پس از فرآیند اولتراسونیک، مقداری از نمونه‌ها به‌صورت ذرات تجمع یافته^۱ باقی ماند. در این پیک، قطر توده‌های تجمع یافته نانوذرات برابر ۶۲۳/۹۹ نانومتر بود که نشان می‌دهد جداسازی نانوذرات کپسوله شده به‌طور کامل انجام نشده و به زمان بیشتری برای اولتراسونیک نیاز داشت. تعداد پیک‌ها با اندازه ذرات مختلف، به مقدار ضریب تفکیک^۲ (PDI) بستگی دارد. ضریب مربوطه، میزان پراکندگی اندازه ذرات را مشخص می‌کند که در این اندازه‌گیری برابر ۰/۲۳۵۵۴ گزارش شد. هر چه مقدار ضریب تفکیک کوچکتر باشد بدین معنی است که ذرات بهتر از هم جدا شده و پایداری بیشتری دارند. به عبارت دیگر، تنوع جمعیت نانوذرات با اندازه‌های مختلف، کمتر است (Caputo et al., 2019).

خصوصیات ضدقارچی عصاره خام و نانوذرات کپسوله

شده حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست

در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد عصاره خام (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* (NCTE)، با افزایش غلظت، میزان بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* افزایش یافت (**جدول ۱**). براساس داده‌های **جدول ۱**، از نظر اثر بازدارندگی، غلظت ۳۰ درصد TE و غلظت ۱۰ درصد NCTE در یک گروه آماری قرار گرفتند. این نتیجه نشان می‌دهد، نانوکپسوله کردن عصاره قارچ آنتاگونیست، موجب افزایش اثر بازدارندگی آن می‌شود. در هر کدام از تیمارهای TE و NCTE، بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به غلظت ۳۰ درصد بود (**شکل ۵**). نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد نوع عصاره، غلظت‌های مختلف عصاره و اثر متقابل آنها بر درصد بازدارندگی قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* بر رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (**جدول ۲**). در بررسی اثر بازدارندگی غلظت ۳۰ درصد هر یک از تیمارهای TE و NCTE، در برابر رشد میسلیومی قارچ *M. phaseolina* طی مدت پنج روز، افزایش میزان بازدارندگی مشاهده گردید (**شکل ۶**). اثر بازدارندگی تیمارهای TE و NCTE به ترتیب در دو و چهار گروه آماری قرار گرفت (**شکل ۶**).

1- Agglomerated

2- Poly Dispersity Index (PDI)

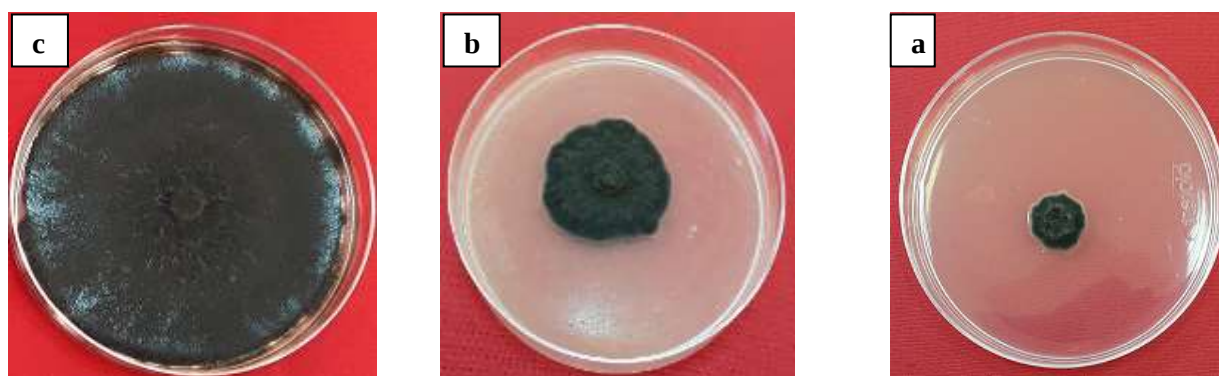
جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ *M. phaseolina* پس از پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Table 1- Effect of different concentrations of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on *M. phaseolina* after five days in *in-vitro* conditions

غلظت عصاره در هر تشتک (%) Concentration of extract in each plate (%)	میانگین درصد بازدارندگی (TE) Mean of inhibition percent (TE)	Std	میانگین درصد بازدارندگی (NCTE) Mean of inhibition percent (NCTE)	Std
10	45.66 e	0.04	55.66 c	0.07
20	49 d	0.12	60 b	0.03
30	55.66 c	0.07	70 a	0.09
10 شاهد (control)	0 f	0	0 f	0
20 شاهد (control)	0 f	0	0 f	0
30 شاهد (control)	0 f	0	0 f	0

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)



شکل ۵- اثر غلظت ۳۰ درصد (a) عصاره خام *T. harzianum* (TE) و (b) نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) بر رشد پیرگنه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* در مقایسه با شاهد (c) بعد از پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Figure 5- Effect of 30 percent concentration of (a) *T. harzianum* crude extract (TE) and (b) *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on colony diameter of *M. phaseolina* in comparison to control (c) after five days in *in-vitro* condition

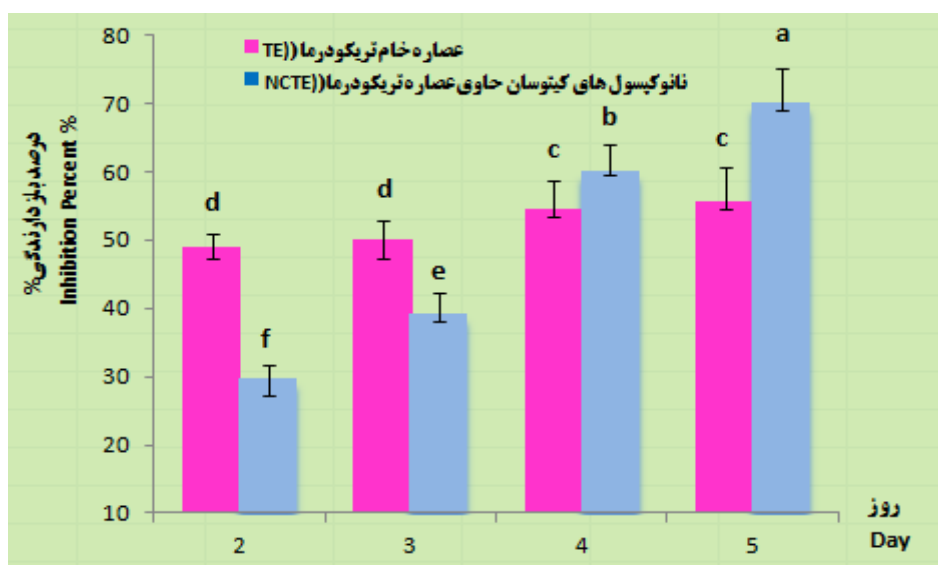
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ *M. phaseolina* پس از پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Table 2- Analysis of variance of inhibitory effect of different concentrations of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on *M. phaseolina* after five days in *in-vitro* condition

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean square	F
نوع عصاره (T) Kind of extrac	2	139.64	31524.9**
غلظت‌های عصاره (C) Concentration of extract	2	0.66	150.24**
اثر متقابل (T*C) (T*C)	4	0.17	39.53**
خطا Error	18	0.0044	-
ضریب تغییرات (%) (CV)	-	1.27	-

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**Significant at level of $P < 0.01$



شکل ۶- اثر بازدارندگی غلظت ۳۰ درصد عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ بیمارگر *M. phaseolina* طی مدت پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Figure 6- Inhibitory effect of 30 percent concentration of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) against growth of *M. phaseolina* within five days in in-vitro condition

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی غلظت ۳۰ درصد عصاره خام *T. harzianum* (TE) و نانوکپسول‌های حاوی عصاره *T. harzianum* (NCTE) در برابر رشد قارچ بیمارگر *M. phaseolina* طی مدت پنج روز در شرایط آزمایشگاه

Table 3- Analysis of variance of inhibitory effect of 30 percent concentration of *T. harzianum* crude extract (TE) and *T. harzianum* nanocapsulated extract (NCTE) on *M. phaseolina* after five days in in-vitro condition

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean square	
نوع عصاره (T) Kind of extract	1	33.79	13.35**
روز (D) Day	3	732.70	289.46**
اثر متقابل (T*D) Interaction	3	361.78	142.93**
خطا Error	16	2.53	-
ضریب تغییرات (%) (CV)	-	3.11	-

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**Significant at level of $P < 0.01$

واریانس نشان می‌دهد نوع عصاره، روز و اثر متقابل آنها بر اثر بازدارندگی قارچ *T. harzianum* در برابر قارچ *M. phaseolina* در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۳). اثر بازدارندگی بهتر تیمار NCTE نسبت به TE در روز پنجم، می‌تواند مربوط به رهاسازی کنترل شده متابولیت‌های ثانویه قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* باشد. بالا بودن اثر بازدارندگی در نمونه‌های حاوی TE در روزهای اول، به دلیل رهایش یکباره مواد

این اثر در تیمار TE، در روزهای دوم و سوم بیشتر از NCTE بود. درحالی‌که در روزهای چهارم و پنجم، NCTE افزایش چشمگیری در اثر بازدارندگی نسبت به TE نشان داد. این تفاوت در سطح احتمال یک درصد، از نظر آماری معنی‌دار بود. در روزهای چهارم و پنجم، روند افزایشی میزان بازدارندگی در تیمارهای TE ادامه داشت، اما تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد، بین این دو روز مشاهده نشد (شکل ۶). نتایج جدول تجزیه

گونه‌های تریکودرما، توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. آنها نشان دادند، حضور همزمان کیتین و کیتوسان، مکانیسم‌های کنترل بیولوژیکی تریکودرما را فعال‌تر و اثرگذارتر می‌کند. تنوع آنزیم‌های تولید شده توسط کیتین و کیتوسان، موجب اجرای مکانیسم مایکوپارازیتیسم به بهترین شکل توسط قارچ آنتاگونیست می‌شود. از طرف دیگر کیتوسان، دیواره سلول‌هایی از تریکودرما را که تحت اثر بیمارگرها تخریب شدند، بازسازی می‌نماید (Kappel et al., 2020). پیل و همکاران (Peil et al., 2020)، *T. reesei* را با هدف بهبود کیفیت رهایش آنزیم و اثر آن بر روی بیمارگرهای تنه درخت انگور، کپسوله نمودند. گونه‌های قارچی آنتاگونیست به دلیل ماندگاری پایین و جوانه‌زنی غیرقابل کنترل، توان کنترل مناسب این بیماری را نداشتند. آنها توانستند با کپسوله کردن *T. reesei*، قدرت کنترل زیستی این قارچ آنتاگونیست را به میزان قابل توجهی افزایش دهند.

وهایی و همکاران (Vahabi et al., 2011)، توانستند با استفاده از توده میسلیمی قارچ *T. reesei*، بیوسنتز خارج سلولی نانوذرات نقره با ابعاد ۵۰-۵ نانومتر تولید نمایند. در این روش، قرار گرفتن میسلیم قارچ در معرض محلول نیترات نقره، موجب تحریک تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های قارچ می‌شود. از آنجا که این قارچ دوستدار محیط زیست می‌تواند متابولیت‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی فراوانی تولید نماید، به نظر می‌رسد این روش می‌تواند در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

در عمده پژوهش‌هایی که ارائه گردید، اسپر یا میسلیم گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما، نانوکپسوله شدند و تاکنون نانوکپسوله کردن عصاره قارچ *T. harzianum* گزارش نشده است. از مزایای نانوکپسوله کردن، وابستگی کمتر به افزایش غلظت ماده مؤثره است که عاملی مطلوب و هدفمند در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود. براساس نتایج تحقیق حاضر، با کپسوله کردن عصاره قارچ تریکودرما در قالب نانوذرات کیتوسان-تری‌پلی‌فسفات، نیاز به غلظت بالای متابولیت‌های ثانویه قارچ آنتاگونیست به شکل قابل توجهی کاهش یافت و اثرات بازدارندگی فرمولاسیون نانو مورد مطالعه با سرعت رهایش تدریجی، مطلوب‌تر ارزیابی گردید. آزمایشات تکمیلی در سایر پاتوسیستم‌ها و نیز ارزیابی فرمولاسیون حاضر در مقیاس بزرگتر جهت اعتبارسنجی به نتایج پیشنهاد می‌گردد.

مؤثره در محیط کشت بود. بدین جهت، گذشت زمان تأثیری در بهبود عملکرد این تیمار نداشت.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش، اثرات ضدقارچی عصاره خام و نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* را بر روی قارچ بیمارگر *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاه اثبات نمود. این اثرات ضدقارچی مربوط به متابولیت‌های ثانویه *T. harzianum* بود. اثرات ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه گونه‌های تریکودرما توسط پژوهشگران دیگر نیز گزارش گردید (Morath et al., 2012; Reino et al., 2008; Siddiquee et al., 2012; Siddiquee, 2014). در این مطالعه مشخص شد نانوکپسوله کردن عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* موجب می‌شود، قدرت کنترل قارچ عامل بیماری (*M. phaseolina*) در روزهای ۴ و ۵ توسط نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ آنتاگونیست *T. harzianum*، افزایش یابد. این افزایش به دلیل رهایش کنترل شده ماده مؤثره در نانوکپسول‌ها می‌باشد. در حالی که در عصاره خام این قارچ آنتاگونیست، ماده مؤثره به یک‌باره در روزهای دوم و سوم، آزاد می‌گردد. از مزیت‌های دیگر فرایند نانوکپسوله کردن، افزایش پایداری عصاره قارچ *T. harzianum* است. بدین ترتیب با گذشت زمان، نانوکپسول‌های حاوی عصاره قارچ *T. harzianum*، اثر بازدارندگی خود را حفظ می‌نمایند. لوکاتلی و همکاران نیز توانستند با تولید گرانول‌های نانوکپسوله شده گونه‌های مختلف تریکودرما (از جمله *T. harzianum*)، موجب پایداری بیشتر فرمولاسیون‌های تریکودرما و اثربخشی بهتر این قارچ آنتاگونیست شوند (Locatelli et al., 2017). جوریک و همکاران (Juric et al., 2019) با کپسوله نمودن *T. viride*، ضمن محافظت قارچ آنتاگونیست در برابر عوامل مضر محیطی، توانستند میزان رهایش ماده مؤثره *T. viride* را نیز کنترل نمایند. ماریویاما و همکارانش (Maruyama et al., 2020)، با تولید میکروکپسول‌های حاوی قارچ *T. harzianum* توانستند ماندگاری، اثربخشی، فعالیت کیتینولیتیک و سلولیتیک این قارچ را افزایش دهند. آنها همچنین نشان دادند قارچ کپسوله شده در مقایسه با شاهد، اثر ضدقارچی بیشتری بر قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* دارد. کاربرد کیتوسان در تولید نانوذرات کپسوله شده موجب می‌شود، کنترل زیستی بهتر و مؤثرتر صورت گیرد (Thai et al., 2020). اثر حضور همزمان کیتین و کیتوسان بر افزایش قدرت کنترل زیستی

منابع

- 1-Abdelkader, H., Hussain, S., & Abdullah, N. (2018). Review on micro-encapsulation with chitosan for pharmaceuticals applications. *MOJ Current Research & Reviews* 1(2): 77-84. <https://doi.org/10.15406/mojcrr.2018.01.00013>.

- 2- Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., & Aminabhavi, T.M. (2004). Recent advances on chitosan based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100(1): 5-28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>.
- 3- Akbari, M., Rahimi, Z., & Rahimi, M. (2021). Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in active and passive microchannels. *Research in Pharmaceutical Sciences* 16(1): 79-93. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.305191>.
- 4- Caputo, F., Clogston, J.B., Calzolari, L.C., Rösslein, M.D. & Prina-Mello, A. (2019). Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *Journal of Controlled Release* 299: 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>.
- 5- Evidente, A., Cabras, A., Maddau, L., Serra, S., Andolfi, A., & Motta, A. (2003). Viridepyronone, a new antifungal 6-Substituted 2H-Pyran-2-one produced by *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(24): 6957-69. <https://doi.org/10.1021/jf034708j60>.
- 6- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse. Low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90: 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>.
- 7- Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96(2): 190-194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>.
- 8- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4): 27-33. <https://doi.org/10.3923/jbs.2010.273.290>.
- 9- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1): 4-10.
- 10- Hung, R., Lee, S., & Bennett, J.W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(8): 3395-3405.
- 11- Jelen, H., Błaszczyk, L., Chelkowski, J., Rogowicz, K., & Strakowska, J. (2013). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress* 13(3): 589-600. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0942-2>.
- 12- Juric, S., Dermic, E., Topolovec-Pintaric, S., Bedek, M., & Vinceković, M. (2019). Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture* 18(11): 2534–2548. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62634-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62634-1).
- 13- Kappel, L., Munsterkotter, M., Sipos, G., Escobar Rodriguez, C., & Gruber, S. (2020). Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLoS Pathogens* 16(2): e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320>.
- 14- Kucuk, C., & Kivanc, M. 2005. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turkish Journal of Biology* 28(2-4): 111-115.
- 15- Kumar, S., Mukherjee, A., & Dutta, J. (2020). Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.002>.
- 16- Locatelli, G.O., dos Santos, G.F., Botelho, P.S., Finkler, C.L.L., & Bueno, L.A. (2017). Development of *Trichoderma* spp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control* <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.002>.
- 17- Mancera-López, M.E., Izquierdo-Estévez, W.F., Escalante-Sánchez, A., Ibarra, J.E., & Barrera-Cortés, J. (2019). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology* 29(2): 107-130. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1535053>.
- 18- Maruyama, C.R., Bilesky-José, N., de Lima, R., & Fraceto, L.F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 225. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>.
- 19- Morath, S.U., Hung, R., & Bennett, J.W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26(2-3): 73-83.
- 20- Naskar, S., Sharma, S., & Kuotsu, K. (2019). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 49(6): 66-81.
- 21- Peil, S., Beckers, S.J., Fischer, J., & Wurma, F.R. (2020). Biodegradable, lignin-based encapsulation enables delivery of *Trichoderma reesei* with programmed enzymatic release against grapevine trunk diseases. *Materials Today Biology* 7: 100061. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100061>.
- 22- Reino, J.L., Guerreo, R.F., & Collado I.G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7(1): 89-123.
- 23- Sarvaiya, J., & Agrawal, Y. (2015). Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti- Alzheimer drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 454-465.
- 24- Sathiyaseelan, A., Saravanakumar, K., Mariadoss, A.V.A., & Wang, M.H. (2020). Biocompatible fungal chitosan

- encapsulated phytogetic silver nanoparticles enhanced antidiabetic, antioxidant and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 15: 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac>.
- 25- Shahiri Tabarestani, M., Rahnama, K., Jahanshahi, M., Nasrollanejad, S., & Fatemi, M.H. (2016 a). Identification of volatile organic compounds of some *Trichoderma* species using static headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Mycologia Iranica* 3(1): 47-55. <https://dx.doi.org/10.22043/mi.2017.41532.1072>.
- 26- Shahiri Tabarestani, M., Rahnama, K., Jahanshahi, M., Nasrollanejad, S., & Fatemi, M.H. (2016 b). Extraction and identification of secondary metabolites produced by *Trichoderma atroviridae* (6022) and evaluating of their antifungal effects. *Journal of Plant Protection* 31(1): 131-141. (In Persian with English abstract). <https://dx.doi.org/10.22067/jpp.v31i1.55861>.
- 27- Siddiquee, S., Cheong, B.E., Taslima, K.H., Kausar, H., & Hasan, M.M. (2012). Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science* 50(4): 358-367.
- 28- Siddiquee, S. (2014). Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. p. 139-170. In: Gupta V.K., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R. S. and Druzhinina I. (eds.) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Eds. Printed and bound in Poland, Elsevier.
- 29- Sreekumar, S., Goycoolea, F.M., Moerschbacher, B.M., & Rivera-Rodriguez, G.R. (2018). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and microparticles. *Scientific Reports* 8(1): 1-11.
- 30- Thai, H., Nguyen, C.H.T., Thach, L.T., & Tran, M.T. (2020). Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 10(1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57666-8>.
- 31- Vahabi, K.H., Mansoori, G.A., & Karimi, S. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (A route for large-scale production of AgNPs). *Insciences Journal* 1(1): 65-79. <https://doi.org/10.5640/insc.010165>.
- 32- Vinale, F., Marra, R., Ghisalberti, E.L., Lorito, M., & Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology* 43(2): 143-148.
- 33- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L., & Lorito, M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72(1-3): 80-86.
- 34- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal* 24(2): 127-139.
- 35- Vincekovic, M., Jalsenjak, N., Topolovec-Pintaric, S., Dermic, E., Bujan, M., & Juric, S. (2016). Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: chitosan/alginate microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(43): 8073-8083. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02879>.
- 36- Wu, H., Xu, Y., Liu, G., Ling, J., Dash, B.C., Ruan, J., & Zhang, C. (2014). Emulsion cross-linked chitosan/nanohydroxyapatite microspheres for controlled release of alendronate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25(12): 2649-2658. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5289-y>.
- 37- Wu, J., Wang, Y., Yang, H., Liu, X., & Lu, Z. (2017). Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 175: 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.058>. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28917853.



Study on the Moths of the Subfamily Xyleninae (Lep.: Noctuidae) in Parts of Western Zagros in Khuzestan and Ilam Provinces

M. Ahamdi¹, M. Esfandiari^{2*}, A. Shirvani³

Received: 17-07-2021

Revised: 01-08-2021

Accepted: 12-03-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Ahmadi, M., Esfandiari, M. & Shirvani A. (2022). Study on the Moths of the Subfamily Xyleninae (Lep.: Noctuidae) in Parts of Western Zagros in Khuzestan and Ilam Provinces. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 197-212. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/JPP.2022.71249.1032](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.71249.1032)

Introduction

Noctuidae species are herbivores as caterpillars and some of them are most destructive crop pests. Moreover, they role as pollinators and prey in ecosystem. Early researches on Noctuidae of Iran were published more than 150 years ago. In recent two decades, Iranian researchers investigated the Noctuidae fauna of Iran and published several articles on different subfamilies. The subfamily Xyleninae may be paraphyletic and defined by plesiomorphic character states. Xyleninae in classic taxonomy is defined by the valva of male genitalia which is not as much constricted below the cucullus at the distal end of the clasper. The cuculus usually is expanded and bears a corona of stout setae. The ampulla is small and usually finger-like, except in Xylenina. Dorsal surface of sacculus is usually irregular in direction to the base. Vesica is often short and tube-like or triangular with few basal cornuti and an elongated patch of spines on the apical half of the vesica. In female genitalia, the ductus bursae is short and heavily sclerotized; and the appendix bursae is small and inconspicuous or absent. It is worth mentioning that Lepidoptera species are one of the important elements of Zagros mountain ranges which dominated by oak forests. Their larvae are important leaf-eaters of oak plants. Therefore, the aim of this research was determining the moths' fauna of Xyleninae subfamily belonging to Noctuidae in Zagros Mountains of Khuzestan and Ilam provinces.

Materials and Methods

Numerous night samplings were done to study the fauna of Xyleninae subfamily (Lep.: Noctuidae) in Zagros Mountains in the provinces of Khuzestan and Ilam during 2018-2019. Sampling was performed by light traps powered by 12 volt batteries and 8 watt UVB light tubes. Sampling areas were two locations in Khuzestan province namely Imamzadeh Abdollah village in Baghmalek (31°22'24"N, 50°07'51"E, 1407 m and 31°23'10"N, 50°09'29"E, 2118 m) and Shelal village in Andika (32°16'19"N, 49°33'07"E, 954 m and 32°19'10"N, 49°35'06"E, 1474 m) as well as two locations in Ilam province namely Kabir-Kouh in Abdanan (33°02'57"N, 47°18'04"E, 1215 m and 33°03'53"N, 47°18'40"E, 1730 m) and Protected Area of Manesht and Ghelarang (33°34'47"N, 46°33'52"E, 1719 m and 33°34'33"N, 46°36'15"E, 2215 m). The specimens and genitalia slides were deposited in the Insect and Mite Collection of Ahvaz (IMCA), Plant Protection Department, Shahid Chamran University of Ahvaz.

Results and Discussion

A total of 28 species belonging to 19 genera of Xyleninae were collected and identified. Among them, 9 and 15 species were new to the fauna of Khuzestan and Ilam provinces, respectively. Furthermore, *Dichonia pinkeri* (Kobes, 1973) is newly recorded from the fauna of Iran. Notes on the bionomy and distribution of the collected species as well as diagnostic characters and illustrations of wing patterns and genitalia for the *D. pinkeri* were

1 and 2- Associate Professor and Ph.D. Student in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, respectively.

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

3- Associate Professor in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

presented. According to the results, 9 species have not been recorded in the previous investigations in Khuzestan province. These species are as follows; *Caradrina boursini*, *Hoplodrina ambigua*, *Polyphaenis monophaenis*, *Apamea syriaca fusciorhoda*, *Sesamia* sp., *Atethmia centrigo*, *Evisa schawerdae*, *Leucochlaena muscosa*, *Pseudenargia deleta*. 15 out of 17 collected species in Ilam were new for the fauna of this province. Because this province was less explored previously for Noctuidae fauna. This indicates that we are still far from a complete provincial list of the Noctuidae in Iran. It needs more samplings especially in area and times which less explored already and using different methods such as bait traps. We didn't present the results on *Agrochola* species here and will treat them separately. 13 species were collected in both studied provinces, among which two species *Hoplodrina ambigua* and *Polyphaenis monophaenis* were new for the fauna of Khuzestan and Ilam. This implies that habitat of such species are Zagros areas including oak forest vegetations and their distribution range may be further expanded in Zagros range. Comparing to the results of Esfandiari et al. (2011) on the noctuid fauna of sugarcane plantations in Khuzestan province, only *Spodoptera exigua* and *Caradrina clavipalpis* out of their 9 Xyleninae species were recorded in the present study. This is because of semidesert climate in sugarcane farms which differs from climate and land cover of our sampling areas. It is necessary to investigate the noctuid fauna, complete the checklists and provide identification catalogues for Iran. Also, larval stages and food plants must be studied in each area. Furthermore, we need local taxonomic revisions in some groups.

Keywords: *Dichonia pinkeri*, Distribution, Fauna, New records

مطالعه شب پره‌های زیرخانواده Xyleninae (Lep.: Noctuidae) در بخش‌هایی از غرب زاگرس در استان‌های خوزستان و ایلام

محمد احمدی^۱ - مهدی اسفندیاری^{۲*} - اصغر شیروانی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۱

چکیده

گونه‌های خانواده Noctuidae در دوره لاروی گیاهخوار بوده و برخی در زمره خسارت‌بارترین آفات محصولات کشاورزی هستند. علاوه بر این، به‌عنوان گرده افشان و طعمه دیگر جانوران نیز در اکوسیستم نقش آفرینی می‌کنند. هدف از این تحقیق شناخت بیشتر فون شب‌پره‌های زیر خانواده Xyleninae از خانواده Noctuidae در کوه‌های زاگرس در استان‌های خوزستان و ایلام بود. نمونه‌ها در سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ در کوه‌های زاگرس در استان‌های خوزستان و ایلام و از مناطق بکر و طبیعی و به دور از اکوسیستم‌ها کشاورزی با استفاده از تله نوری جمع‌آوری شد. در این تحقیق ۲۸ گونه متعلق به ۱۹ جنس از زیرخانواده مذکور شناسایی شد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده ۹ گونه برای اولین بار از استان خوزستان و ۱۵ گونه برای اولین بار از استان ایلام معرفی می‌شوند. همچنین گونه *Dichonia pinkeri* (Kobes, 1973) برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. اطلاعات مربوط به بیونومی و پراکنش جغرافیایی نمونه‌های مطالعه شده همراه با ویژگی‌های افتراقی، تصاویر الگوی بال و اندام تناسلی برای *D. pinkeri* ارائه شده است. از بین گونه‌های جمع‌آوری شده، ۱۳ گونه در هر دو استان مشترک بود و از بین اینها *Hoplodrina ambigua* (Denis & Schiffermüller) و *Polyphaenis monophanis* Brandt برای فون هر دو استان جدید بودند.

واژه‌های کلیدی: پراکنش، گزارش جدید، فون، *Dichonia pinkeri*

مقدمه

شب‌پره‌ها بطور گسترده‌ای به عنوان شاخص‌های تنوع گیاهان و زیستگاه‌ها در اکوسیستم‌های جنگلی استفاده شده‌اند. لذا شناخت فون آنها دارای اهمیت زیادی است (Choi, 2011). از مهمترین خانواده‌های شب‌پره‌ها گونه‌های خانواده Noctuidae هستند که در دوره لاروی گیاهخوار بوده و در بلوغ از شهد گیاهان تغذیه می‌کنند. علاوه بر گیاهخواری که آنها را در زمره خسارت‌بارترین آفات محصولات کشاورزی قرار داده، به‌عنوان گرده افشان و طعمه دیگر

جانوران نیز در اکوسیستم نقش آفرینی می‌کنند (Regier et al., 2009). از آنجا که برخی گروه‌ها مانند گونه‌های متعلق به خانواده Erebidae بر اساس تقسیم‌بندی‌های جدید از خانواده Noctuidae جدا شده‌اند، این خانواده در حال حاضر از گونه‌های با ساختار رگبندی بال trifine تشکیل شده و شامل بیش از ۱۱۷۰۰ گونه می‌باشد (Nieukerken et al., 2011).

بر اساس رده بندی کلاسیک، زیر خانواده Xyleninae Guenée, 1837 توسط فییگر و لافونتین (Fibiger and Lafontaine, 2005) مجدد احیا شد. هرچند این زیر خانواده ممکن است پارافیلیتیک باشد و توسط صفات پلزیومورفیک^۴ تعریف شود، اما تلاش‌ها در جهت تعریف قبیله‌ها و زیرقبیله‌های مونوفیلیتیک در این زیرخانواده بوده است (Fibiger and Hacker, 2007). از صفات

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشیار و دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
(Email: esfandiari@scu.ac.ir)
*) نویسنده مسئول:
۳- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تشخیصی اندام تناسلی نرها والوها^۱ است که در زیر کوکولوس^۲ و انتهای کلاسیپر^۳ باریک شده، اغلب کوکولوس حاوی موهای درشت کوروناً^۴، آمپولا^۵ کوچک و انگشتی شکل (بجز در Xylenina)، سطح بالایی ساکولوس^۶ معمولاً نامنظم، وسیکاً^۷ اغلب کوتاه و لوله‌ای تا مثلی و با چند خار قاعده‌ای و دسته‌ای از خارهای انتهایی است. در ماده‌ها نیز مجرای بورس^۸ کوتاه و کیتینی شده و کیسه ضمیمه بورس^۹ کوچک و نامشخص است. اغلب لاروها در این زیرخانواده از درختان تغذیه می‌کنند، هرچند معدودی از جنس‌ها و قبایل از گیاهان علفی و یا درون ریشه آنها تغذیه می‌کنند (Fibiger and Hacker, 2007).

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد مطالعه در سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۸ در کوه‌های زاگرس در استان‌های خوزستان و ایلام و از مناطق بکر و طبیعی و به دور از اکوسیستم‌ها کشاورزی با استفاده از تله نوری توسط نویسنده اول جمع‌آوری شد. تله نوری حاوی لامپ مهتابی ۸ وات با نور ماوراءبنفش بود. مناطق نمونه‌برداری شامل ۸ ایستگاه در استان‌های خوزستان و ایلام بود (جدول ۱). شب‌پره‌هایی که در تله شکار می‌شدند توسط کلروفرم کشته و سپس برای اتاله و تهیه اسلاید از اندام تناسلی آن‌ها به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. برای تهیه اسلاید از روش فیبیرگر (Fibiger, 1997) استفاده شد. شناسایی گونه‌ها از روی الگوی بال و شکل دستگاه تناسلی با استفاده از منابع موجود مانند (Lodl et al., 2012; Fibiger and Hacker, 2007) انجام گردید. اسلایدها و نمونه‌های آنها در کلکسیون حشرات و کنه‌های اهواز، واقع در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز نگهداری می‌شوند. برای رده‌بندی نیز از لودل و همکاران (Lodl et al., 2012) تبعیت شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق ۲۸ گونه متعلق به ۱۹ جنس از زیرخانواده Xyleninae شناسایی شد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده ۹ گونه برای اولین بار از استان خوزستان و ۱۵ گونه برای اولین بار از استان ایلام معرفی می‌شوند. گونه‌های جدید برای استان خوزستان با علامت *، گونه‌های جدید برای استان ایلام با علامت [§] و گونه‌هایی که برای هر دو استان جدید می‌باشد با علامت ^{§*} مشخص شده‌اند. همچنین گونه *Dichonia pinkeri* (Kobes, 1973) برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. اطلاعات مربوط به بیونومی^{۱۰} و پراکنش جغرافیایی نمونه‌های مطالعه شده همراه با ویژگی‌های افتراقی، تصاویر الگوی بال و اندام تناسلی برای گزارش جدید فون ایران ارائه شده است.

گونه *Caradrina stenoptera* (Boursin, 1939)

تشخیص: (شکل ۱-۱) بال‌ها باریک و کشیده، رنگ پس زمینه

تحقیقات مختلفی توسط اروپایی‌ها روی فون Noctuidae در ایران انجام شده است که از زمان انجام برخی از آنها بیش از ۱۵۰ سال می‌گذرد (Brandt, 1941; Bienert, 1870) و بر این اساس ساختار کلی فون ایران مشخص است. ازجمله پژوهش‌های مهمی که توسط محققان خارجی در این زمینه انجام شده مقاله ابرت و هکر (Ebert and Hacker, 2002) می‌باشد که ۷۳۴ گونه از این خانواده را از مناطق مختلف ایران گزارش نموده‌اند. در دو دهه اخیر نیز انتشارات متعددی توسط پژوهشگران ایرانی در این زمینه منتشر شده است (Shahreyari-Nejad Esfandiari et al., 2015; et al., 2018; Shahreyari-Nejad et al., 2020; Shirvani et al., 2008). هرچند هنوز نیاز به کاوش‌های بیشتری روی فون طبیعت وسیع و متنوع ایران وجود دارد.

بخش قابل توجهی از مساحت ایران کوهستانی است و رشته کوه زاگرس که از شمال غربی به جنوب شرقی ایران امتداد یافته است، از استان‌های مختلفی می‌گذرد. تقریباً ۲۲/۵ درصد از گیاهان بومی ایران در مناطق کوهستانی قرار دارند که حدود نیمی از این گونه‌ها به مناطق کوهستانی زاگرس محدود شده و این منطقه توسط یک فلور بسیار غنی از گونه‌های گیاهی بومی پوشیده شده است (Noroozi et al., 2007). با توجه به گیاه‌خوار بودن غالب بال‌پولکداران این مساله منجر به ایجاد گونه‌های بومی و تنوع در بال‌پولکداران شده و همین امر بررسی فونستیک گونه‌های حشرات را در این مناطق حائز اهمیت می‌کند (Rajaei et al., 2013). از آن‌جا که بال‌پولکداران از عناصر مهم جامعه حشرات در جنگل‌های بلوط هستند و لارو آنها مهمترین برگ‌خواران گیاه بلوط می‌باشند (Patocka Patocka et al., 1962);

- 1- Valves
- 2- Cucullus
- 3- Clasper
- 4- Corona
- 5- Ampulla
- 6- Sacculus
- 7- Vesica
- 8- Ductus bursae
- 9- Apendix bursa

بال‌های جلو قهوه‌ای و لکه‌های لوبیایی و گرد کم‌رنگ شده، ناحیه ماقبل انتهایی و یک سوم انتهایی بال جلو به طور یکنواختی تیره‌تر شده، بال‌های عقب سفید با خطوط عرضی قهوه‌ای و فاقد لکه یا نشانه.

بیونومی: دوره پرواز این گونه اواخر بهار تا تابستان است. مراحل

نابالغ آن تاکنون ناشناخته‌اند (Fibiger and Hacker, 2007). پراکنش: این گونه بومی ایران است. تاکنون از استان‌های فارس، لرستان و اخیراً از خوزستان گزارش شده است (Hacker, 2004; Shahreyari-Nejad et al., 2017).

نمونه‌های مطالعه شده: ۱♀، ۱۳۹۷/۴/۲۲، ایستگاه ۲.

جدول ۱- مشخصات مناطق نمونه‌برداری همراه با مختصات جغرافیایی آنها در ایران

Table 1- Details of sampling localities with their geographic coordinates in Iran

ارتفاع از سطح دریا	مختصات جغرافیایی	منطقه	شماره ایستگاه
Elevation	GPS coordinates	Location	Station number
1407 m	31°22'24"N 50°07'51"E	Khuzestan Province, Baghmalek, Imamzadeh Abdollah village	1
2118 m	31°23'10"N 50°09'29"E	Khuzestan Province, Baghmalek, Imamzadeh Abdollah village	2
954 m	32°16'19"N 49°33'07"E	Khuzestan Province, Andika, Shelal village	3
1474 m	32°19'10"N 49°35'06"E	Khuzestan Province, Andika, Shelal village	4
1215 m	33°02'57"N 47°18'04"E	Ilam Province, Abdanan, Kabirkooch	5
1730 m	33° 03'53"N 47°18'40"E	Ilam Province, Abdanan, Kabirkooch	6
1719 m	33°34'47"N 46°33'52"E	Ilam Province, Manesht and Ghelarang protected area	7
2215 m	33°34'33"N 46°36'15"E	Ilam Province, Manesht and Ghelarang protected area	8

گونه *Caradrina bodenheimeri* (Draudt, 1934) *

تشخیص: (شکل ۱-۲) اگر چه برخی نمونه‌ها دارای واریاسیون هستند اما به‌طور کلی رنگ زمینه بال‌های جلو قهوه‌ای و بال‌های عقب دودی رنگ با حاشیه خارجی تیره، خطوط پیش میانی، میانی و پس میانی مشخص، تیره و موج‌دار، در نسل پاییزه خطوط عرضی کمتر مشخص است.

بیونومی: این گونه در نواحی نیمه بیابانی انتشار دارد. دو نسل در سال داشته که نسل پاییزه تیره‌تر و کوچک‌تر است. لاروها از گیاهان کوچک علفی مانند *Calendula* sp. تغذیه می‌کنند (Hacker, 2001; Hacker, 2004).

پراکنش: این گونه در بخش‌هایی از خاورمیانه و خاور نزدیک انتشار دارد (Hacker, 2004). در ایران از استان‌های اصفهان، زنجان، تهران، فارس، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان، خوزستان، بوشهر، هرمزگان (Hacker, 2004; Ebert and Hacker, 2002)؛ گلستان و خراسان شمالی (Wieser and Stangelmaier, 2005)، کرمان (Shirvani, 2012) خراسان رضوی (Rabieh et al., 2013) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ۱♂، ۱۳۹۷/۳/۶، ۱♀، ۱۳۹۷/۸/۱۷، ۳♂، ۱۳۹۸/۲/۱۵، ایستگاه ۱، ۱♀، ۱۳۹۷/۳/۲، ۲♀، ۱۳۹۷/۸/۱۳، ۴♂، ۱۳۹۸/۲/۱۲، ۳♀، ۱۳۹۸/۲/۱۶، ایستگاه ۴. ۱♂، ۱۳۹۷/۲/۲۵، ایستگاه ۷، ۵♂، ۵♀، ۱۳۹۷/۳/۱۳، ایستگاه ۸، ۴♀، ۱۳۹۸/۲/۱۵، ایستگاه ۱، ۵♂، ۱۰♀، ۱۳۹۷/۲/۲۳، ایستگاه ۸.

گونه *Caradrina boursini* (F. Wagner, 1936) *

تشخیص: (شکل ۱-۳) شاخک ماده نخی و در نر نخی همراه با مژه‌های ریز، بال‌های جلو کشیده و باریک، رنگ زمینه بالها بژ متمایل به قهوه‌ای روشن، ناحیه ماقبل انتهایی تیره‌تر، خطوط عرضی به جز خط ماقبل انتهایی ضعیف، لکه‌های گرد و لوبیایی شکل دارای لکه‌های تیره‌تر از رنگ زمینه. بال عقب سفید، رگبال‌ها پوشیده با فلس کرم، خط انتهایی مشخص، ریشک‌ها سفید. این گونه از روی شکل کیسه وسیکا در اندام تناسلی نر نیز از گونه‌های مشابه در دنیا قابل تفکیک است.

بیونومی: این گونه در بهار فعال بوده و به نور جلب می‌شود. مراحل نابالغ و گیاهان میزبان آن تاکنون ناشناخته است.

پراکنش: این گونه در ایران، ترکیه و ارمنستان انتشار دارد (Hacker, 2004). در ایران از کوه‌های البرز، مازندران، زنجان و آذربایجان شرقی (Hacker, 2004; Ebert and Hacker, 2002) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ۱♀، ۱۳۹۷/۲/۵، ایستگاه ۲.

گونه *Caradrina clavipalpis* (Scopoli, 1763) *

تشخیص: (شکل ۱-۴) این گونه از گونه‌های مشابه و نزدیک خود به وسیله رنگ زمینه بژ-قهوه‌ای کم‌رنگ در بال جلو، بال عقب سفید رنگ که گاهی در ماده‌ها سایه‌ای در ناحیه ماقبل انتهایی دارد، لکه‌های لوبیایی و گرد با حاشیه تیره، نوار ماقبل انتهایی مشخص و

در حاشیه داخلی قهوه‌ای - قرمز شناسایی می‌شود.

بیونومی: گونه‌ای چندخوار است، گیاهان میزبان زیادی دارد و گاهی به محصولات کشاورزی هم صدمه می‌زند. چند نسلی بوده و در مناطق گرمسیر در تمام سال فعال است (Fibiger and Hacker, 2007; Shahreyari-Nejad et al., 2017).

پراکنش: این گونه در اروپا، شمال آفریقا، خاورمیانه و خاور نزدیک انتشار دارد (Hacker, 2004). در ایران از استان‌های آذربایجان غربی و شرقی، تهران، مازندران، گیلان، گلستان، خراسان شمالی و رضوی، کرمانشاه، کردستان، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، فارس، هرمزگان، خوزستان و کرمان تاکنون گزارش شده است (Shahreyari-Nejad et al., 2017).

نمونه‌های مطالعه شده: ۴♀ ۶♂، ۱۳۹۷/۳/۱۳، ۱۵♂ ۱♀
 ۱۳۹۸/۲/۲۳، ۸♂ ۲♀ ۳♂، ۱۳۹۷/۴/۲۸، ۱♂، ۱۳۹۷/۶/۱۹،
 ۸♀ ۲۰♂، ۱۳۹۸/۲/۲۲، ایستگاه ۷، ۱♂، ۱۳۹۷/۲/۲۳، ۱۱♀
 ۱۳۹۸/۲/۲۱، ایستگاه ۶، ۲♀ ۲♂، ۱۳۹۷/۲/۲۲، ۳۰♀ ۱۰♂
 ۱۳۹۸/۲/۲۰، ایستگاه ۵، ۵♀ ۳♂، ۱۳۹۷/۳/۷، ۱♀، ۱۳۹۷/۶/۳۱،
 ۱۲♀ ۳۰♂، ۱۳۹۸/۲/۱۶، ایستگاه ۲، ۱♂، ۱۳۹۷/۷/۱، ۲۰♀ ۱۳♂
 ۱۳۹۸/۲/۱۵، ایستگاه ۱، ۱۵♂ ۱۴♀، ۱۳۹۷/۳/۳، ۳♂ ۲۸♀
 ۱۳۹۷/۶/۴، ۳♂، ۱۳۹۷/۸/۱۲، ۲♂ ۱♀، ۱۳۹۸/۲/۱۲، ایستگاه ۳،
 ۲♀ ۳♂، ۱۳۹۷/۳/۲، ۶♂، ۱۳۹۷/۸/۱۳، ۴♂ ۱♀، ۱۳۸۹/۲/۱۳،
 ایستگاه ۴.

Hoplodrina ambigua (Denis & Schiffermüller, گونہ
*\$ 1775)

تشخیص: (شکل ۵-۱) رنگ زمینه بال‌های جلو و سر و سینه قهوه‌ای-خاکستری، بال عقب سفید کدر، میزان تیرگی رنگ بال جلو متغیر، لکه‌های لوبیایی و گرد بزرگ، با مرکز تیره و حاشیه روشن، نوار پیش میانی معمولاً وجود ندارد، نوار پس میانی شامل ردیفی از نقاط سیاه کوچک، نوار انتهایی و ماقبل انتهایی مستقیم بوده و فقط کمی انحنا دارند. در نمونه ما جزییات نقوش بال جلو پاک شده است.

بیونومی: دارای دو تا سه نسل در سال است و لارو آن از گیاهان علفی تغذیه می‌کند. تمایل به مناطق گرم و خشک و گاهی مهاجرت دارد (Fibiger and Hacker, 2007).

پراگشت: این گونه از استان‌های تهران، خراسان رضوی، مازندران، گیلان، گلستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، البرز و کرمان (Koçak and Kemal 2014; Ebert and Hacker, 2002) ; (Lehmann and Zahiri, 2011; Rabieh *et al.*, 2013) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۳/۲، ایستگاه ۴، ♂ ۲، ۱۳۹۷/۲/۲۴، ایستگاه ۱، ۱۳۹۸/۲/۱۶، ایستگاه ۲، ♂ ۱، ۱۳۹۷/۲/۲۵، ایستگاه ۷.

***\$ 1775)**

تشخیص: (شکل ۵-۱) رنگ زمینه بال‌های جلو و سر و سینه قهوه‌ای-خاکستری، بال عقب سفید کدر، میزان تیرگی رنگ بال جلو متغیر، لکه‌های لوبیایی و گرد بزرگ، با مرکز تیره و حاشیه روشن، نوار پیش میانی معمولا وجود ندارد، نوار پس میانی شامل ردیفی از نقاط سیاه کوچک، نوار انتهایی و ماقبل انتهایی مستقیم بوده و فقط کمی انحنا دارند. در نمونه ما جزییات نقوش بال جلو پاک شده است.

بیونومی: دارای دو تا سه نسل در سال است و لاروان از گیاهان علفی تغذیه می‌کند. تمایل به مناطق گرم و خشک و گاهی مهاجرت دارد (Fibiger and Hacker, 2007).

پراکنش: این گونه از استان‌های تهران، خراسان رضوی، مازندران، گیلان، گلستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، البرز و کرمان (Koçak and Kemal 2014; Ebert and Hacker, 2002) ;

پراکنش: این گونه بومی ایران است و در ایران از استان‌های فارس، کردستان، کرمانشاه، لرستان و کهگیلویه و بویراحمد (Ebert

بزرگتر و پهن‌تر، خطوط پیش و پس میانی به طور مشخص موجدتر که تولید دندان‌های تیز و نوار میانی تیره ضعیفی کرده و حتی ممکن است نوار میانی دیده نشود. در جنس نر این گونه بر خلاف A. *maraschi* کرمانای شکمی (coremata) داری کیسه و اندام برس مانند است.

بیونومی: این شب‌پره به نور و مواد قندی جلب شده و در فصل بهار فعال است. لارو و گیاهان میزبان آن هنوز شناخته نشده است (Ravan et al., 2016).

پراکنش: این گونه از خاور نزدیک، سوریه، اردن و فلسطین اشغالی گزارش شده است (Zilli et al., 2009). در ایران برای اولین بار توسط روان و همکاران (Ravan et al., 2016) از خوزستان گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۳/۷، ایستگاه ۲، ♂ ۲، ۱۳۹۷/۳/۲، ۹۸/۲/۱۳، ایستگاه ۴، ♂ ۴، ۱۳۹۷/۳/۳، ۱۳۹۸/۲/۱۲، ایستگاه ۳، ♀ ۴، ۱۳۹۷/۲/۲۵، ♂ ۷، ۱۳۹۸/۲/۲۲، ایستگاه ۷، ♂ ۳، ۱۳۹۷/۳/۱۳، ♂ ۳، ♀ ۲، ۱۳۹۸/۱/۲۳، ایستگاه ۸، ♂ ۴، ♀ ۳، ۱۳۹۷/۲/۲۳، ایستگاه ۵، ♂ ۲۴، ♀ ۶، ۱۳۹۷/۲/۲۲، ♂ ۷، ♀ ۱، ۱۳۹۸/۲/۲۰، ایستگاه ۶، ♂ ۱، ۱۳۹۷/۳/۷، ایستگاه ۲، ♂ ۲، ۱۳۹۷/۳/۳، ♀ ۴، ۱۳۹۸/۲/۱۲، ایستگاه ۳، ♂ ۲، ۱۳۹۷/۳/۲، ♂ ۱، ۱۳۹۸/۲/۱۳، ایستگاه ۴.

گونه * *Sesamia* sp.

تشخیص: (شکل ۱-۱۱) این گونه به گونه *Sesamia rungsi* Boursin, 1975 نزدیک است. اما شناسایی قطعی آن به مطالعه بیشتری نیاز داشته و در دست بررسی است.

پراکنش: با توجه به عدم شناسایی گونه در مورد پراکنش آن نمی‌توان نظر داد. اما گونه *S. rungsi* قبلاً از استان‌های کرمان و هرمزگان (Ebert and Hacker, 2002) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۱۲/۱۷، ایستگاه ۱.

گونه * *Episema lederi* Christoph, 1885

تشخیص: (شکل ۱-۱۲) شاخک نر کاملاً شانه‌ای، خطوط عرضی موجددار، داخل لکه‌های بزرگ گرد و لوبیایی روی بال قهوه‌ای بسیار کم‌رنگ، رنگ زمینه بال عقب هم رنگ بال جلو.

بیونومی: در مناطق گرم و خشک زندگی می‌کند. تک نسلی بوده و معمولاً در پاییز یافت می‌شود. ماده‌ها سر شب و نرها معمولاً بعد از نیمه شب به نور جلب می‌شوند. لارو از خانواده گندمیان تغذیه می‌کند (Ronkay et al., 2001).

پراکنش: این گونه در ایران از استان‌های کرمانشاه، گیلان، البرز، تهران، آذربایجان غربی، فارس، گلستان، خراسان شمالی و رضوی (Gutleb and Wieser, 2002; Ebert and Hacker, 2002) و (Rabieh et al., 2013; Wieser and Stangelmaier, 2005)

(Koçak and Kemal 2014 and Hacker, 2002) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۴/۲۲، ایستگاه ۲، ♂ ۲، ۱۳۹۷/۴/۲۸، ایستگاه ۷، ۱۳۹۷/۴/۲۹، ۱۳۹۷/۶/۱۸، ایستگاه ۸.

گونه * *Apamea syriaca fusciorhoda* Zilli et al., 2009

تشخیص: (شکل ۸-۱) هر سه گونه *Apamea* ذکر شده در این تحقیق در گروه - گونه *monoglypha* قرار دارند. غالب گونه‌های این گروه به سختی توسط اندام تناسلی از هم قابل تفکیک هستند. در این گونه لکه گرد با زمینه زرد و نخودی ولی بدون حاشیه تیره خیلی واضح می‌تواند آن را از دو گونه هم جنس خود در این تحقیق تفکیک کند.

بیونومی: بالغین این گونه در بهار و تابستان تا اوایل پاییز فعال هستند. به نور جلب شده و در ایران در اکوسیستم زاگرس فعالیت دارد. **پراکنش:** این گونه در اطراف دریای مدیترانه تا ایران انتشار دارد. زیر گونه حاضر در ایران از استان‌های نیمه غربی کشور گزارش شده است (Ebert and Hacker, 2002).

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۹، ♀ ۲، ۱۳۹۷/۳/۳، ۱۳۹۸/۲/۱۲، ایستگاه ۳، ♂ ۱، ۱۳۹۸/۲/۲۱، ایستگاه ۵.

گونه * *Apamea maraschi* (Draudt, 1934)

تشخیص: (شکل ۹-۱) بال جلو خاکستری تیره و انتهای بال تا حدی گرد شده، خطوط عرضی و لکه‌های گرد و لوبیایی براحتی قابل مشاهده، لکه چماقی ممکن است نباشد، اطراف لکه‌های لوبیایی و گرد توسط پولک‌های سفید رنگی پوشیده شده، نوار پیش میانی و ماقبل انتهایی سینوسی شکل و دنداندار و شبیه W، بال عقب خاکستری روشن و رگبال‌های عرضی به وضوح قابل مشاهده است. کرمانای شکمی در جنس نر این گونه فاقد کیسه و اندام برس مانند است.

بیونومی: این گونه در ماه‌های فصل بهار فعال است. لارو و گیاهان میزبان آن هنوز شناخته نشده است (Ravan et al., 2016).

پراکنش: این گونه در ایران، ترکیه، عراق و شمال سوریه انتشار دارد. در ایران از شمال غربی ایران (Hacker, 1990)، خوزستان (Ravan et al., 2016) و فارس (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ایلام: ♂ ۵، ♀ ۲، ۱۳۹۷/۳/۱۳، ایستگاه ۸.

گونه * *Apamea damascena* Zilli, Varga, Ronkay & Ronkay, 2009

تشخیص: (شکل ۱۰-۱) از نظر شکل ظاهری بسیار شبیه به A. *maraschi* با این تفاوت که اندازه A. *damascena* بزرگتر، بال جلو کشیده‌تر و رنگ آن به طور یک دست قهوه‌ای متمایل به قرمز یا بژ با نقاط پراکنده خاکستری یا بدون آن است. همچنین دارای لکه‌های

کرمان (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۸/۲۳، ایستگاه ۷.

گونه *Maraschia grisescens* (Osthelder, 1933)

تشخیص: (شکل ۱-۱۳) سر، قفس سینه و بال جلو خاکستری تا قهوه‌ای تیره، نوار پیش میانی و میانی موجدار اما در همه نمونه‌ها دیده نمی‌شود، دو لکه لوبیایی و گرد به ویژه لوبیایی که تیره تر است دیده می‌شود، لبه‌های جلویی بال جلو و حاشیه‌های خارجی بال عقب تیره‌تر، بال عقب سفید با رگبال و نقاط تیره، لکه دیسکال به سختی قابل دیدن است.

بیونومی: گونه‌ای گرما دوست است که یک نسل در سال دارد و از اواخر شهریور تا اواخر آبان بالغ آن فعال است. تغذیه لاروها از درختان بلوط و افرا می‌باشد (Kravchenko et al., 2007).

پراکنش: این گونه در منطقه پالتارکتیک از اروپا تا آسیای میانه انتشار دارد. در ایران از استان‌های فارس (Ebert and Hacker, 2002)، کرمان (Ravan et al., 2016)، و خوزستان (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۶/۲۸، ایستگاه ۳.

گونه *Conistra pseudopolitina* Hacker, 1990

تشخیص: (شکل ۱-۱۴) رنگ زمینه بال جلو به قهوه‌ای آجری متمایل است، انتهای بال‌های جلو مربعی، لکه‌های گرد و لوبیایی دیده می‌شوند و لکه گرد بزرگ و تقریباً به اندازه لکه لوبیایی است. رگبال‌ها دارای پولک‌های روشن و در زمینه بال جلو کاملاً مشخص، اما در بال عقب رگبال‌ها از پولک‌های تیره پوشیده شده، در ناحیه ماقبل انتهایی بال جلو نوار روشنی که درون آن و در حد فاصل رگبال‌ها لکه‌های تیره وجود دارد دیده می‌شود.

بیونومی: در نواحی گرمسیری در تمام سال فعال است. به نور جلب می‌شود و مراحل نابالغ آن مطالعه نشده است.

پراکنش: این گونه در ایران، ترکیه و تاجیکستان انتشار دارد (Hacker, 1990; Benedek et al., 2021). در ایران از استان‌های بوشهر (Lehmann et al., 2009) و خوزستان (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۲، ۱۳۹۷/۱۰/۷، ۱۳۹۷/۱۲/۸، ایستگاه ۴، ♂ ۳، ♂ ۲، ۱۳۹۷/۱۱/۵، ۱۳۹۷/۱۱/۶، ۱۳۹۷/۱۲/۶، ایستگاه ۱، ♂ ۱، ۱۳۹۸/۲/۲۳، ایستگاه ۸، ♂ ۴، ۱۳۹۷/۲/۲۰، ۱۳۹۷/۱۲/۲۳، ایستگاه ۶، ♂ ۳، ۱۳۹۷/۱۲/۲۴، ۱۳۹۷/۱۰/۱۵، ۱۳۹۷/۲/۲۳، ایستگاه ۵.

گونه *Dicycla oo* (Linnaeus, 1758)

تشخیص: (شکل ۱-۱۵) سر، قفس سینه و رنگ زمینه بال‌های جلویی زرد متمایل به نارنجی تا زرد متمایل به قهوه‌ای، وجود این

رنگ متمایز یک الگوی خوب برای تشخیص این گونه است. خطوط عرضی بال‌ها بخوبی دیده شده، نوار پیش میانی و پس میانی بخوبی قابل تشخیص، لکه‌های گرد، لوبیایی و چماقی شکل بازمنه زرد رنگ به وضوح دیده می‌شوند. بال‌های عقب زرد رنگ و در حاشیه انتهایی دارای خطوط قهوه‌ای.

بیونومی: حشرات بالغ از اواسط اردیبهشت ماه در مناطق مطالعه شده ظاهر می‌شوند. لارو این گونه تک میزبان است و درخت بلوط را مورد تغذیه قرار می‌دهد (Fibiger and Hacker, 2007).

پراکنش: در شمال دریای مدیترانه تا ایران انتشار دارد. این گونه از استان‌هایی مانند اصفهان (Hacker and Kautt, 1999)، آذربایجان غربی، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، کردستان (Ebert and Hacker, 2002)، کرمانشاه، خوزستان (Ravan et al., 2016) و گلستان (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است (Wieser, 2002).

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۵، ♀ ۴، ۱۳۹۷/۳/۲، ایستگاه ۴، ۱۳۹۷/۳/۳، ایستگاه ۳. ♂ ۱۴، ♀ ۴، ۱۳۹۷/۳/۱۳، ایستگاه ۸، ♂ ۲۰، ♀ ۶، ۱۳۹۸/۲/۲۲، ایستگاه ۷، ♂ ۲۱، ♀ ۱۰، ۱۳۹۷/۲/۲۱، ایستگاه ۵، ♂ ۳۸، ♀ ۱۸، ۱۳۹۷/۲/۲۲، ۱۳۹۸/۲/۲۰، ایستگاه ۶، ♂ ۸، ♀ ۶، ۱۳۹۸/۲/۲۳، ایستگاه ۸.

گونه *Atethmia centrargo* (Haworth, 1809)

تشخیص: (شکل ۲-۱) رنگ زمینه سر، سینه و بال‌ها زرد لیمویی کم‌رنگ، ناحیه میانی و نیمه خارجی ناحیه انتهایی بال جلو تیره‌تر، رگبال‌ها به ویژه در بال عقب با پولک‌های قهوه‌ای تیره، خطوط پیش میانی و پس میانی به رنگ قهوه‌ای، واضح، بدون موج، بال به طرف خط انتهایی تیره، واضح و سینیوسی و زمینه بال به طرف آن تیره‌تر، لکه لوبیایی داخلش تیره‌تر ولی ناواضح است. بال عقب نیز به طرف حاشیه بال تیره‌تر.

بیونومی: این گونه در مناطق گرم و خشک یافت می‌شود و در اروپا از گیاهان زبان گنجشگ، نارون و افرا تغذیه می‌کند. معمولاً در تابستان و پاییز فعال است و به نور جلب می‌شود (Ronkay et al., 2001).

پراکنش: این گونه از استان‌های تهران و فارس گزارش شده است (Ebert and Hacker, 2002).

نمونه‌های مطالعه شده: ♀ ۱، ۱۳۹۷/۸/۱۲، ایستگاه ۳.

گونه *Evisa schawerdae* Reisser, 1930

املائی schawerdae که در برخی منابع آمده اشتباه است (Steiner, 1991).

تشخیص: (شکل ۲-۲) سر، سینه و بال‌های جلو خاکستری تیره، با پولک‌های سفید-خاکستری و نقاط پراکنده سیاه رنگ به ویژه روی رگبال‌ها و خطوط حاشیه بال، خط قاعده‌ای سیاه و کشیده، لکه‌های

اروپا پراکنش دارد. در گونه *D. pinkeri* بال‌های جلویی نسبت به گونه *D. aprilina* کشیده‌تر و باریک‌تر هستند (Ronkay et al., 2001). دستگاه تناسلی در دو جنس این دو گونه کاملاً متمایز از یکدیگر است.

اندام تناسلی نر: (شکل ۲-۵) انکوس^۱ کوتاه، باریک و نوک‌تیز. تگومن^۲ باریک و کوتاه. والوها نامتقارن، اسکروتینی و ستر، ساکولوس اسکروتینی، باریک و کشیده، هارپ^۳ ضخیم، و ستر، نوک‌تیز و در انتها خمیده، کولوس وسیع، نیم دایره‌ای، کورونا وجود ندارد، صفحه کناری اسکروتینی، وسیع، در انتها دارای زائده انگشت مانند. یوکستا^۴ عریض و کشیده، وینکولوم^۵ شکل. ادیاگوس^۶ (شکل ۲-۶) باریک و لوله مانند و در سرتاسر خود دارای عرض مساوی، وسیکا لوله مانند و کوتاه.

اندام تناسلی ماده: بر اساس تصاویر منتشر شده رونکای و همکاران (Ronkay et al., 2001)، تخم‌ریز نسبتاً کوتاه، پایلا آنالیز^۷ نسبتاً بزرگ و مودار، آپوفیزها^۸ کوتاه و ظریف، مجرای بورسا کوتاه، در محل اتصال به کیسه بورسا^۹ کمی اسکروتینی، کیسه بورسا غشایی، نسبتاً کوتاه اپندیکس بورسا کوچک.

بیونومی: گونه‌ای نسبتاً ناشناخته است. این گونه در مناطق گرم و خشک یافت شده که مرتفع بوده و پوشیده از جنگل‌های بلوط است. ظهور حشرات بالغ در اواخر پاییز و معمولاً از نیمه دوم آبان تا اواخر آذر می‌باشد. پروانه‌ها شب فعال هستند، و در هنگام غروب و اوایل شب به تله طعمه‌ای قندی جلب شده اما بعداً به سمت نور جلب می‌شوند. زمستان‌گذرانی به صورت تخم است که نزدیک جوانه‌های بلوط به‌ویژه *Quercus pubescens* گذاشته می‌شوند (Ronkay et al., 2001).

پراکنش: در شرق نواحی مدیترانه مانند بلغارستان، یونان و قسمت‌های اروپایی ترکیه انتشار دارد. در خارج از اروپا از مرکز و شرق ترکیه، آذربایجان و ارمنستان گزارش شده است (Ronkay et al., 2001). این گونه برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود.

نمونه‌های مطالعه شده: ۱♂، ۱۳۹۷/۸/۲۱، ایستگاه ۶.

گونه Dryobotodes glaucus Ronkay & Gyulai, 2006^۵

تشخیص: (شکل ۲-۷) رنگ سر، سینه و زمینه بالهای جلو قهوه‌ای، سه لکه چماقی، گرد و لوبیایی روی بال به طور قابل توجهی

گرد و لوبیایی مشخص و با حاشیه سیاه، حاشیه لکه لوبیایی ناقص و نیمه پایینی تیره‌تر. خط انتهایی در هر دو بال سیاه و مشخص.

بیونومی: در اواخر تابستان و پاییز فعال است و درخت بلوط یکی از میزبان‌های آن می‌باشد. در مناطق مرتفع پراکنش دارد (Legrain et al., 1989).

پراکنش: این گونه در جنوب اروپا تا ترکیه و ایران پراکنده است. در ایران از استان فارس گزارش شده است (Koçak and Kemal, 2014).

نمونه‌های مطالعه شده: ۲♂، ۱۳۹۷/۸/۱۲، ایستگاه ۳.

گونه Scotochrosta pulla (Denis & Schiffermüller, 1775)^۵

تشخیص: (شکل ۲-۳) اندازه بزرگ، بدن درشت، بال جلو کشیده و در انتها پهن، رنگ زمینه بال سبز-زرد کم‌رنگ با پولک‌های خاکستری، تیرگی رگال‌ها در بال جلو واضح‌تر از رگهای عرضی، ناحیه ماقبل انتهایی روشن‌تر، لکه‌های گرد و لوبیایی کوچک، روشن و با حاشیه نامشخص، بال عقب سفید با رگال‌های قهوه‌ای تیره کاملاً مشخص.

بیونومی: در مناطق گرم و خشک که دارای درخت‌های بلوط است پراکنش دارد. از بهار تا پاییز فعال است.

پراکنش: در ایران از استان‌های اصفهان (Poorshabanan and Shirvani, 2012)، خوزستان و فارس (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ۱♂، ۱۳۹۷/۶/۲۸، ایستگاه ۴، ۱۹♂، ۱۰♀، ۱۳۹۷/۸/۲۳، ایستگاه ۷.

گونه Dichonia pinkeri (Kobes, 1973)

تشخیص: (شکل ۲-۴) حشره نر: عرض بدن با بال‌های باز ۴۲ میلی‌متر، شاخک، سر، قفس سینه و رنگ زمینه بال‌های جلویی سبز-اخرایی کم‌رنگ. بال جلو کشیده، مثلی شکل، دارای نقاط سیاه‌رنگ کناری، خطوط و نوارهای عرضی بال واضح، خط قاعده ای مشخص، خطوط عرضی پیش و پس میانی به‌صورت واضح دوتایی، خط حاشیه‌ای مشخص، متشکل از فلس‌های پیکان مانند، ریشک‌ها به طور منقطع سفید و سیاه. ناحیه میانی بال کمی تیره‌تر. لکه‌های لوبیایی و گرد کامل و مشخص، روشن‌تر از رنگ زمینه بال، در مرکز تیره رنگ، لکه مثلی شکل نامشخص. ناحیه زیرین بال با فلس‌های سیاه پراکنده، نواحی میانی و پس میانی تیره‌تر، لکه‌های گرد و لوبیایی شکل مشخص، بال عقب دارای فلس‌های تیره، ناحیه حاشیه‌ای تیره‌تر، لکه دیسکال وجود دارد، ریشک‌ها همانند بال جلو. ناحیه زیرین بال سفید با فلس‌های سیاه بسیار پراکنده، لکه دیسکال و نوار عرضی واضح، تیره رنگ.

این گونه بسیار شبیه به گونه *D. aprilina* (L.) است که در

- 1- Uncus
- 2- Tegumen
- 3- Harpe
- 4- Juxta
- 5- Vinculum
- 6- Aedeagus
- 7- Papilla analis
- 8- Apophysis
- 9- Corpus bursae

تشخیص: (شکل ۲-۹) سر، قفس سینه و بال جلو سفید مایل به خاکستری، الگوی واضح و مشخصی در بال جلو دیده نمی‌شود، نوار پیش و پس میانی فاصله دار، سینه‌سی، کم‌رنگ و با حاشیه‌ای از پولک‌های سفید، نوار ماقبل انتهایی سفید و با لکه‌های خاکستری احاطه شده، لکه لویایی و گرد نسبتاً بزرگ و با زمینه زرد روشن مشخص شده، بال عقب سفید شفاف گاهی متمایل به خاکستری با حاشیه تیره.

(Kemal, 2014) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۸/۲۳، ایستگاه ۷.

گونه *Polymixis colluta apothaina* (Brandt, 1938)

تشخیص: (شکل ۲-۱۲) سر، قفس سینه، شکم و بال‌های جلو بژ-قهوه‌ای روشن، ناحیه ماقبل انتهایی کمی تیره تر، لکه‌های گرد، لوبیایی و مثلثی شکل به رنگ زمینه، به طور ظریف با خطوط پرنرنگ احاطه شده، حد فاصل لکه گرد و لوبیایی تیره رنگ، خطوط قاعده‌ای و پیش میانی ضعیف، خطوط پس میانی و انتهایی منقطع. بال عقب در قاعده سفید، نیمه انتهایی قهوه‌ای. این گونه با گونه *Polymixis gracilis* (Brandt, 1941) از این نظر که در گونه دوم فلس‌های سیاه و دودی در بال وجود دارد و خطوط پیش و پس میانی واضح و تیره رنگ هستند متمایز می شود. تفاوت‌های بیشتر در اندام تناسلی این گونه‌ها بسیار مشخص است.

بیونومی: بر اساس اطلاعاتی که تاکنون از مطالعه این گونه ثبت شده، دوره پرواز آن از بهار تا پاییز است. مراحل نابالغ و گیاهان میزبان آن تاکنون گزارش نشده است.

پراکنش: این زیرگونه بومی ایران است و از البرز، تهران، آذربایجان غربی (Ebert and Hacker, 2002)، فارس و خوزستان (Ravan et al., 2016)، لرستان، کرمان، سیستان و بلوچستان (Feizpoor and Shirvani, 2014)، هرمزگان (Lehmann et al., 2009)، گلستان، خراسان شمالی، کهگیلویه و بویراحمد و کردستان (Shahreyari-Nejad et al., 2018) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ۱۳۹۷/۸/۱۷، ایستگاه ۱.

گونه *Polymixis crinomima* (Wiltshire, 1946)

تشخیص: (شکل ۲-۱۳) سر، قفس سینه، شکم و رنگ زمینه بال‌های جلو آجری تا قهوه‌ای متغیر، لکه‌های گرد، لوبیایی و مثلثی شکل به رنگ زمینه، احاطه شده با خطوط تیره، نوک و حاشیه عقبی لکه مثلثی به طور مشخص با فلس سیاه پوشیده شده، خط عرضی سیاه قاعده‌ای مشخص و نسبتاً طویل، خطوط عرضی وجود دارند، خط پس میانی در قسمت عقبی پوشیده با فلس سیاه و در تماس با فلس‌های حاشیه عقبی لکه مثلثی. بال عقب سفید گاهی پوشیده با فلس‌های قهوه‌ای روشن، ریشک‌ها سفید. این گونه با دارا بودن خطوط عرضی سیاه در بال جلو از گونه‌های دیگر متمایز است.

بیونومی: دو نسلی بوده و در بهار و پاییز فعال است. زیستگاه آن مناطق کوهستانی و خشک است.

پراکنش: این گونه بومی ایران است و از کرمانشاه، فارس (Ebert and Wiltshire, 1946 and Hacker, 2002)، کرمان (Shirvani, 2012)، گلستان و خراسان شمالی (Wieser and Stangelmaier, 2005)، بوشهر (Lehmann et al., 2009)، سیستان و بلوچستان (Kazemi, 2013) و خوزستان (Shahreyari-Nejad et al., 2018)

گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۲، ۱۳۹۷/۸/۱۶، ایستگاه ۲.

گونه *Leucochlaena muscosa* (Staudinger, 1892)

تشخیص: (شکل ۲-۱۴) رنگ زمینه سر، سینه و بال جلو قهوه‌ای با نقوش کرم رنگ در زمینه، لکه‌های گرد و لوبیایی کرم رنگ و با پولک‌های سیاه در حاشیه، نواحی پیش میانی، پس میانی و انتهایی کرم روشن با پولک‌های قهوه‌ای پراکنده، بال عقب کرم رنگ و با پولک‌های قهوه‌ای پراکنده به ویژه روی رگبال‌ها و به سمت حاشیه بال.

بیونومی: مناطق گرم و خشک و صخره‌ای را ترجیح می‌دهد. در پاییز فعال است و در شب به نور جلب می‌شود. لارو آن از علف‌ها به ویژه گیاهان جنس *Taraxacum* تغذیه می‌کند (Ronkay et al., 2001).

پراکنش: این گونه در ایران و ترکیه انتشار دارد اما زیرگونه‌های دیگری نیز دارد که از سایر مناطق گزارش شده اند. در ایران از استان‌های گیلان، آذربایجان غربی (Ebert and Hacker, 2002)، کرمانشاه و هرمزگان (Koçak and Kemal, 2014) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۳، ♀ ۱، ۱۳۹۷/۸/۱۳، ایستگاه ۴.

گونه *Pseudenargia deleta* (Osthelder, 1933)

تشخیص: (شکل ۲-۱۵) رنگ سر، قفس سینه و بال‌های جلو قهوه‌ای-حنایی تیره، نوار پیش میانی و پس میانی به صورت خطوط قهوه‌ای تیره با حاشیه سفید، لکه لوبیایی تیره متمایل به سیاه و واضح، لکه گرد و چماقی دیده نمی‌شوند، بال عقب در قاعده روشن تر و به طرف حاشیه به ویژه روی رگبال‌ها حنایی تر، ریشک‌ها قهوه‌ای مایل به کرم.

بیونومی: این گونه دارای یک نسل در سال است. حشره بالغ در طول ماه‌های شهریور تا آبان فعال است. لاروها چندخوار بوده و از گیاهان علفی مختلفی تغذیه می‌کنند (Hacker, 2001).

پراکنش: این گونه بومی کشور سوریه است. این گونه در ایران تاکنون از استان‌های تهران و فارس (Ebert and Hacker, 2002) ; (Ravan et al., 2016) گزارش شده است.

نمونه‌های مطالعه شده: ♂ ۱، ♀ ۲، ۱۳۹۷/۸/۱۲، ایستگاه ۳.

بحث

چنانکه ذکر شد، در این تحقیق ۲۸ گونه متعلق به ۱۹ جنس از زیرخانواده Xyleninae شناسایی شد که در بین آنها ۹ گونه برای اولین بار از استان خوزستان و ۱۵ گونه برای اولین بار از استان ایلام معرفی شدند. از آنجا که قبلاً روان و همکاران (Ravan et al., 2016) و شهریاری و همکاران (Shahreyari-Nejad et al., 2018)

Noctuidae باشد.

۱۳ گونه به‌طور مشترک هم در خوزستان و هم در ایلام جمع‌آوری گردید. از بین اینها دو گونه *H. ambigua* و *P. monophænis* اولین گزارش برای فون هر دو استان بود. این مساله نشان می‌دهد که زیستگاه چنین گونه‌هایی منطقه زاگرس بوده و دامنه انتشار آنها می‌تواند در کل این منطقه گسترده باشد.

در مقایسه با نتایج مطالعه فون مزارع نیشکر در خوزستان که توسط اسفندیاری و همکاران (Esfandiari et al., 2011) انجام شده و ۹ گونه از Xyleninae شناسایی شده است، تنها دو گونه *S. exigua* و *C. clavipalpis* با تحقیق حاضر مشترک بودند. این دو گونه پراکنش وسیعی در مناطق و اقلیم‌های مختلف دارند. اما از آنجا که اقلیم مزارع نیشکر مناطق بیابانی بوده و با محل‌های نمونه‌برداری در تحقیق حاضر متفاوت است و علاوه بر آن در اکوسیستم کشاورزی نیز بوده، گونه مشترک بیشتری بین دو تحقیق وجود نداشت.

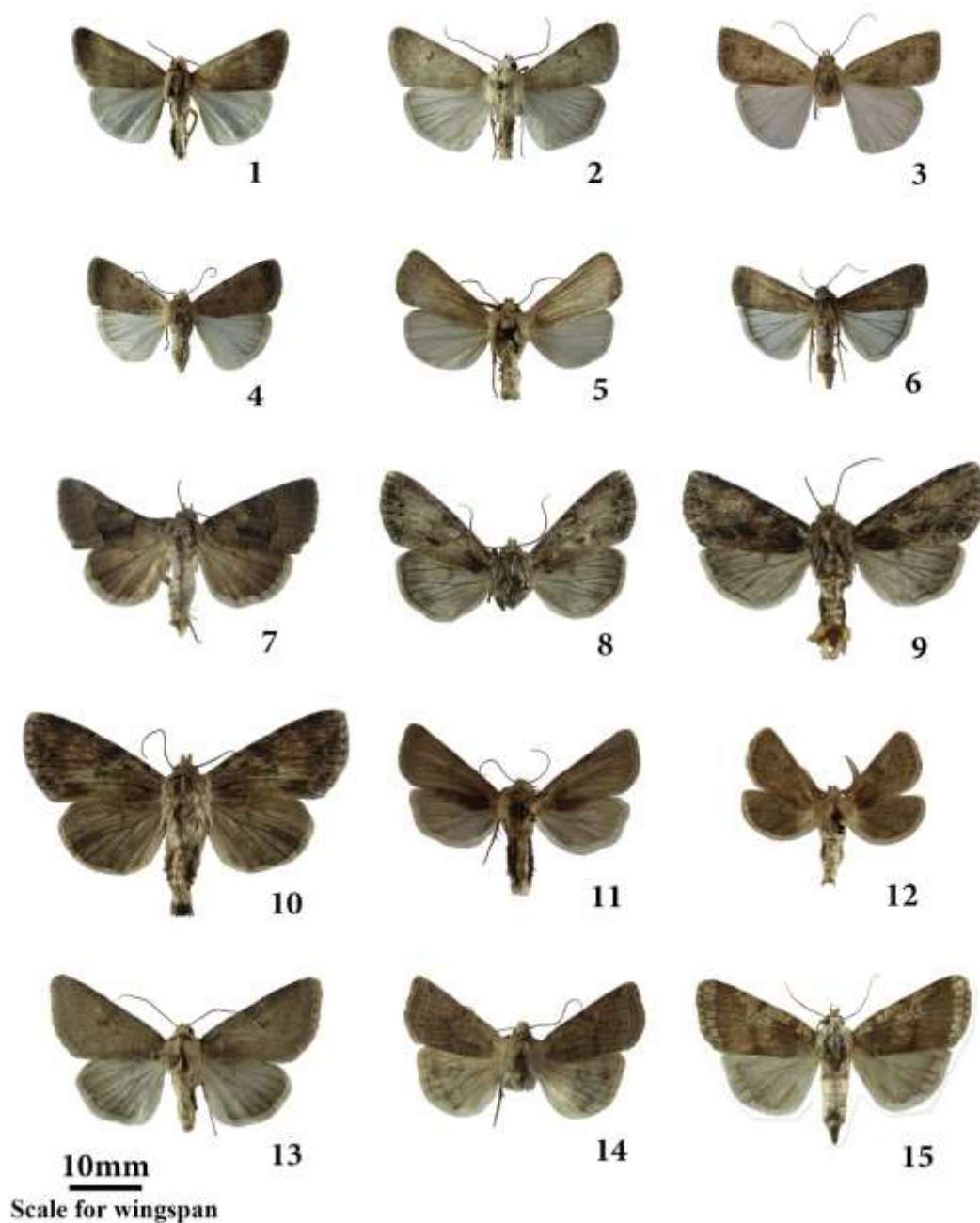
در پایان باید توصیه کرد که علاوه بر انجام مطالعات فونستیک به منظور تهیه چک لیست‌های کامل و کتب مصور برای شناسایی شب‌پره‌ها، نیاز مبرم به انجام مطالعات تاکسونومیک نیز روی فون Noctuidae در ایران وجود دارد. همچنین مطالعه مراحل نابالغ این شب‌پره‌ها و میزبان گیاهی آنها در دوره لاروی به ویژه در اکوسیستم جنگل‌های بلوط بسیار ضروری است.

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 می‌گردد. این مقاله بر اساس فرصت مطالعاتی دوره دکتری نویسنده اول مقاله در دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

نیز مناطقی از خوزستان که نزدیک به مناطق نمونه برداری تحقیق حاضر بوده را مطالعه کرده اند، ۱۶ گونه یافت شده در این تحقیق با آنها مشترک بود. اما از طرف دیگر ۹ گونه نیز در تحقیق حاضر از خوزستان جمع‌آوری شد که قبلاً در دو تحقیق مذکور جمع‌آوری نشده بود. این گونه‌ها عبارت از *H. ambigua*، *C. boursini*، *A. Sesamia* sp.، *A. syriaca fusciorhoda*، *monophænis*، *P. deleta* و *L. muscosa*، *E. schawerdae*، *centrago* این مساله نشان می‌دهد که هنوز تا کامل شدن فهرست گونه‌های موجود در این مناطق زمان زیادی باقی مانده و باید نمونه‌برداری متمرکز بیشتری به ویژه در فصول و ماه‌هایی که کمتر نمونه‌برداری شده انجام گردد. همچنین اگر از روش‌های دیگر مانند تله طعمه‌ای هم استفاده شود یافتن گونه‌های بیشتر کاملاً محتمل خواهد بود. گونه‌هایی نیز از جنس *Agrochola* در این تحقیق یافت شد که نتایج آن جداگانه منتشر شده است (Ahmadi et al., 2021).

از ۱۷ گونه جمع‌آوری شده در استان ایلام، ۱۵ گونه برای این استان جدید بود. همچنین گونه *D. pinkeri* نیز از این استان برای فون ایران جدید بود. دلیل این موضوع این است که این استان کمتر توسط محققان خارجی و داخلی در گذشته مورد بررسی‌های فونستیک قرار گرفته است. بنابراین مطالعه فون این استان اهمیت زیادی دارد و می‌تواند منجر به یافت شدن گونه‌هایی شود که دامنه پراکنش آنها در کشورهای غربی ایران مانند ترکیه و عراق ثبت شده است. در استان ایلام دو بخش کاملاً مجزا و شاخص از دیدگاه توپوگرافیک و جغرافیایی وجود دارد، دشت‌ها و تپه‌ماهورهای پست جنوب ادامه دشت‌های مزوپتامی یا بین النهرین بوده و جنگل‌های بلوط زاگرس که اغلب دربرگیرنده ارتفاعات کوهستانی استان است (Mozaffarian, 2008). با توجه به تنوع اقلیمی و شرایط توپوگرافیک، استان ایلام از شرایط خاصی برخوردار است. بنابراین انتظار می‌رود که این منطقه تحت تاثیر این مساله دارای گونه‌های متنوع و جالب در بسیاری از گروه‌های حشرات بخصوص

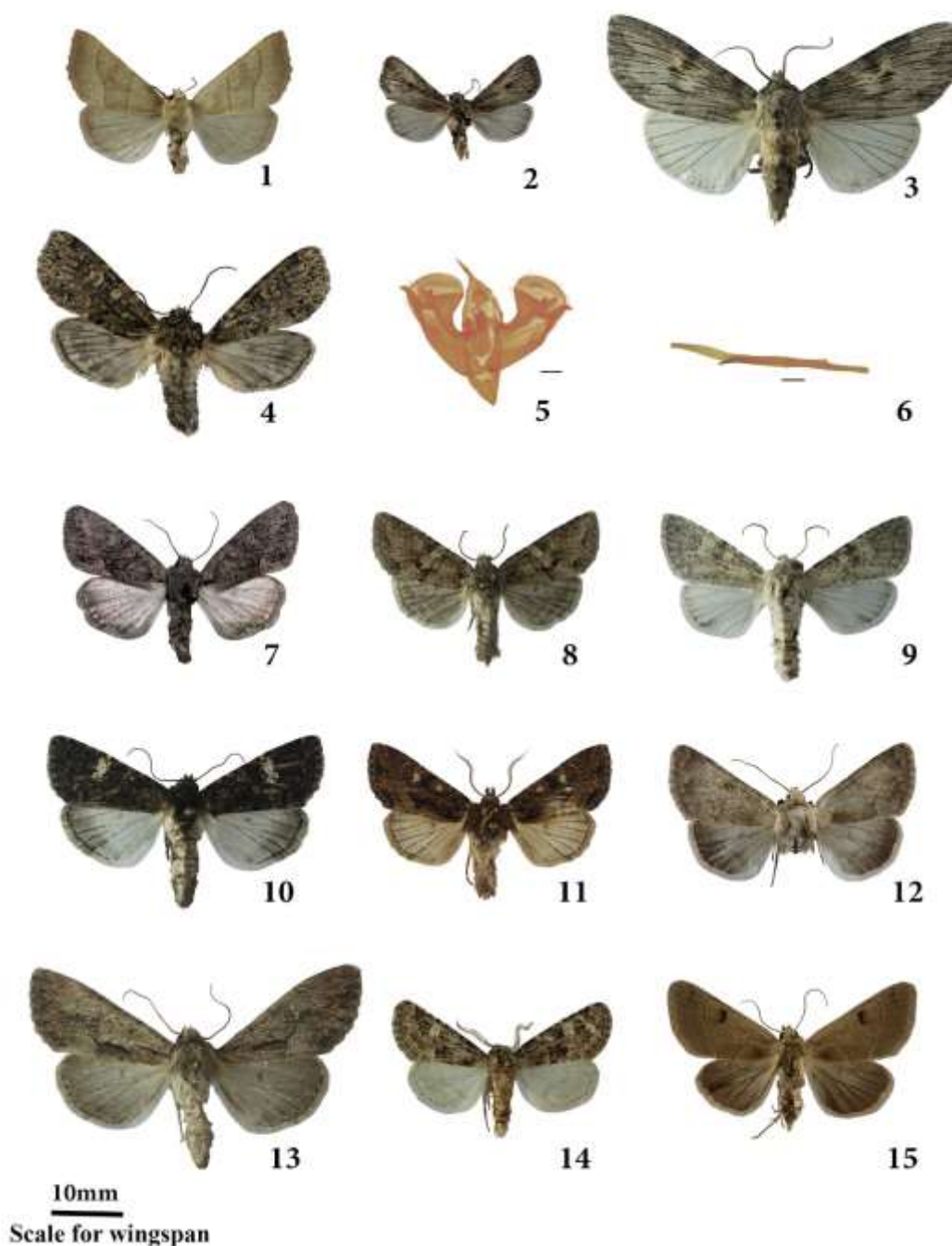


شکل ۱- الگوی بال گونه‌های جمع‌آوری شده

1. *Caradrina stenoptera*, male 2. *Caradrina bodenheimeri*, male 3. *Caradrina boursini*, male 4. *Caradrina clavipalpis*, female 5. *Hoplodrina ambigua*, male 6. *Spodoptera exigua*, female 7. *Polyphaenis monophaenis*, male 8. *Apamea syriaca fusciorhoda*, male 9. *Apamea maraschi*, male 10. *Apamea damascene*, female 11. *Sesamia* sp., male 12. *Episema lederi*, male 13. *Maraschia grisescens*, male 14. *Conistra pseudopolitina*, male 15. *Dicycla oo*, female.

Figure 1- Wing patterns of collected species

1. *Caradrina stenoptera*, male 2. *Caradrina bodenheimeri*, male 3. *Caradrina boursini*, male 4. *Caradrina clavipalpis*, female 5. *Hoplodrina ambigua*, male 6. *Spodoptera exigua*, female 7. *Polyphaenis monophaenis*, male 8. *Apamea syriaca fusciorhoda*, male 9. *Apamea maraschi*, male 10. *Apamea damascene*, female 11. *Sesamia* sp., male 12. *Episema lederi*, male 13. *Maraschia grisescens*, male 14. *Conistra pseudopolitina*, male 15. *Dicycla oo*, female.



شکل ۲- الگوی بال گونه‌های جمع‌آوری شده و اندام تناسلی گونه *Dichonia pinkeri* (مقیاس اندام تناسلی = ۱ mm)

1. *Atethmia centrargo*, female 2. *Evisa schawerdae*, male 3. *Scotochrosta pulla*, male 4. *Dichonia pinkeri*, male 5. *Dichonia pinkeri*, armature 6. *Dichonia pinkeri*, aedeagus 7. *Dryobotodes glaucus*, female 8. *Dryobotodes eremita*, male 9. *Aporophyla canescens*, male 10. *Polymixis ivanchiki*, female 11. *Polymixis trisignata*, male 12. *Polymixis colluta apothaina*, male 13. *Polymixis crinomima*, female 14. *Leucochlaena muscosa*, male 15. *Pseudenargia deleta*, female.

Figure 2- Wing patterns of collected species including male genitalia of *Dichonia pinkeri* (scale for genitalia = 1 mm)

1. *Atethmia centrargo*, female 2. *Evisa schawerdae*, male 3. *Scotochrosta pulla*, male 4. *Dichonia pinkeri*, male 5. *Dichonia pinkeri*, armature 6. *Dichonia pinkeri*, aedeagus 7. *Dryobotodes glaucus*, female 8. *Dryobotodes eremita*, male 9. *Aporophyla canescens*, male 10. *Polymixis ivanchiki*, female 11. *Polymixis trisignata*, male 12. *Polymixis colluta apothaina*, male 13. *Polymixis crinomima*, female 14. *Leucochlaena muscosa*, male 15. *Pseudenargia deleta*, female.

- Ahmadi, M., Esfandiari, M., & Shirvani, A. (2021). A study on *Agrochola* s. l. (Lep.: Noctuidae) of Iran with three new records. *Journal of Insect Biodiversity and Systematics* 7(3): 323–335.
- Benedek, B., Babics, J., & Bálint, Zs. (2021). Faunistical records and annotations for a better knowledge of the Tajikistani moth and butterfly fauna (Lepidoptera: Noctuoidea, Papilionoidea). *Caucasian Entomological Bulletin* 17(1): 61–76.
- Bidar, Z. (2010). Survey on fauna of Noctuidae family (Subfamilies: Hadeninae, Xyleninae, Plusiinae, Eublemminae) in Kerman province. MSc thesis, Department of Plant Protection, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, 143 pp. (In Persian with English abstract)
- Bienert, T. (1870). *Lepidopterologische Ergebnisse einer Reise in Persien in den Jahren 1858 und 1859*. 56 pp.
- Brandt, W. (1941). Beitrag zur Lepidopteren - Fauna von Iran (3). Neue Agrotiden, nebst Faunenverzeichnissen. *Mitteilungen der Münchner Entomologische Gesellschaft* 31: 835-863.
- Choi, S.W. (2011). Moth diversity and identification of indicator species in temperate forests of southern South Korea. *Annals of the Entomological Society of America* 104(5): 952-959. <https://doi.org/10.1603/AN10130>.
- Ebert, G., & Hacker, H.H. (2002). Beitrag zur Fauna der Noctuidae des Iran: Verzeichnis der Bestände im Staatlichen Museum für Naturkunde Karlsruhe, taxonomische Bemerkungen und Beschreibung neuer Taxa (Noctuidae, Lepidoptera). *Esperiana* 9: 237-409.
- Esfandiari, M., Mossadegh, M.S., & Shishehbor, P. (2011). Noctuidae (Lepidoptera) from sugarcane fields of SW Iran. *Fragmenta Faunistica* 2: 137-147.
- Esfandiari, M., Rabieh, M.M., Matov, A., & Mossadegh, M.S. (2015). A survey of Erebidae, Nolidae and Euteliidae (Lepidoptera) in southern and northeastern of Iran. *Redia* 98: 77-92.
- Feizpoor, Sh., & Shirvani, A. (2014). New Records of noctuid moths (Noctuidae, Noctuinae, Xylenini) from Iran. *Journal of the Entomological Research Society* 16(1): 37-47.
- Fibiger M. (1997). *Noctuinae III – Noctuidae Europaeae*, vol. 3. Sorø. 418 pp.
- Fibiger, M. & Hacker, H.H. (2007). *Amphipyridae, Condidinae, Eriopinae, Xyleninae (Part)- Noctuidae Europaeae*, vol. 9. Sorø. 410 pp.
- Fibiger, M., & Lafontaine, J.D. (2005). A review of the higher classification of the Noctuoidea (Lepidoptera) with special reference to the Holarctic fauna. *Esperiana* 11: 7–92.
- Gutleb, B., & Wieser, Ch. (2002). Ergebnisse einer zoologischen Exkursion in den Nordiran, 2001. *Carinthia* 2(192/112): 33-140.
- Hacker, H.H. (1990). "Die Noctuidae Vorderasiens (Lepidoptera), Systematische Liste mit einer Übersicht über die Verbreitung unter besonderer Berücksichtigung der Faunader Türkei (einschließlich der Nachbargebiete Balkan, Südrußland, Westtukestan, Arabische HalbinselÄgypten). *Neue Entomologische Nachrichten* 27: 1–707.
- Hacker, H.H. (2001). Fauna of the Nolidae and Noctuidae of the Levante with descriptions and taxonomic notes. *Esperiana* 8: 7-398.
- Hacker, H.H. (2004). Revision of the genus *Caradrina* Ochsenheimer, 1816, with notes on other genera of the tribus Caradrini (Lepidoptera, Noctuidae). *Esperiana* 10: 7-690.
- Hacker, H.H., & Kautt, P. (1999). Noctuoidea aus dem Iran, gesammelt 1997 von A. Hofmann und P. Kautt (Insecta, Lepidoptera). *Esperiana* 14: 1-686.
- Kazemi, E. (2013). Biodiversity of the genus *Polymixis* Hubner, [1820] (Lepidoptera: Noctuidae, Xyleninae) in Iran. *Natura Montenegrina* 12(1): 65-69.
- Khanjani, M. (2009). *Field crop pests in Iran*. Bu-Ali Sina University Press. 719 pp.
- Koçak, A.Ö., & Kemal, M. (2014). Lepidoptera of Iran based upon the Info-system of the Cesa. *Centre for Entomological Studies Ankara* 31: 1015-8243.
- Kravchenko, V.D., Fibiger, M., Hausmann, A., & Müller, G.C. (2007). *The Lepidoptera of Israel*. Vol. 2, Noctuidae. Pensoft Series, Moscow. 320 pp.
- Legrain, A., Yela, J.L., & Fibiger, M. (1989). *Evisa schawerdai* Reisser, 1930, espèce nouvelle pour la faune de la Péninsule Ibérique (Noctuidae, Cuculliinae). *Nota Lepidopterologica* 11: 265-273.
- Lehmann, L., Stadie, D., & Zahiri, R. (2009). Zum Winteraspekt der Makrolepidopterenfauna Südirans mit Anmerkungen zur Biologie einiger Arten (Lepidoptera: Bombycoidea, Papilionoidea, Geometroidea, Noctuoidea). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo* 30(3): 105-119.
- Lehmann, L., & Zahiri, R. (2011). Results of a lepidopterological expedition to North and Northwest Iran in summer 2007 with new records for Iran (Lepidoptera) (plates 19-22). *Esperiana* 16: 135-165.
- Lodl, M., Gaal-Haszler, S., Jovanovic-Kruspel, S., Ronkay, G., Ronkay, L., & Varga, Z. 2012. *The Vartian Collection. Part I. Noctuoidea*. Fibigeriana-Volum1.-Heterocera press, Budapest. 303 pp.
- Mossadegh, M.S., & Kocheili, F. (2003). *A semi descriptive checklist of identified species of arthropods (agricultural, medical, ...) and other pests from Khuzestan, Iran*. Shahid Chamran University Press. 475 pp.
- Mozaffarian, V. (2008). *Flora of Ilam*. Farhang Moaser Pub., 936 pp.

29. Nieukerken, E.Jv., Kaila, L., Kitching, I.J., Kristensen, N.P., & Lees, DC. (2011). Order Lepidoptera. In: Zhang Z-Q, editor. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* 3148: 212–221.
30. Noroozi, J., Akhiani, H., & Breckle, S.W. (2007). Biodiversity and phytogeography of the alpine flora of Iran. *Biodiversity and Conservation* 17(3): 493–521. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9246-7>.
31. Patocka, J., Capek, M. & Charvat, K. (1962). Príspevok k poznaniu korunovej fauny článkonožcov na duboch Slovenska, predovšetkým so zreteľom na rad Lepidoptera. *Biologické práce* 8(5): 5–156.
32. Patocka, J., Kristin, A., Kulfan, J., & Zach, P. (1999). *DieEichensch adlinge und ihre Feinde*. Institut fur Wald okologie der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Zvolen. 396pp.
33. Pekarsky, O. (2012). Taxonomic overview of *Polymixis serpentina* (Treitschke, 1825) species-group, with the description of a new species (Lepidoptera, Noctuidae, Xyleninae). *ZooKeys* 201: 15-26. <https://doi.org/10.3897/zookeys.201.3035>.
34. Poorshabanan, P., & Shirvani, A. (2012). A new record of *Scotochrosta* Lederer, 1757 (Lep.: Noctuidae: Xyleninae) from Iran. In *20th Iranian Plant Protection Congress*. Shiraz, Iran (p. 127).
35. Rabieh, M.M., Esfandiari, M., & Seraj, A.A. (2013). A contribution to the fauna of subfamilies Metoponiinae, Bryophilinae and Xyleninae (Lepidoptera: Noctuidae) in NE Iran. *Iranian Journal of Animal Biosystematics* 9(1): 1-16. <https://doi.org/10.22067/IJAB.V9I1.33302>.
36. Rajaei, H., Rödder, D., Weigand, A.M., Dambach, J., Raupach, M.J., & Wägele, J.W. (2013). Quaternary refugia in southwestern Iran: insights from two sympatric moth species (Insecta, Lepidoptera). *Organism Diversity & Evolution* 13(3): 409–423. <https://doi.org/10.1007/s13127-013-0126-6>.
37. Ravan, B., Esfandiari, M., Mossadegh, M.S., & Rabieh, M.M. (2016). Introducing some moths of Noctuidae (Lep.: Noctuidae) from southern areas of Zagros in Khuzestan and Fars provinces. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research* 13(2): 113-131. (In Persian with English abstract) <https://doi.org/10.22092/IJFRPR.2016.106019>.
38. Regier, J.C., Zwick, A., Cummings, M.P., Kawahara, A.Y., Cho, S., Weller, S., Roe, A., Baixeras, J., Brown, J.W., Parr, C., Davis, D.R., Epstein, M., Hallwachs, W., Hausmann, A., Janzen, D.H., Kitching, I.J., Solis, M.A., Yen, S.H., Bazinet, A.L., & Mitter, C. (2009). Toward reconstructing the evolution of advanced moths and butterflies (Lepidoptera: Ditrysia): an initial molecular study. *BMC Evolutionary Biology* 9: 280-300. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-280>.
39. Ronkay, L., & Gyulai, P. (2006). New Noctuidae (Lepidoptera) species from Iran and Tibet. *Esperiana* 12: 211-241.
40. Ronkay, L., Yela, G., & Hreblay, M. (2001). *Hadeninae II (Part)–Noctuidae Europaea*, vol. 5. Sorø. 452 pp.
41. Shahreyari-Nejad, S., Esfandiari, M., Rasekh, A., Mossadegh, M.S., & Shirvani, A. (2018). New records of Noctuidae for Iran with additional distribution data (Lepidoptera: Noctuidae). *SHILAP Revista de lepidopterologia* 46(181): 145-155.
42. Shahreyari-Nejad, S., Esfandiari, M., Rasekh, A., Mossadegh, M.S., & Shirvani, A. (2020). Faunistic records of Noctuidae from Iran, with two new records for the country (Insecta: Lepidoptera). *SHILAP Revista de lepidopterologia* 48(190): 239-252.
43. Shahreyari-Nejad, S., Esfandiari, M., Rasekh, A., Mossadegh, M.S., Shirvani, A., & Rabieh, M.M. (2017). First record of *Caradrina* (*Eremodrina*) *turcomana* Hacker, 2004 for Iran with a catalogue of the genus *Caradrina* Ochsenheimer, 1816 of Iran (Lepidoptera, Noctuidae). *Iranian Journal of Animal Biosystematics* 13(2): 137-158. <https://doi.org/10.22067/IJAB.V13I2.63613>.
44. Shirvani, A. (2012). Noctuidae moths (Insecta: Lepidoptera) with Iranian type locality. *Check List* 8 (6): 1134-1157. <https://doi.org/10.15560/8.6.1134>.
45. Shirvani, A., Ronkay, L., Kamali, K., & Talebi, A.A. (2008). A new *Pseudohadena* Alphéraky, 1889 species from Iran (Lepidoptera, Noctuidae, Xyleninae). *Esperiana* 14: 577-580.
46. Steiner, A. (1991). A note on the nomenclature of *Evisa schawerdae* Reisser, 1930 (Lepidoptera, Noctuidae) and on the interpretation of article 31 of the International Code of Zoological Nomenclature. *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo, Frankfurt, N.F.* 11(4): 241-244.
47. Wieser, C., & Stangelmaier, G. (2005). Zwischenergebnisse einer lepidopterologischen Forschungsreise in den Nordiran. Oktobr 2003 (Insecta: Lepidoptera). *Carinthia* 2: 659-674.
48. Wiltshire, E.P. (1946). Middle East Lepidoptera V. A new genus, a new species, and two new races from Iran, with taxonomic notes on other Persian heterocera. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* 15: 118-128.
49. Zilli, A., Varga, Z., Ronkay, G., & Ronkay, L. (2009). *The Witt Catalogue: A taxonomic atlas of the Eurasian and North African Noctuoidea. Apameini 1*, vol. 3. Heterocera press. 393pp.



Effect of Micronutrient Fertilizers on Digestive Enzymes Activity of *Hippodamia variegata* (Goeze) Fed on *Myzus persicae* (Sulzer)

T. Alizamani^{1*}, J. Shakarami², M. Mardani Talaei³, A. Zibaei⁴

Received: 05-01-2022

Revised: 28-02-2022

Accepted: 19-03-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani Talaei, M., & Zibaei, A. (2022). Effect of Micronutrient Fertilizers on Digestive Enzymes Activity of *Hippodamia variegata* (Goeze) Fed on *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 213-225. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/JPP.2022.74291.1070](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.74291.1070)

Introduction

The green peach aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is one of the severe pests of bell pepper *Capsicum annuum* L. in the greenhouse. Ladybird, *Hippodamia variegata* (Goeze), is an important general predator in both larval and adult stages to various aphid species, including, *M. persicae*. In this study, the effect of nutritional interaction among plant-herbivore-natural enemy under the influence of foliar application of iron, zinc, copper and manganese in bell pepper on the activity of digestive enzymes of the third and fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* was examined.

Materials and Methods

The experiments were performed as a completely randomized design with four replicates per treatment during 2020-2021 in the greenhouse and laboratory of the Department of Plant Protection, College of Agriculture, Lorestan University. The foliar application of micronutrient carried out at four-to six-leaf stage with a certain amount of each micronutrient fertilizer. Then, sufficient number of the third and fourth instar larvae of *H. variegata* were randomly collected from each treatment and replication. The samples transferred to 1 mL of distilled water, and homogenized with a hand pestle. Then, the samples centrifuged at 13000 g for 15 min at 4°C. The supernatants as the enzyme source were collected and reserved at -20°C for starting biochemical assays. The activity of digestive enzymes was measured according to the standard protocols.

Results

The results showed that the amount of digestive enzymes activity of the third and the fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* reared on the different micronutrient treatments were higher than the control treatment. The total protease and the trypsin activity were higher in the third instar larvae *H. variegata* reared on manganese (0.583 and 19.296 U/mg protein) and iron (0.574 and 18.426 U/mg protein), respectively. The highest and lowest activity of chymotrypsin, aminopeptidase and carboxypeptidase were found in the third instar larvae in manganese (15.518, 8.95 and 7.536 U/mg protein) and control (7.353, 2.139 and 2.665 U/ mg protein) treatments, respectively. The highest (18.952) and lowest (9.139 U/ mg protein) elastase activity were found in the third instar larvae on iron and control, respectively. The higher activity of α -amylase (25.20 U/mg protein) was observed in the third instar larvae of *H. variegata* in iron treatments then the other treatments. The total protease (0.183 U/ mg protein) and the chymotrypsin (10.396 U/ mg protein) of the fourth instar larvae predatory had higher activities with iron treatment and these enzymes had lower activities on control (0.036 and 6.763 U/ mg protein) and copper (0.059 and 6.655 U/ mg protein) treatments. The highest activity of trypsin and aminopeptidase were observed in the fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* reared on iron

1 and 2- Former Ph.D. Student of Entomology and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Lorestan, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: alizamani.ta@fa.lu.ac.ir)

3- Former Ph.D. Student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan-Rasht, Iran

(6.893 and 2.317 U/ mg protein) and the highest activity of elastase was found on iron (2.486) and zinc (2.251 U/ mg protein, respectively). Also, the lowest activity of trypsin, aminopeptidase and elastase were found on control. The carboxypeptidase activity was higher in the fourth instar larvae *H. variegata* fed on the all micronutrients than the control. Also, the highest and lowest activity of α -amylase were observed in the fourth instar larvae *H. variegata* fed on micronutrients of copper and iron (17.64 and 15.04 U/ mg protein) and control (9.160 U/mg protein), respectively.

Discussion

The results showed that the amount of digestive enzymes activity of the third and the fourth instar larvae of *H. variegata* fed on *M. persicae* reared on different micronutrient treatments were higher than the control treatment.

Based on the results, the foliar application of plants with micronutrient fertilizers has a positive effect on the performance of predator of *H. variegata* through nutritional interaction and improving of the growth quality. Thus, the quality of host plants, as the first level of nutrition, has an important effect on the physiological characteristics of the predator on the third level of nutrition and show the positive effect of prey nutrients on the physiological performance of *H. variegata* that can be used in *M. persicae* management programs.

Conclusion

Using different micronutrient fertilizers along with biological control agents such as ladybird *H. variegata* could be effective in integrated management programs of *M. persicae* through the growth quality improvement of the host plants.

Keywords: Digestive enzymes, *Hippodamia variegata*, Micronutrient fertilizers

تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *Hippodamia variegata* (Goeze) در تغذیه از *Myzus persicae* (Sulzer)

طیبه علی زمانی^{۱*} - جهانشیر شاکرمی^۲ - مژگان مردانی طلایی^۳ - آرش زیبایی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۸

چکیده

شته سبز هلو، *Myzus persicae* (Sulzer) یکی از آفات مهم فلفل دلمه *Capsicum annuum* L. می‌باشد. کفشدوزک *Hippodamia variegata* (Goeze) شکارگر عمومی مهم گونه‌های مختلف شته، از جمله *M. persicae* در مراحل لاروی و حشره کامل می‌باشد. در مطالعه حاضر، تأثیر برهم‌کنش غذایی بین گیاه- گیاهخوار- دشمن طبیعی تحت تأثیر محلول‌پاشی ریز مغذی آهن، روی، مس و منگنز در فلفل دلمه بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای بالغ سن سوم و چهارم *H. variegata* تغذیه شده از *M. persicae* مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در هر تیمار انجام شد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی از جمله پروتئاز کل، آلفاآمیلاز و پروتئازهای اختصاصی بر اساس پروتکل‌های استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت پروتئاز کل و تریپسین لاروهای سن سوم *H. variegata* پرورش‌یافته در تیمارهای منگنز (۰/۵۸۳ و ۱۹/۲۹۶ واحد بر میلی گرم پروتئین) و آهن (۰/۵۷۴ و ۱۸/۴۲۶ واحد بر میلی گرم پروتئین) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. براساس نتایج، بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های کیموتریپسین، آمینوپپتیداز و کربوکسیپپتیداز لاروهای سن سوم *H. variegata* به ترتیب در تیمارهای منگنز (۱۵/۵۱۸، ۸/۹۵۰ و ۷/۵۳۶ واحد بر میلی گرم پروتئین) و شاهد (۷/۳۵۳، ۲/۱۳۹ و ۲/۶۶۵ واحد بر میلی گرم پروتئین) مشاهده شد. بیشترین (۱۸/۹۵۲) و کمترین (۹/۱۳۹) واحد بر میلی گرم پروتئین فعالیت الاستاز لاروهای سن سوم شکارگر به ترتیب در تیمارهای آهن و شاهد ثبت شد. فعالیت بالاتر آلفاآمیلاز لاروهای سن سوم *H. variegata* در تیمار آهن (۲۵/۲۰) واحد بر میلی گرم بر پروتئین ثبت شد. فعالیت پروتئاز کل و کیموتریپسین لاروهای سن چهارم *H. variegata* در تیمار آهن (۰/۱۸۳ و ۱۰/۳۹۶ واحد بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با شاهد (۰/۰۳۶ و ۶/۷۶۳ واحد بر میلی گرم پروتئین) و ریزمغذی مس (۰/۰۵۹ و ۶/۶۵۵ واحد بر میلی گرم پروتئین) به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین فعالیت تریپسین، الاستاز و آمینوپپتیداز لاروهای سن چهارم شکارگر در تیمارهای آهن (۲/۴۸۶، ۲/۳۱۷ و ۲/۴۳۳)، روی (۶/۵۴۳، ۲/۲۵۱ و ۱/۸۲۷) و منگنز (۵/۶۳۱، ۱/۹۵۷ و ۲/۰۵۵ واحد بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با شاهد ثبت شد. فعالیت کربوکسیپپتیداز لاروهای سن چهارم *H. variegata* در تمامی تیمارهای ریزمغذی نسبت به شاهد بیشتر بود. همچنین بیشترین و کمترین فعالیت آلفاآمیلاز لاروهای سن چهارم *H. variegata* به ترتیب در تغذیه از ریزمغذی‌های مس (۱۷/۶۴)، آهن (۱۵/۰۴) واحد بر میلی گرم پروتئین و شاهد (۹/۱۶۰ واحد بر میلی گرم پروتئین) مشاهده شد. بنابراین استفاده از کودهای ریزمغذی با بهبود کیفیت گیاهان میزبان همراه با بکارگیری عوامل کنترل بیولوژیک مثل کفشدوزک *H. variegata* می‌تواند در برنامه‌های مدیریت آفات مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، کودهای ریزمغذی، *Hippodamia variegata*

مقدمه

شته سبز هلو، *Myzus persicae* (Sulzer) یکی از آفات مهم گیاهان تیره بادمجانیان^۵ و فلفل دلمه، *Capsicum annuum* L.

* نویسنده مسئول: (Email: alizamani.ta@fa.lu.ac.ir)

۳- دانشجوی سابق دکتری حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

DOI: [10.22067/JPP.2022/74291.1070](https://doi.org/10.22067/JPP.2022/74291.1070)

5- Solanaceae

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری حشره‌شناسی و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران

می‌باشد (Özgökçe *et al.*, 2018). این آفت علاوه بر خسارت مستقیم از طریق تغذیه، با انتقال بیماری‌های ویروسی و آلودگی‌های میکروبی، خسارت غیر مستقیم ایجاد می‌کند (Fenton *et al.*, 2010). با توجه به اثرات سوء مصرف سموم شیمیایی بر محیط زیست، موجودات غیر هدف و طغیان مجدد آفات، استفاده از روش‌های سازگار با اکوسیستم در قالب راهبرد مدیریت تلفیقی آفات در کنترل آفت الزامی می‌باشد. کنترل بیولوژیک به عنوان یک مولفه مهم مدیریت تلفیقی آفات مطرح است که می‌تواند نقش و اهمیت قابل توجهی در کاهش جمعیت و خسارت آفات داشته باشد (Scholler *et al.*, 1997). کفشدوزک‌های خانواده Coccinellidae از عوامل مهم کنترل بیولوژیک در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات می‌باشند و در این بین گونه‌ی *Hippodamia variegata* (Goeze) با توجه به قدرت جستجوگری زیاد، توان تولیدمثلی و نرخ بالای مصرف شکار از اهمیت بیشتری برخوردار است و در کاهش جمعیت شته‌ها و از جمله شته سبز هلو بسیار مؤثر است (Kontodimas and Stathas, 2005). این کفشدوزک یک شکارگر عمومی مهم در مراحل لاروی و حشره بالغ می‌باشد که علاوه بر شته‌ها، از شپشک‌ها، پسیل‌ها، سفید بالک‌ها، زنجربک‌ها، کنه‌ها، تخم و لارو پروانه‌ها نیز تغذیه می‌کند (Obrycki and Kring, 1998). انجام عملیات کشاورزی مانند بکارگیری نهاده‌های کشاورزی و استفاده از کودهای ریزمغذی به عنوان یک روش مدیریتی جدید می‌تواند در برنامه‌های کنترل آفات از طریق تأثیر بر برهمکنش‌های سه‌گانه با تغییر عناصر غذایی بافت گیاه و تغییر حساسیت گیاه به آفات بر عملکرد دشمن طبیعی نیز مؤثر باشد (Lu *et al.*, 2007). بررسی‌ها نشان می‌دهد که انجام عملیات کشاورزی و استفاده از کودها از جمله کودهای ریزمغذی می‌تواند روی ویژگی‌های جمعیتی آفات و دشمنان طبیعی آن‌ها مؤثر باشد (Mirab-balou and Mottaghinia *et al.*, 2015; Alizamani, 2022). از طرفی افزایش میزان تغذیه، تراکم و استقرار بهتر دشمنان طبیعی و همچنین میزان پارازیتسم بالاتر پارازیتوئیدها در اثر استعمال کودها گزارش شده است (Mottaghinia *et al.*, 2015).

محلول‌پاشی یا تغذیه برگ‌ی عناصر به عنوان یکی از روش‌های مناسب، مؤثر و اقتصادی مصرف کودها با کاهش خطرات زیست محیطی است، که در بر طرف کردن نیاز غذایی گیاهان به عناصر غذایی کم مصرف مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین تغذیه برگ‌ی در مقایسه با کاربرد خاکی، مواد غذایی مورد نیاز گیاهان را سریع‌تر، با کارایی بالاتر و هزینه کمتر فراهم می‌کند (Yassen *et al.*, 2010). علاوه بر عناصر غذایی اولیه یعنی نیتروژن، فسفر و پتاسیم، عناصر ریز مغذی مانند آهن، روی، مس و منگنز نیز برای رشد و نمو مطلوب گیاهان ضروری می‌باشند. کودهای ریزمغذی آهن، روی، مس و منگنز از اجزای اصلی در ساختار آنزیم‌ها و پروتئین‌ها بوده و در

فرآیندهای مختلف متابولیسم و فیزیولوژی گیاهان، فعال شدن آنزیم‌ها، سنتز ماکرومولکول‌ها، هورمون‌های رشد و قوت‌سنتز نقش مهمی را ایفاء می‌کنند (Hansch and Mendel, 2009).

در حقیقت کمیت و کیفیت غذا همانند دیگر عوامل نظیر دما، رطوبت و دوره‌ی نوری رشد، عملکرد و روند فعالیت‌های فیزیولوژیکی حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jansen and Groot, 2004; Musa and Ren, 2005). لذا مطالعه فرآیندهای هضم در حشرات به عنوان یک کلید رابط بین حشرات و محیط آن‌ها می‌تواند منجر به توسعه روش‌های کنترل براساس فیزیولوژی شود. بنابراین، دانش گسترده در مورد سیستم گوارش، فرآیندهای هضم و جذب و سازگاری آن‌ها با رژیم غذایی حشرات برای بهبود روش‌های کنترل مبتنی بر هدف دستگاه گوارش و برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات الزامی است (Bigham and Hosseini-naveh, 2010; Nation, 2008). حشرات به مجموعه‌ای از آنزیم‌های گوارشی از جمله کربوهیدرازها، پروتئازها برای تجزیه مواد غذایی خورده شده نیاز دارند. طبیعت ماده‌ی غذایی و هرگونه تغییر در غذای مصرفی از جمله گیاهان میزبان یا رژیم غذایی و مواد شیمیایی بلعیده شده می‌تواند فعالیت این آنزیم‌ها را تغییر دهد (Silva *et al.*, 2000). آنزیم‌های گوارشی از گروه هیدرولازها هستند و با اضافه شدن مولکول آب پیوندهای شیمیایی آن‌ها شکسته می‌شوند. کربوهیدرازها آنزیم‌هایی هستند که در هضم کربوهیدرات‌ها نقش دارند و نقش اصلی آن‌ها شکستن پیوندهای گلیکوزیدی است که سبب اتصال منوساکاریدها به همدیگر می‌شوند. از جمله آنزیم‌های کربوهیدرزی، آمیلاز گوارشی حشرات از نوع آلفا-آمیلاز است که پیوندهای گلیکوزیدی آلفا-۱ و ۴ واحدهای گلوکز در پلی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند (Franco *et al.*, 2000). پروتئازها آنزیم‌های هضم‌کننده پروتئین‌ها بوده و سبب شکسته شدن پیوندهای پپتیدی بین اسیدهای آمینه می‌شوند. پروتئازها را براساس سازوکار کاتالیز به دو گروه اندوپروتئاز (اندوپپتیدازها) و اگزوپروتئاز (اگزوپپتیدازها) تقسیم می‌کنند (Pascual-Ruiz *et al.*, 2009). اندوپپتیدازها پیوندهای پپتیدی بین اسیدهای آمینه را از وسط زنجیره پروتئینی و اگزوپپتیدازها پیوندهای پپتیدی اسیدهای آمینه را از دو قسمت انتهایی زنجیره پپتیدی می‌شکنند. گروهی از اگزوپپتیدازها که موجب آزاد شدن اسیدآمینه از انتهای آمینوی اسیدآمینه می‌شوند را آمینوپپتیداز و گروهی که سبب آزاد شدن اسیدآمینه از انتهای کربوکسیلی می‌شوند را کربوکسی پپتیداز می‌نامند (Nation, 2008).

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که طعمه‌های مختلف، پروتئین‌های موجود در طعمه و کمیت و کیفیت مواد مغذی می‌تواند فعالیت آنزیم‌های گوارشی شکارگرها را تحت تأثیر قرار دهند (Pascual-Ruiz *et al.*, 2009; Habibi *et al.*, 2001; Sorkhabi-Abdolmaleki *et al.*, 2013). مطالعات پیشین در

آزمایش‌ها در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و چهار تکرار در سال ۱۳۹۹ انجام شد.

تهیه بذر و پرورش گیاهان میزبان

در این پژوهش، بذر فلفل دلمه‌ای رقم کالیفرنیا و اندر از شرکت گلپاد سپاهان شهر استان اصفهان تهیه و استفاده شد. به منظور تسهیل در رشد و جوانه‌زنی، بذر گیاه در داخل دستمال کاغذی مرطوب در ظروف پتری شیشه‌ای (به قطر ۹ و ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متر) به مدت ۱۰ روز خیس‌انده شد. سپس هر بذر در داخل گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۱۵ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، حاوی خاک و ماسه به نسبت ۲ به ۱ در گلخانه تحت شرایط دمای 25 ± 5 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد و دوره نوری طبیعی کاشته شد. آبیاری گیاهان در فواصل زمانی معین براساس نیاز آبی آن‌ها (هر ۲ تا ۳ روز یک بار) انجام شد.

تهیه تیمارهای مورد مطالعه

کودهای ریزمغذی بیومین منگنز، بیومین مس و بیومین روی از شرکت بازرگان کالا تهران و ریزمغذی آهن (آلفا آهن) از شرکت مزرعه فراز آسمان تهران تهیه شد. تیمارهای مورد مطالعه در این پژوهش شامل محلول‌پاشی گیاهان در مرحله‌ی رشدی شش تا هشت برگی به ترتیب با (۱) منگنز، (۲) مس و (۳) روی به میزان یک میلی‌لیتر در یک لیتر آب، ۴- گیاه فلفل دلمه‌ای پرورش‌یافته در خاک زراعی معمولی به علاوه محلول‌پاشی گیاه در مرحله شش تا هشت برگی با ریزمغذی آلفا آهن به میزان ۱/۷ گرم در یک لیتر آب و ۵- گیاه فلفل دلمه‌ای پرورش یافته در خاک زراعی معمولی (بدون کود-دهی) به عنوان تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

پرورش حشرات

جمعیت اولیه شته سبز هلو از کلنی آزمایشگاهی دانشگاه محقق اردبیلی اردبیل تهیه شد. سپس شته‌های سبز هلو بالغ (۵۰ شته بالغ) را با استفاده از قلم‌موی نازک روی بوته‌های فلفل دلمه در مرحله رشدی هشت تا ۱۰ برگی منتقل کرده و در شرایط گلخانه پرورش داده شدند. جهت حفظ کلنی و جلوگیری از پارازیت و شکار شدن شته‌ها، گیاهان حاوی کلنی شته با استفاده از قفس‌های ساخته شده از چوب و توری پارچه‌ای (به ابعاد ۲/۵×۱/۵ متر) محصور شدند. جمعیت اولیه کفشدوزک *H. variegata* از مزارع یونجه استان ایلام تهیه شد. سپس برای پرورش کلنی، کفشدوزک‌های مربوطه را به صورت جفت‌های نر و ماده در داخل ظروف پتری به قطر ۹ و عمق یک سانتی‌متر دارای کاغذ صافی مرطوب در کف آن با هم نگه داشته

ارتباط با تأثیر کودهای ریزمغذی بر برهم‌کنش فلفل دلمه و شته سبز هلو نشان می‌دهد که این عناصر با بهبود ویژگی‌های مرفولوژیک (نظیر ارتفاع، وزن تر و خشک ساقه، ریشه، برگ و افزایش سطح برگ)، فیزیولوژیک (مانند کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) و آنتی‌اکسیدان‌های گیاه میزبان و همچنین با القای مقاومت آنتی‌بیوز از طریق افزایش سطح ترکیبات ثانویه دفاعی (مانند فنول و فلاونوئید) و بروز استرس اکسیداتیو در بدن شته سبز هلو منجر به اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی و کاهش پارامترهای جدول زندگی شته سبز هلو شده است (Alizamani et al., 2020; Alizamani et al., 2021a; Alizamani et al., 2021b). علاوه بر بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعالیت نسبی پروتئازها در روده‌ی سن *Podisus maculiventris* (Say) به طعمه‌ی تغذیه شده بستگی دارد و سن *P. maculiventris* ممکن است از آنزیم‌های پروتئولیتیک طعمه برای هضم غذا استفاده کند و نقش مهم آنزیم‌های گوارشی طعمه در فرآیند هضم شکارگر بیان شده است (Pascual-Ruiz et al., 2009). ارتباط بین آنزیم‌های گوارشی سن *Andrallus spinidens* و ترکیب غذایی طعمه‌ها، نشان‌دهنده‌ی طبیعت سازگار پروفایل آنزیمی عنوان شده که می‌تواند در یافتن طعمه‌های مناسب جهت کنترل موثر آفات و تولید انبوه عوامل کنترل بیولوژیک مناسب و موثر باشد (Sorkhabi-Abdolmaleki et al., 2013). بر طبق گزارش والکر و همکاران (Thompson, 1999) گروه سیستئین پروتئازها (کاتپسین‌های B و L)، آنزیم‌های غالب در معده لاروها و حشرات بالغ کفشدوزک دو نقطه‌ای، *Adalia bipunctata* (L.) می‌باشند. نتایج آن‌ها نشان می‌دهد که فرآیند هضم کفشدوزک دو نقطه‌ای ممکن است از طریق مهارکننده‌های سیستئین پروتئیناز بیان شده در گیاهان تراریخته برای کنترل آفات، از طریق برهم‌کنش سه سطحی بین کفشدوزک‌ها، شته‌ها و گیاهان زراعی ایجاد می‌شود، تحت تأثیر قرار گیرد. با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر عناصر ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی دشمنان طبیعی انجام نشده است، لذا، هدف مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی تغییرات آنزیم‌های گوارشی (آلفا آمیلاز، پروتئاز کل و پروتئازهای اختصاصی) لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* تغذیه شده با *M. persicae* پرورش‌یافته روی تیمارهای مختلف ریزمغذی است. بنابراین، نتایج حاصل از این مطالعه، تأثیر تیمار کردن گیاهان میزبان با کودهای ریزمغذی بر عملکرد دشمنان طبیعی از طریق تغییر در برهم‌کنش‌های غذایی گیاه- گیاهخوار و دشمن طبیعی نشان می‌دهد که می‌تواند در مدیریت آفت موثر باشد.

مواد و روش‌ها

زمان و مکان اجرای پژوهش

درجه سلسیوس، ۸۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید (۳۰ درصد) اضافه شده و نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت حجم مساوی از هیدروکسید سدیم (۲ مولار) اضافه شده و جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فعالیت اندوپیتیدازها (سرین پروتئازها)

سنجش فعالیت سرین پروتئازها شامل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز بر طبق روش (Rahbe et al., 2003) به ترتیب با استفاده از یک میلی‌مولار سدیم-بنزویل-دی‌ال-آرژنین-پی-نیتروآنالید^۱ (به عنوان سوبسترای اختصاصی تریپسین)، آن-سوکسینیل-آل‌نین-آل‌نین-پرولین-فنیل آل‌نین-پی-نیتروآنالید^۲ (به عنوان سوبسترای اختصاصی کیموتریپسین) و آن-سوکسینیل-آل‌نین-آل‌نین-پی-نیتروآنالید^۳ به عنوان سوبسترای اختصاصی الاستاز انجام شد. سپس برای اندازه‌گیری فعالیت هر یک از سرین پروتئازها ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای ویژه هر آنزیم را به صورت مجزا با ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (۲۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۸) و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی حشرات (لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسید تری‌کلرواستیک ۳۰ درصد متوقف شد و میزان جذب آنزیمی در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد.

اندازه‌گیری فعالیت اگزوپیتیدازها

براساس روش (Rahbe et al., 2003) سنجش فعالیت دو آنزیم اگزوپیتیداز یعنی آمینوپیتیداز و کربوکسی پیتیداز به ترتیب با استفاده از سوبسترای اختصاصی هیپوریل-آل-آرژنین^۴ و هیپوریل-آل-فنیل-آل‌نین^۵ با غلظت یک میلی‌مولار انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲۰ میکرولیتر از سوبسترای آنزیمی ذکر شده، ۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (۲۰ میلی‌مولار با اسیدیت ۸) و ۱۰ میکرولیتر عصاره حشرات بود. سپس واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از آن با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۳۰ درصد واکنش متوقف و جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

شدند. برای ایجاد سیستم تهویه و جلوگیری از افزایش رطوبت درپوش پتری‌ها را به اندازه سه سانتی‌متر سوراخ کرده و با توری ریز پوشانده شد. ظروف پرورش حشرات کامل و برگ‌های خشکیده به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی‌های میکروبی روزانه تعویض شدند (Omkar James, 2004) و کفشدوزک‌ها در ظروف جدید قرار داده شدند. تغذیه‌ی کفشدوزک‌ها به صورت روزانه با شته سبز هلو انجام شده و برای تأمین رطوبت داخل ظروف پتری از یک گلوله پنبه مرطوب استفاده شد. روزانه تخم‌های گذاشته شده از محیط پرورش و برگ گیاهان میزبان با استفاده از قلم موی نازک جدا کرده و به ظروف پتری دیگر برای تفریخ و پرورش کلنی کفشدوزک انتقال داده شدند. پس از تفریخ تخم‌ها برای تغذیه‌ی لاروها، برگ‌های آلوده به شته سبز هلو (۶۰ شته بالغ) به پتری‌ها اضافه شد. پتری‌های حاوی لارو روزانه بازدید و برگ آلوده به شته به منظور تغذیه در اختیار شکارگر قرار گرفت. قبل از انجام آزمایش‌های سنجش آنزیمی و به منظور به دست آوردن تعداد کافی از لاروهای سن سوم و چهارم، کفشدوزک *H. variegata* را در تیمارهای مورد نظر در داخل ظروف پتری محتوی برگ آلوده به شته سبز هلو پرورش داده و از لاروهای سن سوم و چهارم این نسل پرورش یافته روی تیمارهای ریزمغذی برای انجام آزمایش و به دست آوردن منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌ها

بررسی تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* در تغذیه از *M. persicae* روی فلفل دلمه بر طبق روش (Ferreira and Terra, 1983) صورت گرفت. برای این منظور ابتدا به ترتیب تعداد ۲۰ لارو از سنین سوم و چهارم کفشدوزک *H. variegata* به صورت تصادفی از هر تیمار مورد نظر جمع‌آوری شد. کل بدن لارو در آب مقطر هموژنایز شد. سپس نمونه‌های هموژنایز شده با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و روشناور حاصل از آن به عنوان منبع آنزیمی برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز کل

اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز کل با استفاده از ۴۰ میکرولیتر سوبسترای آزوکارژین (۲ درصد) براساس روش (Elpidina et al., 2001) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۴۰ میکرولیتر سوبسترا، ۸۰ میکرولیتر بافر یونیورسال (۲۰ میلی‌مولار اسیدیت ۷) و ۲۰ میکرولیتر نمونه بود. سپس بعد از ۶۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۷

1- Na-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide.

2- N-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine-p-nitroanilide.

3- N-succinyl-alanine-alanine-alanine-p-nitroanilide

4- Hippuryl-L-Arginine

5- Hippuryl-L-Phenylalanine

اندازه‌گیری فعالیت آلفا- آمیلاز

سنجش فعالیت آلفا- آمیلاز در لاروهای سنین سوم، چهارم کفشدوزک *H. variegata* براساس روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید (Bernfeld, 1955) مورد بررسی قرار گرفت. برای این آزمایش، ۸۰ میکرولیتر بافر یونیورسال با اسیدیته ۷، ۴۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد به عنوان سوپسترا و ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک در هر یک از تیمارها به طور جداگانه، در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیترو سالیسیک‌اسید به مخلوط واکنش اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت در نهایت، میزان جذب نور به وسیله الایزاید در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه داده‌ها

نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov- Smirnov قبل از تجزیه داده‌ها بررسی شد. سپس تحلیل نتایج حاصل از تأثیر تیمارهای مختلف ریزمغذی بر فعالیت آنزیمهای گوارشی لاروهای دشمن طبیعی با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) در نرم‌افزار آماری MINITAB نسخه ۱۶ صورت

گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (HSD) انجام شد.

نتایج

بررسی تاثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیمهای

گوارشی لارو سن سوم کفشدوزک *H. variegata*

در فعالیت آنزیمهای گوارشی لاروهای سن سوم کفشدوزک *H. variegata* در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان تیمار شده با کودهای ریزمغذی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. بیشترین فعالیت پروتئاز کل در لاروهای سن سوم در تیمارهای منگنز و آهن (به ترتیب ۰/۵۸۳ و ۰/۵۷۴ واحد بر میلی گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن (۰/۰۸۳ واحد بر میلی گرم پروتئین) در کفشدوزک‌های تغذیه شده از شته‌های پرورش یافته در گیاهان شاهد ثبت شد (جدول ۱، $F=30/92$; $df=4, 19$; $p<0/05$). تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در لاروهای سن سوم کفشدوزک نیز معنی‌دار بود ($F=29/76$; $df=4, 19$; $p<0/05$). بیشترین فعالیت آلفا-آمیلاز در تیمار آهن (۲۵/۲۰ واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت شد و فعالیت آن در بین سایر تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول ۱- فعالیت پروتئاز کل و آلفا-آمیلاز لاروهای سن سوم کفشدوزک *Hippodamia variegata* تغذیه شده از *Myzus persicae* پرورش یافته روی

فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 1- Total protease and α -amylase activity of third instar larvae of *Hippodamia variegata*, fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers.

تیمار	پروتئاز کل (واحد بر میلی گرم پروتئین)	آلفا-آمیلاز (واحد بر میلی گرم پروتئین)
Treatment	General Protease (U/mg protein)	α -amylase (U/mg protein)
شاهد	0.0835±0.0103 ^c	10.28±1.17 ^b
Control		
منگنز	0.583±0.0645 ^a	9.750±0.700 ^b
Mn		
آهن	0.574±0.0207 ^a	25.20±1.51 ^a
Fe		
مس	0.311±0.0279 ^b	7.69±2.17 ^b
Cu		
روی	0.353±0.0386 ^b	6.250±0.996 ^b
Zn		

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد

Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

لاروهای سن سوم کفشدوزک در تیمار منگنز (۱۵/۵۱۸ واحد بر میلی گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان شاهد (۷/۳۵۳) و تیمار شده با مس (۸/۵۴۳) واحد بر میلی گرم پروتئین) مشاهده گردید ($F=68/36$; $df=4, 19$; $p<0/05$). بیشترین و کمترین فعالیت الاستاز لاروهای سن سوم

همچنین بیشترین فعالیت تریپسین لاروهای سن سوم کفشدوزک در تغذیه از شته‌های پرورش یافته در تیمارهای منگنز (۱۹/۲۹۶) و آهن (۱۸/۴۲۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) و کمترین مقدار آن در شاهد (۱۳/۶۴۹) واحد بر میلی گرم پروتئین) به دست آمد (جدول ۲، $F=31/27$; $df=4, 19$; $p<0/05$). بیشترین فعالیت کیموتریپسین

کفشدوزک به ترتیب در تغذیه آن‌ها از شته‌های موجود در تیمارهای آهن (۱۸/۹۵۲) و شاهد (۹/۱۳۹) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت شد (جدول ۲، $F=30/82$; $df=4, 19$; $p<0/05$).

جدول ۲- فعالیت پروتئازهای اختصاصی لاروهای سن سوم کفشدوزک *Hippodamia variegata*، تغذیه شده از *Myzus persicae* پرورش یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 2- Specific proteases activity of third instar larvae of *Hippodamia variegata* fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers

تیمار Treatment	(اندوپتیداز واحد بر میلی گرم پروتئین) (Endo-peptidases U/mg protein)			(اکزوپتیداز واحد بر میلی گرم پروتئین) (Exo-peptidases U/mg protein)	
	تریپسین Trypsin	کیموتریپسین Chymotrypsin	الاستاز Elastase	آمینوپتیداز Amino-peptidases	کربوکسی پتیداز Carboxy-peptidases
شاهد Control	13.649±0.683 ^c	7.353±0.301 ^c	9.139±0.482 ^c	2.139±0.373 ^c	2.665±0.489 ^c
منگنز Mn	19.296±0.660 ^a	15.518±0.400 ^a	12.720±0.524 ^b	8.95±1.19 ^a	7.536±0.381 ^a
آهن Fe	18.426±0.168 ^a	12.089±0.239 ^b	18.952±0.626 ^a	5.752±0.409 ^b	4.790±0.149 ^b
مس Cu	14.407±0.170 ^{bc}	8.543±0.566 ^c	13.320±0.964 ^b	3.118±0.258 ^{bc}	5.054±0.197 ^b
روی Zn	16.168±0.0507 ^b	10.481±0.348 ^b	12.548±0.454 ^b	4.535±0.514 ^{bc}	4.152±0.191 ^b

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد
Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم تریپسین لاروهای سن چهارم کفشدوزک به ترتیب در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان تیمار شده با آهن (۶/۸۹۳) و شاهد (۳/۹۴۷) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت شد ($F=13/96$; $df=4, 19$; $p<0/05$). براساس نتایج بیشترین فعالیت آنزیم کیموتریپسین لاروهای سن چهارم در تیمار آهن (۱۰/۳۹۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمارهای مس و شاهد (۶/۶۵۵) و (۶/۷۶۳ واحد بر میلی گرم پروتئین) به دست آمد ($F=12/90$; $df=4, 19$; $p<0/05$) (جدول ۴).

لاروهای سن چهارم کفشدوزک در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمارهای روی (۲/۲۵۱) و آهن (۲/۴۸۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) بیشترین فعالیت آنزیم الاستاز را نشان دادند و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در شاهد (۱/۱۰۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت گردید ($F=4/91$; $df=4, 19$; $p<0/05$). بیشترین و کمترین فعالیت آمینوپتیداز لاروهای سن چهارم کفشدوزک به ترتیب در تیمارهای آهن (۲/۳۱۷) و شاهد (۰/۸۷۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) مشاهده شد ($F=16/34$; $df=4, 19$; $p<0/05$). بیشترین فعالیت کربوکسی پتیداز لاروهای سن چهارم کفشدوزک در تیمارهای مس (۳/۸۲۵)، منگنز (۳/۷۹۳) و آهن (۳/۷۹۱) واحد بر میلی گرم پروتئین) مشاهده شد و کمترین فعالیت آن در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمار شاهد (۲/۰۱۴) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت گردید

تأثیر تیمار کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های آمینو پتیداز ($F=17/11$; $df=4, 19$; $p<0/05$) و کربوکسی پتیداز ($F=32/46$; $df=4, 19$; $p<0/05$) نیز معنی دار بود. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم‌های آمینوپتیداز کربوکسی پتیداز لاروهای سن سوم کفشدوزک به ترتیب در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی گیاهان تیمار شده با منگنز (۸/۹۵) و (۷/۵۳۶) واحد بر میلی گرم پروتئین) و شاهد (۲/۱۳۹) و (۲/۶۶۵) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت شد (جدول ۲).

بررسی تأثیر کودهای ریزمغذی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی لارو سن چهارم کفشدوزک *H. variegata*

بیشترین فعالیت پروتئاز کل لاروهای سن چهارم در تیمار آهن (۰/۱۸۳) واحد بر میلی گرم پروتئین) و کمترین فعالیت آن در تغذیه کفشدوزک‌های تغذیه شده از شته‌های پرورش یافته روی شاهد و تیمار مس (۰/۰۳۶ و ۰/۰۵۹) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت شد ($F=54/16$; $df=4, 19$; $p<0/05$). بیشترین فعالیت آلفا آمیلاز لاروهای سن چهارم کفشدوزک شکارگر در تغذیه از شته‌های پرورش یافته روی تیمارهای مس (۱۷/۶۴) و آهن (۱۵/۰۴) واحد بر میلی گرم پروتئین) ثبت شد و کمترین میزان فعالیت آن در تیمار شاهد (۹/۱۶۰) واحد بر میلی گرم پروتئین) به دست آمد ($F=13/06$; $df=4, 19$; $p<0/05$) (جدول ۳).

(جدول ۴). ($F = 6.06$; $df = 4, 19$; $p < 0.05$). نتایج حاصل از این پژوهش (تأثیر تمامی تیمارهای مورد بررسی بر تک تک فعالیت‌های آنزیمی هر دو سن لاروی کفشدوزک *H. variegata*) به صورت یک نمودار ستونی در انتها نمایش داده شده است (شکل ۱).

جدول ۳- فعالیت پروتئاز کل و آلفا آمیلاز لاروهای سن چهارم کفشدوزک *Hippodamia variegata* تغذیه شده از *Myzus persicae* پرورش یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 3- Total protease and α -amylase activity of fourth instar larvae of *Hippodamia variegata* fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers

تیمار Treatment	پروتئاز کل (واحد بر میلی گرم پروتئین) General Protease (U/mg protein)	آلفا آمیلاز (واحد بر میلی گرم پروتئین) α -amylase (U/mg protein)
شاهد Control	0.0360±0.0071 ^c	9.160±0.165 ^c
منگنز Mn	0.1386±0.0033 ^b	10.576±0.384 ^{bc}
آهن Fe	0.1835±0.0096 ^a	15.04±1.42 ^a
مس Cu	0.0593±0.0127 ^c	17.64±1.56 ^a
روی Zn	0.1067±0.0031 ^b	14.765±0.156 ^{ab}

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد
Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

جدول ۴- فعالیت پروتئازهای اختصاصی لاروهای سن چهارم کفشدوزک *Hippodamia variegata* تغذیه شده از *Myzus persicae* پرورش یافته روی فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی

Table 4- Specific proteases activity of third instar larvae of *Hippodamia variegata* fed on *Myzus persicae* reared on bell pepper treated with micronutrient fertilizers

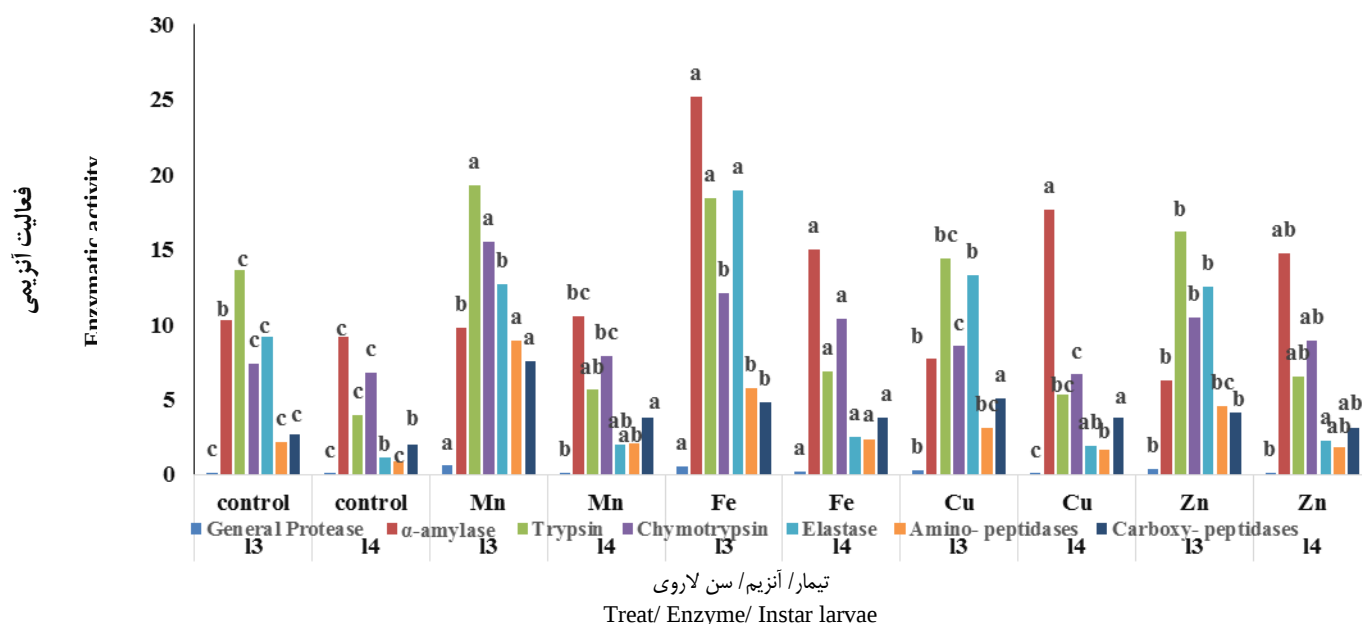
تیمار Treatment	(اندوپپتیداز واحد بر میلی گرم پروتئین) (Endo-peptidases U/mg protein)			(اکزو پپتیداز واحد بر میلی گرم پروتئین) (Exo-peptidases U/mg protein)	
	تریپسین Trypsin	کیموتريپسین Chymotrypsin	الاستاز Elastase	آمینوپپتیداز Amino-peptidases	کربوکسی پپتیداز Carboxy-peptidases
شاهد Control	3.947±0.356 ^c	6.763±0.270 ^c	1.106±0.118 ^b	0.876±0.124 ^c	2.014±0.191 ^b
منگنز Mn	5.631±0.198 ^{ab}	7.906±0.224 ^{bc}	1.957±0.158 ^{ab}	2.055±0.157 ^{ab}	3.793±0.526 ^a
آهن Fe	6.893±0.515 ^a	10.396±0.634 ^a	2.486±0.148 ^a	2.317±0.137 ^a	3.791±0.249 ^a
مس Cu	5.285±0.147 ^{bc}	6.655±0.548 ^c	1.901±0.359 ^{ab}	1.669±0.061 ^b	3.825±0.243 ^a
روی Zn	6.543±0.175 ^{ab}	8.918±0.360 ^{ab}	2.251±0.297 ^a	1.827±0.169 ^{ab}	3.059±0.276 ^{ab}

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون توکی را نشان می‌دهد
Means followed by different letters in the same columns are significantly different (HSD, $P < 0.05$).

بحث

مهم‌ترین عوامل موثر از پایین به بالا^۱) از طریق خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی پارامترهای زیستی و فیزیولوژی حشره گیاه‌خوار و دشمن طبیعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Kalushkov and Hodek, 2004).

روابط و اثرات متقابل سه سطح تغذیه‌ای اصلی زیست بوم‌های کشاورزی یعنی گیاهان- گیاه‌خواران و دشمنان طبیعی بسیار پیچیده می‌باشد. گیاهان میزبان به عنوان سطح اول تغذیه (و یکی از



شکل ۱- میانگین تأثیر تمامی تیمارهای مورد بررسی بر تک تک فعالیت‌های آنزیمی هر دو سن لاروی کفشدوزک *H. variegata*

ستون‌های با حروف یکسان از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$).

Figure 1- The mean effect of all treatments investigated on each enzymatic activity in both instar larvae of *H. variegata*
There is no statistically significantly difference between columns with the same letters ($p \leq 0.05$).

کفشدوزک *H. variegata* در تغذیه از شته سبز هلو پرورش‌یافته روی گیاه فلفل دلمه تیمار شده با کودهای ریزمغذی مختلف، تحت تأثیر قرار گرفته است.

پروتئین‌ها به عنوان یکی از اجزای بیوشیمیایی مهم، نقش حیاتی در سیستم‌های فیزیولوژیکی حشرات از طریق دخالت در فعالیت‌های آنزیم‌ها، ترمیم بافت، تولیدمثل و ... دارند.

هرگونه اختلال در استفاده از پروتئین رژیم غذایی، موفقیت حشرات را در دو جنبه فیزیولوژیکی و اکولوژیکی تغییر می‌دهد (Gatehouse et al., 1999). کمیت و کیفیت پروتئین‌های موجود در طعمه، نوع و فعالیت آنزیم‌های گوارشی شکارگرها را تغییر می‌دهد (Felton, 1996; Pascual-Broadway and Duffey, 1988). نتایج فعالیت پروتئاز کل و پروتئازهای اختصاصی شامل تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، آمینو و کربوکسی‌پپتیداز لاروهای سنین سوم و چهارم کفشدوزک نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم‌ها در تغذیه از شته سبز هلو در تیمارهای ریزمغذی به ویژه ریزمغذی‌های آهن و منگنز در مقایسه با شاهد بیشتر بوده است. افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی کفشدوزک شکارگر در تیمارهای ریزمغذی در مقایسه با شاهد می‌تواند به مقدار پروتئین و ترکیبات شیمیایی بدن طعمه مرتبط باشد. کمیت و کیفیت آنزیم‌های گوارشی حشرات با تغییر در نوع پروتئین رژیم غذایی تغییر می‌کند (Broadway and Duffey, 1988). کیفیت و ارزش غذایی

از سوی دیگر حشرات گیاه‌خوار (از فاکتورهای بالا به پایین^۱) که از گیاهان میزبان تغذیه می‌کنند، به نوبه‌ی خود به عنوان منابع غذایی برای دشمنان طبیعی می‌باشند، در نتیجه گونه‌هایی که در سطوح غذایی بالا قرار دارند به طور غیر مستقیم تحت تأثیر برهم-کنش بین گیاه و گیاه‌خوار قرار می‌گیرند (Price et al., 1980). از طرفی یکی از عوامل اساسی در مدیریت تلفیقی آفات، مطالعه آنزیم-های گوارشی آفات و دشمنان طبیعی و نیز تعیین ویژگی‌های آن‌ها است، زیرا حشرات گیاه‌خوار و دشمنان طبیعی به منظور تغذیه از گیاهان میزبان و طعمه به آنزیم‌های گوارشی خود وابسته می‌باشند (Alizamani et al., 2021a). از سوی دیگر بررسی‌ها نشان می‌دهد که انجام عملیات کشاورزی و کوددهی گیاهان میزبان (از جمله استعمال کودهای ریزمغذی) سازگاری اکولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه‌خواران، دشمنان طبیعی و پارازیتوئیدها را با تغییر در محتوای منابع و رژیم غذایی مورد استفاده طعمه و دشمنان طبیعی از طریق بهبود کمیت و کیفیت مواد غذایی مورد نیاز رشد گیاهان، تغییر عناصر غذایی بافت گیاهی و تغییر حساسیت گیاه به آفات تحت تأثیر قرار می‌دهند (Mardani-Talaei et al., Schädler et al., 2010; Alizamani et al., 2021a; 2016). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای سنین سوم و چهارم

موثر طعمه شود.

کربوهیدرات‌ها یکی از ماکرومولکول‌های ضروری هستند که منبع اصلی انرژی بیشتر حشرات را تشکیل می‌دهند که نشوونما، باروری و دیگر فعالیت‌های حشرات را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Nation, 2008). آلفا- آمیلاز آنزیمی است که پیوندهای آلفا ۱ و ۴ دی گلوکان را در گلیکوژن، نشاسته و سایر کربوهیدرات‌ها را کاتالیز می‌کند (Franco et al., 2000). چنین به نظر می‌رسد که تغذیه لاروهای کفشدوزک از شته‌های پرورش یافته در تیمارهای ریزمغذی به ویژه ریزمغذی آهن و مس دارای مقدار نشاسته بیشتری بوده که منجر به افزایش فعالیت آلفا آمیلاز شده است. افزایش فعالیت آلفا آمیلاز در تیمارهای ریزمغذی به دلیل تغییر در مواد غذایی بافت گیاه میزبان و عدم وجود مهارکننده‌های آلفا آمیلاز در رژیم غذایی می‌تواند نشان‌دهنده کارایی هضم کربوهیدرات و ترکیبات شیمیایی در لاروهای کفشدوزک *H. variegata* باشد (Mardani-Talaei et al., 2016; Alizamani et al., 2021a).

هر گونه ترکیب، صرف نظر از منشأ آن خواه مصنوعی یا طبیعی باشد، هنگام ورود به بدن حشرات بر سازوکارهای فیزیولوژیک آن تأثیر می‌گذارد و متعاقباً تأثیرات مثبت یا منفی آن بر رشد، بقا، تولیدمثل و فعالیت‌های آنزیمی و فیزیولوژی آفات و دشمنان طبیعی آن‌ها نمایان می‌شود. در حقیقت می‌توان گفت ویژگی‌های آنزیمی حشرات با رژیم غذایی آن‌ها ارتباط داشته و تأثیر این آنزیم‌ها بر فعالیت حشرات آفت و دشمنان طبیعی می‌تواند نقش مهمی در مدیریت آفات و عملکرد دشمنان طبیعی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

بنابراین، به منظور کاهش اثرات زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی، کاربرد کودهای ریزمغذی به عنوان یک راهکار مدیریتی جدید در سیستم‌های کشاورزی، با تغییر در عناصر غذایی بافت گیاه و بهبود فرآیندهای رشد و نمو گیاهان، می‌تواند جنبه‌های مختلفی از ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژی سطوح غذایی بالاتر را در برهمکنش گیاه- گیاه‌خوار- دشمن طبیعی تحت تأثیر قرار دهد و در تولید و مدیریت محصولات و آفات گلخانه‌ای به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری گروه گیاه‌پزشکی و کارکنان دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان جهت همکاری برای انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌گردد.

طعمه در فیزیولوژی گوارشی و عملکرد حشرات شکارگر نقش موثری دارد (De Clercq et al., 1998).

در حقیقت در سیستم‌های دارای سه سطح غذایی، پویایی جمعیت مصرف‌کننده سطح میانی (آفت) از طریق فرآیندها و تأثیرات سطح غذایی پایین‌تر (منبع غذایی) و سطح غذایی بالاتر (دشمن طبیعی) و تعاملات آن‌ها تنظیم می‌شود. نتایج بررسی تأثیر کوددهی عناصر ریزمغذی در گیاه فلفل دلمه بر رشد جمعیت پشه شته‌خوار *Aphidoletes aphidimyza* Rondani نشان می‌دهد که عناصر ریزمغذی با بهبود کیفیت گیاهان میزبان حشرات گیاه‌خوار در سطح اول تغذیه و از طریق برهم‌کنش‌های غذایی (گیاه- گیاه‌خوار- دشمن طبیعی) تأثیر مثبتی بر پارامترهای جدول زندگی و عملکرد شکارگر *A. aphidimyza* در سطح سوم تغذیه دارد (Mirab-balou and Alizamani, 2022). همچنین نتایج مطالعات پیشین ما نشان می‌دهد کودهای ریزمغذی که از اجزای اصلی در ساختار آنزیم‌ها و پروتئین‌ها می‌باشند، با تأثیر مثبت بر فرآیندهای رشد و نمو گیاه میزبان از طریق بهبود خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی و با تولید فنول و ترکیبات ضد تغذیه، ضمن نامساعد کردن بافت گیاهی برای تغذیه آفت منجر به القاء مقاومت آنتی-بیوز، ایجاد سمیت و اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی و کاهش پارامترهای جدول زندگی شته سبز هلو می‌شوند (Alizamani et al., 2020; Alizamani et al., 2021a; Alizamani et al., 2021b). از این رو، گیاهان میزبان روی دفاع مستقیم (به صورت شیمیایی و مورفولوژیک) و غیرمستقیم (از طریق دشمنان طبیعی) علیه گیاه-خواران موثر می‌باشند و بدین وسیله بر تعاملات چندگانه تأثیر می‌گذارند. در واقع، تغییر در کیفیت گیاه میزبان به طور چشمگیری کارایی گیاه‌خوار و دشمن طبیعی گیاه‌خوار را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Thompson, 1999).

بررسی‌ها نشان‌دهنده نقش مهم طعمه و ترکیب غذایی آن در فعالیت نسبی پروتازها و فرآیند هضم شکارگرهای *P. maculiventris* و *A. spinidens* است (Pascual-Ruiz et al., 2013; Sorkhabi-Abdolmaleki et al., 2020). همچنین، تأثیر برهم‌کنش‌های سه گانه گیاه- گیاه‌خوار و دشمن طبیعی در گیاهان تراریخته بر فعالیت گوارشی لاروها و حشرات بالغ کفشدوزک *A. bipunctata* گزارش شده است (Walker et al., 1998). لذا با توجه به افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، می‌توان گفت فرآیند هضم و جذب مواد غذایی در لاروهای کفشدوزک *H. variegata* به علت عدم وجود مهارکننده‌ها و بازدارنده‌های غذایی و آنزیمی به صورت موثر صورت گرفته است که با انتقال مواد غذایی از همولف و دستگاه گوارش به اجسام چربی سطح ماکرومولکول‌های ذخیره‌ای را افزایش می‌دهد و متعاقباً می‌تواند منجر به بهبود کارایی شکارگر در کنترل

1. Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani- Talaei, M., Zibaei, A., & Serrão, J.E. (2020). Direct interaction between micronutrients and bell pepper (*Capsicum annuum* L.), to affect fitness of *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Plant Protection Research* 60: 253-262. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.133319>.
2. Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani- Talaei, M., Zibaei, A., & Serrao, J.E. (2021a). Micronutrient fertilizers affect the digestibility, intermediary metabolism, and oxidative stress in *Myzus persicae* (Sulzer). *Neotropical Entomology* 50: 940-947. <https://doi.org/10.1007/s13744-021-00893-z>.
3. Alizamani, T., Shakarami, J., Mardani- Talaei, M., Zibaei, A., & Serrao, J.E. (2021b). Induce of antibiotic resistance in bell pepper, *Capsicum annuum* L., against green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), by micronutrient fertilizers. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 52(2): 73-85. <https://doi.org/10.22059/IJPPS.2021.319609.1006969>.
4. Bernfeld, P. (1955). Amylases, α and β . *Methods in Enzymology* 1: 149-158. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5).
5. Bigham, M., & Hosseini-naveh, V. (2010). Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug, *Brachynema germari* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Asia Pacific Entomology* 13: 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.03.004>.
6. Broadway, R.M., & Duffey, S.S. (1988). The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 34: 1111-1117. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(88\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90213-2).
7. De Clercq, P., Merlevede, F., & Tirry L. (1998). Unnatural prey and artificial diets for rearing *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Biological Control* 12: 137-142.
8. Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Gromenko, V.A., Rudenskaya, Y.A., Dunaevsky, Y.E., & Zhuzhikov, D.P. (2001). Compartmentalization of proteinases and amylases in *Nauphoeta cinerea* midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48: 206-216. <https://doi.org/10.1002/arch.10000>.
9. Felton, G.W. (1996). Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32: 107-130.
10. Fenton, B., Kasprovicz, L., Malloch, G., & Pickup, J. (2010). Reproductive performance of asexual clones of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*, (Homoptera: Aphididae), colonising Scotland in relation to host plant and field ecology. *Bulletin of entomological research* 100: 451-460.
11. Ferreira, C., & Terra, W.R. (1983). Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound P-Dglucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect *Rhynchosciara americana* larva. *Biochemical Journal* 213: 43-51.
12. Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch, C.Jr., Silva, C.P., & Grossi, de Sá M.F. (2000). Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *European Journal of Biochemistry* 267: 2166-2173. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01199.x>.
13. Gatehouse, A.M.R., Norton, E., Davidson, G.M., Babbe, S.M., & Newell, C.A. (1999). Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacnobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology* 45: 545-558.
14. Habibi, J., Backus, E.A., Coudron, T.A., & Brandt, S.L. (2001). Effect of different host substrates on hemipteran salivary protein profiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 369-375.
15. Hansch, R., & Mendel, R.R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>.
16. Jansen, B., & Groot, A. (2004). Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. *Natural Product Reports Article* 21: 449-477. <https://doi.org/10.1039/b311170a>.
17. Kalushkov, P., & Hodek, I. (2004). The effects of thirteen species of aphids on some life history parameters of the ladybird *Coccinella septempunctata*. *Biological Control* 50: 223-233.
18. Kontodimas, D.C., & Stathas, G.J. (2005). Phenology, fecundity and life table parameters of the predator *Hippodamia variegata* reared on *Dysaphis crataegi*. *Biocontrol* 50: 223-233. <https://doi.org/10.1007/s10526-004-0455-7>.
19. Lu, Z.X., Yu, X.P., Heong, K.L., & Hu, C. (2007). Effect of nitrogen fertilizer on herbivores and its stimulation to major insect pests in rice. *Rice Science* 14: 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(07\)60009-2](https://doi.org/10.1016/S1672-6308(07)60009-2).
20. Mardani-Talaei, M., Zibaei, A., Nouri-Ganblani, G., & Razmjou, J. (2016). Chemical and organic fertilizers affect physiological performance and antioxidant activities in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Invertebrate Survival Journal* 13: 122-133.
21. Mendiola-Olaya, E., Valencia-Jimenez, A., Valdés-Rodríguez, S., Delano-Frier, J., & Blanco-Labra, A. (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology* 126: 425-433.
22. Mirab-balou, M., & Alizamani, T. (2022). The effect of nutritional interaction between micronutrient fertilizers and *Capsicum annuum* L. on the population growth of *Aphidoletes aphidimyza* Rondani as predator of green peach

- aphid. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 35(4): 481-494. <https://doi.org/10.22067/JPP.2021.70745.1028>.
23. Mottaghinia, L., Hassanpour, M., Razmjou, J., Chamani, E., & Hosseini, M. (2015). The effect of vermicompost on some biological characteristics of the melon aphid *Aphis gossypii* Glover and the predatory gall midge *Aphidoletes aphidimyza* Rondani on two cultivars of greenhouse cucumber. *Applied research in plant protection* 4(2): 56-70.
24. Musa, P.D., & Ren, S.X. (2005). Development and reproduction of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on three bean species. *Insect Science* 12: 25-30. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9609.2005.00004.x>.
25. Nation, J.L. (2008). Insect physiology and biochemistry (2th ed.), London, CRC press, UK.
26. Obrycki, J.J., & Kring, T.J. (1998). Predaceous coccinellidae in biological control. *Annual Review of Entomology* 43: 295-321. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.295>.
27. Omkar James, B.E. (2004). Influence of prey species on immature survival, development, predation and reproduction of *Coccinella transversalis* Fabricius (Col.: Coccinellidae). *Journal of Applied Entomology* 128: 150-157. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00826.x>.
28. Özgökçe, M.S., Chi, H., Atlihan, R., & Kara, H. (2018). Demography and population projection of *Myzus persicae* (Sulzer.) (Hemiptera: Aphididae) on five pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Phytoparasitica* 46:153-167. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0651-0>.
29. Pascual-Ruiz, S., Carrilo, L., Alvarez-Alfageme, F., Ruiz, M., Castanera, P., & Ortego, F. (2009). The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion of nymphs of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Bulletin of Entomological Research* 99: 487-491. <https://doi.org/10.1017/S0007485308006561>.
30. Price, P.W., Bouton, C.E., Gross, P., McPherson, B.A., Thompson, J.N., & Weis, A. (1980). Interactions among three trophic levels: Influence of plants on interactions between insect herbivores and natural enemies. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 11: 41-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.11.110180.000353>.
31. Rahbe, Y., Deraison, C., Bonade-Bottino, M., Girard, C., Nardon, C., & Jouanin, L. (2003). Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. *Plant Science* 164: 441-450. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00405-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00405-8).
32. Schädler, M., Brandl, R., & Kempel, A. (2010). Host plant genotype determines bottom-up effects in an aphid-parasitoid-predator system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 135: 162-169. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00976.x>.
33. Scholler, M., Prozell, S.A., Al-Kirshi, G., & Reichmuth, C. (1997). Towards biological control as a major component of integrated pest management in stored product protection. *Journal of Stored Products Research* 33: 81-97.
34. Silva, L.B., Silva, W., Macedo, M.L.R., & Peres, M.T.L.P. (2009). Effects of croton urucurana extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 653-664.
35. Sorkhabi-Abdolmaleki, S., Zibae, A., Hosseini, R., & Hoda, H. (2013). Effects of different prey regimes on activities of digestive enzymes in *Andrallus spinidens* (Hem.: Pentatomidae). *Journal of Entomological Society of Iran* 33: 57-68. (In Persian with English abstract)
36. Thompson, S.N. (1999). Nutrition and culture of entomophagous insects. *Annual Review of Entomology* 44: 561-592. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.561>.
37. Walker, A.J., Ford, L., Majerus, M.E.N., Geoghegan, I.E., Birch, N., Gatehouse, J.A., & Gatehouse, A.M.R. (1998). Characterization of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 173-180.
38. Yassen, A., Abou El-Nour, E., & Shedeed S. (2010). Response of wheat to foliar Spray with urea and micronutrients. *Journal of American Science* 6: 14-22.



Taxonomic Status of a Native Species of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) in Iran

M. Mollaei ¹, H. Sadeghi Namaghi ^{2*}

Received: 19-01-2022

Revised: 10-04-2022

Accepted: 30-04-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:Mollaei, M., & Sadeghi Namaghi, H. (2022). Taxonomic Status of a Native Species of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) in Iran. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 227-238. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/JPP.2022.74687.1073](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.74687.1073)

Introduction

The idea of sustainable agriculture has been considered recently due to increasing knowledge and concerns about the destructive effects of chemical pesticides. Biological control is an ecologically based pest management strategy with an important role in achieving sustainable agriculture. The success of this beneficial method closely depends on taxonomy, since accurate identification of pests and their natural enemies has a great importance in biocontrol project's achievement. The gall midges of the genus *Feltiella* are cosmopolitan species known as highly effective predators of tetranychid mites. Despite the high potential of *Feltiella* species as a biological control agent, *F. acarisuga* is the only species commercially available among eleven species of the genus. These predators are difficult to distinguish from each other because of the high similarity and low information about them. Comprehensive taxonomic studies are needed to identify promising species for the control of tetranychid mites. The aim of this study is to determine the status of the native *Feltiella* species in Iran emphasizing their molecular characteristics.

Materials and Methods

The native predatory gall midges larvae and pupae were collected periodically from the spider mites colony on various host plants (*Urtica dioica*, *Lactuca scariola* and *Rubus* sp.) in countrysides around Mashhad during 2018-2019 and maintained in a growth chamber (LD 16:8, 21±1°C, RH 75±5%) until emerging adults. Adults were preserved in ethanol for further analysis and identified morphologically based on male genitalia and other structures used in taxonomic treatments of the genus. The molecular genetic analysis was included DNA extraction using the Chelex 100 method, PCR amplification of the mitochondrial COI gene using the LCO/HCO universal primer pair, sequencing the gene, and matching the sequence with those of the related species using BLAST. Nucleotide divergence between sequences was estimated by Maximum Composite Likelihood model and by the Pairwise deletion method in MEGA-X software. Intra- and interspecific distances were calculated using ExcaliBAR software and their frequency distribution histogram was plotted using Excel software. The sequence data were analyzed through the neighbor-joining method using MEGA-X software. Evolutionary distances for the NJ method were computed by Kimura's two-parameter distances. The resulting tree was subjected to bootstrap analysis with 1000 pseudoreplications. The cecidomyiid genus *Endaphis* was employed as an outgroup taxon to construct the phylogenetic tree.

Results and Discussion

Based on morphological studies, specimens of the native acarivorous gall midges from various localities in Mashhad were identified as *Feltiella acarisuga* Vallot. In spite of the morphological result, the DNA sequence of

1- Postdoctoral Researcher in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, and Iran National Science Foundation: INFS, Tehran, Iran

2- Professor in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, and Responsible for the Postdoctoral Project in Iran National Science Foundation: INFS, Tehran, Iran

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

the native species was relatively different from the corresponding sequence of *F. acarisuga* available in GenBank. The sequence match between the two species was 92.74% in maximum. The match with *F. acarivora* sequences was also low (maximum 91.84%). Whereas the BLAST results of the indigenous species sequence matched the corresponding sequence of *F. tetranych*i with more than 99% homology. Comparing the nucleotide differences between the specimens of the present species with *F. acarisuga* and *F. tetranych*i also showed that our *Feltiella* is a distinct species from *F. acarisuga*, despite of morphological identification. In the histogram of nucleotide distances, intra and inter specific distances in the COI gene overlapped with each other which were related to the nucleotide distances between individuals of *F. tetranych*i species in the gene bank and individuals of the species collected in the present study. Based on the neighbor-joining tree inferred from partial sequences of the COI gene related to *Feltiella* species, Iranian indigenous species and *F. tetranych*i species were in the same ancestor, while individuals of *F. acarisuga* species were in separate ancestors from the native gall midges. Therefore, according to our molecular studies, the specimens of the native gall midges of Mashhad were *F. tetranych*i. The possible interpretation for the difference between morphological and molecular identification results in this study is the difficulty of distinguishing the two species from each other, due to their great morphological similarity. *F. tetranych*i has been mentioned as a possible synonym for *F. acarisuga* so far, because of the high morphological resemblance. Personal correspondence with international experts revealed that there are two taxa named *F. tetranych*i, one named by Rubsaamen and introduced as one of the synonymous names of *F. acarisuga*, and the other named by Kieffer which is an unknown species and mentioned as a possible synonym of *F. acarisuga*. To prove or disprove the hypothesis whether *F. tetranych*i is synonymous with *F. acarisuga* or completely separate from it, it is necessary to study voucher specimens of *Feltiella* species. Studying further populations of the gall midges on various hosts around the world through sequencing more than one molecular marker is also needed.

Conclusion

In this study specimens of the native gall midges were identified as *Feltiella acarisuga* Vallot based on morphological identification, while molecular studies identified them as *F. tetranych*i. Since molecular identification is more accurate than morphological one, the present study can show how different the indigenous species is from the well-known commercial species *F. acarisuga*. The present native species probably has little ability to settle in artificial and manipulated environments despite of its activity in the nature of Mashhad. Its usage as a biological control agent for tetranychid mites requires further bio-ecological studies in the laboratory and its genetic comparison with known species in the world.

Keywords: Biological control, Gall midge, Molecular identification, Tetranychid mite



مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۲۲۷-۲۳۸

موقعیت آرایه‌شناختی یک گونه‌ی بومی از جنس *Feltiella Rübsaamen* (Dip.: Cecidomyiidae) در ایران

مآنده ملائی^۱ - حسین صادقی نامقی^۲*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

چکیده

موفقیت برنامه‌های مهار زیستی آفات به آرایه‌شناسی و شناسایی دقیق آفت و دشمنان طبیعی آن بسیار وابسته است. پشه‌های گال‌زای جنس *Feltiella Rübsaamen*, 1910 از عوامل موثر مهار کنه‌های تارتن هستند، که علی‌رغم تنوع، گستردگی و توانایی مهار بالا تنها یک گونه از آن‌ها به صورت تجاری ثبت شده است. گونه‌های این جنس به دلیل داشتن هم‌نام‌های زیاد و پیچیده و نبود بررسی‌های جامع آرایه‌شناختی به سختی از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند. هدف از انجام این پژوهش، تعیین جایگاه آرایه‌بندی پشه *Feltiella* در ایران بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آن است. جایگاه آرایه‌بندی این پشه با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود و عمدتاً بر پایه ویژگی‌های دستگاه تناسلی حشرات نر و شناسایی مولکولی از طریق تعیین توالی زیرواحد یک ژن سازنده آنزیم سیتوکروم اکسیداز C و مقایسه آن با نمونه‌های موجود در بانک ژن انجام شد. در بررسی ریخت‌شناختی شکارگر جمع‌آوری شده از کلنی کنه‌های تارتن به *Feltiella acarisuga* Vallot تعیین هویت شد. این در حالی بود که در بررسی‌های مولکولی نمونه جمع‌آوری شده از مشهد شباهت بسیار کمتری به گونه‌ی معروف *F. acarisuga* نسبت به گونه‌ی منتسب به *F. tetranynchi* داشت. به طوری که مقایسه اختلافات نوکلئوتیدی بین گونه‌های نمونه‌های گونه‌ی بومی حاضر با نمونه‌های *F. acarisuga* و *F. tetranynchi* موجود در بانک ژن و همچنین نتایج به دست آمده از تحلیل اتصال - همسایگی نشان داد که نمونه‌های مشهد علی‌رغم شناسایی و تایید مورفولوژیکی به عنوان گونه *F. acarisuga*، احتمالاً گونه‌ی *F. tetranynchi* هستند، که به دلیل شباهت بسیار زیاد ریخت‌شناسی از آن به عنوان مترادف احتمالی *F. acarisuga* یاد می‌شود. با توجه به دقت بیشتر شناسایی مولکولی نسبت به ریخت‌شناختی، پژوهش حاضر تفاوت گونه‌ی مورد مطالعه با گونه‌ی معروف تجاری *F. acarisuga* را نشان می‌دهد. اثبات یا رد فرضیه مترادف بودن این دو گونه نیازمند مطالعه‌ی نمونه‌های تیپ گونه‌های *F. tetranynchi* و *F. acarisuga* و بررسی مولکولی و ریخت‌شناختی جمعیت‌های مختلف دنیا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پشه گال‌زا، شناسایی مولکولی، کنه تارتن، مهار زیستی

مقدمه

کشاورزی پایدار مورد توجه قرار گرفته است. کشاورزی پایدار بر بهبود کشاورزی به گونه‌ای تاکید دارد، که علاوه بر تهیه غذای سالم و کافی بتواند یکپارچگی محیط زیست و منابع طبیعی را نیز برای نسل‌های آتی حفظ کند. لذا نیاز به توسعه روش‌هایی است که پایدار، مقاوم، قابل تحمل و در عین حال موثر باشند. این تفکر استفاده از عوامل مهار زیستی را توجیه می‌کند (Baker et al., 2020; Saxena et al., 2013; Singh, 2006). مهار پایدار آفات، نسبت به روش‌های مرسوم نیازمند رویکردی علمی‌تر و آگاهانه‌تر است. نخستین گام در مهار پایدار آفات تشخیص آفت برای دستیابی به اطلاعات مربوط به

در سال‌های اخیر با افزایش آگاهی و نگرانی نسبت به اثرات مخرب سموم شیمیایی بر روی سلامت انسان و محیط زیست، ایده

۱ و ۲- به ترتیب پژوهشگر پسادکتر و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، مشهد و پژوهشگر پسادکتر و مسئول طرح پسادکتر، صندوق حمایت از پژوهشگران، ایران، تهران
(Email: sadeghin@um.ac.ir)
(*) نویسنده مسئول:

زیست‌شناسی و مهار آن است. آرایه‌شناسی^۱ شامل مطالعه نظریه، رویه و قوانین طبقه‌بندی موجودات زنده بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های بین آن‌هاست. شناسایی دقیق حشرات آفت به مهارت متخصصین با تجربه علم آرایه‌شناسی نیاز دارد. اهمیت آرایه‌شناسی به حدی است که اشتباهات احتمالی در حوزه تشخیص آفات می‌تواند به شکست‌های گزاف در برنامه‌های مهار آفات منجر شود (Watson, 1997). مهار زیستی مدیریت آفات بر پایه بوم‌شناختی است، که نسبت به روش‌های شیمیایی و فیزیکی کنترل آفات پایدارتر و بادوام‌تر است و می‌تواند به‌عنوان یک سیستم جایگزین نقش مهمی در رسیدن به کشاورزی پایدار ایفا کند (Baker and Cook, 1974; Hoddle and Van Driesche, 2009). هسته مدیریت پایدار آفات را دو راهبرد مهار زیستی یعنی محافظت و بهره‌برداری از دشمنان طبیعی بومی و وارد کردن دشمنان طبیعی غیربومی تشکیل می‌دهند، که هر دوی آن‌ها نیازمند شناسایی آفت و دشمنان طبیعی آن می‌باشند (Watson, 1997). علی‌رغم مزایای متعدد عوامل مهار زیستی، تنها تعداد معدودی از این عوامل شناسایی و به صورت تجاری به ثبت رسیده‌اند و مهار زیستی به‌عنوان یک صنعت هنوز در ابتدای راه است. آینده مهار زیستی در گرو پیشرفت زیست فناوری در عرصه مطالعات پروتئومیک، ترنسکریپتومیک، متابولومیک و خصوصیات ژنومی عوامل مهار زیستی برای درک بهتر ساز و کارهای دخیل در کنترل پاتوژن‌های گیاهی است (Saxena et al., 2013; Sharma et al., 2013). موفقیت برنامه‌های مهار زیستی کلاسیک وابسته به تطبیق دقیق دشمنان طبیعی با میزبان آن‌هاست و در این مسیر شناسایی صحیح هر دو گونه آفت و دشمن طبیعی بسیار حائز اهمیت است. از این رو می‌توان گفت مهار زیستی موفق وابستگی نزدیکی به آرایه‌شناسی دارد (Rosen, Barratt et al., 2018; Watson, 1997; 1986).

در میان گروه‌های آرایه‌شناختی که به‌عنوان عامل مهار زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند، پشه‌های گال‌زای جنس *Feltiella* موجود در کلنی کنه‌های گیاه‌خوار قریب به دویست سال است که توجه متخصصین را به خود جلب کرده‌اند (Fedotova and Kozlova, 2019). جنس *Feltiella* پیش‌تر تحت نام‌های مختلفی شناخته و توصیف می‌شد، که هم‌اکنون همگی تحت یک نام شناخته می‌شوند. این جنس در سال ۱۹۹۵ توسط گاگنه مورد بازبینی و نام‌گذاری مجدد قرار گرفت و تعداد نام‌های آن از ۲۴ به ۸ عدد کاهش یافت (Abe et al., 2011). طبق کتاب فهرست Cecidomyiidae جنس *Feltiella* مشتمل بر یازده گونه با پراکنش جهانی است، که لاروهای همه گونه‌های آن به کنه‌های تترانیکید حمله می‌کنند (Gagné and Jaschhof, 2021). در این میان گونه‌ی *F. acarisuga* مشتمل بر

بیش از ده نام مترادف است که در سراسر جهان، به‌جز نواحی نتوتروپیکال پراکنده است. *F. acarivora* از اندونزی، ژاپن و استرالیا، *F. curtistylus* از برزیل، آرژانتین و فلوریدا، *F. insularis* تحت نام‌های مختلف از نواحی مختلف آمریکای شمالی و جنوبی، *F. kanchanjungaensis* از شرق هند، *F. ligulata* از آمریکای جنوبی، *F. luboviae* از شمال غربی روسیه، *F. occidentalis* از کالیفرنیا و ژاپن، *F. pini* تحت نام‌های مختلف از آمریکای شمالی و مرکزی و استرالیا، *F. reducta* از آمریکا و *F. tetranychii* از بخش‌های مختلف اروپا، ترکیه و جنوب روسیه گزارش شده‌است. در میان گونه‌های جنس *Feltiella*، گونه‌ی *F. acarisuga* با بیش‌ترین میزان پراکنش جهانی و قدرت شکارگری بسیار بالا به عنوان شکارگر بسیار موثر کنه‌های جنس *Tetranychus* در بسیاری از کشورها شناخته شده‌است (Ganaha- Fedotova and Kozlova, 2019; Kikumura et al., 2012). این گونه در حال حاضر توسط شرکت‌های متعددی در سراسر دنیا تولید می‌شود و موفقیت آن در کنترل کنه‌های تارتن از نقاط مختلف جهان گزارش شده‌است (Opit et al., 1997; Sharaf, 1984; Gillespie et al., 1998; Wardlow and Jobin, 1990). علی‌رغم توانایی بالای گونه‌های جنس *Feltiella* به‌عنوان عامل مهار زیستی، به دلیل مطالعه‌ی کمی که روی این حشرات کنه‌خوار به‌ویژه در حوزه تشخیص آن‌ها صورت گرفته، اطلاعات در مورد این حشرات مفید پراکنده و اندک است. از طرفی به دلیل داشتن هم‌نام‌های زیاد و پیچیده گونه‌های این جنس (Gagné, 1995; Gagné and Jaschhof, 2021) و نبود یک مطالعه‌ی جامع آرایه‌شناختی درباره آن‌ها به سختی از یکدیگر قابل شناسایی و تفکیک می‌باشند. به‌طوری‌که در بسیاری از مقالات مربوط به زیست‌شناسی، این گونه‌ها تنها تحت عنوان کلی *Feltiella* sp. گزارش شده‌اند (Gagné, 1995). تنها توصیف کامل در دسترس از این جنس مربوط به دو گونه از میان یازده گونه‌ی جنس *Feltiella* است (Ganaha-Kikumura et al., 2012; Abe et al., 2011). از این‌رو مطالعات بیش‌تر برای گسترش دانش آرایه‌شناختی و زیست‌شناسی این حشرات کنه‌خوار و به دنبال آن تعیین گونه‌های امیدبخش برای مهار کنه‌های تارتن ضروری به نظر می‌رسد (Fedotova and Kozlova, 2019). کشف یک گونه‌ی جدید از *Feltiella* در ایران به استفاده از این دشمن طبیعی در مدیریت آفات کمک می‌کند. بر اساس منابع موجود (Abe et al., 2011; Ganaha-Kikumura et al., Fedotova and Kozlova, 2019; 2012) شناسایی و تفکیک گونه‌های *Feltiella* از یکدیگر از طریق یک سری ویژگی‌های ظاهری نظیر وضعیت بندهای شاخک، بال و رگ‌بال‌ها، اندازه ران، ساق و بندهای پنجه، پالپ‌ها و عمدتاً شکل‌شناسی دستگاه تناسلی خارجی حشرات نر صورت می‌گیرد. از آنجایی که تفکیک گونه‌ها از روی مشخصات ظاهری حشرات ماده

کنه‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد، برای یافتن لارو و شفیره پشه گال‌زا، زیر استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و حشرات نابالغ همراه با برگ آلوده به کنه به پتری‌دیش‌های حاوی پد مرطوب منتقل شدند. پتری‌دیش‌ها پس از انتقال به اتاقک رشد (با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای 21 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 75 ± 5 درصد) به طور روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و حشرات کامل ظاهر شده برای شناسایی و پرورش جمع‌آوری شدند. نمونه‌های حشرات کامل برای بررسی ریخت‌شناسی در اتانول ۷۰ درصد و برای بررسی مولکولی در اتانول خالص نگهداری شدند. برای شناسایی ریخت‌شناختی پس از شفاف‌سازی نمونه‌ها با استفاده از هیدروکسیدپتاسیم ده درصد، هر نمونه در مخلوط هویر به صورت اسلاید میکروسکوپی دائمی روی لام تثبیت شد. نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود (Lee et al., 2004; Harris, 1966; ; شناسایی و برای تایید نام علمی گونه به نزد دکتر اسکوراوا در جمهوری چک ارسال شد. نمونه‌های مستند (voucher) در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و تعدادی نیز در مجموعه آزمایشگاه شخصی دکتر اسکوراوا نگهداری می‌شوند.

استخراج DNA

برای شناسایی مولکولی، از نمونه‌های نگهداری شده در اتانول ۹۶ درصد و دمای -20 درجه سلسیوس استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های کامل با استفاده از روش چلکس ۱۰۰ انجام شد. بعد از تبخیر کامل اتانول، ۵-۷ عدد حشره کامل در حضور نیتروژن مایع، در یک میکروتیوب حاوی ۴۰ میکرولیتر بافر استخراج (چلکس ۵٪) و ۴ میکرولیتر پروتئیناز پتاسیم کاملاً ساییده و له شد. مخلوط هم‌گن به‌دست‌آمده به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم 60 درجه و سپس برای غیرفعال کردن آنزیم به مدت ۸ دقیقه در دمای 95 درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از سانتیفریژ نمونه در 14000 دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه، محلول رویی برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برداشته شد (Muraji et al., 2004; Sayed et al., 2013).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تعیین توالی

برای تکثیر بخشی از ژن COI از ترکیب دو آغازگر- $5'$ LCO (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- $3'$) به‌عنوان آغازگر- $5'$ (HCO) (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA- $3'$) به‌عنوان آغازگر برگشت استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (پارس توس، مشهد)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۳ میکرولیتر DNA الگو و

بسیار مشکل است، گاهی به‌دلیل عدم دسترسی به حشرات نر گونه‌ها ناشناخته باقی‌مانده‌اند (Abe et al., 2011). ضمن این‌که تکیه بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی جنیتالیا الزاماً همیشه روش تشخیصی واضحی نیست (Fedotova and Kozlova, 2019). در بسیاری از گروه‌های آرایه‌شناختی شناسایی عوامل بالقوه مهار زیستی بر پایه زمینه‌های ریخت‌شناسی به‌تنهایی کافی نیست و لازم است تا تفکیک گونه‌ها از طریق روش‌های مولکولی نیز صورت گیرد (Barratt et al., 2018). در تشخیص هر چه دقیق‌تر عوامل مهار زیستی نیز استفاده از روش‌های مولکولی در کنار ویژگی‌های ریخت‌سنجی بسیار اهمیت دارد، تا جایی که ترکیب آرایه‌شناسی سنتی و روش‌های مولکولی جزء جدایی‌ناپذیر فعالیت‌های مهار زیستی در آینده خواهد بود (Barratt et al., 2018). DNA بارکدینگ به‌عنوان ابزاری موثر در شناسایی و تشخیص گونه‌ها، مکمل خوبی برای روش‌های ریخت‌شناختی است. این روش همچنین در شناسایی نمونه‌های ناقص ریخت‌شناسی، فرم‌های نابالغ حشرات و گونه‌های دارای چندشکلی بسیار کارآمد است (Armstrong and Ball, 2005). قطعه COI زیرواحد یک ژن سازنده آنزیم سیتوکروم اکسیداز C است، که به‌عنوان یک بارکد ژنتیکی در آرایه‌شناسی طیف وسیعی از گونه‌های جانوری از جمله گونه‌های *Feltiella* spp. مطرح و مورد استفاده است (Ganaha-Kikumura et al., Abe et al., 2011; 2012). در زمینه آرایه‌شناسی گونه‌های *Feltiella* spp. علی‌رغم توانایی فوق‌العاده‌شان در مهار زیستی، مطالعات اندکی صورت گرفته‌است. به‌طوری‌که فقط دو مورد توصیف کامل از جنس *Feltiella* در دسترس است و تنها تعداد معدودی توالی از این جنس در بانک ژن به‌ثبت رسیده‌است. در ایران تا کنون از جنس *Feltiella* دو گونه *F. acarivora* و *F. acarisuga* گزارش شده است (Honarmand et al., 2015). هدف از پژوهش حاضر تعیین وضعیت گونه‌ی بومی *Feltiella acarisuga* در ایران بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آن است. اطمینان از هویت این عامل بالقوه بیوکنترل می‌تواند نقش مهمی در برنامه‌های آتی مهار زیستی کنه تارتن با تکیه بر ذخایر بومی و سرمایه‌های طبیعی کشور داشته باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی پشه گالزای شکارگر

نمونه‌برداری طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ (عمدتاً در ماه‌های اردیبهشت-شهریور) با جمع‌آوری برگ گیاهان گزنه *Urtica dioica*، کاهوی وحشی *Lactuca scariola* و تمشک *Rubus* sp. آلوده به کنه تارتن در نقطه‌ای از مناطق ییلاقی توابع شهرستان طرقبه-شاندیز انجام شد. برگ‌های آلوده پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقات

۱). برای تخمین میزان اعتبار گره‌ها^۳ از آزمون بوت‌استرپ^۴ با هزار تکرار استفاده شد.

نتیجه‌گیری و بحث

در این پژوهش، بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی و با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود، شکارگر جمع‌آوری شده از کلنی کنه‌های تارتن به نام *Feltiella acarisuga* Vallot تعیین هویت شد، که برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن به این صورت است: حشرات کامل با بدنی به رنگ خاکستری تیره و شکم مایل به صورتی، دارای جثه‌ای کوچک به طول ۱/۵-۱ میلی‌متر هستند. پالپ‌ها ۴ بندی، کوتاه‌تر از طول و عرض سر و شاخک‌ها ۱۴ بندی با شکل فلاژلومرهای^۵ انتهایی متغیر می‌باشند. شکل فلاژلومرها در افراد نر و ماده متفاوت، هر فلاژلومر در نرها با دو گره، گره قاعده‌ای و انتهایی به ترتیب پوشیده از یک و دو ردیف موهای بلند حلقوی و در حشرات ماده استوانه‌ای شکل، با گردن کوتاه و بدون مو می‌باشد. بال‌ها نسبتاً پهن، به طول تقریبی ۱/۰۸ میلی‌متر، رگبال شعاعی پنج (R_5) مستقیم، در نزدیکی نوک بال به رگبال کناری (C) متصل و رگبال شعاعی یک (R_1) در نیمه قاعده‌ای به رگبال کناری پیوسته است. اولین بند پنجه بدون خار، در نرها ناخن‌های پنجه پاهای جلوی دندانه‌دار و ناخن‌های پاهای میانی و عقبی ساده است. دستگاه تناسلی خارجی حشرات نر با هیپوپروکت‌های کامل و بلندتر از سرسی‌ها که به سمت انتها به تدریج باریک می‌شوند. ایدیواگوس^۶ بلندتر از هیپوپروکت^۷، پهن، کشیده و در انتها گرد است (شکل ۱).

جهت تایید شناسایی مورفولوژیک انجام شده، پس از تکثیر موفقیت‌آمیز نشانگر ژنتیکی COI، کلیه توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده‌های بانک ژن به‌وسیله جستجوی بلاست انطباق یافتند. بیشترین میزان شباهت توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن (حدود ۱۰۰ درصد)، با دو گونه‌ی طبقه‌بندی‌نشده از *Cecidomyiidae* بود که از منطقه اونتاریوی کانادا گزارش شده بودند. از پنج توالی بررسی‌شده نتیجه بلاست همه توالی‌ها با درجه شباهتی بین ۹۹/۲۰ تا ۹۹/۸۴ درصد با توالی مربوط به گونه‌ی *F. tetranynchi* (متعلق به منطقه‌ای در جنوب شرقی انگلستان) منطبق شدند.

۷/۵ میکرولیتر آب مقطر، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد (Folmer et al., 1994). دمای بهینه اتصال (annealing) با انجام PCR گرادیان مشخص شد. برنامه دمایی واکنش PCR به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه (شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و در آخر گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه بود. پس از اتمام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر ۴ میکرولیتر از محصول PCR در چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پنج محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer Corporation, Daejeon, South Korea) ارسال شد. توالی‌یابی به صورت دوطرفه از سمت آغازگر رفت و برگشت و با استفاده از همان آغازگرهای واکنش PCR انجام شد.

تحلیل داده‌های مولکولی

کروماتوگرام توالی‌های به‌دست‌آمده به کمک نرم‌افزار DNA Baser (نسخه ۳،۵،۴) مقایسه و ویرایش شدند و سپس هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها توسط نرم‌افزار MEGA-X (نسخه ۱۰،۱۶) انجام شد. نهایتاً توالی‌ها با سایر توالی‌های COI موجود در بانک ژن (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) توسط ابزار BLASTn مقایسه و هم‌سانی آن‌ها با یکدیگر تایید شد. تخمین میزان واگرایی نوکلئوتیدها با مدل Composite Likelihood model و به روش Pairwise در نرم‌افزار MEGA X انجام شد. محاسبه فواصل نوکلئوتیدی با استفاده از مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا (Kimura, 1980) انجام شد. فواصل درون و بین گونه‌ای با استفاده از نرم‌افزار ExcaliBAR محاسبه (Aliabadian et al., 2014) و هیستوگرام توزیع فراوانی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید. تحلیل خوشه‌بندی^۱ با روش اتصال همسایگی^۲ در نرم‌افزار MEGA X و براساس مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا انجام گرفت. در رسم درخت تبارشناسی به‌منظور مقایسه موقعیت فیلوژنتیک نمونه‌های مورد بررسی، کلیه توالی‌های مربوط به جنس *Feltiella* موجود در بانک ژن (شامل هشت توالی از گونه‌ی *F. acarisuga*، دو توالی از *F. acarivora* و یک توالی از *F. tetranynchi*) دریافت شد و از جنس *Endaphis* به‌عنوان گروه خارجی استفاده گردید (جدول

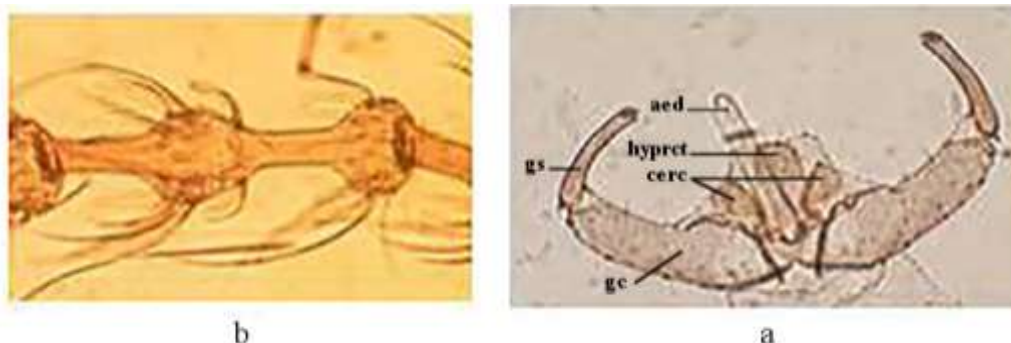
3- Nodal support
4- Bootstrap
5- flagellomere
6- aedeagus
7- hypoproct

1- Clustering analysis
2- Neighbor Joining

جدول ۱- نمونه‌های استفاده‌شده از بانک ژن برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی

Table 1- Gene Bank utilized samples for phylogenetic analysis

گونه Species	منبع دان آ DNA source	شماره دسترسی Accession number
<i>F. tetranych</i>	Dorchin <i>et al.</i> , 2019	MN191294.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698985.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698981.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698978.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698983.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698979.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698980.1
<i>F. acarisuga</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698982.1
<i>F. acarisuga</i>	Dorchin <i>et al.</i> , 2019	MN191293
<i>F. acarivora</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB698995.1
<i>F. acarivora</i>	Ganaha-Kikumura <i>et al.</i> , 2012	AB699003.1
<i>Endaphis fugitive</i>	Garipey and Messing, 2012	HQ599568.1



شکل ۱- دستگاه تناسلی خارجی (a) و فلاژلومر حشره نر (b) گونه‌ی *Feltiella* ی مشهد (شکل‌ها اصلی)

(aed, hypcrct, cerc, gs and gc are aedeagus, hypoproct, cerci, gonostylus and gonocoxite respectively).

Figure 1- Male genitalia and flagellomere of *Feltiella* species of Mashhad

(aed, hypcrct, cerc, gs and gc are aedeagus, hypoproct, cerci, gonostylus and gonocoxite respectively).

tetranych) و نمونه‌های گونه‌ی *F. acarisuga* نسبتاً زیاد بود (۰/۰۷۵۳ تا ۰/۰۹۱۱)، در حالی که در مقایسه بین نمونه‌های بومی و نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranych* اختلافات نوکلئوتیدی بسیار کمتر (۰/۰۰۱۵ تا ۰/۰۰۳۱) مشاهده شد. علاوه بر این، اختلاف نوکلئوتیدی گونه‌ی *F. acarivora* با هر سه گونه‌ی نامبرده نسبتاً زیاد و تقریباً مساوی ارزیابی شد، چنان‌که با نمونه‌های گونه‌ی بومی مورد بررسی بین ۰/۰۸۷۴ تا ۰/۰۹۳۰ (میانگین ۰/۰۹۰۱) و با نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranych* بین ۰/۰۸۸ تا ۰/۰۹۴۰ (میانگین ۰/۰۹۱۳) و با گونه‌ی شناخته‌شده *F. acarisuga* بین ۰/۰۸۸ تا ۰/۰۳۹ (میانگین ۰/۰۹۳۵) تعیین گردید.

پس از به‌دست آوردن فواصل دو به دو بین همه توالی‌های موجود، هیستوگرام فواصل نوکلئوتیدی بین و درون گونه‌ای بر اساس فراوانی آن‌ها رسم شد (شکل ۲). چنان‌که در شکل مشخص است، فواصل بین و درون گونه‌ای در ژن COI نسبت به یک‌دیگر هم‌پوشانی دارند. با بررسی قسمت‌های هم‌پوشان مشخص شد که این هم‌پوشانی‌ها مربوط به فواصل نوکلئوتیدی بین افراد گونه‌ی *F.*

این در حالی بود که میزان شباهت کلیه توالی‌های COI مورد بررسی در این پژوهش با توالی‌های مشابه *F. acarisuga* ی موجود در بانک ژن حداکثر ۹۲/۷۴ درصد و با توالی‌های مشابه *F. acarivora* حداکثر ۹۱/۸۴ درصد بود (جدول ۲). این سطح پایین تشابه بین توالی‌های دو گونه‌ی اخیر با توالی گونه‌ی مورد بررسی می‌تواند نشان‌دهنده‌ی متمایز بودن گونه‌ی بومی حاضر از آن‌ها باشد.

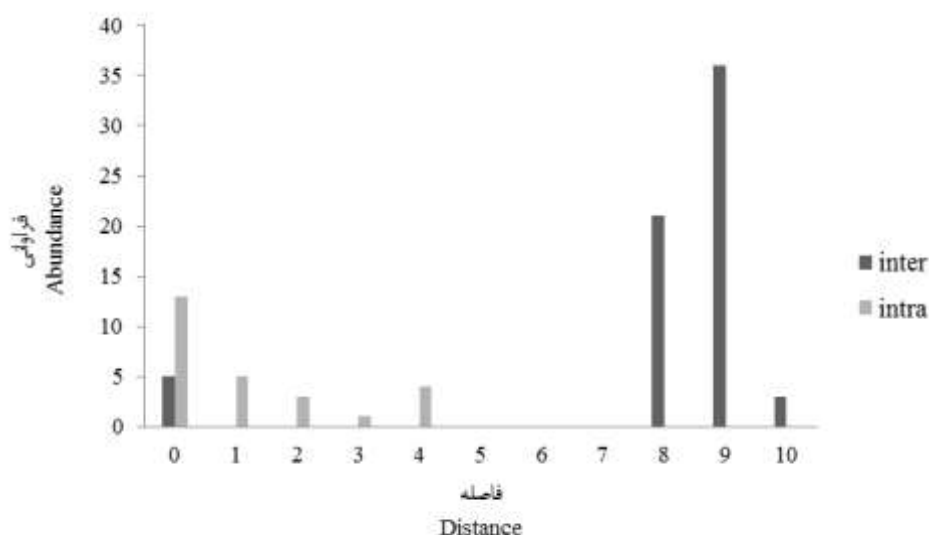
جهت محاسبه بارکد گپ^۱ توالی‌های گونه‌های مختلف *Feltiella* spp. از بانک ژن استخراج و به توالی‌های مطالعه‌ی حاضر اضافه شد. فواصل نوکلئوتیدی بین گونه‌های *Feltiella* spp. (شامل گونه‌های توالی‌یابی‌شده در مطالعه‌ی حاضر و گونه‌های موجود در بانک ژن) براساس مدل جایگزینی نوکلئوتیدی کیمورا از صفر تا ۰/۱۰۴ متغیر بود و میانگین فواصل نوکلئوتیدی بین توالی گونه‌های مورد نظر ۰/۰۸۰ محاسبه شد. فواصل نوکلئوتیدی بین نمونه‌های بومی *Feltiella* (همچنین نمونه‌های گونه‌ی *F.*

tetranych موجود در بانک ژن و افراد گونه‌ای جمع‌آوری شده در مطالعه‌ی نظر گرفته شدند.
حاضر هستند که از نظر ریخت‌شناختی به عنوان گونه‌ی *F. acarisuga* در

جدول ۲- درصد شباهت و میزان پوشش توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های بانک ژن

Table 2- Similarity and coverage between our sequences and those from the NCBI GenBank database

شماره دسترسی نمونه	تاکسون مربوطه	شماره دسترسی بهترین برخورد بلاست بانک ژن	شباهت	میزان پوشش
Specimen accession number	Corresponding Taxon	Best Genbank BLAST hit Accession number	Similarity	Coverage (bp)
OL873569 <i>Feltiella</i> sp.- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.82%	582
	<i>F. tetranych</i>	MN191294	99.66%	629
	<i>F. acarisuga</i>	AB698981	92.28%	814
OL873570 <i>Feltiella</i> sp.- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MF698911	100.00%	588
	<i>F. tetranych</i>	MN191294	99.84%	629
	<i>F. acarisuga</i>	AB698985	92.74%	814
	<i>F. acarivora</i>	AB698995.1	91.84%	814
OL873571 <i>Feltiella</i> sp.- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.83%	582
	<i>F. tetranych</i>	MN191294	99.66%	629
	<i>F. acarisuga</i>	AB698985	92.60%	814
	<i>F. acarivora</i>	AB698995	91.52%	814
OL873572 <i>Feltiella</i> sp.- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.83%	582
	<i>F. tetranych</i>	MN191294	99.20%	629
	<i>F. acarisuga</i>	AB698985	92.58%	814
	<i>F. acarivora</i>	AB698995	91.52%	814
OL873573 <i>Feltiella</i> sp.- Mashhad	Cecidomyiidae sp.	MG120911	99.83%	582
	<i>F. tetranych</i>	MN191294	99.67%	629
	<i>F. acarisuga</i>	AB698985	92.64%	814
	<i>F. acarivora</i>	AB698995	91.57%	814



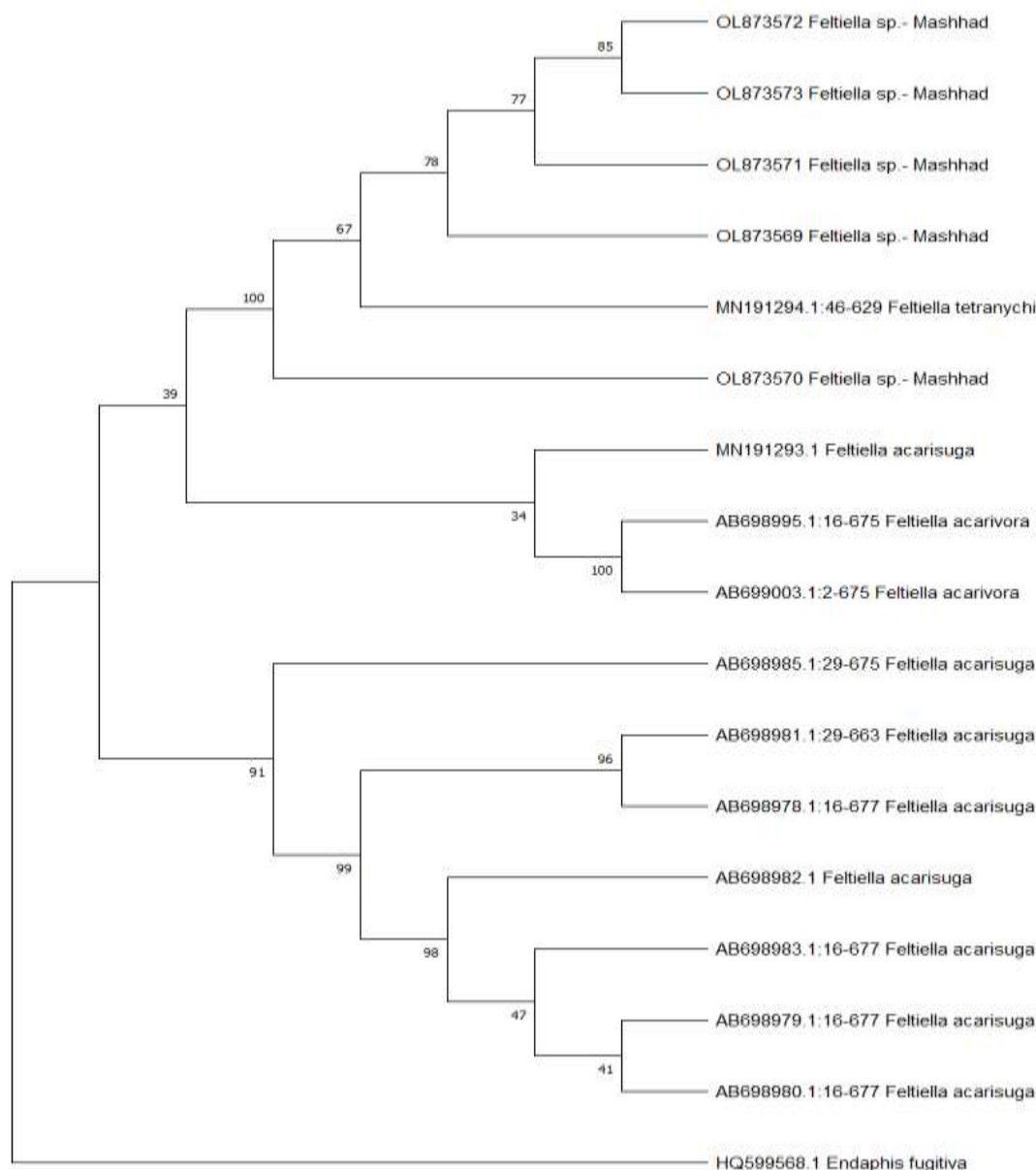
شکل ۲- هیستوگرام توزیع فواصل نوکلئوتیدی بین و درون گونه‌ای در گونه‌های مختلف جنس *Feltiella* برپایه‌ی ژن COI
ستون‌های خاکستری فواصل درون گونه‌ای و ستون‌های سیاه فواصل بین گونه‌ای را نشان می‌دهند.

Figure 2- Histogram of the distribution of Inter and intra specific distances in different species of the genus *Feltiella* based on the COI gene

Gray columns indicate interspecific distances and black columns represent interspecific distances.

درخت تبارشناسی (شکل ۳) حاصل از گونه‌های مختلف جنس *Feltiella* نشان داد که افراد گونه جمع‌آوری شده از ایران و گونه‌ی *F. tetranychii* در یک نیاک و افراد گونه‌ی *F. acarisuga* نیز در نیاکی جدا قرار دارند. باتوجه به اختلافات نوکلئوتیدی نسبتاً زیاد بین نمونه‌های گونه‌ی

F. acarisuga و نمونه‌های این مطالعه و نیز قرار گرفتن نمونه‌های گونه‌ی *F. acarisuga* در نیاکی مجزا از نیاک مربوط به نمونه‌های مطالعه‌ی اخیر (شکل ۳)، می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های گونه جمع‌آوری شده از مشهد علی‌رغم تشخیص ریخت‌شناختی احتمالاً *F. acarisuga* نیستند.



شکل ۳- درخت اتصال-همسایگی استنباط شده از توالی‌های قسمتی از ژن COI مربوط به گونه‌های *Feltiella*

درصد بوت‌استرپ (۱۰۰۰ تکرار) در نزدیک هر شاخه نشان داده شده است (مقادیر زیر ۵۰ درصد حذف شده‌اند). خط مقیاس نشان‌دهنده فواصل براساس مدل جایگزینی کیمورا است. نمونه‌های مورد آزمایش با نام *Feltiella sp. Mashhad* مشخص شده‌اند.

Figure 3- Neighbor-joining tree inferred from partial sequences of the COI gene related to *Feltiella* species

از سوی دیگر، باتوجه به میزان اختلافات نوکلئوتیدی کم بین نمونه‌های گونه‌ی *Feltiella* مطالعه‌ی حاضر و نمونه‌های گونه‌ی *F. tetranych* موجود در بانک ژن، همپوشانی فواصل نوکلئوتیدی بین افراد گونه‌ی *Feltiella* ی ایران و افراد گونه‌ی *F. tetranych* بانک ژن و همچنین نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل اتصال-همسایگی، می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های بومی مورد بررسی، احتمالاً گونه‌ی *F. tetranych* هستند. تفسیر محتمل آن است که این گونه‌ها به دلیل شباهت ریخت‌شناسی بسیار زیاد به راحتی از یک‌دیگر قابل تفکیک نیستند. با این حال اظهار نظر در مورد هویت واقعی نمونه‌های ایرانی نیازمند مقایسه‌ی ریخت‌شناختی این نمونه‌ها با گونه‌ی *F. tetranych* است. به‌علاوه از آن‌جایی که روش‌های مولکولی برای شناسایی و تفکیک گونه‌هایی که از نظر ریخت‌شناسی مرموز یا غیرقابل تمیز می‌باشند، ابزاری سودمند هستند، پیشنهاد می‌شود از ژن‌های بیشتری برای بررسی‌های مولکولی تکمیلی استفاده شود (Hewitt et al., 1991).

در تحقیق حاضر بعد از آشکار شدن تفاوت نتایج تشخیص مولکولی و ریخت‌شناختی نمونه‌هایی طی دفعات برای شناسایی مجدد به نزد دکتر اسکوراوا در جمهوری چک ارسال شد، که باز هم به عنوان *F. acarisuga* تایید شد. نهایتاً طی مکاتباتی که با متخصصین صاحب نظر بین‌المللی صورت گرفت مشخص شد که *F. tetranych* به لحاظ ریخت‌شناسی به *F. acarisuga* بسیار شبیه است، به‌طوری که برخی تاکسونومیست‌ها این دو گونه را هم‌نام می‌دانند. گانگه نیز در فهرست Cecidomyiidae خود اعلام کرده که گونه *F. tetranych* احتمالاً با *F. acarisuga* هم‌نام است (Gagné and Jaschhof, 2021). در این فهرست دو فرد با نام *F. tetranych* وجود دارد که یکی مشخصاً به‌عنوان مترادف *acarisuga* و دیگری به‌عنوان گونه‌ای مجزا طبقه‌بندی می‌شود. گونه‌ی مجزای *F. tetranych* برای اولین بار از جنوب روسیه یافت شد و در سال ۱۹۰۸ توسط Kieffer نام‌گذاری شد. *F. tetranych* Kieffer گونه‌ای است که به درستی شناخته نشده و جز محل پراکنش اطلاعات چندانی از آن در دسترس نیست. لازم به ذکر است که گانگه در سال ۱۹۹۵ از این گونه به‌عنوان گونه هم‌نام *acarisuga* یاد کرده است، اما بعدها در فهرست خود آن را به‌عنوان یک گونه‌ی کاملاً مجزا معرفی کرده است. گونه‌ی دیگر *F. tetranych* در سال ۱۹۱۰ توسط Rubsaamen نام‌گذاری شده‌است

منابع

که از نظر ریخت‌شناسی کاملاً به *F. acarisuga* شبیه است و گانگه در کاتالوگ خود (Gagné and Jaschhof, 2021) آن را مترادف *F. acarisuga* می‌داند (Skuhravá and Skuhravý, 2020). اثبات یا رد این فرضیه که آیا *F. tetranych* Kieffer گونه‌ای هم‌نام با *acarisuga* و یا کاملاً مجزا از آن است، مستلزم نمونه‌برداری از جمعیت‌های مختلف پشه‌گال‌زا در میزبان‌های متنوع از سراسر جهان و انجام بررسی‌های مولکولی بیشتر با توالی‌یابی بیش از یک نشان‌گر مولکولی است. به‌علاوه در حل این معما لزوم بررسی‌های مولکولی نمونه‌های تیپ گونه‌های جنس *Feltiella* موجود در موزه‌های محل نگهداری آن‌ها در کشورهای امریکا، فلسطین اشغالی، انگلستان و آلمان مورد تاکید است (مکاتبات شخصی با پروفیسور گانگه در امریکا، پروفیسور هریس در انگلستان، دکتر منگوال در آلمان و دکتر دورخین در دانشگاه تل‌آویو). آن‌چه مسلم است این است که شناسایی مولکولی نسبت به مطالعات ریخت‌شناختی از دقت بالاتری برخوردار بوده و مکمل آن است، که می‌تواند نشان دهد گونه‌ی مورد بررسی چقدر با گونه‌ی شناخته‌شده *F. acarisuga* که به‌عنوان شکارگر موفق کنه‌های تارتن در سراسر دنیا شناخته می‌شود، تفاوت دارد. گونه‌ی بومی حاضر احتمالاً توانایی کمی برای استقرار در محیط‌های مصنوعی و دست‌کاری‌شده را دارد و علی‌رغم فعالیت در طبیعت شهرستان مشهد، استفاده از آن به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک کنه‌های تارتن نیازمند بررسی‌های بیواکولوژیک بیشتر در شرایط آزمایشگاه و مقایسه‌ی ژنتیکی آن با گونه‌های شناخته‌شده در دنیا است.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب و با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح شماره ۹۵۰۰۸۰۷۷) انجام شده‌است. بدینوسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و دانشگاه فردوسی مشهد که امکانات مالی و اجرایی این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از دکتر مارسلا اسکوراوا (جمهوری چک) برای شناسایی مورفولوژیک گونه و دکتر لیدا فکرت (دانشگاه فردوسی مشهد) به سبب راهنمایی‌های ارزشمندشان قدردانی می‌گردد.

- 1- Abe, J., Ganaha-Kikumura, T., & Yukawa, J. (2011). Morphological features, distribution, prey mites, and life history traits of *Feltiella acarisuga* (Vallot) (Diptera: Cecidomyiidae) in Japan. *Applied Entomology and Zoology* 46(2): 271-279. <https://doi.org/10.1007/s13355-011-0038-x>.
- 2- Aliabadian, M., Nijman, V., Mahmoudi, A., Naderi, M., Vonk, R., & Vences, M. (2014). ExcaliBAR: a simple and

- fast software utility to calculate intra-and interspecific distances from DNA barcodes. *Contributions to Zoology*, 83(1), 79-84d. <https://doi.org/10.1163/18759866-08301004>.
- 3- Armstrong, K., & Ball, S. (2005). DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1813-1823. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1713>.
- 4- Baker, B.P., Green, T.A., & Loker, A.J. (2020). Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biological Control* 140: 104095. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104095>.
- 5- Baker, K. & Cook, R.J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman and Company.
- 6- Barratt, B.I., Cock, M.J., & Oberprieler, R.G. (2018). Weevils as targets for biological control, and the importance of taxonomy and phylogeny for efficacy and biosafety, *Diversity* 10(3): 73. <https://doi.org/10.3390/d10030073>.
- 7- Fedotova, Z. & Kozlova, E. (2019). Gall Midges of the Genus *Feltiella* Rübsaamen (Diptera, Cecidomyiidae) in the Northwest of Russia, with Description of a New Species, *Entomological Review* 99(9): 1359-1381. <https://doi.org/10.1134/S0013873819090136>.
- 8- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- 9- Gagné, R.J. (1995). Revision of tetranychid (Acarina) mite predators of the genus *Feltiella* (Diptera: Cecidomyiidae), *Annals of the Entomological Society of America* 88(1): 16-30. <https://doi.org/10.1093/aesa/88.1.16>.
- 10- Gagné, R.J. & Jaschhof, M. (2021). *A Catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the World*. Fifth Edition. Digital. 816 pp.
- 11- Ganaha-Kikumura, T., Yukawa, J., Tokuda, M., Ohno, S., & Abe, J. (2012). Occurrence of two acarivorous species of the genus *Feltiella* (Diptera: Cecidomyiidae) in Okinawa, southern Japan, and redescription of *F. acarivora* (Zehntner), *Applied Entomology and Zoology* 47(4): 319-329. <https://doi.org/10.1007/s13355-012-0122-x>.
- 12- Gillespie, D.R., Roitberg, B., Basalyga, E., Johnstone, M., Opit, G., Rodgers, J., & Sawyer, N. (1998). Biology and Application of *Feltiella acarisuga* (Vellot)(Diptera: Cecidomyiidae) for Biological Control of Twospotted Spider Mites on Greenhouse Vegetable Crops. Technical Report 145 Agriculture and Agri-Food Canada, Pacific Agri-Food Research Centre: Agassiz, BC, Canada.
- 13- Harris, K. (1966). Gall midge genera of economic importance (Diptera: Cecidomyiidae) Part 1: Introduction and subfamily Cecidomyiinae; supertribe Cecidomyiidi, *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 118(10): 313-358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1966.tb03156.x>.
- 14- Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., & Young, J.P.W. (1991). *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Germany: Springer.
- 15- Hoddle, M.S., & Van Driesche, R.G. (2009). Biological control of insect pests. p. 91-100. In: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.) *Encyclopedia of Insects*, second ed. Academic Press, San Diego.
- 16- Honarmand, A., Sadeghi Namaghi, H., & Fekrat, L. (2015). First report of *Feltiella acarisuga* Vallot (Diptera: Cecidomyiidae) in Iran, *Plant Protection* 28(3): 434-436. <https://doi.org/10.22067/JPP.V28I3.27134>.
- 17- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- 18- Lee, H.-S., Chung, B.-K., & Kim, K.-J. (2004). First report of *Feltiella acarisuga* Vallot (Diptera: Cecidomyiidae) in Korea, *Korean Journal of Applied Entomology* 43(3): 185-188.
- 19- Muraji, M., Kawasaki, K., Shimizu, T., & Noda, T. (2004). Discrimination among Japanese species of the Orius flower bugs (Heteroptera: Anthocoridae) based on PCR-RFLP of the nuclear and mitochondrial DNAs, *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 38(2): 91-95.
- 20- Opit, G., Roitberg, B., & Gillespie, D. (1997). The functional response and prey preference of *Feltiella acarisuga* (Vallot)(Diptera: Cecidomyiidae) for two of its prey: male and female twospotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), *The Canadian Entomologist* 129(2): 221-227. <https://doi.org/10.4039/Ent129221-2>.
- 21- Rosen, D. (1986). The role of taxonomy in effective biological control programs, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 15(2-3): 121-129. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(86\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0167-8809(86)90085-X).
- 22- Saxena, A., Mishra, S., Raghuwanshi, R., & Singh, H.B. (2013). Biocontrol agents: Basics to biotechnological applications in sustainable agriculture. p. 141-164. In: Tiwari S.P., Sharma R., Gaur R. (Eds.) *Recent Advances in Microbiology*, Vol 2. Nova Science Publishers Inc., U.S.A.
- 23- Sayed, S.M., Montaser, M.M., Elsayed, G., Amer, S.A., & Iatrou, K. (2013). Preliminary molecular identification of a predatory bug, *Orius albidipennis*, collected from ornamental plants, *Journal of Insect Science* 13: 11. <https://doi.org/10.1673/031.013.1101>.
- 24- Sharaf, N. (1984). Studies on natural enemies of tetranychid mites infesting eggplant in the Jordan Valley, *Journal of Applied Entomology* 98(1-5): 527-533. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1984.tb02745.x>.
- 25- Sharma, A., Diwevidi, V.D., Singh, S., Pawar, K.K., Jerman, M., Singh, L., Singh, S., & Srivastawa, D. (2013). Biological Control and its Important in Agriculture. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*

- Research* 4(3): 175-180. https://www.ripublication.com/ijbbr_spl/ijbbrv4n3spl_03.pdf.
- 26- Singh, H. (2006). Achievements in biological control of diseases with antagonistic organisms at National Botanical Research Institute, Lucknow, Current status of biological control of plant diseases using antagonistic organisms in India. Proceedings of the group meeting on antagonistic organisms in plant disease management held at Project Directorate of Biological Control, Bangalore, India on 10-11th July 2003, pp. 329-336. <https://eurekamag.com/research/012/763/012763166.php>.
- 27- Skuhravá, M. & Skuhravý, V. (2020). *The Gall Midges of Europe*. Prague: Maxdorf Jesenius.
- 28- Wardlow, L. & Jobin, A. (1990). Potential new additions to the armoury of natural enemies for protected tomatoes. In *Integrated control in glasshouses, Bulletin SROP* (Vol. 13, Num. 5, pp. 225-227).
- 29- Watson, G. (1997). The Role of Taxonomy in Biological Control, With Special Reference to Insects. In *Prociding Kongres Perhimpunan Entomologi Indonesia*, Universitas Padjajaran, Bandung (Vol. V, pp. 24-26).



Weed Seed Bank and Seedling Dynamics in Response to Crop Rotation in Conventional Agroecosystems

N. Valaie^{1*}, M.H. Rashed Mohassel², M. Bannayan³

Received: 11-11-2019

Revised: 05-01-2020

Accepted: 10-02-2020

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Valaie, N., Rashed Mohassel, M.H. & Bannayan, M. (2022). Weed Seed Bank and Seedling Dynamics in Response to Crop Rotation in Conventional Agroecosystems. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 239-258. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/JPP.2021.31941.0](https://doi.org/10.22067/JPP.2021.31941.0)

Introduction

Cropping history can affect our knowledge about the compositions and diversity of weed communities in the soil. Weed Species composition and density are influenced by farming practices and vary from field to field and among areas within fields. Plants that escape control and produce seeds within the field can be considered as a major source of seed entering the soil. Crop rotation is an effective weed management tool which can change weed distribution pattern by increasing selection pressures. Two types of rotation including corn-winter wheat and fallow-winter wheat are the most common cropping systems in arid and semi-arid areas of Iran. The multiple tillage operations can affect the vertical distribution, germination and emergence of weed seeds in the soil. Weed seed bank density, species composition and diversity will change when crop management practices are altered.

Materials and Methods

A field experiment was conducted to evaluate the effects of corn-wheat and fallow-wheat crop rotations on weed seed bank dynamics and seedling population during 2016-2018 growing season at Shiraz University. The fields divided into 10 by 10 meter grids. Soil samples were taken from 0-15 and 15-30 cm depths by soil sampler (auger) with 10 cm diameter. These samples collected after seedbed preparation and before crop sowing from 144 points. The samples of each depth were mixed together, placed in black plastic bags, and transferred to the laboratory. Then, 250g of the total soil was weighed and separated. These samples was placed in silk bags and washed with low water pressure. Finally, weed seeds dried, identified and counted to the level of species using a binocular stereomicroscope. Those seeds that were resistant to forceps pressure assumed as healthy seeds. Weed seedling population were calculated using a quadrat before and after application of herbicide at the same points were seed bank was carried out. Geostatistics technique was used to investigate density and spatial distribution of weed seedlings in two different crop rotations.

Result

The highest frequency of weed seed bank belongs to *Portulaca oleracea*, *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* and *Lamium amplexicaule*. Relative density of *P. oleracea* and *A. retroflexus* seeds increased in corn-wheat rotation compared with fallow-wheat. The results showed that weed seed frequency was significantly affected by crop rotation and depth of plowing. As corn-wheat rotation had 33% increasing and fallow-wheat 19.44% decreasing of weed seed in 15-30 cm soil depth. The size of the total weed seed bank in corn-wheat caused a greater seed accumulation in the surface layer of the soil (0-15 cm). Weed seed density in corn-wheat rotation increased 89.79% and 62.85% in 0-15 and 15-30 cm, respectively during two years. Shannon diversity index increased by 12% in corn-wheat and decreased by 5.4% in fallow-wheat compared with the first year. Margalf index of corn-wheat rotation at 0-15 and 15-30 cm of soil depths decreased 33.70% and 38.25%, respectively, compared to the fallow-wheat rotation in the first year. Sorenson similarity index of corn-wheat and fallow-wheat at 0-15 and 15-30 soil depths was 0.82% and 0.80% during two years. The slope of

1, 2 and 3- Ph.D. Graduated in Weed Science and Professors of Faculty of Agriculture, Department of Agrotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

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

linear regression also indicates that fallow-wheat weed seed bank (0.79) decreased more than corn-wheat rotation (0.47). Spatial distribution of weed seedlings showed that there is a large similarity in distribution patterns of total weed population between before and after herbicide application in two different rotations during the second year. However, distribution pattern of seedlings in corn-wheat rotation at the first year herbicide application was different after application of herbicide. Therefore, herbicide application can affect spatial distribution and number of weed seedling species.

Conclusion

Corn-wheat rotation as a high input level cropping system with deep tillage increases the size of the weed seed bank, especially in the soil surface layer (0-15 cm). While fallow-wheat rotation as a low input level cropping system causes a decreasing in weed seed bank dynamics, increasing in the diversity and richness of the seed bank and improving the soil structure by wheat residual on the soil during fallow system. The results of this study will be valuable in aiding the prediction of likely weed infestations in rotation systems. This ability to predict the size of weed seed bank, population, diversity and emergence would also provide valuable input to population dynamics models that can be used in weed management.

Keywords: Fallow, Rotation, Spatial distribution, Weed seed bank

پویایی بانک بذر و گیاهچه علف‌های هرز در پاسخ به نوع تناوب در اکوسیستم‌های زراعی

نیوشا ولایی^{۱*} - محمدحسن راشد محصل^۲ - محمد بنایان^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱

چکیده

به منظور ارزیابی اثرات تناوب‌های زراعی ذرت-گندم و آیش-گندم بر پویایی بانک بذر و جمعیت علف‌های هرز پژوهشی طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ در مزارع تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، انجام شد. جهت مطالعه بانک بذر از دو عمق ۱۵-۳۰ و ۰-۱۵ سانتی‌متر خاک نمونه‌برداری گردید. برای بررسی توزیع مکانی، تراکم گونه‌های علف‌های هرز و پویایی لکه‌ها، نمونه‌برداری پس از سبز شدن محصول در دو مرحله قبل و بعد از کاربرد علف‌کش‌ها از روش ژئواستاتستیک استفاده شد. تراکم بانک بذر علف‌های هرز در سال دوم تناوب ذرت-گندم نسبت به سال اول دارای روندی افزایشی بود و حداقل تراکم در سال دوم تناوب آیش-گندم مشاهده شد. تراکم بانک بذر ذرت-گندم برخلاف روند کاهشی تناوب آیش-گندم طی دو سال پیاپی در عمق‌های ۰-۱۵ و ۱۵-۳۰ سانتی‌متر به ترتیب ۸۹/۷۹ و ۶۲/۸۵ درصد افزایش یافت. نتایج نشان داد از تنوع گونه‌ای تناوب‌های ذرت-گندم و آیش-گندم نسبت به سال اول کاسته شد. تاثیر تناوب ذرت-گندم در سال اول بر غنای گونه‌ای در عمق‌های ۰-۱۵ و ۱۵-۳۰ سانتی‌متر خاک به ترتیب ۳۳/۷۰ و ۳۸/۲۵ درصد بود که نسبت به تناوب آیش-گندم کاهش چشمگیری داشت. مقایسه میانگین برهمکنش فراوانی بانک بذر علف‌های هرز نشان داد فراوانی بذور به طور معنی‌داری تحت تاثیر تناوب زراعی و عمق شخم می‌باشد. کاهش شیب خط رگرسیون نیز بیانگر کاهش خروج بذور علف‌های هرز از بانک بذر در طول زمان در تناوب ذرت-گندم بود. بررسی پراکنش گیاهچه‌ها در تناوب ذرت-گندم نشان داد شباهت زیادی بین الگوهای توزیع جمعیت کل علف‌های هرز در بین دو مرحله قبل و بعد از کاربرد علف‌کش وجود دارد، به طوری که علف‌های هرز رشد یافته در روی ردیف پس از هر بار تهیه بستر به صورت لکه‌های متمرکز پخش و گسترش می‌یابند.

واژه‌های کلیدی: آیش، بانک بذر، تناوب، توزیع مکانی

مقدمه

تنوع زیستی علف‌های هرز به معنای حضور آن‌ها قبل، در طول فصل رشد و پس از آن می‌باشد. در سیستم‌های مختلف کشاورزی، تلاش مداوم برای کنترل تنوع گونه‌ای علف‌های هرز با استفاده از تکنیک‌های مرسوم و یا استفاده از علف‌کش‌ها اثر خاصی بر جامعه علف‌های هرز دارد (Santín-Montanyá et al., 2016). مطالعات نشان داده است که وضعیت مواد مغذی خاک، سیستم‌های خاکورزی، تناوب محصول و ساختار آن بر میزان حضور علف‌های هرز تاثیر

بسیاری دارد (Skuodiene et al., 2013). امروزه برنامه‌های کنترل شیمیایی علف‌های هرز به طور عمده منجر به پیشرفت سریع علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش و نگرانی‌های جدی محیط زیست شده است. بنابراین، روش‌های شناخت زیست‌شناسی علف‌های هرز و مدیریت تلفیقی آن‌ها توسط محققان به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است (Hosseini et al., 2014). یکی از عواقب این روش‌های مداوم، جانشینی ثانویه اکولوژیکی علف‌های هرز در مراحل اولیه رشد یا تشکیل بانک‌های بذر پایدار و پویا در خاک است (Santín-Montanyá et al., 2016). بانک بذر خاک شامل تمام دانه‌های زنده، غده‌ها، پیازها، ریزوم‌ها و اجزاء تکثیر ریشی موجود در خاک می‌باشد و همچنین ممکن است از ریزش بذورهای اخیر در سطح خاک یا بذورهای مدفون شده در زیر خاک پدیدار شود (Hosseini et

۱ و ۳- به ترتیب دانش آموخته علوم علف‌های هرز و اساتید دانشکده کشاورزی، گروه آگروتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
 (*) - نویسنده مسئول: (Email: n.valaie@yahoo.com)

(Hossain and Begum, 2016; al., 2014).

شناخت کافی بانک بذر می‌تواند وضعیت جمعیت علف‌های هرز در زمان حال و گذشته را نشان دهد و به عنوان شاخصی متأثر از مدیریت خاک و محصولات کشاورزی می‌باشد (Buhler et al., 2001). تعیین بانک بذر علف‌های هرز خاک راه عملی و نقطه شروع مطالعه چرخه زندگی بسیاری از علف‌های هرز است (Jamali and Ahmadvand, 2015). سهم نهایی بانک بذر خاک معادل با بذری که تولید گیاه مادری است که مجال تولید بذر در مزرعه را پیدا می‌کند (Soltani et al., 2015). پیشگویی جمعیت علف‌های هرز با استفاده از مطالعه تراکم و ترکیب گونه‌ای بانک بذر در ابتدا و انتهای فصل، دستیابی به تخمین تقریبی موقعیت و فراوانی علف‌های هرز در طول فصل زراعی و دامنه زمانی جوانه‌زنی علف‌های هرز را به خوبی امکان پذیر می‌سازد (Roham et al., 2011; Siahmarguee et al., 2013). محققین بیان کردند که تراکم علف‌های هرز در یک مزرعه را می‌توان از طریق مشاهده علف‌های هرز سال قبل و همچنین بررسی بانک بذر پیش از کاشت محصول تعیین کرد. از اینرو، دانستن پویایی و کنترل مکانی علف‌های هرز هزینه نهاده‌ها را نیز کاهش می‌دهد (Roham et al., 2013).

بررسی روابط مکانی بین بانک بذر و جمعیت گیاهچه‌ای سلمه تره و علف‌های چمنی یکساله در دو سیستم مدیریتی بدون شخم و شخم با گاوآهن برگردان‌دار نشان داد تراکم بذور سلمه تره در بانک بذر خاک در شرایط شخم با گاوآهن برگردان‌دار نسبت به سیستم بدون شخم بیشتر بود. این در حالی است که تراکم علف‌های چمنی یک ساله در سیستم بدون شخم افزایش معنی‌داری نسبت به شخم با گاوآهن برگردان‌دار نشان داد (Cardina et al., 1995). مطالعه‌ای به منظور ایجاد راهکارهایی در کاهش مشکل علف‌های هرز در مزرعه بیان کرد عدم استفاده از تناوب زراعی سبب کاهش تنوع زیستی علف‌های هرز در مزرعه و در نتیجه کاهش انتخاب علف‌کش‌ها در کنترل علف‌های هرز می‌شود. بعلاوه، خطر مقاومت به علف‌کش‌ها نیز در تناوب‌های تک کشتی نسبت به سیستم‌های تناوبی چندکشتی افزایش می‌یابد (Neve et al., 2011). محققین گزارش کردند کاشت گندم یا سویا در تناوب با ذرت می‌تواند جمعیت دم روباهی کشیده (Alopecurus myosuroides) را به طور معنی‌داری نسبت به کشت متداول ذرت کاهش دهد که بیشترین کاهش نیز در تناوب سویا-گندم-ذرت بود (Moss and Clarke, 1994). نتایج بررسی سه نوع تناوب گندم بهاره-آیش شیمیایی، گندم بهاره و جو بهاره و تک کشتی گندم در مقایسه با تناوب گندم پاییزه-آیش مالج در سیستم رایج بدون شخم در مناطق نیمه خشک شمال غرب آمریکا نشان داد که بیشتر گونه‌های علف‌هرز در عمق ۰ تا ۸ سانتی‌متر خاک حضور دارند و بروموس (*Bromus tectorum* L.) اصلی‌ترین علف هرز در تناوب گندم پاییزه-آیش مالج و سلمه‌تره (*Chenopodium*

leptophyllum) بیشترین گونه غالب در عمق ۸ تا ۱۵ سانتی‌متری خاک بود (Anderson et al., 2007). ارزیابی تغییر بانک بذر در سیستم‌های کشت گندم نشان داد که تراکم بذر در سیستم‌های بدون شخم غلات بهاره، در سطح خاک افزایش نمی‌یابد. بعلاوه، تناوب‌های گیاهان بهاره در سیستم‌های زراعی بدون شخم برای کنترل علف‌های هرز یکساله و پهن برگ‌های چندساله در سیستم‌های کشت پاییزه می‌توانند بسیار موثر واقع شوند (Mirzaei et al., 2007).

در ارزیابی تناوب زراعی مناسب به منظور کنترل مؤثر علف‌های هرز کشت سیب زمینی، تناوب جو-سیب زمینی به‌طور معنی‌داری جمعیت علف‌های هرز را کاهش داد. این در حالی است که تناوب کلزا-سیب زمینی نیز موفقیت زیادی در کنترل علف‌های هرز در طول فصل رشد و افزایش عملکرد سیب زمینی داشت (Skuodiene et al., 2013). اندرسون و همکاران (Anderson et al., 2007) گزارش کردند تغییر تناوب می‌تواند در مدیریت هر چه بهتر علف هرز پیر گیاه (*Conyza Canadensis*) که گونه غالب در تناوب گندم پاییزه-گلرنگ-ارزن است با حذف گلرنگ و جایگزینی ذرت در یک توالی ۶ ساله این علف هرز را تا حد زیادی کنترل نماید. همچنین، با استفاده از تناوبی دارای ۴ محصول به‌طوری که ۲ محصول فصل سرد (نخود-گندم پاییزه) به دنبال ۲ محصول فصل گرم (ذرت-سویا) کشت گردد، می‌توان تراکم علف‌های هرز را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (Anderson et al., 2007). محققین نیز بیان داشتند به‌منظور کاهش اثرات منفی علف‌های هرز در عملکرد محصول در دستگاه‌های کشت بایستی گیاهان زراعی پهن برگ با باریک برگ و گیاهان بهاره و تابستانه با زمستانه در تناوب باشند (Storkey et al., 2012). ترکیب گونه‌ای و تراکم بذر در خاک بسیار متغییر است و تا حد بسیار زیادی به پیشینه زراعی زمین وابسته می‌باشد. به‌طور کلی بانک بذر پویا از تعداد کمی گونه غالب تشکیل شده است که ۷۰ تا ۹۰ درصد از کل بانک بذر را تشکیل می‌دهد (Swanton et al., 2000). همچنین، بررسی تناوب تک کشتی ذرت نشان داد که یک گونه علف هرز حدود ۷۱ درصد از کل علف‌های هرز را شامل می‌شود. درحالی که اجرای تناوب یا آیش درجه تنوع جوامع علف هرز را افزایش می‌دهد (Singer and Cox, 1998; Liebman, 1988). امروزه کشت ممتد گیاهان زراعی، استفاده از مواد شیمیایی مختلف، حداکثر استفاده از منابع در واحد سطح و چشم پوشی از کاربرد آیش و تناوب-های زراعی سبب تغییراتی در بانک بذر علف‌های هرز در نتیجه عملیات متفاوت خاک‌ورزی شده و سیستم‌های زراعی را از لحاظ اقتصادی و زیست محیطی با مشکل رو به رو ساخته است. این در حالی است که افزایش چشمگیری نیز در تولید محصولات زراعی ایجاد نشده است. این تحقیق به منظور بررسی تأثیر تناوب‌های زراعی آیش-گندم و ذرت-گندم با سیستم‌های کشت متوالی بر رفتار بانک بذر و همبستگی آن با گیاهچه علف‌های هرز انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های زراعی ۹۶-۱۳۹۵ و ۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز (عرض جغرافیایی ۲۹ درجه و ۴۵ دقیقه شمالی، طول جغرافیایی ۵۲ درجه و ۳۵ دقیقه شرقی، ارتفاع ۱۹۲۰ متری از سطح دریا) انجام شد. متوسط بارندگی سالانه ۳۷۷ میلی‌متر و حداکثر و حداقل دمای مطلق منطقه به ترتیب ۴۲ و ۸ درجه سانتی‌گراد بود. در این پژوهش از مزارعی (۶ هکتار) با سابقه کشت ۵ سال متوالی تناوب‌های ذرت-گندم و آیش-گندم نمونه برداری گردید. از آنجا که در این پژوهش عمق شخم جهت آماده سازی زمین از ۳۰ سانتی‌متر تجاوز نمی‌کند، لذا این عمق به عنوان حداکثر عمق نمونه برداری از بانک بذر متأثر از عملیات خاک‌ورزی انتخاب شد. به منظور ارزیابی بانک بذر علف‌های هرز پس از آماده سازی زمین و تهیه بستر و قبل از کاشت محصول، مزارع به شبکه‌های ۱۰ × ۱۰ متر تقسیم‌بندی گردید. در مرکز تلاقی شبکه‌ها پنج نمونه مرکب خاک با استفاده از آگر با قطر ۱۰ سانتی‌متر و از دو عمق ۰-۱۵ و ۱۵-۳۰ سانتی‌متری خاک برداشت شد. پس از نرم کردن کلوخه‌ها از هر نمونه خاک مقدار ۲۵۰ گرم توزین و درون کیسه‌هایی از جنس حریر ریخته و با فشار ملایم آب شسته شد (Buhler et al., 2001). سپس، بذور باقی مانده با استفاده از استریو میکروسکوپ شمارش و شناسایی شدند. به منظور اطمینان در شناخت بذور علف‌های هرز و بررسی جوانه‌زنی آن‌ها در شرایط کنترل شده نمونه‌هایی از خاک مزرعه به‌طور جداگانه درون سینی‌های کشت با ضخامت ۱۵ سانتی‌متر در گلخانه کشت داده شدند. سپس، با فواصل هر دو هفته یک‌بار، گیاهچه‌های ظاهر شده شناسایی و شمارش شدند تا غنای گونه‌ای هر نمونه گیاهی بررسی شود (Forcella, 1992). به‌منظور بررسی توزیع مکانی و تغییر تراکم بوته‌های علف‌های هرز و همچنین پویایی لکه‌ها در مزرعه پس از سبز شدن در دو مرحله قبل و بعد از کاربرد علف‌کش‌ها از روش ژئواستاتستیک استفاده شد. برای تخمین و برآورد متغیر مکانی و درون‌یابی از روش کریجینگ (Kriging) و محاسبات مربوط به واریوگرام‌ها توسط نرم افزار GS+ صورت گرفت. بدین منظور از کوادرات‌هایی به ابعاد ۰/۵ × ۰/۵ متر منطبق بر نقاط نمونه‌برداری از بانک بذر خاک استفاده گردید. تعداد گیاهچه‌ها قبل و بعد از کاربرد علف‌کش‌ها به دقت شمارش و براساس جنس و گونه تفکیک شدند. در نهایت نقشه الگوی پراکنش جمعیت گیاهچه‌های علف هرز در مزرعه رسم گردید. در هر مرحله نمونه‌برداری ۱۰۰ نمونه (در مجموع ۶۰۰ نمونه در هر سال) تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. مدیریت زراعی در هر یک از تناوب‌های آیش-گندم و ذرت-گندم در جدول ۱ بیان شده است.

بررسی نرمالیتی داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام شد (Chakravarti, 1967). مواردی که توزیع نرمال نبود از تبدیل $x + 0/5 \sqrt{x}$ استفاده گردید. در این پژوهش شاخص‌های محاسبه شده شامل شانون-وینر، سورنسون و مارگالف بود (Magurran, 1988). به منظور بررسی تنوع گونه‌ای بانک بذر علف‌های هرز بین تیمارهای مختلف تناوب زراعی از شاخص شانون-وینر طبق معادله ۱ استفاده شد:

$$H = -\sum (ni/N * \ln(ni/N)) \quad \text{معادله ۱}$$

به‌طوری که N فراوانی کل گونه‌ها و ni فراوانی گونه n ام می‌باشد (Booth, 2003).

شاخص غنای گونه‌ای مارگالف نیز از معادله ۲ محاسبه گردید:

$$M = (S - 1) / (\ln N) \quad \text{معادله ۲}$$

که در آن M شاخص غنای گونه‌ای مارگالف، S تعداد گونه و N تعداد کل افراد گونه است (May, 1975).

میزان شباهت گونه‌ای بانک بذر با گیاهچه علف‌های هرز در تناوب‌های مختلف زراعی نیز براساس شاخص تشابه سورنسون تعیین شد.

$$S = 2W / (C + J) \quad \text{معادله ۳}$$

که در آن، S شاخص تشابه، W تعداد گونه‌های مشترک در دو شرایط، C و J به ترتیب تعداد گونه‌های موجود در هر یک از دو شرایط می‌باشند. مقدار S بین صفر تا یک متغیر بوده و اگر S=1 باشد تشابه کامل را نشان می‌دهد (Magurran, 1988).

تراکم نسبی بانک بذر علف‌های هرز در خاک نیز براساس معادله ۴ انجام شد (Sarkar, 2015).

معادله ۴

Relative Density = (Density of the species) / (Density of all the species)
تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار R، Statistica v10 و Excel انجام شد. روند تغییر بانک بذر در سال دوم نسبت به سال اول در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی تعیین و تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

در بررسی بانک بذر علف‌های هرز موجود در دو تناوب زراعی ذرت-گندم و آیش-گندم از میان ۱۵ گونه، ۱۳ گونه یک‌ساله، یک گونه چندساله و یک گونه یک‌ساله/چندساله شناسایی شدند. همچنین از این تعداد ۴ گونه مسیری فتوسنتزی چهار کربنه و بقیه گونه‌ها مسیر فتوسنتزی سه کربنه داشتند.

جدول ۱- مدیریت زراعی در تناوب‌های آیش-گندم و ذرت-گندم
Table 1- Agronomic management for corn-wheat and fallow-wheat rotations

آیش Fallow	گندم Wheat	ذرت Corn
بقایای گندم دست نخورده باقی مانده Wheat residue	خاک‌ورزی مرکب (کم خاک‌ورزی) Stubble cultivator (Min till)	گاواهن + دو بار دیسک Moldboard plow + Disk (2 times)
شخم‌برگردان دار برای هر نیم فصل Moldboard plow per each half season	خطی کار پنوماتیک یا بذریاش سانتریفوژ Liner Penomatic or Seed Spreader	ردیف کار پنوماتیک مترمک Maternacc Penomatic row-planter
-	سیروان / پیشتاز Pishtaz/Sirvan	بولسون (علوفه‌ای) Bolson
-	اوره ۲۰۰ Kg/h Urea 200 Kg/h	اوره ۵۰۰ Kg/h Urea 500 Kg/h
-	دی آمونیوم فسفات ۱۵۰ Kg/h Diammonium phosphate 150 Kg/h	دی آمونیوم فسفات ۱۵۰ Kg/h Diammonium phosphate 150 Kg/h
-	سولفات پتاس ۵۰ Kg/h Potassium sulfate 50 Kg/h	سولفات پتاس ۱۰۰ Kg/h Potassium sulfate 100 Kg/h
-	دسیس ۳۰۰ سی سی در هکتار Deltamethrin 300 ml/h	دسیس ۳۰۰ سی سی در هکتار Deltamethrin 300 ml/h
-	تاپیک (Clodinafop propargyl) (0.6-0.8 L ha ⁻¹) گرانستار (Tribenuron-methyl) (20-30 g ha ⁻¹)	۲,4-D (2 L ha ⁻¹) کروز (Nicosulfuron) (2 L ha ⁻¹) مایستر (MaisTer) (2 L ha ⁻¹)
-	-	کولتیواتور Cultivator
-	۴-۵ نوبت (فواصل ۱۰-۱۲ روز) 4-5 times(irrigation intervals 10-12 days)	۶-۷ نوبت (فواصل ۹-۱۰ روز) 6-7 times(irrigation intervals 9-10 days)

*میزان مصرف علف‌کش‌ها براساس میزان توصیه شده است.

حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد از بذور علف‌های هرز در عمق ۳۰-۱۰ سانتی‌متری از سطح خاک می‌گردد (Momen Yasaghi et al., 2017). از سویی دیگر، مدیریت بقایای گیاهی و تناوب زراعی بر جمعیت و فلور علف‌های هرز مؤثر است. به‌طوری‌که کشت متوالی گیاهان زراعی با استفاده از روش‌های فشرده سبب افزایش جمعیت برخی گونه‌های علف هرز با قدرت رقابت‌کنندگی در گیاه بعدی می‌شود (Harker and O'donovan, 2013). لذا مدیریت علف‌های هرز مزارع بر پایه زمان، به‌طور پیوسته دارای اثرات انتقالی است (Bhutada and Bhale, 2015).

به‌علاوه، بیشترین فراوانی بذور علف‌های هرز در هر دو سال متعلق به گونه‌های خرفه (*Portulaca oleracea*)، تاج خروس (*Amaranthus retroflexus*)، سلمه‌تره (*Chenopodium album*) و غریبک (*Lamium amplexicaule*) بود (جدول ۲). نتایج بررسی تراکم نسبی بذور علف‌های هرز خرفه و تاج خروس در تناوب زراعی ذرت-گندم در مقایسه با تناوب آیش-گندم روندی صعودی را نشان داد. همچنین، تراکم بانک بذور در عمق ۳۰-۱۵ سانتی‌متر نسبت به عمق ۱۵-۰ سانتی‌متر به مراتب بیشتر بود (جدول ۲). براساس نتایج مطالعات انجام شده، شخم متداول سبب توزیع عمودی و انباشتگی

جدول ۲- تراکم نسبی بذر علف هرز (بذر در کیلوگرم خاک) در اعماق مختلف پروفیل خاک (سانتی‌متر) تحت تناوب‌های ذرت-گندم و آیش-گندم
 Table 2- Relative density of weed seed in different depths of soil profile in different rotation systems corn-wheat and fallow-wheat

			سال اول First year				سال دوم Second year			
			ذرت – گندم Corn-Wheat		آیش – گندم Fallow-Wheat		ذرت – گندم Corn-Wheat		آیش – گندم Fallow-Wheat	
خانواده Family	گونه گیاهی Species	اسم علمی Scientific name	0-15	15-30	0-15	15-30	0-15	15-30	0-15	15-30
Portulacaceae	خرفه Purslane	<i>Portulaca oleracea</i>	61	60	71	6	94	133	56	4
Amaranthaceae	تاج خروس Redroot pigweed	<i>Amaranthus retroflexus</i>	38	29	43	4	78	74	34	3
Chenopodiaceae	سلمک Lamb's quarters	<i>Chenopodium album</i>	5	3	13	0	5	16	10	0
Lamiaceae	غریبک Common henbit	<i>Lamium amplexicaule</i>	8	4	7	4	0	0	5	3
Poaceae	پانیکوم Witchgrass	<i>Panicum capillare</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
Asteraceae	گل گندم Cornflower	<i>Centaurea cyanus</i>	2	1	0	0	0	0	0	0
Brassicaceae	کیسه کشیش Shepherd's purse	<i>Capsella bursa pastoris</i>	0	1	1	0	2	5	1	0
Poaceae	دم روباهی کشیده Green foxtail	<i>Setaria viridis</i>	0	0	0	0	2	5	0	0
Poaceae	چچم Annual ryegrass	<i>Lolium rigidum</i>	0	0	0	0	10	52	0	0
Poaceae	یولاف وحشی Wild oat	<i>Avena ludoviciana</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
Brassicaceae	خردل وحشی Wild mustard	<i>Sinapis arvensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
Solanaceae	بنگدانه White henbane	<i>Hyoscyamus albus</i>	0	10	0	0	0	0	0	0
Malvaceae	پنیرک Common mallow	<i>Malva neglecta</i>	4	0	2	2	2	10	2	2
Polygonaceae	علف هفت بند Common knotgrass	<i>Polygonum aviculare</i>	4	0	8	0	0	0	0	0
Fabaceae	شیرین بیان Licorice	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	4	6	8	0	0	6	0	8

بانک بذر علف‌های هرز در تناوب آیش-گندم در هر دو سال آزمایش تقریباً روند یکسانی داشت (شکل ۱). اسکودیینه و همکاران (Skuodiene et al., 2013) بیان داشتند، تغییرات زیاد خاک و گیاه زراعی شانس مرگ و میر علف‌های هرز را به دلیل سازگاری با شرایط در سیستم‌های زراعی کشت پیپی کاهش می‌دهند (Skuodiene et al., 2013). لازم به ذکر است که استفاده از کشت پیپی ذرت-گندم به دلیل نوع شخم، نحوه تهیه بستر، کنترل شیمیایی و همخوانی دوره رشدی علف هرز سبب پویایی بانک بذر علف‌های هرز در مقایسه با

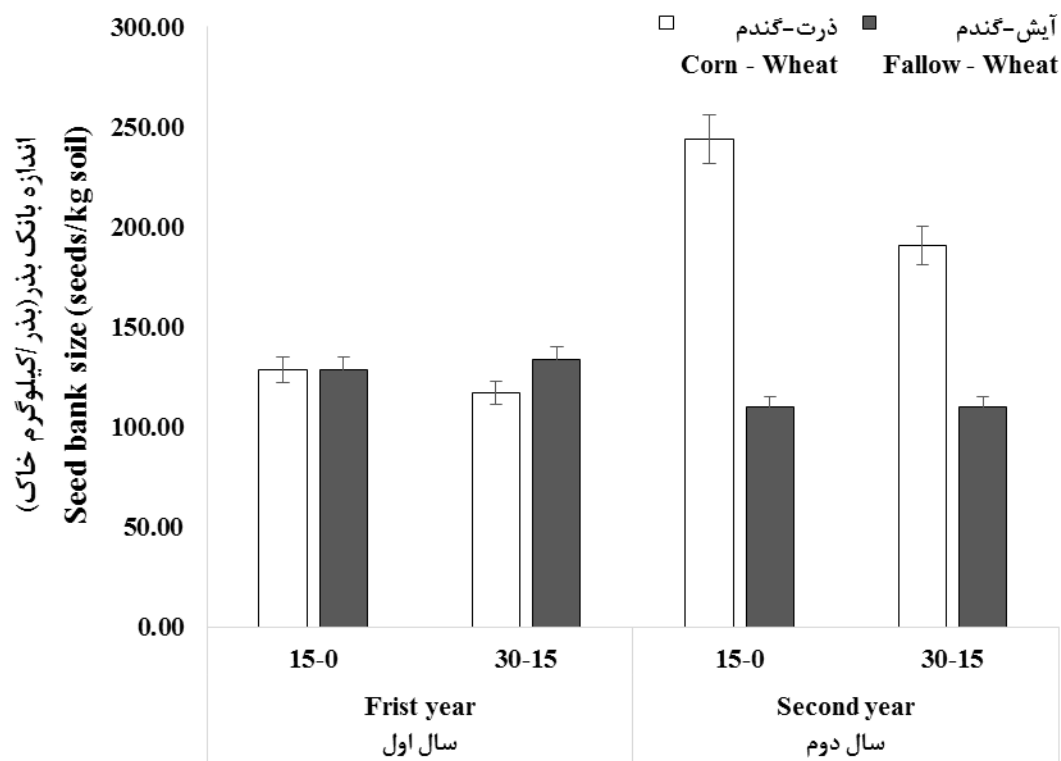
بررسی اندازه بانک بذر علف‌های هرز نشان داد کشت متوالی ذرت-گندم می‌تواند سبب انباشتگی بانک بذر در لایه‌های سطحی خاک (۱۵-۰ سانتی‌متر) گردد (شکل ۱). به‌طوری‌که طی نمونه‌برداری در سال دوم میزان بانک بذر خاک در تناوب ذرت-گندم در هر دو عمق نسبت به تناوب آیش-گندم به طور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش بانک بذر در تناوب ذرت-گندم طی دو سال پیپی در عمق‌های ۱۵-۰ و ۳۰-۱۵ سانتی‌متر به ترتیب ۸۹/۷۹ و ۶۲/۸۵ درصد نسبت به سال اول بود (شکل ۱). این در حالی است که اندازه

تناوب آیش-گندم می‌گردد. به‌طوری‌که علف‌های هرز دوره رشدی خود را در زیر کانوبی سپری کرده و حتی در شرایط نامساعد می‌توانند به میزان اندک بذر تولید کنند. همچنین، تداوم کشت پیایی ذرت-گندم با سیستم کشت ردیفی-کرتی سبب توزیع عمودی علف‌های هرز در سطوح مختلف خاک می‌شود. محققین بیان داشتند استفاده از شخم‌های حداقل سبب افزایش بذر علف‌های هرز در لایه‌های سطحی به‌ویژه ۱۵-۰ سانتی‌متر خاک می‌گردد. درحالی‌که فرصت رویش، استقرار و تولید بذر در شرایط تناوب یا نکاشت به ترتیب تنوع و فراوانی برخی از علف‌های هرز را افزایش و کاهش می‌دهد (Kharqani et al., 2005).

حضور آیش در تناوب به‌عنوان یک راهکار مدیریتی برای کاهش فشار انتخاب و کنترل علف‌های هرز امری اجتناب‌ناپذیر است، به‌طوری‌که عدم توجه به این شرایط فضا را برای گسترش مقاومت به علف‌کش‌ها فراهم می‌سازد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که در سیستم‌های کشت پیایی، یک یا مجموعه‌ای از علف‌های هرز خاص بسیار مشکل ساز می‌شوند. به‌عنوان مثال، در تولید گندم زمستانه و کلزا در آلبرتا، علف پشمکی پس از چندین سال به یک مشکل جدی هرز تبدیل شد (Owen et al., 2015). بنابراین، با مدیریت تناوب می‌توان سرعت توسعه علف‌های هرز مقاوم به علف‌کش را کاهش داد. همچنین، نتایج مطالعات در آلبرتا نشان داد که جو وحشی مقاوم به علف‌کش‌ها بیشتر در مزارعی با تناوب زراعی کشت پیایی و فاقد فصل آیش یافت می‌شود (Broster et al., 2019). بسیاری از تحقیقات بیانگر آن است که مدیریت زراعی می‌تواند سبب تغییرات قابل ملاحظه‌ای در ترکیب، تراکم و توزیع مکانی یا زمانی گونه‌های علف‌های هرز در مزارع شود (Altieri and Virginia et al., 2018; Nourbakhsh et al., 2019; Nicholls, 2018). روند تناوب ذرت-گندم و کشت دوم ذرت در مناطق گرمسیری استان کرمانشاه نشان داد که فراوانی علف‌های هرز قیاق و تاج خروس ارتباط نزدیکی با تناوب فوق دارند (Zareafeizabadi and Rustamzadeh, 2013). به‌علاوه، حفظ بقایا در سطح خاک در طول دوره آیش با توجه به پتانسیل دگرآسیبی بقایای گندم و اثرات کاهنده‌ی آن، در کاهش جمعیت علف‌های هرز نقش مؤثری دارد (Mallek et al., 2007). این امر در حقیقت اهمیت حفظ بقایا در زمان آیش را در مقایسه با سامانه‌های کشت پیایی نشان می‌دهد. از سویی دیگر اثرات ناشی از تفاوت بین گیاهان زراعی نقش مؤثری در شکل‌گیری جوامع علف‌های هرز دارد که این تفاوت‌ها در نتیجه‌ی نحوه‌ی استفاده از منابع می‌باشد (Neve et al., 2011). وجود تنوع گونه‌ای بالا و تراکم کم علف‌های هرز در تناوب‌های آیش-گندم در مقایسه با سایر محصولات (حبوبات) نشان می‌دهد که استفاده از آیش در تناوب‌های زراعی سبب تنوع علف‌های هرز در سامانه‌های زراعی می‌شود (Zareafeizabadi and Rustamzadeh, 2013). محققین

گزارش کردند حضور بقایا در سطح خاک سبب کاهش تغییرات دمایی خاک و جلوگیری از شکسته شدن خواب بذر علف‌های هرز و جوانه‌زنی آنها می‌شود (Varon and Aguilar, 1998). همچنین، بلوم و همکاران (Blum et al., 1997) بیان داشتند که بقایای غلات دانه ریز در تناوب از جوانه‌زنی و رشد علف‌های هرز در بوم نظام‌های زراعی جلوگیری می‌نماید (Blum et al., 1997). بررسی تاثیر سطوح مختلف خاکپوش کاه و کلش گندم بر سرکوبی علف‌های هرز نیز نشان داد که استفاده از بقایای گندم بیش از مصرف علفکش‌ها سبب توقف هر چه بیشتر رشد علف‌های هرز تاج خروس می‌گردد. همچنین، خاکپوش‌های گیاهی علاوه بر جلوگیری از نفوذ نور و تعدیل دمای خاک ممکن است با ویژگی دگرآسیبی نیز جوانه‌زنی و رشد و نمو علف‌های هرز را تحت تاثیر قرار دهند (Bilalis et al., 2003). به‌علاوه، بررسی‌ها حاکی از آن است که استفاده از کلش گندم با محدود کردن تشعشع خورشیدی رسیده بر سطح خاک مانع از جوانه‌زنی و استقرار بذور علف‌های هرز و کاهش تعداد و تراکم نسبی گونه‌های علف هرز در مزارع سیر می‌گردد (Asadi et al., 2014). محققین نشان دادند بقایای آمیخته با خاک گیاهان پوششی در بهار از طریق اثرات دگرآسیبی، تحریک پاتوژن‌های خاکری (Conklin et al., 2002)، تغییر قابلیت دسترسی به عناصر غذایی (Gallandt et al., 1999)، بهبود رشد گیاه زراعی و افزایش قابلیت رقابت با علف‌های هرز (Boquet et al., 2004) می‌تواند از جوانه‌زنی علف‌های هرز جلوگیری کرده و رشد آن‌ها را کاهش دهد (Ghaffari et al., 2012).

تعادل اندازه بانک بذر به‌وسیله تلفات بذور موجود در خاک و تلاش تولیدمثلی علف هرز تنظیم می‌شود (Nasiri Mahallati et al., 2009). با افزایش اندازه بانک بذر در طی سال‌های متوالی، تلفات وابسته به تراکم بذر در خاک به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. نصیری و همکاران (Nasiri Mahallati et al., 2009) با ارزیابی عوامل مربوط به تلفات بذور یولاف در خاک بیان کردند که در تراکم‌های پایین بذر، تلفات مستقل از تراکم است و به‌وسیله عوامل طبیعی تنظیم می‌شود. در حالی که با افزایش اندازه بانک بذر این تلفات وابسته به تراکم بوده و در نتیجه نوعی پس‌خور منفی ایجاد می‌گردد (Nasiri Mahallati et al., 2009). حضور گندم در تناوب به دلیل تراکم کاشت بالا و رقابت شدید بر سر منابع حداقل فضا را برای رشد و تولید بذر علف‌های هرز مهیا نموده و بدین روش پویایی بانک بذر علف‌های هرز را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این درحالی است که مدیریت (حفظ) کلش گندم در زمان آیش در سیستم‌های زراعی غیر فشرده، پویایی بانک بذر علف‌های هرز را به وسیله تلفات بذور در سطح خاک به میزان بسزایی کاهش می‌دهد. از این‌رو، در زمان حضور گندم نیز به دلیل ایجاد رقابت درون‌گونه‌ای، پویایی بانک بذر علف هرز تحت تاثیر قرار خواهد گرفت.



شکل ۱- اندازه بانک بذر علف‌های هرز (بذر در کیلوگرم خاک) در تناوب‌های ذرت-گندم و آیش-گندم در سال‌های زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۶ و ۱۳۹۶-۱۳۹۷

Figure 1- Weed seed bank size (seed/kg soil) in corn-wheat and fallow-wheat rotations in 2016-2017 and 2017-2018 growing season

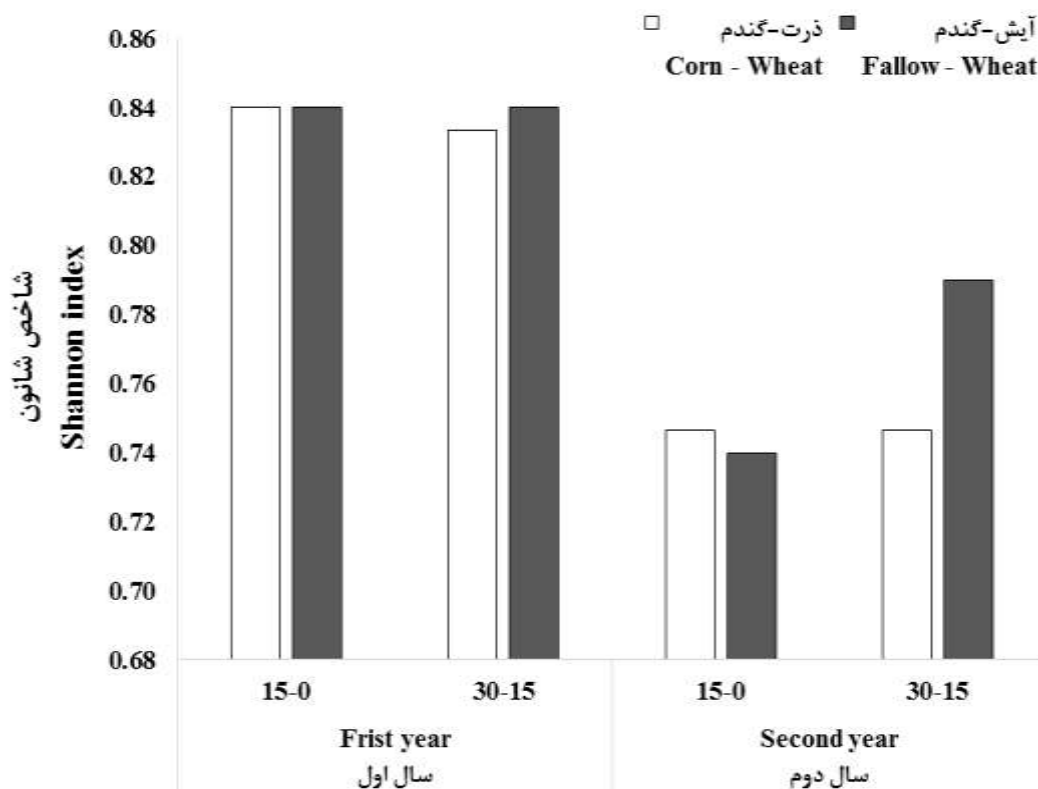
شود و بالعکس استفاده از آیش در تناوب با گندم با تشکیل یک اکوسیستم زراعی می‌تواند سبب کاهش فشار انتخاب در واحد سطح شده و از این‌رو تنوع گونه‌ای بانک بذر به‌ویژه در عمق خاک افزایش می‌یابد. برخی تحقیقات بیانگر آن است که نوع محصول در تناوب زراعی تأثیر اندکی بر تنوع علف‌های هرز داشته و تغییر در روش‌های مدیریتی خاص مانند جایگزینی آیش در مقایسه با نوع محصولات می‌تواند تنوع علف‌های هرز را تعیین کند (Alarcón *et al.*, 2018). بعلاوه، واکنش گونه‌های علف‌های هرز نیز به وجود آیش در تناوب متفاوت است. در برخی مطالعات توالی آیش-گیاه زراعی سبب کاهش تعداد و تنوع علف‌های هرز به‌ویژه علف‌های هرز با دوره خواب کوتاه مدت و بعضی از گیاهان چندساله (Cavers and Benoit, 1989; Donaghy, 1980) می‌شود. این در حالی است سایر تحقیقات نشان می‌دهند که استفاده از آیش در تناوب می‌تواند سبب افزایش تراکم برخی از علف‌های هرز شامل *C. album* و *Thlaspi arvense* گردد (Hume, 1982). یکی از دلایل عمده در کاهش تنوع گونه‌ای میزان

نتایج مقایسه میانگین شاخص تنوع شانون-وینر نشان داد، طی نمونه‌برداری دو ساله در دو تناوب ذرت-گندم و آیش-گندم با توجه به نحوی مدیریت زراعی میزان تنوع گونه‌ای در سال دوم نسبت به سال اول در هر دو عمق ۱۵-۰ و ۳۰-۱۵ سانتی‌متر کاهش یافت. این کاهش در تناوب ذرت-گندم در هر دو عمق نسبت به سال اول ۱۲ درصد بود. در حالی که این روند در تناوب آیش-گندم در پاسخ به تغییرات اکولوژیکی سیستم‌های زراعی سبب افزایش مجدد این شاخص در سال دوم و در عمق ۳۰-۱۵ سانتی‌متر به میزان ۵/۴ درصد نسبت به عمق ۱۵-۰ سانتی‌متر گردید (شکل ۲). تداوم نوع شخم، تهیه بستر، کود دهی و نحوه مبارزه با علف‌های هرز طی سالیان متمادی سبب می‌شود تا شباهت در ترکیب و بقا گونه‌های مهاجم افزایش یابد (Weysi *et al.*, 2014). بدین معنا که تغییرات مشابه طی سالیان متمادی، مهم‌ترین عامل تعیین کننده تنوع علف‌های هرز می‌باشد. براساس شاخص شانون-وینر با افزایش کشت پیایی ذرت-گندم از میزان تنوع گونه‌ای بانک بذر خاک کاسته می-

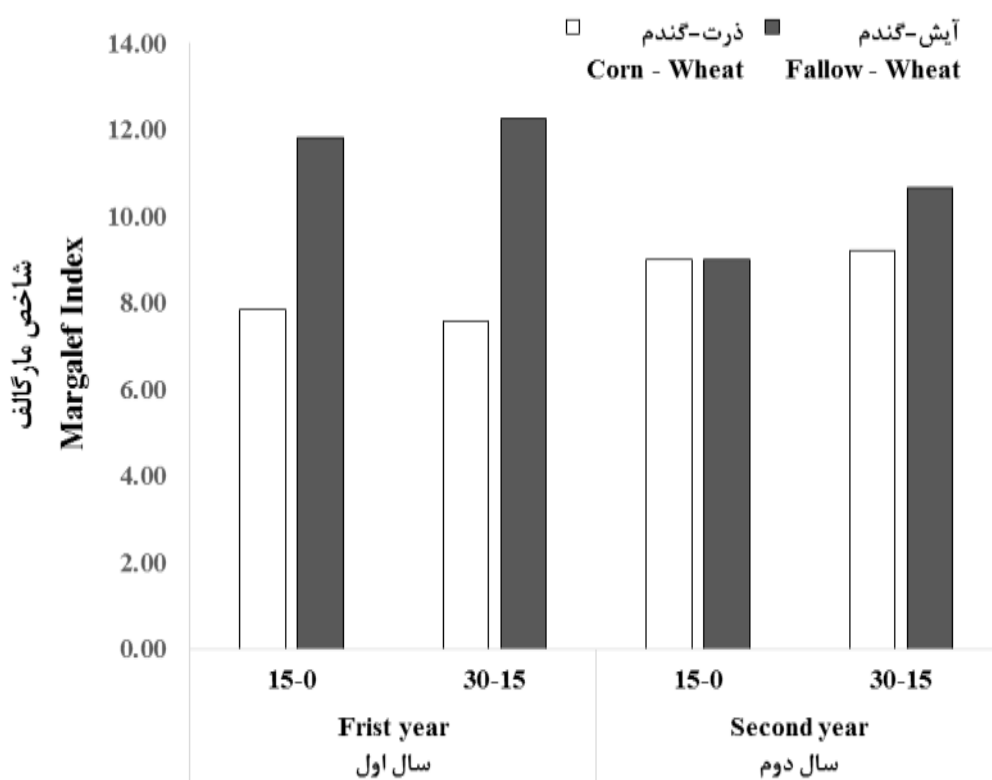
عمق ۱۵-۰ سانتی‌متر تفاوتی وجود نداشت اما این شاخص در عمق ۳۰-۱۵ سانتی‌متر تناوب آیش-گندم به میزان ۱۳/۶۹ درصد نسبت به تناوب ذرت -گندم افزایش یافت (شکل ۳). لازم به ذکر است که غنای گونه‌ای تنها تحت تأثیر فشار انتخاب و تراکم گونه‌ای نبوده و در بسیاری از موارد عوامل دیگری همچون منبع غذایی به خصوص کودهای نیتروژنه در نظام کاشت پرنهاده بر ترکیب و تنوع جوامع گیاهی مؤثر می‌باشند (Mirzaei et al., 2007; Iqbal et al., 2015; Nkoa et al., 2018). بعلاوه، انتخاب گیاهان مختلف در تناوب‌های زراعی با توجه به نوع چرخه رشد، سیستم ریشه‌ای و علف‌های هرز غالب در سیستم‌های تک‌کشتی بدون آیش اثرات بسزایی بر غنای گونه‌ای علف‌های هرز می‌گذارد (Azizi et al., 2010). محققین در بررسی اثرات سیستم‌های خاک‌ورزی و تناوب محصول بر تراکم و ترکیب گونه‌ای علف‌های هرز در ذرت بیان داشتند که تناوب زراعی تک کشتی ذرت، جو بهاره-ذرت، جو بهاره-نخودفرنگی-گندم زمستانه و نخودفرنگی-گندم زمستانه-ذرت تأثیر معنی‌داری بر تغییرات غنای گونه‌ای در ذرت نداشت. در حالی که سیستم کشت و مدیریت زراعی می‌تواند تنوع و تراکم علف هرز در ذرت را به شدت تحت تأثیر قرار دهد (Demjanova et al., 2009).

بالای فشار انتخاب و پیروی از نظام پر نهاده در تناوب ذرت-گندم است. به طور کلی شاخص تنوع شانون-وینر در تناوب‌های زراعی با کشت متوالی مکانیزم پر نهاده بطور معنی‌داری کمتر از نظام‌های زراعی تک‌کشتی کم نهاده می‌باشد (Koocheki and Nasiri, 2005). این در حالی است که استفاده بی رویه از علف‌کش‌ها سبب حذف تنوع زیستی شده است و امکان تجدید ساختار بانک بذر را کاهش می‌دهد و در نهایت طی فشار انتخاب گونه‌های علف هرز با مقاومت بیشتر باقی می‌مانند (Nasiri Rahman et al., 2001; Mahallati et al., 2009).

بررسی نتایج شاخص غنای گونه‌ای مارگالف نشان داد در کشت‌های متوالی بدون آیش با افزایش فشار بر گونه‌ها، میزان این شاخص به میزان چشم‌گیری کاهش می‌یابد و بالعکس کاربرد آیش در حد معمول می‌تواند سبب افزایش غنای گونه‌ای شود. به طوری که در سال اول نمونه برداری میزان غنای گونه‌ای در تناوب زراعی ذرت-گندم به میزان ۳۳/۷۰ و ۳۸/۲۵ درصد به ترتیب در عمق‌های ۱۵-۰ و ۳۰-۱۵ سانتی‌متر کاهش چشمگیری نسبت به تناوب آیش-گندم داشت. این در حالی است که در نمونه‌برداری سال دوم و در عمق ۳۰-۱۵ سانتی‌متر تناوب آیش-گندم بر میزان این شاخص نسبت به عمق ۱۵-۰ سانتی‌متر افزوده شد. همچنین، بین تناوب‌ها در



شکل ۲- اثر تناوب و عمق نمونه‌برداری بر شاخص تنوع شانون بانک بذر خاک در دو تناوب ذرت-گندم و آیش-گندم
Figure 2- Effect of rotation and sampling depth on Shannon diversity index of soil seed bank under the influence of corn-wheat and fallow-wheat



شکل ۳- اثر تناوب و عمق نمونه‌برداری بر شاخص تنوع مارگالف بذر علف‌های هرز در بانک بذر خاک در دو تناوب ذرت-گندم و آیش-گندم
Figure 3- Effect of rotation and sampling depth on Margalef species richness index of soil seed bank under the influence of corn-wheat and fallow-wheat

نتایج تجزیه و تحلیل تنوع گونه‌ای و بانک بذر علف‌های هرز حاکی از وجود شاخص تشابه نسبتاً بالایی بین قطعات یک تناوب زراعی ویژه بود. بیشترین شاخص تشابه بانک بذر علف‌های هرز در میان قطعات تناوب زراعی ذرت-گندم و آیش-گندم در عمق‌های ۰-۱۵ و ۱۵-۳۰ سانتی‌متر به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۸۰ درصد طی دو سال متفاوت مشاهده شد (جدول ۳). همچنین، کمترین شاخص تشابه بین دو نوع تناوب وجود داشت. نتایج نشان داد فشار انتخاب در تناوب ذرت-گندم به مراتب از تنوع گونه‌ای نسبت به تناوب آیش-گندم کاسته است و سبب افزایش فراوانی گونه‌های مهاجم می‌شود (جدول ۲). بررسی عمق‌های ۱۵-۳۰ سانتی‌متر خاک در تناوب‌های زراعی ذرت-گندم و آیش-گندم طی دو سال پژوهش نشان داد، با افزایش تنوع گونه‌های موجود در هر یک از دو نوع تناوب در مخرج کسر معادله نسبت به میزان تعداد گونه‌های مشترک در بین آن‌ها در صورت کسر سبب کاهش واحد تشابه می‌گردد. این امر در خصوص عمق‌های مختلف تناوب زراعی آیش-گندم در سال اول و دوم نیز مشهود است. تفاوت تأثیر تناوب‌ها بر میزان جابه‌جایی خاک، توزیع عمودی بذر و کنترل شیمیایی تراکم گیاهچه (Alarcón et al., 2018; Kharraqani et al., 2005)

سبب تغییر در تجمع بذر علف‌های هرز در لایه ۰-۱۵ سانتی‌متری خاک به ویژه در تناوب ذرت-گندم می‌گردد. محققین بیان داشتند شاخص تشابه سورنسون فلور علف‌های هرز مزارع گندم عمدتاً در سطح پائینی قرار دارد (Ghaffari et al., 2012). بعلاوه تناوب زراعی، ساختار خاک و استفاده از علف‌کش‌ها، یکی از عوامل اصلی تغییر تنوع گونه‌ای و فلور علف‌های هرز شاخص می‌باشد (Iqbal et al., 2018). بررسی مقایسه میانگین برهمکنش فراوانی بانک بذر علف‌های هرز خرفه، تاج‌خروس، سلمه‌تره و غریبک در دو تناوب زراعی دوساله ذرت-گندم و آیش-گندم در هر دو عمق ۰-۱۵ و ۱۵-۳۰ سانتی‌متر معنی‌دار بود ($p < 0.05$). بیشترین فراوانی بذر مربوط به علف‌های هرز خرفه و تاج‌خروس در تناوب ذرت-گندم و کمترین آن در تناوب آیش-گندم و در علف‌های هرز سلمه‌تره و غریبک مشاهده شد (جدول ۴). فراوانی بذر خرفه و تاج‌خروس به طور معنی‌داری تحت تأثیر تناوب زراعی و عمق شخم قرار داشت. به‌طوری‌که استفاده از تناوب ذرت-گندم سبب افزایش ۳۳ درصدی فراوانی بانک بذر در عمق ۱۵-۳۰ سانتی‌متر طی دو سال زراعی شد (جدول ۴).

جدول ۳- شاخص تشابه سورنسون بانک بذر علف هرز تحت تاثیر تناوب زراعی آیش-گندم و ذرت-گندم

Table 3- Sorenson similarity index of corn-wheat and fallow-wheat rotations

سری اول Frist Series				
	Corn-Wheat (0-15)	Corn-Wheat (15-30)	Fallow-Wheat (0-15)	Fallow-Wheat (15-30)
Corn-Wheat (0-15)	1			
Corn-Wheat (15-30)	0.70	1		
Fallow-Wheat (0-15)	0.69	0.62	1	
Fallow-Wheat (15-30)	0.58	0.63	0.80	1
سری دوم Second Series				
	Corn-Wheat (0-15)	Corn-Wheat (15-30)	Fallow-Wheat (0-15)	Fallow-Wheat (15-30)
Corn-Wheat (0-15)	1			
Corn-Wheat (15-30)	0.82	1		
Fallow-Wheat (0-15)	0.73	0.74	1	
Fallow-Wheat (15-30)	0.68	0.53	0.71	1

نتایج برهمکنش تیمارها نشان داد، تیمار آیش-گندم به دلیل حضور باقی مانده بقایای گندم در سطح خاک طی فصل آیش و کنترل مکانیکی در نیم فصل (جدول ۱) سبب کاهش چشمگیر در فراوانی علف‌های هرز در بانک بذر خاک می‌گردد. به‌طوری‌که درصد بذور علف‌های هرز در سطح خاک در زمان آیش نیم فصل توسط عواملی از قبیل شکار حشرات، پوسیدگی و مواد دگرآسیب بقایای گندم کنترل شده و بر پویایی بانک بذر در زمان تهیه بستر نقش بسزایی دارد. بنابراین، استفاده از آیش به ویژه با حضور بقایای گندم در سطح خاک می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مدیریتی، سبب تخلیه بانک بذر خاک گردد (جدول ۴). اضافه نمودن بقایای گیاهی به دلیل اثرات دگرآسیبی می‌تواند به‌طور معنی‌داری جوانه‌زنی بذور علف‌های هرز را مختل کرده و منجر به کاهش تنوع جوامع علف هرزی شود (Tehrani et al., 2009). نتایج تحقیقات نشان داده است که شیوه‌های مدیریتی تولید محصولات زراعی بر تنوع و پراکنش علف‌های هرز تأثیر گذار است، به‌طوری‌که فرآیندهای مؤثر بر پویایی بانک بذر علف‌های هرز در حوزه‌های مختلف بسیار پیچیده بوده و براساس روش‌های تولیدی و زمان کاربرد آن اثرات متفاوتی بر بانک بذر خاک القاء می‌نماید (Buhler et al., 2001).

نتایج تأثیر تناوب ذرت-گندم بر دو علف هرز سلمه تره و غربلیک روند مشابهی را نشان داد. به طوری که در عمق ۱۵-۳۰ سانتی‌متر در سال دوم زراعی نسبت به سال اول به ترتیب ۶۸/۷۵ و ۸۰/۹۵ درصد افزایش در فراوانی بذر دو گونه فوق مشاهده گردید (جدول ۴). بررسی نتایج مجموع فراوانی بذور علف هرز نشان داد که استفاده پی‌درپی از تناوب زراعی فشرده ذرت-گندم به‌عنوان یک بوم نظام پر نهاده می‌تواند شرایط را برای پراکنش و پویایی بانک بذر علف‌های هرز در دو عمق ۱۵-۳۰ و ۳۰-۱۵ سانتی‌متر به ترتیب با ۴۲/۴۰ و ۵۴/۹۱

همچنین، تناوب آیش-گندم نیز به ترتیب سبب کاهش ۱۷/۲۰ و ۱۹/۴۴ درصدی فراوانی بذر در عمق‌های ۱۵-۳۰ و ۳۰-۱۵ سانتی‌متر گردید. نتایج این تحقیق نشان داد، استفاده از تناوب زراعی ذرت-گندم به دلیل سیستم فشرده تهیه بستر و جایگزینی بذور جدید با بذور رفع خواب شده، علاوه بر افزایش حجم رویش علف‌های هرز، طی گذشت چند سال، فراوانی بذور پویا در لایه‌های زیرین (۱۵-۳۰ سانتی‌متر) به مراتب بیشتر خواهد شد (جدول ۴). از دیدگاه مدیریتی، بذور قرار گرفته در عمق ۱۵-۳۰ سانتی‌متر با سپری کردن شرایط مناسب جهت رفع خواب طی فصل زراعی پویایی بیشتری نسبت به لایه‌های سطحی دارند و از این لحاظ از شرایط لازم برای جوانه‌زنی برخوردار می‌باشند. محققین بیان کردند تناوب آیش-گندم با باریک برگ‌هایی مانند چچم (*L. rigidum rigidum*)، خونی‌واش (*Phalaris brachystachys*) و یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*) همبستگی کمی دارد. در حالی که کشت ذرت با گندم سبب کاهش بی‌تی‌راخ (*Galium tricornutum*)، خردل وحشی (*Sinapis arvensis*)، سملک (*Chenopodium album*) و گلرنگ وحشی (*Carthamus oxycantha*) می‌شود اما با علف‌های هرز تاج خروس (*Amaranthus retroflexus*) و پیچک (*Convolvulus arvensis*) همبستگی نزدیکی دارد که در نتیجه این امر سبب افزایش آن‌ها در تناوب می‌گردد (Zareafeizabadi and Rustamzadeh, 2013). بررسی اثر کودها بر تنوع علف‌های هرز در گندم نیز نشان داد الگوی استفاده از کودهای نیتروژن، فسفات و پتاسیم به ترتیب تأثیر مثبت بر تنوع و تراکم علف‌های هرز و تأثیر منفی بر عملکرد گندم در سیستم‌های زراعی دارد، به ویژه در سیستم‌های تک کشتی که آلودگی زمین به کود از محصولات قبلی نیز رخ می‌دهد (Tang et al., 2013).

علف‌های هرز در خاک تحت تاثیر عوامل مختلفی به ویژه روش‌های خاک‌ورزی قرار دارد. به طوری که تغییر روش‌های خاک‌ورزی با تغییر عمق بذر نقش مهمی در پراکنش گونه‌های علف‌های هرز در خاک داشته و بر اثر بخشی شیوه‌های کنترل تأثیر می‌گذارد (Buhler *et al.*, 1997).

درصد در مقایسه با تناوب آیش-گندم افزایش دهد (جدول ۴). بعلاوه، مکانیزم‌های متعددی شامل کاهش نفوذ نور به خاک، کاهش ذخیره بذر قبل از سبز شدن، افزایش شکارگری یا پوسیدگی بذر، کاهش نوسانات درجه حرارت روزانه خاک و تولید ترکیبات دگرآسیب می‌توانند در سبز شدن و رشد علف‌های هرز در حضور بقایا نقش داشته باشند (Mojab *et al.*, 2016). ترکیب و تراکم گونه‌ای بذر

جدول ۴- مقایسه میانگین فراوانی بذر علف‌های هرز در تیمارهای ذرت-گندم و آیش-گندم در عمق‌های ۱۵-۳۰ و ۱۵-۳۰ سانتی‌متر
Figure 4- Mean comparison of weed seed frequency in Corn-Wheat and Fallow-Wheat under 0-15 and 15-30 cm soil depths

تیمارها Treatments	تناوب کاشت Crop rotation	عمق نمونه‌برداری Soil depths	مقایسه میانگین فراوانی بذر علف‌های هرز Mean comparison of weed seed frequency				
			خرفه	تاج خروس	سلمه تره	غریبک	مجموع
سال اول First year	ذرت-گندم Corn-Wheat	0-15	69.00 ^{ef}	38.00 ^d	5.00 ^d	13.00 ^b	117.00 ^d
		15-30	90.00 ^{bc}	29.00 ^f	3.00 ^f	5.00 ^d	128.00 ^c
	آیش-گندم Fallow-Wheat	0-15	71.00 ^d	42.80 ^c	13.00 ^b	7.00 ^c	134.00 ^c
		15-30	84.00 ^c	35.00 ^{de}	6.00 ^d	4.00 ^{de}	129.00 ^c
سال دوم Second year	ذرت-گندم Corn-Wheat	0-15	93.00 ^b	78.00 ^a	5.00 ^d	14.00 ^b	191.00 ^b
		15-30	133.00 ^a	74.00 ^b	16.00 ^a	21.00 ^a	244.00 ^a
	آیش-گندم Fallow-Wheat	0-15	56.00 ^f	34.00 ^e	10.00 ^c	5.00 ^d	110.00 ^e
		15-30	66.00 ^{de}	33.20 ^e	5.00 ^d	4.00 ^e	108.00 ^e

میانگین‌هایی با حروف مشابه براساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد ($P < 0.05$) نمی‌باشند.

Means with the same letters are not significantly different at 5% level of probability based on Dauncan.

(Mahallati *et al.*, 2009). محققین در بررسی بذر تاج خروس ریشه قرمز در شرایط رقابت با ذرت دانه‌ای دریافتند که توانایی تولید بذر تحت تاثیر زمان سبز شدن قرار دارد و با افزایش تراکم، تولید بذر در هر بوته کاهش اما در واحد سطح افزایش می‌یابد (Rajcan *et al.*, 2002). همچنین با افزایش تراکم ذرت، کاهش شدت جریان فوتون در لایه‌های پایینی سایه اندازه و کاهش نور در دسترس، تعداد بذر در هر بوته علف‌هرز کاهش می‌یابد، در حالی که وزن هزار دانه آن کمتر تحت تاثیر شدت نور قرار می‌گیرد (Vasileiadis *et al.*, 2016). بررسی ۵ ساله فراوانی علف‌های هرز در خاک و توزیع عمودی آن در تناوب چاودار-جو-ذرت (علوفه‌ای)-کلزا-ذرت-جو منجر به افزایش چشم گیر دو گونه تاج خروس (*A. tuberculatus* L.) و دم روباهی کشیده (*A. myosuroides*) در تناوب ذرت-کلزا-ذرت به میزان ۸۰ درصد شد. کشت پیایی و ردیفی ذرت-کلزا با عملیات تهیه بستر یکسان سبب توزیع و تجمع بذور در عمق ۲۰ سانتی‌متری خاک گردید. در حالی که در سال‌های پایانی تکرار کشت جو در تناوب سبب افزایش گونه‌ها به خصوص تمرکز بذور در عمق ۱۰ سانتی‌متری خاک شد (Buhler *et al.*, 2001). کاربرد آیش در تناوب می‌تواند به سهولت مدیریت علف‌های هرز در مزرعه کمک شایانی نماید (Moss and Clarke, 1994).

به‌منظور بررسی رابطه میان فراوانی گونه‌های مختلف در بانک بذر تناوب‌های زراعی ذرت-گندم و آیش-گندم طی دو سال زراعی از آنالیز رگرسیون به‌عنوان تابعی از اندازه بانک بذر استفاده شد. بررسی‌ها نشان داد در هر دو تناوب زراعی ذرت-گندم و آیش-گندم همبستگی معنی‌داری به ترتیب به میزان ۰/۹۴ و ۰/۹۷ درصد در دو سال زراعی وجود داشت (شکل ۴). نتایج شیب خط معادله رگرسیون در کشت پیایی ذرت-گندم نسبت به تناوب تک کشتی آیش-گندم به ترتیب با شیب خط ۰/۴۷ و ۰/۷۹ نشان داد که استفاده از تناوب ذرت-گندم همراه با افزایش سطوح مصرف نهاده به تدریج از شیب خط رگرسیون می‌کاهد (شکل ۴). بدین معنا که با کاهش شیب خط، خروج بذر علف‌های هرز از بانک بذر خاک نیز کاهش می‌یابد. از این‌رو، سرعت خروج بانک بذر علف‌های هرز در سال دوم در تناوب‌های ذرت-گندم و آیش-گندم به ترتیب معادل تقریبی ۵۰ و ۷۰ درصد نسبت به سال اول خواهد بود (شکل ۴). بنابراین، در تناوب ذرت-گندم به‌طور متوسط مقدار بذر علف‌های هرز در بانک بذر سال دوم بیشتر از اندازه بذر در سال اول می‌باشد (شکل ۱).
در حقیقت، هر نوع عملیات مدیریتی که ظهور، تولیدمثل و تکمیل چرخه زندگی علف‌های هرز را دچار اختلال نماید می‌تواند سبب تغییر ساختار بانک بذر علف‌های هرز شود (Nasiri

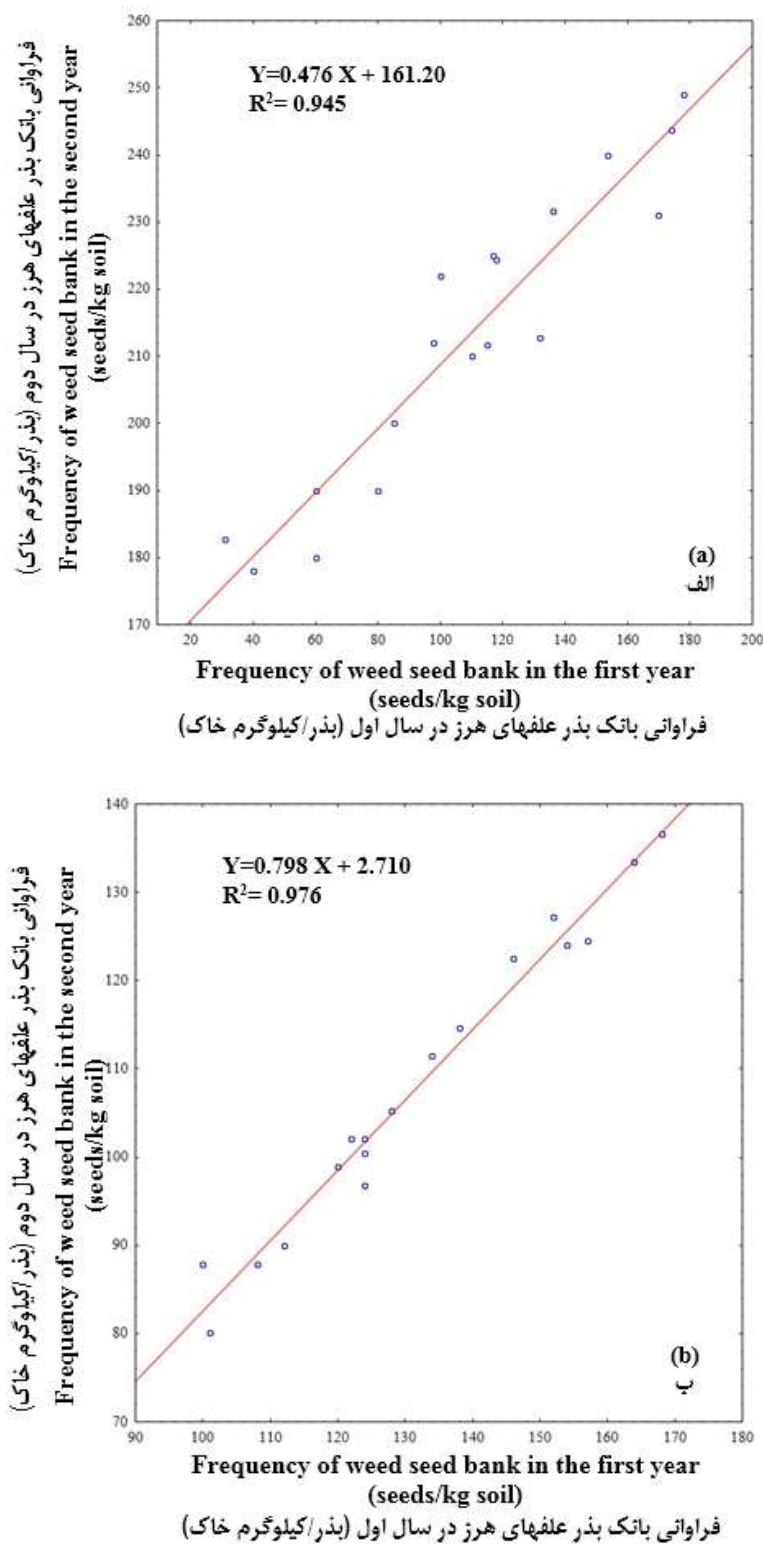
پوشش سطح خاک با بقایای گیاهی با دریافت تشعشع خورشیدی، جلوگیری از افزایش دمای خاک، ظهور، تولیدمثل، برهم زدن فصل رویش، سرکوب جوانه‌زنی و تکمیل چرخه‌ی زندگی علف‌های هرز را دچار اختلال کرده و نهایتاً سبب تغییر ساختار بانک بذر علف‌های هرز خواهد شد (Ramakrishna et al., ; Varon and Aguilar, 1998). یافته‌های این تحقیق با نتایج بسیاری از محققین در خصوص ساختار آیش همراه با بقایای گیاهی بر مدیریت زراعی بانک بذر علف‌های هرز انطباق دارد. به طوری که استفاده از بقایای گندم با تأثیر دگرآسیبی در تناوب آیش-گندم سبب کاهش رشد علف‌های هرز گردید در حالی که در تناوب ذرت-گندم از هیچگونه بقایایی استفاده نشده است. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد استفاده از بقایای گیاهی گندم، جو و کلزا می‌تواند از ظهور و رشد و نمو علف‌های هرز تاج‌خروس و سلمه‌تره بکاهد، به طوری که بررسی پتانسیل دگرآسیبی بقایای ارقام گندم در برابر علف هرز یولاف وحشی و ماشک گل خوشه‌ای (*Vicia villosa*) نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی در ریشه‌چه یولاف وحشی نسبت به ساقه‌چه وجود داشت (Tehrani et al., 2009). حضور بقایای گیاهی و گیاهان پوششی بر سطح خاک می‌تواند تأثیر بسزایی بر رفتار علف‌کش‌ها و علف‌های هرز در خاک داشته باشند، و سبب کاهش تبخیر، تصعید و خاصیت موئینگی علف‌کش‌ها در زمان آیش به منظور کنترل بهتر علف‌های هرز گردد (Chauhan et al., 2006). خرقانی و همکاران (Kharqani et al., 2005) بیان داشتند میانگین تراکم بذور موجود در لایه سطحی خاک (۲۰-۰ سانتی‌متر) در تناوب آیش-ذرت-جو-لوبیا در پایین‌ترین سطح خود قرار داشت. از این‌رو، تراکم بذور موجود می‌تواند تحت تأثیر نوع گیاه زراعی و حضور آیش در تناوب نیز قرار گیرد که می‌توان از آن به عنوان یک راهکار در مدیریت تلفیقی علف‌های هرز استفاده کرد (Kharqani et al., 2005).

نقشه‌های توزیع مکانی و تراکم جمعیت کل گیاهچه‌های علف‌های هرز نشان داد کاربرد علف‌کش‌ها می‌تواند تا حدودی گیاهچه‌های علف‌های هرز را در تناوب‌های ذرت-گندم و آیش-گندم کنترل نماید (شکل ۵). در تناوب ذرت-گندم در سال اول وجود یک مرکز پر تراکم گیاهچه و حواشی کم تراکم تر قبل از مدیریت شیمیایی به خوبی مشهود است. در حالی که پس از کنترل شیمیایی الگوی مکانی لکه‌ها تغییر قابل توجهی کرده است (شکل 5a,b). نقشه‌ها در سال دوم نمونه‌برداری در تناوب ذرت-گندم نشان داد مشابهت زیادی بین الگوهای توزیع جمعیت کل علف‌های هرز در بین دو مرحله قبل و بعد از کاربرد علف‌کش وجود دارد (شکل 5c,d). این نقشه‌ها نشان دهنده وجود مراکز لکه‌های علف‌های هرز باقی مانده در نتیجه کاربرد یکنواخت علف‌کش‌ها و یا علف‌های هرزی است که دیرتر جوانه

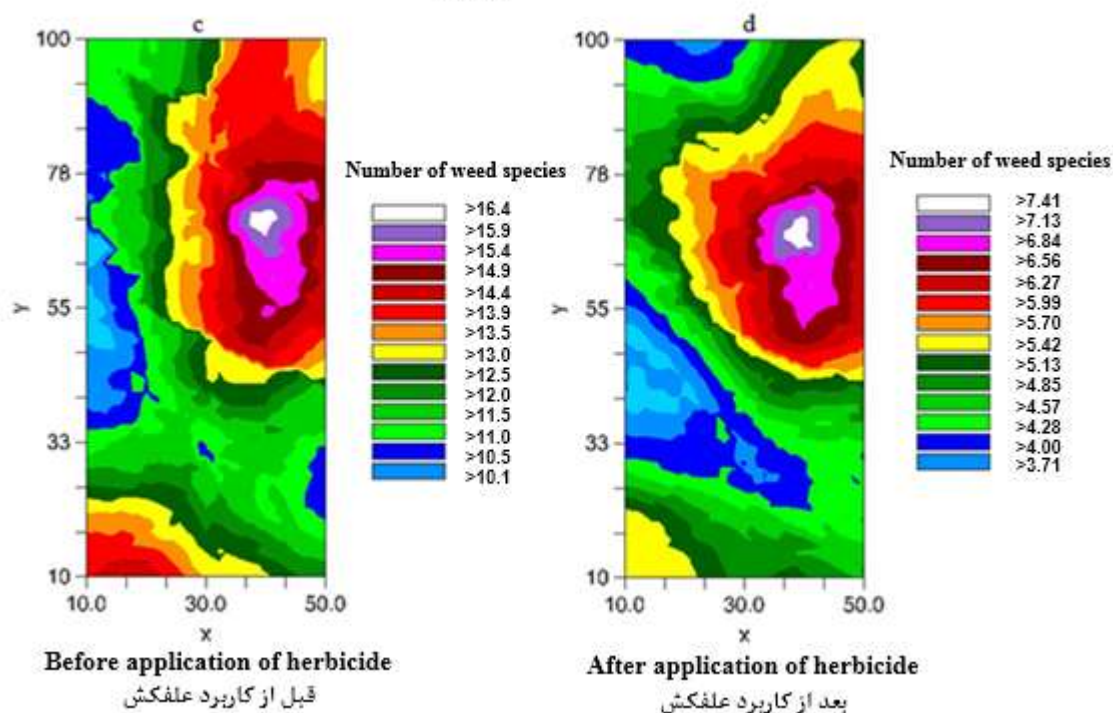
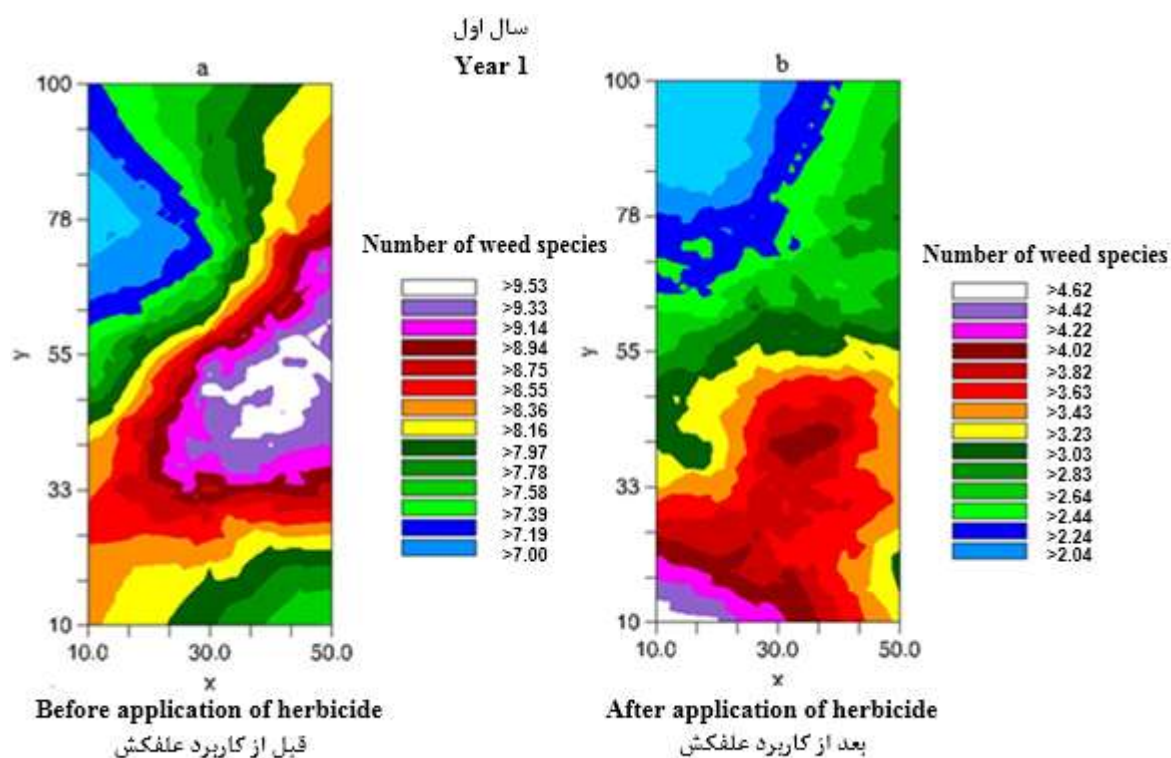
زده‌اند (Makaryan and Rouhani, 2014). مراکز پرتراکم علف‌های هرز در مزرعه بذوری را تولید می‌کنند که می‌توانند در سال بعد سبب تولید گیاهچه شوند. در حقیقت این نقاط پرتراکم می‌توانند همان نقاط بانک بذر با تراکم بالا باشند که در شرایط مناسب جوانه می‌زنند. در تناوب آیش-گندم در سال اول به دلیل حضور پوشش بقایای گندم در سطح خاک و عوامل مدیریتی تعداد معدودی از علف‌های هرز مشاهده شد و بدین منظور نقشه توزیع مکانی تنها در سال دوم رسم گردید. همچنین در سال دوم قبل و بعد از کاربرد علف‌کش در مزرعه گندم تغییر محسوسی در شکل تراکم لکه‌های علف‌های هرز مشاهده نشد (شکل 5e,f). بررسی‌ها نشان می‌دهد که در سیستم‌های شخم متداول لکه‌های نسبتاً ثابتی در طی زمان وجود دارد (Gerhards et al., 1997). در بسیاری از موارد نیز علف‌های هرز تحت تأثیر کنترل شیمیایی قرار نمی‌گیرند و بذوری تولید می‌کنند که به تقویت بانک بذر و افزایش آلودگی در سال‌های آینده کمک خواهد کرد. محققین بیان کردند تناوب زراعی می‌تواند با کاهش تولید بذر و تغییر گونه‌های علف‌های هرز موجب کاهش ذخیره بانک بذر خاک شود (Ge et al., 2018). روش‌های مدیریت مکان ویژه علف‌های هرز اجازه می‌دهد تا با در نظر گرفتن تراکم، فراوانی و غالبیت گونه‌های علف هرزی و الگوی پراکنش آنها در مزرعه بتوان در جهت مصرف بهینه علف‌کش‌ها عمل نمود. بعلاوه، با کاربرد علف‌کش‌ها تنها در مکان‌های آلوده به علف‌های هرز در گندم زمستانه می‌توان سبب ذخیره علف‌کش‌ها تا ۹۱-۵۱ درصد در علف‌کش‌های باریک برگ و ۸۴-۱۶ درصد در علف‌کش‌های پهن برگ گردید (Hamouz et al., 2015). محققین گزارش کردند کاربرد لکه‌ای علف‌کش‌ها در مقایسه با کاربرد طیف وسیعی از آنها در کل مزرعه می‌تواند علف هرز *Elymus repens* را تا ۹۷ درصد کنترل نماید (Rew et al., 1996).

نتیجه‌گیری

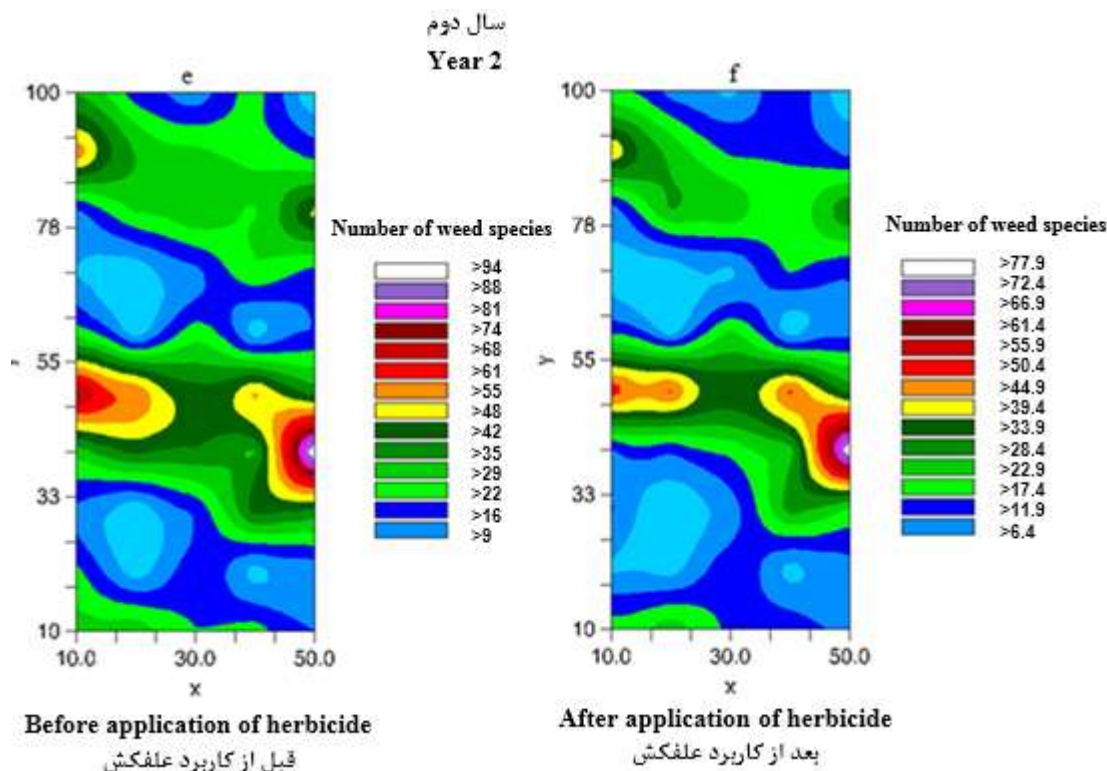
نتایج نشان داد کشت پیای ذرت-گندم به عنوان یک سیستم زراعی پرنهاده با سیستم شخم عمیق سبب به روی خاک آمدن بذور پرایمینگ شده علف‌های هرز از لایه‌های عمیق به سطح خاک و افزایش اندازه بانک بذر به ویژه در لایه‌های سطحی خاک (۱۵-۰ سانتیمتر) می‌شود. تناوب ذرت-گندم با کاهش تنوع گونه‌ای سبب افزایش فراوانی بانک بذر علف‌های هرز دانه ریز فاقد خواب مانند خرفه، تاج خروس، سلمه‌تره و غربلیک می‌شود و این امر با توجه به عدم کارایی مناسب روش‌های شیمیایی، اهمیت توجه به مدیریت و استفاده از سیستم‌های زراعی حفاظتی را دوچندان می‌کند.



شکل ۴- رابطه رگرسیونی بین تناوب‌های زراعی ذرت-گندم (الف) و گندم-آیش (ب) به عنوان تابعی از پویایی بانک بذر طی دو سال نمونه‌برداری
Figure 4- Regression between Corn-Wheat (a) and Fallow-Wheat (b) rotations as a function of soil seed bank dynamics during two years



سال دوم
Year 2



شکل ۵- توزیع مکانی و تراکم گیاهچه کل علف‌های هرز در تناوب ذرت-گندم (a, b, c, d) و تناوب آیش-گندم (e, f) قبل و بعد از کاربرد علف‌کش (هر رنگ نشان دهنده تراکم گیاهچه در متر مربع است)

Figure 5- Spatial distribution and total weed seedlings density in Corn-Wheat (a, b, c, d) and Fallow-Wheat (e, f) rotations, before and after application of herbicide (each year indicates weed seedling density per m²)

تحقیقات تکمیلی گسترده و اساسی در آینده می‌باشد. بهبود و درک درست از پویایی بانک بذر علف‌های هرز به منظور توسعه سیستم‌های کنترل علف‌های هرز امری ضروری و اجتناب ناپذیر است و بایستی علم مدیریت علف‌های هرز با اصول بوم‌شناسی به منظور توسعه استراتژی‌هایی نوین در سیستم‌های مدیریت علف‌های هرز یکپارچه شوند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حوزه ریاست و کلیه عوامل اجرایی مزارع تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز که در اجرای این طرح کمال همکاری را نموده‌اند صمیمانه قدردانی می‌گردد.

در مقابل استفاده از روش‌های تلفیقی همراه با خاک‌ورزی حداقل در کشت آیش-گندم همراه با حفظ بقایا و کنترل مکانیکی در طول آیش علاوه بر کاهش میزان نهاده سبب تخلیه بانک بذر علف‌های هرز، افزایش تنوع و غنای گونه‌ای، بهبود ساختمان خاک، افزایش شرایط پوسیدگی بذر و تغذیه موجودات خاکی از بذور موجود در خاک می‌گردد. از این‌رو، استفاده پیاپی از گیاهان ردیفی و غیر وجینی (ذرت-گندم) همراه با سیستم‌های مدیریتی مرسوم می‌تواند سبب پویایی بانک بذر و خسارت جبران ناپذیری به مزارع گردد. همچنین، از آنجایی که در برخی از نقشه‌ها تغییر محسوس در لکه‌های گیاهچه‌های علف‌های هرز پس از کاربرد علف‌کش‌ها مشاهده نگردید می‌توان به احتمال وجود مقاومت به علف‌کش‌ها در برخی گونه‌ها نیز اشاره کرد. این در حالی است که اثبات قطعی این موضوع نیازمند

منابع

1. Alarcón, R., Hernández-Plaza, E., Navarrete, L., Sánchez, M.J., Escudero, A., Hernanz, J.L., & Sánchez, A.M. (2018). Effects of no-tillage and non-inversion tillage on weed community diversity and crop yield over nine years in a Mediterranean cereal-legume cropland. *Soil and Tillage Research* 179: 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.01.014>.
2. Altieri, M., & Nicholls, C. (2018). *Biodiversity and pest management in agroecosystems*. CRC Press.

3. Anderson, R.L., Stymiest, C.E., Swan, B.A., & Rickertsen, J.R. (2007). Weed community response to crop rotations in western South Dakota. *Weed Technology* 21(1): 131-135. <https://www.jstor.org/stable/4495822>.
4. Asadi, G., Ghorbani R., Khorramdel, S., & Amin Ghafouri, A. (2014). Effects of different levels of wheat straw and nitrogen fertilizer on the combination, density and population of weeds in garlic. *Journal of Agroecology* 4(1): 86-95. (In Persian with English abstract)
5. Azizi, G, Koocheki A., Nasiri Mahallati, M., & Rezvani Moghadam, P. (2010). Effect of plant diversity and type of nutrition on weed composition and weedness in different culture patterns. *Iranian Journal of Field Crops Research* 7(1): 115-125. (In Persian with English abstract)
6. Bhutada, P.O., & Bhale, V.M. (2015). Effect of herbicides and cultural practices on nutrient uptake by chickpea and weed. *Journal of Crop and Weed* 11(1): 232-235.
7. Bilalis, D., Sidiras, N., Economou, G., & Vakali, C. (2003). Effect of different levels of wheat straw soil surface coverage on weed flora in *Vicia faba* crops. *Journal of Agronomy and Crop Science* 189(4): 233-241. <https://doi.org/10.1046/j.1439-037X.2003.00029.x>.
8. Blum, U., King, L., Gerig, T., Lehman, M., & Wosham, A.D. (1997). Effects of clover and small grain cover crops and tillage techniques on seedling emergence of some dicotyledonous weed species. *American Journal of Alternative Agriculture* 12(4): 146-161. <https://www.jstor.org/stable/44503028>.
9. Booth, B.D., Murphy, S.D., & Swanton, C.J. (2003). *Weed Ecology in Natural and Agricultural systems*. CABI publishing.
10. Boquet, D.J., Hutchinson, R.L., & Breitenbeck, G.A. (2004). Long-term tillage, cover crop, and nitrogen rate effects on cotton: plant growth and yield components. *Agronomy Journal* 96: 1443-1452. <https://doi.org/10.2134/agronj2004.1443>.
11. Broster, J.C., Pratley, J.E., Ip R.H.L., Ang L., & Seng, K.P. (2019). Cropping practices influence incidence of herbicide resistance in annual ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia. *Crop and Pasture Science* 70(1): 77-84. <https://doi.org/10.1071/CP18355>.
12. Buhler, D.D., Hartzler, R.G., & Forcella, F. (1997). Implications of weed seedbank dynamics to weed management. *Weed Science* 45(3): 329-336. <https://www.jstor.org/stable/4046027>.
13. Buhler, D.D., Kohler, K.A., & Thompson, R.L. (2001). Weed seed bank dynamics during a five-year crop rotation. *Weed Technology* 15(1): 170-176. <https://www.jstor.org/stable/3988603>.
14. Cardina, J., Sparrow, D.H., & McCoy, E.L. (1995). Analysis of spatial distribution of common Lambsquarters (*Chenopodium album*) in no till soybean (*Glycine max*). *Weed Science* 43:258- 268.
15. Cavers, P.B., & Benoit, D.L. (1989). Seed banks in arable land. p. 309-328. In: Leck, M.A., Parker, V.T. and Simpson, R.L. (eds) *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press, San Diego.
16. Chakravarti, L. (1967). *Handbook of Methods of Applied Statistics*. John Wiley and Sons.
17. Chauhan, B.S., Gill, G.S., & Preston, C. (2006). Tillage system effects on weed ecology, herbicide activity and persistence: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46(12): 1557-1570. <https://doi.org/10.1071/EA05291>.
18. Conklin, A.E., Erich, M.S., & Liebman, M. (2002). Effects of red clover (*Trifolium pratense*) green manure and compost soil amendments on wild mustard (*Brassica kaber*) growth and incidence of disease. *Plant and Soil* 238: 245-25. <https://doi.org/10.1023/A:1014448612066>.
19. Demjanova, E., Macak, M., Dalovic, I., Majernik, F., Tyr, S., & Smatana, J. (2009). Effects of tillage systems and crop rotation on weed density, weed species composition and weed biomass in maize. *Agronomy Research* 7(2): 785-792.
20. Donaghy, D.I. (1980). Zero tillage in relation to Canada thistle. p. 87-90. In Proc. *Canada thistle symptoms*. Agriculture, Canada, Regina, SK.
21. Forcella, F. (1992). Prediction of weed seedling densities from buried seed reserves. *Weed Research* 32: 29-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1992.tb01859.x>.
22. Gallandt, E.R., Liebman, M., & Huggins, D.R. (1999). Improving soil quality: implications for weed management. *Journal of Crop Production* 2: 95-121.
23. Ge, X., Wang, N., Liu, Z., Zhang, X., & Chen, X. (2018). Effects of the herbicide on the weed seed banks of the maize farmlands under different managements. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering* 452: 022167. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/452/2/022167>.
24. Gerhards, R., Wyse-pester, D.Y., & Johnson, G.A. (1997). Characterizing spatial stability of weed populations using interpolated maps. *Weed Science* 45: 108-119. <https://doi.org/10.1017/s0043174500092559>.
25. Ghaffari, M., Ahmadvand, G., Ardakani, M., Keshavarz, N., & Nadali, O. (2012). Ecological weed management with cover crops: Effect on winter weeds and establishment of summer weeds in potato. *Iranian Journal of Crop Research* 10(1): 24-255.
26. Hamouz, P., Hamouzová, K., Tyšer, L., & Holec, J. (2015). Effect of site-specific weed management in winter crops on yield and weed populations. *Plant, Soil and Environment* 60(1): 27-35. <https://doi.org/10.17221/574/2013-PSE>.

27. Harker, K.N., & O'donovan, J.T. (2013). Recent weed control, weed management, and integrated weed management. *Weed Technology* 27(1): 1-11. <https://www.jstor.org/stable/23358301>.
28. Hossain, M.M., & Begum, M. (2016). Soil weed seed bank: Importance and management for sustainable crop production-A Review. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 13(2): 221-228.
29. Hosseini, P., Karimi, H., Babaei S., Mashhadi, H.R., & Oveisi, M. (2014). Weed seed bank as affected by crop rotation and disturbance. *Crop Protection* 64: 1-6.
30. Hume, L. (1982). The long-term effects of fertilizer application and three rotations on weed communities in wheat (after 21-22 years at Indian Head, Saskatchewan). *Canadian Journal of Plant Science* 62: 741-750.
31. Iqbal, M., Khan, S.M., Khan, M.A., Ahmad, Z., & Ahmad, H. (2018). A novel approach to phytosociological classification of weeds flora of an agro-ecological system through Cluster, Two Way Cluster and Indicator Species Analyses. *Ecological Indicators* 84: 590-606.
32. Jamali, M.C., & Ahmadvand, G. (2015). Effect of different tillage systems on weed seed bank dynamics of in Corn-Wheat rotation. *Iranian Journal of Weed Science* 11(1): 1-11. (In Persian with English abstract)
33. Kharqani, F., Rashed Mohasell, M.H., & Nasiri Mahallati, M. (2005). Evaluation of weed seedbank dynamics in different rotations of beans, sugar beet, corn and wheat. *Agricultural Sciences and Technology* 19(1): 72-80. (In Persian)
34. Koocheki, A., & Nasiri, M. (2005). Effects of different input levels on weed seed bank in wheat fields of Mashhad. *Iranian Journal of Agricultural Research* 3(1): 89-102. (In Persian with English abstract)
35. Liebman, M.Z. (1988). *Weed management in agroecosystems ecological approaches*. Translation. Koocheki A., Zarif ketabi H., and Nakhfrosh A. Ferdowsi University of Mashhad Press.
36. Magurran, A.E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Chapman and Hall publication.
37. Makaryan, H., & Rouhani, A. (2014). Determination of spatial distribution of weeds based on damage threshold in two winter wheat fields in Shahrood area. *Journal of Plant Production Research* 21(3): 51-72.
38. Mallek, S., Partner, T.S., & Stapleton, J. (2007). Interaction effects of *Allium* sp. Residues concentrations and soil temperature on seed germination of four weedy plant species. *Applied Soil Ecology* 37: 233-239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.07.003>.
39. May, R.M. (1975). Patterns of species abundance and diversity. p. 81-121. In: Cody, M.L. and Diamond, J. *Ecology and Evolution of Communities*. Harvard University Press, Cambridge.
40. Mirzaei, J., Akbarinia, M., Hosseini, Sohrabi, M., & HosseinZadeh, J. (2007). Diversity of herbaceous plants in relation to physiological factors in middle ecosystems of Zagros. *Iranian Journal of Biology* 4: 382-375. (In Persian)
41. Mojab, M., Hosseini, M., & Eslami, S.V. (2016). Weed population dynamics, water productivity and durum wheat yield (*Triticum durum* L.) in no-tillage and common tillage systems. *Journal of Plant Protection* 30(2): 313-320. (In Persian)
42. Momen Yasaghi, R., Siahmarguee, A., Zeynaly, A., Ghaderi-far, F., & Kamkar, B. (2017). Study of population changes and weed seed banks and soybean yields affected by different tillage methods. *Agricultural Ecology* 9(3): 575-592.
43. Moss, S.R., & Clarke, J.H. (1994). Guidelines for the prevention and control of herbicide-resistant black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.). *Crop Protection* 13(3): 230-234. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0261-2194(94)90083-3).
44. Nasiri Mahallati, M., Kochaki, A., & Siahmarguee, A. (2009). Modeling seed bank dynamics of wild oat (*Avena fatua*) in wheat fields. *Iranian Journal of Field Crop Research* 7(1): 281-293. (In Persian with English abstract)
45. Neve, P., Norsworthy, J.K., Smith, K.L., & Zelaya, I.A. (2011). Modelling glyphosate resistance management strategies for Palmer amaranth in cotton. *Weed Technology* 25: 335-343. <http://dx.doi.org/10.1614/WT-D-10-00171.1>.
46. Nkoa, R., Owen, M.D., & Swanton, C.J. (2015). Weed abundance, distribution, diversity, and community analyses. *Weed Science* 63(SP1): 64-90. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00075.1>.
47. Nourbakhsh, F., Koocheki, A., & Mahallati, M.N. (2019). Investigation of Biodiversity and Some of the Ecosystem Services in the Intercropping of Corn, Soybean and Marshmallow. *International Journal of Plant Production* 13(1): 35-46.
48. Owen, M.D., Beckie, H.J., Leeson, J.Y., Norsworthy, J.K., & Steckel, L.E. (2015). Integrated pest management and weed management in the United States and Canada. *Pest Management Science* 71(3): 357-376.
49. Rahman, A., James, T.K., Mellsop, J.M., & Grbavac, N. (2001). Weed seed bank dynamics in maize under different herbicide regimes. *New Zealand Plant Protection* 54: 168-173.
50. Rajcan, I., Agha Alikhani, M., Swanton, C.J., & Tollenaar, M. (2002). Development of redroot pigweed is influenced by light spectral quality and quantity. *Crop Science* 42: 1930-1936.
51. Ramakrishna, A., Tam, H.M., Wani, S.P., & Long, T.D. (2006). Effect of mulch on soil temperature, moisture, weed infestation and yield of groundnut in northern Vietnam. *Field Crops Research* 95: 115-125.
52. Rew, L.J., Cussans, G.W., Muggleston, M.A., & Miller, P.C.H. (1996). A technique for mapping the spatial distribution of *Elymus repens*, with estimates of the potential reduction in herbicide usage from patch spraying.

- Weed Research* 36(4): 283-292.
53. Roham, R., Akbari, N., Abdollahian Noghabi, M., Esivand, H.R., & Yaghoubi, M. (2013). Investigation of spatial relationship between seed bank, weed population and its distribution pattern during the growing season in sugar beet field. *Journal of Sugar Beet* 28(2): 187-171. (In Persian with English abstract)
 54. Santín-Montanyá, M.I., Martín-Lammerding, D., Zambrana, E., & Tenorio, J.L. (2016). Management of weed emergence and weed seed bank in response to different tillage, cropping systems and selected soil properties. *Soil and Tillage Research* 161: 38-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.still.2016.03.007>.
 55. Sarkar, A.K. (2015). Assessment of soil seedbank composition of woody species in moraghat forest, jalpaiguri, India. *International Journal of Recent Scientific Research* 6(11): 7319-7321.
 56. Siahmarguee, A., Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., & Mahghani, S. (2011). Effect of integrated weed management on seed bank dynamics in farms (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agroecology* (3)2: 151-162. (In Persian with English abstract)
 57. Singer, J.W., & Cox, W.J. (1998). Agronomics of corn production under different crop rotations in New York. *Journal of Production Agriculture* 11(4): 462-468.
 58. Skudodienė, R., Karcauskiene, D., Ciuberkis, S., Repsiene, R., & Ambrazaitiene, D. (2013). The influence of primary soil tillage on soil weed seed bank and weed incidence in a cereal-grass crop rotation. *Zemdirbyste-Agriculture* 100(1): 25-32.
 59. Soltani, E., Soltani, A., Galeshi, S., Ghaderi-Far, F., & Zeynali, E. (2015). Vertical distribution of rape seed and wild mustard seeds in seed soybean and wheat fields. *Agronomy Journal (Pajouhesh and Sazandegi)* 112: 20-28. (In Persian with English abstract)
 60. Storkey, J., Meyer, S., Still, K.S., & Leuschner, C. (2012). The impact of agricultural intensification and land-use change on the European arable flora. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 279: 1421-1429.
 61. Swanton, C.J., Shrestha, A., Kenzevic, S.Z., Roy, R.C., & Ball-Coelho, B.R. (2000). Influence of tillage type on vertical weed seedbank distribution in a sandy soil. *Canadian Journal of Plant Sciences* 80: 455-457.
 62. Tang, L., Wan, K., Cheng, C., Li, R., Wang, D., Pan, J., & Chen, F. (2013). Effect of fertilization patterns on the assemblage of weed communities in an upland winter wheat field. *Journal of Plant Ecology* 7(1): 39-50.
 63. Tehrani, M., Ayene band, A., & Nabati Ahmadi, D. (2009). The Study of Dynamics of Weed Plants Population Affected by Residue Management and Nitrogen Splitting Implanting of Canola (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture)* 65-79. (In Persian)
 64. Varon, A.C., & Aguilar, I. (1998). Weed Seedbanks and Corn Growth following Continuous Corn or Alfalfa. *Agronomy Journal* 90: 813-818.
 65. Vasileiadis, V.P., Van Dijk, W., Verschwele, A., Holb, I.J., Vámos, A., Urek, G., Leskovšek, R., Furlan, L., & Sattin, M. (2016). Farm-scale evaluation of herbicide band application integrated with inter-row mechanical weeding for maize production in four European regions. *Weed Research* 56(4): 313-322. <https://doi.org/10.1111/wre.12210>.
 66. Virginia, A., Zamora, M., Barbera, A., Castro-Franco, M., Domenech, M., De Gerónimo, E., & Costa, J.L. (2018). Industrial agriculture and agroecological transition systems: A comparative analysis of productivity results, organic matter and glyphosate in soil. *Agricultural Systems* 167: 103-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agsy.2018.09.005>.
 67. Weysi, M., Rahimian Mashhadi, H., Alizadeh, H., Minbashi, M., & Ovissi, M. (2014). Effect of crop protection and Herbicide management on weed species distribution in wheat fields. *Iranian Journal of Field Crop Science* 45(4): 521-530. <https://dx.doi.org/10.22059/ijfcs.2014.53562>.
 68. Zareafeizabadi, A., & Rustamzadeh, R. (2013). Effect of crop rotation on weed density and weed biomass and yield of wheat (*Triticum aestivum*). *Agroecology Journal* 5(3): 318-329. (In Persian)



Isolation of Candidate Genes in Host- *Phelipanche aegyptiaca* Interaction by Genome Walking

M.R. Rezaei¹, A. Mirshamsi Kakhki^{2*}, A.R. Seifi³

Received: 10-08-2021

Revised: 27-11-2021

Accepted: 09-04-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:Rezaei, M.R., Mirshamsi Kakhki, A., & Seifi, A.R. (2022). Isolation of Candidate Genes in Host- *Phelipanche aegyptiaca* Interaction by Genome Walking fields. *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 259-267. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/JPP.2022.71531.1038](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.71531.1038)

Introduction

Broomrape (*Phelipanche aegyptiaca*) is one of the most important plant parasitic species which causes significant yield loss of different crops by colonizing roots and uptaking nutrients from the host plants. Haustoria attachment stage is the most important stage to study molecular mechanism of plant-parasite interaction. Identifying key genes in haustoria attachment stage may reveal novel strategies to control Broomrape. Transcriptome studies by Next-generation (high throughput, deep) sequencing have become an important tool in the molecular biology of plants in recent years. All stage-specific RNA-seq data are available on the plant parasite genome project database (<http://ppgp.huck.psu.edu>). Differential gene expression in haustoria attachment stage can detect candidate parasitism genes and contribute to understanding molecular basis of plant-parasite interaction. This information may reveal novel genetic strategies such as HIGS to control *Phelipanche aegyptiaca* efficiently.

Materials and Methods

Analysis of Transcriptome data from the plant parasite genome project database (<http://ppgp.huck.psu.edu>) at Haustoria attachment stage and imbibed seed stage revealed 391 gene transcripts with differential expression in these stages (unpublished data). Among these transcripts, four transcripts with unknown functions were detected with a high fold change in expression in the haustoria attachment stage. In order to predict possible roles of these transcripts in broomrape-host interactions, we used genome walking method to extend these transcripts. DNA was extracted from *Phelipanche aegyptiaca* stem using CTAB method. The quantity and quality of DNA samples were determined using the NanoDrop and agarose gel electrophoresis. DNA was digested by four restriction enzymes, *DraI*, *EcoRV*, *StuI*, *PvuII*. Four DNA libraries were purified using SDS protocol and ligated to GenomeWalker Adaptor (GenomeWalker Adaptor 1 and GenomeWalker Adaptor 2). Gene specific primers (GSPs) were designed using Primer3plus for Oa548, Oa3391, Oa1635, Oa424 transcripts. Primary PCR was done using gene-specific primer 1 (GSP1) and adaptor primer 1 (AP1). 1 µl of each primary PCR were diluted into 49 µl of deionized water. Diluted primary PCR products were used as template for Secondary PCR. Primary PCR was done to amplify the unknown sequence using gene-specific primer 2 (GSP2) and adaptor primer 2 (AP2). Secondary PCRs desired bands were extracted from agarose gel using Genet Bio k-8000 kit. Extracted products were ligated to pTG19-T vector. Recombinant vectors were cloned to *Escherichia coli* competent cells using heat shock procedure and then cultured on LB plates. Colonies that contain recombinant vectors were detected using blue-white screening. Colony PCR was done to confirm the presence of inserted sequences. Selected colonies were incubated in 37°C in LB media containing 100 microgram per ml Ampicillin. Plasmid extraction was done by Silica procedure. After sequencing by M13F and M13R, complete sequences were assembled using CAP contig assembly software. Fgenesh online software was used to predict gene structure by selecting *Arabidopsis thaliana* as organism. Gene prediction was done by AUGUSTUS. Complete sequences were more analyzed using Blast, CDD, Phobius prediction, HMMER, InterProScan.

1, 2 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professors, Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

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

Results and Discussion

In this study we successfully extended the genomic sequences for two candidate transcript that showed increase expression in attachment stage. The sequence of Oa1635 and Oa424 transcripts was extended from the end of the 5' using the genome-walking method to determining the DNA sequence of unknown flank *genomic* regions and study the role of these sequences in plant-parasite interaction. Using this technique, 587bp and 165bp of new DNA sequences were obtained for Oa424 and Oa163, respectively. Analysis of homology using BLASTX algorithm for Oa424 showed 71.57% similarity (e-value: $2e-41$) with unknown protein (XP_011081407.1) containing the transposase domain. Also, the results of CDD tool predicted the DDE_Tnp_ISL3 domain in position between 257 and 466 bp (e-value: $7.31e-14$). For Oa1635 transcript, the results of homology analysis using BLASTX algorithm showed 72.73% ($2e-9$) similarity with retrovirus-related polyprotein sequence from transposon tnt 1-94 (GFP84907.1). As the regulatory function of proteins with mutant-like transposase domains, the two transcripts Oa424 and Oa1635 may play a key role in haustoria development and plant-parasitic interaction. Signal peptides have observed in these sequences suggesting that these transcripts encodes secretory proteins from haustoria to plant-parasite interaction.

Conclusion

Bioinformatics analysis on extended sequence, identified transposase domains which may have regularity role in parasitic process such as haustoria development or penetration. These genes may play important roles in plant-parasite interaction and developing molecular strategies to control this parasitic plant.

Keywords: Genome walking, Plant parasite, Transcriptome

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۲۶۷-۲۵۹

جداسازی ژن‌های کانديد در میانکنش میزبان- گل جالیز (*Phelipanche aegyptiaca*) با استفاده از روش پیمایش ژنوم

محمدرضا رضائی^۱ - امین میرشمسی کاخکی^{۲*} - علیرضا سیفی^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

چکیده

گیاه گل جالیز مصری (*P. aegyptiaca*) یکی از مهمترین گونه‌های انگلی می‌باشد که خسارت پنهان آن به انواع گیاهان زراعی از طریق جذب آب و مواد غذایی از ریشه گیاه میزبان، بسیار قابل توجه است. مرحله اتصال مکینه انگل به میزبان، مهم‌ترین مرحله برای مطالعه مولکولی میانکنش انگل-میزبان است. با گسترش روش‌های توالی‌یابی NGS و مطالعات ترنسکریپتوم، اطلاعات مهمی از مراحل رشدی و میانکنش گیاهان انگلی با میزبان در دسترس قرار گرفته است. برای روشن شدن راهبردهای مولکولی کلیدی این فرایند، داده‌های RNA-Seq موجود در پایگاه داده پروژه ژنوم گیاهان انگلی (<http://ppgp.huck.psu.edu>) آنالیز شد. آنالیز داده‌های ترنسکریپتوم مربوط به مرحله اتصال به میزبان به عنوان مرحله مهم در فرایند انگلی شدن، منجر به شناسایی رونوشت‌هایی با افزایش بیان در این مرحله گردیده است. از بین رونوشت‌های شناسایی شده احتمالی با کارکرد نامشخص، چهار رونوشت که بیشترین سطح بیان را در مرحله اتصال به میزبان داشتند در این مطالعه بطور دقیق‌تری بررسی شدند. برای تشخیص نقش احتمالی این رونوشت‌ها در فرایند انگلی شدن گل جالیز، جهت دستیابی به توالی کامل‌تر از روش پیمایش ژنوم استفاده شد. ۵۸۷ جفت باز به توالی رونوشت Oa424 و ۱۶۵ جفت باز به توالی رونوشت Oa1635 اضافه گردید. بررسی‌ها نشان داد توالی کامل رونوشت Oa424 و بخشی از توالی Oa1635 به روش پیمایش ژنوم جداسازی شده است. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی‌های کامل Oa424 و Oa1635، تشابه با پروتئین‌های با فعالیت ترانسپوزاز را نشان دادند. با توجه به نقش تنظیمی پروتئین‌های دارای دامین ترانسپوزاز به نظر می‌رسد احتمالاً این دو رونوشت نقش تنظیمی در فرایند انگلی شدن دارند. همچنین با توجه به وجود سیگنال پپتید در این توالی‌ها، احتمالاً این دو رونوشت پروتئین‌های ترشحی را کد می‌کنند که در میانکنش انگل-میزبان از اندام مکنده ترشح می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: پیمایش ژنوم، ترنسکریپتوم، گیاه انگل

مقدمه

اقتصادی به گیاهان خانواده‌های Apiaceae، Cruciferae، Solanaceae، Cucurbitaceae، Leguminosae، Compositae، و Geraminaceae شده است (Chai et al., 2015).

در این بین، گل جالیز مصری (*Phelipanche aegyptiaca*) یکی از مهمترین گونه‌های گل جالیز می‌باشد که خسارت پنهان آن به انواع گیاهان زراعی، بسیار قابل توجه است. چرخه زندگی این انگل یک سال طول می‌کشد و در پایان این دوره قادر است بذور ریز و فراوانی را تولید کند، که تا ۲۰ سال قوه نامیه خود را در خاک حفظ می‌کند (Singh et al., 2006). این انگل اکثر دوره‌ی زندگی خود را در زیر خاک گذرانده و استقرار موفق در خاک، آن را تبدیل به یک مخزن برای دریافت آب و مواد غذایی از گیاه میزبان می‌کند

گونه‌های گل جالیز (*Orobancha* spp.)، گونه‌های انگلی هستند که آب، مواد معدنی و آلی مورد نیاز خود را از طریق مکینه انگلی از گیاه میزبان دریافت می‌کنند. این گیاه نوعی علف هرز انگل اجباری است که در سرتاسر منطقه مدیترانه، آسیای غربی و اروپای شرقی، باعث بروز خسارت فراوانی شده است. این گیاه باعث خسارت عمده

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(Email: mirshamsi@um.ac.ir)

(*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/JPP.2022.71531.1038

(Delavault, 2015). انگل در مراحل پایانی نمو، در حالی که ارتباط بسیار نزدیک و شدیدی با ریشه‌ی گیاه میزبان برقرار کرده است، با ظهور قسمت گل‌دار، بیرون از خاک پدیدار می‌گردد. گل‌جالیز به موجب جذب آب، مواد معدنی و برخی ماکرومولکول‌ها از میزبان، خسارت ظاهری مانند پژمردگی، کوتولگی، و در نهایت کاهش کیفی و کمی محصول را به دنبال دارد (Joel et al., 2007).

نحوه‌ی استقرار گل‌جالیز بر روی ریشه‌ی گیاه میزبان و اعمال عمده‌ی خسارت قبل از ظهور ساقه‌ی گل‌دهنده، کنترل این انگل را بسیار مشکل ساخته است. تاکنون بسیاری از راهبردهای کنترل، همچون روش‌های گوناگون به‌زراعی تا کنترل شیمیایی انجام شده (Joel et al., 2007)، که متأسفانه هیچ‌کدام از روش‌های کنترل موجود روشی موثر، مقرون به صرفه و قابل اجرا در سطح مزرعه نبوده است. به رغم تلاش‌های گسترده‌ای که در جهت کنترل گل‌جالیز صورت گرفته، به دلیل ارتباط نزدیک میزبان و انگل، سیکل زندگی و ظهور آن بعد از اعمال خسارت، نتایج موفقیت آمیز کمی حاصل شده است (Gressel et al., 2004). از این‌رو لزوم توسعه و معرفی روش‌های جایگزین، با بهره‌وری بالا، از طریق مطالعه دقیق میانکنش انگل-میزبان جهت شناخت راهبردهای درگیر و استفاده از مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت در گیاهان زراعی ضروری به نظر می‌رسد. اخیراً با گسترش روش‌های توالی‌یابی NGS، مطالعات ترنسکریپتومی به یکی از ابزارهای مهم تحقیقات ژنتیکی تبدیل شده است. با استفاده از مطالعات ترنسکریپتوم اطلاعات مفیدی از هر یک از مراحل رشدی به دست می‌آید (Wang et al., 2009). مطالعه ترنسکریپتوم گل‌جالیز در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت و داده‌های ترنسکریپتوم تمام مراحل رشدی گل‌جالیز از طریق پایگاه داده پروژه ژنوم گیاهان انگلی (<http://ppgp.huck.psu.edu>) در دسترس است (Yang et al., 2014). یکی از مهمترین عوامل موفقیت در کنترل جوامع انگلی، انتخاب ژن‌های ضروری و دخیل در مراحل ابتدایی رشد و نمو انگل است، که به منظور کنترل انگل قبل از اعمال خسارت بسیار حائز اهمیت است (Yoder et al., 2009). آنالیز مقدماتی انجام شده توسط تیم تحقیقاتی حاضر روی داده‌های ترنسکریپتوم مربوط به مرحله اتصال به میزبان به عنوان مرحله مهم در فرایند انگلی شدن، منجر به شناسایی رونوشت‌هایی با افزایش بیان در این مرحله گردیده است (داده‌های منتشر نشده). از بین رونوشت‌های شناسایی شده، چهار رونوشت با کارکرد نامشخص و همراه با بیشترین سطح بیان انتخاب شد.

به منظور بررسی *In silico* عملکرد احتمالی این ژن‌ها در فرایند میانکنش انگل-میزبان، در این تحقیق جداسازی توالی کامل برخی از این ژن‌های احتمالی کلیدی براساس داده‌های بدست آمده از فاز

مقدماتی مطالعات RNA-Seq و با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی به عنوان هدف پروژه مورد بررسی قرار گرفت. اخیراً از روش خاموشی ژن از طریق میزبان (HIGS) به عنوان یک روش موثر در کنترل آفات و بیماری‌ها در روش‌های مهندسی ژنتیک استفاده می‌شود (Koch and Govindarajulu et al., 2015). روش HIGS در پژوهش‌هایی که برای کنترل گیاهان انگلی مانند *Striga asiatica* (Yoder et al., 2009)، *Triphysaria versicolor* (Tomilov et al., 2008) و *Cuscuta pentagona* (Alakonya et al., 2012) انجام شده‌اند، مورد استفاده قرار گرفته است. پس از جداسازی با استفاده از روش پیمایش ژنوم (Leoni et al., 2011) و بررسی بیوانفورماتیکی، ژن‌های کلیدی جهت استفاده در طراحی استراتژی‌های مبتنی بر HIGS، مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

مواد و روش‌ها

شناسایی رونوشت‌های کاندید با نقش نامشخص در میانکنش

در این مطالعه، داده‌های توالی‌یابی ترنسکریپتوم گل‌جالیز مربوط به پایگاه PPGP (<http://ppgp.huck.psu.edu>) گونه *P. aegyptiaca*، در مرحله جوانه‌زنی و اتصال به میزبان مورد تجزیه و تحلیل تفاوت بیان قرار گرفت. در این بررسی چهار رونوشت با نقش نامشخص Oa548، Oa3391، Oa1635 و Oa424 از بین رونوشت‌های افزایش بیان یافته در مرحله اتصال به میزبان (جدول ۱)، بر اساس بیشترین بیان (Fold Change) و کمترین P-value، انتخاب گردید (داده‌های چاپ نشده).

جدول ۱- رونوشت‌های انتخابی با نقش نامشخص
Table 1- Selected transcripts with unknown function

نام رونوشت انتخابی	تفاوت بیان	مقدار پی
Transcript Name	Fold change	P-value
Oa548	6253	1.59E-09
Oa3391	2108	2.00E-07
Oa1635	1890	6.88E-08
Oa424	681	9.90E-07

جداسازی ژن‌های کاندید با استفاده از روش پیمایش ژنوم

استخراج DNA و تهیه کتابخانه‌های پیمایش ژنوم

استخراج DNA از ساقه گل‌جالیز رشدیافته در مزرعه گوجه‌فرنگی به روش CTAB براساس روش دوایل (Doyle, 1991)

1- Next-generation sequencing

2- Host-induced gene silencing

به سلول مستعد انتقال یافت (Sambrook and Russell, 2006). جهت انتخاب تک کلون حاوی پلاسمید نوترکیب از روش غربالگری سفید/آبی و کلونی PCR برای شناسایی کلون‌های نوترکیب دارای قطعه مدنظر استفاده شد. پس از تایید حضور قطعه موردنظر از طریق روش کلونی PCR، کلونی باکتری در LB مایع حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد داده شد. سپس استخراج پلاسمید به روش سیلیکا انجام گرفت (Grimm, and Voß-Neudecker, 2003) انجام گرفت.

توالی‌یابی، آنالیزهای بیوانفورماتیکی و پیش‌بینی کارکرد ژن

پلاسمیدهای استخراج شده جهت انجام توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و با استفاده از آغازگرهای M13F و M13R مورد توالی‌یابی قرار گرفت. سرهم کردن توالی کامل با استفاده از ابزار CAP contig assembly انجام شد. سپس ساختار ژنی توالی‌های کامل، با استفاده از ابزار Fgenesh به دست آمدند. در بخش انتخاب ارگانسیم ابزار Fgenesh، گزینه *Arabidopsis thaliana (thale cress)* انتخاب گردید. پیش‌بینی ژن با استفاده از ابزار AUGUSTUS برای توالی‌های کامل با انتخاب *Arabidopsis thaliana* به عنوان ارگانسیم انجام شد. از ابزارهای بیوانفورماتیکی Blast، CDD،^۴ Phobius prediction، HMMER و InterProScan برای بررسی توالی کامل به دست آمده، استفاده شد. تمام تنظیمات برای این ابزارها به صورت پیش‌فرض انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی ژن‌های کاندید با روش پیمایش ژنوم و سرهم

کردن توالی رونوشت‌های Oa424 و Oa1635

واکنش PCR اول برای ژن‌های کاندید موردنظر در ۴ کتابخانه ژنومی با استفاده از آغازگر آداپتور اول (AP1) و آغازگر اول اختصاصی ژن برای هر کدام از ژن‌های کاندید (جدول ۳) انجام شد. سپس واکنش PCR دوم همراه با آغازگر آداپتور AP2 و آغازگرهای اختصاصی ژن GSP2-424، GSP2-1635، GSP2-548 و GSP2-3391 انجام و منجر به تکثیر چندین باند قابل مشاهده برای هر رونوشت در هر کتابخانه ژنومی گردید (شکل ۱). بطور کلی در روش پیمایش ژنوم انتخاب باند با سایز بزرگتر که با شدت بالا و بصورت شارپ تکثیر شده باشد اولویت می‌باشد. برای مثال در مورد ژن Oa424 بزرگترین باند ضعیف تکثیر شده است لذا باند بسیار شارپ بعدی به عنوان قطعه تکثیر شده بصورت اختصاصی در نظر گرفته، تخلیص و جداسازی شد.

با کمی تغییرات انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز مورد سنجش قرار گرفت. جهت تهیه کتابخانه‌های پیمایش ژنوم، DNA ژنومی بعد از ارزیابی کیفی و کمی به طور کامل با آنزیم‌های محدود کننده *DraI*، *PvuII* و *EcoRV* (شرکت ThermoFisher)، برش داده شد. در نهایت هر کتابخانه با استفاده از تخلیص به روش SDS، تخلیص گردید (Leoni et al., 2011) و به طور جداگانه به آداپتورهای پیمایش ژنوم^۱ متصل شد. توالی این آداپتورها با نام‌های GenomeWalker Adaptor 1 و GenomeWalker Adaptor 2 در جدول ۲ آمده است.

مرحله جداسازی با استفاده از PCR های پیمایش ژنوم

طراحی آغازگرها در این مرحله با استفاده از ابزار Primer3Plus انجام شد (جدول ۲). برای هر رونوشت دو آغازگر اختصاصی طراحی شد. به این صورت که آغازگر دوم اختصاصی ژن (GSP2) در بالادست و آغازگر اول اختصاصی ژن (GSP1) نزدیک به انتهای ۵ پرم توالی قرار می‌گیرد. واکنش PCR به ازای هر کتابخانه با استفاده از آغازگر اول آداپتور (AP1) و یک آغازگر اول اختصاصی ژن (GSP1)، انجام شد. سپس مخلوط PCR اول ۱ به ۵۰ رقیق شده و به عنوان الگو برای PCR دوم با استفاده از آغازگر دوم آداپتور (AP2) و یک آغازگر دوم اختصاصی ژن (GSP2)، استفاده گردید. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. نتیجه این فرایند به طور کلی یک یا چند باند در هر محصول PCR در هر کتابخانه است.

تخلیص قطعات از ژل و کلونینگ قطعات PCR در وکتور TA

تخلیص باندهای مورد نظر از ژل با استفاده از کیت (Genet Bio k-8000) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس مقدار ۱۰۰ نانوگرم از هر کدام از قطعات تخلیص شده از ژل، در پلاسمید pTG19-T (۵۰ نانوگرم) مربوط به کیت TA (شرکت سیناکلون کد CL5841)، با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده کلون شدند. این پلاسمید دارای ژن *LacZ* برای غربالگری به روش کلونی‌های سفید/آبی و همچنین آغازگرهای M13 برای توالی‌یابی می‌باشد.

انتقال وکتور نوترکیب به باکتری مستعد

ابتدا سلول مستعد باکتری با استفاده از *Escherichia coli* سویه *Top10* تهیه و سپس پلاسمیدهای نوترکیب به روش شوک حرارتی

- 1- GenomeWalker Adaptors
- 2- Gene-specific primer 2
- 3- Gene-specific primer 1

4- Conserved Domain Database

جدول ۲- توالی‌های اولیگونوکلوئیدی، آغازگرهای اختصاصی (GSP) و آغازگرهای آداپتوری (AP) مورد استفاده در این مطالعه

Table 2- Oligonucleotide sequences, gene specific primers (GSP) and adaptor primers (AP) used in this study

نام آغازگر	دمای اتصال	توالی پرایمر ۵'→۳'
Primer name	Tm° C	Primer sequence 5'→3'
548_GSP1	57	CCCATCAGTGGATTCTTGCT
548_GSP2	56	CTAGTGGGATTGGATTTTGATGCC
424_GSP1	56	AGCGCATATAGTAACGCATC
424_GSP2	58	CAACTCCTCCTTTGGCTGTCTC
1635_GSP1	58	AAAAGGGTCATGGTCTGGTG
1635_GSP2	55	GTTTTGGCTTTGATAAGGAGTGCT
3391_GSP1	56	ATCAAAAAGCCGGATGTGTTC
3391_GSP2	56	GCTGAGAAGCAAAGCCACAAAA
AP1	51	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	59	ACTATAGGGCACGCGTGGT
GenomeWalker Adaptor 1	-	CCCGACCA
GenomeWalker Adaptor 2	-	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT

همچنین این آنالیز نشان داد که دو بخش CDSf و CDSI^۳ به ترتیب مربوط به توالی‌های کدکننده با کدون آغاز و کدون پایان به ترتیب در موقعیت (+82-172) و (+528-604) قابل شناسایی هستند. علاوه بر این پیش‌بینی ساختار ژن توالی Oa1635 نشان دهنده وجود سیگنال احتمالی TATA-Box و PolyA به ترتیب در موقعیت +174 و +831 می‌باشد (شکل ۲ و جدول ۳). بررسی همولوژی توالی کامل Oa424 با استفاده از الگوریتم BLASTX همانندی 71.57 درصدی (2e-41) با پروتئین ناشناخته (XP_011081407.1) حاوی دومین ترانسپوزاز را نشان داد. نتایج آنالیز همولوژی با استفاده از الگوریتم‌های BLASTX و BLASTN در جدول ۴ آورده شده است. همچنین آنالیز توالی کامل Oa424 توسط ابزار CDD مربوط به پایگاه NCBI، وجود دومین ترانسپوزازی DDE_Tnp_ISL3 بین فاصله 257 تا 466 جفت باز (7.31e-14) را تایید نمود. با استفاده از ابزار ORFfinder، بلندترین توالی ORF به دست آمد و سپس این توالی با ابزار HMMER مورد ارزیابی قرار گرفت. خروجی بدست آمده کاملاً نتایج آنالیز BLASTX و BLASTN را تایید نمود. نتایج آنالیز همولوژی با استفاده از الگوریتم BLASTX برای توالی Oa1635 همانندی 72.73 درصدی (2e-9) با توالی Retrovirus-related pol polyprotein from transposon tnt 1-94 با شماره دسترسی GFP84907.1 نشان داد (جدول ۴).

رونوشت‌های ناشناخته Oa424 و Oa1635، در مرحله اتصال انگل به میزبان در گیاه انگلی، افزایش بیان را نشان دادند. توالی کامل این رو نوشت‌ها از سمت انتهای ۵ پرایم با استفاده از روش پیمایش ژنوم گسترش داده شد تا نقش این رونوشت‌ها در میانکشی انگل و

لازم به ذکر است در این موارد جداسازی و تخلیص این باندها نیز نتیجه بهتری می‌دهد. بطور کلی در پیمایش ژنوم تکثیر غیر اختصاصی معمول است و باندهای غیر اختصاصی به دلیل تکثیر کمتر در واکنش PCR روی ژل کم‌رنگ تر مشاهده می‌شوند. با توجه به نتایج حاصل، به ترتیب برای رونوشت‌های Oa424 باند حدوداً ۶۰۰ جفت بازی، رونوشت Oa1635 باند ۲۰۰ جفت بازی، رونوشت Oa548 باند حدوداً ۹۰۰ جفت بازی و رونوشت Oa3391 باند حدوداً ۷۰۰ جفت بازی انتخاب و بعد از تخلیص از ژل در وکتور pTG19T کلون شدند. بعد از انجام کلونی PCR، پلاسمیدهای تایید شده pTG19T-424 و pTG19T-1635 توالی‌یابی قرار گرفت. کلونی PCR برای دو رونوشت Oa548 و Oa3391 تایید نشد و برای توالی‌یابی ارسال نشدند.

سرهم کردن توالی کامل با استفاده از ابزار CAP contig assembly، همدیگی ۳۸ جفت باز از قطعه حاصل از پیمایش ژنوم را با قطعه رونوشت Oa424 تایید کرد. در این پیمایش ژنومی ۵۸۷ جفت باز به انتهای 5' توالی Oa424 اضافه گردید. همچنین ۲۲ جفت باز از قطعه حاصل از پیمایش ژنوم با توالی Oa1635 همدیگی گردید و ۱۶۵ جفت باز به انتهای 5' توالی Oa1635 اضافه شد.

پیش‌بینی ساختار ژن و آنالیز انتولوژی توالی‌های کامل Oa1635 و Oa424

نتایج آنالیز توالی Oa424 با استفاده از ابزار Egenesh، حضور سیگنال TSS^۱ مربوط به ناحیه TATA-box و سیگنال PolyA را در موقعیت‌های (+29 و +797) توالی پیش‌بینی نمود.

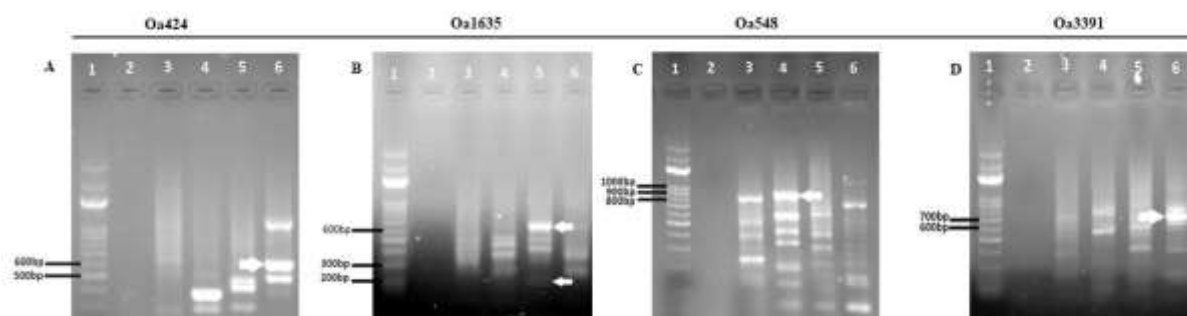
2- Coding DNA sequence

3- Coding DNA sequence _ internal

1- Position of transcription start (TATA-box position and score)

توالی کامل برای هر دو رونوشت، شامل ناحیه TATA-box، ناحیه CDS و سیگنال PolyA بودند.

میزبان مشخص شود. در این روش، به انتهای 5' توالی‌های Oa424 و Oa1635، به ترتیب ۵۸۷ و ۱۶۵ جفت باز اضافه شدند. نتیجه آنالیز

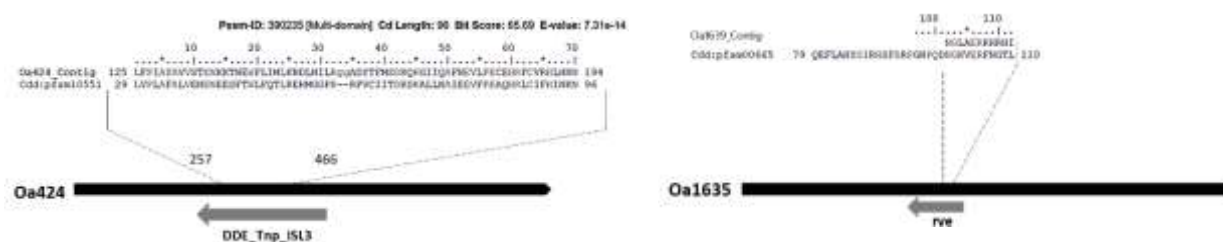


شکل ۱- تکثیر قطعات PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن 424-GSP2، 1635-GSP2، 548-GSP2 و 3391-GSP2 و آغازگر آداپتور AP2 و در PCR مرحله دوم پیمایش ژنومی

چاهک ۱ سایز مارکر 100bp (شرکت دنازیست)، چاهک ۲ کنترل منفی و چاهک ۳ تا ۶ به ترتیب مربوط به تکثیر ناحیه بالادست توالی چهار رونوشت کاندید

Figure 1- Amplification of PCR fragments using specific primers (424-GSP2, 1635-GSP2, 548-GSP2 and 3391-GSP2) and AP2 (nested primer) in the second PCR of genome walking

Lane 1, 100bp DNA ladder (Denazist); Lane 2, negative control, Lane 3-6, second PCR product amplified from the upstream region of the four candidate transcripts



شکل ۲- نمایش شماتیک همردیفی توالی و موقعیت آن در دومین‌های پیش بینی شده توسط ابزار CCD

Figure 2- Schematic representation of sequence alignment and its positions in predicted domains by CCD

جدول ۳- پیش‌بینی ساختار ژن و موقعیت سیگنال توالی‌های Oa1635 و Oa424 با استفاده از ابزار AUGUSTUS

Table 3- Prediction of gene structure and signals position of Oa424 and Oa1635 sequences by AUGUSTUS

نام توالی Sequence name	طول Length	ژن Gene	ترمینال Terminal	کدکننده CDS	کدون پایان Stop Codon	تی‌اس‌اس TSS	سیگنال پلی‌آ PolyA Signal
Oa1635	894	Begin	209	-	209	596	831
		End	598	-	598	598	
		Strand	+	+	+	+	
		Reading frame	.	1	1	0	
Oa424	839	Begin	88	-	88	602	797
		End	604	-	604	604	
		Strand	+	+	+	+	
		Reading frame	.	2	2	0	

DNA و دومین‌های فعال‌سازی رونویسی در ترانسپوزاز Mutator-like ها بسیار حفاظت شده است که احتمالاً نقش فعال‌سازی برخی

با بررسی همولوژی توالی کامل رونوشت Oa424، دامین ترانسپوزاز Mutator-like مشاهده گردید. دومین‌های اتصال به

سلول‌های میزبان و متیلاسیون DNA، پروموتور ژن *E-cadherin* (*CDH1*) را مورد هدف قرار داده و بیان آن را کاهش می‌دهد (Moon et al., 2012). با توجه به نتیجه BLASTX و BLASTN برای رونوشت Oa1635 (جدول ۴)، همولوژی با توالی Retrovirus-related pol polyprotein from transposon tnt 1-94 *Phtheirospermum japonicum* و خانواده Orobanchaceae می‌باشد و دارای نقش ترنسپوزازی می‌باشد. از آنجا که نقش تنظیمی پروتئین‌های دارای دامین ترانسپوزاز Mutator-like مشخص شده است، احتمالاً دو رونوشت Oa1635 و Oa424 در فرایندهای انگلی نقش کلیدی دارند و احتمالاً دارای نقش تنظیمی می‌باشند. در توالی این دو رونوشت ناحیه سیگنال پپتید تشخیص داده شد. پس احتمالاً این دو پروتئین ترشحی می‌باشند و ممکن است در میانکشی گل‌جالیز و میزبان از طریق اندام مکنده ترشح شوند.

ژن‌ها را ایفا می‌کنند (Lin et al., 2007). برای مثال می‌توان به نقش آن‌ها در تنظیم بیوسنتز کلروفیل اشاره کرد (Tang et al., 2012). فقدان یا افزایش بیان ترانسپوزاز DAYSLEEPER در گیاهان آراییدوپسیس منجر به رشد و نمو غیرطبیعی در این گیاه می‌شود. یافته‌های این مطالعه نشان دادند که ترانسپوزازها می‌توانند برای توسعه گیاهی ضروری باشند و بیان ژن را در سطح کلان تنظیم کنند (Bundock and Hooykaas, 2005). رابطه تکاملی بین فاکتورهای رونویسی مخمر مانند *Rcs1p* و *Rbf1p* و ترانسپوزازها و همچنین رابطه تکاملی بین دامین فاکتور رونویسی WRKY-GCM1 و ترانسپوزازها اثبات شد (Aravind et al., 2006). متأسفانه در خصوص نقش ترانسپوزازها در میانکشی انگل-میزبان تا کنون گزارشی ارایه نشده است و تنها مقالات معدودی به نقش ترانسپوزازها در خصوص پاتوژن‌ها اشاره کرده‌اند. برای مثال، ترانسپوزاز باکتری *Acinetobacter baumannii* با عمل بر هسته

جدول ۴- آنالیز همولوژی توالی های Oa1635 و Oa424 با الگوریتم های BLASTX و BLASTN
Table 4- Homology analysis of Oa424 and Oa1635 transcripts by BLASTX and BLASTN algorithms

نام توالی Sequence name	بلاست BLAST	مقدار ای E- value	درصد تطابق Identity %	شماره دسترسی Accession	توضیحات Description
Oa1635	BLASTX	2e-09	72.73	GFP84907.1	Retrovirus-related pol polyprotein from transposon tnt 1-94 [<i>Phtheirospermum japonicum</i>] (Orobanchaceae)
		3e-08	65.91	ABA97652.1	Retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass [<i>Oryza sativa</i> Japonica Group]
	BLASTN	9e-06	72.27	XR_005157610.1	<i>Triticum dicoccoides</i> uncharacterized LOC119325638 (LOC119325638), transcript variant X3, ncRNA
Oa424	BLASTX	3e-05	86.79	XM_023302364.2	<i>Zea mays</i> probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein
		2e-41	71.57	XP_011081407.1	uncharacterized protein LOC105164455 [<i>Sesamum indicum</i>]
	BLASTN	4e-28	55.34	VFQ92043.1	unnamed protein product [<i>Cuscuta campestris</i>]
		1e-38	72.93	XM_011083105.1	<i>Sesamum indicum</i> uncharacterized LOC105164455 (LOC105164455), mRNA
		6e-22	69.07	XM_012975170.1	<i>Erythranthe guttatus</i> uncharacterized LOC105951718 (LOC105951718), mRNA

منابع

- Alakonya, A., Kumar, R., Koenig, D., Kimura, S., Townsley, B., Runo, S., Garces, H.M., Kang, J., Yanez, A., David-Schwartz, R., Machuka, J., & Sinha, N. (2012). Interspecific RNA Interference of SHOOT MERISTEMLESS-Like Disrupts *Cuscuta pentagona* Plant Parasitism. *The Plant Cell* 24(7): 3153-3166. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099994>.
- Aravind, L., Iyer, L. M., Balaji, S., & Babu, M.M. (2006). The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Research* 34(22): 6505-6520. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl888>.

3. Bundock, P., & Hooykaas, P. (2005). An Arabidopsis hAT-like transposase is essential for plant development. *Nature* 436(7048): 282-284. <https://doi.org/10.1038/nature03667>.
4. Chai, M., Zhu, X., Cui, H., Jiang, C., Zhang, J., & Shi, L. (2015). Lily Cultivars Have Allelopathic Potential in Controlling *Orobanchae aegyptiaca* Persoon. *PloS one* 10(11): e0142811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142811>.
5. Delavault, P. (2015). Knowing the Parasite: Biology and Genetics of *Orobanchae*. *Helia* 38(69): 15-29. <https://doi.org/10.1515/helia-2014-0030>.
6. Doyle, J. (1991) *DNA Protocols for Plants*. p. 283-293. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. and Young, J.P.W. (Eds.) *Molecular Techniques in Taxonomy*, Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18.
7. Govindarajulu, M., Epstein, L., Wroblewski, T., & Michelmore, R.W. (2015). Host-induced gene silencing inhibits the biotrophic pathogen causing downy mildew of lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 13(7): 875-883. <https://doi.org/10.1111/pbi.12307>.
8. Gressel, J., Hanafi, A., Head, G., Marasas, W., Obilana, A.B., Ochanda, J., & Tzotzos, G. (2004). Major heretofore intractable biotic constraints to African food security that may be amenable to novel biotechnological solutions. *Crop protection* 23(8): 661-689. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.11.014>.
9. Grimm, S., & Voß-Neudecker, F. (2003). High-purity plasmid isolation using silica oxide. p. 83-87. In N. Casali & A. Preston (Eds.) *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press.
10. Joel, D., Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P., & Rubiales, D. (2007). Biology and management of weedy root parasites. *Horticultural Reviews* 33: 267-349. <https://doi.org/10.1002/9780470168011.ch4>.
11. Koch, A., & Kogel, K.H. (2014). New wind in the sails: Improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology Journal* 12(7): 821-831. <https://doi.org/10.1111/pbi.12226>.
12. Leoni, C., Volpicella, M., De Leo, F., Gallerani, R., & Ceci, L.R. (2011). Genome walking in eukaryotes. *The FEBS Journal* 278(21): 3953-3977. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08307.x>.
13. Li, J.-F., Li, L., & Sheen, J. (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods* 6(1): 1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-1>.
14. Lin, R., Ding, L., Casola, C., Ripoll, D.R., Feschotte, C., & Wang, H. (2007). Transposase-derived transcription factors regulate light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 318(5854): 1302-1305. <https://doi.org/10.1126/science.1146281>.
15. Moon, D.C., Choi, C.H., Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, S.I., Kim, D.S., & Lee, J.C. (2012). Nuclear Translocation of *Acinetobacter baumannii* Transposase Induces DNA Methylation of CpG Regions in the Promoters of E-cadherin Gene. *PloS One* 7(6): e38974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038974>.
16. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: "ultra-competent" cells. *Csh Protoc* 2006(1): 10-1101.
17. Singh, H.P., Batish, D.R., & Kohli, R.K. (2006). *Handbook of Sustainable Weed Management*: Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781482293593>.
18. Tang, W., Wang, W., Chen, D., Ji, Q., Jing, Y., Wang, H., & Lin, R. (2012). Transposase-derived proteins FHY3/FAR1 interact with phytochrome-interacting factor1 to regulate chlorophyll biosynthesis by modulating during deetiolation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24(5): 1984-2000. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.097022>.
19. Tomilov, A.A., Tomilova, N.B., Wroblewski, T., Michelmore, R., & Yoder, J.I. (2008). Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *The Plant Journal* 56(3): 389-397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03613.x>.
20. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10: 57. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.
21. Yang, Z., Wafula, E.K., Honaas, L. A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M., & Der, J.P. (2014). Comparative transcriptome analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Molecular Biology and Evolution* 32(3): 767-790. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu343>.
22. Yoder, J.I., Gunathilake, P., Wu, B., Tomilova, N., & Tomilov, A.A. (2009). Engineering host resistance against parasitic weeds with RNA interference. *Pest Management Science* 65(5): 460-466. <https://doi.org/10.1002/ps.1696>.



Effect of Living and Straw Mulch in Integration with Reduced Doses of Trifluralin on Yield and Yield Components of Dill (*Anethum graveolens* L.)

M. Abbaszadeh¹, R. Amini^{2*}, A. Dabbagh Mohammadi Nassab³

Received: 11-11-2021

Revised: 13-12-2021

Accepted: 27-02-2022

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:

Abbaszadeh, M., Amini, R., & Dabbagh Mohammadi Nassab, A. (2022). Effect of Living and Straw Mulch in Integration with Reduced Doses of Trifluralin on Yield and Yield Components of Dill (*Anethum graveolens* L.). *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 269-283. (In Persian with English abstract)

DOI: [10.22067/JPP.2022.73561.1060](https://doi.org/10.22067/JPP.2022.73561.1060)

Introduction

Integrated weed control in medicinal plants is one of the most important components of sustainable production. The dill seed production could be affected mainly by weed interference because of low competitive ability of this medicinal plant against weeds. So, this study was conducted in order to evaluate the effect of different doses of trifluralin in integration with non-chemical weed control options including living mulch, straw mulch and one time hand weeding on weeds, yield components, grain and essential oil production of dill.

Material and Methods

The study was conducted in Research Field of Agriculture-Jahad in Khoda Afarin County in East Azarbaijan Iran in 2019 as factorial experiment based on randomized complete block design with three replications. The first factor was application of different rates of trifluralin at four levels including 0, 480, 720 and 960 g ai ha⁻¹ of trifluralin herbicide and the second factor was different levels of non-chemical weed control consisted of planting the living mulch of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), planting the living mulch of bitter vetch (*Vicia ervilla* L.), application of wheat straw mulch, one time hand weeding 50 days after emergence of dill and control (without non-chemical weed control). Also the weed-free treatment during whole growth season was considered in the experiment.

Results and Discussion

The results indicated that the interaction effect of herbicide dose × non-chemical weed control method was significant ($p \leq 0.01$) on weed density and biomass. At all non-chemical control levels, increasing the trifluralin dose reduced the weed density and the lowest weed density (2.33 Plant m⁻²) was observed in one time hand weeding and straw mulch treatments. The weed density at all non-chemical control levels decreased compared with that in without non-chemical control. Increasing the trifluralin dose decreased the weed biomass at all non-chemical control levels, and the lowest weed biomass was observed in one time hand weeding treatment + 960 g ai ha⁻¹ of trifluralin (78 g m⁻²) that caused 86% reduction in weed biomass compared with control treatment. At all non-chemical control levels, the weed biomass decreased compared with that in without non-chemical control. Comparison of weed biomass among the different mulch treatments indicated that except in control (0 g ai ha⁻¹ of trifluralin), the weed biomasses were not significantly different under all herbicide doses. The effect of non-chemical control level was significant on plant height, number of umbels per plant and 1000-grain weight of dill. The means comparison indicated that among the non-chemical weed control treatments the greatest plant height (97 cm), number of umbels per plant (31.8) and 1000-grain weight (192.8 g) were obtained in wheat straw mulch application. Also increasing the herbicide dose, improved the number of umbels per plant and 1000-grain weight of dill as the highest values were observed in 960 g ai ha⁻¹ of trifluralin. The interaction effect of herbicide dose × non-chemical weed control method was significant on grain number per plant and grain yield of dill. At all non-chemical control levels, the grain number per plant enhanced by increasing the trifluralin dose.

1, 2 and 3- Post Graduate Student in Weed Science and Professors, Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: r_amine@tabrizu.ac.ir)

Comparing the non-chemical control treatment showed that the highest grain number per plant was observed in straw mulch application treatment and other non-chemical weed control treatments were not significantly different. The all non-chemical weed control treatments increased the grain number per plant compared with that in control treatment. By increasing the trifluralin dose under all non-chemical control treatments the grain yield of dill enhanced. Also the grain yield increased significantly at all non-chemical control treatments compared with those in without non-chemical control and the greatest grain yield of dill was observed in straw mulch application treatment + 960 g ai ha⁻¹ of trifluralin (9842 kg ha⁻¹) that indicated 6% reduction compared with weed free treatment. Also the grain yield in this treatment increased by 89.7% compared with that in without control and 0 g ai ha⁻¹ of trifluralin (weed-infested treatment). The grain yield of dill in one time hand weeding treatment was higher than those in fenugreek and bitter vetch living mulch treatments. Also in living mulch treatments there were no significant difference between dill grain yield of 480 and 720 g ai ha⁻¹ of trifluralin. The effects of herbicide dose and non-chemical weed control treatment were significant on essential oil content and yield of dill. The essential oil content and yield increased by increasing the herbicide dose and the highest essential oil content (1.46%) and yield (110.34 kg ha⁻¹) were observed in 960 g ai ha⁻¹ of trifluralin. The essential oil content and yield increased at all non-chemical control treatments compared with that in without control treatment. The highest essential oil content (1.38%) was obtained in straw mulch treatment that was not significantly different with that in one time hand weeding (1.35%) treatment. The highest essential oil yield (100.6 kg ha⁻¹) was obtained in straw mulch treatment that was not significantly different with that in one time hand weeding (96.43 kg ha⁻¹).

Conclusion

The all non-chemical weed control treatments decreased the weed density and biomass but the hand weeding and straw mulch treatments showed higher efficacy in weed biomass reduction compared with living mulch treatments (fenugreek and bitter vetch). The grain and essential oil production of dill in straw mulch and one time hand weeding treatments were greater than those in fenugreek and bitter vetch living mulch treatments. Therefore, the straw mulch and one time hand weeding could be recommended in integration with reduced doses of trifluralin for sustainable weed management of dill.

Keywords: Biomass, Essential oil, Hand weeding, Integrated weed control, Grain number per plant

مقاله پژوهشی

جلد ۳۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، ص. ۲۸۳-۲۶۹

اثر مالچ زنده و کلش در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین بر عملکرد و اجزای عملکرد شوید (*Anethum graveolens* L.)

مریم عباس زاده^۱ - روح اله امینی^{۲*} - عادل دباغ محمدی نسب^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

چکیده

به منظور بررسی اثر دزهای کاهش یافته علف‌کش تریفلورالین در تلفیق با مالچ زنده و کلش بر علف‌های هرز، عملکرد دانه و اسانس شوید آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی جهاد کشاورزی شهرستان خداآفرین استان آذربایجان شرقی (ایران) در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. فاکتور اول شامل کاربرد مقادیر مختلف علف‌کش تریفلورالین در چهار سطح شامل دز صفر، ۴۸۰، ۷۲۰ و ۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار علف‌کش و فاکتور دوم سطوح مختلف کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز شامل کاشت مالچ زنده شبلیله، مالچ زنده گاودانه و کاربرد مالچ کاه و کلش گندم، یک بار و جین دستی و تیمار عدم کنترل علف‌هرز بود. نتایج نشان داد، کمترین مقدار تراکم علف‌هرز در تیمار یک بار و جین دستی با دز ۹۶۰ گرم ماده موثره علف‌کش در هکتار و تیمار مالچ کلش گندم با دز ۹۶۰ گرم ماده موثره علف‌کش (هر دو به میزان ۲/۳۳ بوته در متر مربع) مشاهده شد که باعث کاهش آلودگی به میزان ۹۶٪ نسبت به تیمار عدم کنترل شد. همچنین کمترین زیست توده علف‌هرز در تیمار یک بار و جین دستی با ۹۶۰ گرم ماده موثره علف‌کش تریفلورالین (به میزان ۷۸/۱ گرم در متر مربع) بدست آمد که نسبت به تیمار عدم کنترل ۸۶٪ کاهش را نشان داد. بالاترین عملکرد دانه در تیمار مالچ کلش گندم با مصرف ۹۶۰ گرم ماده موثره علف‌کش (به مقدار ۹۸۴۲ کیلوگرم در هکتار) حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد عاری از علف‌هرز ۶٪ کاهش نشان داد. همچنین بیشترین عملکرد اسانس شوید در تیمار مالچ کلش گندم (۱۰۰/۶ کیلوگرم در هکتار) بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با تیمار یک بار و جین دستی (۹۶/۴ کیلوگرم در هکتار) نداشت. به طور کلی استفاده از مالچ کلش و یک بار و جین دستی در تلفیق با مقادیر کاهش یافته تریفلورالین، می‌تواند در مدیریت پایدار علف‌های هرز شوید توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، تعداد دانه در بوته، زیست توده، کنترل تلفیقی علف هرز، و جین دستی

مقدمه

زراعی است که در اغلب نقاط جهان کاشته می‌شود. (*graveolens* L. *Anethum*) با نام فارسی شوید یا شبت گیاهی علفی و یکساله است که مصارف مختلفی در صنایع دارویی و غذایی دارد (Rassam et al., 2006, Mozaffarian, 2006). از دانه‌های شوید به عنوان کاهنده چربی به خصوص تری گلسیرید خون، پیشگیری و درمان آترواسکلروز و کولیک‌های صفراوی استفاده می‌شود (Rahimi et al., 2015). یکی از عوامل اصلی کاهش رشد و عملکرد شوید، علف‌های هرز می‌باشند که به دلیل سرعت رشد کم و توان رقابت پایین شوید با علف‌های هرز در مراحل اولیه رشد می‌تواند عملکرد دانه و اسانس و کیفیت محصول را تحت تاثیر قرار دهد (Omidbaigi, 2007). همچنین در کشاورزی پایدار تلاش می‌شود که در تولید گیاهان دارویی اسانس‌دار مثل شوید کمتر از مواد

تمایل به تولید گیاهان دارویی و معطر و تقاضا برای این محصولات به خصوص در شرایط اکولوژیکی در جهان رو به افزایش است (Carrubba et al., 2002). شوید یا شبت گیاهی علفی و یکساله است که مصارف مختلفی در صنایع دارویی و غذایی دارد (Mozaffarian, 2006). جنس *Anethum* در ایران دارای یک گونه

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد آگروتکنولوژی گرایش علوم علف‌های هرز و استادان گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

تبریز

(Email: r_amini@tabrizu.ac.ir)

(*) - نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/JPP.2022.73561.1060

شیمیایی مثل علف‌کش‌ها استفاده شده و تمایل بیشتر به استفاده از روش‌های غیرشیمیایی مثل انواع مالچ وجود دارد (Amini et al., 2020a). از طرف دیگر با توجه به گسترش مقاومت علف‌های هرز به علف‌کش‌ها و اثرات مخرب زیست محیطی ناشی از مصرف آن‌ها، توسعه راهکارهای اکولوژیک، کاهش وابستگی سیستم‌های زراعی به علف‌کش‌ها، استفاده از دز کاهش یافته علف‌کش‌ها به عنوان گزینه‌های کم هزینه برای کنترل علف‌های هرز در جهت کاهش مصرف علف‌کش‌ها، از اولویت‌های کشاورزی پایدار است (Amini et al., 2020a). استفاده از دزهای کاهش یافته علف‌کش‌ها، باعث کاهش آلودگی و عدم تخریب محیط زیست و همچنین افزایش سود خالص کشاورزان شده است (Nazarko et al., Kudsk, 2008). برای کنترل بهتر علف‌های هرز در کنار استفاده از علف‌کش‌ها، روش‌های غیرشیمیایی مثل تغییر توان رقابتی گیاه زراعی در برابر علف‌های هرز (Amini and Yousefi, 2014) و (Amini et al., 2013)، کاربرد انواع مالچ (Amini et al., 2020a) و روش‌های مکانیکی (Caseley et al., 1993) در جهت کاهش دز مصرفی علف‌کش‌ها موثر می‌باشند.

تریفلورالین، نخستین و پر مصرف ترین علف‌کش از خانواده دی نیتروآنیلین‌ها و یکی از مهمترین علف‌کش‌های انتخابی در گیاهان زراعی است. اگر چه تریفلورالین بطور عمده برای کنترل علف‌های هرز در پنبه و سویا استفاده می‌شود، اما امروزه در بیش از ۴۰ گونه زراعی مورد مصرف می‌باشد (Monaco, 2002). تریفلورالین به طور گسترده‌ای به صورت پیش‌رویشی برای کنترل علف‌های هرز باریک‌برگ (Zimdahl, 2018) و پهن برگ (Behgam et al., 2019) در گیاهان زراعی دولپه‌ای به کار می‌رود. همچنین، کارایی تریفلورالین در کنترل علف‌های هرز گیاه دارویی آنیسون (*Pimpinella anisum* L.) نیز تایید شده و این گیاه حتی به دزهای بالاتر از مقدار توصیه شده این علف‌کش نیز تحمل مناسبی نشان داده است (Yousefi et al., 2012). در بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) کاربرد تریفلورالین با دز ۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار به همراه مالچ کلش بیشترین کاهش زیست توده علف هرز و عملکرد اسانس را داشت (Amini et al., 2020a). در زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) و بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) کاربرد تریفلورالین با دز ۷۲۰ گرم ماده موثره در هکتار بیشترین عملکرد اسانس را به دنبال داشت (Ahmadi-Faridi, 2020 Kakavandi et al., 2022). تیمار کاربرد دز ۴۸۰ گرم ماده موثره در هکتار تریفلورالین در گاو زبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) بیشترین عملکرد اسانس را داشت (Sarencheh, 2018).

استفاده از مالچ کلش یک روش غیرشیمیایی در کنترل علف‌های

هرز و هم سو با اهداف کشاورزی پایدار است که می‌تواند به تنهایی و یا در تلفیق با دزهای کاهش یافته علف‌کش در مدیریت علف هرز استفاده شود (Amini et al., 2020a). پوشاندن سطح خاک به طوری که مانع از رسیدن نور به آن شود سبب جلوگیری از جوانه‌زنی بذور و رویش گیاهچه‌های علف‌هرز می‌شود. مالچ کاه و کلش گندم در خاک می‌تواند بانک بذر علف‌های هرز در خاک را کاهش دهد (Gibson et al., 2011). در مطالعه کنترل تلفیقی علف‌های هرز در گاو زبان اروپایی استفاده از علف‌کش‌های تریفلورالین و پندیمتالین منجر به کاهش زیست توده علف‌های هرز شد و استفاده از دز کاهش یافته تریفلورالین (۴۸۰ گرم ماده موثره در هکتار) + مالچ کلش بیشترین کاهش زیست توده علف هرز و عملکرد اسانس گاو زبان را داشت (Sarencheh, 2018). بیشترین عملکرد اسانس زیره سبز در تیمار کاربرد تریفلورالین با دز توصیه شده (۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار) + مالچ کلش مشاهده شد (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022). تلفیق کاربرد علف‌کش تریفلورالین با ۷۵ درصد دز توصیه شده (۷۲۰ گرم ماده موثره در هکتار) با مالچ کلش و یک بار وجین دستی باعث افزایش عملکرد اسانس بابونه آلمانی در مقایسه با تیمار علف‌کش به تنهایی شد. همچنین کاربرد تیمار وجین‌دستی در گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) باعث کاهش زیست توده علف هرز و افزایش عملکرد اسانس گردید (Gity and Raoofy, 2017).

مالچ‌های زنده، گیاهان زراعی پوششی هستند که به صورت مخلوط یا در تناوب با گیاهان زراعی یکساله یا چند ساله کشت می‌شوند (Behgam et al., 2019). مالچ‌های زنده، به دلیل رقابت کمتر نسبت به علف‌هرز با گیاه زراعی و همچنین اثر کنترلی بر روی علف‌هرز، موجب افزایش عملکرد گیاه زراعی می‌شوند (Hiltbrunner et al., 2007). با کاربرد مالچ زنده گندم (*Triticum aestivum* L.) و مالچ کلش گندم در ترکیب با دز کاهش یافته پیریدیت، زیست توده علف‌هرز در نخود (*Cicer arietinum* L.) کاهش یافت و عملکرد دانه در دزهای ۷۲۰ و ۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار (دز توصیه شده)، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (Nosrati et al., 2017). کشت مالچ زنده گاودانه (*Vicia ervilia* L.) در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین باعث کاهش زیست‌توده علف‌هرز و افزایش عملکرد دانه لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گردید (Behgam et al., 2018). همچنین کاربرد شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) به عنوان مالچ زنده در گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) برای کنترل علف هرز نشان داد که شنبلیله می‌تواند زیست‌توده علف هرز را کاهش دهد ولی برای کنترل قابل قبول علف‌هرز در کل دوره رشد باید از روش‌های تکمیلی مثل کاربرد علف‌کش استفاده نمود (Pouryousef et al., 2015).

با توجه به اهمیت کنترل علف‌های هرز در شوید و همچنین لزوم استفاده از روش‌های کنترل غیرشیمیایی سازگار با محیط زیست، می‌توان از مالچ‌های زنده و کلش و همچنین تلفیق آنها با دزهای کاهش یافته علف‌کش در مدیریت تلفیقی علف‌های هرز شوید و کاهش اثرات منفی علف‌کش‌ها در اکوسیستم زراعی استفاده نمود. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر دزهای کاهش یافته تریفلورالین در تلفیق با روش‌های کنترل غیرشیمیایی شامل کاربرد مالچ کلش، مالچ‌های زنده و وجین دستی بر کنترل علف‌های هرز و عملکرد شوید می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در سال ۱۳۹۸ در مزرعه تحقیقاتی جهاد کشاورزی شهرستان خداآفرین استان آذربایجان شرقی با مختصات جغرافیایی ۴۶ درجه و ۴۷ دقیقه طول شرقی و ۳۸ درجه و ۵۳ دقیقه عرض شمالی اجرا شد. اقلیم منطقه معتدل گرم محسوب می‌شود. میانگین نزولات سالیانه در دراز مدت ۳۸۰ میلی‌لیتر گزارش شده است. آنالیز خاک مزرعه قبل از آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه محل آزمایش

Table 1- The physiochemical characteristics of the soil of the experimental field

هدایت الکتریکی EC dS.m ⁻¹	واکنش خاک pH	کربن آلی Organic carbon (%)	نیتروژن N (%)	فسفر P mg/kg	پتاسیم K mg/kg	بافت خاک Soil texture	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)
1.48	7.91	2.66	0.26	41.4	76.5	لوم Loam	48	38	14

جوانه‌زنی بهتر و یکنواخت‌تر انجام شود. بعد از کاشت تیمار مالچ کلش گندم به میزان ۵ تن در هکتار اعمال گردید. تیمار مالچ زنده شنبلیله با تراکم کشت ۴۰ بوته در متر مربع، مالچ زنده گاودانه با متوسط تراکم کشت ۶۰ بوته در متر مربع در بین ردیف‌ها کشت شدند. تیمار وجین دستی علف‌های هرز یک نوبت، ۵۰ روز بعد از کاشت شوید به صورت دستی انجام شد. همچنین در تیمارهای بدون علف هرز بصورت مکرر و تا پایان فصل رشد وجین دستی صورت گرفت تا در طول مدت آزمایش عاری از علف‌هرز بمانند.

نمونه‌برداری علف‌های هرز مزرعه در زمان ۵۰ درصد گلدهی شوید به وسیله کادر ۱ مترمربعی و به صورت تصادفی انجام شد. علف‌های هرز داخل کادر پس از کف بر شدن به آزمایشگاه منتقل شد، گونه‌های علف هرز شناسایی و پس از شمارش، تراکم آنها ثبت شد. جهت اندازه‌گیری زیست‌توده در واحد سطح، بوته‌های علف‌هرز به دستگاه آون در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. پس از ۴۸ ساعت زیست توده علف‌های هرز نیز با ترازوی با دقت ۰/۰۱ توزین شد. از جمله صفات دیگر اندازه‌گیری شده برای علف‌های هرز درصد فراوانی گونه‌های علف هرز بود. درصد فراوانی گونه‌های مختلف علف‌های هرز از معادله زیر محاسبه شد (Amini et al., 2020a):

$$FK = Yi/n * 100$$

FK درصد فراوانی گونه مورد نظر، Yi تعداد کرت‌های که گونه مورد نظر در آن وجود دارد و n تعداد کل کرت‌ها می‌باشد.

برداشت شوید با استفاده از کادر (۱ متر مربع) در کرت‌ها انجام شده و ده بوته از هر کرت انتخاب شده و صفات ارتفاع بوته، تعداد چتر در بوته، تعداد دانه در بوته و وزن هزار دانه اندازه‌گیری شدند. در

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. عامل اول شامل کاربرد علف‌کش تریفلورالین در دزهای صفر، ۴۸۰، ۷۲۰ و ۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار (دز توصیه شده ۲ لیتر در هکتار ترفلان با فرمولاسیون ۴۸٪ EC) و عامل دوم روش‌های کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز، شامل کاربرد مالچ کلش گندم به مقدار ۵ تن در هکتار، مالچ زنده شنبلیله (*Trigonella foenum – graecum* L.) و گاودانه (*Vicia ervilla* L.) وجین دستی یک نوبت ۵۰ روز بعد از کاشت و تیمار عدم کنترل غیرشیمیایی علف هرز بود. علاوه بر این یک تیمار شاهد بدون علف‌هرز در تمام فصل رشد در آزمایش در نظر گرفته شد.

تیمار علف‌کش توسط سمپاش پشتی لانس‌دار شارژی با نازل شره‌ای که در فشار ۲۱۰ کیلوپاسکال با حجم ۲۵۰ لیتر در هکتار کالبره شده بود، صورت گرفت. بعد از سمپاشی بلافاصله توسط شن‌کش، حدود ۷ سانتی‌متر خاک سطحی هر کرت کاملاً مخلوط شد تا علف‌کش با تمامی ذرات خاک اختلاط پیدا کند. بعد از گذشت ۲ روز از تیمار علف‌کش، در تاریخ ۲۰ اردیبهشت ماه بذور شوید با عمق کاشت ۲ تا ۳ سانتی‌متری به صورت دستی کشت گردید. به منظور جلوگیری از آلودگی‌های قارچی، بذور قبل از کاشت با قارچ‌کش بنومیل به نسبت ۲ در هزار ضدعفونی شدند. مساحت هر کرت ۱۵ متر مربع در نظر گرفته شد که هر کرت شامل ۶ ردیف با ۵ متر طول و ۳ متر عرض بود. فاصله بین ردیف‌های کشت ۵۰ سانتی‌متر، فاصله بین بوته‌ها روی ردیف ۱۵ سانتی‌متر، عمق کاشت ۱/۵ سانتی‌متر و در هر کپه تعداد ۴ تا ۶ بذر کاشته شد. قبل از کاشت یک نوبت آبیاری انجام شد و کاشت بذور در خاک مرطوب صورت گرفت (هیرم کاری) تا

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام شد و مقایسه میانگین آنها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد.

نتایج و بحث

ترکیب و فراوانی علف‌های هرز

گونه‌های شناسایی شده در مزرعه و درصد فراوانی آنها در جدول ۲ ارائه شده است. گونه‌های علف هرز از ۶ تیره گیاهی و شامل ۸ گونه بود. بیشترین فراوانی مربوط به گونه‌های اوپارسلام زرد، تربچه وحشی، قیاق و کمترین فراوانی به گونه‌های پنجه مرغی و دم روباهی سبز متعلق بود.

نهایت عملکرد دانه شوید در واحد یک متر مربع اندازه‌گیری و ثبت شد.

برای استخراج اسانس از دانه شوید از دستگاه اسانس گیر (کلونجر) استفاده شد. بدین ترتیب مقدار ۱۰۰ گرم از دانه شوید از هر واحد آزمایشی جهت اسانس گیری آسیاب شده، سپس نمونه‌ها در بالن‌های دو لیتری ریخته شدند و در حدود دو سوم بالن‌ها با آب مقطر پر شدند. عمل اسانس گیری با حرارت دادن در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ ساعت ادامه یافت و در نهایت اسانس خالص جمع‌آوری گردید. درصد و عملکرد اسانس زیره با رابطه‌های زیر محاسبه شدند (Amini et al., 2020a):

$$\text{درصد اسانس (\%)} = \frac{\text{وزن اسانس}}{\text{وزن دانه}} \times 100$$

درصد اسانس × عملکرد بذر (کیلوگرم در هکتار) = عملکرد اسانس

جدول ۲- اسامی علمی، نام عمومی، نام تیره و فراوانی گونه‌های شناسایی شده در مزرعه آزمایشی

Table 2 - Scientific name, common name, family and frequency of weed species identified in the experimental field

ردیف	نام فارسی Persian name	نام علمی Scientific name	نام خانواده Family name	فراوانی (%) Frequency (%)
1	اوپارسلام زرد Yellow nutsedge	<i>Cyperus esculanthus</i> L.	Cyperaceae	100
2	تربچه وحشی Wild radish	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Brassicaceae	98
3	قیاق Johnsongrass	<i>Sorghum halepens</i> L.	Poaceae	97
4	کنگر شیردار Milk thistle	<i>Silybum marianum</i> L.	Asteraceae	91
5	خرفه Common purslane	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	90
6	پیچک صحرایی Field bindweed	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Convolvulaceae	87
7	دم روباهی سبز Green foxtail	<i>Setaria viridis</i> L.	Poaceae	76
8	پنجه مرغی Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i> L.	Poaceae	45

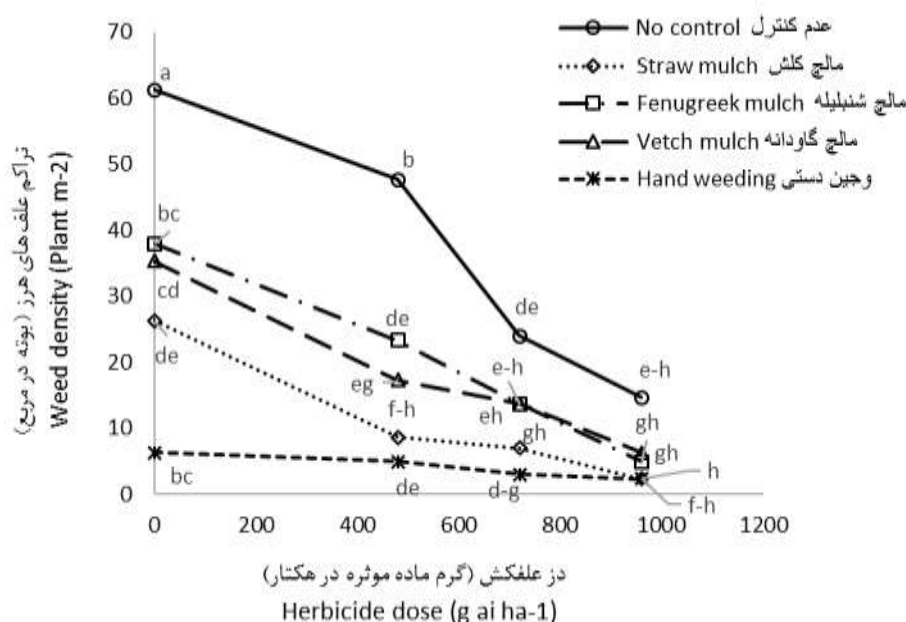
تراکم علف‌های هرز

غیرشیمیایی با افزایش دز علف‌کش، تراکم علف‌های هرز به طور معنی‌دار کاهش یافت ولی میزان این کاهش در تیمارهای کنترلی مختلف، متفاوت بود. بیشترین تفاوت بین دزهای علف‌کش در تیمار عدم کنترل مشاهده شد که تفاوت بین مقدار دزهای صفر، ۴۸۰ و ۷۲۰ گرم ماده موثره در هکتار معنی‌دار بود. تحقیقات قبلی نیز نشان داده است که مالچ کلش، جوانه‌زنی بذر و سبز شدن گیاهچه‌های علف هرز را کاهش داد که دلیل آن جلوگیری از رسیدن نور و همچنین ایجاد مانع فیزیکی برای خروج گیاهچه است (Amini et al., 2020b). در ارزیابی کنترل تلفیقی علف‌های هرز بادرشو گزارش شد که استفاده از

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر متقابل دز علف‌کش در روش‌های غیر شیمیایی کنترل علف‌های هرز بر تراکم علف‌های هرز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱) نشان می‌دهد در بین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، تیمار یک بار وجین دستی و مالچ کلش گندم با دز ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین کمترین تراکم علف‌های هرز را داشت (۲/۳۳ بوته در متر مربع). هر دو تیمار ذکر شده نسبت به تیمار شاهد آلوده باعث ۹۶٪ کاهش تراکم علف هرز شدند. در همه سطوح کنترل

استفاده از مالچ زنده گاودانه در ترکیب با دزهای مختلف علف‌کش ایمازاتاپیر باعث کاهش معنی‌دار در تراکم علف‌های هرز لوبیا در مقایسه با تیمار کاربرد علف‌کش به تنهایی شد (Behgam et al., 2018).

مالچ کلش به تنهایی و در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین و پندیمتالین، باعث کاهش معنی‌دار تراکم علف‌هرز در واحد سطح شد (Amini et al., 2020a). به طور کلی تیمارهای مالچ زنده شنبلله و گاودانه از نظر تراکم علف‌هرز اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند و باعث کاهش تراکم علف‌هرز در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند.



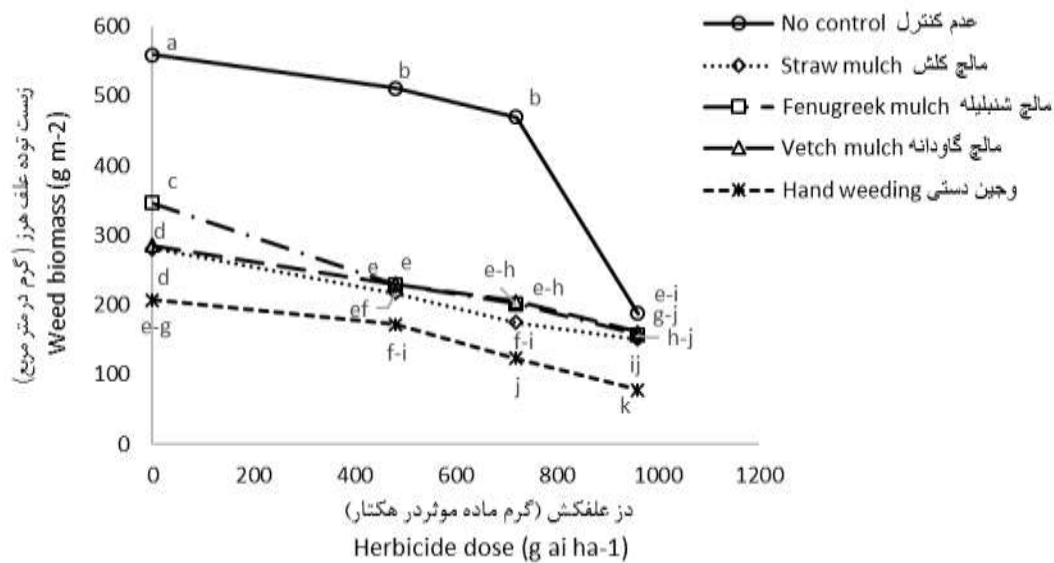
شکل ۱- اثر متقابل دز علف‌کش تریفلورالین در کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز بر تراکم علف‌های هرز در زمان برداشت شوید (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد)

Figure 1- Interaction effect of trifluralin dose × non-chemical weed control on weed density at dill harvesting time (Different letters indicate a significant difference in Duncan test at 5% probability level)

بادرشو شد (Ebrahimi et al., 2019). کاربرد مالچ کلش و کشت مالچ زنده گاودانه در تلفیق با دزهای کاهش یافته ایمازاتاپیر باعث کاهش زیست توده علف‌های هرز لوبیا در مقایسه با تیمار کاربرد علف‌کش به تنهایی شد (Behgam et al., 2018). همچنین در همه سطوح کنترل غیر شیمیایی، با افزایش مقدار دز علف‌کش، زیست توده علف‌های کاهش یافت و در تیمارهای کاربرد مالچ کلش و مالچ زنده گاودانه و شنبلله، زیست توده علف‌هرز در دزهای ۴۸۰ و ۷۲۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار، اختلاف معنی‌داری نداشتند. در کاربرد مالچ کلش گندم در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین در زیره سبز مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین زیست توده علف هرز بین دزهای ۴۸۰ و ۷۲۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار وجود نداشت (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022).

زیست‌توده علف هرز

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر متقابل دز علف‌کش در کنترل غیرشیمیایی بر زیست‌توده علف‌های هرز در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد در بین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، تیمار عدم کنترل بیشترین زیست-توده علف هرز را به خود اختصاص داد (۵۵۹/۲ گرم در متر مربع) و همه تیمارهای کنترل غیرشیمیایی باعث کاهش معنی‌دار زیست‌توده علف هرز نسبت به این تیمار شدند. در بین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، تیمار یک‌بار وجین‌دستی + ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار کمترین زیست‌توده علف‌هرز را داشت که باعث کاهش ۸۶ درصدی زیست توده علف هرز در مقایسه با تیمار شاهد آلوده شد. کاربرد مالچ کلش گندم به تنهایی و در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین باعث کاهش زیست توده علف‌هرز در



شکل ۲- اثر متقابل دز علف‌کش تریفلورالین و تیمارهای کنترل غیرشیمیایی بر زیست توده علف‌های هرز در زمان برداشت شوید (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد)

Figure 2- Interaction effect of trifluralin dose × non-chemical weed control on weed biomass at dill harvesting time (Different letters indicate a significant difference in Duncan test at 5% probability level)

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات علف‌های هرز و شوید تحت تأثیر دز علف‌کش تریفلورالین و کنترل غیرشیمیایی علف هرز

Table 3- Analysis of variance for weeds and dill traits affected by trifluralin dose and non-chemical weed control

		Mean squares				
منابع تغییر S.O.V	درجه ازادی d.f	تراکم علف هرز Weed density	زیست توده علف هرز Weed biomass	ارتفاع بوته Plant height	تعداد چتر در بوته Number of umbel plant -1	تعداد دانه در بوته Grains number plant -1
بلوک Block	2	36.87*	1473.71 *	0.517 ^{ns}	73.35*	9.05*
دز علفکش Herbicide dose (HD)	3	67.92**	21603.02**	65.83**	112.13**	161.64**
کنترل غیرشیمیایی Non-chemical control (NCC)	4	87.56**	12885.24**	3335.27**	72.73**	236.14**
HD × NCC	12	74.22**	27566.98**	40.85 ^{ns}	13.19 ^{ns}	9.02*
خطا Error	38	33.33	1037.97	43.17	14.46	7.07
ضریب اطمینان Coefficient of variation	--	10.43	11.27	7.62	9.55	10.47

ns, *, ** و *** به ترتیب به مفهوم غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

ns, * and **: non -significant and significant at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.

ارتفاع بوته

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثر اصلی دز علف‌کش و کنترل غیرشیمیایی بر ارتفاع بوته در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. اثر متقابل دز علف‌کش در کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز بر ارتفاع بوته شوید معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان می‌دهد، ارتفاع بوته در همه‌ی سطوح کاربرد تریفلورالین،

افزایش معنی‌داری در مقایسه با تیمار عدم کنترل نشان داد. در بین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، تیمار کلش‌گندم بیشترین ارتفاع بوته (۹۷/۴ سانتی‌متر) را داشت که نسبت به تیمار عدم کنترل باعث افزایش ۴۶ درصدی در ارتفاع بوته شوید شد. ارتفاع بوته بین تیمارهای یک بار وجین‌دستی و مالچ زنده شنبلیله، اختلاف معنی‌داری نداشت. تلفیق مالچ کلش‌گندم با دزهای مختلف علف‌کش تریفلورالین باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته زیره سبز در مقایسه با

تیمارهای کاربرد علف کش گردید (Ahmadi-Kakavandi *et al.*, 2022). کاربرد تلفیقی مالچ کلش گندم با دز ۴۸۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار و دز توصیه شده پندیمتالین باعث افزایش معنی دار ارتفاع بوته بادرشو در مقایسه با تیمارهای کاربرد علف کش به تنهایی شد (Ebrahimi *et al.*, 2019). استفاده از دزهای مختلف علف کش تریفلورالین در تلفیق با مالچ کلش گندم باعث افزایش

معنی دار ارتفاع بوته بابونه آلمانی در مقایسه با تیمارهای علف کش بدون مالچ گردید (Faridi, 2020). استفاده از مالچ کلش گندم علاوه بر کاهش تراکم و زیست توده علف هرز می تواند باعث افزایش ذخیره رطوبت خاک و بهبود صفات رشدی گیاه زراعی شود (Duppong *et al.*, 2004, Amini *et al.*, 2020a).

جدول ۴- مقایسات میانگین صفات شوید تحت تاثیر دز علف کش تریفلورالین و کنترل غیرشیمیایی علف هرز
Table 4- The mean comparisons of dill traits affected by trifluralin dose and non-chemical weed control

عملکرد اسانس (کیلوگرم در هکتار)	درصد اسانس (%)	وزن هزار دانه (گرم)	تعداد چتر در بوته	ارتفاع بوته (سانتیمتر)	عملکرد اسانس (کیلوگرم در هکتار)
Essential oil yield (kg ha ⁻¹)	Essential oil content (%)	1000-grain weight (g)	Number of umbel plant ⁻¹	Plant height (cm)	Essential oil yield (kg ha ⁻¹)
0	0.98 ^c	141.6 ^d	20.6 ^b	72.9 ^b	13.92 ^c
480	1.14 ^b	158.8 ^c	26.2 ^a	75.1 ^a	75.08 ^b
720	1.22 ^{ab}	176.7 ^b	26.7 ^a	76.6 ^a	84.12 ^b
960	1.46 ^a	197.1 ^a	28.0 ^a	77.8 ^a	110.34 ^a
عدم کنترل	0.93 ^c	146.6 ^d	19.6 ^c	52.6 ^d	10.65 ^c
No control					
مالچ کلش	1.38 ^a	192.8 ^a	31.8 ^a	97.4 ^a	100.6 ^a
Straw mulch					
مالچ زنده شنبلیله	1.10 ^b	170.6 ^b	24.1 ^b	81.7 ^b	72.05 ^b
Fenugreek living mulch					
مالچ زنده ماشک	1.25 ^b	160.9 ^{cd}	24.5 ^b	67.8 ^c	74.60 ^b
Vetch living mulch					
وجین دستی	1.35 ^a	171.8 ^b	26.8 ^b	78.6 ^b	96.43 ^a
Hand weeding					

برای هر دو عامل، حروف متفاوت در هر ستون، بیانگر اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد می باشد.
For both factors, different letters in each column indicate significant difference at $p \leq 0.05$.

تعداد چتر در بوته

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر اصلی دز علف کش و اثر اصلی کنترل غیرشیمیایی بر تعداد چتر در بوته در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود ولی اثر متقابل دز علف کش در کنترل غیرشیمیایی علف های هرز بر تعداد چتر در بوته شوید معنی دار نبود. مقایسه میانگین ها (جدول ۴) نشان داد که همه تیمارهای کنترل غیرشیمیایی باعث افزایش معنی دار این صفت در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند. در بین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، تیمار مالچ کلش گندم بیشترین تعداد چتر در بوته (۳۱/۸) را داشت که با تیمارهای کنترلی دیگر اختلاف معنی داری داشت. تعداد چتر در بوته در تیمارهای کنترل غیرشیمیایی یک بار وجین دستی، مالچ زنده شنبلیله و مالچ زنده گاو دانه اختلاف معنی داری باهم نداشتند. مقایسه سطوح مختلف کاربرد علف کش نشان داد که همه ی سطوح دز علف کش

باعث افزایش معنی دار تعداد چتر در بوته در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند و تفاوت معنی داری بین دزهای ۴۸۰، ۷۲۰ و ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار مشاهده نشد. کاربرد تلفیقی مالچ کلش گندم با دز توصیه شده (۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار) باعث افزایش معنی دار تعداد چتر در بوته زیره سبز در مقایسه با تیمار کاربرد دز توصیه شده تریفلورالین به تنهایی گردید (Ahmadi-Kakavandi *et al.*, 2022). همچنین استفاده از مالچ کلش گندم در ترکیب با دزهای ۵۰ و ۱۰۰٪ توصیه شده تریفلورالین باعث افزایش معنی دار تعداد گل در بوته گاوزبان اروپایی در مقایسه با تیمارهای کاربرد علف کش به تنهایی شد (Sarencheh, 2018).

تعداد دانه در بوته

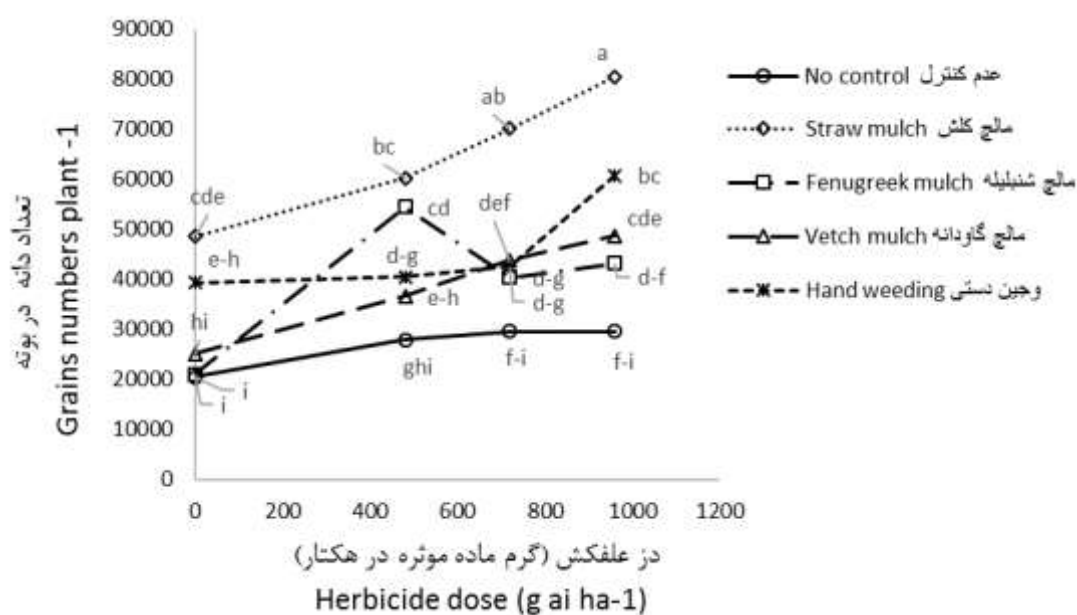
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر متقابل دز

دستی در ترکیب با دزهای مختلف علف‌کش باعث افزایش معنی‌دار در تعداد دانه در بوته لوبیا در مقایسه با تیمار بدون کنترل شد (Behgam et al., 2019). در همه سطوح کنترل غیرشیمیایی به غیر از مالچ زنده شنبلله، با افزایش دز علف‌کش، تعداد دانه در بوته شلید افزایش یافت و تفاوت معنی‌داری در این صفت بین دزهای مختلف علف‌کش، مشاهده نشد.

وزن هزاردانه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان می‌دهد که اثر متقابل دز علف‌کش در کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز بر وزن هزار دانه شلید معنی‌دار نبود ولی اثرات اصلی دز علف‌کش و کنترل غیرشیمیایی بر وزن هزار دانه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد که تیمار مالچ کلش گندم باعث افزایش ۲۳ درصدی در وزن هزار دانه شلید در مقایسه با تیمار بدون کنترل شد. همچنین کاربرد تریفلورالین با دز ۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار باعث افزایش وزن هزار دانه به میزان ۲۸ درصد در مقایسه با تیمار بدون کاربرد علف‌کش (دز صفر) گردید. تیمارهای مالچ زنده شنبلله و یک بار وجین دستی اختلاف معنی‌داری از نظر این صفت با هم نداشتند.

علف‌کش در کنترل غیرشیمیایی علف هرز بر تعداد بذر در بوته شلید در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳) نشان داد که همه تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، باعث افزایش معنی‌دار تعداد دانه در بوته شلید در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند. در بین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی، بیشترین تعداد دانه در بوته تریفلورالین در هکتار مشاهده شد. تیمار مالچ کلش گندم + ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار با تیمار مالچ کلش گندم + ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار از نظر تعداد دانه در بوته اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند. در تیمار کاربرد ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار، استفاده از مالچ کلش باعث افزایش ۱۴۵ درصدی در تعداد دانه در بوته شلید نسبت به تیمار کاربرد علف‌کش به تنهایی شد. همچنین در تیمار بدون علف‌کش، کاربرد مالچ کلش باعث افزایش ۷۴ درصدی این صفت در مقایسه با تیمار عدم کنترل شد. کاربرد علف‌کش تریفلورالین با دز توصیه شده در تلفیق با مالچ کلشی و پلاستیکی باعث افزایش تعداد دانه در بوته زیره سبز در مقایسه با تیمار کاربرد تریفلورالین به تنهایی شد (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022). همچنین استفاده از روش‌های غیرشیمیایی شامل مالچ کلشی، مالچ زنده گاودانه و یک بار وجین



شکل ۳- اثر متقابل دز علف‌کش تریفلورالین در کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز بر تعداد دانه در بوته شلید (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد)

Figure 3- Interaction effect of trifluralin dose × non-chemical weed control on grains number per plant of dill (Different letters indicate a significant difference in Duncan test at 5% probability level)

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس صفات عملکرد دانه و اسانس شوید تحت تأثیر دز علف کش تریفلورالین و کنترل غیرشیمیایی علف هرز

Table 5- Analysis of variance for grain and essential oil yield traits of dill affected by trifluralin dose and non-chemical weed control

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی d.f	Mean squares میانگین مربعات			
		وزن هزار دانه 1000-grain weight	عملکرد دانه Grain yield	درصد اسانس Essential oil content	عملکرد اسانس Essential oil yield
بلوک Block	2	0.02 ^{ns}	80.81 ^{ns}	0.01 ^{ns}	1.04 ^{ns}
دز علف کش Herbicide dose (HD)	3	21.17 ^{**}	282.95 ^{**}	0.22 ^{**}	1.96 ^{**}
کنترل غیرشیمیایی Non-chemical control (NCC)	4	4.41 ^{**}	1285.24 ^{**}	0.17 ^{**}	3.28 ^{**}
HD × NCC	12	0.03 ^{ns}	381.24 ^{**}	0.05 ^{ns}	0.44 ^{ns}
خطا Error	38	0.06	192.08	0.06	0.50
ضریب اطمینان Coefficient of variation	-	9.61	11.52	8.22	9.78

ns و ** به ترتیب به مفهوم غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می باشد.

ns, * and **: non-significant and significant at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.

همچنین عملکرد دانه در این تیمار نسبت به تیمار عدم کنترل و دز صفر علف کش (شاهد آلوده)، ۸۹/۷٪ افزایش یافت. عملکرد دانه شوید در تیمارهای کاربرد مالمسج زنده گاودانه و شنبلیله کمتر از تیمارهای مالچ کلش و یک بار وجین دستی بود. کاهش عملکرد دانه شوید در تیمارهای مالچ زنده گاودانه و شنبلیله را می توان به توانایی کمتر این تیمارها در کاهش زیست توده علف هرز (شکل ۲) و همچنین رقابت آنها با گیاه شوید نسبت داد (Behgam et al., 2019). همچنین تیمار یک بار وجین دستی به علت کاهش زیست توده علف هرز باعث افزایش عملکرد دانه شوید شده است. در تحقیقات قبلی بر روی رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill) مشاهده شد که تلفیق یک بار وجین دستی با دزهای مختلف تریفلورالین و پندیمتالین باعث افزایش عملکرد دانه در این گیاه شد (Rahimi et al., 2015; Amini et al., 2020b). تیمار مالچ کلش گندم هر چند در مقایسه با تیمار یک بار وجین دستی بیومس علف هرز بیشتری دارد ولی احتمالاً به دلیل افزایش ذخیره رطوبتی خاک باعث افزایش رشد و عملکرد دانه شوید گردید. استفاده از تیمارهای مالچی باعث کاهش تلفات رطوبتی شده و افزایش کارایی انتقال مجدد مواد فتوسنتزی ساقه به گل را در پی داشته و در نهایت به افزایش عملکرد محصول کمک می کند (Farokhbakht et al., 2010). همچنین کاربرد مالچ کلش و پلاستیکی در تلفیق با دزهای مختلف علف کش تریفلورالین باعث افزایش عملکرد دانه زیره سبز شد (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022). همچنین گزارش شده است که کاربرد مالچ کلش گندم در تلفیق با دز ۵۰٪ توصیه شده تریفلورالین باعث افزایش عملکرد دانه گل گاوزبان اروپایی در مقایسه با تیمار علف کش

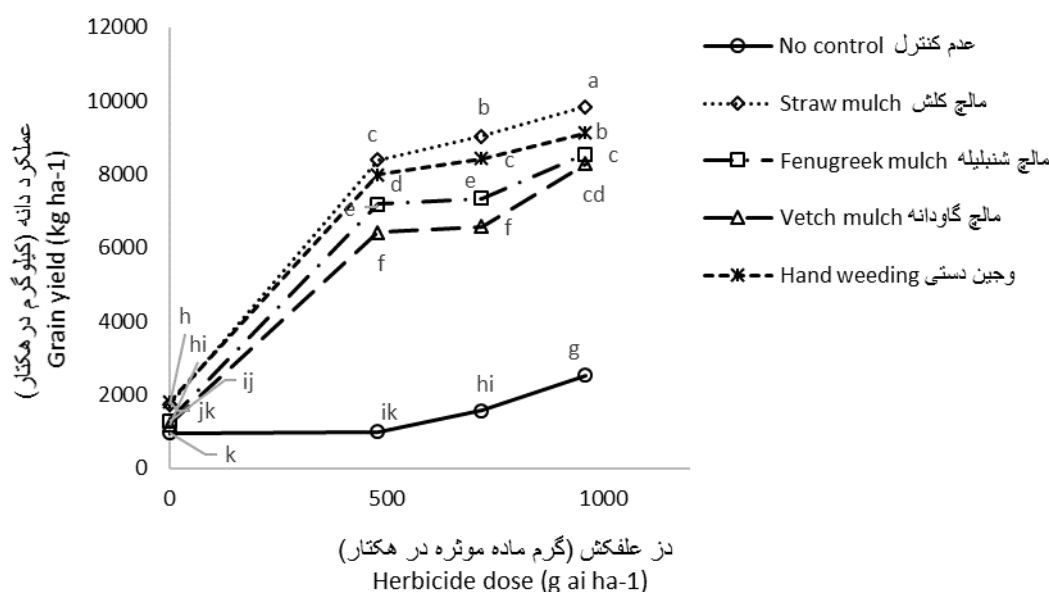
تلفیق مالچ کلش گندم و مالچ پلاستیکی با علف کش تریفلورالین در دزهای مختلف تأثیر معنی داری بر وزن هزاردانه زیره سبز در مقایسه با تیمار کاربرد تریفلورالین نداشت (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022). در صورتی که کاربرد مالچ کلشی، مالچ زنده گاودانه و یک بار وجین دستی در تلفیق با دزهای مختلف علف کش باعث افزایش معنی دار در وزن صددانه لوبیا در مقایسه با تیمار علف کش (به تنهایی) گردید (Behgam et al., 2019). افزایش دز علف کش به طور معنی داری باعث افزایش وزن هزاردانه شوید شد به طوری که بیشترین وزن هزاردانه (۱۹۷/۱ گرم) در تیمار کاربرد دز ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار مشاهده شد (جدول ۴). در زیره سبز نیز افزایش دز علف کش تریفلورالین از ۵۰ به ۱۰۰٪ مقدار توصیه شده آن باعث افزایش معنی دار وزن هزاردانه شد (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022).

عملکرد دانه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که اثرات اصلی دز علف کش و کنترل غیرشیمیایی و اثر متقابل دز علف کش در کنترل غیرشیمیایی علف هرز بر عملکرد دانه شوید در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. مقایسه میانگین ها (شکل ۴) نشان داد که همه تیمارهای کنترل غیرشیمیایی باعث افزایش معنی دار عملکرد دانه در مقایسه با تیمار بدون کنترل شدند. بیشترین عملکرد دانه در تیمار مالچ کلش گندم + ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار (۹۸۴۲ کیلوگرم در هکتار) مشاهده گردید که نسبت به تیمار شاهد عاری از علف هرز (۱۰۴۳۲ کیلوگرم در هکتار) تنها ۶٪ افت عملکرد نشان داد.

زنده در دزهای مختلف علفکش نشان می‌دهد که میانگین زیست توده مالچ زنده سنبله (۴۶۶/۱ گرم در متر مربع) بیشتر از میانگین زیست توده مالچ زنده گاودانه (۴۱۳/۸ گرم در متر مربع) می‌باشد که می‌تواند دلالت بر توان بیشتر سنبله در سرکوب علف‌های هرز و افزایش عملکرد دانه شود در مقایسه با مالچ زنده گاودانه باشد (شکل ۴). هر چند که نتایج مربوط به زیست توده علف‌هرز (شکل ۱) نشان داد که مالچ‌های زنده سنبله و گاودانه از این نظر تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند.

شده است (Sarencheh, 2018). در تحقیقات قبلی نیز بخشی از افزایش عملکرد گیاه زراعی در تیمار کاربرد مالچ کلش به افزایش ذخیره رطوبتی خاک نسبت داده شده است (Amini et al., 2020a, Behgam et al., 2018). در پژوهشی در کنترل علف هرز زیره سبز نیز مشاهده شد که در تیمارهای کاربرد مالچ کلشی و پلاستیکی عملکرد دانه در سطوح ۱۰۰ و ۷۵ درصد دز توصیه شده علف‌کش تریفلورالین تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022). مقادیر میانگین زیست توده مالچ‌های



شکل ۴- اثر متقابل دز علف‌کش تریفلورالین در کنترل غیرشیمیایی علف‌های هرز بر عملکرد دانه شوید (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد)

Figure 4- Interaction effect of trifluralin dose × non-chemical weed control on grain yield of dill (Different letters indicate significant difference in Duncan test at 5% probability level)

(Amini et al., 2020a). مقایسه تیمارهای کنترل غیرشیمیایی نشان داد که تیمار مالچ کلش گندم بیشترین درصد اسانس را داشت (۱/۳۸٪) که با تیمار یک بار وجین دستی تفاوت معنی‌داری از این نظر نداشت. تیمارهای کاربرد مالچ کلش و یک بار وجین دستی به ترتیب باعث افزایش درصد اسانس به میزان ۴۸ و ۴۵ درصد در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند. کاربرد تریفلورالین با دز توصیه شده (۹۶۰ گرم ماده موثره در هکتار) در تلفیق با کاربرد مالچ کلش باعث افزایش معنی‌دار (۱۳٪) در درصد اسانس زیره سبز در مقایسه با تیمار کاربرد تریفلورالین به تنهایی شد (Ahmadi Kakavandi et al., 2022). استفاده از تیمارهای غیرشیمیایی یک بار وجین دستی و مالچ کلش گندم در تلفیق با دزهای مختلف تریفلورالین باعث افزایش درصد اسانس بابونه آلمانی شدند و بیشترین درصد اسانس در تیمار یک بار وجین دستی + دز توصیه شده تریفلورالین حاصل شد (Faridi,

درصد اسانس

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که اثر اصلی دز علف کش و کنترل غیرشیمیایی در سطح احتمال یک درصد بر درصد اسانس شوید معنی‌دار بود و اثر متقابل دز علف‌کش در کنترل غیرشیمیایی علف‌هرز بر این صفت معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد که بیشترین درصد اسانس (۱/۴۶٪) در دز ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با درصد اسانس در دز ۷۲۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار نداشت. کاربرد دزهای ۴۸۰، ۷۲۰ و ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار به ترتیب باعث افزایش ۱۶، ۲۵ و ۴۹ درصدی درصد اسانس نسبت به تیمار بدون کاربرد علف‌کش (دز صفر) شد. در صورتی که در زیره سبز و بادرشو افزایش دز کاربرد تریفلورالین، تاثیر معنی‌داری بر درصد اسانس نداشت (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022).

عملکرد اسانس در این گیاه شد (Gity and Raoofy, 2017). تلفیق کاربرد مالچ کلش گندم با دزهای توصیه شده و کاهش یافته تریفلورالین باعث افزایش معنی‌دار عملکرد اسانس زیره سبز (Ahmadi-Kakavandi et al., 2022) و عملکرد دانه کنجد (Sesamum indicum L.) (Hosseingolizadeh et al., 2022) در مقایسه با تیمارهای کاربرد علف‌کش شد. در بابونه آلمانی تیمار یک بار وجین دستی در ترکیب با دزهای مختلف تریفلورالین عملکرد اسانس بیشتری در مقایسه با تیمارهای ترکیب مالچ کلش گندم با علف‌کش تریفلورالین داشت (Faridi, 2020). در بادرشو نیز تلفیق کاربرد دز توصیه شده تریفلورالین با مالچ کلش گندم باعث افزایش ۱۳ درصدی در عملکرد اسانس بادرشو شد (Amini et al., 2020a).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد همه تیمارهای کنترل غیرشیمیایی باعث کاهش زیست‌توده علف‌های هرز در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند ولی تیمارهای یک بار وجین دستی و مالچ کلش گندم کارایی بیشتری در کاهش زیست‌توده علف‌های هرز در مقایسه با تیمارهای مالچ زنده گاودانه و شنبلیله داشتند. کمترین زیست‌توده علف‌های هرز در تیمار یک بار وجین دستی مشاهده شد ولی عملکرد دانه شوید در تیمار مالچ کلش گندم بیشتر از عملکرد دانه آن در تیمار یک بار وجین دستی بود که این افزایش عملکرد را می‌توان به افزایش ذخیره رطوبتی خاک در حضور مالچ کلش نسبت داد. همچنین عملکرد اسانس شوید در تیمار مالچ کلش گندم و یک بار وجین دستی بیشتر از عملکرد آن در تیمارهای مالچ زنده شنبلیله و گاودانه بود. به طور کلی به منظور مدیریت پایدار علف‌های هرز شوید می‌توان از مالچ کلش گندم و یک بار وجین دستی در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین استفاده نمود. همچنین اگر افت عملکرد تا حدودی برای کشاورز قابل پذیرش باشد می‌توان از مالچ‌های زنده گاودانه و شنبلیله نیز در تلفیق با دزهای کاهش یافته تریفلورالین در کنترل علف‌های هرز شوید استفاده نمود.

2020). همچنین بیشترین درصد اسانس بادرشو در تیمار کاربرد علف‌کش تریفلورالین با دز ۱۲۰۰ گرم ماده موثره در هکتار حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار کاربرد ۶۰۰ گرم ماده موثره در هکتار تریفلورالین و تیمار عاری از علف‌هرز نداشت (Amini et al., 2020a).

عملکرد اسانس در واحد سطح

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد که اثرات اصلی کنترل غیرشیمیایی علف‌هرز و دز علف‌کش بر عملکرد اسانس شوید در واحد سطح در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل دز علف‌کش در کنترل غیرشیمیایی علف‌هرز بر عملکرد اسانس معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد که همه دزهای علف‌کش باعث افزایش معنی‌دار در عملکرد اسانس در مقایسه با تیمار بدون کاربرد علف‌کش شدند و بیشترین عملکرد اسانس (۱۱۰/۳۴ کیلوگرم در هکتار) در تیمار کاربرد ۹۶۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار حاصل شد. همچنین عملکرد اسانس شوید در تیمارهای کاربرد ۷۲۰ و ۴۸۰ گرم ماده موثره تریفلورالین در هکتار، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴). مقایسه میانگین تیمارهای کنترل غیرشیمیایی نشان داد که همه تیمارها باعث افزایش معنی‌دار عملکرد اسانس در مقایسه با تیمار عدم کنترل شدند (به ترتیب افزایش ۸۴۴، ۵۷۶، ۶۰۰ و ۸۰۵ درصدی در تیمارهای مالچ کلش، مالچ زنده شنبلیله، مالچ زنده گاودانه و یک بار وجین دستی در مقایسه با تیمار عدم کنترل). بیشترین عملکرد اسانس (۱۰۰/۶ کیلوگرم در هکتار) در تیمار کاربرد مالچ کلش حاصل شد که تفاوت معنی‌داری از این نظر با تیمار یک بار وجین دستی (۹۶/۴۳ کیلوگرم در هکتار) نداشت. همچنین عملکرد اسانس شوید در تیمارهای مالچ زنده گاودانه و مالچ زنده شنبلیله اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در پژوهش قبلی گزارش شد که عدم کنترل علف‌های هرز می‌تواند عملکرد اسانس بادرشو را تا ۹۰٪ نسبت به تیمار شاهد عاری از علف‌هرز کاهش دهد (Forouzin and Nour-Abadi, 201). همچنین افزایش تراکم و آلودگی علف‌های هرز باعث تخلیه عناصر غذایی از خاک و کاهش میزان رشد در گیاه دارویی نعنای فلفلی شد که در نهایت سبب کاهش

منابع

- 1- Ahmadi-Kakavandi, R., Amini, R., Shakiba, M.R., & Nosratti, I. (2022). Effect of mulch application in integration with reduced rates of trifluralin on weeds and essential oil yield of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 32(2): 161-179. (In Persian with English abstract). <http://dx.doi.org/10.22034/SAPS.2021.45892.2678>.
- 2- Amini, R., Pezhgan, H., & Dabbagh Mohammadi Nasab, A. (2013). Effect of weeds competition on some growth parameters of red, white and pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 3(5): 86-93.
- 3- Amini, R., Pezhgan, H., & Dabbagh Mohammadi Nasab, A. (2014). Evaluating the competitive ability of different common bean genotypes against the weeds. *Iranian Journal of Field Crops Research* 12(3): 491-501. (In Persian)

- with English abstract)
- 4- Amini, R., & Yousefi, A. (2014). Using reduced rates of trifluralin and hand weeding in sustainable weed control of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Agriculture Science and Sustainable Production* 24(2): 95-105. (In Persian with English abstract)
- 5- Amini, R., Mobli, A., & Dabbagh Mohammadi Nasab, A. (2020b). Response of common cocklebur (*Xanthium strumarium* L.) emergence and competition with corn (*Zea mays* L.) to seed burial depth and mulch. *Archives of Agronomy and Soil Science* 66: 679-693.
- 6- Amini, R., Ebrahimi, A., & Dabbagh Mohammadi Nasab A. (2020a). Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) essential oil content and composition as affected by sustainable weed control treatments. *Industrial Crops & Products* 150.112416.
- 7- Behgam, M., Amini, R., & Dabbagh Mohammadi Nassab, A. (2018). Effect of integrated weed control methods on yield and yield components of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Sustainable Agriculture and Production Science* 28(4): 175-190. (In Persian with English abstract)
- 8- Behgam, M., Amini, R., & Dabbagh Mohammadi Nassab, A. (2019). Integrated application of mulch and reduced doses of imazethapyr for weed control in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Iranian Journal of Weed Science* 15(1): 109-124.
- 9- Carrubba, A., La Torre, R., & Matranga, A. (2002). Cultivation trials of some aromatic and medicinal plants in a semi-arid Mediterranean environment. Proceedings of an International Conference on MAP, *Acta Horticulture (ISHS)*, 978(1): 4200-6315.
- 10- Caseley, J.C., Wilson, B.J., Watson, E., & Arnold, G.M. (1993). Enhancement of mechanical weed control by sub-lethal doses of herbicide. *Proceeding 8th EWRS Symposium, Braunschweig, Germany*. 357-364.
- 11- Duppong, L.M., Delate, K., Liebman, M., Horton, R., Romero, F., Kraus, G., Petrich, J., & Chowdbury, P.K. (2004). The effect of natural mulches on crop performance, weed suppression and biochemical constituents of catnip and St. John's wort. *Crop Science* 44(3): 861-869.
- 12- Ebrahimi, A., Amini, R., & Dabbagh Mohammadi Nasab, A. (2019). Integrated weed control of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) using reduced rates of herbicides and straw mulch. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 29(4): 129-144. (In Persian with English abstract)
- 13- Faridi, Sh. (2020). Effect of different herbicide doses integrated with straw mulch in weed control of German chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). M.Sc. Thesis. Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Iran. (In Persian with English abstract)
- 14- Farokhbakht, O., Lorzadeh, Sh., & Khodarahmpour, Z. (2010). Evaluation of effect of integrated weeds control on yield and yield of components of cowpea (*Vigna sinensis* L.) in the North of Khuzestan. *Scientific Journal Control System* 2(6): 1-12. (In Persian with English abstract)
- 15- Forouzin, F., & Nour-Abadi, A. (2011). Evaluating the integrated weed control methods in reduction of environmental effects of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). *National Symposium of Climate Change and its Effect on Agriculture and Environment. Orumiyeh, Iran*.
- 16- Gibson, K.D., Mc Milan, J., Hallett, S.G., Jordan, T., & Weller, S.C. (2011). Effect of a living mulch on weed seed banks in tomato. *Weed Technology* 25(2): 245-251.
- 17- Gity, S., & Raoofy, M. (2017). Yield, essential oil and some morphological characteristics of peppermint (*Mentha piperita* L.) influenced by hand weeding and plant density. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 27(1):14-23. (In Persian with English abstract)
- 18- Hiltbrunner, J., Jeanneret, P., Liedgens, M., Stamp, P., & Streit, B. (2007). Response of weed communities to legume living mulches in winter wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 93-102.
- 19- Hosseingolizadeh, M., Amini, R., & Dabbagh Mohammadi Nassab, A. (2022). Effect of reduced rates of trifluralin in integration with living and straw mulch on weeds and yield of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 32(2): 181-196. (In Persian with English abstract). <http://dx.doi.org/10.22034/SAPS.2021.45765.2673>.
- 20- Kudsk, P. (2008). Optimizing herbicide dose: a straightforward approach to reduce the risk of side effects of herbicide. *Environmentalist* 28(1): 49-55.
- 21- Monaco, T.J., Weller, S.C., & Ashton, F.M. (2002). *Weed science: principles and practices*, 4th edition. John Wiley & Sons, New York.
- 22- Mozaffarian, V. (2006). *Dictionary of Iranian Plant Names*. (Fourth Edition), Contemporary Culture Publications.
- 23- Nazarko, O.M., Van Acker, R.C., & Entz, M.H. (2005). Strategies and tactics for herbicide use reduction in field crops in Canada: A review. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 457-479.
- 24- Nosrati, I., Dabbagh Mohammadi Nassab, A., Shakiba, M.R., & Amini, R. (2017). Evaluating the cultural and physical methods and reduced doses of herbicide in integrated weed control of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 27(3): 78-110. (In Persian with English abstract)
- 25- Omidbaigi R. (2007). *Production and Processing of Medicinal Plants* (vol.2). Astane Ghods Razavi, Mashhad. 438 P. (In Persian).

- 26- Padulosi, S., Leaman D., & Quek, P. (2002). Challenges and opportunities in enhancing and conservation and use of medicinal and aromatic plants. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 9: 243-267.
- 27- Pouryousef, M., Yousefi, A.R., Oveisi, M., & Asadi, F. (2015). Intercropping of fenugreek as living mulch at different densities for weed suppression in coriander. *Crop Protection* 69: 60-64.
- 28- Rahimi, M.R., Yousefi, A.R., Jamshidi, Kh., Pouryousef, M., & Fotovat, R. (2015). The study efficiency of reduced rate of pendimethalin integrated with mulch and hand-weeding in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Plant Protection* 29(4): 521-530. (In Persian with English abstract)
- 29- Rassam, G.H., Ghorbanzadeh, M., & Dadkhah, A. (2006). Effect of planting date and nitrogen on yield and seed components of dill (*Anethum graveolens* L.) in Shirvan region. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 13(3): 1-9. (In Persian)
- 30- Sarencheh, S. (2018). Evaluating the application efficiency of different herbicides rates integrated with straw mulch and hand weeding in weed control of Borage (*Borago officinalis* L.). M.Sc. Thesis. Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. Iran. (In Persian with English abstract)
- 31- Yousefi, A.R., Pouryousef, M., Osanloo, Z., & Inaloo, A. (2012). Response of grass and broad-leaf weeds to different rate of trifluralin: implementation for weed control in anise (*Pimpinella anisum* L.). p 397. *Proceedings of National Congress on Medicinal Plants. Kish Island, Iran*,
- 32- Zand, A., Rahimian Mashhadi, H., Kouchaki, A., Khalqani, J., Mousavi, K., & Ramezani, K. (2004). *Weed Ecology*. Publications University of Mashhad.
- 33- Zimdahl, R.L. (2018). *Integrated Weed Control for Sustainable Agriculture*. Burleigh Dodds Science Publishing Limited. Cambridge, UK.



Evaluating the Effect of Mixing Clopyralid with Oxadiazon and Oxadiargyl on Control of Broadleaf Weeds in Rapeseed (*Brassica napus* L.)

A. Rashidi¹, E. Elahifard^{2*}, M.H. Tabib³

Received: 01-12-2021

Revised: 11-12-2021

Accepted: 18-12-2021

Available Online: 21-09-2022

How to cite this article:Rashidi, A., Elahifard, E., & Tabib, M.H. (2022). Evaluating the Effect of Mixing Clopyralid with Oxadiazon and Oxadiargyl on Control of Broadleaf Weeds in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Iranian Plant Protection Research* 36(2): 285-299. (In Persian with English abstract)DOI: [10.22067/JPP.2021.73906.1066](https://doi.org/10.22067/JPP.2021.73906.1066)

Introduction

Rapeseed is one of the most important crops cultivated for oil extraction and has the highest annual growth rate (in terms of production) among the essential oilseeds in the world. Due to its slow growth rate, the rapeseed plant has little competitive ability against weeds in the early growing season, which causes it to be severely damaged by weed interference. Since the long-term presence of weeds in rapeseed could reduce its quality and yield, early weed control is essential to achieve economically acceptable yields.

Materials and Methods

In order to control broadleaf weeds in rapeseed fields, a factorial experiment based on a randomized complete block design with three replications was conducted in winter 2019 in Benvar Nazer region, Andimeshk county, Iran. The experimental factors included two types of rapeseed hybrids (Hayola 50 and Agamax) and clopyralid herbicide (1.5 L ha⁻¹ recommended dose, EC30%, Aryashimi, Iran) application with a fixed dose of 1 lit ha⁻¹ for all treatments along with oxadiazon herbicide (recommended dose of 3 L ha⁻¹ for using in rice as pre-plant before the two leaved barnyard grass, EC12%, Shimagro company, Iran) at doses of 100, 175, and 200 ml ha⁻¹, and oxadiargyl herbicide (recommended dose of 3-3.5 L ha⁻¹ for using in rice as pre-emergence or at the beginning of weed emergence in transplanted rice, SC3%, Herbicide Production Company, Iran) with doses of 100, 125, and 150 ml ha⁻¹. Weedy and weeding control (complete control by manual weeding) were considered as control treatments. Herbicides were applied by a 12 liter back sprayer equipped with a TJET 11003 nozzle, which was calibrated for spraying 200 liters per hectare, in the initial 2-leaf stage to the beginning of 4 true leaves for chemical control of weeds in the plots. The grass weeds were removed by hand. Broadleaf weeds were counted separately according to the weed species at before spraying, three and six weeks after spraying and were cut at the soil surface and dried at 70 °C in oven. Then, weed dry weight was measured with a digital scale 0.01 and the percentage reduction in density and dry weight of weeds were calculated. In addition, the amount herbicides used on rapeseed was visually assessed using the EWRS standard table. Then, yield and yield components of rapeseed including number of siliques, seed no. per silique, 1000-seed weight, seed yield, biological yield and harvest index were measured.

Results and Discussion

Results showed that the predominant weed species in the experimental plots included wild clover, queen anne's lace, mallow, *Anagalis* spp., wild mustard, and field bindweed, which the highest frequency (31.29%) belonged to wild clover and the lowest frequency (1.03%) belonged to field bindweed. The ANOVA results showed that the reduction percentage of density and dry weight of weeds and seed yield were affected by

1- M.Sc. Degree Graduate in Weed Science, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Bavi, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Bavi, Iran

(*- Corresponding Author Email: e.elahifard@asnrukh.ac.ir)

3- Plant Protection Management Administration, Jihad Agricultural Organization of Khuzestan, Ahvaz, Iran

experimental treatments; as the treatments of clopyralid + oxadiazon 100, clopyralid + oxadiazon 175, clopyralid + oxadiargyl 125 in Hyola50 hybrid and clopyralid + oxadiazon 175 in Agamax hybrid reduced the density and dry weight of weeds by 100%. While, the lowest reduction percentage of weed density and dry weight (44.74 and 55.33%, respectively) was observed in Agamax hybrid and clopyralid (1 L ha^{-1}) treatment. Also, the highest and lowest herbicide injury on weeds were observed in clopyralid+oxadiazon 100 (9.67%) and clopyralid alone and combination of clopyralid+oxadiargyl 100 and 150 in Agamax hybrid (0%), respectively. The highest seed yield, biological yield and 1000-seed weight of rapeseed were observed in clopyralid+oxadiazon 200, oxadiargyl 125 and 150 ($3377.6 \text{ kg ha}^{-1}$, 11295 kg ha^{-1} , and 3.27 g , respectively), and the lowest was observed in weedy control treatment ($2064.2 \text{ Kg ha}^{-1}$, 7458 Kg ha^{-1} and 2.87 g). 1000-seed weight is less affected by treatments and is a genetic trait. The highest and lowest number of seeds per silique under the influence of herbicide treatment were related to clopyralid+oxadiazon 175 and clopyralid+oxadiargyl 100 (23.33 and 18.17), respectively. An increase in the number of seeds per silique was observed with increasing the dose of herbicide oxadiazon in combination with clopyralid up to 175 ml ha^{-1} . The highest number of siliques per plant was obtained in weeding treatment in Agamax hybrid with 189.33 silique per plant, which was significantly different from weedy control treatment. Also, the lowest number of weed control silique was obtained with Hayola 50 hybrid, which was not significantly different from clopyralid+oxadiazon 100 in Agamax hybrid.

Conclusion

According to the results, mixing herbicides is a solution to eliminate the competition of weeds with rapeseed and increase the yield so that the yield of up to 3.3 tons is obtained, which compared to clopyralide only as a control treatment. In general, the highest yield of rapeseed from plots treated with clopyralid+oxadiazon 200, oxadiargyl 125, and 150 were the best treatment in comparison with the applied treatments. The best treatment is the one in which rapeseed yield has been the highest. In addition, since clopyralid is a selective herbicide in rapeseed, it did not have sufficient efficacy due to poor control of important weeds such as wild mustard. It should also be noted that further testing of the above herbicide mixtures on rapeseed fields throughout the country is necessary in order to obtain the results that are the basis for recommending these mixtures in rapeseed.

Keywords: Rapeseed hybrid, Weed density and dry weight reduction, Yield

بررسی اثر اختلاط علف‌کش کلوپیرالید با علف‌کش‌های اگزادیازون و اگزادیارجیل بر کنترل علف‌های هرز پهن برگ کلزا (*Brassica napus* L.)

امین رشیدی^۱ - الهام الهی فرد^{۲*} - محمدحسین طبیب^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷

چکیده

تنوع اندک و عدم کارایی کافی علف‌کش‌های ثبت شده برای کنترل علف‌های هرز پهن‌برگ در مزارع کلزا در کشور، بررسی کارایی علف‌کش‌های جدید یا علف‌کش‌های سایر محصولات در کلزا، امری ضروری است. به منظور کنترل علف‌های هرز پهن‌برگ مزارع کلزا آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو نوع هیبرید کلزا (هایولا ۵۰ و آگامکس) و مصرف علف‌کش‌های کلوپیرالید با دُز یک لیتر در هکتار به تنهایی و همراه با علف‌کش‌های اگزادیازون با دُزهای ۱۰۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میلی‌لیتر در هکتار و نیز اگزادیارجیل با دُزهای ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌لیتر در هکتار و شاهد آلوده به علف هرز و شاهد بدون علف هرز (کنترل کامل توسط وجین دستی) در زمستان سال ۱۳۹۸ در منطقه بنوار ناظر از توابع شهرستان اندیمشک، استان خوزستان، انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که درصد کاهش تراکم و وزن خشک علف‌های هرز و عملکرد دانه تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت؛ به‌طوری‌که تیمارهای کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰، کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵، کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ در هیبرید هایولا ۵۰ و کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ در هیبرید آگامکس، تراکم و وزن خشک علف‌های هرز را به میزان ۱۰۰ درصد کاهش دادند. درحالی‌که کمترین درصد کاهش تراکم و وزن خشک علف‌های هرز (به ترتیب ۴۴/۷۴ و ۵۵/۳۳ درصد) در تیمار کلوپیرالید (یک لیتر در هکتار) در هیبرید آگامکس مشاهده شد. همچنین، بیشترین گیاهسوزی علف‌کش روی کلزا (۹/۶۷ درصد) در تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ در هیبرید آگامکس مشاهده شد. بیشترین عملکرد دانه (۳۳۷۷/۶ کیلوگرم در هکتار)، عملکرد بیولوژیک (۱۱۲۹۵ کیلوگرم در هکتار) و وزن هزار دانه کلزا (۳/۲۷ گرم) به ترتیب تحت تأثیر تیمارهای کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰، اگزادیارجیل ۱۲۵ و ۱۵۰ و کمترین عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و وزن هزار دانه کلزا مربوط به شاهد آلوده به علف‌هرز (۲۰۶۴/۲، ۷۴۵۸ کیلوگرم در هکتار و ۲/۸۷ گرم) بود. به طور کلی، با توجه به حصول بیشترین عملکرد کلزا از کرت‌های تیمار شده با کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰، اگزادیارجیل ۱۲۵ و ۱۵۰، این تیمارها بهترین تیمار در مقایسه با تیمارهای اعمال شده بود. ضمناً از آن‌جا که کلوپیرالید علف‌کش اختصاصی کلزا است به دلیل کنترل ضعیف علف‌های هرز مهمی مانند خردل وحشی، کارایی مناسبی نداشت.

واژه‌های کلیدی: تراکم و وزن خشک علف‌های هرز، عملکرد، هیبرید کلزا

مقدمه

کلزا با نام علمی (*Brassica napus* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که در سطح دنیا جهت استخراج روغن کشت می‌شود و از بیشترین میزان رشد سالانه (از نظر میزان تولید) در بین گیاهان دانه روغنی مهم جهان برخوردار است (Al-Barrak, 2006). این محصول در بین دانه‌های روغنی جهان بیشترین رشد را در دهه‌های اخیر داشته و امروزه مقام سوم را پس از سویا (*Glycine max* (L.) Merr. و نخل روغنی (*Elaeis guineensis* Jacq) در

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اگروتکنولوژی، علوم علف‌های هرز، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، باوی، ایران
- ۲- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، باوی، ایران (Email: e.elahifard@asnrukh.ac.ir)
- ۳- اداره مدیریت حفظ نباتات، سازمان جهاد کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران

علف‌های هرز زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) به خود اختصاص دادند. نتایج آزمایشی نشان داد که علف‌کش اگزادیازون بعد از آبیاری اول می‌تواند به طور معنی‌داری باعث کاهش علف‌های هرز و افزایش عملکرد گیاه زراعی پیاز (*Allium cepa* L.) شود (Ghosheh, 2004). نتایج آزمایش جمال و چستر (Jamal and Chester, 2006) نشان داد که هر دو علف‌کش اکسی‌فلورفن و اگزادیازون بسیار انتخابی بودند و برای کنترل علف‌های هرز مرزنجوش (*Origanum syriacum* L.) بسیار موثر بودند.

یعقوبی (Yaghoubi, 2015) با مطالعه کنترل شیمیایی علف‌هرز گوشاب (*Potamogeton nodosus* Poir.) و سوروف (*Echinochloa crus-galli* L.) در شالیزار گزارش کرد که علف‌کش اگزادیاژیل به میزان ۹۰-۷۵٪ و ۴۵-۳۵٪ به ترتیب منجر به کنترل سوروف و گوشاب گردید. براساس گزارش شیمی و همکاران (Shimi et al., 2014) در ۰/۸ لیتر ماده تجاری در هکتار از علف‌کش لونتول (کلوپیرالید) بر روی درصد کاهش تراکم پنی‌رک تأثیری نداشت ولی در پایان فصل از نظر کاهش وزن خشک، این علف‌هرز را ۵۲ درصد کنترل نمود. یک لیتر در هکتار لونتول و واچ (برند تجاری دیگر کلوپیرالید) توانستند درصد کاهش تراکم و وزن خشک پنی‌رک را ۵۰ درصد کنترل نماید. مقادیر بالاتر این دو ماده تجاری کلوپیرالید نتوانستند تأثیر بیشتر روی کنترل پنی‌رک بگذارند. نتایج آزمایش عسکری و همکاران (Askari et al., 2012) نشان داد که بالاترین عملکرد و اجزای عملکرد دانه کلزا و پایین‌ترین شاخص‌های علف‌های هرز در تیمار کاربرد کلوپیرالید ۳۰۰+ سیکلوکسیدیم و پس از آن تیمار کاربرد کلوپیرالید ۳۰۰+ هالوکسی فوپ-آر-متیل حاصل گردید.

از آنجایی که تعیین موثرترین علف‌کش در شرایط اقلیمی ایران جهت توصیه مصرف و ترویج در بین کشاورزان و حذف سموم با تأثیر کمتر، ضروری به نظر می‌رسد و نظر به اینکه کلزا از محصولات استراتژیک کشور به شمار می‌رود، این گونه تحقیقات زمینه‌های لازم را برای رفع برخی از محدودیت‌های توسعه کشت هموار خواهد ساخت. لذا به علت تنوع اندک و عدم کارایی کافی علف‌کش‌های ثبت شده برای کنترل علف‌های هرز به‌ویژه پهن‌برگ‌ها در مزارع کلزا در کشور، بررسی کارایی علف‌کش‌های جدید یا علف‌کش‌های سایر محصولات در کلزا، امری ضروری است. در این آزمایش با توجه به محدودیت کنترل برخی علف‌های هرز توسط علف‌کش‌های رایج کلزا در استان خوزستان استفاده از علف‌کش‌های اگزادیازون و اگزادیاژیل به صورت اختلاط با کلوپیرالید در دو هیبرید کلزای هایولا ۵۰ و آگامکس^۱ به عنوان هدف پژوهش در نظر گرفته شد.

فراورده‌های روغن گیاهی احراز کرده است (Berry and Spink, 2006). گیاه کلزا به دلیل سرعت رشد و نمو کند در اوایل فصل رشد توانایی رقابتی اندکی در مقابل علف‌های هرز دارد و همین امر سبب می‌شود که از تداخل علف‌های هرز آسیب فراوانی ببیند. از آنجایی که حضور طولانی مدت علف‌های هرز در کلزا می‌تواند باعث کاهش کیفیت و عملکرد آن گردد، بنابراین کنترل زود هنگام علف‌های هرز برای رسیدن به عملکرد قابل قبول اقتصادی، امری بسیار ضروری است (Naylor and Lutman, 2002). مهار علف‌های هرز در زراعت کلزا می‌تواند ۶/۸ تا ۹/۵ درصد عملکرد محصول را افزایش دهد. براساس تحقیقات انجام شده، ۷۰ درصد علف‌های هرز مزارع کلزای ایران را علف‌های هرز پهن‌برگ و ۳۰ درصد آنها را باریک‌برگان تشکیل می‌دهند (Dastorani et al., 2018). بر اساس مطالعات انجام شده وجود علف‌های هرز خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.) و سلمه‌تره (*Chenopodium album* L.) موجب کاهش عملکرد دانه کلزا به میزان ۲۰ درصد می‌شود (Blackshaw, 2002). حضور ۱۰ بوته خردل وحشی در هر مترمربع از کشت کلزا، کاهش ۲۰ درصدی عملکرد دانه و حضور ۵ درصدی بذور خردل وحشی در محصول کلزای برداشت شده، بالا رفتن اسید اروسیک و گلیکوزینولات در روغن استحصال شده را به همراه داشت. افزایش تراکم خردل به ۲۰ بوته در مترمربع میزان خسارت را به میزان ۳۶ درصد افزایش می‌دهد.

در حال حاضر، برای کنترل علف‌های هرز کلزا، به طور عمده از علف‌کش‌های تریفلورالین (ترفلان)، کلوپیرالید (لونتول) و یک باریک برگ‌کش به نام هالوکسی فوپ آر متیل استر (گالانت سوپر) استفاده می‌شود که هیچ‌کدام قادر به کنترل کامل علف‌های هرز هم‌خانواده کلزا مانند خردل وحشی و انواع خاکشیر (*Descurainia sophia* Webb ex Prantl) و سایر علف‌های هرز مانند پنی‌رک (*Malva* spp.) نیستند (Tabib et al., 2019). امروزه کاهش مصرف علف‌کش‌ها یکی از اهداف اساسی مدیریت علف‌های هرز می‌باشد که در این بین می‌توان به روش‌های مختلفی چون دُزهای خرد شده علف‌کش، تکنولوژی‌های جدید در کاربرد علف‌کش، کاربرد نواری علف‌کش، استفاده از مواد افزودنی و مخلوط علف‌کش‌ها اشاره نمود (Kudsk and Striebig, 2003).

دو علف‌کش اگزادیازون (رونستار) و اگزادیاژیل (تاپ‌استار) از علف‌کش‌های رایج در شالیزارهای برنج می‌باشند که طیف علف‌های هرز هدف آن‌ها به‌ویژه دو خانواده Brassicaceae و Malvaceae با مزارع کلزا مشترک می‌باشد (Mehdinejad et al., 2011; Musavi, 2013). نتایج تحقیقات دستورانی و همکاران (Dastorani et al., 2018) نشان داد در بین تیمارهای مختلف علف‌کش‌ها، اتالفلورالین و اگزادیازون به ترتیب با ۹۷/۴۰ و ۸۴/۳۱ درصد نسبت به تیمار عدم کاربرد علف‌کش، بیشترین کاهش را در وزن خشک

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۸ در منطقه بنوار ناظر از توابع شهرستان اندیمشک با طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۱۷ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۳ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۰۸ متر از سطح دریا اجرا شد. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل انجام آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است.

آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو نوع هیبرید کلزا شامل هایولا ۵۰ (رقم هیبرید بهاره زودرس (Askari et al., 2012)) و آگامکس (رقم هیبرید، دوصفر با عملکرد دانه بالا، خیلی زودرس و مقاوم به ورس) و مصرف علف‌کش‌های کلوپیرالید (دز توصیه شده به میزان ۱/۵ لیتر در هکتار برای کلزا به صورت پس رویشی، SL30%، شرکت آریا شیمی)، اگزادیازون (دز توصیه شده به میزان ۳ لیتر در هکتار برای مصرف در برنج (Oryza sativa L.) به صورت پیش کاشت تا قبل از دو برگ شدن سوروف، EC12%، شرکت شیماکرو) و اگزادیارجیل (دز توصیه شده به میزان ۳-۳/۵ لیتر در هکتار برای مصرف به صورت پیش رویش یا در شروع رویش علف‌های هرز در برنج نشایی، SC3%، شرکت تولید سموم علف‌کش) (Musavi, 2013) در هفت سطح و شاهد آلوده به علف‌هرز و شاهد بدون علف‌هرز کنترل کامل (وجین دستی) بود. تیمارهای علف‌کشی عبارت بودند از کلوپیرالید، اگزادیازون و اگزادیارجیل که به صورت کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار + اگزادیازون ۱۰۰ میلی‌لیتر در هکتار، کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار + اگزادیازون ۱۷۵ میلی‌لیتر در هکتار، کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار + اگزادیازون ۲۰۰ میلی‌لیتر در هکتار، کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار + اگزادیارجیل ۱۰۰ میلی‌لیتر در هکتار، کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار + اگزادیارجیل ۱۲۵ میلی‌لیتر در هکتار، کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار + اگزادیارجیل ۱۵۰ میلی‌لیتر در هکتار و کلوپیرالید ۱ لیتر در هکتار به عنوان شاهد.

قبل از کشت به منظور تهیه زمین ابتدا ماکار و پس از گاورو شدن توسط گاواهن برگردان‌دارشخم زده شد و سپس دو دیسک و پس از آن جهت انجام تسطیح نسبی از لولر (ماله) استفاده شد. پس از انجام عملیات تهیه بستر، طرح مورد نظر در قطعه زمینی به مساحت ۱۲۰۰ متر مربع شامل ۵۴ کرت (۱۸ تیمار در ۳ تکرار) اجرا شد. ابعاد هر کرت به طول ۴ و عرض ۲ متر بود و فاصله بین کرت‌ها یک خط نکاشت به عرض ۷۵ سانتیمتر بود. در هر کرت پنج پشته ۷۵ سانتیمتری در نظر گرفته شد و روی هر پشته نیز ۳ خط کاشت انجام شد. فاصله بین ردیف‌های روی هر پشته ۲۵ سانتی‌متر و فاصله بین بلوک‌ها نیز ۱/۵ متر در نظر گرفته شد. اختصاص تیمارها در هر بلوک

و کرت به صورت تصادفی انجام شد.

جهت عملیات کشت از دستگاه دانه‌ریز کار مدل SABALAN NT150 ساخت شرکت ماشین بذرکار همدان استفاده شد. بذر مصرفی جهت کاشت ۸ کیلوگرم توسط دستگاه کارنده تنظیم گردید. همچنین، جهت اعمال تیمارهای علف‌کش، ترکیبات علف‌کش به وسیله سمپاش کتابی پستی اهرمی ۱۲ لیتری مجهز به نازل سبز به شماره P1 8800704، که برای پاشش ۲۰۰ لیتر در هکتار کالیبره شده بود در مرحله ۲ برگ اولیه تا ابتدای ۴ برگ حقیقی به منظور کنترل شیمیایی علف‌های هرز در کرت‌های مورد نظر اعمال شدند و علف‌های هرز کشیده برگ به صورت دستی وجین شدند.

بر اساس نتایج آزمون خاک، کوددهی برای کلزا به صورت ۲۵۰ کیلوگرم کود نیتروژن از منبع اوره، ۱۵۰ کیلوگرم فسفر از منبع سوپرفسفات تریپل و ۱۵۰ کیلوگرم پتاس از منبع سولفات پتاسیم انجام شد. تمامی کودهای فسفر و پتاسیم در زمان کاشت و کود نیتروژن به مقدار ۱۰۰ کیلوگرم در مرحله کاشت، ۱۵۰ کیلوگرم به صورت سرک در زمان رشد سریع به خاک داده شدند.

علف‌های هرز پهن‌برگ قبل از سمپاشی، سه و شش هفته بعد از سمپاشی با توجه به گونه علف‌هرز به تفکیک شمارش شد. برای تعیین وزن علف‌های هرز، در هر کرت با حذف اثرات حاشیه‌ای، کوادراتی به ابعاد یک در یک متر از وسط هر کرت جدا شده و علف‌های هرز واقع در این کوادرات برداشت و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند، سپس وزن خشک آن‌ها با ترازوی دیجیتالی ۰/۰۱ اندازه‌گیری شد. سپس، درصد کاهش تراکم و درصد کاهش وزن خشک علف‌های هرز محاسبه شد (Zand et al., 2014). ضمناً میزان خسارت علف‌کش‌های به کار برده شده بر روی کلزا به صورت چشمی با استفاده از جدول استاندارد EWRS^۱ برآورد شد (Zand et al., 2014).

جهت اندازه‌گیری اجزاء عملکرد از کل بوته‌های برداشت شده از هر کرت به مساحت یک مترمربع تعداد ۵ بوته به صورت تصادفی انتخاب شد و سپس به ترتیب تعداد دانه در خورجین در هر کرت به صورت تصادفی انتخاب گردید و پس از شمارش تعداد بذور موجود در آن‌ها، تعداد دانه در خورجین برای هر واحد آزمایشی مشخص شد. برای تعیین وزن هزار دانه نیز دو نمونه ۵۰۰ تایی از بذور هر یک از کرت‌های آزمایشی شمارش و توزین گردید و براساس آن وزن هزار دانه محاسبه شد. برای تعیین عملکرد اقتصادی و بیولوژیک کلزا در مرحله برداشت فیزیولوژیک از هر کرت به میزان یک متر مربع به طور تصادفی از سطح زمین کف‌بر و به آزمایشگاه منتقل شد، ابتدا دانه‌ها از غلاف‌ها جدا شد و سپس بوته‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و وزن آن‌ها با ترازوی

دیجیتال ۰/۰۱ توزین گردید. شاخص برداشت نیز از نسبت عملکرد دانه به عملکرد بیولوژیکی بر حسب درصد بدست آمد. پس از اتمام یادداشت‌برداری‌ها، تجزیه واریانس داده‌ها با کمک نرم‌افزار SAS9.4 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام شد. مقایسه میانگین اثرات متقابل به صورت مقایسه ترکیبات تیماری ارائه شد. رسم نمودارها نیز با کمک نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد.

نتایج و بحث

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک

Table 1- Physical and chemical characteristics of the soil

سیلت (درصد) Silt (%)	رس (درصد) Clay (%)	ماسه (درصد) Sand (%)	هدایت الکتریکی E.C. (dS m ⁻¹)	اسیدیته pH	کربن آلی (درصد) Organic Carbon (%)	نیترژن (درصد) Nitrogen (%)	فسفر در دسترس (درصد) Available Phosphorus (mg kg ⁻¹)	پتاسیم در دسترس (درصد) Available Potassium (mg kg ⁻¹)
44	41	15	0.54	7.17	0.44	0.027	2.8	95

جدول ۲- فراوانی گونه‌های مشاهده شده در مزرعه آزمایشی

Table 2- Frequency of observed species in the experimental field

گونه Species		فراوانی نسبی Relative frequency (%)
نام فارسی Persian name	نام علمی Scientific name	
شبدر وحشی	<i>Trifolium spp.</i>	31.29
وایه	<i>Ammi majus L.</i>	24.64
آناگالیس	<i>Anagalis sp.</i>	20.61
شاه‌تره	<i>Fumaria sp.</i>	14.24
پنیرک	<i>Malva spp.</i>	4.67
خردل وحشی	<i>Sinapis arvensis L.</i>	3.52
پیچک مزرعه	<i>Convolvulus arvensis L.</i>	1.03

و استفاده از علف‌کش کلوپیرالید به میزان (۱۹/۳۶) درصد در سه هفته بعد از سمپاشی و (۴۴/۷۴) درصد شش هفته بعد از سمپاشی) بوده است (جدول ۴). در آزمایشی گزارش شد که کاربرد اگزادیاژیل که مانند اگزادیاژون از خانواده اکسیدازول‌ها و آنزیم پروتوپورفیرینوژن اکسیداز است (Musavi, 2013; Mehdinejad et al., 2011)، در غلظت بالاتر از دز توصیه شده (۴۵۰۰ گرم در هکتار) در سه و شش هفته پس از مصرف علف‌کش، درصد کاهش تراکم کل علف‌های هرز مزارع برنج را به ترتیب ۷۱ و ۵۲ درصد نسبت به تیمار شاهد کنترل کرد (Nasiri et al., 2014). همچنین، طبیب و همکاران (Tabib et al., 2019) گزارش کردند که بهترین تیمار علف‌کش مربوط به کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۵۰ میلی‌لیتر و کمترین مربوط به کلوپیرالید برای کنترل علف‌هرز پنیرک می‌باشد.

کاهش تراکم علف‌های هرز در سه و شش هفته پس از سمپاشی مزرعه کلزا

اثر ساده هیبرید کلزا، علف‌کش و همچنین مقایسه ترکیبات تیماری بر درصد کاهش تراکم و وزن خشک کل گونه‌های علف‌های هرز پهن‌برگ در سه و شش هفته پس از اعمال علف‌کش معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$) (جدول ۳).

نتایج مقایسه ترکیبات تیماری در سه و شش هفته بعد از سمپاشی نشان داد که بیشترین درصد کاهش تراکم علف‌های هرز مربوط به هیبرید هایولا ۵۰ و همچنین استفاده از علف‌کش ترکیبی کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۲۵ به میزان ۱۰۰ درصد کاهش تراکم و کمترین درصد کاهش تراکم علف‌های هرز مربوط به هیبرید آگامکس

جدول ۳- تجزیه واریانس کاهش تراکم و وزن خشک علف‌های هرز پهن‌برگ (کل) سه و شش هفته پس از اعمال علف‌کش
Table 3- Analysis variance of density reduction and dry weight reduction of broad leaf weed three and six weeks after herbicide application

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean Square)			
		کاهش تراکم		کاهش وزن خشک	
		Density reduction percentage		Dry weight reduction percentage	
		21 days	42 days	21 days	42 days
Replication تکرار	2	51.07 ^{ns}	2.34 ^{ns}	108.79 ^{ns}	84.55 ^{ns}
Hybrid (A) هیبرید کلزا	1	2329.69*	943.92**	1234.10**	495.64**
Herbicide (B) علف‌کش	6	2403.45*	1515.49**	1603.12**	1031.79**
(A×B) هیبرید × علف‌کش	6	794.20**	361.91**	453.46**	233.46**
Error خطا	26	33.31	29.58	94.40	38.36
CV (%) ضریب تغییرات (درصد)	-	7.05	6.05	10.96	6.68

*، ** به ترتیب اختلاف در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{ns} غیرمعنی‌دار

*** mean significant differences at 5 and 1 % probability level respectively and ^{ns} means no significant difference.

جدول ۴- مقایسه ترکیبات تیماری هیبرید کلزا × علف‌کش به لحاظ درصد کاهش تراکم کل گونه‌های هرز سه و شش هفته پس از سمپاشی مزرعه کلزا

Table 4- Comparison of rapeseed hybrid×herbicide treatment compositions in terms of percentage reduction of total weed density, three and six weeks after herbicide application in rapeseed field

هیبرید کلزا Hybrid Rapeseed	تیمار Treatment	۲۱ روز 21 days	۴۲ روز 42 days
هایولا ۵۰ Hyola50	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	90.95	100
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 17	95.74	100
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	97.19	99.37
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	76.60	94.75
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	100	100
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	99.09	99.09
	کلوپیرالید Clopyralid	65.19	69.37
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	45.91	62.10
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 17	93.28	100
آگامکس Agamax	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	89.14	95.15
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	90.52	97.67
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	88.83	97.24
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	93.45	99.32
	کلوپیرالید Clopyralid	19.36	44.74
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	45.91	62.10
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 17	93.28	100
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	89.14	95.15
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	90.52	97.67
LSD		9.68	9.13

جدول ۵- مقایسه ترکیبات تیماری هیبرید کلزا × علف‌کش به لحاظ درصد کاهش وزن خشک کل گونه‌های هرز سه و شش هفته پس از سمپاشی مزرعه کلزا

Table 5- Comparison of rapeseed hybrid × herbicide treatment compositions in terms of percentage reduction of total weed dry weight, three and six weeks after herbicide application in rapeseed field

هیبرید کلزا Hybrid Rapeseed	تیمار Treatment	۲۱ روز 21 days	۴۲ روز 42 days
ه‌یولا ۵۰ Hyola50	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	97.19	100
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 17	99.26	100
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	99.28	99.87
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	93.50	96.76
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	100	100
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	97.41	99.56
	کلوپیرالید Clopyralid	71.50	76.67
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	56.67	73.33
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 17	95.94	100
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	95.93	99
آگامکس Agamax	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	95.59	99.50
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	98.33	99.55
	کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	99.29	100
	کلوپیرالید Clopyralid	40.50	53.33
	LSD	16.31	10.39
	-	-	-

علف‌کش کلوپیرالید به تنهایی تأثیر بهتری بر روی کاهش وزن خشک علف‌های هرز پهن برگ مزرعه کلزا دارند (جدول ۵). تحقیقات بسیاری انجام شده است که بیانگر تأثیر بهتر علف‌کش‌های ترکیبی کلوپیرالید با دیگر علف‌کش‌ها در مقایسه با کلوپیرالید به تنهایی برای کنترل علف‌های هرز می‌باشد (Askari et al., 2016; Tabib et al., 2019).

ارزیابی خسارت چشمی ناشی از کاربرد علف‌کش بر روی

کلزا و علف‌های هرز بر اساس استاندارد EWRS

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس ارزیابی خسارت چشمی ناشی از کاربرد علف‌کش بر کلزا مشاهده شد که اثر هیبرید، علف‌کش و ترکیبات تیماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین در ارزیابی خسارت چشمی ناشی از کاربرد علف‌کش بر علف‌هرز نشان داد که اثر هیبرید و علف‌کش معنی‌دار در حالی که اثر ترکیبات تیماری معنی‌داری نبود (جدول ۶).

کاهش وزن خشک علف‌های هرز در سه و شش هفته پس از

سمپاشی مزرعه کلزا

نتایج جدول تجزیه واریانس مربوط به درصد کاهش وزن خشک علف‌های هرز کلزا در سه و شش هفته پس از اعمال تیمارها نشان داد که اثر هیبرید، علف‌کش و همچنین مقایسه ترکیبات تیماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

نتایج مقایسه ترکیبات تیماری به لحاظ درصد کاهش وزن خشک کل گونه‌های هرز مورد بررسی نشان داد که بیشترین کاهش وزن خشک کلیه علف‌های هرز پس از سه و شش هفته از سمپاشی در تیمار کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ هیبرید ه‌یولا ۵۰ (۱۰۰ درصد کاهش وزن خشک) و کمترین در تیمار کلوپیرالید هیبرید آگامکس (۴۰/۵ درصد) در ۲۱ روز پس از سمپاشی و (۵۵/۳۳ درصد) با گذشت شش هفته از سمپاشی بود. پس در نتیجه ترکیب علف‌کش کلوپیرالید با علف‌کش‌های اگزادیازون و اگزادیارجیل نسبت به

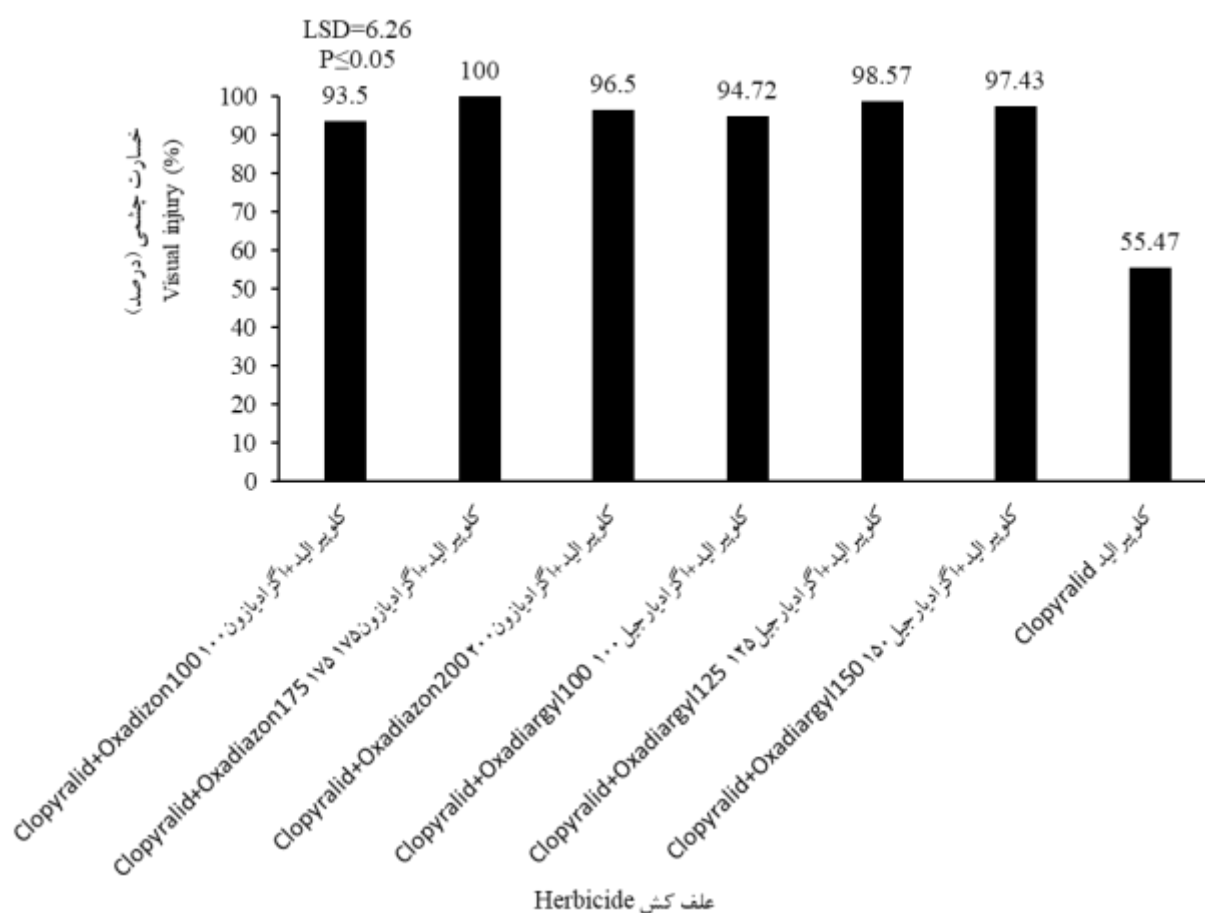
جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس ارزیابی خسارت چشمی ناشی از کاربرد علف کش بر کلزا و علف های هرز

Table 6- Results of ANOVA for visual injury assessment due to herbicide application on rapeseed and weeds

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean Square)	
		کلزا Rapeseed	علف هرز Weed
تکرار Replication	2	1.36 ^{ns}	40.41 ^{ns}
هیبرید کلزا Hybrid (A)	1	51.48 ^{**}	183.82 [*]
علف کش Herbicides (B)	6	32.37 ^{**}	1492.52 ^{**}
هیبرید × علف کش (B × A)	6	23.43 ^{**}	42.32 ^{ns}
خطا Error	26	0.50	27.79
CV (%) ضریب تغییرات (درصد)	–	29.09	5.80

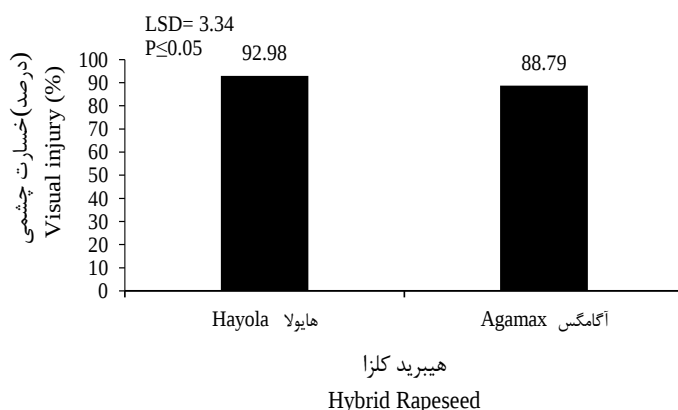
*, ** به ترتیب اختلافات در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{ns} غیرمعنی دار

*, ** are standing for significant differences at 5, 1 % level respectively and ^{ns} no significant differences.



شکل ۱- ارزیابی خسارت چشمی ناشی از کاربرد علف کش بر روی علف های هرز

Figure 1- Visual injury assessment caused by herbicide application on weeds



شکل ۲- ارزیابی خسارت چشمی ناشی از کاربرد علف‌کش بر روی علف‌های هرز در هیبریدهای کلزا
Figure 2- Visual injury assessment caused by herbicide application on weeds in rapeseed hybrids

ارزیابی عملکرد و اجزای عملکرد کلزا

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد عملکرد و اجزای عملکرد کلزا تحت تأثیر تیمار هیبرید قرار نگرفت. تیمار علف‌کش بر تمامی شاخص‌های عملکرد و اجزای عملکرد (به استثنای شاخص برداشت) تأثیر معنی‌دار داشت. براساس این نتایج، فقط تعداد خورجین در بوته تحت تأثیر ترکیب تیماری هیبرید و علف‌کش قرار گرفت در حالی که بر سایر شاخص‌ها اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۸).

تعداد خورجین در بوته

مقایسه ترکیبات تیماری نیز مشخص کرد که بیشترین تعداد خورجین در بوته در تیمار وجین به همراه هیبرید آگامکس به میزان ۱۸۹/۳۳ خورجین در بوته بدست آمد که با تیمار شاهد با علف‌هرز دارای اختلاف معنی‌داری بود. همچنین کمترین تعداد خورجین شاهد با علف‌هرز به همراه هیبرید هایولا ۵۰ که با تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ هیبرید آگامکس اختلاف معنی‌داری نداشت بدست آمد. در رقم هایولا ۵۰ استفاده از علف‌کش‌های ترکیبی کلوپیرالید + اگزادیازون و کلوپیرالید + اگزادیارجیل نسبت به علف‌کش کلوپیرالید به تنهایی باعث افزایش تعداد خورجین در بوته شد، در صورتی که در رقم آگامکس علف‌کش کلوپیرالید به تنهایی باعث افزایش تعداد خورجین در بوته شد. به عبارتی، کنترل مطلوب‌تر علف‌های هرز توسط تیمار وجین سبب کاهش رقابت بین گونه‌ای، بهبود فضای میکروکلیمایی و بهبود توزیع تشعشع در کانوپی کلزا و در نتیجه افزایش تعداد خورجین در بوته شده است. همچنین علف‌کش‌های اگزادیازون و اگزادیارجیل پس از اختلاط با کلوپیرالید سبب تولید خورجین بیشتر در کلزا شده‌اند که به دلیل افزایش طیف علف‌کشی و نیز اثر متقابل سینرجیک آنها نسبت به هم می‌باشد (جدول ۹) که با نتایج عسکری و همکاران (2016, Askari et al.) مطابقت دارد.

بررسی نتایج نشان داد که بیشترین مقدار گیاهسوزی در علف‌های هرز به ترتیب در تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین در تیمار کلوپیرالید به میزان ۵۵/۴۷ درصد مشاهده شد (شکل ۱). همچنین بیشترین گیاهسوزی در کلزا در رقم هایولا ۵۰ با میزان ۹۲/۹۸ درصد بود (شکل ۲). علف‌کش کلوپیرالید دارای توانایی متوسط به منظور کنترل علف‌های هرز می‌باشد. البته هرچه علف‌های هرز در ابتدای مراحل رشدی باشد، عملکرد کلوپیرالید بر روی این گونه‌های هرز بهتر خواهد بود ولی از آنجایی که علف‌های هرز در شرایط مزرعه در دامنه‌های فنولوژیکی متفاوت قرار می‌گیرند لذا کنترل آن‌ها توسط علف‌کش لوتنترل بویژه در مراحل بالاتر دو برگ گیاهچه یا بیشتر خواهد شد (Shimi et al., 2014) اما با اختلاط انجام شده در آزمایش مذکور به ویژه در تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ این کنترل به مراتب از کلوپیرالید تنها بیشتر بود که با نتایج آزمایش طبیب و همکاران (Tabib et al., 2019) مطابقت داشت.

مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نشان داد که استفاده از علف‌کش کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ به همراه هیبرید هایولا ۵۰ بالاترین اثر منفی (گیاهسوزی) را بر روی کلزا دارد و همچنین کمترین اثر گیاهسوزی در تیمارهای کلوپیرالید به همراه هیبرید هایولا ۵۰، آگامکس و (کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ و ۱۵۰ هیبرید آگامکس) مشاهده شد (جدول ۷). مطالعات طبیب و همکاران (Tabib et al., 2019) نشان داد که در آزمایش‌های پس از اختلاط کلوپیرالید یک لیتر + اگزادیازون ۲۰۰ بیشترین گیاهسوزی مربوط به کلوپیرالید یک لیتر + (اگزادیازون ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌لیتر) است، دیگر اختلاط‌ها دارای گیاهسوزی قابل چشم‌پوشی بود که با نتایج پژوهش پیش‌رو مطابقت داشت.

جدول ۷- مقایسه ترکیبات تیماری هیبرید کلزا × علف کش به لحاظ ارزیابی خسارت چشمی بر هیبریدهای کلزا
Table 7- Visual injury assessment caused by different herbicide treatments on rapeseed hybrids

هیبرید کلزا Hybrid Rapeseed	تیمار Treatment	خسارت چشمی (درصد) Visual injury (%)
هایولا ۵۰ Hyola50	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopypiralid + Oxadiazon 100	9.67
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopypiralid + Oxadiazon 175	6.50
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopypiralid + Oxadiazon 200	0.3
	کلوپیرالید + اگزادیا رجیل ۱۰۰ Clopypiralid + Oxadiargyl 100	1
	کلوپیرالید + اگزادیا رجیل ۱۲۵ Clopypiralid + Oxadiargyl 125	7
	کلوپیرالید + اگزادیا رجیل ۱۵۰ Clopypiralid + Oxadiargyl 150	0.3
	کلوپیرالید Clopypiralid	0
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopypiralid + Oxadiazon 100	1
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopypiralid + Oxadiazon 175	3
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopypiralid + Oxadiazon 200	3.67
آگامکس Agamax	کلوپیرالید + اگزادیا رجیل ۱۰۰ Clopypiralid + Oxadiargyl 100	0
	کلوپیرالید + اگزادیا رجیل ۱۲۵ Clopypiralid + Oxadiargyl 125	1.67
	کلوپیرالید + اگزادیا رجیل ۱۵۰ Clopypiralid + Oxadiargyl 150	0
	کلوپیرالید Clopypiralid	0
	–	1.19
	LSD	–

جدول ۸- نتایج تجزیه واریانس مربوط به عملکرد و اجزای عملکرد کلزا تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی
Table 8- ANOVA results related to the yield and yield components of rapeseed affected by experimental treatments

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean Square)					شاخص برداشت Harvest index
		تعداد خورجین در بوته Number of siliques per plant	تعداد دانه در خورجین Number of seed per silique	وزن هزار دانه 1000-seed weight	عملکرد دانه Seed yield	عملکرد بیولوژیک Biological yield	
تکرار Replication	2	3179.68**	120.68**	1.11**	948329.73**	23263318.4**	150.10 ^{ns}
هیبرید کلزا Hybrid (A)	1	1745.35 ^{ns}	6.68 ^{ns}	0.07 ^{ns}	486433.57 ^{ns}	3729920.4 ^{ns}	1.04 ^{ns}
علف کش Herbicides (B)	8	2289.97**	13.45**	0.19*	1103225.7**	9587531.2**	37.86 ^{ns}
هیبرید × علف کش (A×B)	8	1952.81**	5.31 ^{ns}	0.14 ^{ns}	308780.74 ^{ns}	5565791.3 ^{ns}	73.27 ^{ns}
Error	34	453.99	3.74	0.06	162718.36	3306535.4	51.89
CV (%)	ضریب تغییرات (درصد)	21.53	9.42	8.51	13.93	18.08	24.23

*, ** اختلاف در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{ns} غیرمعنی دار

*, ** are standing for significant differences at 5, 1 % level respectively and ^{ns} no significant differences.

تعداد دانه در خورجین

بیشترین و کمترین صفت تعداد دانه در خورجین تحت تأثیر تیمار علف‌کش مربوط به تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ و کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۰۰ به ترتیب به میزان (۲۳/۳۳ و ۱۸/۱۷) بوده است. با افزایش دز اگزادیازون ترکیب با کلوپیرالید تا ۱۷۵ میلی‌لیتر افزایش تعداد دانه در خورجین مشاهده شد. ولی با افزایش بیشتر از ۱۷۵ میلی‌لیتر در هکتار روند برعکس شد و تعداد دانه در خورجین کاهش یافت. در صورتی که با افزایش دز علف‌کش اگزادیاژیل در ترکیب با کلوپیرالید تعداد دانه در خورجین افزایش

یافت (جدول ۱۰). به طور کلی رقابت علف‌های هرز از طریق کاهش طول خورجین‌ها، کاهش وزن خشک گیاه و ایجاد محدودیت در تأمین مواد فتوسنتزی لازم برای پر کردن دانه‌ها، تعداد دانه در خورجین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jamal and Chester, 2006). از طرفی می‌توان اظهار داشت که تعداد دانه در خورجین بیشتر تحت تأثیر عوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی از جمله رقابت با علف‌های هرز است. بالا بودن درصد کاهش تراکم علف‌های هرز در تیمارهای کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ سبب تأثیر مثبت در بر تعداد دانه در خورجین و افزایش آن گردیده است.

جدول ۹- مقایسه ترکیبات تیماری هیبرید کلزا × علف‌کش به لحاظ تعداد خورجین در بوته کلزا

Table 9- Comparison of rapeseed hybrid × herbicide treatment compositions in terms of pod number per rapeseed plant

هیبرید کلزا Hybrid Rapeseed	تیمار Treatment	تعداد خورجین در بوته Number of siliques per plant
هایولا ۵۰ Hayola 50	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	125
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 175	113
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	125.67
	کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	115
	کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	95
	کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	118.67
	کلوپیرالید Clopyralid	91.67
	آلوده Infected	52
	وجین weeding	106
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	52.67
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 175	69
	کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	86
آگامکس Agamax	کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	99.67
	کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	77
	کلوپیرالید + اگزادیاژیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	126.33
	کلوپیرالید Clopyralid	119.67
	آلوده Infected	70
	وجین weeding	139.33
	LSD	35.36
	-	

تعداد دانه در خورجین

بیشترین و کمترین صفت تعداد دانه در خورجین تحت تأثیر تیمار علف‌کش مربوط به تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ و کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ به ترتیب به میزان (۲۳/۳۳ و ۱۸/۱۷) بوده است. با افزایش دز اگزادیازون ترکیب با کلوپیرالید تا ۱۷۵ میلی‌لیتر افزایش تعداد دانه در خورجین مشاهده شد. ولی با افزایش بیشتر از ۱۷۵ میلی‌لیتر در هکتار روند برعکس شد و تعداد دانه در خورجین کاهش یافت. در صورتی که با افزایش دز علف‌کش اگزادیارجیل در ترکیب با کلوپیرالید تعداد دانه در خورجین افزایش یافت (جدول ۱۰). به طور کلی رقابت علف‌های هرز از طریق کاهش طول خورجین‌ها، کاهش وزن خشک گیاه و ایجاد محدودیت در تأمین مواد فتوسنتزی لازم برای پر کردن دانه‌ها، تعداد دانه در خورجین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Jamal and Chester, 2006). از طرفی می‌توان اظهار داشت که تعداد دانه در خورجین بیشتر تحت تأثیر عوامل ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی از جمله رقابت با علف‌های هرز است. بالا بودن درصد کاهش تراکم علف‌های هرز در تیمارهای کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ سبب تأثیر مثبت در بر تعداد دانه در خورجین و افزایش آن گردیده است.

وزن هزار دانه

وزن هزار دانه کمتر تحت تأثیر تیمارها قرار می‌گیرد و یک صفت ژنتیکی است و همان طور که از نتایج مقایسه میانگین مشخص است که بیشترین وزن هزاردانه در تیمار کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ به میزان ۳/۲۷ گرم که با تیمارهای کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ و ۱۲۵ اختلاف معنی‌داری نداشت و همچنین کمترین وزن هزار دانه در تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ به میزان ۲/۸۷ گرم که با شاهد با علف‌هرز اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱۰). در تیمار وجین که رقابت درون گونه‌ای و بین گونه‌ای کمتر بوده و نیز نور به میزان کافی موجود باشد، گیاه قادر است با افزایش تولید آسیمیلات‌ها علاوه بر افزایش تعداد خورجین، تعداد دانه‌های موجود در خورجین افزایش می‌دهد که باعث افزایش وزن هزار دانه می‌شود. همچنین، از دلایل وزن هزار دانه بالا در تیمار کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ می‌توان به خصوصیات این علف‌کش در کنترل علف‌هرز اشاره کرد که باعث شده بوته کلزا دارای تعداد مخزن بیشتری برای مواد پرورده فتوسنتزی داشته باشد. استفاده از علف‌کش کاهش رقابت علف‌های هرز با گیاه زراعی را به همراه داشته و در نتیجه موجب افزایش وزن هزار دانه شده است. همچنین، بلکشاو (Blackshaw, 2002) نیز کاهش وزن هزار دانه را در اثر رقابت علف‌های هرز گزارش کردند.

عملکرد دانه و بیولوژیک

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۱۰) نشان داد که بیشترین عملکرد دانه کلزا (۳۳۷۷/۶ کیلوگرم در هکتار) تحت تأثیر تیمار کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ و کمترین (۲۰۶۴/۲ کیلوگرم در هکتار) آن تحت تیمار شاهد با علف‌هرز حاصل شد، به طوری که که استفاده از کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ عملکرد دانه را ۱۶/۳۶ درصد نسبت به شاهد با علف‌هرز، افزایش داد (جدول ۱۰). همچنین بیشترین عملکرد بیولوژیک در تیمار کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ به میزان ۱۱۲۹۵ کیلوگرم در هکتار و کمترین به میزان ۷۴۵۸ کیلوگرم در هکتار آن مربوط به تیمار شاهد با علف‌هرز بود (جدول ۱۰).

با توجه به نتایج، اختلاط علف‌کش‌ها راهکاری به منظور حذف رقابت علف‌های هرز با کلزا و افزایش عملکرد می‌باشد، به طوری که عملکرد بالغ بر ۳/۳ تن به دست آمده که نسبت به کلوپیرالید تنها به عنوان شاهد تفاوت معنی‌داری دارند که این موید نتایج حاضر به ویژه در تیمار کلوپیرالید با اگزادیارجیل بود (Tabib et al., 2019). نتایج آزمایشی نشان داد که علف‌کش اگزادیازون بعد از آبیاری اول می‌تواند به طور معنی‌داری باعث کاهش علف‌های هرز و افزایش عملکرد پیاز شود (Ghosheh, 2004). نتایج آزمایشی نشان داد علف‌های هرز تأثیر بسیاری در کاهش عملکرد کلزا دارند و هر نوع اقدام در جهت کنترل علف‌های هرز سبب افزایش عملکرد کلزا می‌گردد. خسارت ظاهری مصرف علف‌کش‌ها نسبتاً بالا است، اما اختلاط علف‌کش‌ها به عنوان یک راهکار می‌تواند در راستای کنترل علف‌های هرز و به تبع آن افزایش عملکرد کلزا موثر باشد (Shimi et al., 2008).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، با توجه به حصول بیشترین عملکرد کلزا از کرت‌های تیمار شده با کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰، اگزادیارجیل ۱۲۵ و ۱۵۰ میلی‌لیتر در هکتار، این تیمارها بهترین تیمار در مقایسه با تیمارهای اعمال شده بود؛ از آن‌جا که کلوپیرالید تنها پهن‌برگ‌کش پس‌رویشی اختصاصی کلزا است، به دلیل کنترل ضعیف علف‌های هرز مهمی مانند خردل وحشی، پنیرک و پیچک مزرعه کارایی مناسبی نداشته و لذا اختلاط آن با سایر علف‌کش‌ها جهت افزایش کارایی بیش از پیش احساس می‌شود. از آن‌جا که دو علف‌کش اگزادیازون و اگزادیارجیل علف‌های اختصاصی برنج می‌باشند، لذا بررسی طیف تأثیر آن‌ها نشان داد که قادر به کنترل علف‌های هرزی مانند پنیرک، تربچه وحشی، خردل وحشی، خاکشیر، پیچک مزرعه و کشیده‌برگی مانند یولاف وحشی، علف‌های هرز رایج در مزارع کلزا در سراسر کشور، می‌باشند که بیشتر این طیف تأثیر مربوط به علف‌کش اگزادیازون می‌باشد. لذا با توجه به فقیر بودن محصول کلزا از نظر تعداد علف‌کش‌های ثبت

شده در کشور و همچنین ضرورت در دسترس بودن آب در هنگام کاربرد علف‌کش‌های پیش‌رویشی دو منظوره کلزا ضرورت استفاده از علف‌کش‌های سایر محصولات به منظور افزایش طیف علف‌کش‌های کلزا وجود دارد. همچنین، لازم به ذکر است که انجام آزمایش‌های بیشتر در خصوص اختلاط‌های علف‌کشی مذکور در مزارع کلزای سراسر کشور به منظور حصول نتایجی که مبنای توصیه اختلاط‌های مذکور در کلزا باشد ضرورت دارد.

جدول ۱۰- مقایسه میانگین عملکرد و اجزای عملکرد کلزا تحت تأثیر تیمارهای علف‌کش

Table 10- The mean comparison of the yield and yield components of rapeseed affected by herbicide treatments

تیمار Treatment	تعداد دانه در خورجین Number of seed per silique	وزن هزار دانه Thousand seed weight (g)	عملکرد دانه Seed yield (Kg ha ⁻¹)	عملکرد بیولوژیک Biological yield (Kg ha ⁻¹)
کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 100	21	2.97	2600.8	9816
کلوپیرالید + اگزادیازون ۱۷۵ Clopyralid + Oxadiazon 175	23.33	2.83	2710.6	10199
کلوپیرالید + اگزادیازون ۲۰۰ Clopyralid + Oxadiazon 200	20.67	3.1	3377.6	10379
کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۰۰ Clopyralid + Oxadiargyl 100	18.17	3.25	3233.1	10995
کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۲۵ Clopyralid + Oxadiargyl 125	19	3.23	3077.1	11295
کلوپیرالید + اگزادیارجیل ۱۵۰ Clopyralid + Oxadiargyl 150	21.67	3.27	3168.2	10617
کلوپیرالید Clopyralid	20.83	3.11	2597.6	8631
آلوده Infected	20.33	2.87	2064.2	7458
وجین weeding	19.83	3.02	3236.6	11099
LSD	2.27	0.30	2133.5	473.3

منابع

- Al- Barrak, K.M. (2006). Irrigation interval and nitrogen level effects on growth and yield of canola (*Brassica napus* L.). Scientific Journal of King Faisal University. Al-Hassa, Saudi Arabia 7(1): 87-102.
- Askari, M., Faraji, A., Dadashi, M.R., & Asgari, M. (2012). Evaluation of some agronomic characteristics and yield of new spring rapeseed hybrids. In: Proceedings of the 1th National Conference on Biology Sciences. Falavarjan. Available in: <https://civilica.com/doc/183311/> (visited 11 Desember 2021) (In Persian with English abstract)
- Askari, S.A., Saeedipour, S., & Kalantar Hormozi, S. (2016). Evaluation of the effect of application of some herbicides in weed control of rapeseed field in Khuzestan province. In: Proceedings of the 1th National Conference on Modern Research in Agriculture and Animal Sciences. Birjand, p. 1103 (In Persian with English abstract)
- Berry, M.P., & Spink, J.H. (2006). A physiological analysis of oilseed rape yield, past and future (review). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 199: 381-392. <https://doi.org/10.1017/S0021859606006423>.
- Blackshaw, R.E. (2002). Influence of wild radish yield on quality of canola. *Weed Science* 50(3): 344-349. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0344:IOWROY\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0344:IOWROY]2.0.CO;2).
- Dastorani, M., Gholamalipour Alamdari, A., Biabani, A., Avarseji, Z., & Habibi M. (2018). Study the several herbicides effect on weeds control and yield of cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Iranian Journal of Weed Science* 14(1): 83-95. (In Persian with English abstract)
- Ghosheh, H.Z. (2004). Single herbicide treatments for control of broad-leaved weeds in onion. *Crop Protection* 23: 539-542. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.010>.
- Jamal, R.Q., & Chester, L.F. (2006). Selective weed control in Syrian marjoram (*Origanum syriacum* L.) with oxadiazon and oxyfluorfen herbicides. *Weed Technology* 20(3): 670-676. <https://doi.org/10.1614/WT-04-129R1.1>.
- Kudsk, P., & Striebig J.C. (2003). Herbicides – a two-edged sword. *Weed Research* 43(1): 90-102. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2003.00328.x>.
- Mehdinejad, K., Mehdinejad, M., & Shariati Feyzabadi, F. (2011). Toxic effects of different concentrations of

- oxadiargyl (topstar) herbicide on rice fields on *Scenedesmus* sp. green algae in water sources. *Journal of Biology* 5(2): 95-105. (In Persian with English abstract)
11. Musavi, M.R. (2013). Herbicides: Knowledge and Application. Marze Danesh Press, Iran. 284 pp. (In Persian)
12. Nasiri, S., Asghari, J., Samizadeh, H., Moradi, P., & Shirzad, F. (2014). Evaluation of oxadiargyl and thiobencarb herbicides efficacy on rice (*Oryza sativa* L.) yield and yield components. *Cereal Reserch* 3(4): 307-319. (In Persian with English abstract)
13. Naylor, R.E.L., & Lutman, P.J. (2002). What is Weed? Weed Management Handbook, Eds R.E.L. Naylor (2002) Blackwell Science Ltd. pp: 19– 40.
14. Shimi, P., Poorazar, R., Ghezeli, F., & Sasanfar, H.R. (2014). Efficiency of two commercial forms of clopyralid at different doses in controlling canola weeds. *Iranian Journal of Weed Science* 10: 145-153. (In Persian with English abstract)
15. Shimi, P., Saeidi, H., Abtali, Y., Poorazar, R., & Maleki, I. (2008). Testing butisan star in canola. Final on farm research report. Iranian Research Institute of Plant Protection, Plant Protection Organization and Ministry of Agriculture Agronomic Affairs. (In Persian with English abstract)
16. Tabib, M.H., Ghasemi Nezhad, M., Hassani, M., Shojaei, A., & Beiranvand, H. (2019). The investigation mixing of lontrol with ronstar and topstar for *Malva nicaeensis* control in rapeseed (*Brassica napus*) in Behbahan. In: Proceedings of the 8th Iranian Weed Science Congress. Mashhad, p. 891. (In Persian with English abstract)
17. Yaghoubi, B. 2015. Chemical Control of Pondweed (*Potamogeton nodosus*) and Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in paddy fields. *Iranian Journal of Weed Science* 11: 195-207. (In Persian with English abstract)
18. Zand, E., Mousavi, S.K., & Heidari, A. (2014). Herbicides and Their Application Methods. Jihad Daneshgahi Press of Mashhad, Iran. 547 pp. (In Persian)

Contents

Evaluating the Reaction of different Species of Beans to <i>Macrophomina phaseolina</i>, <i>Rhizoctonia solani</i> and <i>Fusarium solani</i> In Vitro	141
S. Mohammadi, M. Atashpanjeh	
Evaluation of the <i>Trichoderma harzianum</i> BI alone and in Combination with Thiamine, Riboflavin and Hexanoic Acid Effects on Resistance Induction against <i>Meloidogyne javanica</i> in Tomato Plants	153
M. Kavari, E. Mahdikhani- Moghaddam, H. Rouhani	
The Effect of Sodium Silicate in Inducing Systemic Resistance in Cucumber <i>Fusarium</i> Stem and Root Rot	169
S. Reisi Dehkordi, N. Radman, A.H. Taheri, S.K. Sabbagh	
Evaluation of Antifungal Effect of Biodegradable Nano Encapsulated Extract of <i>Trichoderma harzianum</i>	183
M. Shahiri Tabarestani	
Study on the Moths of the Subfamily Xyleninae (Lep.: Noctuidae) in Parts of Western Zagros in Khuzestan and Ilam Provinces	197
M. Ahamdi, M. Esfandiari, A. Shirvani	
Effect of Micronutrient Fertilizers on Digestive Enzymes Activity of <i>Hippodamia variegata</i> (Goeze) Fed on <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	213
T. Alizamani, J. Shakarami, M. Mardani Talaee, A. Zibae	
Taxonomic Status of a Native Species of the Genus <i>Feltiella</i> Rübsaamen (Dip.: Cecidomyiidae) in Iran	227
M. Mollaei, H. Sadeghi Namaghi	
Weed Seed Bank and Seedling Dynamics in Response to Crop Rotation in Conventional Agroecosystems	239
N. Valaie, M.H. Rashed Mohassel, M. Bannayan	
Isolation of Candidate Genes in Host- <i>Phelipanche aegyptiaca</i> Interaction by Genome Walking	259
M.R. Rezaei, A. Mirshamsi Kakhki, A.R. Seifi	
Effect of Living and Straw Mulch in Integration with Reduced Doses of Trifluralin on Yield and Yield Components of Dill (<i>Anethum graveolens</i> L.)	269
M. Abbaszadeh, R. Amini, A. Dabbagh Mohammadi Nassab	
Evaluating the Effect of Mixing Clopyralid with Oxadiazon and Oxadiargyl on Control of Broadleaf Weeds in Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	285
A. Rashidi, E. Elahifard, M.H. Tabib	

Iranian Plant Protection Research

(AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY)

Vol . 36

No. 2

2022

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	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Baghaee Ravari ,S	Plant Pathology	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Karim Mojeni ,H	Production and Plant Genetics	Asso. Prof. Isfahan University of Technology
Pourjam, E.	Plant Pathology	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	Researcher and Curator of Lepidoptera collection, Department Entomology State Museum of Natural History 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: <https://jpp.um.ac.ir/>