

اثر متقابل قارچ *Verticillium dahlia* و نماتد *Meloidogyne incognita* در گیاه پنبه

سعید نصراله نژاد^{۱*}، زکیه السادات محمدی^۲، تانیا داوریان^۳، عمران عالی‌شاه^۴
و عبدالحسین طاهری^۱

^۱ دانشیار و دانش‌آموخته گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
^۲ مربی گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور گرگان
^۳ دانشیار مؤسسه تحقیقات پنبه کشور- گرگان
تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲

چکیده

قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی *Verticillium dahlia* و نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne incognita* از شایع‌ترین و مخرب‌ترین عوامل بیماریزا در زراعت پنبه می‌باشند. به منظور تعیین اثر متقابل بین این دو عامل، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی بر روی چهار رقم پنبه انجام گرفت. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار (شامل: شاهد، قارچ به تنهایی، نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰، نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰، قارچ و نماتد همزمان با غلظت ۲۳۰۰ و قارچ و نماتد همزمان با غلظت ۷۰۰۰) در چهار تکرار به اجرا در آمد. ابتدا نماتد *Meloidogyne incognita* از گیاهان میزبان جداسازی شد و پس از تعیین گونه و نژاد، با تلقیح به نشای گوجه فرنگی تکثیر گردید. قارچ *Verticillium dahlia* پس از جداسازی از بوته‌های پنبه آلوده، کشت و شناسایی گردید و سپس برای تکثیر، به بذر گندم رقم تجن (سه بار اتوکلاو شده) انتقال یافت. تعداد $10^4 \times 12$ میکرواسکلروت برای هر تیمار قارچ و تعداد ۷۰۰۰ و ۲۳۰۰ تخم و لارو سن دو، برای تیمارهای مربوط به نماتد، به گیاهچه‌های ۴۰ روزه پنبه، مایه‌زنی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که اثرات متقابل قارچ *Verticillium dahlia* و نماتد *Meloidogyne incognita* در پنبه از نوع تشدید کننده می‌باشد؛ به طوری که ترکیب همزمان قارچ و نماتد افزایش معنی‌داری ($P=1\%$) در شدت پژمردگی پنبه داشته است. با افزایش غلظت نماتد، پوسیدگی ریشه، تعداد گره و کیسه تخم نیز افزایش یافته و برعکس طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: پنبه، قارچ *Verticillium dahlia*، نماتد *Meloidogyne incognita*، اثر متقابل

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum*) از محصولات گران‌بها و پرارزشی است که از نظر اقتصادی موقعیت خاصی در جهان امروزی بدست آورده است تا جایی که به آن طلای سفید نام نهاده‌اند (آتکسن سون، ۲۰۰۷). بنابر گزارشات موجود از ایالات متحده حدود ۱۳۹ قارچ بیماریزا از روی این گیاه گزارش شده است (تارت و واتکین، ۲۰۱۵). از بین بیماری‌های مختلف، بیماری پژمردگی آوندی یا ورتیسیلیومی مهم‌ترین بیماری پنبه بوده و گسترش جهانی دارد. این بیماری ابتدا در سال ۱۹۲۷ در پنبه‌های تجارتي آمریکا در تنسی و کالیفرنیا به سال ۱۹۳۰ توسط شاپووالوف و ردلف گزارش شد (تارت و واتکین، ۲۰۱۵). از بین دو گونه *V. albo-atrum* و *V. dahlia* که به‌عنوان عامل پژمردگی آوندی در گیاهان شناسائی گردید، گونه *V. dahlia* به‌عنوان عامل بیماری پژمردگی آوندی پنبه در ایران معرفی شده است (سعیدزاده و همکاران، ۲۰۰۹).

نماتودهای جنس *Meloidogyne* از مهم‌ترین گونه‌های نماتد انگل گیاهی در سراسر دنیا و به عنوان مهم‌ترین نماتدهای بیماریزای پنبه مطرح می‌باشند و از میان چهار گونه مهم *Meloidogyne* (*M. incognita*، *M. javanica*، *M. hapla*، *M. arenaria*) که از ایالات متحده گزارش شده‌اند، فقط *M. incognita* به پنبه حمله می‌کند و جمعیت‌های مختلف این گونه از نظر بیماری‌زایی در این گیاه متفاوتند (تارت و واتکین، ۲۰۱۵). طبق گزارشات مبنی بر بررسی و برآورد میزان خسارات ناشی از این نماتد در زراعت پنبه که هر ساله از سوی انجمن بیماریهای پنبه (CDC) منتشر می‌شود، تقریباً ۲ درصد از کل پنبه در ایالات متحده بر اثر نماتدها آسیب می‌بیند (آتکسن سون، ۲۰۰۷).

ارتباط متقابل بین گونه‌های مختلف نماتد مولد گره و بسیاری از عوامل بیماریزای گیاهی از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها مورد توجه بسیاری از محققین بوده است. اولین بار در سال ۱۸۹۲ اتکینسون مشاهده نمود که پژمردگی فوزاریومی پنبه در حضور نماتد مولد گره شدیدتر ظاهر می‌شود (پاول، ۱۹۷۱). تاکنون اینگونه روابط متقابل روی بسیاری از محصولات از جمله یونجه، لوبیا، میخک، فلفل، پنبه، نخود، توتون، گوجه فرنگی و سیب زمینی مطالعه شده است (تارت و واتکین، ۲۰۱۵). در کلیه این روابط متقابل، نقش نماتد به عنوان تشدید کننده بیماری‌زایی بیمارگر ثانویه ذکر شده است. ابتدا تصور بر این بوده نقش نماتد تنها ایجاد زخم و تسهیل کننده نفوذ بیمارگر ثانویه باشد تا اینکه پاول در سال‌های ۱۹۷۱ و ۱۹۷۰ ثابت کرد که آلودگی قارچ در حضور نماتد به مراتب بیشتر از آلودگی قارچ به تنهایی است و شدت بیماری بیشتر از مجموع میزان دو بیماری می‌باشد. او پیشنهاد نمود که در این ارتباط متقابل نقش نماتد صرفاً ایجاد زخم و آماده‌سازی زمینه نفوذ نبوده و احتمالاً نماتد موجب اختلال در فیزیولوژی گیاه شده به‌طوری که استعداد آلودگی آن توسط قارچ عامل پژمردگی افزایش می‌یابد (پاول، ۱۹۷۱). فرنس و ابوی (۱۹۹۴) نشان دادند که در ارتباط متقابل نماتد *Meloidogyne*

usarium oxysporum f. sp. lycopersici و *javanica* طی سه هفته بررسی میزان نفوذ قارچ در آوندهای چوبی و سلول‌های غول‌آسا در ارقام حساس به قارچ به حدی بود که منجر به انسداد آوندها و تجزیه سلول‌های غول‌آسا گردیده است. در حالی که در ارقام مقاوم تا هفته دوم هیچ گونه علائمی از بیماری و نشانه‌ای از وجود قارچ در آوندهای چوبی مشاهده نشد و در هفته سوم نیز تعداد معدودی میکروکنیدی فقط در آوندهای چوبی ظاهر شدند. همچنین فرنس و ابوی (۱۹۹۴) نشان دادند که شدت پژمردگی فوزاریومی پنبه ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* با میزان جمعیت نماتد رابطه مستقیم دارد. شدت بیماری در صورت وجود تعامل بین نماتد و قارچ می‌تواند منجر به مرگ گیاه شود. در حالی که همان میزان زادمایه اولیه، تنها با حمله قارچ شدت بیماری بسیار پائین‌تری ایجاد می‌کند.

تعدادی از محققان افزایش جمعیت نماتدهای *Pratylenchus spp.* را در گیاهان آلوده به ورتیسیلیوم (آلودگی توأم) را نسبت به گیاهان آلوده به نماتد (به‌تنهایی) گزارش نموده‌اند. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که نماتدها بر روی گیاهان آلوده به ورتیسیلیوم تکثیر سریع‌تری دارند (فولکلر و اسکاتلند، ۲۰۰۱).

در مورد ارتباط متقابل نماتد مولد گره و قارچ ورتیسیلیوم اطلاعات کمی وجود دارد و اکثر نتایج با هم مغایرت دارند. شواهد اولیه از ارتباط بین *V. dahliae* و نماتد مولد گره در پنبه مشاهده شد. برهمکنش نماتدها با عوامل پژمردگی آوندی یکی از موضوعات مورد بحث محققان است که اثر آن در پژمردگی ورتیسیلیومی به‌صورت افزایش شدت بیماری، کاهش دوره مون و کاهش محصول ارائه شده است. بررسی‌های موجود اثرات متقابل از نماتدهای مولد گره (*M. javanica*) و قارچ *V. dahlia* را روی خیار و نهال‌های زیتون در گلخانه نشان داد که وجود توأم بیمارگرها اثرات شدیدتری بر آلودگی نهال‌ها دارد (مجدوب و همکاران، ۲۰۰۲). با بررسی همکنش نماتدهای مولد گره *M. incognita* و *P. vulnus* و قارچ *V. dahlia* بر روی دو رقم سین و پندالینو مشاهده کردند که قارچ ورتیسیلیوم به همراه با هر یک از نماتدها علائم پژمردگی و تغییر رنگ آوندی را در گیاه شدیدتر و سریع‌تر ایجاد می‌کند (ولر و همکاران، ۱۹۹۴). در مطالعه اثر متقابل قارچ *V. albo-atrum* با نماتد *M. incognita* نتیجه گرفتند که حضور نماتد باعث افزایش معنی‌دار در شدت بیماری پژمردگی می‌شود و این شدت بیماری با میزان جمعیت نماتد ارتباط مستقیم دارد.

برجسون و همکاران (۱۹۷۰) پی بردند که آلودگی گیاهان گوجه فرنگی به نماتد گره ریشه *M. javanica* باعث افزایش پیوسته‌ای در جمعیت قارچ *F. oxysporum f. sp. Lycopersici* در رایزوسفر گوجه فرنگی می‌شود. هم چنین آنها پی بردند که اکتینومیست‌های آنتاگونیست *Fusarium spp.* در رایزوسفر گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد مولد گره کاهش یافته بود. بنابراین آلودگی نماتد

ممکن است در افزایش جمعیت قارچ بیمارگر در رایزوسفر تاثیر داشته باشد و از پتانسیل فعالیت آنتاگونیست‌ها بکاهد.

شدت پژمردگی ناشی از *Verticillium dahliae* Kleb به‌وسیله *M. incognita* و *R. reniformis* و *Belonolaimus gracilis* و *Pratylenchus spp. Cobb* افزایش می‌یابد. تحقیقات جدید نشان داده است که نماتدهای *Pratylenchus* طول دوره انکوباسیون *Verticillium* را کوتاه می‌کنند و میزان وقوع و شدت بیماری را نیز افزایش می‌دهند (تارت و اتکین، ۲۰۱۵). هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر متقابل قارچ عامل پژمردگی آوندی *Verticillium dahlia* و نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne incognita* روی گیاه پنبه در شرایط گلخانه بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه قارچ: طی چند مرحله بازدید از ایستگاه تحقیقات پنبه کردکوی، بوته‌های آلوده به پژمردگی ورتیسیلیومی جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردید. جهت ضدعفونی سطحی از روش بک و همکاران (۲۰۰۲) استفاده گردید. به‌منظور جداسازی قارچ ورتیسیلیوم از ساقه پنبه، ساقه به قطعات ۳-۴ سانتی‌متری بریده شده و به‌مدت ۵-۴ دقیقه در محلول اتانول ۹۶ درجه فرو برده شد. سپس نمونه‌ها از محلول خارج شده و ۰/۵ سانتی‌متر از دو انتها حذف گشته و بقیه قسمت‌ها به قطعات ۳-۴ میلی‌متری تقسیم و در محیط زاپک-داکس-آگار حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام سولفات استریپتومایسین کشت گردیدند. نمونه‌ها بعد از کشت، در انکوباتور ۲۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به‌مدت ۲ هفته نگهداری شدند. پرگنه‌های رشد یافته قارچ پس از شناسایی و اثبات بیماری‌زایی به روش نوک ریشه خالص‌سازی گردید و از طریق کشت روی بذر گندم تکثیر شد. مقدار اینوکولوم برای هر گلدان $10^4 \times 12$ میکرواسکلروت در نظر گرفته شد.

تهیه زادمایه نماتد: نمونه‌های آلوده به نماتد از مزارع با میزبان‌های مختلف نماتد جمع‌آوری و پس از تهیه توده تخم منفرد روی گوجه فرنگی رقم روت گرس تکثیر گردیدند و پس از چند دوره متوالی انتقال روی گوجه فرنگی، میزان مناسبی از زادمایه نماتد به دست آمد. استخراج تخم و تهیه لارو سن دو با استفاده از روش هوسی و بارکر انجام گرفت (وایت هد، ۱۹۶۸). ضمناً با استفاده از خصوصیات مرفولوژیکی و مرفومتريک، گونه نماتد *M. incognita* تشخیص داده شد.

آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار در گلخانه صورت گرفت. تیمارها شامل شاهد، نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰، نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰، قارچ به تنهایی، قارچ و نماتد هم‌زمان با غلظت ۲۳۰۰ و قارچ و نماتد هم‌زمان با غلظت ۷۰۰۰ در نظر گرفته شد.

تهیه گیاهچه‌های پنبه: پس از تهیه خاک مورد نظر، ۵ عدد بذر از هر رقم (ضمن اینکه ۲۴ ساعت قبل، با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد ضدعفونی و جهت رشد بهتر و سریع‌تر خیس داده شدند)، در هر گلدان کاشته شد. در کنار هر ذر یک عدد نی به منظور اضافه کردن زادمایه تعبیه گردید تا زادمایه دقیقاً به پای ریشه گیاه اضافه گردد. نهال‌ها در درجه حرارت ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه، نگهداری و در صورت نیاز، آبیاری شدند. جهت افزودن زادمایه، ۲ ماه بعد از کاشت بوته‌های اضافی هر گلدان، خارج گشتند.

اضافه کردن سوسپانسیون به منظور ارزیابی بیماری - حجم خاک گلدان‌های مورد آزمایش ۳ کیلوگرم بود. میزان سوسپانسیون قارچ به ازای هر کیلوگرم خاک ۴۰ میکرواسکلروت منظور گردید که بعد از خارج کردن نی‌ها در چاهک ایجاد شده ریخته شد. نحوه اختلاط تخم و لاروهای سن دوم با خاک گلدان‌ها - جمعیت در نظر گرفته شده نماتد مورد آزمون که از نظر هویت کاملاً یکسان و مشخص می‌باشد، به میزان ۲۳۰۰ و ۷۰۰۰ لارو سن دوم به داخل چاهک‌های اطراف ریشه گیاهچه‌ها اضافه گردید.

جداسازی مجدد ورتسیلیوم از گیاهان تلقیح شده: در پایان آزمایش با کشت ریشه‌ی گیاهان آلوده به قارچ بر روی محیط نیمه انتخابی، قارچ *V. dahliae* مجدداً جداسازی شد. آماربرداری و ثبت علائم پژمردگی ورتسیلیومی جهت ارزیابی بیماری: مایه‌زنی گیاهچه‌های پنبه در اواخر تیرماه انجام شد و در اواخر شهریور همان سال پس از گذشت حدود ۲ ماه از مایه‌زنی، گیاهچه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند که ارزیابی بیماری با بررسی ظاهری علائم در شاخه و برگ انجام گرفت. هر هفته ۲ بار یادداشت برداری صورت گرفت. شاخص ۴-۰ بر اساس درصد برگ‌های متأثر شده توسط کلروز، نکروز و علائم پژمردگی و یا برگ‌ریزی استفاده شد (درجه ۰ = بدون علائم: درجه ۱ = ۱-۳۳٪ برگ‌های متأثر شده: درجه ۲ = ۳۴-۶۶٪ برگ‌های متأثر شده: درجه ۳ = ۶۷-۱۰۰٪ برگ‌های متأثر شده: درجه ۴ = گیاهان مرده). نواحی زیر منحنی پیشرفت بیماری برای هر تیمار، جهت ارزیابی میزان بروز بیماری توسط فرمول زیر محاسبه گردید (ولر و همکاران، ۱۹۹۴):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \left(\frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Y_i : درصد بروز بیماری در ارزیابی i ام

T_i : نخستین تاریخ ارزیابی

n : کل روزهای ارزیابی بیماری.

ارتباط بین شدت بیماری و رشد توسط اندازه‌گیری چندین پارامتر رشد، ۲ هفته پس از تلقیح به دست آمد.

ثبت علائم از یک هفته بعد از تلقیح آغاز و تا دو ماه ادامه یافت. داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از آزمون LSD در نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. روش ارزیابی فاکتورهای رشدی گیاهان مورد آزمون: پس از اتمام مدت آزمایش گلدان‌ها را برگردانده و ریشه‌های هر یک را با ملایمت در زیر جریان آب شسته و سپس بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا آب اضافی آنها خارج شود. طول و وزن (تر و خشک) ریشه و اندام هوایی در این مرحله اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری طول ریشه از انتهای نوک تا محل یقه، طول ساقه از محل یقه تا انتهای نوک ساقه به‌عنوان مشخصه‌های رشدی گیاه به منظور ارزیابی وضعیت رشد و نمو گیاهان مورد آزمون یادداشت شد. وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه پس از قرار دادن آنها در آون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

روش محاسبه شاخص گال و شاخص کیسه تخم: در انتهای آزمایش ریشه هر یک از نهال‌های دارای تیمار نماتد به قطعات چند سانتی‌متری خرد و دو نمونه یک گرمی از هر تیمار گرفته و با اسید فوشین رنگ‌آمیزی شد. توده‌های تخم به وسیله فرو بردن ریشه‌ها در محلول اسید فوشین ۰/۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از رنگ‌آمیزی نمونه‌های ریشه، تعداد توده‌های تخم شمارش گردید. شدت گال ریشه (RGS) براساس شاخص درجه ۰: ۵-۰ بدون گال، درجه ۱ ۱-۲ گال، درجه ۲: ۱۰-۳ گال، درجه ۳: ۳۰-۱۱ گال، درجه ۴: ۱۰۰-۳۱ گال و درجه ۵: بیش از ۱۰۰ عدد گال ارزیابی شد (جدول ۱).

جدول ۱ - شاخص گال (ولر و همکاران، ۱۹۹۴)

شاخص گال	صفر	۱	۲	۳	۴	۵
تعداد گال	صفر	۱-۲	۳-۱۰	۱۱-۳۰	۳۱-۱۰۰	بیش از ۱۰۰

نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که ظهور علائم روی گیاه پنبه مایه‌زنی شده به قارچ و نماتد دو هفته بعد از مایه‌زنی نمایان می‌شود که ابتدا به‌صورت سوختگی بین رگبرگ پائینی، سپس زردی و سوختگی کل برگ و در برخی موارد ریزش و پیچیدگی پهنک برگ‌ها نمایان می‌شود. طول اندام هوایی و ریشه: نتایج بررسی‌ها نشان داد بین تیمارها از لحاظ طول اندام هوایی در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده برای تیمارها و ارقام مختلف پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ساقه	طول ریشه	وزن تر ساقه	وزن خشک ساقه	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	تعداد گره	تعداد کیسه تخم	میزان پوسیدگی
تیمار A	۵	۱۹۹/۷۶۶*	۷/۵۵ ^{ns}	۶۶/۴۵۸ ^{ns}	۲/۶۶۷ ^{ns}	۰/۳۷۶ ^{ns}	۰/۰۲۱ ^{ns}	۱۵/۱۰۰**	۹/۶۹۱**	۲۸/۲۴۱**
تیمار B	۳	۳۵/۶۲۵ ^{ns}	۵/۱۷۳ ^{ns}	۴۲/۳۱۰ ^{ns}	۲/۶۷۱ ^{ns}	۰/۷۴۳ ^{ns}	۰/۰۴۷ ^{ns}	۰/۰۸۳ ^{ns}	۲/۳۰۵**	۰/۵۹۷ ^{ns}
AB	۱۵	۵۷/۲۸۳ ^{ns}	۸/۳۶۵ ^{ns}	۱۹/۹۳۰ ^{ns}	۰/۷۷۴ ^{ns}	۰/۲۲۵ ^{ns}	۰/۰۲۱ ^{ns}	۰/۰۸۳ ^{ns}	۰/۵۳۰**	۰/۲۶۳ ^{ns}
خطا	۷۲	۸۸/۹۷۲	۵۸۳/۳۷۵	۴۷/۳۰۰	۱/۲۸۳	۰/۳۸۱	۰/۰۲۷	۰/۰۹۷	۰/۲۰۱	۰/۴۰۲
ضرب‌تغییرات	-	۲۲/۵۲	۲۶/۶۳	۷۸/۸۹	۶۲/۷۳	۶۰/۶۰	۶۲/۲۰	۲۴/۹۴	۴۶/۸۳	۴۶/۸۷

A: تیمارهای قارچ و نماد B: تیمارهای قارچ و نماد

** و * به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد و ns: عدم معنی‌دار

بیشترین میانگین طول اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد بود که اختلاف آن با تیمارهای نماد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ و قارچ و نماد با غلظت ۷۰۰۰ معنی‌دار بود (جدول ۳). کمترین میانگین طول اندام هوایی به تیمار نماد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ تعلق داشت. تیمارهای قارچ به تنهایی و نماد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰ و قارچ و نماد با غلظت ۲۳۰۰ اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند. در صفت طول ریشه اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. بیشترین میانگین طول ریشه مربوط به تیمار شاهد و کمترین میانگین به تیمار قارچ و نماد با غلظت ۷۰۰۰ مربوط بود. تیمار قارچ به تنهایی بعد از شاهد دارای بیشترین میانگین طول ریشه بود (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده برای تیمارها و ارقام مختلف پنبه

فاکتور	تیمار	طول ساقه	طول ریشه
A	شاهد	۴۵/۹۵ a	۱۱/۳۵ a
	قارچ به تنهایی	۴۵/۸۷ ab	۱۱/۳۱ a
	نماد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰	۳۷/۰۶ c	۹/۸۷ a
	نماد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰	۴۳/۱۹ abc	۱۱/۲۵ a
	قارچ و نماد با غلظت ۷۰۰۰	۳۸/۲۵ bc	۴/۵۶ a
	قارچ و نماد با غلظت ۲۳۰۰	۴۲/۲۵ abc	۹/۸۷ a
	L.S.D	۶/۶۵	۲/۰۱
B	ساحل	۴۳/۳۷ a	۱۰/۵۲ a
	N200	۴۲/۲۵ a	۱۱/۱۹ a
	مهر	۴۱/۴۶ a	۱۰/۱۲ a
	ورامین	۴۰/۵۰ a	۱۰/۵۲ a
	L.S.D	۵/۴۳	۱/۶۴

A: تیمارهای قارچ و نماد B: تیمارهای قارچ و نماد

اعداد با حروف مشابه در هرستون در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

وزن تر و خشک اندام‌های هوایی: نتایج نشان داد وزن تر اندام‌های هوایی بین تیمارها و ارقام، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در بین تیمارها، شاهد با میانگین ۱۱/۲۷ دارای بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی و نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ دارای بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی بودند. اختلاف بین این دو تیمار معنی‌دار بود. تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ بعد از تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ کمترین میانگین وزن تر اندام‌های هوایی را به خود اختصاص داد (جدول ۴).

براساس نتایج بین تیمارها از لحاظ آماری در صفت وزن خشک اندام‌های هوایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. تیمار شاهد با بیشترین وزن خشک اندام‌های هوایی با دو تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ و قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ اختلاف معنی‌داری داشت. بقیه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند.

نتایج وزن تر و خشک ریشه نشان داد از لحاظ آماری بین تیمارها در صفت وزن تر ریشه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. بیشترین میانگین با مقدار ۱/۲۱ به تیمار شاهد تعلق داشت که این مقدار با میانگین وزن تر ریشه تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ اختلاف معنی‌داری داشت. سایر تیمارها با تیمار شاهد و تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ اختلاف معنی‌داری نداشتند. تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ پس از تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ دارای کمترین میانگین وزن تر ریشه بود.

نتایج نشان داد وزن تر اندام‌های هوایی بین تیمارها و ارقام، اختلاف معنی‌داری ندارد (جدول ۴). در بین تیمارها، شاهد با میانگین ۱۱/۲۷ دارای بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی و نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ دارای بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی بودند. اختلاف بین این دو تیمار معنی‌دار بود. تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ بعد از تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ کمترین میانگین وزن تر اندام‌های هوایی را به خود اختصاص داد. در بین ارقام، رقم ورامین بیشترین و رقم مهر کمترین وزن تر اندام‌های هوایی را دارا بودند. دو رقم N200 و ساحل به ترتیب بعد از ورامین دارای بیشترین وزن تر اندام هوایی بودند (جدول ۴).

بر اساس نتایج جدول ۴، بین تیمارها از لحاظ آماری در صفت وزن خشک اندام‌های هوایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. تیمار شاهد با بیشترین وزن خشک اندام‌های هوایی با دو تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ و قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ اختلاف معنی‌داری داشت. بقیه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند.

ضمن این‌که نتایج بیانگر این بود که بین ارقام نیز از نظر وزن خشک اندام‌های هوایی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. البته این اختلاف در بین ارقام مهر و N200 معنی‌دار بود. رقم مهر با میانگین ۲/۱۷ دارای کمترین وزن خشک اندام هوایی بود. ارقام ساحل و ورامین اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی در تیمارها و ارقام مختلف پنبه نسبت به اثرات قارچ و نماتد.

فاکتور	سطح	وزن تر اندام‌های هوایی	وزن خشک اندام‌های هوایی
A	شاهد	۱۱/۲۷ a	۲/۴۰ a
	قارچ به تنهایی	۹/۳۵ ab	۱/۸۵ a
	نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰	۵/۴۹ b	۱/۴۳ b
	نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰	۱۰/۱۹ ab	۲/۱۳ a
	قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰	۷/۶۶ ab	۱/۳۵ b
	قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰	۸/۳۵ ab	۱/۶۷ a
	L.S.D	۴/۸۵	۰/۸۴
B	ساحل	۸/۳۱ a	۱/۷۶ ab
	N200	۹/۲۲ a	۲/۱۷ a
	مهر	۷/۱۰ a	۱/۳۷ b
	ورامین	۱۰/۲۳ a	۱/۹۲ ab
	L.S.D	۳/۹۶	۰/۶۵

A: تیمارهای قارچ و نماتد B: تیمارهای قارچ و نماتد
اعداد با حروف مشابه در هرستون در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

تعداد گره، کیسه تخم و میزان پوسیدگی ریشه: نتایج نشان داد تیمار شاهد با میانگین صفر دارای کمترین تعداد گره بود و تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ دارای بیشترین تعداد گره را دارا می‌باشد. بین تیمار قارچ و نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. اختلاف بین تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ و نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ نیز معنی‌دار بوده است. تعداد کیسه تخم در بین تیمارها، ارقام و اثر متقابل تیمار و رقم در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲). در بین تیمارها، تیمار شاهد با مقدار صفر دارای کمترین میانگین کیسه تخم و تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ دارای بیشترین میانگین کیسه تخم بودند. تیمارهای نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰، قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ و قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

بیشترین میانگین پوسیدگی ریشه به تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ و کمترین میانگین پوسیدگی ریشه به تیمار شاهد تعلق داشت. بین تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰ و قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰ اختلاف معنی‌داری دیده نشد. اختلاف بین تیمارهای نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰ و نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ و تیمار قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰ معنی‌دار بوده است (جدول ۵).

جدول ۵ - نتایج مقایسه میانگین تعداد گره، کیسه تخم و میزان پوسیدگی ریشه در تیمارها و ارقام مختلف پنبه

فاکتور	سطح	تعداد گره	تعداد کیسه تخم	میزان پوسیدگی ریشه
	شاهد	۰ C	۰ C	۰ C
A	نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰	۲/۰۰ a	۱/۸۷ a	۱/۲۵ b
	نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰	۱/۸۷ ab	۱/۱۹ b	۰/۰۱ b
	قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰	۱/۷۵ b	۱/۳۱ b	۰/۰۳ a
	قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰	۱/۸۷ ab	۱/۳۷ b	۲/۸۷ a
	L.S.D	۰/۲۲	۰/۳۱۲	۰/۴۵
B	ساحل	۱/۲۵ a	۱/۱۲ a	۱/۵۸ a
	N200	۱/۶۷ a	۰/۵۰ b	۱/۲۵ a
	مهر	۱/۲۹ a	۱/۱۷ a	۱/۳۳ a
	ورامین	۱/۲۹ a	۱/۰۴ a	۱/۲۵ a
	L.S.D	۰/۱۸	۰/۲۹	۰/۳۶

A: تیمارهای قارچ و نماتد B: تیمارهای قارچ و نماتد

اعداد با حروف مشابه در هرستون در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

نتایج نواحی زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC): نتایج نشان داد (جدول ۶) در اولین تاریخ یادداشت‌برداری (مرداد ماه)، بین تیمارها در صفت AUDPC اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد ولی در دو تاریخ بعدی این اختلاف معنی‌دار نبوده است. در اواخر یادداشت‌برداری (تاریخ‌های اوایل، اواسط و اواخر شهریور ماه) مجدداً اختلاف معنی‌دار شد. به طوری که میانگین‌ها در اوایل شهریور در سطح ۵ درصد و در دو تاریخ آخر در سطح ۱ درصد اختلاف داشتند. در همه تاریخ‌ها شاهد دارای کمترین میانگین یعنی مقدار صفر بود. در اولین تاریخ تیمار قارچ به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ و قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰ دارای بیشترین میانگین AUDPC بودند. در این تاریخ تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰ نیز با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. اما در سه تاریخ آخر تیمار نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ دارای بیشترین میانگین AUDPC بود. در این تاریخ‌ها به غیر از شاهد سایر تیمارها با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۶).

جدول ۵: نتایج مقایسه میانگین AUDPC در تاریخ‌های مختلف در تیمارها و ارقام مختلف پتبه نسبت به اثرات قارچ و نماتد

فاکتور	سطح	۸۸/۵/۱۰	۸۸/۵/۲۱	۸۸/۵/۲۹	۸۸/۶/۱۸	۸۸/۶/۱۵	۸۸/۶/۲۵
شاهد		۰/۰۰b	۰/۰۰b	۰/۰۰b	۰/۰۰b	۰/۰۰b	۰/۰۰b
قارچ به تنهایی		۲/۵۰a	۱۳/۴۴ab	۴۹/۰۶ab	۱۳۵/۰۰a	۱۸۱/۲۵a	۱۹۵/۰۰a
نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰		۳/۴۴a	۱۰/۶۳ab	۸۸/۱۳a	۱۷۰/۹۴a	۲۱۸/۴۴a	۲۳۰/۳۱a
نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰		۰/۹۴b	۳۴/۰۶a	۸۰/۳۱ab	۱۱۹/۰۶a	۱۴۲/۸۱a	۱۸۹/۰۶a
قارچ و نماتد با غلظت ۷۰۰۰	A	۲/۸۱a	۱۲/۱۹ab	۵۷/۸۱ab	۱۴۴/۶۹a	۱۶۹/۰۶a	۲۰۱/۸۸a
قارچ و نماتد با غلظت ۲۳۰۰		۳/۴۴a	۲۲/۱۹ab	۹۸/۷۵a	۱۴۱/۸۸a	۱۹۸/۴۴a	۲۰۶/۵۶a
L.S.D		۱/۵۵	۳۱/۹۴	۸۰/۷۱	۱۰۰/۰۰	۱۰۷۰/۱	۱۱۰/۲۱
ساحل		۱/۶۷a	۶/۲۵a	۶۵/۰۰a	۱۲۸/۳۳a	۱۸۰/۴۲a	۱۹۲/۰۸a
N200		۲/۵۰a	۹/۵۸a	۵۹/۷۹a	۱۲۸/۱۳a	۱۵۳/۱۳a	۱۸۹/۳۸a
مهر	B	۱/۶۷a	۱۶/۲۵a	۶۲/۵۰a	۱۲۳/۳۳a	۱۵۰/۲۱a	۱۷۲/۲۱a
ورامین		۲/۹۵a	۲۹/۵۸a	۶۲/۰۸a	۹۴/۵۸a	۱۲۲/۹۲a	۱۲۵/۲۱a
L.S.D		۱/۲۷	۲۶/۰۸	۶۵/۹۰	۸۱/۶۵	۸۷/۴۵	۸۹/۹۹

A: تیمارهای قارچ و نماتد B: تیمارهای قارچ و نماتد

اعداد با حروف مشابه در هرستون در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

در تحقیق حاضر و نمونه‌برداری‌هایی که از میزبان‌های مختلف و خاک‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه برای تعیین نژاد صورت گرفت، نژاد ۲ *Meloidogyne incognita* نژاد غالب منطقه به‌دست آمد. در این آزمون، برای مایه‌زنی قارچ پژمردگی آوندی ریشه *Verticillium dahlia* از میکرواسکلروت به‌جای کنیدی استفاده شد. زیرا طبق یافته‌های محققین (تارت و واتکین، ۲۰۱۵) زمستان‌گذرانی قارچ به‌صورت میکرواسکلروت بوده که در خاک وجود دارد. هم‌چنین بیان نمودند که آلوده شدن ریشه‌ها با *V. dahlia* نیاز به تماس نزدیک ریشه‌ها با میکرواسکلروت قارچ دارد. برای آلوده‌سازی گیاهچه پنبه از تلقیح هم‌زمان قارچ و نماتد استفاده گردید.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که نماتد با غلظت ۷۰۰۰ باعث کاهش معنی‌دار طول ساقه پنبه شد. اما این کاهش در غلظت ۲۳۰۰ نماتد معنی‌دار نشد. مشابه این نتایج توسط محققین دیگری (فولکنر و همکاران، ۱۹۷۰) که نشان دادند نماتد *Pratylenchus neglectus* با تراکم ۱۵۴۰

به ازای هر کیلوگرم خاک در طول بوته کاهش ایجاد نموده در حالی که این کاهش در تراکم ۶۶۲ نماتد به ازای هر کیلوگرم خاک معنی‌دار نبود. تبدلات دوطرفه‌ای بین ریشه و اندام‌های هوایی برای مواد غذایی و ترکیبات هورمونی وجود دارد. پیشنهاد شده که نماتدها در طی نفوذ و تغذیه‌شان، مکان‌های مناسبی برای فعالیت‌های هیف قارچ‌ها فراهم می‌کنند. نماتد با صدمه رساندن به ریشه‌های تغذیه کننده از طریق آثیر بر جذب آب و عناصر غذایی بر رشد گیاه اثر گذاشته و باعث کاهش رشد گیاه می‌گردد. از آنجایی که آلودگی ریشه، سیستم آوندی را مختل و از جذب و انتقال آب و مواد غذایی به بالا، از طریق سیستم ریشه گیاه جلوگیری می‌کند. کاهش کارایی انتقال آب و مواد غذایی باعث کم رشدی اندام‌های هوایی گیاه و کلروز یا زردی برگ‌ها می‌شود. همچنین ثابت شد که گیاهان لوبیایی آلوده به *M. incognita* به طور معنی‌داری حاوی مقادیر پایینی از کلروفیل، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات نیتروژنی بوده و جذب آب و ازت در آنها کاهش می‌یابد (فاسولنیوز، ۲۰۱۲). نماتد *M. incognita* سبب تضعیف گیاه از راه آسیب زدن به ریشه و کاهش قدرت جذب آن می‌شود. حال هر چه حضور نماتد و قارچ مذکور توأم با یکدیگر باشد احتمال تضعیف گیاه بیشتر است (ماویمبل، ۲۰۱۴).

نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ تأثیر معنی‌داری در کاهش وزن تر و خشک اندام هوایی داشت. طبق گزارشات (کریکون و اوریون، ۲۰۰۳) نماتد *Pratylenchus neglectus* بر روی سیب‌زمینی منجر به کاهش وزن تر اندام هوایی گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده تعداد کیسه تخم در نماتد به تنهایی با غلظت ۲۳۰۰ به‌طور معنی‌داری کمتر از نماتد به تنهایی با غلظت ۷۰۰۰ بود. در آزمایشی (ویلر و همکاران، ۱۹۹۴) برای ارزیابی مقاومت ارقام مختلف سیب‌زمینی به نماتد *M. incognita* انجام دادند، با افزایش جمعیت اولیه، افزایش کیسه‌های تخم مشاهده شد. در این تحقیق نتایج نشان داد رقم N200 گره بیشتری در ریشه تشکیل داد و این اختلاف با سایر ارقام معنی‌دار نبود. در حالی که این رقم دارای کمترین کیسه تخم در ریشه بود. با مراجعه به نتایج ذکر شده، مشاهده می‌شود که الزاماً رابطه‌ای بین ایجاد گال و کیسه تخم وجود ندارد و این مطلب با یافته‌های دیگر محققین (فاسولنیوز، ۲۰۱۲) در بررسی مقاومت ارقام بومی و تجاری مختلف خیار نسبت به نماتدهای مولد گره ریشه، مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت مدیریت و کنترل نماتد مولد گال می‌تواند از شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در مزارع پنبه را کنترل و یا کاهش دهد.

منابع

1. Atkinson, G.F. 2007. Some diseases of cotton. Bulletin of Alabama Agricultural Experiment Station. 41: 61-65.
2. Back, M.A., Haydock, P.P.J., and Jenkinson, P. 2002. Disease involving plant parasitic nematodes and soilborn pathogens. Plant pathology. 51: 683-697.
3. Bergeson, G.B., Van Gundy, S.D., and Thomason, I.J. 1970. Effect of *Meloidogyne javanica* on rhizosphere microflora and *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology. 60(8): 1245 –1249.
4. Fassuliois, G. 2012. Plant breeding for root-knot nematode resistance, In: J. N. Sasser and C.C. Carter (eds). Root-knot nematode: Systematics, biology and Control. Academic. New York. p. 428-453.
5. Faulkner, L.R., and Skotland, C.B. 1970. Interactions of *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus minyus* in *Verticillium* wilt of peppermint: influence of the nematode as determined by a double root technique. Phytopathology. 60(1): 100-103.
6. France, R.A., and Abawi, G.S. 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. J. Nematol. 26(4): 467-474.
7. Krikun, J., and Orion, O. 2003. Studies on the interaction of *Verticillium dahliae* and *Pratylenchus thornei* on potato. Isr. J. Plant Prot. Sci. 5: 67.
8. Majzoob, S., Karegar, A., Taghavi, M and Hamzehzarghani, H. 2012. Evaluation of rhizobacteria for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on cucumber, under greenhouse condition. Iran. J. Plant Pathology. 48 (1): 69-84. (In Persian).
9. Mavimbela, S.G. 2014. The effect of the interaction of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Meb.) and rootknot nematode (*Meloidogyne incognita* Kofid and White) on cotton and tomato. Plant pathology, 91: 283-297.
- 10- Powell, N.T. 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Annual Review of Phytopathology. 9: 253 –74.
11. Saeedizadeh, A., Kheiri, A., Zad, J., Etebarian, H.R., Bandani, A.R. and Niasti, F. 2009. A study of the interaction effect of *Verticillium* wilt and root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Iranian Journal of Plant protection science. 40(1): 65-72. (In Persian).
12. Tuart, D.L, and Watkins, G.M. 2015. Diseases of Cotton (*Gossypium* spp.) The American Phytopathological Society. 473 p. Available in: <http://www.apsnet.org>.
13. Wheeler, T.A., Madden, L.V., Reidel, R.M., and Rowe, R.C. 1994. Distribution and yield loss relations of *Verticillium dahliae*, *Pratylenchus penetrance*, *P. scribneri*, *P. crenatus* and *Meloidogyne hapla* in commercial potato fields. Phytopathology 84(8): 843-852.
14. Whitehead, A.G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematodea: Heteroderidae) with descriptions of four new species. Transactions of the Zoological Society of London. 31: 263-401.

Interaction between nematode (*Meloidogyne incognita*) and *Verticillium dahliae* in cotton plant

S. Nasrollanejad*¹, Z. Mohamadi², T. Davarian³, O. Alishah⁴ and A. Taheri¹

^{1&2}Associate Professor and MSc. student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

³Academic Member, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Paym-e-noor.

⁴Associate Professor of Cotton Research Institute, Gorgan

Received: 2015/5/24 Accepted: 2015/12/23

Abstract

Vascular wilt fungus, *Verticillium dahliae*, and root knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are the most common and destructive pathogen factors in cotton. In order to study interactions between these two factors, their interaction effect on 4 cotton cultivars (Sahel, N200, Mehr and Varamin) was done in a completely randomized block design in 4 iterations and 6 treatments in a greenhouse. Treatments including, control, just fungus, just nematode with concentration of 2300, just nematode with concentration of 7000, both fungus and nematode with concentration of 2300 and both fungus and nematode with concentration of 7000. 12×10^4 Microsclerote for each fungus treatment and 7000 and 2300 nematode eggs and second stage juvenile for the nematode treatments respectively (depending on the desired treatment) were inoculated to 60 days old cotton seedling. *Meloidogyne incognita* nematode was isolated from the host plant and then its species and race were determined and at last it was reproduced by inoculation to tomato transplants. After that the *Verticillium dahliae* fungus was isolated from infected cotton plants and after cultivation and identification steps, it was transferred to the Tajan wheat seed cultivar (three times been autoclaved) for reproducing. The results of this review after 2 months showed that the interactions between *Verticillium dahliae* fungus and *Meloidogyne incognita* nematode in cotton was resonator. As a combination of fungus and nematode simultaneously leads to a significant increase ($P = \%1$) in the wiltdejection. With increment in nematode concentration, root rot, the number of nodes and egg mass increased and shoot and root length, fresh and dry weight decreased vice versa.

Keywords: Cotton cultivars, *Verticillium dahliae*, *Meloidogyne incognita*, interaction

*Corresponding author; Snasrollanejad@yahoo.com