مبارزه بیولوژیک با قارچ *Pythium ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود توسط قارچهای آنتاگونیست[1]

داریوش شهریاری ،محمود اخوت و حمید روحانی

بترتیب محقق و کارشناس ارشد سازمان تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی ورامین ،

دانشیاران گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

و دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان

تاریخ پذیرش مقاله ۷۴/۱۰/۲۷

خلاصه

کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود در اثر *P.ultimum* توسط قارچهای آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* جدا شده از خاک مزرعه نخود کرج با استفاده از محیط کشت اختصاصی داوه [2] و جدا شده های *Trichoderma viride* و *Gliocladium virens* دریافتی از دانشکده کشاورزی کرج در شرایط آزمایشگاهی ازنظر قدرت رقابت تغذیه ای ،تشکیل کلنی درکشت متقابل،همچنین تاثیر ترکیبات فرار و ترشحات مایع خارج سلولی روی رشد کلنی قارچ بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت . نتایج حاصله نشان داد ، از بین جدا شده *T.viride*, *G.virens* دریافتی از دانشکده از نظر قدرت میکوپارازیتیسم [3] در گروه بسیار قوی قرار گرفته ، ولی از نظر آنتی بیوز [4] تاثیرضعیفی روی رشد کلنی *Pythium* داشتند . در حالیکه گونه *T.harzianum* جدا شده از مزارع نخود کرج از لحاظ ایجاد کلنی روی قارچ بیماریزا در حد متوسط بود. هرچه کشت این قارچها متراکم تر شود ، میزان بازداری از رشد قارچ بیماریزا توسط ترکیبات قرار آنها افزوده تر می گردد.

بر اساس ویژگی میکو پارازیتیسم جدا شده های *T.viride* و *G,virens* برای آزمایشات مزرعه علیه *Pythium* انتخاب شدند. در این آزمایش اسپور آنتاگونیست ها به نسبت $1-5\times10^{7}$ با بذر نخود رقم جم آغشته شدند. قارچکش متالاکسیل ۲۵٪ نیز بمیزان ۰/۳ گرم درکیلوگرم بذر بکار رفت .آزمایش در ۴ تکرار همراه با شاهد مزرعه و شاهد آلوده به *Pythium* در طرح بلوکهای کامل تصادفی در مزرعه پیاده شد.

آمار برداری بر اساس درصد جوانه زدن بذر که ۲۷ روز بعد از ظهور گیاهچه انجام شد نشان داد جدا شده های *G.virens* (جدا شده کمال آباد) و *T.viride*(جدا شده شهریار) بترتیب با ۶۱/۸ و ۵۷/۵ درصد و قارچکش متالاکسیل با ۷۱/۸ درصد جوانه زنی در یک گروه آماری قرار گرفتند و با شاهد آلوده با ۳۴/۶٪ در سطح ۱٪ اختلاف معنی دار داشته و باعث افزایش درصد گیاهچه نخود شده است .

مقدمه

یکی از عوامل مهم پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه در اکثر نواحی نخود کاری بویژه مناطق غرب کشور ،قارچ *Pythium uktimum* Trow می باشد . این قارچ با پوساندن و یا جلوگیری از جوانه زنی بذر نخود هرساله خسارت زیادی به تراکم بوته در واحد سطح می زند، بطوریکه در برخی از نواحی کشور مثل کردستان این میزان تا حد چند بوته در متر مربع کاهش می یابد. کنترل بیماری با استفاده از قارچکشها علاوه برهزینه زیاد و اثرات نامطلوب زیست محیطی نمی تواند گیاه را در مقابل پاتوژنهای متعدد خاکزی محافظت نماید و اغلب مانع تشکیل غدد محتوی باکتریهای تثبیت

1 - Antagonist 2- Davet 3- Mycoparasitism 4- Antibios

کننده ازت در ریشه نخود می شوند(۴).

بررسی منابع علمی نشان می دهد میکرو ارگانیزمهای متعددی بویژه قارچهایی از جنسهای ***Gliocladium, Trichoderma*** و ***Penicillium*** تا حدود زیادی این بیماری را تحت کنترل درآورده اند. در زمینه کنترل بیولوژیکی بیماریها در ایران با قارچهای آنتاگونیست ،زکیئی در سال ۱۳۵۴ روی بلاست برنج بررسیهایی انجام داد (۳). در سالهای اخیر قدمهای موثری در تحقیقات کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزا برداشته شد که می توان به کنترل ***Rhizoctonia solani*** Kuehn (عامل پوسیدگی جوانه و استولن سیب زمینی) توسط چند جدا شده ***Trichoderma*** Pers.ex Fr. (۲)، بکارگیری قارچهای آنتاگونیست تریکودرما علیه ***Fusarium solani*** (Mart.)Sacc. عامل پوسیدگی سیاه ریشه نخود ایرانی (٦)و استفاده از عوامل آنتاگونیست فوق در مقایسه با چند قارچکش علیه قارچهای ***Colletotrichum coccodes***(Wallr) Hughes و ***Phytophthora erythroseptica*** Pethybr در سیب زمینی (۵) اشاره کرد. در کشورهای دیگر اولین کوشش ها در کاربرد مستقیم مبارزه بیولوژیک علیه پاتوژنهای گیاهی توسط هارتلی با کنترل قارچ ***Pythium debaryanum*** Hesse با ۱۳ قارچ آنتاگونیست انجام گرفت (۸). در سال ۱۹۸۹ لومستن و لوک از بین ۵۰ نمونه قارچ و باکتری جدا شده از خاک که علیه عامل مرگ گیاهچه آهار بکار گرفتند ، تنها جدا شده ***Gliocladium virens*** Miller & Forster بهترین اثر را در کنترل پی تیوم و ریزوکتونیا و ترکیب این دو داشتند (۱۴).

آغشته‌نمودن‌بذرنخود فرنگی و تربچه به اسپور ***T.harzianum*** Rifai بوسیله هرمان در سال ۱۹۸۱ بر علیه پوسیدگی بدر توسط ***P.ultimum*** و ***Rhizoctonia solani*** آزمایش شد و نتیجه مثبت بوده است (۹). کایزر و هانان در سال ۱۹۸۴ قارچ ***Penicillium oxalicum*** Currie & Thom و چند جدا شده تریکو درما را بر علیه ***P.ultimum*** عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود بکار بردند در تیماری که از پنی سیلیم استفاده شد میزان جوانه زنی تا حد شاهد سالم افزایش یافت (۱۲).

تحقیقات ویندلینک و امرسون ثابت کرده است که ترشحات خارج سلولی تریکو درما اثر بازدارندگی روی رشد بعضی از عوامل بیماریزا دارد(۱٦).

دنیس و وبستر در سال ۱۹٦۱ مشخص نمودند علاوه بر ترشحات خارج سلولی‌ترکیبات دیگری نیز بوسیله گونه های تریکو درما ایجاد می شود که فرار بوده و روی رشد قارچهای بیماریزا اثر بازدارندگی دارند (۷). تحقیقات هاول نشان می دهد مکانیزم عمده کنترل ***R.solani, P.ultimum*** عامل مرگ گیاهچه پنبه توسط ***Gliocladium virens*** بر اساس لیز نمودن میسیلومها و میکو پارازیتیسم می باشد (۱۱). در مورد کاربرد عملی قارچهای تریکودرما علیه ***P.ultimum*** عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود تاکنون در ایران کاری صورت نگرفته و این تحقیق برای اولین بار بصورت آزمایشگاهی و مزرعه ای به اجرا در آمده است .

مواد و روشها

۱ - جداکردن ایزوله های تریکودرما از خاک مزارع نخود

بمنظور جدا کردن تریکودرما از خاک مزرعه نخود اداره اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج ازعمق ۲۰-۱۵ سانتی متری در منطقه ریزوسفر رشدگیاه نمونه برداری شد . در آزمایشگاه مقدار ۴۰گرم خاک به یک لیتر آب مقطر محتوی ۲ میلی لیتر اسید استیک همراه با چند قطره مویان مخلوط شد. سپس میزان ۲-۱ میلی لیتر از سوسپانسیون فوق به ۲۰ میلی لیتر آب آگار دو درصد دردمای ۴۵ درجه سانتیگراد اضافه شدو بعد از بسته شدن محیط ،قرصی بقطر یک سانتیمتر از محیط جدا شد ودر وسط محیط کشت اختصاصی داوه قرارداده شد(۵). در این محیط بجای ونکلوزولین نیم میلی لیتر فرمالین ۳۷٪ افزوده شد . پتریها بمدت ۴۸ ساعت در تاریکی و بعددر شرایط نور فلورسانس و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا اسپور ها بفراوانی تولیدشوند. قارچهای بدست آمده بعد از خالص سازی به روش تک اسپور برای شناسائی روی محیط مالت آگار منتقل شد. ایزوله هابا استفاده از کلید طبقه بندی رافائی (۱۵) تحت بررسی و شناسائی قرار گرفت.

۲ - بررسی رقابت تغذیه‌ای و قدرت ایجاد کلنی توسط آنتاگونیست ها با ***Pythium ultimum***

در این بررسی یک ایزوله آنتاگونیست جدا شده از مزرعه نخودکرج و دو ایزوله دریافتی از دانشکده کشاورزی کرج بکار برده شدند. برای اجرای آزمایش لام استریل که کمی گرم شده بود در وسط ظروف پتری محتوی P.D.A قرار داده شد . سپس یک قرص از قارچ آنتاگونیست کشت پنج روزه در یکطرف پتری و در طرف

مقابل یک قرص از کلنی پی تیوم کشت سه روزه قرار داده شد. بعد از اینکه هیفهای دو قارچ در سطح لام با هم تلاقی نمودند وضع رشد و تاثیر آنتاگونیست ها روی پی تیوم مورد مطالعه قرار گرفت. بمنظور بررسی نحوه هیپر پارازیتیسم آنتاگونیستها، لامها بدقت از محیط جدا شده و با بلو دومتیلن رنگ آمیزی گردید و با بزرگنمائی ۴۰۰X میکرو سکوپ تحت بررسی قرار گرفت .

برای مشاهده قدرت ایجاد کلنی یک قرص از قارچ آنتاگونیست ها در حاشیه پتری محتوی پی تیوم سه روزه که کاملا" سطح پتری را پوشانده بود کشت داده شد. بعد از یک هفته پیشرفت قارچهای آنتاگونیست و نحوه استقرار آن روی پی تیوم مطالعه شد.

در این آزمایش میزان رقابت غذایی و قدرت کلنی زاسیون بر اساس میزان رشد آنتاگونیست ها در مقابل پی تیوم بشرح زیرمحاسبه شد (۴).

الف - اگر قارچ آنتاگونیست (۱۰۰-۸۰) درصد پتری محتوی پی تیوم را بپوشاند رقابت غذایی و قدرت کلی زاسیون قوی است .

ب - اگر قارچ آنتاگونیست (۸۰-۶۵) درصد پتری محتوی پیتیوم را بپوشاند رقابت غذایی و قدرت کلنی زاسیون خوبی دارد.

د - اگر قارچ آنتاگونیست زیر ۵۰ درصد پتری محتوی پیتیوم را بپوشاند رقابت غذایی و قدرت کلنی زاسیون ضعیفی دارد ویا اصلا" ندارد.

۳ - بررسی ترکیبات گازی فرار آنتاگونیست ها روی ***Pythium***

در این آزمایش از کشت های ۴۸ و ۹۶ ساعته آنتاگونیست ها در محیط P.D.A استفاده شد.

بدین منظور درپوش پتریهای حاوی آنتاگونیست ها در شرایط استریل با دقت برداشته شده و در روی آن پتری دیگری که در وسط یک قرص پی تیوم از کشت سه روزه‌داشت بطور وارونه قرار داده شد و با چسب نواری معمولی کاملا" مسدود گردید تا هیچگونه گازی از منافذ آن خارج نشود. برای شاهد از پتری محتوی P.D.A حاوی پی تیوم بدون آنتاگونیست استفاده شد. این آزمایش با چهار تکرار در یک طرح کاملا" تصادفی در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور انجام شد. نتایج براساس رشد قطر کلنی پی تیوم بر حسب میلی متر بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون محاسبه شد.

۴ - بررسی ترکیبات مایع خارج سلولی آنتاگونیست ها روی رشد میسلیومی ***Pythium ultimum***

سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست ها از کشت هفت روزه بمیزان $۱-۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه شد و ۵ میلی لیتر آن به فلاسکهای ۵۰۰CC محتوی ۱۰۰CC محیط داوه بدون آگار اضافه شد. فلاسکها روی شیکر بمدت ۱۴ روز با ۶۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا پالتها تشکیل شوند سپس محلول فوق از کاغذ فیلتر در قیف بوخنر با استفاده از دستگاه خلاء مکیده شده ، عصاره حاصله به روش ***Horsfall***به نسبت ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ درصد با محیط P.D.A در حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد ترکیب شد و در پتری ریخته شد(۹). بعد از انعقاد محیط‌ها حلقه های ۵ میلی متری ازکشت سه روزه پی تیوم در وسط پتریها قرار داده شد. در شاهد از آب مقطر استریل‌استفاده شد. این آزمایش در سه تکرار و بصورت طرح کامل تصادفی اجرا شد.

آمار برداری از قطر رشد کلنی پی تیوم ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد بعمل آمد.

۵ - کنترل پی تیوم توسط آنتاگونیستها در شرایط مزرعه

این آزمایش در سه مرحله اجراء شد.

الف - تهیه ایناکولوم ***Pythium***

پتری محتوی کشت هفت روزه پی تیوم در محیط P.C.A (هویج ،سیب زمینی ، آگار) را با میزان مشخص از آب مقطر استریل در مخلوط کن کاملا" بهم زده شد تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آمد . تعداد اووسپورها و اسپرانجیومها توسط لام گلبول شمار شمارش شد. سپس محلول فوق با خاک استریل و خاک مزرعه به نسبت مساوی طوری مخلوط شد که به میزان ۲۰۰۰ پروپاگال در هر گرم خاک رسید. خاک مذکور بصورت نواری در شیار بستر کاشت نخوددر مزرعه قرار داده شد.

ب - تهیه ایناکولوم تریکو درما و گلیوکلادیوم

قارچهای آنتاگونیست روی محیط P.D.A در شرایط نور فلورسانس سه هفته تا تولید انبوه اسپور نگهداری شدند. اسپورهای حاصله توسط اسکالپل از سطح محیط جمع آوری گردید و به بذور نخود جم در ارلن بمدت چند دقیقه بهم زده شد تا اسپورها سطوح بذرنخود را کاملا" بپوشاند . برای تعیین میزان اسپور روی هر بذر تعداد ۵ بذر در ارلن مایر۲۵۰ CC محتوی ۱۰۰CC آب مقطر شسته شد. از سوسپانسیون حاصله برای شمارش اسپور با هموسیتومتر (گلبول شمار)نمونه برداری شد تا میزان $۱-۵\times۱۰^{۷}$ اسپور

روی هر بذر قرار داده شود.

ج - کشت نخود در مزرعه

برای اینکار مزرعه ای که بمدت یکسال آیش بود در دانشکده کشاورزی کرج انتخاب شد . بافت خاک لومی و pH خاک برابر با ۶/۵ تعیین شد. تیمارها عبارتند از:

۱ - آغشته کردن اسپور تریکو درما و یریده با بذر نخود به نسبت $1-5\times10^{7}$

۲ - آغشته کردن اسپور گلیوکلادیوم با بذر نخود به نسبت $1-5\times10^{7}$

۳ - قارچکش متالاکسیل با بذر نخود به نسبت ۰/۳ گرم در هر کیلوگرم .

۴ - شاهد مزرعه :بذر بدون آغشته شدن به اسپر یا قارچکش و کشت در خاک مزرعه بدون آلودگی به پی تیوم

۵ - شاهد آلوده : بذر بدون آغشته شدن به اسپر یا قارچکش در خاک مزرعه‌باآلودگی به پی تیوم با میزان ۲۰۰۰ پروپاگال در گرم اینوکولم‌بمقدارمساوی‌باخاک مخلوط و در خطوط کاشت پخش شد.

نتایج

۱ - میزان فعالیت پارازیتی آنتاگونیست ها در روی کلنی ***Pythium***

در بررسی میکروسکوپی مشخص شد هیف قارچهای آنتاگونیست به موازات هیفهای جوان پی تیوم رشد کرده و با تولید مکه و آپرسوریوم و اتصال با آن ضمن تغذیه از مواد درون سلولی سبب‌تجزیه سیتوپلاسم ونهایتا"لیزشدن میسلیومهای‌پی تیوم می شوند.در رابطه با وضعیت آنتاگونیست ها از نظر رقابت غذایی و میزان کلنی زاسیون، همانطورکه درجدول شماره ۱مشخص‌گردیده جدا شده های ***G.virens, T.viride*** علیرغم رشد سریع پی تیوم به ترتیب ۹۰ و ۸۱ درصد پوشش فضای پتری دیش را اشغال نمودند و بعنوان جدا شده بسیار قوی شناخته شدند. جدا شده ***T.harzianum***با ۶۹ درصد پوشش در گروه خوب قرار گرفت.

در بررسی نحوه کلنی زاسیون آنتاگونیست ها روی پی تیوم بعد از یکهفته به ترتیب ***T.viride*** صد در صد . ***G.virens***نود درصد و ***T.harzianum*** شصت درصد سطح پتری محتوی پی تیوم را پوشاند و تولید اسپور نمودند و از این نظر ***G.virens, T.viride***در گروه قوی و ***T.harzianum***در گروه متوسط قرار گرفتند.

۲ -اثر ترکیبات فرار(گازی) آنتاگونیستهاروی رشدمیسلیومی ***Pythium***

بر اساس نتایج تجزیه واریانس و گروه بندی آماری از میزان رشد قطر کلنی پی تیوم در جدول ۲ مشخص شده است که جدا شده های ***T.harzianum, T.viride,G.virens***در کشت ۴۸ ساعته به ترتیب ۴۵/۵%، ۷۸% و ۵۲/۹% مانع رشد پی تیوم شده اند. در کشت ۹۶ ساعته میزان بازداری از رشد پی تیوم به ترتیب ۸۵/۱% ، ۸۵/۸%، ۹۰/۶% افزایش یافت. این نتایج نشان می دهد اولا" ترکیبات فرار بطور قابل ملاحظه ای مانع رشد پی تیوم شده اند دوما" هرچه کشت قارچ متراکم تر می شود میزان بازداری از رشد نیز بیشتر شده است .

۳ - قدرت بازدارندگی ترکیبات خارج سلولی آنتاگونیست ها روی رشد کلنی ***Pythium ultimum***

در این مرحله نیز ایزوله های آنتاگونیست ها از نظر تاثیر ترکیبات خارج سلولی بطور متفاوت و متغیر عمل نموده‌اند. بطوریکه

جدول ۱ - میزان فعالیت پارازیتی جدا شده های آنتاگونیست روی کلنی ***P.ultimum***بعد از ده روز انکوباسیون

نسبت کلنی زاسیون	درصد کلنی زاسیون	نسبت رقابت غذایی	درصد رقابت غذایی	جدا شده ها
قوی	۱۰۰	قوی	۹۰(۱)	***T.viride***
قوی	۹۱	قوی	۸۱	***G.virens***
متوسط	۶۳	خوب	۶۹	***T.harzianum***

(۱): اعداد جدول میانگین قطر رشد کلنی آنتاگونیست هابر حسب میلی متر در سه تکرار میباشد.

جدول ۲ - تاثیر ترکیبات فرار جدا شده های تریکو درما روی قطر رشد کلنی ***Pythium ultimum***

جدا شده (تیمارها)	سن جدا شده ها در مقابل پی تیوم	میانگین قطر رشد پی تیوم به میلی متر	درصد بازداری از رشد [۲] وگروه بندی آماری [۳]
T.haz,ianum	۴۸ ساعته	۴۰[۲]	۵۲/۹ c
	۹۶ ساعته	۱۲	۹۰/۶ b
T.viried	۴۸ ساعته	۱۸/۶	۷۸/۱ b
	۹۶ ساعته	۱۲	۸۵/۸ b
G.virens	۴۸ ساعته	۴۶/۳	۴۵/۵ C
	۹۶ ساعته	۱۲/۶	۸۵/۱ b
شاهد محیط کشت	۴۸ ساعته	۸۵	۰ a
	۹۶ ساعته	۸۵	۰ a

۱ - بدلیل وجود صفر در بین اعداد (x) از $\sqrt{X+\frac{1}{2}}$ برای تعدیل نرمال، استفاده شد.

۲ - اعداد جدول میانگین قطر رشد کلنی پی تیوم بر حسب میلی متر در سه تکرار می باشد.

۳ - بین تیمارهایی که با یک حرف نشان داده شده در سطح ۱ % اختلاف معنی دار وجود ندارد.

*G.virens, T.viride*در تمام غلظتهای بکار رفته هیچگونه اثری روی رشد میسلیومی پی تیوم نداشتند ولی*T.harzianum* در غلظت ۲۵ % توانسته بمیزان ۱۵/۲% از رشد کلنی پی تیوم جلوگیری نماید (جدول ۳).

۴ - اثر آنتاگونیست ها درکنترل پی تیوم در مزرعه

طبق تجزیه واریانس و گروهبندی آماری در تیمارهائیکه بذورنخود با اسپور *G.virens, T.viride*آغشته شده بودند، در صد جوانه زدن بذور به ترتیب ۵۷/۵% و ۶۱/۸۷% و در تیمار قارچکش متالاکسیل ۷۱/۸۷% تعیین شد. این سه تیمار در یک گروه آماری قرار گرفتند و با شاهد آلوده در سطح ۱ % اختلاف معنی داری داشتند(جدول ۴). بعد از کشت اندام آلوده نخود روی محیط P.D.A علاوه بر قارچ *P.ultimum* قارچهای,Spp *Macrophomina*, *Rhizoctonia solani, Fusarium solani* جدا گردید .

بحث

جدا سازی تریکودرما از خاک مزارع نخود نشان می دهد . در میکوفلور خاکهای زراعی عموما" قارچهای آنتاگونیست وجود دارد ولی تراکم آنها بواسطه استفاده از ترکیبات شیمیایی کاهش یافته است لذا افزایش جمعیت آنتاگونیستها اولین قدم برای بهبود شرایط میکروبی خاک محسوب می گردد.

بدلیل خصوصیات مختلف آنتاگونیستها که هر ایزوله را به لحاظ یک صفت منحصر به فرد می سازد امکان کاربرد صحیح آنها را در کنترل بیولوژیکی میسر می کند. در بررسی مکانیزم کنترل پی تیوم مشخص گردید هیپرپارازیتیسم نقش عمده ای دارد. در حالیکه ترکیبات فرار (گازی) تنها در شرایط خاص روی رشد میسلیومی پی تیوم موثر بوده، ترکیبات مایع خارج سلولی به عبارتی آنتی بیوز هیچگونه تاثیری در نابودی پی تیوم نداشتند . نتایج حاصله با کارهای لیف و همکاران (۱۲) در کنترل پی تیوم توسط گلیوکلادیوم روی پنبه مطابقت دارد.

در کنترل مزرعه ای پی تیوم، آنتاگونیست ها کم و بیش همتراز با قارچکش متالاکسیل توانستند درصد جوانه زنی بذور و ظهورگیاهچه نخود را افزایش دهند. همواره روشهای بکارگیری آنتاگونیست ها در مزرعه عامل اصلی در توسعه روشهای بیولوژیکی محسوب می گردد. نتایج این بررسی نیز یافته های دیگران که برای

جدول ۳ - درصد بازداری از رشد کلنی پی تیوم توسط مایع خارج سلولی جدا شده ها بعد از ده روز انکوباسیون

جدا شده ها	غلظت عصاره جدا شده ها بر حسب درصد				
	۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵
T.viride	۰ (۱)	۰	۰	۰	۰
G.virens	۰	۰	۰	۰	۰
T.harzianum	۱۵/۲	۳/۵	۰	۰	۰
Check	۰	۰	۰	۰	۰

(۱): اعداد جدول درصد بازداری از رشد پی تیوم بر حسب میلی متر میانگین سه تکرار می باشد.

جدول ۴ - میزان کنترل *P.ultimum* توسط آنتاگونیست ها در مقایسه با قارچکش متالاکسیل در مزرعه دانشکده کشاورزی کرج

تیمارها	میانگین تعداد گیاهچه های سالم	درصد گیاهچه های سالم و گروهبندی آماری (۲)	
متالاکسیل	۵۷/۵(۱)	۷۱/۸۷	a
G.virens	۴۹/۵	۶۱/۸۷	ab
T.viride	۴۶	۵۷/۵	b
شاهد مزرعه‌ای	۴۱/۵	۵۱/۸۷	b*
شاهد آلوده	۲۷/۷۵	۳۴/۶	c

۱ - میانگین ها بر اساس شمارش بوته های سالم در چهار تکرار آزمایش در مزرعه می باشد.

۲ - بین تیمارهاییکه با یک حرف یا حروف مشابه نشان داده شده اختلاف معنی دار وجودندارد.۲

* : نشانه آلودگی طبیعی خاک است .

کنترل پی تیوم روی نخود انجام شده و با استفاده از $۱۰^{۷}$×۵-۱ اسپور پنی سیلیم و تریکو درما توانستند درصد گیاهچه های سالم را بین ۲۸-۲۵ درصد افزایش دهند مطابقت دارد (۱۲ و ۱۶) .

جدا سازی قارچهای پاتوژن مثل فوزاریوم و ریزوکتونیا از ناحیه ریشه و طوقه نخود در تیمار شاهد نشانه دامنه حفاظت وسیع قارچهای آنتاگونیست علیه پاتوژنهای متعدد خاکزی است (۲ و ۵).

بهرحال در این تحقیق کوشش شد برخی از مسائل مبارزه بیولوژیک با *P.ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود روشن شود ولی بلاشک تحقیقات بیشتر برای تهیه ایزوله های مناسب و سازگار با شرایط خاکهای ایران و بررسیهای آزمایشگاهی بمنظور شناسائی ترکیبات خارج سلولی آنتاگونیستها (آنتی بیوتیکها) و تحقیقات کاربردی در این زمینه را می طلبد.

مراجع مورد استفاده

سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق ازاعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران تامین شده که بدینوسیله نویسندگان از معاونت های پژوهشی دانشگاه و دانشکده کشاورزی تشکر می نمایند.

مراجع مورد استفاده *REFERENCES*

۱ - بصیری ،ع . ۱۳۶۲ . طرحهای آماری در علوم کشاورزی ، انتشارات دانشگاه شیراز چاپ دوم ۵۹۵ صفحه .

۲ - روحانی ،ح ، ع . کریمی و ف ،نوعپرست . ۱۳۷۰ . نقش ایزوله های تریکودرما در مبارزه بیولوژیک علیه ***Rhizoctonia solani*** مجله آفات و بیماریهای گیاهی ،موسسه بررسی آفات و بیماریها گیاهی اوین . ایران . جلد ۵۸ (۲ و ۱) : ۲۹ - ۱۷.

۳ - زکیئی ،ز.۱۳۵۴ . بررسی پدیده آنتاگونیسم بین ***Trichoderma***و قارچ ***Pyricularia oryzae***پایان نامه فوق لیسانس گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی ،دانشگاه تهران ،کرج ،۶۴ صفحه .

۴ - شهریاری ،د.۱۳۷۳. کنترل بیولوژیکی ***Pythium ultimum*** Trow عامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه نخود توسط قارچهای آنتاگونیست ***Trichoderma*** spp پایان نامه کارشناسی ارشد . رشته های بیماری شناسی گیاهی . دانشگاه تربیت مدرس . ۱۲۶ ص.

۵ - ظفری ،د. ۱۳۷۰ . بررسی اثر آنتاگونیسم قارچ ***Trichoderma*** علیه قارچهای ***Phytophthora erythroseptica, Colletotrichum coccodes*** جدا شده از سیب زمینی ،پایان نامه فوق لیسانس ،گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ،کرج ،۱۶۷ صفحه.

۶ - کرم پور ،ف.۱۳۷۱. مبارزه بیولوژیک با عامل پوسیدگی سیاه فوزاریومی ریشه نخود ایرانی بوسیله قارچ آنتاگونیست ***Trichoderma***پایان نامه فوق لیسانس گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی کرج ،۱۵۴ ص.

7 - Denis,C.& Webster,J. 1961.Antagonistic properties of species groups of Trichoderma . II production of volatile antibiotic. Trans. By mycol. soc.57.41-48.

8 - Hartley, C.1921.Damping -off in forest nurseries U.S.Dep Agr.Dept .Bull. 934.99p.

9 - Herman , G.E. , 1981. Factor effecting Trichoderma hamatum applied to seed as a biocontrol agent. Phytophathology . 71:569-572.

10- Horsfall, J.G. 1956. Principles of Fungicidal action. Waltham Mass.U.S.A.350 p.

11- Howell, C.R. 1982. Effect on Gliocladium virens on Pythium ultimum, Rhizoctonia solani and damping - off of cotton seedling phytopathology . 72:496-498.

12- Kaiser, W.J.& Hannan , R.M. 1984.Biological control of seed rot and preemergence damping- off of chickpea with Penicillium oxalicum. Plant Dis.98:806-811.

13- Lifshitz, R. , B.sneb, & R.Baker, 1984. Soil suppressiveness to a plant pathogenic Pythium species . Phytopathology 74:1054-1061.

14- Lumsden,R.D. & Lock, J.C. 1989. Biological control of damping - off caused by Pythium ultimum and Rhizoctonia solani with Gliocladium virens in soilless Mix. Phytophathology 79:361-366.

15- Rafai, M.A 1989.A revision of the genus Trichoderma .Mycological papers. Common wealth . mycological institute Kew survey. England.ni.116:56 pp

16- Windling , R & Emerson, O.H. 1936. The isolation a Toxic substance from the culture filtrate of Trichoderma .phytopathol. 26:1068-1070.

Biological Control of *Pythium ultimum* ,Trow,The Causal Agent Of Chickpea Seed-rot and Damping -off Disease by Antagonistic Fungi

D.SHAHRIARY , M.OKHOVVAT AND H.ROUHANI

Plant pests and Diseases Institue Varamin, Associate Professor College of Agriculture , University of Tehran and Associate Professor College of Agriculture ,University of Bouali , Hamadan ,Iran

Accepted 17 Jan.1996.

SUMMARY

Biological control of chickpea seed-rot and damping -off caused by ***Pythium ultimum***was studied , using an antagonistic fungus (***Trichoderma harzianum***) isolated from the soil of a chickpea field in Karaj and two other isolates received from the College of Agriculture, Karaj. In laboratory tests ***Trichoderma harzianum*** , ***T. viride and Gliocladium virens*** were tested for nutrition competition and colonization in double culture method on PDA againsts ***Pythium ultimum*** . The effects of volatile and nonvolatile compounds of these antagonists were very different. ***T.viride and G.virens*** had very strong mycoparasitism effect on the ***pythium*** , but their antibiosis effects were weak, ***T.harzianum*** had diverse activities .Isolates of ***T.viride*** and G.virens were used in the field trials. In these tests , the antagonists at the rate of $1\text{-}5\times10^7$ spores/seed Metalaxyl 25% (0.3gr. / Kgr.seed) was used for seed treatments .Seeds were planted in the field (of Agricultural College in Karaj) . The soil was inoculated with ***Pythium*** by 2000 propagules per gram. This experiment was carried out with 4 replications in completely randomized block design and included infected and natural controls. 27 days after seedling emergence , percentage of seed germination was counted, The results indicated ***G.virens, T.viride*** and Metalaxyl treatments were highly significantly different than the inoculated control.