شناسایی و بیماری‌زایی قارچ‌های همراه با گونهٔ گیاهی غیربومی سنبل آبی در اکوسیستم‌های تالابی گیلان

محمود هوشیار فرد*[1] ، علیرضا میرزاجانی[2]

۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

۲- پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران

mhoushiarfard@yahoo.com

تاریخ دریافت :۱۳۹۷/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۵/۲

چکیده

طی سال ۹۷-۱۳۹۶، از ۵۸ نمونه گیاهی جمع‌آوری‌شده از سه اکوسیستم تالابی گیلان شامل تالاب انزلی (غرب گیلان)، تالاب کیاکلا (شهرستان لنگرود، شرق گیلان) و تالاب عینک (شهرستان رشت) که دارای علائم لکه‌ای بر روی برگ، دمبرگ و ساقه گیاه سنبل آبی (*Eichhornia crassipes*) مجموعاً ۳۱ جدایه قارچی متعلق به شش گونه با فراوانی‌های مختلف شامل *Alternaria alternata* (۴۸/۳۹ درصد)، *Curvularia lunata* (۱۶/۱۳ درصد)، *Colletotrichum lindemutianum* (۶/۴۵ درصد)، *Phoma* sp. (۶/۴۵ درصد)، *Bipolaris victoriae* (۹/۶۸ درصد) و *Fusarium semitectum* (۱۲/۹ درصد)، جداسازی و شناسایی شدند. بیماری‌زایی و ویرولانس جدایه‌های در شرایط آزمایشگاهی بر روی گیاه سنبل آبی به روش برگ جداشده (Detached leaf)، انجام گردید. عکس‌العمل بیماری‌زایی یا ویرولانس جدایه‌های قارچی بر اساس پهنای لکه‌ها (بسیار بیماری‌زا: ۵ میلی‌متر<، بیماری‌زا: ۵-۳ میلی‌متر<، بیماری‌زایی کم: ۳ میلی‌متر>) و یا طول زمان ظهور لکه‌های برگی (ویرولانس بالا: ۵ روز>، ویرولانس: ۷-۵ روز، ویرولانس متوسط: ۱۰-۷ روز، ویرولانس پایین: ۱۰ روز<)، تعیین گردید. نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های *A. alternate* و *C. lunata* دارای بیشترین میزان وقوع و شدت بیماری (سطح آلوده برگ)، روی سنبل آبی بودند. با این وجود، استفاده از این قارچ‌ها به عنوان عامل کنترل بیولوژیک سنبل آبی به دلیل دامنه میزبانی زیاد آنها خصوصاً بیماری‌زایی آنها روی برنج، امکان‌پذیر نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سنبل آبی، قارچ‌های بیماری‌زا، کنترل بیولوژیک، گیلان

مقدمه

تاریخچهٔ استفاده از عوامل میکروبی علیه علف‌های هرز طولانی بوده و نشان می‌دهد که هم تعداد علف‌های هرز هدف برای کنترل و هم تعداد عوامل بیماری‌زای کاندید موردمطالعه و علف‌کش‌های بیولوژیک ثبت‌شده افزایش یافته است (Hasan and Ayres, 1990). علاقه‌مندی زیادی از گذشته به استفاده از عوامل بیماری‌زای گیاهی تحت عنوان علف‌کش‌های بیولوژیک در کنترل بیولوژیک علف‌های هرز وجود داشته است (Shabana, 2005; Auld and Morin, 1995). دو راهبرد اساسی در کنترل بیولوژیک علف‌های هرز توسط عامل بیماری‌زا شامل روش کلاسیک به صورت واردکردن عامل بیماری‌زای خارجی و غیربومی و راهبرد افزایشی علف‌کش میکروبی در نواحی که عامل میکروبی بیماری‌زا از قبل به‌طور طبیعی روی علف هرز حضور دارد و جمعیت آنان بعد از رهاسازی توده‌ای افزایش می‌یابد (Hasan and Ayres, 1990)، وجود دارد. علف‌کش‌های بیولوژیک عمدتاً از عوامل بیماری‌زای بومی که نابودکنندهٔ علف هرز هستند، تهیه و معمولاً در دزهای تجمعی و طی مراحل حساس رشد گیاه میزبان استفاده می‌شوند (Menon and Sinha, 2007; El-Morsy *et al*., 2006; Charudattan, 2005; Cruttwell, 2000). روش‌های کنترل سنبل آبی شامل روش سنتی و رایج (دستی یا حذف مکانیکی) و کنترل شیمیایی است (Shearer, 2010). کاربرد هر دو روش در مناطق با آلودگی بالا، ناکافی و مستلزم هزینه بسیار زیادی است (Bateman, 2001). علف‌کش‌های قارچی توان بالقوه برای کنترل علف‌های هرز را دارند (Cuda *et al*., 2008; Dagno, 2006; Charudattan, 2001). اولین بار قارچ عامل زنگ بنام *Uredo eichhorniae* (۱۹۷۲) و سپس قارچ سیاهک *Doassansia eichhorniae*، از روی سنبل آبی گزارش شد (Charudattan, 1975). بررسی‌های دیگر نشان داد که چندین قارچ با شدت بیماری‌زایی زیاد شامل *Acremonium zonatum*، *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler، *A eichhorniae*، *Bipolaris* spp، *Fusarium chlamydosporum*، *Helminthosporium* spp.، *Cercospora piaropi*، *Myrothecium roridum*، *Rhizoctonia solani* و *Uredo eichhornia*e، باعث ایجاد بیماری در گیاه سنبل آبی می‌شوند (Charudattan, 2001; Evans and Reeder, 2000; El-Morsy, 2004; Praveena and Naseema, 2004; Naseema *et al.,* 2004; Babu *et al.*, 2002; Shabana, 2005). مطالعات کنترل شده در شرایط آزمایشگاه توانایی بالقوه قارچ‌های *Alternaria eichhorniae* و *Cercospora piaropi* را برای کنترل گیاه سنبل آبی تأیید نمود (Charudattan *et al*. 1985; Shabana *et al*. 1995). برخی از این عوامل بیماری‌زا هنگام استفاده به صورت علف‌کش بیولوژیک باعث کاهش معنی‌دار بیوماس گیاه سنبل آبی (۵۰-۱۰۰ درصد) شدند (Charudattan, 1986; Shabana *et al*., 1995; El-Morsy, 2004; Jimenez and Balandra, 2007). El Morsy (۲۰۰۴)، گزارش کرد که گونه *A. alternata* یک علف‌کش قارچی بالقوه برای سنبل آبی در محیط‌های آبی است که برای رسیدن به میزان کشندگی دو ماه طول می‌کشد. اگرچه برای مشاهده اولین علائم آلودگی روی سنبل آبی به دوره انکوباسیون ۱۲ روزه نیاز دارد. Aneja و همکاران (۲۰۱۴)، استرین جدیدی از گونه *A.alternata* (AL-14) را از روی سنبل آبی معرفی کردند. تاکنون فقط دو علف‌کش قارچی برای بیوکنترل سنبل آبی با هدف تجاری‌سازی در جهان توسعه یافته است. اولین علف‌کش که توسط آژانس حفاظت محیط‌زیست ایالات متحده به ثبت رسیده حاوی گونه قارچی بیماری‌زا بنام *Cercospora rodmanii* (Mycosphaerellales: Mycosphaerellaceae) بود که میزبان اختصاصی آن گیاه سنبل آبی است (Freeman and Charudattan, 1984; TeBeest, 1991). فرمولاسیون آزمایشگاهی این علف‌کش بیولوژیک بنام ABG-5003 برای استفاده علیه سنبل آبی (*E. crassipes*) تهیه شده است (Praveena *et al*., 2004).

دومین علف‌کش قارچی بنام Hyakill از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* به دست آمد (de Jongand and de Voogd, 2003). قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل بیماری‌زای اختصاصی سنبل آبی نیست و به عنوان یک قارچ بیماری‌زای گیاهی روی انواع محصولات مانند لوبیا، آفتابگردان و هویج شایع است. همچنین، دو استرین قارچی *Alternaria jacinthicola* strain MUCL, 53159 و استرین *Cadophora malorum* strain Mln715 کنترل مؤثری را علیه سنبل آبی داشته‌اند، به طوری که به ترتیب باعث ۸۷ و ۹۳ درصد بیماری برگی و نابودی سنبل آبی طی شش هفته پس از استفاده شدند (Dagno *et al*., 2011b). قارچ *Alternaria eichhorniae* روی سنبل آبی در استرالیا، بنگلادش، اندونزی و افریقای جنوبی شناسایی شد (Dagno, 2006). در حال حاضر، این قارچ به عنوان علف‌کش قارچی برای کنترل سنبل آبی در کشور مصر مصرف می‌شود (Shabana, 1997). فرمولاسیونی از این قارچ طی ۱۳-۷ هفته بعد از استفاده باعث کنترل ۱۰۰ درصد سنبل آبی گردید. استرین *Cadophora malorum*, Mln715 اولین بار به عنوان عامل بیماری‌زا از سنبل آبی گزارش شد (Dagno, 2006). گونه *Cadophora malorum* لکه‌های روی برگ و استولون سنبل آبی با شدت‌های مختلف ایجاد کرده و نهایتاً باعث نابودی گیاه می‌شود. قارچ *Cadophora malorum* برای توسعه خود به رطوبت بالا نیاز دارد (Dagno *et al*., 2011a). Muteb و همکاران (۲۰۱۳)، تحقیقاتی را روی غلظت و فرمولاسیون اسپور قارچ *Acremonium zonatum*، عامل لکه برگی سنبل آبی به عنوان علف‌کش بیولوژیک انجام دادند. علف هرز سنبل آبی در چنان سطح وسیعی پراکنده است که ریشه‌کن کردن آن ممکن نیست ولیکن کنترل آن امکان‌پذیر است. با توجه به عدم استراتژی مشخص مقابله با گیاهان آبزی در تالاب‌های انزلی، عینک (شهرستان رشت) و کیاکلا (شهرستان لنگرود)، توسعهٔ آن طی سال‌های آتی فاجعه‌ای جبران‌ناپذیر را در پی خواهد داشت. این تحقیق با هدف جداسازی، شناسایی، تعیین فراوانی، بیماری‌زایی قارچ‌های همراه سنبل آبی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

الف) مناطق موردمطالعه: تالاب انزلی، تالاب کیاکلا و رودخانه عینک

ب) روش نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی قارچ‌ها

نمونه‌هایی از برگ، دمبرگ، ساقه و قسمت متورم ساقه آلوده سنبل آبی که نوع و اندازه لکه‌ها متفاوت بودند در طی دوره‌های مختلف رشدی در طول یک سال از نواحی موردمطالعه جمع‌آوری و بعد از ثبت مشخصات درون کیسه‌های پلاستیکی تمیز و سترون در یخدان به آزمایشگاه منتقل و تا شروع کار در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (شکل ۱). برای جداسازی، ابتدا نمونه‌ها در زیر شیر آب به خوبی شستشو شدند تا خاک و بقایای چسبیده به سطح آنها جدا شود. سپس، توسط اسکالپل سترون قطعات کوچک سه میلی‌متری از حد فاصل ناحیهٔ سالم و آلودهٔ لکه‌های نکروز یا کلروز برگ و دمبرگ تهیه و پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد (۲-۳ دقیقه) و سه نوبت آبکشی با آب مقطر سترون اقدام به کشت آنها بر روی محیط مغذی سیب‌زمینی-دکستروز آگار (PDA, Merck, Darmstadt, Germany)، حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر) یا محیط غذایی عصاره مخمر +PDA، گردید. تشتک‌ها درون انکوباتور با

شرایط دمای ۱±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷-۳ روز نگهداری شدند. قارچ‌های رشد کرده به روش نوک‌هیف (یا تک اسپور) خالص‌سازی و پس از رنگ‌آمیزی با بلولاکتوفنل میکروسکوپی و با استفاده از کلیدهای مربوطه شناسایی شدند (Holliday, 1993; Simmons, 2007; Ainsworth *et a*l., 1973; Booth 1977; Sutton, 1980; Sivanesan, 1987; Lacap *et al*., 2003) جدایه‌های به‌دست‌آمده داخل لوله‌های آزمایش به صورت کشت مورب داخل یخچال با دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. فراوانی قارچ‌ها بر اساس جنس به صورت درصد تعیین و طبقه‌بندی آنها طبق روش مورسی (El-Morsy, 2004) ، انجام گردید (فراوانی بالا: ۲۰٪<، فراوانی متوسط: ۲۰-۱۰ درصد، فراوانی پایین: کمتر از ۱۰ درصد).

شکل ۱. قسمت‌های آلوده گیاه سنبل آبی

ج) آزمون بیماری‌زایی

همه جدایه‌های قارچی پس از شناسایی مقدماتی در حد جنس برای مطالعات بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان سنبل آبی سالم از زیستگاه طبیعی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی به روش برگ جداشده (Detached leaf) با مایه زنی سوسپانسیون ۲×۱۰^{۶} اسپور/میلی‌لیتر از کشت سه‌هفته‌ای آنها بر روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز آگار حاوی ۰/۰۵ درصد عصارهٔ مخمر انجام شد. برای این کار، حداقل دو برگ یک‌شکل و اندازه برای هر جدایه در نظر گرفته شد. برگ‌ها در تشتک پتری که در کف آنها کاغذ صافی مرطوب قرار داشت، با کمک یک سوزن سترون (نوک خمیده)، مایه زنی و خراشیدن سطح تشتک پتری قارچ (حاوی میسیلیوم و اسپور) مایه زنی شده و داخل دسیکاتور به مدت ۱۰ روز در شرایط دمای اتاق نگهداری شدند. در ابتدا، درب تشتک‌ها به مدت ۲۴ ساعت گذاشته و سپس برداشته شد. همچنین، بر روی گیاهان شاهد توسط محیط کشت سترون، مایه زنی انجام گرفت. برگ‌های گیاهان مایه زنی شده، علائم متنوعی از لکه برگی را نشان دادند.

د) غربال قدرت بیماری‌زایی (ویرولانس) جدایه‌ها

عکس‌العمل برگ‌ها بر اساس پهنای لکه‌ها درجه‌بندی شدند (جدایه‌ها مجدداً از برگ‌های بیمار، جداسازی شدند). قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی در آزمایش فوق‌الذکر، بر اساس طول زمان ظهور (ویرولانس بالا: کمتر از ۵ روز، ویرولانس: ۷-۵ روز، ویرولانس متوسط: ۱۰-۷ و ویرولانس پایین بیش از ۱۰ روز) و توسعه علائم بیماری (اندازهٔ لکه‌ها: بالاتر از ۵ میلی‌متر، ۵-۳ میلی‌متر، کمتر از ۳ میلی‌متر) تعیین گردید.

ه) تعیین شدت آلودگی

این مرحله بر اساس غربال اولیهٔ جدایه‌ها، با استفاده از پنج گونه قارچی که عبارت‌اند از: *Alternaria alternata*، *Fusarium semitectum*، *Colletotrichum lindemutianum*، *Bipolaris victoriae* و *Curvularia lunata* و دارای بیشترین قدرت بیماری‌زایی (ویرولانس) بودند در شرایط کنترل شده و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. بدین منظور، برگ‌های سالم سنبل آبی زیر شیر آب لوله شستشو و پس خشک کردن با کاغذ حوله‌ای سترون درون الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شد. قطعات برگی درون تشتک‌های پتری ۱۵ سانت حاوی ماده تنظیم‌کنندهٔ رشد Kinetin 6-furfurylaminopurin با غلظت یک گرم/لیتر قرار داده شدند. مقدار ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (غلظت ۲×۱۰^{۶} اسپور/میلی‌لیتر) از کشت ۳-۲ هفته‌ای قارچها حاوی ماده سورفاکتانت توئین-۸۰، ۰/۰۱ درصد به میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر/۵۰ میلی‌لیتر تهیه و اسپورپاشی انجام گردید (برای افزایش جذب سطحی از توئین ۲۰ با غلظت یک درصد استفاده شد). بعد از مایه زنی سریعاً تشتک‌های پتری به کمک پارافیلم مسدود و داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط روشنایی ۱۲ ساعته به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (شکل ۳) (Aneja, 2003; Aneja and Singh, 1989). شاخص بیماری (شاخص شدت آلودگی، DSI) با اندکی تغییرات از رابطهٔ زیر محاسبه گردید (Freeman and Charudattan, 1984):

$$DSI = \frac{\text{مجموع درجات بیماری برای هر برگ}}{\text{۵×کل تعداد برگ‌های نمره دهی شده}}$$

و) آزمایشات گلخانه‌ای

آزمایشات گلخانه‌ای به صورت طرح کامل تصادفی با پنج جدایهٔ قارچی (+ تیمار شاهد) و در سه تکرار انجام گردید. برای تهیه سوسپانسیون اسپور از کشت دوهفته‌ای قارچها بر روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز آگار حاوی ۰/۰۵ درصد عصارهٔ

مخمر استفاده شد. سوسپانسیونی با غلظت 2×10^6 اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از آب مقطر حاوی توئین ۲۰ (۰/۲ درصد) به کمک لام هموسیتومتر تنظیم گردید. بوته‌های تقریباً یک اندازه، هم سن و سالم سنبل آبی برای مایه زنی انتخاب شدند. بعد از مایه زنی، برای حفظ رطوبت نسبی روی بوته‌ها به مدت ۴۸ ساعت با کیسه‌های نایلونی شفاف پوشانده شد. بازدیدهای روزانه برای مشاهده علائم بیماری تا شش هفته انجام گرفت.

شکل ۳. مایه زنی برگ‌های سنبل آبی به روش اسپورپاشی و نگهداری داخل انکوباتور

ز) تعیین وقوع بیماری (Disease incidence)

وقوع بیماری به صورت درصد برگ‌های گیاه که علائم بیماری را نشان دادند، محاسبه گردید.

ح) تعیین شدت بیماری (Disease severity):

تعداد ۱۰ برگ به‌طور تصادفی (در هر تکرار) و قبل از آلوده‌سازی انتخاب و علامت‌گذاری شدند (کلیه ارزیابی‌ها روی این برگ‌ها انجام شدند). ارزش‌گذاری شدت بیماری با معیار نمره دهی شش عددی بر اساس آلودگی سطح برگ (صفر: عدم بیماری، ۱: ۱-۲۵ درصد آلودگی، ۲: ۲۶-۵۰ درصد آلودگی، ۳: ۵۱-۷۵ درصد آلودگی، ۴: ۷۶-۹۷ درصد آلودگی، ۵: ۹۷ < درصد آلودگی یا خشکیدگی کامل برگ) صورت گرفت و شاخص بیماری (شاخص شدت آلودگی، DSI)، با اندکی تغییرات از رابطه زیر محاسبه گردید (Freeman and Charudattan, 1984):

$$DSI = \frac{\text{مجموع درجات بیماری برای هر برگ}}{\text{۵ ×کل تعداد برگ‌های نمره دهی شده}}$$

ط) تجزیه آماری

در آزمایش‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. جهت نرمال کردن درصدهای به‌دست‌آمده از تبدیل Arc sin(sqrt (p)) استفاده شد. تجزیهٔ واریانس و مقایسهٔ میانگین صفات درصد آلودگی (وقوع بیماری: Disease Incidence) و شدت آلودگی (Disease Severity)، در مطالعات آزمایشگاهی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) و در مطالعات گلخانه‌ای به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شدند.

یافته‌ها و بحث

۱-شناسایی جدایه‌های قارچی

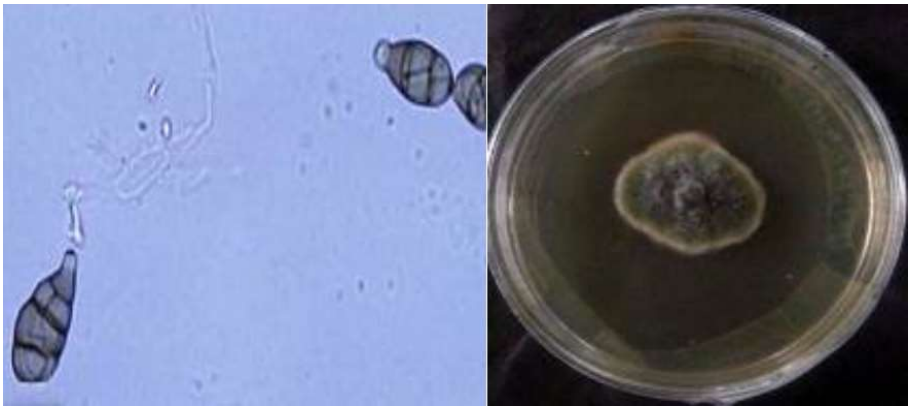
طی بررسی‌های دوره‌ای از منابع آبی مختلف استان، علائم (بیماری‌های) متعددی شامل لکه برگی، لکه دمبرگ و حباب (قسمت متورم)، سبزردی و بلایت برگی همراه گیاهان سنبل آبی مشاهده شدند. مجموعاً، تعداد ۵۸ نمونه گیاهی بیمار (برگ، دمبرگ، ساقه متورم) از محیط‌های آبی استان گیلان جمع‌آوری شد. اندام‌های آلوده و نوع علائم آلودگی در جدول (۱) ارائه شده است. عوامل قارچی همراه گیاهان آلوده بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی با استفاده از کلیدهای معتبر در سطح جنس و گونه شناسایی شدند. تعداد ۳۱ جدایه قارچی با ترکیب جمعیتی مختلف متعلق به جنس‌های Alternaria (۱۵ جدایه، ۴۸/۳۹ درصد)،Colletotrichum (۲ جدایه، ۶/۴۵ درصد)،Fusarium (۴ جدایه، ۱۲/۹ درصد)، Curvularia (۵ جدایه، ۱۶/۱۳ درصد)، Bipolaris (۳ جدایه، ۹/۶۸ درصد) و Phoma (۲ جدایه، ۶/۴۵ درصد) شناسایی شدند. جنس Alternaria بیشترین (۴۸/۳۹ درصد) و جنس‌های Phoma (۶/۴۵ درصد) و Colletotrichum (۶/۴۵ درصد) کمترین فراوانی را در بین جدایه‌های قارچی داشتند.

پرگنه قارچ *A. alternata* به رنگ خاکستری مایل به سیاه و قطر چهار سانتی‌متر بود. چهار جفت از حلقه‌های متحدالمرکز رشدی روی محیط کشت تشکیل شدند. بخش هوایی پرگنه‌ها فشردگی کمتری داشتند زنجیره‌های منشعبی از ۶-۴ کنیدی زیتونی‌رنگ، خاکستری کمرنگ یا سبز قهوه‌ای روی کنیدیوفورها کوتاه مشاهده شدند. کنیدیوفورها نیمه مستقیم بودند و یک خوشهٔ انتهایی از زنجیره‌های منشعب از کنیدی‌های کوچک به وسیلهٔ کنیدیوفورهای ثانویه کوتاه، مجزا می‌شدند. کنیدیوم‌ها ۷-۱ دیواره عرضی و تعداد اندکی دیواره طولی هم داشتند (شکل ۴).

گونه *C. lindemutianum* دارای پرگنهٔ قارچی به رنگ سفید مایل به خاکستری تا قهوه‌ای، رشد کرکی در مرکز با حلقه‌های متحدالمرکز و در حواشی دارای رشد فشرده است (Rajesha and Mantur, 2014). کنیدی‌ها شفاف تک‌سلولی، دارای دیوارهٔ صاف – بیضی شکل با قسمت انتهایی مدور دارای اندازه‌های ۱۲-۲۰ ×۸-۵/۴ میکرومتر بودند (شکل ۵).

جدول ۱. قارچ‌های جداسازی شده از قسمت‌های مختلف گیاه سنبل آبی

جدایهٔ قارچی	اندام آلوده	علائم آلودگی
Alternaria alternata	برگ-دمبرگ	لکهٔ برگی کلروز و نکروز -برگ سوختگی
Fusarium semitectum	برگ و ساقه	لکه برگی
Phoma sp.	برگ و دمبرگ	لکه برگی
Colletotrichum lindemuthianum	برگ	لکه برگی
Bipolaris victoriae	برگ	لکه برگی
Curvularia lunata	برگ و دمبرگ	لکه برگی



شکل ۴. پرگنه و کنیدی‌های قارچ *Alternaria alternate*

قارچ *F. semitectum* Berk. & Ravenel (syn: *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc.*; F. incarnatum* (Roberge) Sacc.) از گونه‌های رایج و گسترش یافته در مناطق گرمسیری، نیمه گرمسیری و مدیترانه‌ای است. (Leslie and Summerell, 2006) این گونه عضو بخش Fusarium section Arthrosporiella است و فرم جنسی آن ناشناخته است

(Burgess *et a*l., 1994). قارچ *F. semitectum* لکه‌های قهوه‌ای مایل به قرمز بر روی دمبرگ ایجاد و باعث کلروز و پژمردگی برگ‌های سنبل آبی می‌گردد.

شکل ۵. پرگنه و کنیدی‌های قارچ *Colletotrichum lindemuthianum*

لکه‌های حاصل از قارچ *C. lunata* قهوه‌ای با هالهٔ زردرنگ روی دمبرگ و قسمت متورم ساقه (Swollen portion)، نمایان بود (شکل ۶).

شکل ۶. آلودگی قسمت متورم ساقه سنبل آبی به قارچ *C. lunata*

قارچ *A. alternata* در بنگلادش، استرالیا، مصر و هند به عنوان عامل بیماری‌زای سنبل آبی معرفی شده است (Shabana *et al*., 1995a,b,c; El-Morsy, 2004; El-Morsy *et al*., 2006). بر اساس نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی و مقایسه

میانگین‌های درصد شدت آلودگی به روش حداکثر اختلاف معنی‌دار، معلوم شد که بین جدایه‌های قارچی از نظر میزان کلروز و نکروز برگ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). بیشترین درصد شدت آلودگی مربوط به گونه‌های *A. alternata* (۲/۳۱±۵۳/۳۹) و *C. lunata* (۲/۴۶±۴۰/۵۴) بود که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشتند و کمترین میزان شدت آلودگی و نکروز سطح برگ مربوط به قارچ‌های *B. victoria* و *C. lindemutianum* بود (جدول ۲).

آزمایشات نشان داد که سوسپانسیون اسپور/میسیلیوم جدایه‌های *A. alternata* در مقایسه با سایر جدایه‌های قارچی باعث آلودگی شدید برگی در علف هرز سنبل آبی شدند. از بین ۳۱ جدایهٔ قارچی، پنج جدایهٔ ویرولانس (بیماری‌زاترین جدایه‌ها) برای آزمایشات بعدی غربال‌گری و تعیین شاخص‌های آلودگی انتخاب شدند. در این بین، گونه *A. alternata* بیشترین بیماری‌زایی و گونه‌های دیگر نیز بیماری‌زایی خفیف‌تری را داشتند. با توجه به گونهٔ قارچی پس از گذشت مدت زمان معین از مایه زنی، شدت بیماری‌زایی هر کدام از جدایه‌ها بر اساس اندازه و نوع لکه‌ها روی گیاهان سنبل آبی تعیین گردید. اندازهٔ لکه‌ها بین جدایه‌ها متفاوت بود (جدول‌های ۳ و ۴). اولین لکه‌ها ۳-۲ روز بعد از مایه زنی ظاهر شدند. شدت لکهٔ برگی و توسعهٔ آن در جدایه‌های مختلف متفاوت بود و بافت برگ‌ها درجات مختلفی از آلودگی را نشان دادند.

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین درصد وقوع و شدت بیماری (شاخص آلودگی) در مطالعات آزمایشگاهی

جدایهٔ قارچ	درصد آلودگی برگ	شدت آلودگی
A. alternata	a۱/۷۳±۳۲/۲۴	a۲/۳۱±۵۳/۳۹
F. semitectum	ab۱/۱۵±۳۱/۱۰	c۱/۱۷±۳۷/۳۳
C. lindemutianum.	d۲/۴۹±۱۵/۹	d۱۱/۳۴±۱/۵۹
B. victoriae	c۲/۵۴±۱۸/۳	d۱/۸۴±۱۳/۵۲
C. lunata	a۱/۷۸±۳۱/۷۰	b۲/۴۶±۴۰/۵۴
LSD5%	۳/۰۸	۴/۲۸

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) نمی‌باشند

جدول ۳. تجزیهٔ واریانس اندازهٔ لکهٔ برگ (سانتی‌متر)

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات	F value	Pr>FF
جدایه	۵	۱/۵۶۸	۱۹/۷۹	۰/۰۰۰۱
اشتباه	۱۲	۰/۵۷۸	۰/۶۸	۰/۴۱۰۵

جدول ۴. مقایسه میانگین اندازه لکه‌های برگ (سانتی‌متر)

جدایهٔ قارچی	اندازه لکه (سانتی‌متر)
A. alternata	a ۱/۱۹±۰/۴۳
F. semitectum	c۰/۳۹±۰/۲۸
C. lindemutianum	bc۰/۵۲±۰/۳۴
B. victoria	c۰/۳۷±۰/۱۷
C. lunata	b۰/۷۷±۰/۳۴

نتایج حاصل از مطالعات گلخانه‌ای تا حدود زیادی نتایج آزمایشگاهی را تأیید کرد. نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های وقوع نشان داد که همه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$). بالاترین میزان وقوع بیماری در بوته‌های مایه زنی شده با قارچ‌های *A. alternata* (۸۲/۷±۳/۶) و *C. lunata* (۴۱/۷±۳/۶۵) دیده شد (جدول ۵).

شدت بیماری (سطح آلودهٔ برگ) در بوته‌های مایه زنی شده با قارچ *A. alternata* بیشترین بود (۴۷/۹۳±۲/۱۱). بررسی‌ها نشان داد که کلروز و نکروز روی برگ‌های جوان‌تر، بیشتر بودند. به نظر می‌رسد مراحل رشدی گیاه و فاکتورهای محیطی در ظهور و شدت آلودگی گیاه مؤثر بوده‌اند. به طوری که قارچ *A. alternata* لکه‌های قهوه‌ای تیره به قطر ۵-۱ میلی‌متر روی برگ و ساقهٔ گیاه سنبل آبی ایجاد کرد که با گذشت زمان بزرگتر شدند.

جدول ۵. مقایسه میانگین درصد وقوع و شدت بیماری (شاخص آلودگی) در مطالعات گلخانه‌ای

جدایهٔ قارچ	درصد آلودگی برگ	شدت آلودگی
A. alternata	a۸۲/۷۴±۳/۵۲	a۴۷/۹۳±۲/۱۱
F. semitectum	ab۳۷/۶۳±۳/۳۵	b۱۳/۸۶±۱/۰۷
C. lindemutianum	d۳۱/۸۳±۳/۱۹	b۲/۱۸±۱۶/۵۲
B. victoria	c۲۲/۱۳±۲/۸۱	b۱۴/۲۷±۱/۴۶
C. lunata	ab۴۱/۷۰±۳/۶۵	ab۲۸/۱۴±۲/۳۱

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) نمی‌باشند.

Puja و Pandey (۲۰۰۸)، با جداسازی چندین گونهٔ قارچی از روی سنبل آبی اعلام داشتند که گونهٔ *A. alternata* حداکثر بیماری را ایجاد می‌نماید. در هفته‌های دوم و چهارم برگ‌های تازه روئیده در اکثر تیمارها (به استثناء *F. semitectum*) خصوصاً قارچ *A. alternata* مشاهده شد (شکل ۷) و شدت آلودگی‌ها بعد از هفتهٔ دوم افزایش یافت. قارچ *F. semitectum* باعث کلروز برگ‌ها شد اما پیشرفت بیماری بسیار کند بود. در این رابطه، می‌توان اظهار داشت این گونه و گونه‌های مشابه مطلوبیت چندانی از نظر عامل کنترل بیولوژیک ندارد.

شکل ۷. شدت بیماری‌زایی *Alternaria alternata* روی برگ سنبل آبی در شرایط گلخانه‌ای

۲-رابطهٔ بین وقوع و شدت بیماری در مطالعات گلخانه

بین وقوع و شدت بیماری لکه آلترناریایی همبستگی مثبت با ضریب ۰/۹۱ (r^2 =۰/۸۶) که در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. این موضوع نشان می‌دهد که غلظت ۲×۱۰^۶ /اسپور در میلی‌لیتر درصد باعث وقوع و شدت بیماری قابل‌توجهی روی گیاه سنبل آبی در طول شش هفته گردید.

نتیجه‌گیری کلی

به نظر می‌رسد اگرچه، برخی جدایه‌های به‌دست‌آمده مانند *Phoma sp.* غیر بیماری‌زا بودند ولیکن عمده این قارچ‌ها مانند گونه‌های فوزاریوم، آلترناریا و کولتوتریکوم غیراختصاصی بوده و روی محصولات زراعی منطقه ازجمله برنج و لوبیا نیز بیماری‌زا می‌باشند. مطالعات حاضر نشان داد که قارچ‌هایی مانند گونه‌های *A. alternata*، *B. victoriae*، *F. semitectum* و *C. lunata* در فلور طبیعی گیاه و بذر برنج وجود دارند. قارچ *A. alternata* روی گوجه‌فرنگی و مرکبات باعث بلایت برگی می‌شود. لکه قهوه‌ای آلترناریایی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در سراسر دنیا و ایران می‌باشد. این بیماری به وسیلهٔ *A. alternate* ایجاد می‌شود و خسارت اقتصادی بالایی به این محصول وارد می‌کند. قارچ *C. lunata* به دلیل دامنه میزبانی بالا نمی‌تواند عامل بیوکنترل در نظر گرفته شود. این قارچ روی آفتابگردان بذرزاد است. محققان نیز اظهار داشته‌اند که توسعه علف‌کش‌های قارچی علیه سنبل آبی با موفقیت‌ها و چالش‌های متعددی همراه بوده است (Dango *et al*., 2012).

توصیه ترویجی

گیاهان آبزی مهاجم مانند سنبل آبی به دلیل داشتن استولون، اهمیت بیشتری دارند. لیکن، در این تحقیق معلوم شد که هیچ‌یک از جدایه‌ها از روی استولون جداسازی نشدند و بنا به عبارت دیگر، بررسی‌ها معلوم داشت اگرچه، قارچ *A. alternata* باعث ایجاد خسارت روی گیاه سنبل آبی می‌گردد ولی باعث نابودی شاخساره‌ها و استولون نمی‌شود. این تحقیق می‌تواند اطلاعات پایه‌ای برای انتخاب عوامل بالقوهٔ کنترل بیولوژیک گیاه سنبل آبی بعد از بررسی‌های بیشتر در زمینهٔ دامنه میزبانی و توانایی بیماری‌زایی فلور قارچی گیاه سنبل آبی و سایر محصولات زراعی نظیر حبوبات و سبزیجات را در دسترس قرار دهد. با توجه به اینکه برای توسعهٔ عامل بیولوژیک، حصول اطمینان از عدم خسارت زایی آن روی زراعت منطقهٔ عامل بیولوژیک به عنوان یک پیش‌شرط ضروری است، استفاده از قارچ‌های مذکور برای کنترل بیولوژیک گیاه مهاجم سنبل آبی توصیه نمی‌گردد. هزینهٔ بالای اولیه، محدود بودن تعداد دشمنان طبیعی برای علف هرز سنبل آبی، عدم قابلیت کنترل انتشار عامل بیماری‌زای وارداتی پس از آزادسازی در طبیعت، از معایب روش کلاسیک است. از طرف دیگر، کنترل موفق علف هرز سنبل آبی رابطهٔ بسیار نزدیکی با شرایط مساعد برای افزایش مؤثر جمعیت اولیه و استقرار جمعیت اپی‌فیت‌ها برای کاهش جمعیت علف هرز مزاحم دارد.

منابع

1- Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K. and Sussman, A.S., 1973. The Fungi, Vol. IVA. *A: A taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti. Academic Press, New York, NY*.

2- Aneja, K.R. and Singh, K., 1989. Alternaria alternata (Fr.) Keissler, a pathogen of waterhyacinth with biocontrol potential. *International Journal of Pest Management*, *35*(4), pp.354-356.

3- Aneja, K.R., 2003. *Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology*. New Age International.. 4th ed. New Delhi: New Age International (p) Ltd. Publishers.

4- Aneja, K.R., Kumar, P. and Sharma, C., 2014. A new strain of Alternaria alternata (AL-14) on water hyacinth from India. *Journal of Innovative Biology June*, *1*(2), pp.117-121.

5- Auld, B.A. and Morin, L., 1995. Constraints in the development of bioherbicides. *Weed Technology*, *9*(3), pp.638-652.

6- Babu, R.M., Sajeena, A., Seetharaman, K., Vidhyasekaran, P., Rangasamy, P., Raja, A.S. and Biji, K.R., 2002. Host range of Alternaria alternata—a potential fungal biocontrol agents for waterhyacinth in India. *Crop protection*, *21*(10), pp.1083-1085

7- Babu, R.M., Sajeena, A. and Seetharaman, K., 2003. Bioassay of the potentiality of Alternaria alternata (Fr.) Keissler as a bioherbicide to control waterhyacinth and other aquatic weeds. *Crop Protection*, *22*(8), pp.1005-1013.

8- Bateman, R., 2000, October. IMPECCA: an international, collaborative program to investigate the development of a mycoherbicide for use against water hyacinth in Africa. In *ACIAR PROCEEDINGS* (pp. 57-61). ACIAR; 1998.

9- Booth, C., 1977. *Fusarium. Laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.

10- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D., 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research. Fusarium Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney, and The Royal Botanic Gardens, Sydney. *New South Wales*.

11- Charudattan, R. and Conway, K.E., 1975. Comparison of Uredo eichhorniae, the waterhyacinth rust, and Uromyces pontederiae. *Mycologia*, *67*(3), pp.653-657.

12- Charudattan, R., Linda, S.B., Kluepfel, M. and Osman, Y.A., 1985. Biocontrol efficacy of Cercospora rodmanii on waterhyacinth. Phytopathology, 75(11), pp.1263-1269.

13- Charudattan, R., 1986. Cercospora rodmannii: a biological control agent for water hyacinth. Aquatics, 8, pp.21- 24.

14- Charudattan, R., 1986. Integrated control of waterhyacinth (Eichhornia crassipes) with a pathogen, insects, and herbicides. Weed Science, 34(S1), pp.26-30.

15- Charudattan, R., 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, *46*(2), pp.229-260.

16- Charudattan, R. 2005. Ecological, practical and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target? *Biological Control*, 35**,** pp.183-196.

17- Cruttwell, M.R.E., 2000. Successes in biological control of weeds. In: Spencer N.R., ed. *Proceedings of the 10th International Symposium on Biological Control of Weeds*, 4-14 July 1999, Montana State University, Bozeman, Montana, USA, 3-14.

18- Cuda, J. P., Charudattan, R., Grodowitz, M. J., Newman, R. M., Shearer, J. F., Tamayo, M. L. and Villegas B. 2008. Recent advances in biological control of submersed aquatic weeds. *Journal of Aquatic Plant Management*, 46**,** pp.15–32.

19- Dagno, K., 2006. Evaluation des microorganismes fongiques en tant qu'agents de lutte biologique contre *Eichhornia crassipes* (Martius) Solms-Laubach dans le bassin du fleuve

Niger au Mali. *DEA Doc. Sci. agron. Gembloux, Belgique: Gembloux Agricultural University–FUSAGx*.

20- Dagno, K., Lahlali, R., Diourté, M. and Jijakli, M.H., 2011. Effect of temperature and water activity on spore germination and mycelial growth of three fungal biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of applied microbiology*, *110*(2), pp.521-528.

21- Dagno, K., Lahlali, R., Diourté, M. and Jijakli, H., 2011. Production and oil-emulsion formulation of Cadophora malorum and Alternaria jacinthicola, two biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *African Journal of Microbiology Research*, *5*(8), pp.924-929.

22- Dagno, K., Lahlali, R., Diourté, M. and Jijakli, H., 2012. Present status of the development of mycoherbicides against water hyacinth: successes and challenges. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *16*(3), pp.360-368.

23- de Jong, M.D. and de Voogd, W.B., 2006. Novel mycoherbicides for biological control of aquatic weeds such as Water Hyacinth and Water Lettuce©: Patent Disclosure. *Annals of Plant Protection Sciences*, *14*(1), pp.274-274.

24- El-Morsy, E.M., Dohlob, S.M. and Hyde, K.D., 2006. Diversity of *Alternaria alternata* a common destructive pathogen of *Eichhornia crassipes* in Egypt and its potential use in biological control. *Fungal Divers*, *23*, pp.139-158.

25- El-Morsy, E.M., 2004. Evaluation of microfungi for the biological control of water hyacinth in Egypt. *Fungal Divers*, *16*, pp.35-51.

26- Evans, H.C. and Reeder, R.H., 2000, October. Fungi associated with *Eichhornia crassipes* (water hyacinth) in the upper Amazon basin and prospects for their use in biological control. In *ACIAR PROCEEDINGS* (pp. 62-70). ACIAR; 1998.

27- Freeman, T.E. and Charudattan, R., 1984. Cercospora rodmanii Conway--a biocontrol agent for waterhyacinth. *Bulletin-Florida, Agricultural Experiment Stations*.

28- Hasan, S. and Ayres, P.G., 1990. The control of weeds through fungi; principles and prospects. *New Phytologist*, *115*(2), pp.201-222.

29- Holliday P., 1993. *A dictionary of plant pathogens*. Cambridge University Press. New Delhi. 369 p.

30- Lacap, D.C., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y., 2003. An evaluation of the fungal'morphotype'concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*.

31- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell, Oxford, 388 p.

32- Jimenez, M.M. and Balandra, M.A.G., 2007. Integrated control of *Eichhornia crassipes* by using insects and plant pathogens in Mexico. *Crop Protection*, *26*(8), pp.1234-1238.

33- Naseema, A., Praveena, R., Nair, R.R. and Peethambaran, C.K., 2004. *Fusarium pallidoroseum* for management of water hyacinth. *Current Science*, *86*(6), pp.770-771.

34- Mutebi, C.M., Arama, P.F., Opande, G.O., Were, J.O., Omolo, P.O. and Buyela, D., 2013. Innundative biocontrol of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Martias Solms) Laubach) using zonate leafspot (Acremonium zonatum Sawada Gams) fungal agent. *11th African Crop Science Proceedings, Sowing innovations for sustainable food and nutrition security in Africa. Entebbe, Uganda, 14-17 October, 2013*, pp.413-415.

35- Praveena, R. and Naseema, A., 2006. Fungi occurring on water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] in Kerala. *Journal of Tropical Agriculture*, *42*, pp.21-23.

36- Rajesha, G., Mantur, S.G., Shankar, M.R., Boranayaka, M.B. and Shadakshari, T.V., 2010. In vitro evaluation of fungicides and biocontrol agents against Colletotrichum lindemuthianum causing anthracnose of Dolichos bean. *International Journal of Plant Protection*, *3*(1), pp.114-116.

37- Puja, R. and Pandey, A.K., 2008. Efficacy of pathogens of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) singly and in combination for its biological control. *Journal of Biological Control*, *22*(1), pp.173-177.
38- Menon, G.I. and Sinha, S., 2007. Biological control of insect pests and diseases of forestry importance. *Current Science*, *92*(2), p.166.
39- Shabana, Y.M., 2005. The use of oil emulsions for improving the efficacy of Alternaria eichhorniae as a mycoherbicide for waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Biological Control*, *32*(1), pp.78-89.
40- Shabana, Y.M., 1997. Formulation of Alternaria eichhorniae, a mycoherbicide for waterhyacinth, in invert emulsions averts dew dependence/Formulierung von *Alternaria eichhorniae*, einem Mykoherbizid gegen die Wasserhyazinthe, in Wasser-in-Öl-Emulsionen verhindert die Abhängigkeit von Tau. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, pp.231-238.
41- Shabana, Y.M., Charudattan, R. and Elwakil, M.A., 1995. First record of Alternaria eichhorniae and Alternaria alternata on waterhyacinth(*Eichhornia crassipes*) in Egypt. *Plant Disease*, *79*(3), p.319.
42- Shabana, Y.M., Charudattan, R. and Elwakil, M.A., 1995. Identification, pathogenicity, and safety of *Alternaria eichhorniae* from Egypt as a bioherbicide agent for waterhyacinth. *Biological Control*, *5*(2), pp.123-135.
43- Shabana, Y.M., Charudattan, R. and Elwakil, M.A., 1995. Evaluation of Alternaria eichhorniae as a bioherbicide for waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) in greenhouse trials. *Biological Control*, *5*(2), pp.136-144.
44- Shearer, J.F., 2010. A historical perspective of pathogen biological control of aquatic plants. *Weed Technology*, *24*(2), pp.202-207.
45- Simmons, E.G., 2007. *Alternaria: An Indentification Manual*(No. PA 632.488 S56.).
46- Sivanesan, A., 1987. *Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs*. CAB International.
47- Sutton, B.C., 1980. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute..
48- TeBeest, D.O., 1991. *Microbial control of weeds*. New York, USA: Chapman and Hall.