نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد 24 شماره 2/ تابستان 1393

بررسی کنترل بیولوژیکی علف هرز تلخه (*Acroptilon repens* L.) به وسیله عوامل بیماری زای قارچی

نیلوفر معاون[1*]، رضا قربانی[2] و رویا رضائیان دلوئی[3]

تاریخ دریافت: 91/9/18 تاریخ پذیرش: 92/6/27

1- دانشجوی کارشناسی ارشد کشاورزی اکولوژیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

2- عضو هیئت علمی و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

3-عضو هیات علمی و استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، گروه کشاورزی، مشهد، ایران

*. مسئول مکاتبه: E-mail: ni.moaven @ gmail.com

چکیده

گیاه تلخه (*Acroptilon repens* L.) علف هرزی چندساله وسمج از تیره کاسنی است که سبب بروز مشکلات فراوانی در مزارع، باغات، مراتع وچراگاه ها در ایران و اکثر مناطق جهان می شود. به منظور بررسی امکان کنترل بیولوژیکی تلخه به وسیله عوامل بیماری زای قارچی، پژوهشی در مناطق مختلف شهرستان چناران و مشهد در سال 1390-1391 صورت گرفت. ابتدا عوامل بیماری زا از روی تلخه جمع آوری و در محیط های کشت آزمایشگاهی خالص سازی شدند. پس از انجام آزمایش های مقدماتی، به منظور تعیین توان بیماری زایی جدایه ها، سه جدایه قارچی شامل *Alternaria alternata*، *Fusarium oxysporum* و *Puccinia acroptili* به عنوان موثرترین جدایه ها برگزیده شدند و آزمون دامنه میزبانی آن ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، بررسی های تکمیلی به منظور تعیین بهترین غلظت سوسپانسیون اسپور از 10^4 تا 10^7 اسپور در یک میلی لیتر آب مقطر و تاثیر طول دوره شبنم (رطوبت اشباع) از سه تا 48 ساعت بر بیماری زایی قارچ بررسی گردید. نتایج آزمون دامنه میزبانی روی 10 گیاه از مهمترین گیاهان اقتصادی منطقه، (شامل گندم، جو، کلزا، گوجه فرنگی، چغندرقند، خیار، لوبیا سبز، ذرت، سیب زمینی و یونجه) نشان داد که از بین جدایه های استخراج شده، تنها *Puccinia acroptili* هیچگونه بیماری زایی در گیاهان غیر هدف نداشت. همچنین مایه زنی این قارچ در مرحله گیاهچه وزن خشک تلخه را تا 61 درصد کاهش داد. افزون بر آن، سوسپانسیون با غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر این قارچ در دوره رطوبتی 48 ساعت با اعمال تاریکی، در مقایسه با دوره رطوبتی 3 ساعته و شرایط روشنایی، سبب افزایش سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری تا 24/62 درصد و نیز کاهش وزن خشک گیاهچه تلخه تا 40 درصد گردید. بر اساس نتایج این پژوهش، قارچ *P. acroptili* را می توان به عنوان یک کاندیدای عامل کنترل بیولوژیکی امید بخش برای تلخه در نظر داشت.

واژه های کلیدی: آلترناریا، فوزاریوم، *Puccinia acroptili*، دوره رطوبتی اشباع، تست دامنه میزبانی.

Investigation on Biological Control of Russian Knapweed (*Acroptilon repens* L.) with Fungal Pathogens

N Moaven[1*], R Ghorbani[2] and R Rezaeian-Doloei[3]

Received: December 8, 2012 Accepted: September 18, 2013
1- Ms Student of Agroecology , Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran.
2- Assoc Prof, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3- Faculty of Islamic Azad University, Mashhad Branch, Department of Agriculture, Mashhad, Iran
*Corresponding author: ni.moaven @ gmail.com

Abstract

Russian knapweed (*Acroptilon repens* L.) is a noxious perennial weed in the family of *Asteraceae* which caused various problems in field crops, pastures, grasslands and orchards. For collecting fungal pathogens from this weed, as biocontrol agents, a survey was carried out during 2011-2012 in Mashhad and Chenaran areas (north east of Iran). The isolated fungal agents from infected Russian knapweeds were purified. After primary studies, three isolates of *Alternaria alternata, Fusarium oxysporum* and *Puccinia acroptili* as the most effective fungal pathogen on Russian knapweed, were selected for host range tests and further studies. Supplementary studies were conducted to evaluate their effect on the target host at different concentrations consisted of 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 spores ml^{-1}. In a separate experiment, the influence of colorless or black plastic cover and dew periods included of 3, 6, 12, 18, 24, 48 hours on disease expression by *P. acroptili* was studied. In host range test of *P. acroptili* no any symptom was detected on wheat, barley, conola, sugar beet, tomato, potato, cucumber, green bean, maize and alfalfa whereas, two other isolates induced disease on some of the tested crops. *P. acroptili* reduced the dry weight of 4-week old seedlings of *A. repens* by 61%, compare with control. The most sever disease symptoms on seedlings of the target host was obtained from treating with *P. acroptili* spores at 10^7 spores ml^{-1} and 48 hours dew period under black plastic. This treatment, compared with 3 hours dew period under colorless plastic cover, reduced dry weight of *A. repens* seedlings by 40%, and disease progress curve on the weed was evaluated 24.64%. Based on this research, *P. acroptili* could be considered as a promising biocontrol agent for Russian knapweed.

Key words: *Alternaria*, Dew period, Host rang test, *Fusarium, Puccinia acroptili*

مقدمه

در میان تمامی آفت کش های شیمیایی، علف‌کش-ها بیشترین میزان مصرف را در کل دنیا به خود اختصاص داده اند که این مطلب روشن گر اهمیت نسبی علف‌های هرز می باشد (کویمبی و همکاران 2002). استفاده مداوم از یک علف‌کش و یا علف‌کش‌هایی با نحوه عمل یکسان علاوه بر پدید آمدن جمعیت مقاوم علف‌های هرز به علف‌کش‌ها، آلودگی های زیست محیطی را نیز در پی دارد (هانگ و گرسل 1997). نگرانی ها در مورد عملیات رایج کنترل علف‌های هرز، اهمیت توجه به راهکارهای نوین مدیریت از جمله کنترل بیولوژیکی را افزایش داده است (راشدمحصل و حسینی 1386). کنترل بیولوژیکی علف‌های هرز روشی است که در آن اصول اکولوژیکی و زیستی به خوبی رعایت می شوند. در این روش از دشمنان طبیعی و عوامل بیماریزا (حشرات، قارچ ها، ویروس ها، باکتری ها و نماتدها) به منظور کاهش جمعیت، توانایی رقابت و میزان خسارت علف‌هرز به زیر سطح آستانه خسارت اقتصادی استفاده می شود (مندی 2001). استفاده از عوامل بیماری زای گیاهی برای مدیریت علف‌های هرز در سیستم های کشاورزی و مراتع به عنوان روشی کاربردی، ایمن، مناسب برای محیط زیست مورد قبول واقع شده است (چاروداتان 2001).

تلخه (*Acroptilon repens* L.) علف هرزی مخرب است که معمولا از طریق جوانه های موجود در ریشه های خزنده و بذر تکثیر شده و پس از استقرار در یک محیط، می تواند پوششی یکپارچه و وسیع تشکیل داده و جایگزین سایر گونه های گیاهی شود (کلین 2011). این گیاه ممکن است تا 70 سال دوام داشته باشد (آرملینا و زیمدال 1998). تلخه علاوه بر آنکه در زمین های زراعی باعث کاهش عملکرد محصول می شود، به طور قابل توجهی از ارزش و کیفیت خاک نیز می کاهد (واتسون 1980). حضور آن در گیاهان علوفه ای بسیار مشکل ساز است. کیفیت آرد و سایر محصولات غلات و حبوبات که به وسیله تلخه آلوده شده باشند به خاطر مزه تلخ آن کاهش می یابند. این گیاه با هجوم به رستنگاه های بومی مانع رشد سایر گیاهان گشته و تنوع زیستی را کاهش می دهد (USDA 2008). کنترل این گیاه به خاطر داشتن ریزوم و توانایی رشد رویشی فوق العاده و نفوذ ریشه ها به عمق خاک بسیار مشکل می باشد. بخشی از خسارت تلخه همچنین به ترشح مواد آللوپاتیک نسبت داده می شود (میلر و هیلد 2006).

این علف هرز بومی ایران، آسیای صغیر، ارمنستان، ترکیه، ترکمنستان و مغولستان می باشد و هم اکنون در بسیاری از نقاط دنیا به چشم می خورد (جاکوبس و دنی 2006). طبق بررسی نوروزاده و همکاران (1387) علف‌های هرز خارشتر (*Alhagi psendoalhagi*) و تلخه با بیش از 47 در صد حضور در مناطق مختلف استان های خراسان شمالی، جنوبی و رضوی، مهمترین علف‌های هرز چند ساله می باشند. همچنین این گیاه هرز با شاخص غالبیت حدود 57 درصد به عنوان مهمترین رستنی مزاحم قبل از برداشت گندم در شهرستان کرج گزارش شده است (مین باشی معینی و همکاران 1387). کنترل شیمیایی گیاه هرز تلخه علاوه بر پی آمدهای اکولوژیکی اغلب در مراتع مقرون به صرفه نیست. روش های مکانیکی نیز تاثیر محدودی بر سیستم ریشه ای گسترده تلخه دارد و می تواند تاثیرات مخربی بر گیاهان غیر هدف داشته باشد (جانسون 2008). سایر روش ها نیز گران و موقتی خوانده شده اند (وگرپیچ 2009). لذا یافتن عوامل کنترل بیولوژیکی موثر و کارآمد از اهمیت زیادیبرخوردار است. تلخه در سال 1992 در آمریکا به عنوان علف هرز هدف برای کنترل بیولوژیک کلاسیک معرفی شد (کویمبی 1995). همچنین این گیاه به عنوان یکی از ده گونه از مهم ترین علف‌های هرز در کانادا و امریکا، از اولویت های کنترل زیستی معرفی شده است (اسکینر و همکاران 2000).

تا کنون اقدامات متعددی در سایر کشور ها برای یافتن عوامل بیماری زای مناسب برای کنترل بیولوژیکی

تلخه انجام شده است. اولین تلاش ها از سال 1970 آغاز، و به رها سازی گونه ای نماتد گالزا با نام *Subanguina picridis* منجر شد (واتسون 1977). بررسی‌های آزمایشگاهی خسارت شدید این نماتد بر رشد گیاه و تولید بذور نشان داده اما به دلیل تحرک کم و شرایط رطوبتی متفاوت نتایج رهاسازی کمتر از حد انتظار بود (جانسون 2008). قارچ *Phoma exigua* var *exigua* (PEE) از جمله عوامل بیماری زای گزارش شده از روی این گیاه است که در ترکیه به عنوان قارچی با پتانسیل کنترل بیولوژیکی تلخه معرفی گردید (برنر و همکاران 2011). گونه *Cercosporella acroptili* قارچ دیگری است که در ترکیه، قزاقستان و قرقیزستان یافت شده و کاربرد آن سبب بروز بیماری در تمامی برگ‌های پایینی گیاه تلخه شده است (برنر و همکاران 2005). اسپورهای این قارچ می‌تواند به عنوان عامل تقویت کننده در فرمولاسیون علف‌کش PEE به کار روند تا کارایی آن را بر تلخه افزایش دهند (برنر و همکاران 2011). زنگ *Puccinia acroptili* پارازیت کننده تلخه و بومی آسیا و اروپا ست و در شمال آمریکا نیز گسترش دارد. طبیعت تک میزبانه این قارچ گواه این است که *P. acroptili* دارای میزبان اختصاصی است که این خصوصیت برای عوامل بیماریزایی که در کنترل بیولوژیک علف هرز به کار می روند ضروری است (بروکارت وهمکاران 2010).

تراکم عامل بیماری و دوره رطوبت اشباع از مهمترین شرایط برای کارایی عوامل کنترل میکروبی علف‌های هرز می باشد. به بیان دیگر برای گسترش بیماری در علف هرز هدف، میزان کافی از اندام های تولید مثلی (اسپورها،کنیدی ها، قطعات میسیلیویی) برای کنترل بیولوژیکی در سطح گیاه مورد نیاز است. به علاوه اسپورها یا میسیلیوم ها و سلول های بیشتر عوامل بیماریزا برای تندش، نفوذ و آلودگی در میزبان، به یک دوره ای که در آن یک لایه آب یا رطوبت آزاد روی بافت‌های برگ را پوشیده باشد، نیاز دارند که این رطوبت در طبیعت از طریق ایجاد شبنم تامین می گردد و معمولا هر چه طول دوره وقوع شبنم بیشتر باشد بیماری زایی افزایش می یابد (قربانی و همکاران 2005).

چون علف هرز تلخه بومی ایران می‌باشد، پژوهش حاضر به منظور جمع‌آوری و شناسایی عوامل بیماری‌زای موجود روی تلخه و ارزیابی آن‌ها به منظور بررسی امکان کنترل بیولوژیک این علف هرز به عنوان روشی مناسب و مبتنی بر اصول اکولوژیک انجام شده است.

مواد و روش ها

تهیه و پرورش بوته های تلخه

این تحقیق در استان خراسان رضوی، روستای کلاته شیخها در جلگه چناران واقع در شهرستان چناران به انجام رسید. با توجه به این که تلخه معمولا از طریق جوانه های موجود بر ریشه‌های خزنده و به ندرت از طریق بذر تکثیر می یابد، ریشه های تلخه در اسفند ماه 1390 از داخل خاک جمع آوری و در دمای 10 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در فروردین ماه 1391 قطعاتی به طول 20 سانتی متر و قطر تقریبا یکسان که دارای دو تا سه جوانه بوده از بین ریشه‌ها انتخاب گردید (آل ابراهیم و همکاران 1388) و در گلدان هایی به قطر 20 و ارتفاع 20 سانتی‌متر که حاوی مخلوطی از خاک زراعی و ماسه بودند به حالت افقی و در عمق چهار سانتی متری خاک کشت شدند. در هر گلدان دو قطعه از ریشه‌ها قرار داده شد. پس از جوانه زدن و روییدن بوته‌ها در سطح خاک، تنها یک بوته را در هر گلدان نگه داشته و بقیه بوته‌ها حذف شدند.

نمونه برداری و خالص سازی عوامل بیمارگر

گیاهان تلخه دارای علائم آلودگی به عوامل بیماری زا طی 20 بار نمونه برداری از رویشگاه های طبیعی تلخه و کشتزارهای آلوده به آن در چناران و مشهد جمع‌آوری گشتند. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه

منتقل شده و با استفاده از قیچی سترون به قطعات کوچک دو تا سه میلی متری تقسیم شدند. جهت ضدعفونی سطحی، آن ها را در محلول هیپوکلریت سدیم[1] 1 درصد به مدت 30 تا 45 ثانیه قرار داده **و** آنگاه سه بار در آب مقطر سترون به مدت یک دقیقه شستشو داده شد. سپس با قرار دادن آنها بر روی کاغذ صافی سترون، رطوبت همراه آنها گرفته شد و داخل پتری دیش های حاوی محیط کشت PDA کشت داده شدند.

پس از آنکه پر گنه های[2] قارچی به حد کافی رشد یافت، جهت خالص سازی مقدماتی از هر یک از آن ها کشت فرعی[3] تهیه گردید. سپس با استفاده از روش تک اسپور در محیط آب-آگار، مرحله نهایی خالص سازی انجام شد و بسته به نوع قارچ به محیط برگ میخک - آگار یا PDA انتقال یافت. بدین ترتیب پرگنه های خالص سازی شده که شامل یک جدایه فوزاریوم و شش جدایه آلترناریا بود، برای مراحل بعدی این پژوهش نگهداری شدند. با توجه به آنکه یکی از عوامل جمع آوری شده از روی تلخه از قارچ های عامل زنگ و پارازیت اجباری بود. به منظور خالص سازی، ابتدا قطعات برگ و ساقه جمع آوری شده حاوی زنگ به روش فوق ضد عفونی گردیدند. سپس مایه زنی اولیه بر روی برگ های ظریف گیاهچه های تلخه که تنها چهار هفته از زمان کاشت آنها گذشته بود صورت گرفت. روی گلدان ها پوشش نایلونی سیاه رنگ کشیده و با پاشش آب درون فضای میان گیاه و روکش پلاستیکی، رطوبت گلدان ها افزایش داده شد و به مدت 48 ساعت در دمای 20 درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس گلدان ها به گلخانه با دمای 25 درجه سانتی گراد انتقال یافت. چون احتمال وجود چند نژاد زنگ در یک نمونه وجود داشت، به منظور خالص سازی یکی از جوش ها که به طور جداگانه قرار گرفته بود با قلم موی ظریف (شماره سه صفر) برداشته شد و روی گیاهچه تلخه مایه زنی گردید. جوش هایی که در این مرحله به دست آمدند در چند مرحله تکثیر و اسپور زیادی حاصل گشت (قاسم زاده و همکاران،1389 و بروکارت و همکاران، 2010).

تهیه مایه قارچ جهت مایه زنی

برای تهیه مایه قارچ فوزاریوم از کشت پنج روزه این جدایه در محیط PDA بلوکی به ابعاد پنج میلی متر به ویال های حاوی محیط کشت مایع PDB منتقل گردید و به مدت سه روز بر روی دستگاه شیکر با سرعت 90 دور در دقیقه در آزمایشگاه با دمای 2± 24 درجه سانتیگراد به هم زده شد. به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور و حذف میسیلیوم ها و مواد زاید، محتویات هر کدام از ویال ها از پارچه ململ سترون عبور داده شد. ضمنا 0/5 درصد توئین 20[4] به عنوان ماده پخش کننده به سوسپانسیوت اسپور هر جدایه اضافه گردید.

برای تهیه مایه تلقیح جدایه های آلترناریا، از هر جدایه چند پتری کشت خالص روی محیط PDA تهیه شد. سپس 5-10 میلی لیتر محلول رقیق شده توئین 20 در هر پتری حاوی قارچ ریخته و با لوپ استریل سطح قارچ ها به آرامی خراش دهی شد و اسپور ها جداسازی گردیدند. سپس مخلوط بدست آمده از پارچه ململ استریل عبور داده شد. جهت تولید مایه تلقیح زنگ، اسپورها با استفاده از قلم موی ظریف (شماره سه صفر) از سطح برگ برداشته شده و در محلول آب مقطر و توئین 20 (v/v 0.15%) معلق گردیدند (بروکارت و همکاران، 2010). شمارش اسپورها با کمک لام هموسایتومتر انجام شد.

[1] NaOCl
[2] Colony
[3] Subculture
[4] Polysorbate 20 (commercially known as Tween 20)

تعیین توان بیماری زایی جدایه ها روی برگ بریده و گیاهچه تلخه

با توجه به این که تعداد جدایه های استخراج شده زیاد بود ابتدا توان بیماری زایی آنها روی برگ بریده تلخه در آزمایشگاه بررسی گردید تا قوی ترین عوامل بیماری زای قارچی انتخاب شوند و در آزمایش های بعدی به کار روند. ابتدا برگ های جوان گیاهان تلخه که فاقد هر گونه علایم بیماری بودند، داخل پتری دیش هایی به قطر دهانه 10 سانتی متر دارای کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شدند. سپس برگ ها به وسیله سوزن سترون خراشدهی شده و با استفاده از سمپلر روی قسمت های خراشدهی شده یک قطره سوسپانسیون به غلظت 1×10^7 اسپور در میلی‌لیتر قرار گرفت. پتری دیش ها به مدت 10 روز زیر پوشش پلاستیکی در دمای 25 درجه سانتی گراد در رطوبت بالاتر از 70 درصد قرار گرفتند. پتری دیش ها روزانه بازدید شده و هر گونه علایم بیماری ثبت شد.

در مرحله بعد، پس از گذشت چهار هفته از کاشت ریشه های تلخه و هنگامی که در مرحله گیاهچه بودند، سوسپانسیون حاوی اسپور با غلظت 10^7 اسپور در یک میلی لیتر بر روی آنها پاشیده شد. گلدان ها در گلخانه ای با دمای 30- 25 درجه سانتیگراد و رطوبت 60 در صد قرارگرفتند. این دما و رطوبت تا پایان آزمایش ثابت نگه داشته شد. به منظور ایجاد رطوبت کافی جهت فعالیت قارچ ها، گلدان ها به مدت 48 ساعت پس از پاشش سوسپانسیون، به وسیله پوشش پلاستیکی پوشانده شدند. تا دو هفته پس از ظهور اولین علایم، گلدان ها به صورت روزانه بازدید گشتند، و مقدار آلودگی روی آن ها ثبت شد. در هر دو آزمایش در تیمارهای شاهد از آب مقطر سترون به همراه 0/5 درصد توئین 20 بدون اندام های قارچی استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت. ارزیابی میزان بیماری زایی گیاهان تیمار شده بر اساس روش نمره دهی صفر تا پنج انجام شد. سیستم نمره دهی بدین صورت بود که صفر= عدم بیماری، 1= 25-1 درصد آلودگی ، 2= 50-26 درصد آلودگی، 3= 75-51 درصد آلودگی، 4= 97-75 درصد و 5= 99 درصد آلودگی یا مرگ گیاه (فلاح پور 1389) را نشان می دهد. همچنین تعیین و مقایسه وزن خشک گیاهچه های تیمارها، معیار دیگری برای ارزیابی تاثیر آ،نها بود. برای تعیین وزن خشک، گیاهچه ها پس از قرار داده شدن در آون 72 درجه سانتی گراد برای 48 ساعت توزین شدند.

شناسایی نمونه ها

پس از پایان آزمایش های مقدماتی، جدایه های برتر، مجدداً جداسازی و خالص سازی شده و با نمونه های اولیه مورد مقایسه قرار گرفتند. شناسایی جدایه ها تا سطح گونه در گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

تعیین دامنه میزبانی

در این مرحله 10 گیاه از مهمترین گیاهان اقتصادی منطقه به منظور تست دامنه میزبانی قارچ های مورد نظر انتخاب شدند. این گیاهان شامل گندم[1] رقم سایونز، جو[2] رقم سهند، جو رقم سی بی، کلزا[3] رقم اکاپی به عنوان مهمترین گیاهان زراعی پاییزه و گوجه فرنگی[4] رقم های موبیل و استنلی، چغندر قند[5] رقم خیار[6] رقم بینگو، ،لوبیا[7] رقم سانرایز، ذرت[8] رقم 704 مغان و سیب زمینی[9] رقم فونتان به عنوان محصولات رایج کشت بهاره و یونجه[10] رقم سکوئل به عنوان یک

[1] *Triticum aestivum*
[2] *Hordeum vulgare*
[3] *Brassica napus*
[4] *Lycopersicum esculentum*
[5] *Beta vulgaris*
[6] *Cucumis sativus*
[7] *Phaseolus vulgaris*
[8] *Zea mays*
[9] *Solanum tuberosum*
[10] *Medicago sativa*

محصول زراعی چند ساله بودند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در 4 تکرار در دو مرحله آزمایشگاهی و گلخانه ای صورت گرفت. ابتدا برگ های جوان گیاهان زراعی ذکر شده که فاقد هرگونه آلودگی بودند جدا شده و پس از ضد عفونی سطحی، داخل پتری دیش هایی به قطر دهانه 10 سانتیمتر دارای کاغذ صافی سترون مرطوب در کف آن ها قرار گرفتند (هر کاغذ صافی با سه قطره آب مرطوب شده بود). سپس برگ ها خراشدهی شدند و روی قسمت های خراشیده یک قطره سوسپانسیون با غلظت 1×10^7 اسپور در میلی‌لیتر قرار گرفت. پتری ها به مدت 10 روز زیر پوشش پلاستیکی در دمای 25 درجه سانتی گراد و در رطوبت نسبی 90 درصد قرار گرفتند. پتری دیش ها روزانه بازدید شده و هر گونه علایم بیماری ثبت شد.

در آزمایش گلخانه ای، سوسپانسیون حاوی اسپورهای قارچ های مورد نظر با غلظت 1×10^7 اسپور در میلی‌لیتر بر روی گیاهان زراعی رشد داده شده در گلدان هایی به قطر دهانه 18 و عمق 15 سانتی متر که با مخلوطی از خاک زراعی و ماسه پرشده بودند، محلول پاشی گشتند و در گلخانه ای با دمای 30- 25 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 60 در صد قرار داده شدند. گلدان ها به مدت 48 ساعت پس از استفاده از سوسپانسیون به وسیله پوشش پلاستیکی شفاف برای آلترناریا و فوزاریومو پوشش تیره برای پوکسینیا محصور گشتند.

بررسی اثر بیماری زایی غلظت های مختلف اسپور قارچ

برای تعیین بهترین غلظت سوسپانسیون اسپور های قارچ در بروز علائم بیماری بر روی تلخه، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. در این آزمایش اثر چهار غلظت 10^7، 10^6،10^5 و 10^4 اسپور در میلی لیتر آب مقطر بر روی بوته های تلخه در دمای 25 درجه سانتی گراد و رطوبت اشباع برای 48 ساعت پس از اسپور پاشی مورد بررسی قرار گرفت. شمارش اسپورها با استفاده از لام هموسایتومتر صورت گرفت تا غلظت مورد نظر سوسپانسیون بدست آید. در صورتی که غلظت سوسپانسیون بیش از میزان مورد نظر بود با استفاده از آب مقطر استریل آن را رقیق کرده تا به غلظت دلخواه برسد. اما اگر غلظت کمتر از حد مطلوب بود با قرار گرفتن در دستگاه سانتریفیوژ با 2000 دور در ثانیه به مدت دو دقیقه، غلظت مناسب حاصل می شد.

گیاهان تیمار شده به مدت یک ماه مورد بازدید و بررسی قرار گرفتند و ارزیابی نهایی با استفاده از اندازه گیری وزن خشک انجام شد. به علاوه با محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC[1])، روند توسعه آلودگی در طول زمان برای هر تیمار بر اساس فرمول زیر(حاجیان فر و زربخش، 1389 و شپرز و همکاران، 2009). تعیین گردی:

$$AUDPC = \Sigma_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})(t_{i+1} - t_i)/2]$$

در این معادله، Xi درصد آلودگی به بیماری در مشاهده اول، Xi+1 در صد آلودگی به بیماری در مشاهده دوم، ti زمان یادداشت برداری در مشاهده اول، ti+1 زمان یادداشت برداری در مشاهده دوم، n تعداد کل مشاهدات بود.

stAUDPC [2] نیز از طریق تقسیم مقدار AUDPC بر تعداد روز های بین شروع اپیدمی و پایان آن محاسبه شد.

stAUDPC = AUDPC/ duration of epidemic

بررسی اثر رطوبت اشباع و نوع پوشش پلاستیکی روی بیماری زایی

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با 4 تکرار انجام شد. تیمارها در این آزمایش پوشش پلاستیکی در دو سطح (تیره و شفاف) و

[1] Area under disease progress curve
[2] standardized area under the disease progress curve

دوره های زمانی مختلف رطوبت پس از اسپور پاشی در شش سطح (3، 6، 12، 18، 24، 48 ساعت) بودند. به این منظور بهترین غلظت سوسپانسیون اسپور تعیین شده در ایجاد علائم روی تلخه اعمال شد. بلافاصله بعد از مایه زنی بوته ها با قارچ، روی گلدان ها با پوشش پلاستیکی پوشانده شد و پیش از محصور کردن گلدان ها توسط این پوشش با پاشیدن آب درون فضای میان گیاه و روکش پلاستیکی، رطوبت زیر پوشش پلاستیکی هرگلدان افزایش یافت و رطوبت آن به بالای 80 در صد رسید. پس از سپری شدن مدت دوره های رطوبتی، گلدان ها به گلخانه با دمای حدود 25 درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی حدود 60 درصد منتقل شدند. سپس معیار وزن خشک و محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تراکم تاول های حاوی اسپور های زنگ با محاسبه تعداد تاول در هر سانتی متر مربع برگ تلخه تخمین زده شد.

محاسبات آماری و تجزیه و تحلیل

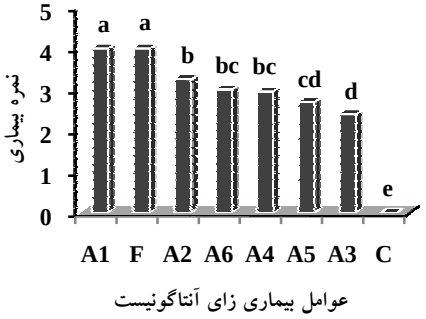
جهت انجام محاسبات آماری، از نرم افزار SAS ver.9.1 استفاده شد (شابانا و همکاران 2010). میانگین-ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن درسطح احتمال 1 درصد مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. نمره بیماری کسب شده در رابطه با هر یک از تیمار ها با استفاده از آزمون غیر پارامتری کروسکال-والیس[1] (سوکال و رولف 1992) و نرم افزار MINITAB ver.13.1 (سوکال و رولف 1992) مورد مقایسه قرار گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 انجام شد.

نتایج و بحث

از نمونه های تلخه آلوده جمع آوری شده، جمعا شش جدایه از قارچ آلترناریا*Alternaria alternata* (A1, A2, A3, A4, A5,A6) و یک جدایه فوزاریوم *Fusarium oxysporum* (F) و یک جدایه پوکسینیا *Puccinia acroptili* (P) خالص سازی شد. سپس این جدایه ها برای سنجش کنترل بیولوژیک علف هرز تلخه مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین توان بیماری زایی جدایه ها روی برگ بریده تلخه

در این مرحله تمامی تیمارها با شاهد در سطح 1 درصد اختلاف معنی دار داشتند (P< 0/01 و H=28/6). بیشترین بیماری زایی بر اساس مقیاس نمره دهی، مربوط به جدایه F (*F. oxysporum*) و جدایه A1 (*A. alternata*) بود که با دیگر تیمارها اختلاف معنی داری نشان دادند (شکل 1). چون زنگ (*P. acroptili*) پارازیت اجباری است، لذا این مورد در مراحل اولیه تنها با مایه زنی گیاهچه های جوان مورد آزمون قرار گرفت.



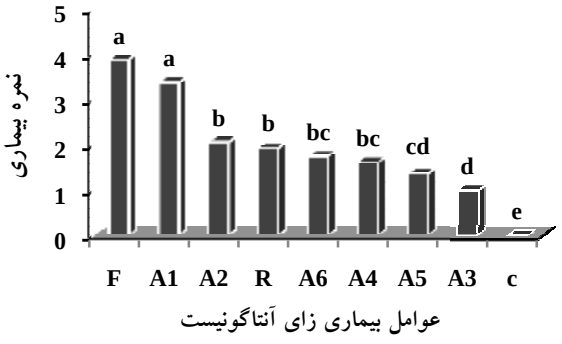
شکل 1- مقایسه توان بیماری زایی جدایه های استخراج شده روی برگ بریده تلخه در آزمایشگاه. هر میانگین حاصل چهار تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها در سطح احتمال 1 درصد بر اساس آزمون کروسکال-والیس می باشد. A1 تا A6= جدایه های مختلف آلترناریا، F = جدایه فوزاریوم و C = شاهد می باشند.

تعیین توان بیماری زایی جدایه ها روی گیاهچه تلخه

کلیه تیمارها با شاهد در سطح یک درصد، اختلاف معنی دار داشتند (P<0/01 و H=31/07). بیشترین بیماری زایی مربوط به جدایه های F (*F. oxysporum*) و A1 (*A. alternata*) ارزیابی شد. همان طور که در شکل2 ملاحظه می شود نمره بیماری جدایه A1 و F با دیگر جدایه ها دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد.

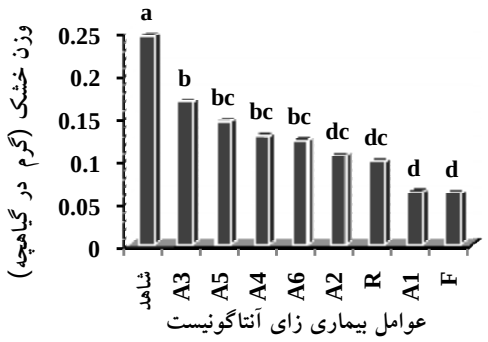
[1]Kruskal-Wallis test

کمترین وزن خشک بوته های تلخه مربوط به جدایه فوزاریوم (F) و آلترناریا (A1) بود که به ترتیب آن را تا 75% و 76% کاهش دادند. جدایه های پوکسینیا (P) و آلترناریا (A2) نیز توانستند به ترتیب 61 و 58 درصد، وزن خشک را نسبت به شاهد کاهش دهند (شکل 3).



C

شکل2- مقایسه توان بیماری زایی جدایه های استخراج شده روی گیاهچه تلخه در شرایط گلخانه. هر میانگین حاصل چهار تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها در سطح احتمال 1 درصد بر اساس آزمون کروسکال-والیس می باشد. A1 تا A6= جدایه های مختلف آلترناریا، F = جدایه فوزاریوم، P= زنگ و C= شاهد می باشند.



P

شکل 3- مقایسه وزن خشک گیاهچه های تلخه تیمار شده به وسیله جدایه های مختلف قارچ و آب مقطر. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح 0/01 می باشد. A1 تا A6= جدایه های مختلف آلترناریا، F = جدایه فوزاریوم، P= زنگ و C= شاهد می باشند.

جدایه قارچ فوزاریوم پس از مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^7 اسپور در میلی لیتر، روی برگ های تلخه علایمی به صورت لکه های نکروزه در محل مایه زنی ایجاد نمود که به تدریج توسعه یافته و به قسمت های بالا و پایین محل اولیه کشیده شد. هر شش جدایه آلترناریا ابتدا باعث پدیدار شدن لکه های سیاه رنگ و سپس گسترش آلودگی به تمام سطح برگ و در نهایت مرگ گیاهچه گشتند. علایم جدایه زنگ ابتدا به صورت لکه های کوچک و رنگ پریده بدون اسپورزایی بود. سپس ظهور تاول ها و اسپورزایی فراوان همراه با کلروز در اندام های هوایی گیاه (ساقه و برگ) رخ داد. در حالی که در شاهد که با آب مقطر سترون به همراه 0/5 درصد توئین 20 مایه زنی شده بودند هیچ گونه علایمی مشاهده نشد. با توجه به آزمون های تعیین توان بیماری زایی جدایه ها در آزمایشگاه و در مرحله گیاهچه، جدایه های *F* (*F. oxysporum*)، *A1* (*A. alternata*) و P (*P. acroptili*) به منظور ادامه آزمایش ها برگزیده شدند.

تعیین دامنه میزبانی

نتایج آزمون دامنه میزبانی در آزمایشگاه و گلخانه نشان داد که مایه زنی با سوسپانسیون اسپور *A. alternata* با غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر روی کلزا و سیب زمینی و *F. oxysporum* با همین غلظت روی گندم، جو، سیب زمینی و ذرت منجر به ایجاد بیماری شدند (جدول 1). ولی مایه زنی *P. acroptili* در هیچ یک از گیاهان مورد آزمایش منجر به بروز علائمی نشد (جدول 1).

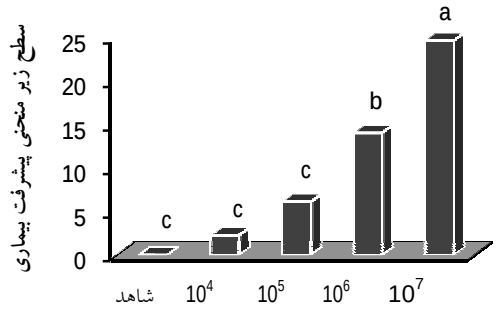
با توجه به این که جدایه *P. acroptili* در گیاهچه تلخه بیماری زا تشخیص داده شد و از طرف دیگر تهدیدی برای گیاهان زراعی آزمایش شده نیست می تواند به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

جدول 1- دامنه میزبانی قارچ های استخراج شده از روی تلخه بر روی مهمترین گیاهان اقتصادی در منطقه

خانواده	گیاه زراعی	رقم	*A. alternata*	*F. oxysporum*	*P. acroptili*
گندمیان	گندم	سایونز	-	+	-
گندمیان	جو	سهند	-	+	-
گندمیان	جو	سی بی	-	+	-
گندمیان	ذرت	704	-	+	-
		مغان			
کلم	کلزا	اکاپی	+	-	-
بقولات	لوبیا	سانرایز	-	-	-
بقولات	یونجه	سکوئل	-	-	-
سیب زمینی	گوجه فرنگی	موبیل	-	-	-
سیب زمینی	گوجه فرنگی	استنلی	-	-	-
سیب زمینی	سیب زمینی	فونتان	+	+	-
کدوئیان	خیار	بینگو	-	-	-
اسفناج	چغندر قند	ناگانو	-	-	-

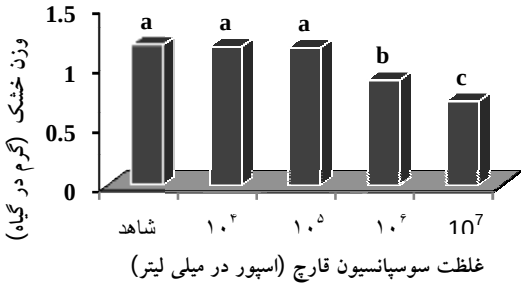
بررسی اثر غلظت های مختلف قارچ *P. acroptili* در بیماری زایی روی تلخه

با افزایش غلظت اسپورهای این قارچ تا 10^7 اسپور در میلی لیتر آب مقطر ، وزن خشک تلخه به شدت کاهش یافت که دلیل آن می تواند افزایش توان آلوده سازی قارچ و اختلال در فتوسنتز و سیستم سوخت وساز تلخه باشد. شکل های 4 و 5 نشان می دهند که غلظت 10^7 اسپور در یک میلی لیتر آب با افزایش سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری تا 24/62 درصد و 40 درصد کاهش وزن خشک گیاه هرز تلخه نسبت به شاهد، موثرترین تیمار می باشد. در حالی که تفاوت معنی داری بین شاهد و تیمارهای غلظت های 10^5 و 10^4 اسپور در میلی لیتر وجود نداشته است (P <0/01).



شکل 4- اثر غلظت های مختلف *Puccinia acroptili* بر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری.

هر میانگین حاصل 4 تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح 1% می باشند.



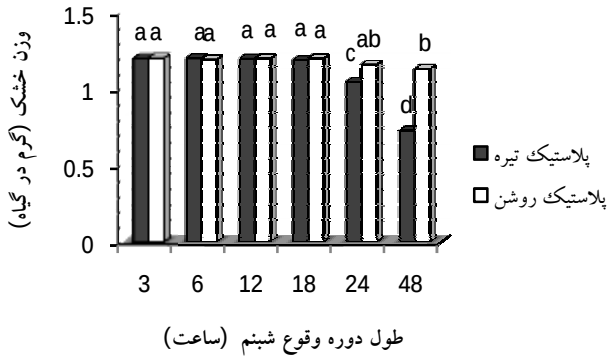
شکل 5- اثر غلظت های مختلف *Puccinia acroptili* بر وزن خشک هر گیاه هرز تلخه.

هر میانگین حاصل 4 تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح 1% می باشند.

تاثیر طول دوره شبنم بر بیماری زایی *Puccinia acroptili* روی گیاه هرز تلخه

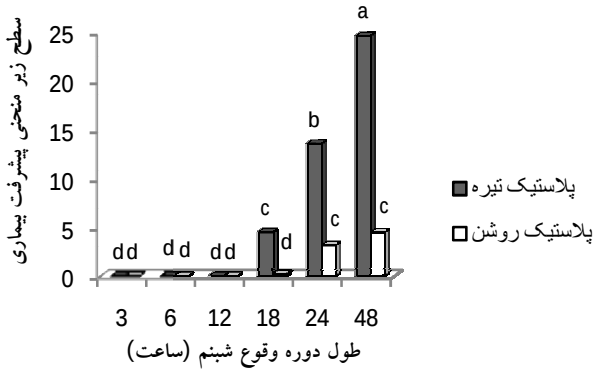
به طور کلی وزن خشک گیاه تلخه در تیمار نقطه شبنم 48 ساعت و 24 ساعت با پلاستیک تیره اختلاف معنی داری با یکدیگر و با سایر تیمارها داشتند. کمترین وزن خشک 0/727 گرم، مربوط به تیمار دوره رطوبتی 48 ساعته و پوشش پلاستیک تیره بوده که نسبت به وزن خشک تیمار دوره 3 ساعته با پوشش روشن 40 درصد کمتر ارزیابی شد.

نتایج حاکی از آن است که برای بروز علایم بیماری و ایجاد آلودگی جدایه زنگ حداقل به 24 ساعت رطوبت اشباع نیاز است. در این آزمایش تیمار 48 ساعت با پوشش تیره رنگ به وضوح روند توسعه بیماری را بیشتر نمود. تیمارهای 48 و 24 ساعت تیره با یکدیگر و با سایر تیمارها در سطح یک در صد تفاوت معنی داری داشتند (شکل 7). طبق مشاهدات گلخانه ای تیمارهایی که در آن ها تاریکی اعمال شده بود، اسپورزایی بیشتری داشتند. این در حالی است که علائم در گلدان هایی که در طی دوره رطوبتی به وسیله پلاستیک روشن محصور شده بودند، عمدتا فقط شامل لکه های کلروتیک و نکروتیک بوند. همچنین شکل 8 نیز نشان می دهد که بیشترین تراکم جوش های حاوی اسپور در تیمار 48 ساعت با پوشش تیره می باشد. لذا این طور به نظر می رسد که اعمال تاریکی به همراه 48 ساعت نقطه شبنم شرایط مساعدتری را در گیاه برای تکثیر ورخنه جدایه زنگ (*P. acroptili*) روی علف هرز تلخه فراهم می کند.



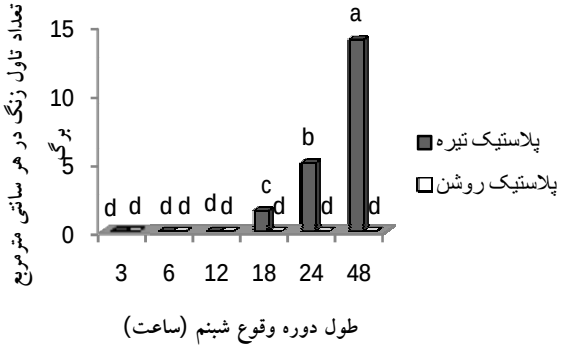
شکل6- تاثیر طول دوره نقطه شبنم بر وزن خشک هر گیاه تلخه به وسیله *Puccinia acroptili*.

هر میانگین حاصل 4 تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح 1% می باشند.



شکل 7- تاثیر طول دوره نقطه شبنم بر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری *Puccinia acroptili*.

هر میانگین حاصل 4 تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح 1% می باشند.



شکل8- تاثیر طول دوره نقطه شبنم بر تراکم تاول های *Puccinia acroptili*.

هر میانگین حاصل 4 تکرار بوده و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار میانگین ها بر اساس آزمون دانکن در سطح 1% می باشند.

قربانی و همکاران (2000) در تحقیقاتی با ارزیابی جدایه ای از قارچ *A. alternate* برای کنترل بیولوژیک تاج خروس *Amaranthus retroflexus* گزارش کردند که سریعترین و شدیدترین حالت بیماری در غلظت 10^7 اسپور و دوره رطوبتی 24 ساعت حاصل گردید و به طور کلی در دوره رطوبتی بیش از 12 ساعت سطوح بالای بیماری مشاهده شد. تان و همکاران (2002) بر اساس بررسی های خود روی کنترل گونه *Alternanthera philoxeroides* با یک سویه از قارچ *Fusarium* spp. گزارش کردند که شدت بیماری با افزایش غلظت سوسپانسیون قارچ افزایش یافت و در غلظت 10^6 و 10^5 تمامی گیاهان تیمار شده، از بین رفتند. به علاوه نتایج بررسی آنها نشان داد که دوره رطوبتی بیش از 12 ساعت در افزایش شدت بیماری به طور معنی داری مؤثر بوده است. همچنین غلظت 10^7 قارچ *A. alternata* در دوره رطوبتی 24 ساعته سبب مرگ 100 درصد گیاهچه های علف هرز ترشک *Rumex dentatus* شد (سیدیکوی و همکاران، 2009). زید علی (1386) نشان داد که جدایه ای از قارچ *A. alternata* در غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر و نقطه شبنم 24 ساعت بیشترین بیماری زایی را در پیچک صحرایی ایجاد کرد. مطالعات نشان داده است که در کنترل *Parthenium hysterophorus* به وسیله

Puccinia abrupt در دوره رطوبتی 4-6 ساعته سبب تولید میزان کمی تاول شد (پارکر و همکاران، 1994).

قارچ های پارازیت اجباری خصوصا قارچ های مولد زنگ از سی سال پیش اثرات زیادی در کنترل علف‌های هرز داشته اند. آن ها معمولا دارای میزبان های محدودی بوده و بیمارگر های بسیار مهاجمی می باشند. گونه هایی از قارچ *Puccinia* در کنترل علف-های هرز گل گندم(*Centuria diffusa*) و *Chondrilla juncea* موثر بوده اند (صارمی و زند، 1382). نمونه های بسیار موفقی از به کار گیری زنگ ها به عنوان عامل کنترل بیولوژیک کلاسیک وجود دارد از جمله کنترل بیولوژیکی *Acacia salinga* در آفریقای جنوبی به وسیله زنگ *Uromycladium tepperianum* گردآوری شده از استرالیا، یا رها سازی *Puccinia carduorum* در آمریکا که به طور گسترده ای انتشار یافت و تراکم علف هرز هدف (*Carduus thoermeri*) را کاهش داد. این قارچ به تاثیر عوامل کنترل بیولوژیک دیگر از جمله حشرات کمک شایانی کرد (چارورداتان، 2001). *Puccinia chondrilla* نیز که یک زنگ ماکرو سیکلیک است برای کنترل علف هرز *Chondrlla juncea* که چند ساله و غیر بومی در استرالیا بود به کار رفت. این علف هرز با بهره گرفتن از قارچ مذکور تا 79 درصد کنترل شد که بازده اقتصادی آن 20 میلیون دلار در سال برآورد گردید (منتظری، 1384). استفاده از قارچ *Puccinia lagenophorae* که منجر به کاهش علف هرز یک ساله *Senecio vulgaris* شد نمونه‌ای از به کار بردن راهکار افزایشی در کنترل زیستی است (چارورداتان، 2001). علف‌کش زیستی Dr. BioSedge® که در آمریکا ثبت شده است، عامل آن زنگ *Puccinia canaliculata* می باشد و جهت کنترل بیوتیپ‌های ویژه ای از اویارسلام زرد (*Cyperus esculentus*) به کار می رود (چارورداتان و آموس، 2000).

نتایج حاضر نشان داد که جدایه *P. acroptili*، دارای توانایی کنترل رشد گیاه هرز تلخه می باشد. زیرا، این جدایه علاوه برآن که در مرحله گیاهچه تاثیر قابل توجهی روی رشد تلخه داشت و وزن خشک آن را تا 61 درصد کاهش داد، روی گیاه کامل این علف هرز نیز ایجاد علائم بیمار نمود. این جدایه برای کنترل نسبی تلخه نیاز به غلظت بالای اسپور و یک دوره رطوبتی طولانی دارد. بنابراین، هر دو این عوامل از تنگنا های استفاده از آن به عنوان علف‌کش زیستی می باشد. لذا برای استفاده موثر از آن در کنترل بیولوژیکی باید تحقیقات بیشتر به منظور یافتن جدایه های موثرتر، روش تولید انبوه و فرمولاسیون مناسب صورت پذیرد تا بتوان در سطح تجاری از آن استفاده نمود.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر حمید روحانی استاد گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد برای شناسایی نمونه های قارچی تشکر و قدردانی می گردد. همچنین از سرکار خانم مهندس علیه گنجی برای همکاری در اجرای این تحقیق سپاسگذاری می شود.

منابع مورد استفاده

آل ابراهیم م ت، میقانی ف، راشد محصل م ح، باغستانی م ع، 1388. بررسی فنولوژی علف هرز تلخه (Acroptilon repens)، بر اساس درجه-روز رشد. نشریه آفات و بیماری های گیاهی، جلد 77، شماره 2. صفحه های 119تا 136

حاجیان فر ر و زربخش ع، 1389. ارزیابی واکنش برخی ارقام و ژنوتیپ های گوجه فرنگی نسبت به Alternaria tenuissima عامل بیماری لکه موجی. مجله علمی- پژوهشی علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. شماره 13. صفحه های 62 تا 74.

راشد محصل م ح و حسینی ا، 1386. افق های نوین در مدیریت علف‌های هرز (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی.

زید علی ا، 1386. کنترل زیستی پیچک صحرایی(Convolvulus arvensis) توسط پاتوژن های آنتاگونیست گیاهی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

صارمی ح و زند ا، 1382. قارچ ها و کنترل بیولوژیک. انتشارات دانشگاه زنجان.

فلاح پور ف، 1389. بررسی امکان کنترل زیستی انگل سس (Cuscuta compestris) به وسیله عوامل بیماری زای قارچی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

قاسم زاده ا، افشاری ف، خدارحمی م و بی همتا م، 1389. بررسی ژنتیکی مقاومت به بیماری زنگ قهوه ای در تعدادی از لاین های پیشرفته گندم در مرحله گیاهچه ای. مجله زراعت و اصلاح نباتات، جلد 6، شماره 3. صفحه های 51 تا 59.

منتظری م، 1384. یافته های دانش علف هرز با چشم اندازی ویژه در کنترل بیولوژیکی. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی.

مین باشی معینی م، باغستانی م ع، رحیمیان مشهدی ح و عالی فرد م، 1387. پراکنش علف‌های هرز مزارع گندم استان تهران با استفاده از سامان اطلاعات جغرافیایی(GIS). مجله دانش علف‌های هرز، جلد 4 شماره 1. صفحه های 97 تا 118.

نوروززاده ش، راشد محصل م ح، نصیری محلاتی م، کوچکی ع و عباس پور م، 1387. ارزیابی تنوع گونه ای، کارکردی و ساختار جوامع علف‌های هرز مزارع گندم در استان های خراسان شمالی، جنوبی و رضوی. مجله پژوهش های زراعی ایران، جلد 6، شماره 2. صفحه های 471 تا 485.

Armellina AA and Zimadahl RL, 1998. Effect of light growth and development of field bindweed (*Convolvulus arvensis*) and Russian knapweed (*Centaurea repens*). Weed Science 36: 779-783.

Berner DK, Eskandari FM, Braun U, McMahon MB, 2005. Cercosporella acroptili and Cercosporella centaureicola sp. nov. Potential biological control agents of Russian Knapweed and yellow starthistle, respectively. Mycologia 97: 1122-1128.

Berner D, Souissi T, Smallwood E, Cavin C, Eskandari F, Tunai B, Buyuk O, Yildrim O, Mukhina A, Kolomiets Z, Matveeva T, Bogomas D, Kassannelli D, Mejri D, Latiri K, Kashefi J and Logopodi A, 2011. Mutual benefits through formalized international collaboration on biological control of weeds with plant pathogens. Tunisian Journal of Plant Protection 6: 49-74.

Bruckart, W L, Eskandari F M, Berner DK and Amie MC, 2010. Life cycle of Puccinia acroptili on Rhaponticum(= Acroptilon) repens. Mycologia 102:62-68.

Charudattan R and Amos D, 2000. Biological Control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. Journal of Crop Protection 19: 691-695.

Charudattan R, 2001. Biological control of weeds by means of plant pathogens: Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. Bio control 46: 229-260.

Ghorbani R, Seel W, Litterick A and Leifert C, 2000. Evaluation of Alternaria alternata for biocontrol of *Amaranthus retroflexus*. Weed Science 48: 473-479.

Ghorbani R, Leifert C and Seel W, 2005. Biological control of weeds with antagonistic plant pathogens. Advances in Agronomy 86:191-225.

Huang B and Gressel J, 1997. Barnyardgrass resistance to both Butachlor and Thiobencarb in China. Resistance Pesticide Management 9:5-7.

Jacobs J and Denny K, 2006. Ecology and management of Russian knapweed [Acroptilon repens (L.) DC]. Natural Resources Conservation Service. Invasive Species Technical note No. MT-7.

Johnson RS, 2008. Field Release of Aulacidea acroptilonica, an Insect for Biological Control of Russian Knapweed (*Acroptilon repense*), in the Continetal United States. USDA.

Klein H, 2011. Russian Knapweed (Acroptilon repens L. de Candolle). Alaska National Heritage Program. University of Alaska ANCHORAGE.

Mealor BA and Hild AL, 2006. Potential selection in native grass populations by exotic invasion. Molecular Ecology 15: 2291-2300.

Mendy EM, 2001. Biological control of Chenopodium album by Ascochyta caulina. PhD. Thesis, University of Aberdeen, Scotland, UK.

Parker A, Holden ANC and Tomley A J, 1994. Host specificity test and assessment of the pathogenicity of the rust, Puccinia abrupta var. parthenniicola, as a biological control of parthenium weed (*Parthenium hysterophorus*). Plant Pathology 43:1-16

Quimby PC, 1995. An overview of federal research on biological control of weeds in Northern Plain area of the United States of America. Proceeding of the 8 International symposium on Biological control of weeds.

Quimby PC, King AJ. and Grey WE, 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. Agriculture Ecosystem Environment 88: 147-152.

Schepers HT, Bain R, Hausladen H, Nielsen BJ, Spits HG, Vanden Bery W and Evenhuis A, 2009. Fungicide evaluation to rate efficacy to control leaf late blight for Euroblight table result 2006-2009. Applied Plant Research.

Shabana YM, Charudattan R, Abou Tabl AH, Morales-Payan JP, Rosskopf EN, Klassen W, 2010. Production and application of the bioherbicide agent Dactylaria higginsii on organic solid substrates. Biological Control 54: 159–165

Siddiqui I, Bajwa R and Javaid A, 2009. Some factors affecting the pathogenicity of Alternaria alternata against the weed Rumex dentatus. The Philippine Agricultural Scientist 92: 282-289

Skinner K, Smith A and Rice P, 2000. Using noxious weed lists to prioritize targets for developing weed management strategies. Weed Science 48: 640-644.

Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. 1992. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Researches. Freeman Company, New York, NY.

Tan TZ, Li QI and Qing L, 2002. Biological control of alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*) with a Fusarium sp. Biocontrol 47: 463-479.

USDA (United States Department of Agriculture). 2008. Control of Russian Knapweed, Federal Register 73:165.

Wager-Page S, 2009. Field Release of Jaapiella ivannikavi (Diptera: Cecidomyiidae), an Insect for Biological Control of Russian knapweed (Acroptilon repens), in the Continental United States. Plant Protection and Quarantine Animal and Plant health Inspection Service U.S. department of Agriculture.

Watson AK, 1977. The biological control of Russian Knapweed (*Centaurera repens*) with a nematode. In Proceedings of the 4 th. International Symposium on Biological Control of Weeds. University of Florida, Gainesville (1976), 221-223.

Watson AK, 1980. The biology of Canadian weeds. 43. *Acroptilon (Centaurea)* repens. Canadian Journal Plant Science 60: 993-1004.