Iranian Journal of Weed Science
Vol 16, No 1, 2020 (27-36)
DOI: 10.22092/IJWS.2020.1601.1326

مجله دانش علف‌های‌هرز
دورهٔ ۱۶، شمارهٔ ۱، ۱۳۹۹ (ص ۳۶-۲۷)

بررسی اولیه کنترل زیستی برخی از علف‌های‌هرز مهم مزارع گندم با استفاده از جدایه‌های فوزاریوم ریشه آن‌ها

فرشید نورالوندی[۱]، حسن علیزاده[۲*]، حسین صارمی[۳]، غلامرضا صالحی جوزانی[٤]

۱- دانشجوی دکتری علوم علف‌های هرز، دانشگاه تهران، ۲-استادگروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۳- استادگروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ٤- استاد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/٤/۲۲)

چکیده

در این تحقیق، امکان بهره‌گیری از جدایه‌های قارچ فوزاریوم (*Fusarium* spp.)، در ارتباط با ریشه برخی علف‌های‌هرز مهم مزارع گندم به عنوان عامل کنترل زیستی آن‌ها مطالعه شد. بذرهای جودره (*Hordeum spontaneum*)، یولاف وحشی (*Avena ludoviciana*)، چاودار (*Secale cereale*)، خردل وحشی (*Sinapis arvensis*) و شلمی (*Rapistrum rugosum*) روی خاک نمونه‌برداری شده از مزارع گندم استان‌های آذربایجان شرقی، البرز، تهران، خراسان رضوی، خراسان شمالی، خوزستان، فارس، قزوین، قم، کرمانشاه، گلستان، مازندران و همدان در شرایط گلخانه کشت و جدایه‌های فوزاریوم ریشه این گیاهان، جداسازی شدند. در مرحله اول، زیست‌سنجی روی گیاهچه گیاه حساس کاهو (*Lactuca sativa*) به عنوان گیاه محک و در مرحله بعدی روی گیاهچه‌های علف‌های‌هرز انجام شد. در زیست‌سنجی، اثر بازدارندگی جدایه‌ها بر رشد ریشه‌چه (≤۷۰ درصد) به عنوان معیار کنترل موثر در نظر گرفته شد. در نهایت، برای ارزیابی میزبان‌گزینی اختصاصی، زیست‌سنجی جدایه‌ها روی گیاهچه گندم رقم سیوند انجام شد. جدایه‌هایی که به میزان مناسبی باعث بازدارندگی رشد ریشه‌چه علف‌های‌هرز شدند اما برای گندم ایمن بودند (کاهش رشد ریشه‌چه ≥ ۱۰ درصد)، با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی شناسایی شدند. نتایج نشان داد که یک جدایه از قارچ *F. oxysporum* در کنترل انتخابی خردل وحشی و شلمی، یک جدایه از قارچ *F. brachygibbosum* در کنترل انتخابی جودره و یک جدایه از قارچ *F. equiseti* در کنترل انتخابی جودره و یولاف وحشی به طرز موفقیت آمیزی عمل کردند. آگاهی از میکروارگانیسم‌های مناسب برای کنترل زیستی علف‌های‌هرز می‌تواند در تنوع بخشیدن به روش‌های موجود و حفظ ثبات کارایی علف‌کش‌های شیمیایی موجود یاری رسان باشد.

کلمات کلیدی: ریشه، فوزاریوم، گندم، گیاه محک، میزبان گزینی

Initial investigation of biological control of some important weed species of wheat fields using Fusarium isoaltes of the root

Farshid Nooralvandi[1,2], Hasan Alizadeh[2*], Hosein Saremi[3] and Gholamreza Salehi Jozani[4]

1. PhD student of Weed Science, 2. Agronomy and Plant Breeding Department, University of Tehran, 3. Plant Protection Department, University of Tehran, 4. Agricultureal Biotechnology Research Institute of Iran
(Received: April 17, 2019 - Accepted: July 13, 2019)

ABSTRACT

In this research, the biological potential of rhizosphere Fusarium (*Fusarium* spp.) species to control some important weeds of wheat fields was studied. In the greenhouse, wild barely (*Hordeum spontaneum*), wild oat (*Avena ludoviciana*), rye (*Secale cereale*) wild mustard (*Sinapis arvensis*), and turnipweed (*Rapistrum rugosum*) seeds were planted on the soils sampled from wheat fileds of East Azerbayejan, Alborz, Tehran, North Khorasan, Razavi Khorasan, Khouzestan, Fars, Qazvin, Qom, Mazandaran, Kermanshah, Hamedan and Golestan provinces. Fusarium species of plants root were isolated. Effect of Fusarium isolates on seedling radicle length was considered as the criteria for successful control (inhibition of radicle length≥ 70%) in the bioassay experiments. In the first step of bioassay experiments, lettuce (*Lactuca sativa*) seedling was used as a test plant and the next step was carried out on mentioned weed species. Finally, wheat seedling of Sivand cultivar was used to evaluate the host specifity of selected isolates from pervious stages. Isolates with efficient inhibitory effects on weeds with least inhibitory (seedling radicle reduction≥ 10%) effect on wheat, were determined as successful selective biological control agents and identified with morphological and molecular methods. Results showed that one isolation of *F. oxysporum* on wild mustard and turnipweed, one isolate of *F. brachygibbosum* on wild barely and one isolate of *F. equiseti* on wild barely and wild oat, controlled the species very effectively. Knowledge about microbial agenets for biological control of weed species could be helpful in diversifying current management methods and maintenance of efficacy of available chemical herbicides.

Keywords: *Fusarium*, host specifity, root, test plant, wheat

* Corresponding author E-mail: malizade@ut.ac.ir

مقدمه

علف‌های‌هرز یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در اکوسیستم‌های زراعی هستند. در حال حاضر علف‌کش‌ها مهم‌ترین و مؤثرترین ابزار مدیریت علف‌های‌هرز در ایران و جهان می‌باشند (Westwood *et al*., 2018; Zand *et al*., 2009) و اثرات نامطلوب آن‌ها بر سلامت انسان، محیط زیست و بروز پدیده مقاومت در علف‌های‌هرز مطرح است. بر این اساس گرایش به سمت مدیریت غیرشیمیائی علف‌های‌هرز رو به افزایش است (Kremer & Kennedy, 1996). در ایران کنترل شیمیائی علف‌های‌هرزی مانند جودره (*Hordeum spontaneum* Koch)، چچم (*Lolium* spp.)، چاودار (*Secale cereale* L.)، یولاف وحشی (*Avena* spp.)، خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.) و شلمی (*Rapistrum rugosum* L.)، با چالش‌های بسیاری از جمله مقاومت به علف‌کش‌ها و یا تحمل ذاتی آن‌ها نسبت به اغلب گزینه‌های علف‌کشی موجود در بازار روبرو است (Montazeri *et al*., 2003; Payedar *et al*., 2009; Derakhshan *et al*., 2015).

کنترل زیستی علف‌های‌هرز به عنوان رهیافتی مهم و امیدبخش در روش‌های مدیریت تلفیقی علف‌های‌هرز مطرح است (Aldrich,1984) اما این رهیافت برای مؤثر واقع شدن نیازمند در اختیار داشتن ابزار مناسب است. از حشرات و قارچ‌ها به شکل تجاری برای کنترل برخی گونه‌های گیاهی مزاحم استفاده شده است (Van Lenteren *et al*., 2018). در این راستا، میکروارگانیسم‌ها ابزار بالقوه مناسبی برای اجرایی کردن استراتژی‌های کنترل زیستی علف‌های‌هرز هستند (Stubbs & Kennedy, 2012). سابقه استفاده از علف‌کش‌های زیستی با عامل قارچی (Mycoherbicides)، به دهه هفتاد میلادی باز می‌گردد (Beest *et al*., 1992). با توجه به این که علف‌های‌هرز خانواده گندمیان (Poaceae) از نظر فیزیولوژیکی به گندم و جو نزدیک بوده و با محدودیت وجود علف‌کش‌های اختصاصی و استعداد بالای بروز مقاومت به علف‌کش‌ها برخوردار هستند (Tranel *et al*., 1993)، اتخاذ روش‌های کنترل زیستی این علف‌های‌هرز، بسیار مفید ارزیابی شده است.

مطالعات مختلفی در مورد بهره‌گیری میکروارگانیسم‌های موجود در منطقه ریزوسفر و همچنین اندوفیت‌های ریشه علف‌های‌هرز برای کنترل زیستی آن‌ها وجود دارد (Skipper *et al*., 1996; Stubbs & Kennedy, 2012; Kremer, 2013). برای مثال، ریزوباکتری‌های زیان آور[1] از جمله میکروارگانیسم‌هائی هستند که روی ریشه گیاهان کلنی‌سازی کرده و موجب بازداری از رشد آن‌ها می‌شوند (Lakshmi *et al*., 2015) و این نقش آن‌ها، موضوع چندین مطالعه بوده است (Park *et al*., 2015; Abbas *et al*., 2017). همچنین گونه‌های مختلف قارچ‌های منطقه ریزوسفر به عنوان عامل کنترل زیستی مطالعه و پیشنهاد شده‌اند (Ahluwalia, 2007). برای مثال، انواع گونه‌های قارچ فوزاریوم (*Fusarium* spp.) در این راسته قرار دارند و خاصیت بیماری‌زائی آن‌ها موضوع مطالعات زیادی بوده است (Pearson *et al*., 2016; Mrema *et al*., 2017). در واقع اعضای این جنس، به عنوان یکی از مهم‌ترین قارچ‌های قابل استفاده در کنترل زیستی علف‌های هرز مطرح می‌باشند (Kermer, 2013).

متاسفانه در کشور ما، اطلاعات در رابطه با طیف قارچ‌های ریزوسفر و اندوفیت ریشه علف‌های‌هرز

[1] - Deleterious rhizobacteria

محدود است. اولین قدم در رابطه با درک روابط میان علف‌های‌هرز و میکروارگانیسم‌های همراه آن‌ها، آگاهی از طیف میکروبی است که گیاه در ارتباط با آن‌ها قرار دارد. چنین مطالعاتی در درک بهتر نحوه تعامل یک علف‌هرز با محیط اطراف خود بسیار مفید است (Cibichakravarthy *et al.*, 2012). برخورداری از چنین دانشی، امکان یافتن عوامل کنترل زیستی کارامد را به عنوان یک ابزار جایگزین در کنار مدیریت شیمیایی و در نتیجه تنوع بخشیدن به روش‌های کنترل علف‌های‌هرز فراهم می‌کند. با توجه به مطالب بیان شده، این تحقیق با هدف مطالعه جدایه‌های فوزاریوم ریزوسفر علف‌های‌هرز جودره، یولاف وحشی، چاودار، خردل وحشی و شلمی و ارزیابی امکان بهره‌گیری از آن‌ها به عنوان ابزار کنترل زیستی این علف‌های هرز مهم گندم اجرا شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری مواد آزمایشی

نمونه‌های خاک، از مزارع گندم استان‌های آذربایجان شرقی، البرز، تهران، خراسان رضوی، خراسان شمالی، خوزستان، فارس، قزوین، قم، کرمانشاه، گلستان، مازندران و همدان جمع آوری شدند. از هر استان، سه تا پنج مزرعه با سابقه کشت گندم در نقاط مختلف انتخاب شدند و نمونه برداری به‌صورت سیستماتیک، از عمق پنج تا ۳۰ سانتی‌متری خاک انجام شد. در نهایت نمونه‌های خاک مربوط به هر استان با یکدیگر مخلوط شدند و به عنوان نمونه نهایی خاک همان استان مورد استفاده قرار گرفت.

کشت گیاهان

ابتدا بذرهای جودره، یولاف وحشی، چاودار، خردل وحشی و شلمی ضد عفونی سطحی شدند و در شرایط آزمایشگاهی روی تشتک پتری‌دیش جوانه‌دار شدند. برای این منظور، بذرها کاملا با آب مقطر شسته شدند و سپس به ترتیب در الکل ۷۰ درصد، هیپوکلرید سدیم یک درصد و دوباره در الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. در مورد شلمی و خردل وحشی، هر بار قرار گرفتن در محلول ضدعفونی کننده ۴۵-۳۰ ثانیه و در مورد در مورد گندم، جودره، یولاف وحشی و چاودار ۱۲۰ ثانیه بود. در نهایت بذرها سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. بذرهای جوانه‌دار شده روی نمونه‌های خاک درون گلدان‌های استوانه‌ای شکل به قطر ۱۰ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر در شرایط گلخانه کشت شدند. پس از ۴۰-۳۰ روز و در مرحله پنج تا شش برگی، گیاهان با دقت از خاک خارج شدند و ریشه‌ها از محل طوقه جدا شدند.

جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها از ریشه

ریشه‌های گیاهان کاملا با آب مقطر اتوکلاو شده شسته شدند و به همان روش اشاره شده در مورد بذرها، ضدعفونی شدند. زمان لازم برای ضدعفونی ریشه هر یک از گونه‌های مورد مطالعه، بر اساس حذف تمام میکروارگانیسم‌های موجود در سطح ریشه و باقی ماندن قارچ‌هایی که در داخل بافت ریشه نفوذ کرده و کلونی‌سازی کرده بودند بود در نظر گرفته شد. برای رسیدن زمان مطلوب از نتایج مربوط به پیش تیمارها استفاده شده که نشان داده بود که در زمان‌های طولانی‌تر ضدعفونی، به علت از بین رفتن بافت ریشه و میکروارگانیسم‌های داخل آن، تقریبا دیگر هیچ گونه قارچی از ریشه قابل کشت نبود.

ریشه‌ها به قطعاتی به طول حدوداً یک سانتی‌متر تقسیم شدند و روی محیط کشت اختصاصی فوزاریوم، پنتاکلرو نیتروبنزن پپتون-آگار[1] (PPA) (Isack *et al.*, 2014)، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت و شروع رشد

[1] -Penta chloro nitrobenzene peptone agar

قارچ از داخل ریشه، قسمتی از میسلیوم آن برداشته شد و به محیط کشت آب-آگار[1] (TWA) دو درصد منتقل شد. برای خالص‌سازی جدایه‌ها، از روش برداشتن نوک هیف[2] استفاده شد (Jensen *et al.*, 2013). بسته به سرعت رشد هر جدایه قارچ روی این محیط، پس از ۷۲-۲۴ ساعت نوک هیف تهیه شد و به محیط سیب‌زمینی دکستروز-آگار[3] (PDA) منتقل شد. به این ترتیب جدایه‌ها از ریشه گیاه جداسازی و سپس خالص‌سازی شدند.

زیست‌سنجی جدایه‌های فوزاریوم روی گیاهان

با توجه به این‌که در اغلب مطالعات مربوط به جداسازی میکروارگانیسم‌ها از بافت‌های گیاهی، با تعداد قابل ملاحظه‌ای جدایه میکروبی روبرو هستیم، استفاده از روش‌های کارامدی که امکان غربال‌گری سریع و مؤثر را فراهم می‌کنند، بسیار اهمیت دارد. بر همین اساس، در مرحله اول، از گیاهچه گیاه حساس کاهو (*Lactuca sativa* L.) به عنوان گیاه محک برای غربال‌گری استفاده شد (Aroca *et al.*, 2013) و خاصیت احتمالی بازدارندگی تمام جدایه‌های قارچی روی این گیاه آزمایش شد.

برای زیست‌سنجی مؤثر، از محیط دولایه برنج-آگار[4] (RAM) و TWA استفاده شد (Kremer, 2013). گزارش کرمر مبنی بر این‌که قارچ در محیط RAM به خوبی رشد کرده و توکسین‌های فراوانی ترشح می‌کند (Kremer, 2013)، علت استفاده از این محیط بود و در نتیجه می‌توان جدایه‌هایی را که به صورت بالقوه حاوی توکسین‌های به خصوصی هستند را بهتر غربال کرد. همچنین محیط TWA رقیق شده این امکان را فراهم می‌کند که ریشه‌های گیاهچه‌ها، ضمن رشد مطلوب به داخل آن، در تماس با توکسین‌های رها شده از جدایه قارچی در این محیط قرار گیرند.

در این مرحله، ابتدا محیط RAM، درون ظرف‌های شیشه‌ای استوانه‌ای شکل کشت بافت به قطر هشت و ارتفاع شش سانتی‌متر ریخته شد و سپس پلاگ[5]های قارچی جدایه‌های مورد نظر روی آن کشت شدند. پس از این‌که میسلیوم‌های قارچ رشد کردند و تمام سطح محیط RAM را پوشاندند (در حدود پنج تا هفت روز بسته به جدایه‌های مختلف)، محیط TWA رقیق شده (۰/۵ درصد) به ارتفاع تقریبی یک سانتی‌متر، روی محیط RAM و قارچ رشد کرده روی آن ریخته شد.

بذرهای کاهو ضد عفونی شده (طبق روشی که قبلا بیان شد و به مدت ۴۵-۳۰ ثانیه درون هر محلول ضدعفونی کننده)، روی محیط TWA دو درصد کشت داده شدند. به محض خروج ریشه‌چه (اندازه تقریبی یک تا دو میلی‌متر)، بذرهای جوانه‌دار شده روی محیط دولایه RAM و TWA رقیق شده منتقل شدند. تعداد ۱۵ گیاهچه کاهو برای هر تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد. برای شاهد هر آزمایش تمام مراحل بیان شده انجام شد، با این تفاوت که روی محیط RAM، قارچ کشت نشده بود. شیشه‌های کشت بافت در ژرمیناتوری با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط هشت ساعت نور و ۱۶ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بازدارندگی (درصد کاهش رشد ریشه‌چه در مقایسه با شاهد) روی رشد ریشه‌چه گیاهچه کاهو پس از هفت روز ارزیابی شد.

جدایه‌های قارچی که مقدار قابل قبولی از درصد بازدارندگی (≥۷۰) را روی گیاهچه کاهو نشان داده بودند، به مرحله بعد منتقل شدند. روش کار این

[1] - Tap Water agar
[2] - Hyphal tip method
[3] - Potato dextrose agar
[4] - Rice agar medium
[5] - Plug

مرحله، مشابه با مرحله قبل بود تنها با این تفاوت که زیست‌سنجی روی علف‌های هرز هدف صورت گرفت. برای این منظور تعداد ۱۰ گیاهچه شلمی و خردل وحشی و پنج گیاهچه جودره، یولاف وحشی و چاودار روی هر ظرف شیشه‌ای کشت بافت و در پنج تکرار (طرح کاملا تصادفی) قرار داده شدند. مانند مرحله قبل، در این مرحله نیز شاهدی در نظر گرفته شد با این تفاوت که به جای گیاهچه کاهو، از گیاهچه علف‌های‌هرز مورد مطالعه استفاده شد. ارزیابی خاصیت بازدارندگی بر رشد ریشه‌چه نیز مانند روش اشاره شده در مرحله قبل انجام شد.

در مرحله نهایی، برخورداری از ویژگی میزبان گزینی اختصاصی[1] جدایه‌های قارچی که روی جودره، یولاف وحشی، چاودار، خردل وحشی و شلمی بازدارندگی مطلوب (بیش از ۷۰ درصد) ایجاد کرده بودند ارزیابی شد. برای این منظور، زیست‌سنجی جدایه‌هایی که از مرحله قبل انتخاب شده بودند، روی گیاهچه گندم رقم سیوند انجام شد. روش زیست‌سنجی جدایه‌ها روی گیاهچه گندم کاملا مانند مراحل قبل بود، با این تفاوت که اثر احتمالی بازدارندگی رشد جدایه‌ها روی گیاهچه گندم ارزیابی شد (پنج گیاهچه گندم روی هر ظرف شیشه‌ای کشت بافت و در پنج تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی در نظر گرفته شد). در نهایت، جدایه‌هایی برای گندم ایمن در نظر گرفته شدند که میزان بازدارندگی کمی (کمتر از ۱۰ درصد) روی گیاهچه‌های گندم نشان داده بودند. این جدایه‌ها با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی شناسایی شدند.

شناسایی جدایه‌های منتخب

برای شناسایی جدایه‌های خالص سازی شده از روش‌های مورفولوژیک و مولکولی استفاده شد. لازم به ذکر است که شناسایی در مورد جدایه‌هایی انجام شد که در مرحله زیست‌سنجی، به عنوان یک عامل کنترل زیستی مناسب تشخیص داده شده بودند. برای شناسائی مورفولوژیک، هر یک از جدایه‌ها روی محیط‌های کشت PDA، آگار مغذی شده مصنوعی[2] (SNA) و برگ میخک آگار[3] (CLA) منتقل شدند و ویژگی‌های رشدی و مورفولوژیک آن‌ها مشاهده، اندازه‌گیری و ثبت شد (Rahjoo *et al.*, 2008). این ویژگی‌ها عبارت بودند از: رنگ و قطر کلونی در محیط PDA، وجود و عدم وجود اسپورودوکیوم[4] و ماکروکنیدی[5] و خصوصیات ظاهری آن‌ها، وجود و یا عدم وجود میکروکنیدی[6] و خصوصیات ظاهری آن (تعداد سلول، شکل گرزی یا سیلندری و ...)، وجود یا عدم وجود فیالیدها[7]، کلامیدوسپور[8] و شکل ظاهری آن‌ها. این ویژگی‌ها در جدول مخصوصی که به عنوان یک کلید برای شناسائی جدایه‌ها در نظر گرفته شده بود ثبت شدند و در نهایت شناسائی مورفولوژیک، با در نظر گرفتن این شاخص‌ها و با استفاده از منابع معتبر (Leslie *et al.*, 2006) انجام شد.

شناسایی جدایه‌ها به روش مولکولی با استفاده از روش تکثیر و توالی یابی ژن tef انجام شد. برای استخراج DNA ژنومی قارچ از روش ژانگ و استفنسون (Zhong & Steffenson, 2001) با اعمال اندکی تغییرات استفاده شد. برای تهیه میسلیوم، قارچ روی محیط کشت PDA رشد داده شد. تشتک‌های پتری، به مدت یک هفته در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از رشد کافی پرگنه قارچ، بافت قارچی با استفاده از اسکالپل استریل، از

[1] - Host specificity

[2] - Synthetic nutrient agar
[3] Carnation leaf agar
[4] - Sporodochium
[5] - Macroconidia
[6] - Microconidia
[7] - Phialide
[8] - Chlamydospore

روی محیط کشت به درون تشتک پتری خراش داد شد و مستقیماً به داخل هاون‌های چینی سترون منتقل شد. از این میسلیوم‌ها برای استخراج DNA استفاده شد. به منظور ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از ژل آگاروز ۰/۸ درصد و دستگاه نانودارپ (Implen Inc.1000) استفاده شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، با استفاده از آغازگرهای ویژه مربوط به ژن tef صورت گرفت (جدول ۱) و از تکثیر بخشی این ژن، درجهت تعیین توالی استفاده شد (Geiser *et al.*, 2004). پس از قرار دادن میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری در دستگاه ترموسایکلر، برنامه حرارتی به منظور تکثیر DNA در ۳۵ چرخه (مراحل واسرشت‌سازی، اتصال آغازگر و بسط) تنظیم شد.

جدول ۱- آغازگرها برای تکثیر نواحی ژنی tef

Table 1. Primers for replication TEF gene regions

Primer name	Primer orientation	Primer sequence	Reference
EF1T	Forward	5´ATGGGTAAGGAGGACAAGAC3´	Geiser et.al., (2004)
EF2T	Reverse	5´GGAAGTACCAGTGATCATGTT3´	

محصولات تکثیرشده برای خالص‌سازی و توالی یابی[1] نوکلئوتیدی، به یک شرکت معتبر در این زمینه در کشور کره جنوبی فرستاده شد. بعد از دریافت توالی‌های DNA، این توالی‌ها در بانک ژن NCBI، بلاست[2] و مشابهت‌یابی شدند (Altschul *et al.*, 1997). با قرار دادن اطلاعات به‌دست آمده از شناسایی مورفولوژیک و مولکولی در کنار یکدیگر، شناسایی قطعی جدایه‌های فوزاریوم انجام شد.

روش تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار R انجام شد و میانگین داده‌ها با کمک آزمون LSD محافظت شده ($P<0.05$) مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بیش از ۳۵۰ جدایه مختلف از ریشه علف‌های‌هرز کشت داده شده روی خاک مزارع گندم استان‌های آذربایجان شرقی، البرز، تهران، خراسان شمالی، خراسان رضوی، خوزستان، قزوین، قم، کرمانشاه، گلستان، مازندران و همدان جداسازی شدند. در غربال‌گری ابتدایی صورت گرفته با استفاده از زیست‌سنجی این جدایه‌ها روی گیاهچه حساس کاهو، ابتدا ۹۴ جدایه که باعث ایجاد بازدارندگی از رشد ریشه‌چه به میزان حداقل ۷۰ درصد یا بیشتر شده بودند، شناسایی شدند (داده‌ها نشان داده نشده است) و سپس زیست‌سنجی آن‌ها روی علف‌های‌هرز هدف انجام شد.

از میان جدایه‌های انتخاب شده از مرحله قبل، ۲۰ جدایه روی حداقل یکی از علف‌های‌هرز، اثر بازدارندگی قابل قبول نشان دادند (جدول ۲). چهار جدایه برای گندم، ایمن بود و بازدارندگی قابل قبولی بر کاهش وزن ریشه‌چه گندم نشان داد. یک جدایه *F. oxysporum* isolate A15 روی علف‌های‌هرز شلمی و خردل وحشی، به ترتیب ۸۹/۳ و ۷۵ درصد بازدارندگی نشان داد (جدول ۲). این جدایه، رشد ریشه‌چه گندم را ۱/۵ درصد افزایش داد.

جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از گذشته به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های فوزاریوم برای کنترل انتخابی علف‌های‌هرز مطرح بوده‌اند. این قارچ به عنوان اندوفیت گیاهان زراعی و وحشی نیز گزارش شده (Bacon & Hinton, 1996; Leslie *et al.*, 1990) و برای مثال در کنترل انتخابی گل جالیز (*Orobanche*

[1]- Sequencing
[2] - Blast

.spp) و استرایگا (*Striga hermonthica*) استفاده شده است (Ciotola *et al*., 1995; Kroschel *et al*., 1999).

جدول ۲- اثر بازدارندگی جدایه‌های مختلف قارچ فوزاریوم (*Fusarium* spp.) روی رشد ریشه‌چه گندم (*Triticum aestivum*) و برخی از علف‌های‌هرز

Table 1. Inhibitory effects of *Fusarium* spp. isolats on wheat and some weeds radicle growth

Isolate*	Radicle length inhibition%					
	Hordeum spontaneum	*Avena ludoviciana*	*Secale cereale*	*Rapistrum rugosum*	*Sinapis arvensis*	*Triticum aestivum*
F. oxysporum isolate A15	29.5 (4)	39 (9)	-	89.3 (7)	75 (4.3)	-1.5 (0.9)
Fusarium spp. isolate H49	60.4 (7.2)	63.7 (4.2)	-	15.6 (6.2)	-	90.7 (2)
Fusarium spp. isolate R3	77 (6)	54.3 (7)	-	15.6 (6)	-	34.9 (5.4)
Fusarium oxysorum isolate R70	72.8 (4)	76.7 (3.2)	-	100 (0)	100 (0)	50.3 (6.4)
Fusarium spp. isolate H106	68.7 (8.2)	28.7 (4.1)	-	84 (3.7)	42 (5)	44.3 (6.3)
Fusarium spp. isolate H29	79.2 (8)	29 (7)	-	33.3 (5)	-79.7 (9.5)	31.6 (3)
Fusarium torulosum isolate R58	73.6 (3.2)	-	-	4.9 (3.5)	-	28.2 (6.2)
F. brachygibbosum isolate A7	84.1 (6)	34.3 (7)	-	3.1 (2.2)	6 (1.3)	-4.4 (2.8)
Fusarium spp. isolate A59	-	60 (3.6)	-	100	-	40.4 (4.1)
Fusarium spp. isolate A49	77.3 (2.6)	31.3 (6.7)	-	100	83.7 (5.1)	26.3 (5.4)
Fusarium spp. isolate H108	68.7 (8.2)	28.7 (6.1)	11.7 (4.1)	83.1 (7.4)	58 (4.5)	24.2 (2.7)
Fusarium spp. isolate H5	74 (6.4)	-	-	19.6 (6.8)	-	50.1 (3)
Fusarium redolens isolate H47	78.2 (2.8)	-	-	100 (0)	-	34.7 (3.9)
Fusarium spp. isolate A1	51.2 (6)	46.3 (4.1)	18 (3.6)	80.4 (6.3)	70 (3.4)	30.1 (5.2)
Fusarium equiseti isolate A20	63.3 (3.2)	76 (4.4)	-	-	-	3.0 (2.5)
Fusarium equiseti isolate A24	24.7 (7)	45.3 (8.2)	-	-30.2 (6.5)	71 (10)	-6.7 (4.6)
Fusarium spp. isolate R62	73.5 (6)	36.7 (6)	9.7 (5)	100 (0)	93 (4.4)	-3 (1.9)
Fusarium spp. isolate H65	65.5 (7)	66 (4.2)	16 (5.7)	84.4 (5.5)	-	37.7 (4.2)
Fusarium spp. isolate R55	77.7 (4.4)	63 (5.2)	53.3 (4.3)	100 (0)	-	55.2 (5.4)
Fusarium oxysporum isolate H114	36 (2)	14 (4.5)	29 (7)	82 (11)	56 (3)	28 (3)

* اغلب جدایه‌هایی که برای گندم ایمن نبوده‌اند (بازدارندگی رشد ریشه‌چه بیش از ۱۰ درصد)، در حد گونه شناسایی نشده‌اند. اعداد داخل پرانتز و "-"، به ترتیب نشان دهنده خطای استاندارد و اثر نامشخص روی گونه خاص می‌باشد. مقادیر منفی در کنار برخی اعداد، نشان دهنده تحریک رشد در نتیجه کاربرد جدایه‌های فوزاریوم است.

* Most of the isolates with no host specificity on wheat (inhibitory effect on wheat seedling radicle more than 10 percent) are not identified at species level. Numbers in parenthesis and "-" represent standard errors and undetermined effect on certain species, respectively. Negative amounts beside some data represent promotion of growth due to using *Fusarium* spp. isolates.

اثر قارچ *F. brachygibbosum* isolate A7 بر بازدارندگی رشد ریشه‌چه جودره، ۸٤/۱ بود، ضمن این‌که رشد ریشه‌چه گندم را ٤/٤ درصد افزایش داد (جدول ۲). این جدایه برای اولین بار از ایران، در

سال ۲۰۱٤، توسط میرحسینی و همکاران (Mirhosseini *et al.*, 2014) گزارش شده است. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که این جدایه از فوزاریوم می‌تواند روی گیاه خرزهره (*Nerium oleander* L.) بیماری‌زایی ایجاد کند.

یک جدایه از قارچ *F. equiseti* isolate A20 روی جودره و یولاف وحشی، به ترتیب ٦۳/۳ و ۷٦ درصد بازدارندگی نشان داد، درحالی که فقط سه درصد رشد ریشه‌چه گندم را کاهش داد (جدول ۲). معمولا قارچ *F. equiseti* به عنوان یک نوع قارچ ساپروفیت یا مهاجم ثانویه شناخته می‌شود (Leslie *et al.*, 2006) و نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ممکن است برخی از

جدایه‌های آن، به عنوان عوامل کنترل زیستی انتخابی برخی از علف‌های‌هرز، دارای اهمیت باشند. نتایج یک مطالعه (Boari & Vurro, 2004) در شرایط آزمایشگاهی نیز نشان داده است که برخی از جدایه‌های قارچ *F. equiseti* می‌تواند به شدت روی گونه‌ای از گل جالیز (*Orobanche ramosa*) بیماری‌زا باشد.

برخی موارد دیگر استفاده از گونه‌های فوزاریوم در کنترل انتخابی علف‌های‌هرز عبارتند از: *F. tumidum* برای *Cytisus scoparius* و *Ulex europaeus* در زلاند نو (Fröhlich *et al.*, 1999)، *F. nygamai* برای استرایگا در سودان و آلمان (Kroschel *et al.*, 1999)، *F. semitectum* var. *majus* برعلیه استرایگا در غرب آفریقا و کانادا (Ciotola *et al.*, 1995) و *Fusarium* spp. برای کنترل نوعی فرفیون (*Euphorbia esula*) در آمریکا (Caesar, 1999) و برای *Egeria densa* و *E. najas* در برزیل (Nachtigal & Pitelli, 1999).

به نظر می‌رسد جدایه‌های فوزاریوم معرفی شده در این تحقیق، به نوعی قارچ‌های اندوفیت ریشه باشند چرا که روی ریشه کلونی‌سازی کرده و بدون این‌که علایم بیماری‌زایی خاصی روی گیاهچه‌ها بروز دهند (Rodriguez *et al.*, 2009)، به میزان قابل توجهی موجب کاهش رشد ریشه‌چه علف‌های‌هرز شده‌اند. لازم به ذکر است که این جدایه‌ها برای اولین بار از یک میزبان گیاهی جدید گزارش می‌شوند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه، نویدبخش امکان بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌ها به عنوان ابزار کنترل زیستی، در تنوع بخشیدن و تکامل روش‌های مدیریت آن‌ها است. در حقیقت، زمانی که یک عامل کنترل زیستی برای یک گونه دردسرساز معرفی شود، چندین رهیافت برای استفاده مؤثر از آن وجود خواهد داشت (Mortensen, 1998) که عبارتند از ۱- استفاده مستقیم از عامل برای کنترل گونه مورد نظر، ۲- شناسایی و استفاده از توکسین آن عامل مورد نظر به عنوان یک علف‌کش زیستی و ۳- استفاده از توکسین عامل مورد نظر به عنوان الگو برای سنتز علف‌کش‌های جدید. اتخاذ هر یک از راهکارهای ارایه شده، بستگی به عوامل متعددی دارد و انتخاب یک روش اصولی برای بهره‌گیری از عامل کنترل زیستی می‌تواند در چیره شدن بر محدودیت‌های استفاده از آن‌ها در شرایط خاص (مانند استفاده مستقیم از خود میکروارگانیسم در شرایط مزرعه که ممکن است به دلایل متعددی مانع از عملکرد موفقیت آمیز آن عامل باشد) موفقیت آمیز باشد (Stubbs & Kennedy, 2012). در مجموع این مطالعه، گام اول را در بهره‌گیری از عوامل کنترل زیستی در کنترل علف‌های‌هرز دردسرساز که کنترل شیمیایی آن‌ها با دشواری‌هایی روبرو است، برداشته است و جهت‌گیری‌های بعدی می‌توانند در شناساندن این عوامل به عنوان ابزاری مؤثر و کارامد در مدیریت علف‌های‌هرز، نقشی کلیدی ایفا کنند.

منابع

Ahluwalia, A.D. 2007. Bioherbicides: An eco-friendly approach to weed management. Curr. Sci. 92: 10-11.

Abbas, T., Zahir, Z.A. and Naveed, M. 2017. Bioherbicidal activity of allelopathic bacteria against weeds associated with wheat and their effects on growth of wheat under axenic conditions. BioControl. 62: 719-730.

Aldrich, R.J. 1984. Weed-crop ecology: Principles in weed management. Breton Publishers. 456Pp.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Aroca, R., Ruiz-Lozano, J.M., Zamarreño, Á.M., Paz, J.A., García-Mina, J.M., Pozo, M.J. and López-Ráez, J.A. 2013. Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. J. Plant Physiol. 170: 47-55.

Bacon C.W. and Hinton, D.M. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. Can. J. Bot. 74: 1195-1202.

Boari, A. and Vurro, M., 2004. Evaluation of *Fusarium* spp. and other fungi as biological control agents of broomrape (*Orobanche ramosa*). Biol. control. 30: 212-219.

Caesar, A.J. 1999. Insect/pathogen interactions are the foundation of weed biocontrol. In: Program Abstracts, *X* Int. Symp. Biol. Control Weeds. USDAARS and Montana State University, Bozeman, MT. 53 Pp.

Cibichakravarthy, B., Preetha, R., Sundaram, S.P., Kumar, K. and Balachandar, D. 2012. Diazotrophic diversity in the rhizosphere of two exotic weed plants, *Prosopis juliflora* and *Parthenium hysterophorus*. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 605-613.

Ciotola, M., Watson, A.K. and Hallett, S.G. 1995. Discovery of an isolate of *Fusarium oxysporum* with potential to control *Striga hermonthica* in Africa. Weed Res. 35: 303-309.

Derakhshan, A., Najari Kalantar, N., Gherkhlou, J. and Kamkar, B. 2015. Wild mustard (*Sinapis arvensis*) and turnipweed (*Rapistrum rugosum*) resistance to herbicide tribenuron-methyl in Agh Ghala. J. Plant Protec. 29: 199-205. (In Persian)

Fröhlich, J., Morin, L., Gianotti, A. and Webster, R. 1999. Exploring the host range of *Fusarium tumidum*, a candidate bioherbicide for gorse and broom in New Zealand. In *Program Abstracts, X X* Int. Symp. Biol. Control Weeds. 121 Pp.

Geiser, D.M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J. and O'donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. EUR. J. Plant Pathol. 110: 473-479.

Hirsch P.R. and Mauchline T.H. 2012. Mutualism: plant-microorganism interactions. 43–55, in Ogilvie, L.A. and Hirsch P.R. eds. Microbial ecological theory. Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press.

Hoseini, A., Rashed Mohasel, M.H., Kazerouni, E. and Ghalibaf, K. 2015. Evaluation *Hordeum spontaneum* populations tolerance to herbicide clodinafop-propargyl. J. Plant Protec. 28: 467-473. (In Persian).

Isack, Y., Benichis, M., Gillet, D. and Gamliel, A., 2014. A selective agar medium for isolation, enumeration and morphological identification of Fusarium proliferatum. Phytoparasitica, 42: 541-547.

Jensen, A.B., Aronstein, K., Flores, J.M., Vojvodic, S., Palacio, M.A. and Spivak, M., 2013. Standard methods for fungal brood disease research. J. Apic. Res. 52: 1-20.

Kremer, R.J. 2013. Interactions between the plants and microorganisms. Allelopathy J. 31: 51-70.

Kremer, R.J. and Kennedy, A.C. 1996. Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. Weed Technol. 10: 601-609.

Kroschel, J., Mueller-Stoever, D., Elzein, A. and Sauerborn, J. 2000. The development of mycoherbicides for the management of parasitic weeds of the genus *Striga* and *Orobanche*—A review and recent results. In Proc. X Int. Symp. Biol. Control Weeds. 139 Pp. Bozeman, MT: Montana State University.

Ladygina, N. and Hedlund, K. 2010. Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. Soil Biol. Biochem. 42: 162-168.

Lakshmi, V., Kumari, S., Singh, A. and Prabha, C. 2015. Isolation and characterization of deleterious *Pseudomonas aeruginosa* KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedlings. J. King Saud Univ. Sci. 27: 113-119.

Leslie, J.F., Summerell, B.A. and Bullock, S., 2006. The Fusarium. Laboratory manual, p.388.

Leslie, J.F., Pearson, C.A.S., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. 1990. *Fusarium spp*. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. Pol. J. Ecol. 80: 343-350.

Mirhosseini, H.A., Babaeizad, V. and Hashemi, L., 2014. First report of *Fusarium brachygibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. J. Plant Pathol. 96:431-435.

Montazeri, M., Zand, E. and Bagheatani, M. A. 2003. Weeds and their control in wheat fields of Iran. Weed Research Department of Research Institute of Pest and Diseases. 85 Pp.

Mortensen, K., 1998. Biological control of weeds using microorganisms. Plant–microbe interactions and biological control. New York: Marcel Dekker. 223-248.

Mrema, E., Shimelis, H., Laing, M. and Bucheyeki, T. 2017. Screening of sorghum genotypes for resistance to *Striga hermonthica* and *S. asiatica* and compatibility with *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*. Acta Agr scand B-S P. 67, 395-404.

Nachtigal, G.D.F. and Pitelli, R.A. 1999. *Fusarium* sp. as a potential biocontrol agent for *Egeria densa* and *Egeria najas*. In Program Abstracts, *X Int. Symp. n Biol. Control Weeds*. 68 Pp.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 1998. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Accessed October 25, 2017.

Park, J.M., Radhakrishnan, R., Kang, S.M. and Lee, I.J. 2015. IAA producing *Enterobacter* sp. I-3 as a potent bio-herbicide candidate for weed control: A special reference with lettuce growth inhibition. Indian J. Microbiol. 55: 207-212.

Pearson, K.A., Taylor, A.F.S., Fuchs, R.M.E. and Woodward, S. 2016. Characterisation and pathogenicity of *Fusarium* taxa isolated from ragwort (*Jacobaea vulgaris*) roots. Fungal ecol. 20: 186-192.

Payedar, S., Zand, E., Baghestani, M.A. and Jamali, M.R. 2009. Investigation efficacy of native and foreign Fenoxaprop –p –ethyl for controlling wild Oat (*Avena ludoviciana*). Iranian J. Weed Res. 1: 45-55. (In Persian with English abstract).

Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A.M., Okhovvat, S.M., Bihamta, M.R., Razzaghian, J. and Klemsdal, S.S., 2008. Morphological and molecular identification of Fusarium isolated from maize ears in Iran. J. Plant Pathol. 90: 463-468.

Rodriguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E. and Redman, R.S., 2009. Fungal endophytes: Diversity and functional roles. New phytol. 182: 314-330.

Skipper, H.D., Ogg, A.G. and Kennedy, A.C. 1996. Root biology of grasses and ecology of rhizobacteria for biological control. Weed Technol. 10: 610-620.

Stubbs, T.L. and Kennedy, A.C. 2012. Microbial weed control and microbial herbicides. In Herbicides-environmental impact studies and management approaches.InTech.https://www.intechopen.com/books/herbicides-environmental-impact-studies-and-management-approaches/microbial-weed-control-and-microbial-herbicides. Accessed March 12, 2019.

Te Beest, D.O., Yang, X.B. and Cisar, C.R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 30: 637-657.

Tranel, P.J., Gealy, D.R. and Kennedy, A.C. 1993. Inhibition of downy brome (*Bromus tectorum*) root growth by a phytotoxin from *Pseudomonas fluorescens* strain D7. Weed Technol. 7: 134-139.

Van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J. and Urbaneja, A. 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl. 63: 39-59.

Wardle, D.A., Yeates, G.W., Williamson, W. and Bonner, K.I. 2003. The response of a three trophic level soil food web to the identity and diversity of plant species and functional groups. Oikos. 102: 45-56.

Westover, K.M., Kennedy, A.C. and Kelley, S.E. 1997. Patterns of rhizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. J. Ecol. 85: 863-873.

Westwood, J.H., Charudattan, R., Duke, S.O., Fennimore, S.A., Marrone, P., Slaughter, D.C., Swanton, C. and Zollinger, R. 2018. Weed management in 2050: Perspectives on the future of Weed Science. Weed Sci. 66: 275-285.

Zand, E., Baghestani, M.A., Nezam Abadi, N., Minbashi Moeini, M. and Hadizadeh, M.H. 2009. A review on the last list of herbicides and the most important weeds of Iran. Iranian J. Weed Res. 2: 83-100.(In Persian with English abstract).

Zhong, S. and Steffenson, B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology. 91: 469-476.