

اثر تلفیقی چند قارچ کش سنتتیک با چند عامل بیولوژیک در کنترل مرگ گیاهچه ریزوکتونیایی پنبه

Integrative effect of some synthetic fungicides with some biological agents in control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings

لیلا موسوی میرک، اکبر شیرزاد*، داود محمدی

Mosavi Mirak Leila, Shirza Akbar*, Mohammadi Davoud

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani
University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashirzad@azaruniv.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲)

چکیده

واژه‌های کلیدی

کنترل تلفیقی

رایزوکتونیا

کنترل بیولوژیک

Trichoderma

Pseudomonas

قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* یکی از بیمارگرهای خاک‌زاد مهم است که دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و باعث مرگ گیاهچه یا پوسیدگی طوقه و ریشه در گیاهان میزبان می‌شود. استفاده از چند عامل کنترل در مدیریت تلفیقی آفات و بیماریها به عنوان یکی از روش‌های کارآمد در کنترل عوامل بیمارگر توصیه شده است که اهمیت آن به خصوص در بحث مدیریت مقاومت به سموم متداول بسیار زیاد است. در این بررسی، مقادیر EC₂₅ و EC₅₀ سه قارچ کش زینب، کاپتان و کربوکسین تیرام و دو عامل بیوکنترلی *Pseudomonas fluorescens* 73 و *Trichoderma harzianum* T22 در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای علیه بیمارگر *Rhizoctonia solani* در بیماری مرگ گیاهچه پنبه مورد بررسی قرار گرفت. در بین قارچ‌کش‌های مورد بررسی، کربوکسین تیرام با EC₅₀ معادل ۰/۰۵ ppm در مقایسه با زینب و کاپتان در کنترل بیمارگر موثرتر بود. در اختلاط قارچ‌کش‌های شیمیایی با آنتاگونیست *T. harzianum* T22 بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به ترکیب مقادیر EC₅₀ آنتاگونیست با قارچ کش کربوکسین تیرام بود (۷۵٪). همچنین در اختلاط قارچ‌کش‌ها با باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 نیز بیشترین بازدارندگی مربوط به ترکیب تیماری مقادیر EC₂₅ و EC₅₀ باکتری آنتاگونیست با قارچ کش کاپتان به دست آمد (هر دو ۷۵٪). در مطالعات گلخانه‌ای که تاثیر عوامل کنترلی به صورت انفرادی و در ترکیب با یکدیگر مورد بررسی قرار گرفته بودند، بیشترین کنترل در شاهد مثبت و EC₅₀ قارچ‌کش‌ها در ترکیب با *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73 مشاهده شد. در این بررسی مشخص شد که تلفیق روش‌های کنترل در مدیریت این بیماری، نتیجه قابل قبولی در شرایط آزمایشگاهی دارد و در گلخانه نیز با این روش مدیریت تلفیقی، امکان کنترل بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه پنبه افزایش می‌یابد.

مقدمه

سالهاست که روش کنترل شیمیایی از راههای موثر و مهم در کنترل بیماریهای گیاهی بوده است. هر چند سموم شیمیایی به دلیل سهولت استفاده و اثر سریع در کنترل بیماریها و آفات نقش ارزندهای دارند، لکن موجب بروز مشکلات زیست محیطی می شوند. هزینه تولید و مصرف این مواد و باقی ماندهی سموم، سرطانزا بودن و بحث مقاومت آفات و بیمارگرها به سموم شیمیایی نیز از مشکلات استفاده وسیع از آفت کش ها می باشد (Berger, 1995). در هر صورت باید به این نکته توجه داشت که حتی امروزه نیز سموم شیمیایی در عمل نیرومندترین سلاح کنترل بیماریهای گیاهی به شمار می روند و احتمالاً بشر هرگز از آنها کاملاً بی نیاز نخواهد شد (Biljana, 2018).

در کشاورزی پایدار، کاهش وابستگی مدیریت بیماریهای گیاهی به استفاده از سموم شیمیایی از اهداف عمده است. از جمله روشهای جایگزین، روش کنترل بیولوژیکی را می توان ذکر کرد، ولی روش کنترل بیولوژیکی هم دارای محدودیتهایی مانند رقابت میکروبی و کارایی کم در شرایط نامساعد محیطی می باشد. این موضوع در مورد بیمارگرهای خاکزاد اهمیت بیشتری دارد و پیچیدگی اکوسیستم خاک، کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای ریشه را با چالش جدی مواجه می سازد. برهم کنشهای بین میزبان، بیمارگر، آنتاگونیست و محیط خاک، باعث عدم ثبات کارایی و عملکرد عوامل بیوکنترل در مناطق و فصول مختلف می شود. عوامل بیولوژیکی باعث کنترل بیماری به طور موثر و سازگار با محیط زیست می شوند، اما اغلب نسبت به عوامل محیطی حساس، غیر قابل پیش بینی و تهیهی فرمولاسیون از آنها اغلب پرهزینه و زمان بر می باشد (Gerbore et al. 2014; Brewer and Larkin 2005). با به کارگیری روشهای مدیریت تلفیقی و استفاده از چند روش کنترلی از جمله روش بیولوژیکی به همراه روش شیمیایی می توان تا حدی این معایب را برطرف نمود. کاربرد تلفیق عوامل بیوکنترل با قارچکشهای سیستمیک یکی از استراتژیهای موفق مدیریت تلفیقی است. در موارد زیادی مشخص شده است که کارایی عوامل بیوکنترل در تلفیق با قارچکشهای سنتتیک بیشتر می شود. البته به شرطی که این عوامل

باهم سازگار بوده و آفتکشهای به کار رفته، اثر منفی روی این عوامل بیوکنترل نداشته باشند (Budge and Whipps, 2001).

برهم کنشهای مثبت و منفی بین عوامل بیوکنترل و میکروفلور بومی می تواند در چگونگی عمل آنها در ریزوسفر موثر باشد. برای مثال، دو گروه از میکروارگانیسمهایی که زیستگاه اکولوژیکی یکسان و نیازهای تغذیه ای مشابهی دارند، برای به دست آوردن غذا با همدیگر به رقابت خواهند پرداخت و این موضوع کارایی آنها را تحت تاثیر قرار خواهد داد (Fukui 1994; Raaijmakers et al. 1995). مطالعات مختلفی در راستای کارایی تلفیق دو عامل کنترلی به خصوص روش شیمیایی و بیولوژیک صورت گرفته است و در این بین، علاوه بر کنترل موثرتر در تلفیق دو عامل، تاثیر احتمالی عوامل کنترل بر یکدیگر و سازگاری این عوامل در تلفیق باهم موضوع مطالعه محققین مختلف بوده است (Panyda et al. 2012; Tapwal et al. 2012). در یک بررسی، هفت قارچ کش سیستمیک تریفلومیزول، بیترتانول، ازوکسی استروبین، تبوکونازول، تریادیمورف، پروپیکونازول، هگزاکونازول و دو قارچ کش تماسی کوپر هیدروکسید، کوپر اکسی کلراید، پنج حشره کش پروپارژیت، اندوسولفان، فنپروپاترین، دیکوفول، کینالفوس و سه حشره کش بیولوژیکی نیمیسایدین، پونیم و اویس روی عامل بیوکنترلی *T. harzianum* برای سازگاری اختلاط مورد مطالعه قرار گرفتند که از بین آنها قارچکشهای سیستمیک بیترتانول و آزوکسی استروبین و سه حشره کش تماسی دیکوفول، کینالفوس و اندوسولفان سازگاری خوبی با عامل بیوکنترلی داشتند، اما حشره کشهای بیولوژیکی، ناسازگار با عامل بیوکنترلی گزارش شدند (Sarkar 2010). همچنین در بررسی مشابهی اثر قارچکشهای کوپراکسی کلراید، هگزاکونازول، پروپیکونازول و کاربندازیم بر روی *T. harzianum* نشان داد که به غیر از قارچ کش تماسی کوپراکسی کلراید بقیه ی آنها روی این عامل بیوکنترلی اثر سمی دارند (Islam et al. 2011). تحقیقات Adolf and David (1994) نیز نشان داده است که قارچهای آنتاگونیست *Trichoderma* و *Gliocladium* با بسیاری از ترکیبات آفت کش شیمیایی از جمله کاربوکسین، کاپتان، کوپراکسی کلراید و متالاکیل سازگار بوده اند. حالت هم افزایی *Streptomyces* sp. با قارچکشهای مانکوزب و

بررسی قرار گرفت که به علت تاثیر منفی قارچ کش بر روی آنتاگونیست باعث شکست این کنترل تلفیقی شد (Henis et al. 1978). کارایی روش های مختلف کنترلی از جمله تلفیق دو یا چند روش و بخصوص اگر یک جزء تلفیق عامل بیوکنترلی قارچی یا باکتریایی باشد بسته به نوع میزبان، نحوه استفاده، محل استفاده و نوع آفت کش مورد استفاده ممکن است بالا و یا بسیار پایین باشد. آگاهی درست از نحوه تعامل و سازگاری دو عامل کنترلی در بحث تلفیق آنها برای کنترل هر عامل بیمارگر و شرایط استفاده بسیار حائز اهمیت است (Fravel et al. 2005).

Rhizoctonia solani یکی از عوامل بیماری زای خاکزاد مهم پنبه بوده و قادر به حمله به طیف وسیعی از گیاهان می باشد که باعث پوسیدگی ریشه، طوقه، سوختگی برگ، و گیاهچه میری در گیاهان میزبان می شود (Ajayi-Oyetunde and Bradley 2018). هر چند روش های کنترلی مختلف از جمله روش های بیولوژیکی برای این عامل گزارش شده است (Brewer M and Larkin 2005) ولی در بحث مدیریت تلفیقی، تلفیق چند عامل کنترلی برای مبارزه با این بیمارگر مهم ارزش بالایی دارد. در این پژوهش، تاثیر تلفیق چند قارچ کش شیمیایی و دو عامل بیوکنترل *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73 در کنترل این بیماری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* T22 از گروه گیاه پزشکی دانشگاه تبریز و جدایه آنتاگونیست *P. fluorescens* 73، و بیمارگر *R. solani* AG4 از آزمایشگاه بیماری شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تهیه شد.

بررسی تاثیر قارچ کش های شیمیایی بر رشد بیمارگر

در این بررسی از پودر وتابل سه قارچ کش زینب (80% WP)، کاپتان (50% WP) و کربوکسین تیرام (75% WP) استفاده شد. برای هر یک از قارچ کشها یک محدوده ی غلظت کلی ppm ۱۰،۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ در محیط کشت PDA تهیه شد و یک حلقه ی میسلومی از کشت تازه قارچ بیمارگر *R. solani* AG4

کاربندازیم گزارش شده است که باعث ممانعت از جوانه زنی اسپور و کاهش زیست توده ی قارچی ناشی از پژمردگی *F. udum* در نخود کفتری *Cajanus cajan* شده است. مقدار EC₅₀ برای باکتری، ۱۰^۶ اسپور بر میلی لیتر و برای دو قارچ کش مانکوزب و کاربندازیم به ترتیب ۴۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است (Singh and Chhatpar 2011). باکتری *P. fluorescense* در ترکیب با قارچ کش بنومیل حالت هم افزایی را در کنترل زردی کلم *F. oxysporum* نشان داد (Someya et al. 2007). بررسیها نشان داده که *T. harzianum* T22 در ترکیب با قارچ کش های شیمیایی بهترین نتیجه را در کنترل پاتوژن های خاکزاد دارد (Harman 2000). اختلاط عامل بیولوژیکی *T. harzianum* و قارچ کش فلوئونالیل در کنترل *R. solani* در سیب زمینی نشان داد که کنترل این بیمارگر به خصوص هنگامی که در فاصله ی ۳۰ میلی متری غده استفاده شود، بهترین نتایج را در کاهش بیماری نسبت به حالتی که هر کدام از عوامل به تنهایی استفاده شوند، دارد (Wilson et al. 2008). کنترل توسط آنتاگونیست *B. subtilis* Nj-18 در ترکیب با قارچ کش های فلوئونالیل به عنوان اسپری برگی و دیفن کونازول با ضد عفونی بذر نتایج بهتری را در کاهش بیماری نسبت به استفاده انفرادی در کنترل *R. cerealis* در گندم نشان داده است (Shandong et al. 2014).

همچنین دو باکتری آنتاگونیست *Streptomyces philanthi* RM-1-138 و *B. subtilis* در ترکیب با قارچ کش های کاربندازیم، والیدامایسین، پروپیکونازول و مانکوزب در کنترل *R. solani* PTRRS-9 در برنج مورد بررسی قرار گرفت و از بین آنها موفقیت بهتر در ترکیب با قارچ کش های کاربندازیم و پروپیکونازول به دست آمد (Boukaew et al. 2013). طی تحقیقی، ترکیب آنتاگونیست قارچی *F. oxysporum* strain cs20 با قارچ کش های تیرام، کلروتالونیل، آزوکسی استروبین، مانکوزب، مفنوکسیم و کلروتالونیل در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای در مقابل *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* مورد بررسی قرار گرفت. از بین قارچ کش های مورد استفاده، کلروتالونیل، آزوکسی استروبین در شرایط آزمایشگاهی و قارچ کش تیرام در شرایط گلخانه ای برای این آنتاگونیست سمی بود. تلفیق *T. harzianum* با قارچ کش PCNB در کنترل رایزوکتونای گوجه فرنگی مورد

در آن محیط‌ها کشت داده شد و بعد از گذشت چهار روز، میزان مهار رشد بیمارگر نسبت به شاهد (محیط کشت بدون قارچ کش) با اندازه‌گیری میزان رشد قطری ریشه‌های بیمارگر ارزیابی گردید. از فرمول شماره ۱ برای محاسبه درصد بازدارندگی استفاده شد. غلظت موثر برای جلوگیری از رشد توده قارچی با نام Effective Concentration (EC) با نرم افزار SPSS و تجزیه پروبیت محاسبه گردید.

$$[۱] \quad \text{Gc} = \frac{Gc - Gt}{Gc} \times 100 = \text{درصد بازدارندگی از رشد}$$

Gc: میزان رشد در شاهد، Gt: میزان رشد در تیمار

بررسی تاثیر آنتاگونیست‌های *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73 بر رشد بیمارگر

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون غلظت‌های 10^3 ، 10^4 ، 10^5 ، 10^7 و 10^9 اسپور در میلی‌لیتر قارچ *T. harzianum* T22 در محیط کشت حاوی ۱۰ میلی‌لیتر PDA پخش شد. آنگاه بیمارگر در این محیط‌ها کشت گردید. تیمار محیط PDA بدون اسپور آنتاگونیست به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از چهار روز میزان رشد کلنی بیمارگر اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شد.

در مورد آنتاگونیست باکتریایی نیز غلظت‌های 10^3 ، 10^4 ، 10^5 و 10^7 سلول در میلی‌لیتر باکتری تهیه و به‌طور جداگانه به صورت دو نقطه‌ای در محیط PDA+NA کشت داده شدند. سپس بیمارگر فوق در قسمت وسط پتری قرار داده شد و رشد آن با اندازه‌گیری سطح رشد کلنی در آن محدوده‌ها بررسی گردید. مطابق روش مورد استفاده در بخش بررسی اثر قارچ‌کش‌ها، درصد مهارکنندگی رشد و مقادیر (EC) Effective Concentration برای آنتاگونیست‌ها نیز محاسبه گردید.

بررسی تاثیر مقادیر EC_{50} و EC_{25} قارچ‌کش‌ها در رشد

آنتاگونیست‌های *T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73

چون از مقادیر EC_{25} و EC_{50} قارچ‌کش‌ها در بررسی تلفیقی استفاده خواهد شد، تاثیر مقادیر EC_{25} و EC_{50} قارچ‌کش‌های مورد مطالعه بر رشد میسلیمی *T. harzianum* T22 و جمعیت سلولی *P. fluorescens* 73 مورد بررسی قرار گرفت تا اثرات سوء احتمالی قارچ‌کش‌ها بر آنتاگونیست‌ها مشخص شود. برای این

منظور، در محیط PDA دارای EC_{25} و EC_{50} سموم مورد مطالعه به‌طور جداگانه، یک حلقه میسلیمی از قارچ *T. harzianum* T22 کشت داده شد. با پر شدن تشتک پتری شاهد، میزان تاثیر احتمالی قارچ‌کش‌ها در رشد *T. harzianum* بررسی شد. همچنین برای بررسی تاثیر احتمالی قارچ‌کش‌ها بر آنتاگونیست باکتریایی *P. fluorescens* 73 به محیط کشت LB حاوی EC_{25} و EC_{50} سموم مورد مطالعه، ۲۰ میکرولیتر از کشت تازه‌ی باکتری *P. fluorescens* 73 با غلظت 10^5 CFU/ml اضافه شد. بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای 27°C با 160 دور در دقیقه، میزان تکثیر باکتری با شاهد بدون قارچ‌کش مورد مقایسه قرار گرفت. ارزیابی رشد باکتری با شمارش جمعیت آن با اسپکتروفتومتر مشخص گردید. برای اینکه مطمئن باشیم آنتاگونیست‌های مورد مطالعه در این آزمون هنوز هم فعال هستند، بازکشت نیز صورت گرفت.

بررسی اثر اختلاط قارچ‌کش‌های شیمیایی با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

بعد از تهیه دو غلظت EC_{50} و EC_{25} برای هریک از سموم شیمیایی مورد استفاده (کاپتان، کربوکسین تیرام و زینب) و قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22، تلفیق دو غلظت از عامل بیولوژیک و سموم شیمیایی با چهار حالت ممکن (EC_{50} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش، EC_{50} قارچ‌کش + EC_{25} آنتاگونیست، EC_{50} قارچ‌کش + EC_{25} آنتاگونیست + EC_{50} قارچ‌کش و EC_{25} قارچ‌کش + EC_{25} آنتاگونیست) در محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت. در محیط حاوی غلظت‌های مختلف قارچ‌کش، میزان مورد نیاز از سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* T22 اضافه شد تا میزان غلظت مورد نظر حاصل شود. سپس در این تشک‌های پتری، قارچ بیمارگر *R. solani* کشت داده شد. نتایج آزمایش پس از پر شدن تشتک پتری شاهد بررسی شد. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد.

بررسی تاثیر اختلاط قارچ‌کش‌های شیمیایی و باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 در کنترل بیمارگر

ابتدا در محیط کشت NA تلفیق بین باکتری *P. fluorescens* 73 و سموم شیمیایی در چهار ترکیب مختلف (EC_{50} آنتاگونیست +

میسلیومی بیمارگر پس از پر شدن تیمار شاهد ارزیابی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام گرفت.

بررسی گلخانه‌ای تاثیر هر یک از عوامل کنترلی و تلفیق آنها بر کنترل بیمارگر در گیاه پنبه

بعد از اثبات بیماری‌زایی *R. solani* AG4 در روی پنبه رقم ورامین، اثر تیمارهای کنترلی روی این بیمارگر به شرح زیر بررسی گردید: اینوکولوم قارچ بیمارگر به روش (Pal et al. (2001) تهیه شد. گلدانها با خاک استریل حاوی یک گرم اینوکولوم بیمارگر به ازای یک کیلوگرم خاک پر شدند. پس از ضدعفونی بذور با هیپوکلریت سدیم ۵٪، در هر گلدان پلاستیکی چهار بذر پنبه کشت گردید. برای تهیه‌ی اینوکولوم *T. harzianum* T22 از کشت هشت روزه‌ی قارچ زمانی که در حال اسپورزایی بود از یک قطعه پنج میلی‌متری در اطراف هر بذر استفاده گردید. برای بررسی اثر کنترلی باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 نیز از روش Pal et al. (2001) استفاده شد. باکتری در محیط کشت LB به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. غلظت آن به مقدار 10^7 سلول بر میلی‌لیتر با اسپکتروفتومتر تنظیم گردید. برای هر بذر کشت شده یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری در حاشیه خاک اطراف بذر استفاده شد. دو غلظت EC_{25} و EC_{50} هر یک از قارچ‌کش‌های مورد مطالعه در ترکیب با مقادیر EC_{50} هر کدام از آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی (*T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73) به‌طور جداگانه مطالعه شدند. بعد از ۲۰ روز فاکتورهای رشدی گیاه شامل ارتفاع بوته و وزن تر و خشک، اندازه‌گیری شد. در مجموع از یک غلظت معادل EC_{50} آنتاگونیست‌ها با دو غلظت EC_{50} و EC_{25} قارچ‌کش‌ها در مطالعات تلفیق در شرایط گلخانه‌ای استفاده شد. شدت بیماری با تبعیت از روش (Kim et al. (1977 با مقیاس صفر تا پنج به شرح زیر ارزیابی شد: "۰" گیاهان سالم بدون هیچ‌گونه علائم آلودگی، "۱" کمتر از ۲۰٪ ریشه آلوده شده و دارای حداقل یک شانکر قهوه‌ای درشت، "۲" حدود ۵۰٪ ریشه دارای شانکرهای تپیک باشد، "۳" بیش از ۶۰-۷۰٪ ریشه دارای شانکر باشد، "۴" مرگ گیاهچه پس از خروج گیاهچه از خاک (Postemergence)، طول

EC_{50} قارچ‌کش، EC_{25} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش، EC_{50} آنتاگونیست + EC_{25} قارچ‌کش و EC_{50} آنتاگونیست + EC_{50} قارچ‌کش) به طور جداگانه انجام گرفت و قارچ بیمارگر ریزوکتونیا در این محیط، کشت گردید. نتایج آزمایش پس از پرشدن تشتک پتری شاهد بررسی شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

بررسی اثر باکتری *P. fluorescens* 73 روی قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22

بررسی اثر احتمالی باکتری *P. fluorescens* 73 در رشد میسلیومی *T. harzianum* T22 در محیط PDA+NA با کشت دو نقطه‌ای مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که در دو طرف حاشیه‌ی تشتک پتری 10^7 و 10^5 سلول بر میلی‌لیتر معادل EC_{50} و EC_{25} به‌طور جداگانه با رعایت فاصله‌ی یک سانتی‌متری از حاشیه‌ی پتری‌ها کشت گردید و یک حلقه‌ی میسلیومی از آنتاگونیست قارچی در وسط پتری قرار داده شد. اندازه‌گیری رشد قارچ آنتاگونیست نسبت به شاهد تا پر شدن پتری شاهد ادامه یافت. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

تاثیر تلفیق باکتری *P. fluorescens* 73 با قارچ *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

در این بررسی، تلفیق دو غلظت $10^3 \times 6$ و $10^2 \times 3$ اسپور بر میلی‌لیتر از قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 به ترتیب با دو غلظت 10^7 و 10^5 سلول بر میلی‌لیتر باکتری *P. fluorescens* 73 به طور جداگانه مورد مطالعه قرار گرفت (غلظت‌ها بر اساس EC_{50} و EC_{25} دو عامل تعیین گردید). سوسپانسیون باکتریایی + سوسپانسیون آنتاگونیست قارچی به‌طور ترکیبی بکار برده شد. این آزمایش در چهار حالت (EC_{50} دو آنتاگونیست، EC_{25} دو آنتاگونیست، EC_{50} آنتاگونیست قارچی + EC_{25} آنتاگونیست باکتریایی) انجام شد. در هر تیمار، در یک نقطه پتری به فاصله ۱ سانتیمتر از حاشیه، میزان 20 میکرولیتر از مخلوط دو آنتاگونیست با غلظتهای ذکر شده کشت شد و در نقطه مقابل، یک دیسک پنج میلی‌متری از بیمارگر کشت داده شد. میزان بازداری از رشد

اختلاط سموم شیمیایی با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

نتایج حاصل نشان می‌دهد که درصد بازدارندگی تیمارهای تلفیقی قارچ آنتاگونیست با قارچ‌کش‌ها در مقایسه با هر یک از تیمارهای انفرادی بیولوژیکی و شیمیایی در کنترل بیمارگر معنی‌دار است. بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به ترکیب مقادیر EC_{50} آنتاگونیست تریکودرما با قارچ‌کش کربوکسین تیرام است (جدول ۲). با توجه به آنالیز داده‌ها اثرات هم‌افزایی در تلفیق توأم سموم شیمیایی با عوامل بیولوژیکی در غلظت‌های مختلف وجود دارد و حتی تلفیق غلظت‌های پایین آنتاگونیست‌ها و قارچ‌کش‌ها هم می‌تواند در کنترل بیمارگر در مقایسه با تاثیر هر کدام از این عوامل به‌طور جداگانه بهتر عمل نماید (جدول ۲).

تلفیق قارچ‌کش‌ها با باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* 73 در کنترل بیمارگر

تمام تیمارها باعث بازدارندگی از رشد بیمارگر *R. solani* شدند، اثر تیمارهای ترکیبی در مقایسه با استفاده‌ی هر کدام از این عوامل به‌طور جداگانه، معنی‌دار بود. بیشترین بازدارندگی مربوط به ترکیب تیماری مقادیر EC_{50} و EC_{25} باکتری آنتاگونیست با قارچ‌کش کاپتان است (جدول ۲). نکته مهم تاثیر یکسان دو غلظت بالا و پایین این قارچ‌کش با یک غلظت از باکتری می‌باشد که در راستای کاهش مصرف غلظت سم مصرفی دارای اهمیت مدیریتی می‌باشد.

اختلاط باکتری *P. fluorescens* 73 با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 در کنترل بیمارگر

آنالیز میانگین داده‌ها نشان داد که اختلاف بین تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. بیشترین میانگین بازدارندگی به ترتیب به EC_{50} آنتاگونیست *T. harzianum* T22 با مقادیر EC_{50} و EC_{25} باکتری *P. fluorescens* 73 اختصاص دارد (جدول ۳).

بررسی گلخانه‌ای تاثیر هر یک از عوامل کنترلی و تلفیق آنها بر رشد بیمارگر در گیاه پنبه

در این بررسی، بیشترین آلودگی‌ها مربوط به شاهد منفی (بدون اعمال روش کنترل) و EC_{25} قارچ‌کش‌های مورد مطالعه است. شاهد مثبت (بدون بیمارگر) بدون آلودگی بوده و کمترین

گیاهچه کمتر از پنج سانتی‌متر باشد، "۵" مرگ گیاهچه قبل از خروج از خاک (Preemergence) یا پوسیدگی بذر شاخص بیماری (Disease Index (DI) بر حسب درصد و با استفاده از فرمول شماره ۲ محاسبه شد.

$$DI\% = \frac{(A \times B)}{5 \times T} \times 100$$
 [۲]
A: مقیاس آلودگی، B: تعداد گیاهان آلوده در مقیاس، T: تعداد کل تیمارها. مخرج کسر حداکثر مقیاس آلودگی $\times$ تعداد کل تیمارها است که نتیجه آن حداکثر شدت بیماری ممکن می‌باشد.
تجزیه آماری برای محاسبه مقادیر موثر بر مهار رشد بیمارگر از تجزیه پروبیت با استفاده از نرم افزار SPSS (V 16) استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون چند دامنه‌ی دانکن با نرم افزار MSTAT-C انجام شد.

نتایج و بحث

تاثیر قارچ‌کش‌های شیمیایی و آنتاگونیست‌ها بر رشد بیمارگر بر اساس نتایج حاصل از بازدارندگی از رشد میسلیمی قارچ بیمارگر توسط غلظت‌های مورد آزمایش هر یک از عوامل بیولوژیکی و قارچ‌کش‌ها، مقادیر EC_{75} ، EC_{50} و EC_{25} محاسبه شده با تجزیه پروبیت برای قارچ‌کش‌ها و آنتاگونیست‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود قارچ‌کش کربوکسین تیرام با EC_{50} معادل ۰/۰۵ ppm بیشترین تاثیر را در بین قارچ‌کش‌ها نشان داد. مقدار EC_{50} برای قارچ آنتاگونیست 6×10^3 اسپور بر میلی‌لیتر و برای باکتری آنتاگونیست 10^7 سلول بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

تاثیر قارچ‌کش‌های شیمیایی روی عوامل بیولوژیک

در بررسی تاثیر غلظت‌های EC_{50} و EC_{25} قارچ‌کش‌های مورد مطالعه بر روی رشد آنتاگونیست قارچی و باکتریایی، کاهش رشد معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین مقادیر EC_{50} و EC_{25} باکتری *P. fluorescens* 73 بر رشد قارچ *T. harzianum* T22 تاثیر منفی نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است).

آلودگی در EC₅₀ قارچ کش‌ها در ترکیب با تریکودرما و سودوموناس مشاهده شد. درصد جوانه زنی به مراتب با افزایش آلودگی رازوکتونیایی کاهش یافت (جدول ۴). تلفیق مقادیر زیرکشنده قارچ کش‌ها با عوامل بیوکنترل تا ۵۰ درصد آلودگی به

بیمارگر را کاهش داد. همچنین تلفیق دو عامل بیوکنترل با یکدیگر نیز به نحو موثری از آلودگی به بیمارگر جلوگیری کرد.

جدول ۱- مقادیر EC₅₀ و EC₂₅ قارچ کش‌ها و آنتاگونیست‌ها در کنترل *R. solani*
Table 1. EC₂₅ and EC₅₀ values of fungicides and antagonists in *R. solani* control

عامل کنترل	EC ₂₅ (%/۹۵ CL)	EC ₅₀ (%/۹۵ CL) *	EC ₇₅ (%/۹۵ CL)
زینب	۰/۹۵ (۰/۷۹ - ۱/۱)	۲۸ (۲۵ - ۳۱)	۸۴ (۷۵ - ۹۵)
کاپتان	۱۱ (۰/۹ - ۱۳)	۱۸ (۱۵ - ۲۱)	۲۹ (۲۴ - ۳۶)
کربوکسین تیرام	۰/۰۲ (۰/۰۱ - ۰/۰۳)	۰/۰۵ (۰/۰۴ - ۰/۰۷)	۰/۱۶ (۰/۱۱ - ۰/۲۴)
<i>T. harzianum</i> T22	۳×۱۰ ^۲ (۱/۳×۱۰ ^۲ - ۵/۷×۱۰ ^۲)	۶×۱۰ ^۳ (۳/۳۹×۱۰ ^۳ - ۱۰/۵×۱۰ ^۳)	۱۲۵×۱۰ ^۳ (۵۹×۱۰ ^۳ - ۳۷۹×۱۰ ^۳)
<i>P. fluorescens</i> 73	۱۰ ^۵ (۳×۱۰ ^۴ - ۲/۵×۱۰ ^۵)	۱۰ ^۷ (۵×۱۰ ^۶ - ۲×۱۰ ^۷)	۱۰ ^۹ (۴/۵×۱۰ ^۸ - ۳/۸×۱۰ ^۹)

* واحد غلظت‌های قارچ کش‌ها به صورت قسمت در میلیون (ppm) و واحد قارچ و باکتری آنتاگونیست به ترتیب اسپور و سلول بر میلی لیتر می‌باشد.

The units of fungicides concentrations, the fungal antagonist and the bacterial antagonist are presented as parts per million (ppm), spore per ml and cell per ml, respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارهای اختلاط سموم شیمیایی با آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی در بازدارندگی از رشد بیمارگر

Table 2. Mean comparison of the effects of mixed chemical compounds in interaction with fungal and bacterial antagonists for pathogen growth inhibition.

تیمارها	EC ₀	زینب		کاپتان		کربوکسین تیرام	
		EC ₂₅	EC ₅₀	EC ₂₅	EC ₅₀	EC ₂₅	EC ₅₀
<i>T. harzianum</i>	EC ₀	-	۴۷/۲۳ g	۲۶/۶۶ h	۴۷/۲۳ g	۲۳/۲۳ h	۴۵/۶۶ g
	EC ₅₀	۴۳/۲۳ g	۶۷/۶۶ bc	۵۰ fg	۷۳/۲۳ ab	۶۰ de	۷۵ a
	EC ₂₅	۲۶/۶۶ h	۵۵ ef	۵۰ fg	۶۵ cd	۶۰ de	۵۵ ef
<i>P. fluorescens</i>	EC ₀	-	۴۷/۲۳ c	۲۶/۶۶ e	۴۷/۲۳ c	۲۳/۲۳ e	۴۵/۶۶ c
	EC ₅₀	۴۶ c	۴۶/۶۷ c	۴۵ c	۷۵ a	۶۵ b	۶۰ b
	EC ₂₅	۲۵ e	۴۶/۶۷ c	۲۵ e	۵۰ c	۳۰ de	۶۰ b

حروف مشابه در غلظت‌های مختلف هر عامل کنترل بیولوژیک نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۵٪ است.

Means indicated by the same letter in different treatments, show no significant difference (p=0.05) according to the Duncan's test.

جدول ۳- مقایسه میانگین تیمارهای اختلاط باکتری *P. fluorescens* 73 با قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T22 بر رشد بیمارگر

Table 3. Mean comparison of the *P. fluorescens* 73 mixed with *T. harzianum* T22 in inhibition of pathogen growth

تیمارها	EC ₀ P	EC ₅₀ P	EC ₂₅ P
EC ₀ T	-	۴۶±۱cd	۲۵±۰ e
EC ₅₀ T	۴۳/۲۳±۳/۲d	۶۰±۲ a	۵۵±۲/۸ab
EC ₂₅ T	۲۶/۶۶±۱/۶۶ e	۵۰±۱/۲ bc	۴۵±۲/۸ c

*T: *T. harzianum* T22 , P : *P. fluorescens* 73

حروف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۵٪ است.

Values indicated by the same letter are not significantly different at p=0.05 according to the Duncan's test

جدول ۴- تاثیر تیمارهای مختلف بر بیماری زایی قارچ *R. solani* روی گیاه پنبه

Table 4. The effect of different treatments on pathogenicity of *R. solani* on cotton plant

مرگ گیاهچه (Preemergence)	مرگ گیاهچه (Postemergence)	آلودگی ۶۰ الی ۷۰٪	آلودگی ۵۰٪	آلودگی کمتر از ۲۰٪	بدون آلودگی
	EC ₂₅ Z	EC ₅₀ Z	EC ₂₅ Z +T	EC ₅₀ Z+T	
	EC ₂₅ C	EC ₅₀ C	EC ₂₅ C +T	EC ₅₀ C+T	
	EC ₂₅ Ct	EC ₅₀ Ct	EC ₂₅ Ct +T	EC ₅₀ Ct+T	
شاهد منفی	—	P	EC ₂₅ Z +P	EC ₅₀ Z +P	شاهد مثبت
	—	T	EC ₂₅ C +P	EC ₅₀ C +P	
	—	—	EC ₂₅ Ct +P	EC ₅₀ Ct +P	
	—	—	—	P+T	

P و T به ترتیب غلظت های EC₅₀ *P. fluorescens* 73 و *T. harzianum* T22 می باشد. Z، C و Ct به ترتیب نشانه قارچ کش های زینب، کاپتان و کربوکسین تیرام است.

T and P are indicating the concentration of EC₅₀ of *T. harzianum* and *P. fluorescens*, respectively. Z, C, and Ct are presenting Zineb, Captan and Carboxin-thiram fungicides, respectively.

جدول ۵- مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف بر فاکتورهای رشدی گیاه پنبه

Table 5. Mean comparison of the effect of different treatments on plant growth factors of cotton

ارتفاع (سانتی متر) Plant length (cm)	وزن خشک (گرم) Dry plant weight (g)	وزن تر (گرم) Fresh plant weight (g)	تیمار Treatment
۲۰/۶۰ fgh	۰/۱۰۶۰ chi	۱/۴۲۰ cdefg	EC ₅₀ Z
۱۴/۲۰ i	۰/۰۶۶۰۰ ij	۱/۲۰۰ efg	EC ₂₅ Z
۱۸/۶۰ fghi	۰/۰۸۴۰۰ ij	۱/۱۹۴ efg	EC ₅₀ C
۱۶/۶۰ ghi	۰/۰۶۴۰۰ ij	۱/۱۶۰ efg	EC ₂₅ C
۲۰/۲۰ efghi	۰/۰۸۲۰۰ ij	۱/۱۲۰ fgh	EC ₅₀ Ct
۱۵/۴۰ hi	۰/۰۸۰۰۰ ij	۱/۰۴۰ gh	EC ₂₅ Ct
۳۳/۲۰ a	۰/۱۷۸۲ cde	۱/۸۸۰ bcd	EC ₅₀ Z +T
۲۵/۴۰ bcde	۰/۱۰۶۰ chi	۱/۸۰۰ bcde	EC ₂₅ Z +T
۳۰ ab	۰/۲۵۰۰ b	۲/۰۶۰ c	EC ₅₀ C +T
۲۰/۲۱ defgh	۰/۱۵۰۰ ef	۱/۴۵۴ cdefg	EC ₂₅ C +T
۳۱/۲۰ ab	۰/۳۲۲۰ a	۲/۵۶۰ a	EC ₅₀ Ct +T
۲۳/۶۰ cdef	۰/۲۰۶۰۰ bcd	۲/۳۰۰ ab	EC ₂₅ Ct +T
۲۹/۴۰ abc	۰/۲۲۲۰ bc	۱/۷۴۰ bcdef	EC ₅₀ Z +P
۲۱/۶۰ defgh	۰/۱۴۶۰ efg	۱/۶۲۰ cdefg	EC ₂₅ Z +P
۲۷ abcd	۰/۱۶۸۰ def	۱/۷۸۰ bcde	EC ₅₀ C +P
۲۱/۸۰ defgh	۰/۱۳۲۰ fgh	۱/۶۶۰ cdefg	EC ₂₅ C +P
۳۰/۸۰ ab	۰/۲۴۲۰ b	۱/۹۷۸ abc	EC ₅₀ Ct +P
۲۲/۸۰ defg	۰/۱۸۴۰ cde	۱/۴۶۰ cdef	EC ₂₅ Ct +P
۱۵/۶۰ hi	۰/۹۴۰۰ hi	۱/۰۳۸gh	P
۱۵/۸۰ hi	۰/۹۴۰۰ hi	۱/۰۲۰ gh	T
۲۷/۴۰ abcd	۰/۲۱۲۸ bc	۱/۷۲۰ bcdef	P+T
۷/۱۸۰ j	۰/۰۴۰۰ j	۰/۵۴۰۰ h	کنترل منفی
۳۱/۴۰ ab	۰/۱۸۵۲ cde	۱/۲۶۰ defg	کنترل مثبت

P و T به ترتیب غلظت های EC₅₀ *P. fluorescens* 73 و *T. harzianum* T22 می باشد. Z، C و Ct به ترتیب قارچ کش های زینب، کاپتان و کربوکسین تیرام است. حروف مشابه در

هر ستون نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۱٪ است.

P and T are indicating the concentration of EC₅₀ of *T. harzianum* and *P. fluorescens*, respectively. Z, C, and Ct are presenting Zineb, Captan and Carboxin-thiram fungicides, respectively. Means in each column labeled by similar letters are not significantly different at p=0.01 probability level, using Duncan's Multiple Range Test

قابل نفوذ در آگار هم مشخص شد (داده‌ها نشان داده نشده است).

ترکیب *P. fluorescens* با قارچ کش پنیسیکرون در کنترل پوسیدگی ریشه‌ی گندم، کاهش دز مصرفی این قارچ کش را به دنبال داشت (Mathre et al. 1995). در این بررسی هم آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که تاثیر تلفیقی عوامل بیولوژیکی و شیمیایی در کنترل *R. solani* AG4 به مراتب بیشتر از استفاده‌ی هر کدام از این عوامل به تنهایی است. در بحث اختلاط، اگرچه بیشترین بازدارندگی‌ها مربوط به غلظت‌های بالاتر (EC_{50}) آنتاگونیست‌ها و قارچ‌کش‌های مورد مطالعه است، اما در تعدادی از تیمارها، استفاده از غلظت‌های بالای آنتاگونیست‌ها (*T. harzianum* T22 و *P. fluorescens* 73) و غلظت‌های کم قارچ‌کش‌ها، بازدارندگی یکسانی در کنترل بیمارگر نشان داد. این موضوع از نظر کاهش دز مصرفی قارچ‌کش شیمیایی در برنامه مدیریت تلفیقی اهمیت دارد. احتمال دارد در این موارد قارچ‌کش‌ها به نحوی باعث افزایش فعالیت بیوکنترلی در غلظت‌های پایین (EC_{25}) عوامل آنتاگونیستی شده است یا اینکه هضم دیواره‌ی سلولی توسط آنتاگونیست‌ها باعث جذب بهتر قارچ‌کش‌ها شده و بیمارگر در حد قابل ملاحظه‌ای کنترل شده است. مشخص شده است که استفاده از غلظت پایین قارچ‌کش باعث کنترل ضعیف پاتوژن می‌شود اما وقتی با آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی ترکیب می‌شود آن‌ها را به آنتاگونیست‌هایی قوی تبدیل می‌کند که باعث افزایش فعالیت کنترلی نیز می‌گردد (Malathi et al. 2002).

در مواردی عدم موفقیت در تلفیق عوامل بیوکنترل با قارچ کش‌های سنتتیک نیز مشاهده شده است. گزارش شده که به دلیل تاثیر منفی قارچ کش PCNB در روی آنتاگونیست *T. harzianum*، تلفیق این دو عامل کنترلی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه موفقیت‌آمیز نبود و اثرات آنتاگونیستی در این نوع تلفیق مشهود است (Henis et al. 1978). در یک بررسی عدم سازگاری دو جدایه *Trichoderma* IBT-II و *Trichoderma* MT-4 w با قارچ‌کش کاربردنازیم در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد و مشخص گردید که جدایه MT-4 w حساس‌تر بوده و در کمترین غلظت بازدارندگی ۱۰۰٪ داشته است (Nongmaithem 2015). نشان داده شده که از پنج قارچ‌کش مورد مطالعه (*DitaneM-45*,

نتایج حاصل از تاثیر تلفیق عوامل کنترل بر پارامترهای رشدی گیاه پنبه تیمار شده با بیمارگر نشان می‌دهد که وزن تر، خشک و ارتفاع گیاه پنبه در حالت کنترل تلفیقی بیولوژیکی- شیمیایی بیشتر از کنترل هر کدام از این عوامل به تنهایی است. بیشترین وزن تر و خشک پنبه به ترتیب در تیمارهای تلفیقی معادل‌های EC_{50} تریکودرما با قارچ‌کش کربوکسین تیرام با مقدار ۲/۵۶۰ گرم و ۰/۳۲۲۰ گرم مشاهده شد. بیشترین ارتفاع محصول پنبه نیز در ترکیب غلظت بالای زینب با آنتاگونیست *T. harzianum* به دست آمد (جدول ۵).

یکی از مکانیسم‌های کنترلی آنتاگونیست تریکودرما عمدتاً میکوپارازیتسم به حالت پیچش پیرامون هیف‌های بیمارگر و تداخل هیف‌ها در همدیگر می‌باشد (Tran 2010). البته، مزیت استفاده از *Trichoderma* spp. به عنوان یک قارچ‌کش بیولوژیک، فعال نمودن چندین مکانیسم بیوکنترلی مختلف به طور هم‌زمان در کنترل بیماری‌های خاک‌زاد است. لذا بوجود آمدن گونه‌های مقاوم بیمارگر در برابر آن عملاً غیر ممکن است و این مزیت همراه با تلفیق‌پذیری و سازگاری با قارچ‌کش‌های معمول، اهمیت استفاده از این عامل در برنامه مدیریت تلفیقی را بالا می‌برد (Benitez et al. 2004). گزارش شده است که *T. harzianum* T22 با سموم شیمیایی، قارچ‌های میکوریزی و آفت‌کش‌ها تقریباً سازگار است (Harman 2000) که این موضوع در تحقیق حاضر نیز به اثبات رسید.

مکانیسم‌های بیوکنترلی که باکتری *P. fluorescense* بر علیه پاتوژن‌های خاک‌زاد به کار می‌برد اغلب پیچیده بوده و بیشترین ویژگی کنترلی آن به تولید آنتی بیوتیک نسبت داده شده است (Howell et al. 1988). یکی از آنتی بیوتیک‌ها *2-4 diacetylphloroglucnol* می‌باشد که در کنترل بیمارگرهای گیاهی خاک‌زاد نقش عمده‌ای دارد (Postma 2011). در بررسی حاضر نیز ترشحات نارنجی تا قهوه‌ای رنگ در آنتاگونیست باکتریایی *P. fluorescense* 73 تولید شد که احتمالاً مربوط به تولید آنتی بیوتیک است، که می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی بیوکنترلی، نقش اصلی را در تخریب پاتوژن ایفا کند. البته این موضوع در بررسی تاثیر متابولیت‌های باکتریایی

حتی بدون تماس با محل آلودگی قادر به حرکت در گیاه است و می تواند تخریب پاتوژن را در هر قسمت از گیاه انجام دهد، و این امر در تلفیق با آنتاگونیست T22 باعث کارایی بیشتر این تیمار شده است. مزیت استفاده از قارچ کش های سیستمیک علاوه بر کنترل بیماری های بذور، ریشه کن کردن بهتر بیمارگرهای بذرزاد است (Brewer M and Larkin 2005). در ترکیب *T. harzianum* با قارچ کش توپسین-ام نیز وزن تر و خشک ساقه و ریشه بخصوص زمانی که عامل بیوکنتری قبل از کاشت و قارچ کش بعد از کاشت استفاده شده است بیشترین مقدار خود را نشان داد (Gveroska and Ziberoski 2011). ترکیب *S. sannanensis* با قارچ کش های سیستمیک کاربندازیم و تیوفانات متیل در مقایسه ی با قارچ کش تماسی مانکوزب در کنترل بیماری های خاک زاد موفق تر عمل کرد و علت آن تاثیر سریع در جوانه زنی، حفاظت در مراحل حساس گیاهیچه و قدرت حرکت این قارچ کش های سیستمیک در گیاه گزارش شده است (Gnanamangai and Ponmurugan 2012). نتایج مشابه در ترکیب *T. harzianum* با قارچ کش فلوئولانیل در کنترل ریزوکتونیا در سیب زمینی به دست آمد. دلیل این موفقیت تلفیقی این است که پایداری کنترل توسط قارچ آنتاگونیست در طول فصل رشد تضمین شده است. قارچ کش نیز با تاثیر سریع، حفاظت در مراحل اولیه رشد گیاه را فراهم آورده است و ترکیب این دو باعث موفقیت کنترلی بیشتر نسبت به استفاده ی هر کدام به تنهایی شده است (Wilson et al. 2008).

تلفیق غلظت های پایین دو آنتاگونیست بیوکنتریل در کنترل ریزوکتونیا تا حد قابل قبولی نتیجه داده است. این تلفیق در آزمون گلخانه ای نیز کنترل بهتری داشت. قرار گرفتن عامل بیوکنتریل در ریزوسفر ریشه می تواند یکی از عوامل مهم موفقیت در یک برنامه کنترل باشد، بطوریکه در آزمایشی که در تلفیق *P. fluorescens* P5 با *T. atroviridea* انجام گرفت، علت موفقیت کنترل تلفیقی، قرار گرفتن آنتاگونیست ها در محل مناسب نزدیک ریزوسفر ریشه گزارش شده است (Poornima 2011) که در بررسی حاضر نیز شاید یکی از دلایل موفقیت کنترل در شرایط گلخانه ای محل و زمان مناسب معرفی عوامل کنترلی بوده است. در یک بررسی، علت شکست تلفیق *P. fluorescens* با *T.*

viride (ridomil, captaf, bluecopper, bavistin) در تلفیق با *T. viride* فقط دو قارچ کش کاپتاف (Captaf) و کات کبود (Blue copper) سازگار بودند (Ashwani T, et al. 2012). در این پژوهش، در شرایط آزمایشگاهی هرچند تمام تیمارهای تلفیقی بهتر از تیمارهای انفرادی عمل کردند، لکن سازگاری بیشتری در تلفیق T22 *T. harzianum* با قارچ کش کربوکسین تیرام و تلفیق *P. fluorescens* 73 با قارچ کش کاپتان مشاهده شد. احتمال می رود علت هم افزایی این باشد که دو جزء تلفیقی به نحوی باعث افزایش فعالیت یکدیگر شده اند و رشد بیمارگر نیز به نحو زیادی تحت تاثیر قرار گرفته است. در گزارشی اسپور باکتری *B. subtilis* بسیار متحمل به شرایط محیطی و تنش ها از جمله قارچ کش بوده است و همراه با استفاده ی یک قارچ کش سازگار باعث افزایش فعالیت بیوکنتریل آن از جمله افزایش میزان و فعالیت آنزیم ها و آنتی بیوتیک های دخیل در فعالیت کنترلی شده است. همچنین امکان کاهش دز مصرفی قارچ کش فلوئولانیل با این روش از ۷۵۰ به ۳۷۵ گرم بر لیتر میسر شده است (Di Peng et al. 2014). کارایی بهتر کنترل تلفیقی باکتری های *Streptomyces* sp. با قارچ کش های مختلف، به این نسبت داده شده است که باکتری با مکانیسم های مختلف باعث هضم دیواره سلولی شده و این عمل باعث جذب بیشتر قارچ کش توسط غشاء سیتوپلاسمی می شود و لذا اختلاط سموم بیولوژیکی با سموم شیمیایی، نسبت به استفاده هر کدام از آنها به تنهایی، بازده بیشتری داشته و کارتر و موثرتر خواهد بود (Boukaew et al. 2013). در این بررسی هر چند در شرایط آزمایشگاهی در ترکیب غلظت های پایین باکتری و قارچ کش زینب اثرات کنترلی اندکی مشاهده شد، در شرایط گلخانه تمام تیمارهای تلفیقی در کنترل بیماری نتیجه ی بهتری داشتند. احتمال می رود قارچ کش ها حفاظت از مراحل اولیه ی بذر را انجام می دهند و پایداری کنترل در طول رشد توسط عوامل بیوکنتریل تضمین می شود. شاخص های رشدی گیاه شامل وزن تر و خشک، و میزان کنترل بیماری در تیمار تلفیق T22 *T. harzianum* با EC₅₀ قارچ کش کربوکسین تیرام (کنترل بیماری با بیش از ۸۰ درصد) در مقایسه با دو قارچ کش دیگر و استفاده ی مجزای هر کدام از این عوامل بیشتر بود. احتمالاً به این دلیل که این قارچ کش سیستمیک بوده و

بررسی‌های صورت گرفته، کنترل تلفیقی علاوه بر کاهش آلودگی زیست محیطی و کاهش دز مصرفی، باعث کاهش تکرار مصرف قارچ کش می‌شود. این مسئله در بحث مقاومت به قارچ کش‌ها حائز اهمیت است که بحران اصلی در کشاورزی نوین محسوب می‌شود (Spadaro and Gullino 2005)، به عبارتی با کاهش غلظت قارچ کش و تعداد دفعات سمپاشی می‌توان گام موثری در مدیریت مقاومت بیمارگر به قارچ کش‌های متداول برداشت. گزارش شده که عواملی مثل تناوب زراعی، شخم قبل از کشت، آفتاب‌دهی خاک، بافت و pH خاک در این مکانیسم کنترل تلفیقی تاثیر دارند و حتماً باید با آگاهی از این عوامل (شناخت کامل هر کدام از عوامل کنترلی و چگونگی اختلاط آن‌ها، زمان صحیح استفاده، شناخت کامل بیمارگر و پاتوژن و مراحل حساس آن‌ها، پیش‌بینی‌های شرایط آب و هوایی، ترکیب درست بافت خاک و رطوبت ...) تلفیق صورت گیرد تا کنترل موثر بدست آید (Virgen-Calleros *et al.* 2000).

harzianum، سیدروفور تولید شده توسط گونه‌های سودوموناس تشخیص داده شد که در این شرایط تریکودرما با کمبود آهن مواجه شده و نتوانسته فعالیت بیوکنترلی خوبی از خود ارائه دهد (Harman and Hadar 1983).

در این تحقیق به دلیل توان تهاجمی جدایی قارچی بیمارگر بکار رفته اکثر گیاهچه‌های شاهد، دچار مرگ گیاهچه قبل از بیرون آمدن از خاک شدند و گیاهچه‌های زنده در ناحیه‌ی طوقه زخم نشان دادند و جوانه‌زنی به بیش از ۵۰ درصد کاهش پیدا کرد. در این کنترل تلفیقی هر دو جزء (قارچ کش + عامل بیوکنترل) نقش عمده‌ای در کاهش بیمارگر داشتند. در شرایط گلخانه در تیمارهای تلفیقی در مقایسه با تیمارهای کاربرد این عوامل به تنهایی، گیاهانی با ریشه و ساقه‌های ضخیم که وزن تر و خشک آن‌ها نیز به مراتب بیشتر است به دست آمد. حتی غلظت پایین (EC₂₅) قارچ کش‌ها با عوامل بیولوژیکی نیز در کنترل بیمارگر با بازدارندگی حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد موفق عمل کرد. در

منابع

- Adolf LB, David MS. 1994. Options to methyl bromide for the control of soil-borne diseases and pests in California with reference to the Netherlands. Environmental Protection Agency:1-59.
- Ajayi-Oyetunde OO, Bradley CA. 2018. Rhizoctonia solani: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. Plant Pathology 67:3-17.
- Ashwani T, Rajesh K, Nandini G, Shailesh P. 2012. Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. International Journal of Plant Pathology 3(2): 89-94.
- Benitez T, Rincón AM, Limon MC, Codon AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7:249-260.
- Berger A. 1995. The potential of botanical pesticides in plant disease control. Plant Protection Section, Mt Makulu Agricultural Research Station, Chilanga- Zambia 37: 1-7.
- Biljana G. 2018. In vitro evaluation of the effectiveness of some new fungicides in the control of *Rhizoctonia solani* in tobacco seedlings. International Journal of Environmental and Agriculture Research 4: 56-65.
- Boukaew S, Klinmanee Ch, Prasertsan P. 2013. Potential for the integration of biological and chemical control of sheath blight disease caused by *Rhizoctonia solani* on rice. World Journal of Microbiology Biotechnology 29: 1885-1893.
- Brewer M, Larkin P. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection 24: 939-950.
- Budge SP, Whipps JM. 2001. Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. Phytopathology: 91(2): 221-227.
- Di Peng, Shandong Li, Changjun C, Mingguo Z. 2014. Combined application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat. Biological Control. 70: 28-34.
- Fravel DR, Deahl KL, Stommel J. 2005. Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides. Biological Control 34:165-169.
- Fukui R, Schroth MN, Hendson M, Hancock JG. 1994. Interaction between strains of pseudomonads in sugar beet spermospheres and their relationship to pericarp colonization by *Pythium ultimum* in soil. Phytopathology 84: 1322-1330.
- Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. Environmental Science and Pollution Research 21:1-14.
- Gnanamangai BM, Ponnurugan P. 2012. Evaluation of various fungicides and microbial based biocontrol agents against bird's eye spot disease of tea plants. Crop Protection 32 :111-118.

- Gveroska B and Ziberoski J. 2011.** The influence of *Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by *Rhizoctonia solani*. International Journal of Pure and Applied Science and Technological 2: 1-11.
- Harman GE, Hadar Y. 1983.** Biological control of *Pythium* species. Seed Science Technology 11: 893-906.
- Harman GE. 2000.** Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84:377-393.
- Henis YA, Bakerr G. 1978.** Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: Effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. Phytopathology 68: 900-907.
- Howell CR, Beier RC, Stipanovic RD. 1988.** Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the control of *Pythium preemergence* damping off by the bacterium. Phytopathology 78:1075-1078.
- Islam MS, ALI M, Rahman MS. 2011.** In vitro studies on the fungicidal effect on *Trichoderma* species in tea plantation. Bangladesh Journal Agriculture Research 36: 677-683.
- Kim DS, Cook RJ, Weller DM. 1997.** *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87: 551-558.
- Malathi P, Viswanathan R, Padmanaban P, Mohanraj D, Ramesh A. 2002.** Compatibility of biocontrol agents with fungicides against seed rot disease of sugarcane. Sugarcane Technology 4:131-136.
- Mathre D, Johnston R, Callan N, Mohan SK, Martin J, Miller J. 1995.** Combined biological and chemical seed treatments for control of two seedling diseases of Sh2 sweet corn. Plant Disease 79:1145-1148.
- Nongmaithem N. 2015.** Compatibility of pesticides with *Trichoderma* spp. and their antagonistic potential against some pathogenic soil borne pathogens. Indian J. Agric. Res., 49 (2): 193-196.
- Pal KK, Tilak K, Saxena A, Dey R, Singh C. 2001.** Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research 156: 209-223.
- Pandya J, Sabalpara A, Chawda S, Waghunde R. 2012.** Compatibility of *Trichoderma harzianum* with fungicide. Bioinfolet 9: 695 – 696.
- Poornima S. 2011.** Evaluation of disease control and plant growth promotion potential of biocontrol agents on *Pisum sativum* and comparison of their activity with popular chemical control agent – carbendazim. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences 3: 127-138.
- Postma J, Scheper R, Schilder M. 2011.** Effect of successive cauliflower plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. Soil Biology and Biochemistry 42: 804-812.
- Raaijmakers J, Leeman M, Van Oorschot M, Van der Sluis I, Schippers B, Bakker P. 1995.** Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology 85: 1075-1081.
- Sarkar S, Narayanan P and Divakaran A. 2010.** The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Turkish Journal Biological 34 :399-403.
- Shandong Li DP, Chen Ch, Zhou M. 2014.** Combined application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat. Biological Control 70: 28-34.
- Singh A, Chhatpar H. 2011.** Combined use of *Streptomyces* sp. A6 and chemical fungicides against fusarium wilt of *Cajanus cajan* may reduce the dosage of fungicides required in the field. Crop Protection 30: 770-775.
- Someya N, Tsuchiya K, Yoshida T, Tsujimoto-Noguchi, M, Sawada H. 2007.** Combined application of *Pseudomonas fluorescens* strain LRB3W1 with a low dosage of benomyl for control of cabbage yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. conglutinans. Biocontrol Science Technology 17:21-31.
- Spadaro D, Gullino M. 2005.** Improving the efficacy of biocontrol agents against soil borne pathogens. Crop Protection 24: 601-613.
- Tapwal A, Kumar R, Gautam N, Pandey S. 2012.** Compatibility of *Trichoderma viride* for selected fungicides and botanicals. International Journal of Plant Pathology 3: 89-94.
- Tran N. 2010.** Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. Journal ISSAAS 1:17-21.
- Virgen-Calleros G, Olalde-Portugal V, Carling D. 2000.** Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in central Mexico and potential for biological and chemical control. American Journal of Potato Research. 77:219-224.
- Wilson P, Ahvenniemi P, Lehtonen MJ, Kukkonen M, Rita H, Valkonen J. 2008.** Biological and chemical control and their combined use to control different stages of the *Rhizoctonia* disease complex on potato through the growing season. Annals of Applied Biology 53: 307-320.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1**Integrative effect of some synthetic fungicides with some biological agents in control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings**

Mosavi Mirak Leila, Shirza Akbar*, Mohammadi Davoud

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: ashirzad@azaruniv.ac.ir

Rhizoctonia solani is an important soil-borne pathogen which has a broad host range and cause damping-off or rottenness in root and crown of cultivated plants. The combined use of different control methods in IPM programs is an effective strategy against pathogens and is useful especially in resistance management programs. In this study, EC₅₀ and EC₂₅ values of three conventional chemical fungicides Zineb, Captan and Carboxin thiram and two biocontrol antagonist *Pseudomonas fluorescens* 73 and *Trichoderma harzianum* T22 were tested against *R. solani* *in vitro* and greenhouse condition. The results revealed that Carboxin thiram was effective than other fungicides with EC₅₀ values of 0.05 ppm *in vitro*. The best control (75%) were obtained in combined use of Carboxin thiram fungicides with EC₅₀ value of *T. harzianum* T22. and EC₅₀ and EC₂₅ values of *P. fluorescens* 73 in combination with Captan fungicide showed the best control (near 75%) *in vitro*. In green house tests that the control agents individually and in combination with each other were evaluated showed that, the best control of the disease were observed in positive control (without infection) and EC₅₀ values of fungicides in combination with each of biocontrol agents. Overall results of this research showed that combined use of two antagonists with selected fungicides in both *in-vitro* and green house condition are effective than individual use of each control agent and may be it is possible to control the *R. solani* derived disease using this integrated method in cotton crop.

Key words: Biological control, Integrative control, *Pseudomonas*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*