بررسی حساسیت جدایه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی طوقه برنج به قارچ‌کش تیوفانات‌متیل تیرام در استان گیلان

علی حسین‌نژاد[1]، دوستمراد ظفری[2] و فریدون پاداشت دهکایی[3]

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه برنج ناشی از گونه‌های *Fusarium verticillioides*، *F. fujikuroi* و *F. proliferatum* یکی از بیماری‌های مهم بذرزاد برنج می‌باشد که بهترین راه کنترل آن، ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌ها است. مقاومت به قارچ‌کش‌ها یکی از موضوعات مهمی است که باید به‌طور مداوم مورد بررسی قرار گیرد. در این پژوهش، حساسیت 77 جدایه قارچ‌های عامل بیماری به قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در محیط‌کشت PSA حاوی 1، 5، 10، 20 و 25 میلی‌گرم در لیتر از ماده موثره قارچ‌کش مورد مطالعه قرارگرفت و سپس EC50 و MIC قارچ‌کش برای هرکدام از جدایه‌ها محاسبه شد. نتایج نشان داد که EC50 و MIC قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام برای جدایه‌های مختلف به‌ترتیب بین 6/47-2/01 و 25-5 میلی‌گرم در لیتر متغیر بوده است. از آن‌جا که EC50 متحمل‌ترین جدایه، تنها 3/22 برابر حساس‌ترین جدایه بوده و جدایه‌های قدیمی استفاده شده نیز در همین دامنه حساسیت قرار گرفتند، بنابراین در جمعیت قارچ عامل بیماری، بعد از 10 سال مصرف قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام، مقاومتی رخ نداده است. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین میانگین EC50 جدایه‌های گونه‌های مختلف مشاهده نشد. بنابراین دامنه EC50 برای سه گونه به صورت مشترک بیان شد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه، تیوفانات‌متیل‌تیرام، حساسیت، قارچ‌کش، *Fusarium*.

1و2. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
3. عضو هیأت علمی، بخش گیاه‌پزشکی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت.

مقدمه

بیماری‌های برنج در غالب مناطق کشت این گیاه، عامل اصلی کاهش محصول هستند (اخوت، 1378). بیماری پوسیدگی طوقه برنج (Bakanae disease and Foot Rot) یکی از بیماری‌های بذرزاد است که از خزانه تا شالیزار روی برنج دیده می‌شود. در دهه 70 شمسی با تهیه و کشت ارقام اصلاح شده، خصوصاً رقم بسیار حساس خزر، این بیماری به‌سرعت در سطح استان گیلان گسترش یافت (پاداشت، 1372). گرلاخ و نیرنبرگ (1982) و هم‌چنین نیرنبرگ و ادانل (1998) *F. fujikuroi* Nirenberg را عامل این بیماری دانستند، درحالی‌که نلسون و همکاران (1983) *Fusarium moniliforme* Sheldon را به‌عنوان عامل این بیماری معرفی کردند. در بعضی از مناطق علاوه بر *F. fujikuroi*، گونه‌های *F. proliferatum* و *F. verticillioides* را نیز به عنوان عامل بیماری معرفی کرده‌اند (دسجاردینز و همکاران، 2000). به‌طور کلی این سه گونه جزء بخش Liseola از جنس *Fusarium* می‌باشند. نیرنبرگ و ادانل (1998) اجزا این بخش را به صورت *Gibberella fujikuroi* species complex آورده‌اند. عباس‌زاده (1384) نشان داد که سه جمعیت آمیزشی A (*F. verticillioides*)، C (*F. fujikuroi*) و D (*F. proliferatum*) عامل پوسیدگی طوقه برنج در گیلان می‌باشند.

یکی از راه‌های موثر کنترل این بیماری، ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌ها می‌باشد. پاداشت و همکاران (1375) و سپس ایزدیار و همکاران (1379) به ترتیب قارچ‌کش تیوفانات متیل تیرام[1] و همچنین قارچ‌کش‌های تریفلومیزول[2] و فلودیوکسونیل[3] را برای کنترل این بیماری در استان گیلان به‌ثبت رسانده‌اند.

در حال حاضر، مقاومت به قارچ‌کش‌ها به علت استفاده گسترده از آن‌ها به عنوان یک خطر جدی در مدیریت بیماری‌های گیاهی محسوب می‌شود (هویت، 1998). جهت پیش‌بینی ظهور مشکلات مقاومت، بررسی موارد مشکوک مقاومت عملی، پیگیری پیشرفت مقاومت در طول زمان، بازبینی استراتژی‌های مدیریت مقاومت و راهنمایی جهت انتخاب قارچ‌کش در سطح محلی، نیاز به مراقبت از مقاومت قارچ هدف به قارچ‌کش وجود دارد. بیشتر عوامل بیماری‌زا از لحاظ پاسخی که به یک قارچ‌کش، در داخل و یا بین جمعیت‌ها نشان می‌دهند، متفاوت هستند. این تنوع طبیعی، باید قبل از این‌که تغییر در پاسخ، قابل سنجش باشد، شناخته شود. (برنت، 1988). شکست کنترل بیماری در مزرعه ممکن است بیشتر از این‌که ناشی از شمار کامل جدایه‌های مقاوم در جمعیت باشد، در نتیجه افزایش فراوانی این جدایه‌ها در جمعیت ایجاد شود (گیسی و استاهل چک، 1988).

در بعضی از قارچ‌کش‌ها، مانند گروه بنزیمیدازول‌ها، مقاومت به‌وسیله یک ژن عمده کنترل می‌گردد. چنین ترکیباتی به عنوان قارچ‌کش‌های با خطر بالا طبقه‌بندی می‌شوند (هویت، 1998). در این نوع مقاومت،جدایه‌های مقاوم، حتی اگر زمانی که قارچ‌کش در ابتدا استفاده می‌شود، فوق‌العاده نادر باشند، زیرجمعیتی را تشکیل می‌دهند که با زیرجمعیت حساس هم‌پوشانی نداشته و از آن متمایز است (جورجوپولوس، 1988).

در ژاپن، در منطقه شیگا در سال 1983 بیش از 80 درصد و در منطقه فوکوشیما در همان سال 90 درصد جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج، مقاوم به بنومیل[4] بودند (اگاوا، 1988). ایگوچی و تاک‌یوچی (1988) گزارش کردند که از سال 1985 در منطقه چیبا ژاپن، جدایه‌های متحمل به بنومیل شناسایی شد. این جدایه‌ها هم‌چنین به تیوفانات‌متیل و تیابندازول[5] متحمل بودند، اما قارچ‌کش‌های تریفلومیزول، پروپیکونازول[6] و پروکلراز[7] در کنترل جدایه‌های متحمل به بنومیل موثر بودند.

در این مطالعه، نظر به اهمیت برنامه مراقبت، حساسیت (یا احتمال مقاومت) جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان نسبت به

1. Thiopanate-methyl thiram
2. Triflumizole
3. Fludioxonil
4. Benomyl
5. Tiabendazole
6. Propiconazole
7. Prochloraz

تیوفانات متیل تیرام که نزدیک به 10 سال از استفاده آن می‌گذرد، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری

در این بررسی، 60 جدایه قارچ عامل بیماری که توسط عباس زاده (1384) در سال 1383 و هشت جدایه که توسط پاداشت (1372) در سال 1372 و سال‌های قبل از آن و نیز پاداشت و ایزدیار (1383) در سال 1378 از مزارع مختلف استان گیلان جمع‌آوری و بیماری‌زایی آن‌ها اثبات شده بود و هم‌چنین 9 جدایه که در سال 1384 از مزارع مختلف استان گیلان جمع آوری شده و بیماری‌زایی آن‌ها به‌اثبات نرسیده، مورد استفاده قرار گرفت. جمع‌آوری نمونه‌ها از مزارعی که رقم خزر در آن‌ها کشت می‌شد، در اولویت قرار داشت. به منظور خالص سازی، از محیط کشت‌های آب- آگار[1] و سیب-زمینی دکستروز آگار[2] و روش تک‌اسپور استفاده شد.

از محیط کشت PDA جهت مشاهده خصوصیات ظاهری پرگنه استفاده شده و از محیط کشت CLA[3] در در دمای اتاق و نور nUV [4] و نیز از محیط کشت SNA در دمای $20^{\circ}C$ و شرایط تاریکی کامل به مدت 10-14 روز، جهت مشاهده مشخصات میکروسکوپی مانند شکل و اندازه میکروکنیدیوم، شکل و اندازه ماکروکنیدیوم‌ها، وجود سرهای دروغین، شکل یاخته‌های مولد کنیدیوم و نوع فیالیدها (پلی‌فیالید یا منوفیالید)، وجود و یا عدم وجود کلامیدوسپور و ... استفاده شد. هم‌چنین جهت تشخیص گونه‌ها از کلید شناسایی نیرنبرگ و ادانل (1998) و نیز از شرح گونه‌های گرلاخ و نیرنبرگ (1982) استفاده گردید.

اثبات بیماری‌زایی

از پرگنه 7 روزه جدایه‌های مختلف در محیط کشت PDA، سوسپانسیونی با غلظت 10^6 کنیدیوم در میلی لیتر تهیه گردید. یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون، با استفاده از سرنگ انسولین، در مرحله قدکشیدگی (2 ماه بعد از کشت) به بوته‌های برنج رقم خزر (5 بوته در هر گلدان)، در شرایط گلخانه با دمای $30\text{-}35^{\circ}C$ تزریق شد. هم‌چنین در گلدان شاهد نیز به همین مقدار آب مقطر سترون به بوته‌ها تزریق گردید.

آزمایش‌های حساسیت به قارچ‌کش

قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام با نام تجاری همای[5] همای[5] به‌صورت پودر وتابل 80 درصد[6] (ساخت شرکت شرکت تاید اینترناشنال چین) مورد استفاده قرار گرفت. این ترکیب شامل 50 درصد تیوفانات‌متیل (قارچ‌کش سیستمیک از گروه بنزیمیدازول‌ها)، 30 درصد تیرام (قارچ‌کش حفاظتی از گروه دی‌تیوکاربامات‌ها) و 20 درصد مواد همراه است.

برای این آزمایش‌ها از محیط کشت PSA (سیب زمینی سوکروز آگار[7]) استفاده شد. جهت ساختن این محیط‌کشت ابتدا 200 گرم سیب زمینی خرد شده به مدت نیم ساعت در آب مقطر جوشانده شد و سپس عصاره آن صاف شده و با اضافه کردن 20 گرم ساکارز ساخت شرکت مرک آلمان و 17/5 گرم آگار گرانوله[8] ساخت شرکت BBL، حجم آن با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. بعد از همگن‌سازی، 9 میلی‌لیتر محیط کشت PSA در لوله‌های آزمایش تقسیم شده و اتوکلاو گردید. با اضافه کردن 1 میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف قارچ کش تیوفانات متیل تیرام در درجه حرارت $50^{\circ}C$، غلظت‌های 1، 5، 10، 20 و 25 میلی‌گرم در لیتر از ماده موثره قارچ‌کش به‌دست آمد.

بعد از به‌دست آوردن غلظت‌های مختلف، محیط‌های کشت حاوی قارچ‌کش در ظروف پتری ریخته شدند. پس از جامد شدن محیط کشت، قرص‌های میسیلیومی به قطر 7 میلی‌متر از حاشیه در حال رشد کشت4 روزه جدایه‌های مختلف در 3 پتری مختلف به صورت وارونه روی محیط کشت گذاشته شد. در هر پتری، 4 جدایه مختلف در 4 گوشه قرار داده شدند. درب

1. Water-Agar
2. potato dextrose agar (PDA)
3. Carnation Leaf Agar
4. near ultra violet

5. Homai
6. 80% Wettable Powder
7. Potato Sucrose Agar
8. granulated Agar

پتری‌ها مسدود شده و در انکوباتور با دمای $28 \pm 2^{\circ}C$، به مدت 72 ساعت نگهداری شدند. سپس شعاع رشد پرگنه جدایه‌های مختلف اندازه‌گیری شده و درصد بازداری از رشد هر جدایه نسبت به شاهد آن (در پتری که قارچ‌کش به آن اضافه نشده) با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{شعاع رشد پرگنه تیمار قارچ‌کش- شعاع رشد پرگنه}}{\text{شعاع رشد پرگنه شاهد}} \times 100$$

جدایه‌هایی که در غلظت‌های ذکر شده قادر به رشد بودند، در غلظت‌های بالاتر آزمایش شدند. بعد از محاسبه درصد بازداری در غلظت‌های مختلف، EC50 قارچ کش (غلظتی از قارچ‌کش که از 50 درصد رشد میسیلیومی جلوگیری می‌کند) با استفاده از Probit Analysis Version 5.1 و نیز شاخص MIC [1] (حداقل غلظتی از قارچ‌کش که به‌طور کامل از رشد میسیلیومی قارچ جلوگیری می‌کند) برای هر جدایه محاسبه شد.

هم‌چنین جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم‌افزارهای SAS و Excel استفاده شد. جهت مقایسه میانگین EC50 در 43 جدایه که تیپ آمیزشی آن‌ها توسط عباس‌زاده (1384) و لطفی (1385) مشخص شده بود و هم‌چنین جهت مقایسه میانگین EC50 قارچ‌کش در سال‌های 84 و 83 و سال‌های قبل از آن، از طرح ساده کاملاً تصادفی و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

شناسایی و اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها

در این بررسی از نتایج تعیین جمعیت و تیپ آمیزشی 43 جدایه که توسط عباس‌زاده (1384) و لطفی (1385) انجام شده بود، استفاده گردید. تشخیص گونه جدایه‌های مختلف براساس اطلاعات قبلی از جمعیت آمیزشی و بررسی‌های تکمیلی مورفولوژی تعیین شد. جدایه‌های مختلف، متعلق به سه گونه *F. proliferatum*، *F. fujikuroi* و *F. verticillioides* بودند. این سه گونه در بخش Liseola و جنس *Fusarium* قرار دارند. از لحاظ مورفولوژی، تشابه زیادی بین این سه گونه وجود دارد.

گونه *F. verticillioides* علی‌رغم داشتن زنجیره میکروکنیدیوم بلند و سرهای دروغین و نداشتن کلامیدوسپور، فیالیدهای آن به صورت مونوفیالید بوده و مهم‌ترین تفاوت آن با دو گونه دیگر، نداشتن پلی‌فیالید است. گونه *F. proliferatum* دارای پلی‌فیالید به تعداد فراوان بوده و پلی‌فیالیدهای آن، دو و یا بیشتر از دو محل کنیدی‌زایی دارند. هم‌چنین این گونه علاوه بر داشتن کنیدیوم چماقی شکل، دارای کنیدیوم گلابی شکل نیز می‌باشد. گونه *F. fujikuroi* نیز از لحاظ بعضی از خصوصیات مهم، از دو گونه دیگر متفاوت می‌شود. این گونه دارای زنجیره کوتاه میکروکنیدیوم بوده و علاوه بر مونوفیالید، به‌ندرت و به صورت پراکنده دارای پلی‌فیالیدی است که بیش از دو محل کنیدیوم‌زایی ندارد. وجودکنیدیوفورهای پرولیفریت سیمپودیال به تعداد فراوان، از مشخصات بارز و مهم برای شناسایی این گونه می‌باشد. لازم به‌ذکر است که بیماری‌زایی 68 جدایه مربوط به سال 83 و سال‌های قبل از آن، توسط پاداشت (1372)، پاداشت و ایزدیار (1383) و عباس‌زاده (1384) اثبات شده است. 9 جدایه مربوط به سال 84 که هنوز بیماری‌زایی آن‌ها اثبات نشده است، در این مطالعه به‌طور جداگانه مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج آزمایش‌های حساسیت به قارچ‌کش

در این پژوهش، جهت آزمایش‌های قارچ‌کش، جمعاً از 77 جدایه قارچ های عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج استفاده شد. در انتخاب جدایه‌ها، تنوع جغرافیایی مورد توجه قرار گرفت. هم‌چنین در مورد جدایه‌های سال 83، سعی شد از جدایه‌هایی که قبلاً جمعیت و تیپ آمیزشی آن‌ها تعیین شده و اطلاعات خوبی در مورد آن‌ها موجود بود، استفاده شود. نمودار رشد رویشی 68 جدایه بیماری‌زا در لگاریتم غلظت‌های مختلف قارچ‌کش در شکل1 آورده شده است. شکل 2، درصد فراوانی جدایه‌های دارای MICهای مختلف را نشان می‌دهد. MIC جدایه‌های مختلف بین 25-5

1. Minimum Inhibitory Concentration

میلی‌گرم در لیتر از ماده موثره قارچ‌کش نوسان داشت. تنها یک جدایه (جدایه Gf-237) در غلظت 5 میلی‌گرم در لیتر، بازداری 100 درصد داشت. بیشترین فراوانی MIC در غلظت 10 میلی‌گرم در لیتر بود. تمام جدایه‌های قدیمی (مربوط به سال 78 و سال‌های قبل از آن) دارای MIC 10 میلی‌گرم در لیتر بودند، در حالی‌که 77/8 درصد جدایه‌های سال 84 دارای همین مقدار MIC بودند. شکل 3 نیز فراوانی جدایه‌های دارای EC50های مختلف را نشان می‌دهند. EC50 جدایه‌ها بین 6/47-2/01 میلی‌گرم در لیتر از ماده موثره تیوفانات‌متیل‌تیرام (میانگین 1/16 ± 3/88) در نوسان بود. جدایه Gf-145 با EC50 برابر با 6/47 میلی‌گرم در لیتر دارای بیش‌ترین EC50 و جدایه‌های Gf-121 و Gf-237 با EC50 برابر با 2/01 میلی‌گرم در لیتر دارای کم‌ترین EC50 بودند. نسبت بیش‌ترین EC50 به کم‌ترین EC50 برابر با 3/22 بود. از این نسبت در منابع مختلف به‌عنوان فاکتور مقاومت[1] 3/22، دامنه[2] 3/22 و نسبت مقاومت[3] 3/22 یاد می‌شود (شیخی‌گرجان، 1381؛ هسیانگ و همکاران، 1997 و وونگ و ویلکوکس،2000 و 2002).

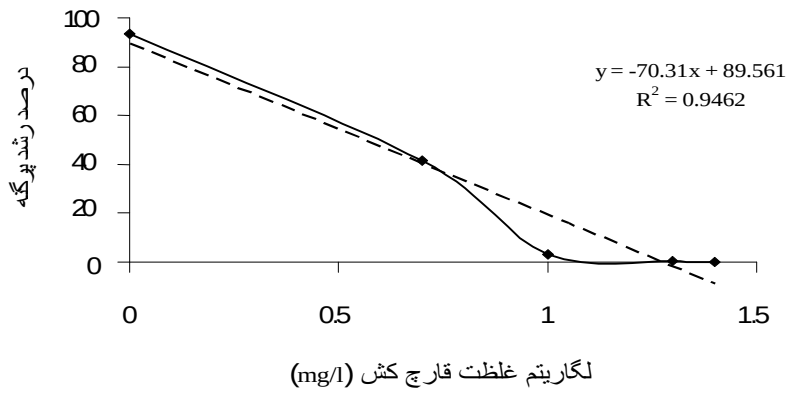
با توجه به این‌که در این پژوهش، از جدایه‌هایی که قبلاً جمعیت آمیزشی آن‌ها مشخص شده بود، استفاده گردید، بنابراین مقایسه‌ای بین جمعیت‌های آمیزشی مختلف از لحاظ EC50 انجام گرفت که نتایج آن در جدول 1 آورده شده است. از نتایج این جدول چنین برمی‌آید که بین جدایه‌های سه جمعیت آمیزشی (سه گونه) اختلاف معنی‌داری از لحاظ میانگین EC50 وجود ندارد (P = 0/89).

هم‌چنین در جدول 2 میانگین EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام برای جدایه‌های مربوط به سال‌های مختلف مقایسه شده‌اند. بر اساس اطلاعات جدول 8 تفاوت معنی‌داری بین میانگین EC50 جدایه‌های مربوط به سال‌های مختلف وجود دارد (P<0/001). میانگین EC50 جدایه‌های سال 83 بیشتر از سایر سال‌ها می‌باشد.

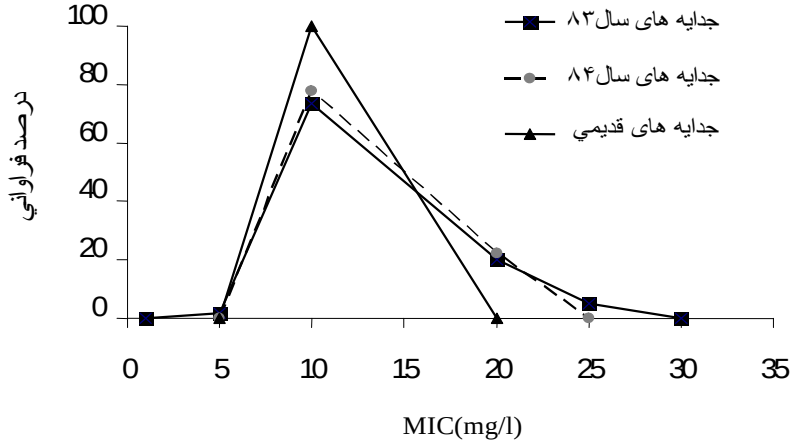
روش دیگر تقسیم‌بندی جدایه‌ها از لحاظ حساسیت به قارچ‌کش، استفاده از حدود اطمینان 95 درصد EC50 است. این حدود از کم‌ترین EC50 مربوط به حساس‌ترین جدایه‌ها با جدایه‌های بعدی هم‌پوشانی پیدا کرده و به همین ترتیب، این هم‌پوشانی تا بیش‌ترین EC50 مربوط به متحمل‌ترین جدایه ادامه می‌یابد. بنابراین با توجه به هم‌پوشانی حدود اطمینان 95 درصد EC50، تمام جدایه‌ها دارای پیوستگی بوده و عملاً تنها در یک گروه واحد قرار می‌گیرند. حتی جدایه‌های مربوط به سال 78 و سال‌های قبل از آن و نیز جدایه‌های سال 84 با جدایه‌های سال 83 در یک گروه قرار می‌گیرند.

تیوفانات‌متیل از قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول می‌باشد. تفاوت 3/22 برابری EC50 بین حساس‌ترین و متحمل‌ترین جدایه، در مورد قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول (و تمامی قارچ‌کش‌هایی که دارای خطر مقاومت تک‌ژنی می‌باشند) تفاوت زیادی نبوده و نمی‌تواند به‌عنوان مقاومت محسوب شود. استاوب (1991) فاکتور مقاومت جدایه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها را در جمعیت *Botrytis cinerea*، بالای 1000 دانسته و نیز ذکر کرده است که مقاومت، طی یک مرحله ژنتیکی صورت می‌گیرد. در بررسی لاموندیا و داگلاس (1997)، جدایه‌های حساس به تیوفانات‌متیل در جمعیت *Botrytis cinerea*، EC50 کمتر از 1 میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند، در حالی‌که جدایه‌های مقاوم دارای EC50 بیش‌تر از 400 میکروگرم در میلی‌لیتر بودند.

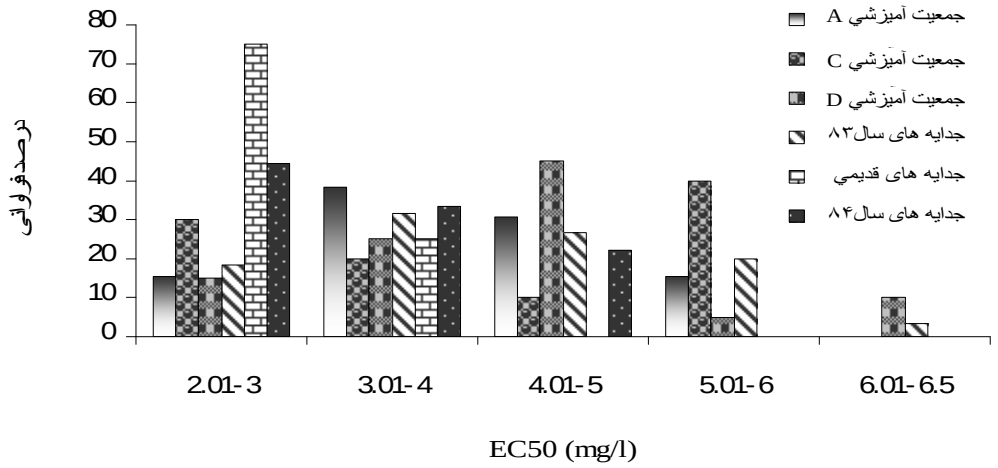
1. Resistance factor
2. range
3. Resistance ratio



شکل۱: نمودار رشد رویشی ۶۸ جدایه بیماریزا در غلظت‌های مختلف قارچکش تیوفانات‌متیل‌تیرام



شکل 2: نمودار درصد فراوانی MIC قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف



شکل3: درصد فراوانی EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف و جمعیت‌های آمیزشی مختلف

جدول 1: مقایسه میانگین EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جمعیت‌های آمیزشی (گونه‌های) مختلف

جمعیت آمیزشی (گونه)	تعداد جدایه	دامنه EC50 (mg/l)	میانگین EC50 (mg/l)
A (*F . verticillioides*)	13	2/63-5/48	3/93 ±0/87 a
C (*F. fujikuroi*)	10	2/01-5/83	4/10±1/ 53 a
D (*F. proliferatum*)	20	2/52-6/47	4/12 ±1/05 a
P			0/89
MSE			1/28

تیمارهایی که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند. MSE میانگین مربعات خطا است.

جدول 2: مقایسه میانگین EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در سال‌های مختلف

سال	تعداد جدایه	دامنه EC50 (mg/l)	میانگین EC50 (mg/l)
78 و قبل از آن	8	2/06-3/38	2/65 ±0/42 b
83	60	2/01-6/47	4/05±1/13 a
84	9	2/29-4/42	3/17 ±0/73 b
P			0/0006
MSE			1/09

تیمارهایی که دارای حروف مشابه می‌باشند، در سطح 5 درصد اختلاف معنی‌داری ندارند. MSE میانگین مربعات خطا است.

در بعضی از منابع، به مقاومت متوسط یا پایین نیز اشاره شده است. در پژوهش یوان و ژو (2005)، جدایه‌های حساس *Gibberella zea* به کاربندازیم، MIC برابر با 1/4 میکروگرم در میلی‌لیتر و جدایه‌های با مقاومت متوسط[1] MIC 100 میکروگرم در میلی‌لیتر داشتند، در حالی‌که جدایه‌های با مقاومت بالا، در غلظت 100 میکروگرم در میلی‌لیتر، بازداری کمتری نشان دادند. ما و همکاران (2003 b) رشد جدایه‌های *Monilinia fructicola* را در محیط‌کشت PDA حاوی قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول مورد بررسی قرار دادند. در حالی‌که EC50 جدایه‌های حساس به تیوفانات‌متیل بین 0/26-0/76 میلی‌گرم در لیتر بود، EC50 جدایه‌های با مقاومت پایین بین 2/4-6/4 میلی‌گرم در لیتر و EC50 جدایه‌های با مقاومت بالا، بیشتر از 50 میلی‌گرم در لیتر بود. بنابراین بین میانگین EC50 جمعیت‌های حساس و نیمه‌مقاوم یا با مقاومت پایین، 10 تا بیشتر از 10 برابر تفاوت وجود دارد. حتی اختلاف 3/22 برابر بین حساس‌ترین و متحمل‌ترین جدایه در جمعیت بررسی شده (به‌عنوان جمعیت حساس)، نسبت به بررسی‌های مشابه کمتر است. چنان‌که در بررسی وونگ و ویلکوکس (2002) روی 256 جدایه*Uncinula necator*، دامنه حساسیت در جمعیت پایه‌ای آزوکسی‌استروبین (به‌عنوان یک قارچ‌کش با مقاومت تک‌ژنی)، 7/5 برابر بود. آن‌چنان‌که از بررسی منابع مختلف برمی‌آید، جمعیت بررسی شده سه گونه قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در این پژوهش، جمعیت حساس به تیوفانات‌متیل‌تیرام می‌باشند. بنابراین تفاوتی نیز که با بررسی‌های آماری بین میانگین EC50 جدایه‌های سال‌های مختلف مشاهده شد، نمی‌تواند نشان‌دهنده دو جمعیت حساس و مقاوم باشد. هم‌چنین در این بررسی تفاوت معنی‌داری بین میانگین EC50 جدایه‌های متعلق به سه جمعیت آمیزشی (سه گونه) مختلف، پیدا نشد. بنابراین در تمام نتایج، اطلاعات مربوط به حساسیت و EC50 برای تمام جدایه‌ها به‌صورت مشترک به‌کار برده شد و تفکیکی بین آن‌ها صورت نگرفت. احتمالاً شباهت بین ناحیه ژنی مسئول مقاومت به تیوفانات‌متیل‌تیرام در سه گونه مختلف عامل این امر باشد. ما و همکاران (2003 a) جهت بررسی مقاومت به

1. Moderate resistance

آزوکسی‌استروبین در جدایه‌های *Alternaria* ، 72 جدایه را از سه گونه مختلف *A. alternata*، *A. tenuissima* و *A. arborescens* مورد استفاده قرار دادند. حساسیت و مقاومت برای تمام این گونه‌ها به‌طور یکسان صورت گرفته و هیچ تفکیکی بین آن‌ها انجام نشد.

گرچه در مورد قارچ‌کش‌هایی مثل گروه بنزیمیدازول‌ها، مقاومت در اثر جهش در یک تک‌ژن عمده به‌وجود می‌آید، اما جورجوپولوس (1988) ضمن اذعان به اثر ژن‌های دیگر، اشاره می‌کند که ژنی که بیش‌ترین تاثیر را در ایجاد مقاومت یک‌مرحله‌ای (تک‌ژنی) دارد، نسبت به سایر ژن‌هایی که حساسیت به همان نوع قارچ‌کش را تحت تاثیر قرار می‌دهند، اثر اپی‌ستاتیک[1] دارد و ژن‌های جهش‌یافته در سایر لوکوس‌ها نمی‌توانند باعث افزایش مقاومت شوند. بنابراین تفاوت مشاهده شده بین EC50 جدایه‌های مختلف در این آزمایش را شاید بتوان به اثر کوچک ژن‌های دیگر موثر بر حساسیت به قارچ‌کش و هم‌چنین تفاوت‌های اندک در ژن عامل مقاومت نسبت داد.

ممکن است، این تردید به وجود آید که شاید تمام جدایه‌های مورد بررسی، مقاوم باشند. اما در بررسی‌های انجام شده در مورد این گروه از قارچ‌کش‌ها در نقاط مختلف دنیا، حتی در صورت مقاومت گسترده، همواره جدایه‌های حساس همراه با جدایه‌های مقاوم در جمعیت یافت شده‌اند. کونها و ریزو (2003)، در بین 238 جدایه *Helminthosporium solani* ، 182 جدایه مقاوم و 56 جدایه حساس گزارش نمودند. در سایر گزارش‌ها نیز همواره جدایه‌های حساس وجود داشته‌اند.

در یک بررسی در اصفهان، جدایه *F. proliferatum* var. *proliferatum* عامل پوسیدگی طوقه برنج، در محیط کشت PDA حاوی 10 میلی‌گرم در لیتر تیوفانات‌متیل، بعد از 3 و 12 روز به‌ترتیب حدود 30 و 72 درصد بازداری رشد رویشی نشان داده و اثر قارچ‌کش در محیط کشت با گذشت زمان، افزایش یافت (دامادزاده و حسن‌پور،1366). در آزمایش بهالی و همکاران (2001)، 8 جدایه آزمایش شده *F. moniliforme* عامل پوسیدگی طوقه برنج در محیط کشت PDA حاوی 10 میلی‌گرم در لیتر تیوفانات‌متیل، بعد از 4 روز در دمای $30\pm2^{\circ}C$، 81/5 درصد بازداری از رشد رویشی نشان دادند. در این بررسی کم‌ترین بازداری از رشد رویشی در غلظت 10 میلی‌گرم در لیتر و بعد از 3 روز در محیط کشت PSA، حدود 70 درصد بود و اکثر جدایه‌ها در این غلظت، بازداری 100 درصد داشته و میانگین بازداری در این غلظت،96/8 درصد بود.

قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در بررسی پاداشت (1372) و پاداشت و همکاران (1375) به‌عنوان قارچ‌کش مناسب جهت کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان توصیه شده و به ثبت رسید. اما به‌نظر می‌رسد که با وجود گذشت نزدیک به 10 سال، جدایه مقاومی پیدا نشده و جمعیت موجود قارچ‌های عامل بیماری، حساس به قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام می‌باشند. دلیل این امر را شاید بتوان در استفاده کم و غیرگسترده از قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول در استان گیلان دانست. پاداشت و شریفی تهرانی (1381) نیز در مورد جمعیت قارچ *P. grisea* عامل بیماری بلاست برنج در استان گیلان، EC50 بین 0/6-0/1 میلی‌گرم در لیتر را برای قارچ‌کش بنومیل گزارش کردند. این امر نشان می‌دهد که حتی در مورد یکی از مستعدترین قارچ‌ها به مقاومت، جدایه مقاوم به بنومیل وجود نداشته است. به‌نظر می‌رسد که با وجود گزارش‌های متعدد ازنقاط مختلف دنیا در مورد ایجاد مقاومت گسترده به گروه بنزیمیدازول‌ها، این قارچ‌کش‌ها به‌طور موثری در سطح استان گیلان قابل استفاده باشند. اما استفاده از این قارچ‌کش‌ها نیاز به مدیریت دقیق و مناسب دارد. به‌طوری‌که استفاده مکرر و گسترده و به‌کار بردن استراتژی‌های نامناسب مانند کاربرد تنهای قارچ‌کش به تعداد چند بار در فصل زراعی، احتمال بروز مقاومت را بسیار بالا خواهد برد. بنابراین توصیه می‌شود که در صورت نیاز، این قارچ‌کش‌ها حتی‌الامکان با ترکیبی از هر دو راه‌کار مخلوط و تناوب قارچ‌کش‌ها با قارچ‌کش‌های غیر هم‌گروه استفاده شوند.

در پژوهش انجام شده توسط آندراده و همکاران (2000)، در حالی‌که جدایه‌های *Aspergillus nidulans* نسبت به قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول یعنی

1. Epistatic

کاربندازیم و تیابندازول، EC50 0/22 و 1/99 میلی‌گرم در لیتر داشتند، نسبت به تیرام EC50 برابر با 25/41 میلی‌گرم در لیتر داشتند. در بررسی دامادزاده و حسن‌پور (1366) روی جدایه *F. proliferatum* var. *proliferatum* در حالی‌که قارچ‌کش‌های مانکوزب و زینب (از گروه دی‌تیوکاربامات‌ها) پس از 12 روز در غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر و بعد از 12 روز، به‌ترتیب 100 و 51/5 درصد و مانکوزب در غلظت 10 میلی‌گرم در لیتر و بعد از 12 روز، 19 درصد بازداری از رشد رویشی داشتند، اما تیوفانات‌متیل در غلظت 10 میلی‌گرم در لیتر در همان مدت، 72 درصد بازداری نشان داد که این امر می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت بالای MIC و EC50 آن‌ها باشد. جاسپرز (2001)، حساسیت *Phaemoniella chlamydospora* را به تعدادی از قارچ‌کش‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داد. در بررسی او، درحالی‌که تیوفانات‌متیل EC50 0/312 میلی‌گرم در لیتر داشت، تیرام دارای EC50 17/4 میلی‌گرم در لیتر بود (58 برابر). بنابراین EC50 تیوفانات‌متیل‌تیرام که در این بررسی محاسبه شده، بیشتر ناشی از تیوفانات‌متیل می‌باشد. اما، چون ممکن است که تیرام هم اثرات کاهشی و یا افزایشی داشته باشد، غلظت ماده موثره (به‌دلیل استفاده از پودر وتابل 80 درصد)، 80 درصد در نظر گرفته شد. بدیهی است که حتی اگر تمام اثر این ترکیب مربوط به تیوفانات‌متیل دانسته می‌شد، تنها میزان EC50 از 6/47-2/01 به 4/04-1/25 میلی‌گرم در لیتر تغییر می‌یافت که این امر هیچ تاثیری در مقاومت و حساسیت نداشته و هم‌چنان تمام جدایه‌ها حساس خواهند بود.

استفاده از قارچ‌کش‌های حفاظتی همراه با قارچ‌کش‌های سیستمیک، علاوه بر کنترل تعداد بیشتری از عوامل بیماری‌زا، می‌تواند منجر به جلوگیری از مقاومت شود (واآرد، 1988). اما آن‌چه که بدیهی به‌نظر می‌رسد، این است که قارچ‌کش‌های حفاظتی گروه دی‌تیوکاربامات‌ها، به‌تنهایی، اثر کافی روی قارچ عامل بیماری ندارند. چنان‌که دامادزاده و حسن‌پور (1366) نتیجه گرفتند که اثر تیوفانات‌متیل و یا بنومیل برای کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در شرایط مزرعه بسیار بهتر از قارچ‌کش‌های دی‌تیوکاربامات مثل مانکوزب و زینب است. بنابراین در صورت بروز مقاومت گسترده به تیوفانات‌متیل، نمی‌توان به کنترل کافی بیماری به‌وسیله قارچ‌کش تیرام امیدوار بود.

فعالیت ذاتی تعیین شده قارچ‌کش در شرایط آزمایشگاهی، به‌طور کامل، کارایی مزرعه‌ای قارچ‌کش را منعکس نمی‌کند. بررسی‌ها نشان داده که سایر خصوصیات قارچ‌کش مثل تبخیر، انتشار مجدد، جذب، تجزیه و... علاوه بر فعالیت ذاتی به بازدهی قارچ‌کش تحت شرایط مزرعه کمک می‌کنند (وونگ و ویلکوکس، 2002).

در این بررسی، به‌دلیل عدم دسترسی به ماده تکنیکال، از فرمولاسیون پودر وتابل 80 درصد تیوفانات‌متیل‌تیرام استفاده شد. وادا و همکاران (1990) و همچنین تاته‌ایشی و چیدا (2000) نیز به ترتیب از فرمولاسیون‌های پودر وتابل 30 درصد و 15EC قارچ‌کش تریفلومیزول استفاده کردند. هم‌چنین کورت و همکاران (2003)، حساسیت *Verticillium dahliae* را نسبت به ترکیب پروکلراز-منگنز در محیط کشت آب-آگار مورد بررسی قرار دادند. از بررسی منابع مختلف، خصوصاً، راسل (2003) و بررسی‌های فوق، این‌چنین نتیجه‌گیری می‌شود که در برنامه‌های مراقبت از مقاومت به قارچ‌کش می‌توان از ترکیبات فرموله شده به جای ماده تکنیکال استفاده کرد. اما در ادامه برنامه مراقبت، باید از همان نوع ترکیب فرموله شده و با همان شرایط نگهداری و محیط کشت استفاده کرد تا نتایج به‌دست آمده، قابل مقایسه باشند.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات برنج کشور، به‌خاطر فراهم آوردن امکان انجام بخش اول این تحقیق، از سرکار خانم محیا عباس‌زاده، به‌خاطر تهیه بسیاری از جدایه‌های استفاده شده، از جناب آقای دکتر مصطفی درویش‌نیا، به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده در شناسایی مورفولوژی جدایه‌ها و از جناب آقای دکتر پویا زمانی، به‌خاطر راهنمایی در انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

اخوت، س. م. 1378. بیماری‌های غلات. انتشارات دانشگاه تهران، ص 272-192.

ایزدیار، م.، پاداشت دهکایی، ف. و دامادزاده، م. 1379. گزارش نهایی طرح بررسی کارآیی چند قارچ‌کش جدید در ضـدعفونی بذور در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج. 36 ص.

پاداشت دهکایی، ف. 1372. بررسی بیماری پوسیدگی طوقه برنج (*Gibberella fujikuroi*) در گیلان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

پاداشت دهکایی، ف. و ایزدیار، م. 1383. گزارش نهایی طرح بررسی اثر چند میکروارگانیزم در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج. مؤسسه تحقیقات برنج کشور، 16 ص.

پاداشت دهکایی، ف. و شریفی تهرانی، ع. 1381. مقاومت قارچ *Pyricularia grisea* Sacc. عامل بیماری بلاست برنج به قارچ‌کش‌های ادی فنفوس و بنومیل در استان گیلان. مجله علوم کشاورزی ایران، 33: 769-763.

پاداشت دهکایی، ف.، شریفی تهرانی، ع.، حجارود، ق.، ایزدیار، م. و اخوت، س.م. 1375. بررسی اثر چند قارچ‌کش در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گیلان. مجله بیماری‌های گیاهی، 32: 277-268.

دامادزاده، م. و حسن پور، ح. 1366. پوسیدگی طوقه برنج و مبارزه شیمیایی با آن در اصفهان. مجله بیماری‌های گیاهی، 23: 61-49.

شیخی گرجان، ع. 1380. بررسی راهبردهای کاربرد انتخابی حشره‌کش‌ها در کنترل سن گندم (*Eurygaster integriceps* Put.). پایان‌نامه دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات.

عباس‌زاده، م. 1384. مطالعه باروری جنسی و تیپ های آمیزشی (Mating types) در قارچ (*Gibberella fujikuroi*) عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج. پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان.

لطفی، ف. 1385. مطالعه ساختار جمعیت قارچ *Gibberella fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.

Anderade, A. C., Del Sorbo, G., Van Nistelrooy, J. G. M. and De Waard, M. A. 2000. The ABC transporter AtrB from *Aspergillus nidulans* mediates resistance to all major classes of fungicides and Some natural toxic compounds. Microbiology, 146: 1987 - 1997.

Bhalli, J. A., Aurangzeb, M. And Ilyas, M. B. 2001. Chemical Control of Bakanae Disease of Rice Caused by *Fusarium moniliforme*. Journal of Biological Sciences, 1: 483 - 484.

Brent, J.B. 1988 . Monitoring for fungicide resistance. In Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V. and smith, C.M., Fungicide Resistance in North America. APS press, P. 9 - 11.

Cunha, M. G. and Rizzo, D. M. 2003. Development of fungicide cross resistance in *Helmithosporium solani* populations from California . Plant Disease, 87 : 798 - 803.

Desjardins, A.E., Manadhar, H.K., Plattner, R.D., Manadhar, G.G., poling, S.M. and Maragos, C.M. 2000 . *Fusarium* species from Nepalse rice production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. Applied and Enviromental Microbiology, 66 : 1020 - 1025.

Georgopoulos, S.G. 1988. Genetics and population dynamics. In Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V. and Smith, C.M., Fungicide Resistance in North America. APS press, P. 12 - 13.

Gerlach,W.and Nirenberg, H.I. 1982. The Genus *Fusarium*-A Pictorial Atlas. Mitt.Biol. Bundesanst, Land-Forstw, PP.406.

Gisi, U. and Staehle-Csech, U. 1988. Resistance risk evaluation of new candidates for disease control. In Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V. and Smith, C.M., Fungicide Resistance in North America. APS press, P. 101 - 106.

Hewitt, H.G. 1998. Fungicides in Crop Protection. CAB INTERNATIONAL, PP. 221.

Hsiang, T., Yang, L. and Barton, W. 1997. Baseline Sensitivity and cross - resistance to demethylation-inhibiting fungicides in Ontario isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* . European Journal of Plant Phatology, 103 : 409 - 416.

Iguchi, k. and Takeuchi, T. 1988. Occurrence and control of benomyl resistant strains of *Fusarium moniliforme* the causal fungus of bakanae disease in Chiba prefecture. Review of plant pathology, 1991, 5: 342.

Jaspers, M. V. 2001. Sensitivity of *Phaeomoniella Chlamydospora* to fungicides in vitro. New Zealand Plant Protection, 54: 225 - 228.

Kurt, S., Dervis, S. and Sahinler, S. 2003. Sensitivity of *Verticillium dahliae* to prochloraz and prochloraz - manganese complex and control of *Verticillium* wilt of cotton in the field. Crop Protection, 22: 51 - 55.

LaMondia, J. A. and Douglas, S. M. 1997. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from Connecticut Greenhouses to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides . Plant Disease, 81 : 729 - 732.

Ma, Z., Felts, D. and Michailides, T.J. 2003a. Resistance of azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. Pesticide Biochemistry and physiology, 77: 66-74.

Ma, Z., Yoshimura, M. and Michailides, T. J. 2003b. Identification and Characterization of Benzimidazole Resistance in *Monilinia fructicola* from Stone Fruit Orchards in California . Applied and Enviromental Microbiology, 69 : 7145 - 7152.

Nelson, P.E.,Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species. The Pennsylvania state university press, PP. 193.

Nirenberg, H.I. and O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90 : 434 - 458.

Ogawa, K. 1988. Damage by Bakanae Disease and its chemical control . Japan pesticide information, 52 : 13 - 17.

Russell, P. E. 2003. FRAC Monograph No 3: Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Crop Life International, Brussels, PP. 56.

Staub, T. 1991. Fungicide Resistance: Practical Experience with Antiresistance Strategies and the Role of Integrated Use. Annual Review of Phytopathology, 29: 421 - 42.

Tateishi, H. and Chida, T. 2000. Sensitivity of *Fusarium moniliforme* Isolates to Ipconazole. Journal of General Plant Pathology, 66 : 353 - 359.

Waard, M. A. 1988. Interactions of fungicide combinations. In Delp, C.J., Delp, B.R., Fort III, T.M., Morton, H.V. and Smith, C.M. Fungicide Resistance in North America. APS press, P. 98-100.

Wada, T., Kuzuma, S. and Takenaka, M., 1990. Sensitivity of *Fusarium moniliforme* Isolates to Pefurazoate. Annual of Phytopathological Society of Japan, 56: 449 - 456.

Wong, F. P., and Wilcox, W. F. 2000. Distribution of Baseline Sensitivities to Azoxystrobin Among Isolates of *Plasmopara viticola* . Plant Disease, 84 : 275 - 281.

Wong, F. P. and Wilcox, W. F. 2002. Sensitivity to Azoxystrobin Among Isolates of *Uncinula necator* : Baseline Distribution and Relationship to Myclobutanil Sensitivity . Plant Disease, 86 : 394 - 404.

Yuan, S. and Zhou, M. 2005. A major gene for resistance to carbendazim, in field isolates of *Gibberella zea*. Canadian Journal of Plant Pathology, 27: 58 - 63.

Study on the Sensitivity of *Fusarium* spp. Isolates, Causal Agents of Rice Bakanae Disease and Foot Rot to Thiophanate-methyl thiram

Hossien Nejad[1], A., Zafari[2], D. and Padasht Dehkaee[3], F.

Abstract

Rice Bakanae disease and foot rot caused by *Fusarium verticillioides*, *F. fujikuroi* and *F. proliferatum*, is one of the most important rice seed-born diseases that the best method of its control is seed treatment by fungicides. Fungicide resistance is one of the important subjects that must be studied continuously. In this study, sensitivity of 77 isolates to thiophanate-methyl thiram was investigated in PSA medium amended with 1, 5, 10, 20 and 25 mg/l of thiophanate-methyl thiram active ingredient, after that EC50 and MIC of this fungicide were calculated for each isolate. The results showed that EC50 and MIC of thiophanate-methyl thiram for different isolates were 2.01-6.47 and 5-25 mg/l, respectively. Since the least sensitive isolate was separated from the most sensitive isolate by factor of 3.22 and previous isolates were placed in this range too, therefore it is concluded that resistance to thiophanate-methyl thiram hasn't appeared in studied populations after almost 10 years of application. There wasn't any significant difference among mean EC50 of different species, thus their sensitivity range can be expressed as identical EC50 range for three species.

Key words: Foot rot, Thiophanate-methyl thiram, Sensitivity, Fungicide, *Fusarium*.

1& 2. Ex-student and Associate Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan

3. Researcher, Plant Protection Unit, National Institute of Rice Research, Rasth

---