

## مقاله تحقیقی

شناسایی، پراکنش و تنوع کارکردی جدایه‌های ایرانی *Pythium oligandrum*

زینب حقی، رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا، حبیب‌الله حمزه زرقانی

دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

مستول مکاتبات: رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا، پست الکترونیک: rmostofi@shirazu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۱۶

۷(۲)۹۱-۱۱۲

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۰

## چکیده

گونه *Pythium oligandrum* یکی از عوامل زیست‌مهیار مهم در برابر بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود. بر اساس آزمون‌های ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌های این گونه از استان‌های آذربایجان غربی، ایلام، بوشهر، چهارمحال و بختیاری، فارس، کرمانشاه، کرمان، گلستان و یزد جداسازی و شناسایی گردید. بیشترین فراوانی جدایه‌ها به ترتیب در استان‌های کرمانشاه و فارس مشاهده شد. به منظور غربال‌گری، تنوع کارکردی جدایه‌ها بر اساس دمای رشد و اثر مهیار زیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد. اثر جدایه‌های بومی *P. oligandrum* در برابر قارچ‌های بیمارگر خاک‌برد شامل *Rhizoctonia solani*، *F. oxysporum* f. sp. *pisi* و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*، *F. redoens*، *Fusarium solani*، *Phytophthora parasitica* با واکاوی‌های آماری ناپارامتریک ارزیابی و با سویه‌های تجاری *P. Clonostachys rosea*، *Fusarium oxysporum*، *Trichoderma asperellum* و *oligandrum* مقایسه گردید. جدایه‌های بومی *P. oligandrum* در دمای رشدی و فعالیت‌های زیست‌مهاری خود دارای تنوع بودند. بیشترین میزان بازدارندگی رشد ریشه در برهمکنش جدایه‌ی *P. oligandrum* با *R. solani* مشاهده شد. ترکیبات فرار این جدایه‌ها بیشترین اثر معنی‌دار را روی *P. parasitica* و *R. solani* و کمترین اثر را روی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نشان دادند. همچنین ترکیبات غیرفرار آن‌ها بیشترین اثر معنی‌دار خود را روی *P. parasitica* نشان دادند. در آزمون‌های ترکیبات فرار و غیرفرار، در اکثر تیمارها بین فرم تجاری *P. oligandrum* و جدایه‌های *P. parasitica* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ویژگی‌های رشدی و توان جدایه‌های بومی *P. oligandrum* در مهیار بیمارگرهای گیاهی مختلف، در شرایط آزمایشگاهی متفاوت است و از تنوع موجود می‌توان در غربال‌گری‌های بیوشیمیایی و گلخانه‌ای آن‌ها استفاده کرد.

## واژه‌های کلیدی: اُمیکوتا، بیمارگرهای گیاهی خاک‌برد، تنوع، مهیار زیستی، سازوکارها

## مقدمه

می‌شوند به سرعت گسترش یافته و منتشر می‌شود (Le Floch et al., 2003). در مورد سامانه‌های کشت بدون خاک و آب‌کشت (hydroponic)، گونه‌های قارچی بیماری‌زا در مقایسه با شرایط کشت سنتی کم‌تر دیده می‌شوند. اما در این سامانه‌ها، بیماری‌های ریشه شایع هستند و در مقایسه با روش‌های کشت سنتی خسارت بیش‌تری وارد می‌کنند (Le Floch et al., 2007). در چند دهه گذشته، فعالیت‌های گسترده‌ای برای توسعه‌ی کشاورزی پایدار صورت گرفته و

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در حفاظت محصول مانند کاربرد تناوب زراعی، استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی و تولید رقم‌های مقاوم، بیمارگرهای گیاهی خاک‌برد هنوز هم به طور قابل توجهی بازده و کیفیت محصولات مهم اقتصادی را کاهش می‌دهند (Brozova, 2002). این بیمارگرها به دلیل این‌که از طریق ساختارهای مقاوم در خاک بقا می‌یابند چالش‌برانگیز هستند. زمانی که بیمارگرهای خاک‌برد وارد کشت‌های گلخانه‌ای

پادزیستی این شبه قارچ در طول واکنش با یک میزبان قارچی مشاهده شده است. به منظور ارزیابی سهم نسبی قارچ‌انگلی و پادزیستی در فرایند مهار زیستی، برهمکنش *P. oligandrum* و قارچ‌های بیمارگر با میکروسکوپ‌های الکترونی و نوری ارزیابی شده است. این مشاهدات میکروسکوپی نشان می‌دهد که اثر پادزیستی همراه با تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده علیه *F. oxysporum* ممکن است مقدم بر فعالیت‌های قارچ‌انگلی این عامل زیست‌مهار باشد (Benhamou et al., 1999; Rey et al., 2008). در روش قارچ‌انگلی این شبه قارچ به درون ریشه میزبان رخنه می‌کند و موجب تخریب سیتوپلاسم سلول‌های میزبان و سرانجام مرگ میزبان می‌گردد. با توجه به بیمارگر هدف، گونه‌ی *P. oligandrum* با تولید ترکیبات ضدقارچی و از طریق پادزیستی یا قارچ‌انگلی موجب مهار بیمارگر می‌شود. گزارش وجود *P. oligandrum* در خاک‌های کشاورزی ایران (Babai-Ahary et al., 2004; Mostowfzadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi, 2005; Abad et al., 2011) زمینه مناسبی را برای مطالعه و استفاده از جدایه‌های آن به عنوان قارچ‌کش زیستی ایجاد می‌کند. از فراورده‌های زیستی این شبه‌قارچ می‌توان برای تولید بهینه و سالم محصولات مانند چغندرقد، خیار، گوجه فرنگی و حبوبات استفاده کرد (McQuilken et al., 1992; Meszka & Bielenin, 2010) که همگی جزء محصولات مهم و پرمصرف در ایران محسوب می‌شوند. همچنین تولید فراورده‌های تجاری و کاربرد جدایه‌های بومی آن می‌تواند باعث کاهش مصرف سموم شیمیایی و تولید محصولات عاری از هر گونه ماده شیمیایی گردد. نخستین گام برای تدوین شرح حال و غربال‌گری جدایه‌های بومی گونه‌هایی که درون‌مایه‌ی مهار زیستی دارند، شناسایی دقیق و تعیین پراکنش بوم‌شناختی آن‌ها و همچنین بررسی تنوع کارکردی آزمایشگاهی این جدایه‌ها در محیط‌های کنترل شده است. از این رو این مطالعه با هدف شناسایی، تعیین پراکنش و ارزیابی تنوع کارکردی جدایه‌های ایرانی *P. oligandrum* در میزان رشد در دماهای مختلف و همچنین توانمندی آن‌ها

روش‌های جایگزین ایمن و قابل اعتمادی نیز برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است (Alabouvette et al., 2006). در کنار روش‌هایی مانند شیوه‌های به‌زراعی و تولید رقم‌های مقاوم، آفت‌کش‌های غیرشیمیایی به ویژه قارچ‌کش‌های زیستی یکی از ارکان مهار تلفیقی عوامل بیماری‌زای گیاهی به شمار می‌آیند (Paulitz & Belanger, 2001). از این رو مطالعه‌ی این عوامل مهار زیستی در سال‌های اخیر به طور قابل توجهی افزایش یافته است (Gerbore et al., 2014).

گونه *Pythium oligandrum* Dreschler 1930

اُمیستی خاک‌زی است که اولین بار از بوته‌های بیمار نخود در ایالات متحده آمریکا جداسازی شده است (Drechsler, 1930). با این که *P. oligandrum* یک اُمیست غیربیماری‌زای خاک‌زی است، سیستم ریشه‌ی بسیاری از گیاهان را کلنیزه می‌کند. این شبه قارچ از طریق قارچ‌انگلی (mycoparasitism) روی ریشه بسیاری از قارچ‌ها فعالیت دارد (Benhamou et al., 2012). نفوذ *P. oligandrum* به درون سلول‌های میزبان موجب تخریب کامل سیتوپلاسم سلول‌های آن می‌شود که این تخریب در نهایت با مرگ میزبان همراه است. این فرایند در واکنش با قارچ‌ها و شبه‌قارچ‌هایی مانند *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis* و *P. ultimum* Trow و *lycopersici* Jarvis & Shoemaker مشاهده شده است (Benhamou et al., 1997, 1999). گونه *P. oligandrum* همچنین در طیف وسیعی از گیاهان موجب القای واکنش‌های دفاعی گیاه بر علیه بیمارگرهای مختلف می‌شود (Yacoub et al., 2018). در این گونه شبه قارچ دو نوع پروتئین شبه‌الیستین با نام اُلِگاندرین (*oligandrin*) و پروتئین‌های دیواره‌ی سلولی با نام Pod-1 و Pod-2 با توانایی القای مقاومت در گونه‌های گیاهی مختلف جداسازی شده است (Gerbore et al., 2014). پادزیستی (antibiosis) به عنوان تعامل خاص بین ریزجانداران، یکی دیگر از ویژگی‌های مهار زیستی در *P. oligandrum* است. در این تعامل، موجود هدف به وسیله‌ی متابولیت‌های ثانویه‌ی سمی موجودی دیگر از بین می‌رود. در مطالعه‌ی ری و همکاران (Rey et al., 2008) قارچ‌انگلی و

۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)، عصاره مالت-آگار (MEA) ۲۰ گرم مالت، ۱۶ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)، عصاره شاهدانه-آگار (عصاره ۶۰ گرم شاهدانه خرد شده، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)، عصاره هویج-آگار (عصاره ۲۰ گرم هویج خرد شده، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) و CMA (عصاره ۴۰ گرم ذرت خرد شده، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) بررسی شد.

### شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای تأیید شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های *P. oligandrum*، شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی P.OLIG.F1 (5'-CTGTGCTTCGTCGCAAGACT-3' و P.OLIG.R04 (5'-CTTTAAAAAGACAGCGGAGA-3') بر اساس نواحی اختصاصی واحد تکراری فاصله‌ی ترانویسی شده داخلی دی‌ان‌ای ریپوزومی (ITS) (Vasseur *et al.*, 2005) و آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش OliganF1 (5'-ATGTTACCAAGACCTTGG-3' و OliganR1 (5'-TTAAGCGGAGCCAACCACGG-3') مبتنی بر ژن آلیگاندترین انجام شد. برای طراحی و انتخاب آغازگرهای مبتنی بر آلیگاندترین، در میان توالی‌های معتبر ژن آلیگاندترین به دست آمده از پروژه ژنومی *P. oligandrum* (Berger *et al.*, 2016) نواحی یگانه، به صورت با استفاده از نرم‌افزار Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) ردیابی شدند. میزان اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در گونه‌های هدف با استفاده از واکاوی درون رایانه‌ای (Primer-BLAST, NCBI) و با آزمون روی جدایه‌های معتبر *P. oligandrum* و گونه‌های نزدیک در تبار D گونه‌های *Pythium* (Hyde *et al.*, 2014) بررسی شد. استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش سلمانی‌نژاد و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Salmaninezhad & Mostowfzadeh-Ghalamfarsa, 2019) و با استفاده از

در مهیار بیمارگرهای گیاهی خاک‌برد از طریق روش‌های مختلف آزمایشگاهی طراحی شده است.

### مواد و روش‌های بررسی

#### جداسازی جدایه‌های *P. oligandrum*

به منظور جداسازی جدایه‌های *P. oligandrum* نمونه‌برداری از خاک فراریشه‌ی محصول‌های گیاهی مختلف در مناطق مختلف به صورت تصادفی انجام گرفت. جدایه‌ها به روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات (Banihashemi *et al.*, 1992) و با استفاده از محیط کشت CMA-PARP (CMA آماده شده با ۰/۰۲ گرم در لیتر دلواسید، ۰/۵ گرم در لیتر آمپی سیلین، ۰/۰۱ گرم در لیتر ریفامپین و ۰/۱ گرم در لیتر PCNB) جداسازی شدند (Jeffers & Martin, 1968). پرگنه‌های به دست آمده پس از سه روز روی محیط کشت آب آگار (۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت و به روش نوک‌ریسه خالص شدند (Hsieh & Chang, 1976; Chang, 1988; Singleton *et al.*, 1992). نوک‌ریسه‌ها به محیط کشت CMA (Tuit, 1969) منتقل گردید. جدایه‌های خالص شده به لوله‌های حاوی محیط کشت CMA منتقل و در ۱۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

#### شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های *P. oligandrum*

شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی اندام‌های رویشی، با استفاده از کلیدهای موجود (van der Plaats-Niternick, 1981; Dick, 1990) انجام گرفت. ویژگی‌های اندام‌های جنسی و غیرجنسی شامل ریخت‌شناسی اسپورانژیوم (کروی، رشته-ای)، تزئینات سطح آگونیوم (صاف یا دارای تزئینات)، مقدار فضایی که آسپور در آگونیوم اشغال کرده است (پرساز یا ناپرساز "plerotic or aploretic")، خاستگاه (تک‌بُن یا دو بُن "monoclinous or diclinous") و حالت اتصال آنتریدیوم به آگونیوم (پراماده یا زیرماده "paragynous or hypogynous") انجام گرفت. الگوی رشد پرگنه روی محیط کشت‌های عصاره سیب‌زمینی-آگار (PDA، عصاره ۳۰۰ گرمی سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز،

محاسبه گردید. دماهای مورد بررسی در این آزمون شامل ۲۵، ۲۷، ۲۹، ۳۲، ۳۵، ۳۷ و ۴۰ درجه سلسیوس بود.

### ارزیابی توان مهار زیستی جدایه‌های *P. oligandrum* روی بیمارگرهای گیاهی کشت متقابل عوامل زیست‌مهار با عوامل بیمارگر گیاهی

به منظور مقایسه قدرت بازدارندگی جدایه‌های *P. oligandrum* از رشد عوامل بیمارگر از روش کشت متقابل استفاده شد. در این آزمایش از قارچ‌های زیست‌مهار شامل *Trichoderma asperellum* Samsuels، فرم‌های تجاری Lieckf. & Nirenberg سویه T34 (شرکت Biobest، فرانسه)، *Clonostachys rosea* (Preuss) Mussat، سویه CYS (شرکت Adjuvants Plus، کانادا)، *P. oligandrum* سویه M1 (شرکت De Sangosse، فرانسه؛ مربوط به آفت‌کش زیستی تجاری پلی‌ورسوم)، سویه Fo47 قارچ *Fusarium oxysporum* (مؤسسه ملی تحقیقات کشاورزی فرانسه، دیژون) و جدایه‌های ایرانی منتخب *P. oligandrum* شامل K29، K31، K48، K50، K85، K87، BR1، FSX و IZTO و بیمارگرهای *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hans (FOL) و *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (C.J.J. Hall) W.C. Snyder & H.N. Hansen (FOP) و *F. solani* (Mart.) Sacc. و *Phytophthora parasitica* Breda *redolens* Wollenw de Haan و *Rhizoctonia solani* Kuhn استفاده گردید.

آزمایش در تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری و محیط کشت PDA در سه تکرار انجام شد. یک بلوک پنج میلی‌متری از پرگنه پنج روزه عوامل بیمارگر در یک طرف تشتک پتری و یک بلوک پنج میلی‌متری از پرگنه پنج روزه هر یک از جدایه‌های زیست‌مهار در سمت دیگر تشتک پتری به صورت جدا در مقابل هر بیمارگر قرار داده شد. تشتک‌های پتری در ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. رشد پرگنه‌ی عوامل زیست‌مهار و بیمارگر دو بار در روز اندازه‌گیری شد. واکاوی داده‌ها با استفاده از روش رگرسیون خطی انجام شد. برای واکاوی داده‌ها از نرم‌افزار

کیت DNG™-PLUS (سیناژن، ایران) و به روش توصیه‌شده توسط شرکت تولیدکننده انجام گرفت.

دی‌ان‌ای مربوط به فاصله ترانویسی شده داخلی تحت شرایط یک چرخه واسرشتگی ابتدایی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، هم‌جوشی در ۵۹ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، و یک چرخه گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسیکلر CGI-96 (کوریت ریسرچ، استرالیا) انجام شد. در مورد آغازگرهای مبتنی بر ژن الیگاندرین دمای هم‌جوشی ۶۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه به کار برده شد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با الکتروفورز در ژل یک درصد اگارز حاوی ۰/۰۰۵ اتیدیوم بروماید در بافر تی‌بی‌بی (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم بی‌دی‌تی‌ای، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۹۰ ولت تأیید شد. قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومتر (سین‌ژن، ایالات متحده آمریکا) عکس‌برداری شد، اندازه نوارهای به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰ جفت‌بازی (Gene Ruler؛ فرمنتاز، بریتانیا) برآورد شد. مشاهده نوارهای ۳۸۴ و ۲۶۷ جفت‌بازی به عنوان واکنش مثبت به ترتیب برای آغازگرهای مبتنی بر آی‌تی‌اس و آغازگرهای مبتنی بر ژن الیگاندرین در نظر گرفته شد.

### تعیین دمای رشد و میزان رشد روزانه در جدایه‌های *P. oligandrum*

برای تعیین دمای رشد و میزان رشد شعاعی روزانه در هر دما برای جدایه‌ها، از حاشیه پرگنه‌های جوان رشد یافته روی محیط کشت PDA یک قطعه پنج میلی‌متری برداشته و در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. برای هر جدایه در هر دما سه تکرار در نظر گرفته شد. میانگین رشد شعاعی در هر دما برای هر جدایه

جداگانه در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت PDA کشت شد. پس از برداشتن در تشتک‌های پتری حاوی بیمارگر، این تشتک‌ها روی تشتک حاوی جدایه‌های *P. oligandrum* قرار داده شد و دور تشتک‌ها با نوار پارافیلیم بسته شد. برای تیمار شاهد از یک دیسک PDA بدون عامل زیست‌مهار استفاده شد. تشتک‌ها حاوی قارچ بیمارگر به صورت وارونه نسبت به تشتک حاوی عامل زیست‌مهار قرار داده شده، در ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی نگهداری گردیدند. قطر پرگنه قارچی به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر، بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$100 \times (\text{قطر پرگنه قارچ در تیمار} - \text{قطر پرگنه قارچ در شاهد}) = \text{درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ}$$

قطر پرگنه قارچ در شاهد

پتری در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Mohammadi *et al.*, 2009). اندازه‌گیری رشد شعاعی پرگنه قارچ بیمارگر به فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت عامل بیماری انجام گرفت. در این آزمایش درصد بازدارندگی از رشد ریشه‌های قارچ عامل بیماری با استفاده از رابطه‌ی ذکر شده در قسمت قبل محاسبه گردید.

با توجه به نرمال نبودن توزیع پاسخ اندازه‌گیری شده و مشکل بودن تفسیر داده‌های در مقیاس تبدیل شده برای تحقیق تأثیر تیمارها روی قارچ‌های بیمارگر هدف و مقایسه میانگین درصد بازدارندگی رشد پرگنه قارچ‌های بیماری‌زا توسط ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* از روش تجزیه واریانس ناپارامتری (آزمون رتبه‌ای دوطرفه فریدمن یا Two way Friedman rank test) استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ صورت گرفت. برای واکاوی داده‌ها از نرم‌افزار SAS نسخه 9.2 (North Carolina State University) استفاده شد. از فرم تجاری *P. oligandrum* (پلی‌ورسوم، سویه M1)، به عنوان شاهد استفاده شد.

SAS نسخه 9.2 (North Carolina State University) استفاده شد.

### تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی بیمارگرهای گیاهی خاک‌برد

اثر ترکیبات فرار جدایه‌های K29، K48 و K87 بر اساس روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster, 1971) ارزیابی شد. ابتدا دیسک‌های پنج سانتی‌متری از حاشیه‌ی فعال پرگنه‌های قارچی سه روزه جدایه‌های *P. oligandrum* و قارچ‌های بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *R. solani* و *Ph. parasitica* به عنوان نماینده‌هایی از سه شاخه بازیدیومیکوتا، آسکومیکوتا و آُمیکوتا به طور

### تأثیر ترکیبات برون سلولی غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی بیمارگرهای گیاهی

به منظور بررسی اثر ترکیبات غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی قارچ‌های بیمارگر *R. solani*، *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Ph. parasitica* از حاشیه‌ی در حال رشد جدایه‌های K29، K48 و K87 بلوک‌های به قطر یک سانتی‌متر درون فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌متری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع عصاره ارزن (۴۰ گرم ارزن، ۲۰ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر) منتقل شد. کشت‌ها به مدت ۱۰ روز روی دستگاه لرزا با ۸۰ دور در دقیقه و در ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس محتویات درون فلاسک‌ها در شرایط کاملاً سترون با استفاده از کاغذ صافی و پمپ خلاء فیلتر شد. محلول فیلتر شده با محیط کشت PDA به نسبت مساوی در دمای حدود ۴۰ درجه سلسیوس به خوبی مخلوط گردید و در تشتک‌های پتری ریخته شد. بعد از انعقاد محیط کشت یک بلوک پنج میلی‌متری از کشت سه روزه‌ی قارچ‌های بیمارگر *R. solani* و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Ph. parasitica* در وسط تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌های

## نتایج

بختیاری، فارس، کرمانشاه، کرمان، گلستان و یزد جداسازی گردید (جدول ۱). بیشترین فراوانی جدایه‌ها به ترتیب در استان‌های کرمانشاه و سپس فارس مشاهده گردید و نمونه برداری از استان‌های اصفهان و همدان منجر به جداسازی گونه هدف نگردید (شکل ۱). جدایه‌های K29، K31، K48، K50، K85، K87، BR1، FSX و IZTO که نماینده مناطق و بستره‌های گیاهی مختلف بودند به عنوان جدایه‌های منتخب برای استفاده در سایر آزمون‌ها برگزیده شدند.

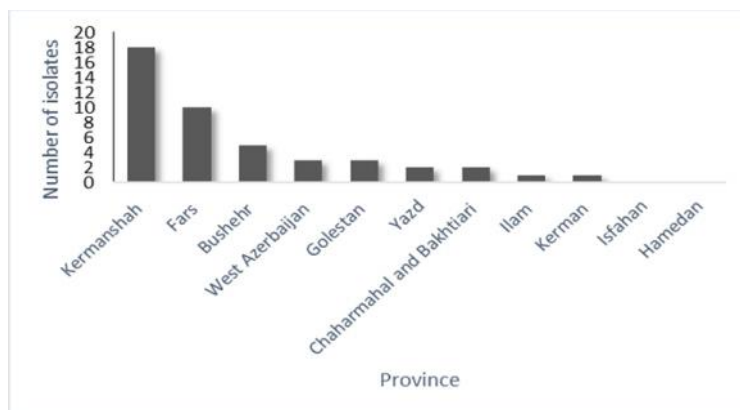
در این بررسی در مجموع ۴۵ جدایه *P. oligandrum* از فراریشه گیاهان مختلف از جمله گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* Mill.)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، بادمجان (*Solanum melongena* L.)، چغندرقد (*Beta vulgaris* L.)، یونجه (*Medicago sativa* L.)، نخود (*Cicer arietinum* L.)، عدس (*Lens culinaris* L.)، گندم (*Triticum aestivum* L.)، برنج (*Oryza sativa* L.)، ذرت (*Zea mays* L.)، سویا (*Glycine max* (L.) Merr.)، گردو (*Juglans regia* L.) و پسته (*Pistacia vera* L.) از استان‌های آذربایجان غربی، ایلام، بوشهر، چهارمحال و

جدول ۱- جدایه‌های *Pythium oligandrum* جدا شده از فراریشه‌ی محصولات گیاهی مختلف در ایران

**Table 1.** Isolates of *Pythium oligandrum* recovered from the rhizosphere of various crops in Iran.

Isolate	Province (Location)	Matrix	Date	Coordinates
BR1	Bushehr (Borazjan)	Tomato	April 2017	29.25041°N -51.19022°E
BR2	Bushehr (Borazjan)	Tomato	April 2017	29.24961°N -51.19109°E
BR4	Bushehr (Borazjan)	Tomato	April 2017	29.25011°N -51.18840°E
Bg2	Bushehr (Borazjan)	Eggplant	April 2017	29.25400°N -51.19230°E
Bg1	Bushehr (Borazjan)	Eggplant	April 2017	29.24524°N -51.19287°E
P39a	Chaharmahal and Bakhtiari (Farsan)	Walnut	November 2016	5044.984°N -3219.564°E
P36a	Chaharmahal and Bakhtiari (Farsan)	Wheat	November 2016	5044.984°N -3220.861°E
FBt1	Fars (Bajgah)	Tomato	October 2016	29.75130°N -52.55870°E
FBm3	Fars (Bajgah)	Maize	October 2016	29.75118°N -52.55846°E
FC56	Fars (Jahrom)	Lemon	April 2017	28.49092°N -53.59005°E
FJB	Fars (Jahrom)	Barely	December 2013	53.29168°N -28.91920°E
FKto	Fars (Kamfiruz)	Tomato	April 2017	30.32205°N -52.19609°E
FSX	Fars (Saadat Shahr)	Tomato	October 2016	30.10455°N -53.04253°E
FS110	Fars (Saadat Shahr)	Tomato	April 2017	30.10420°N -53.04253°E
FSG	Fars (Saadat Shahr)	Grapevine	October 2016	30.08178°N -53.12411°E
FSP1	Fars (Sivand)	Potato	April 2017	30.07995°N -52.91012°E
FSP2	Fars (Sivand)	Potato	April 2017	30.07995°N -52.90952°E

GM1	Golestan (Gorgan)	Soybean	August 2016	36.87660°N -54.38788°E
GZ1	Golestan (Gorgan)	Rice	August 2016	36.85976°N -54.62475°E
GK1	Golestan (Gorgan)	Wheat	August 2016	36.87507°N -54.36155°E
FM0 8	Ilam (Zarin Abad)	Tomato	April 2017	33.01373°N -46.87092°E
KBu	Kerman (Bam)	Alfalfa	April 2017	28.65273°N -59.00611°E
K71	Kermanshah (Eslamabad-e Gharb)	Chickpea	November 2016	34.09844°N -46.50717°E
K44	Kermanshah (Gilan-e Gharb)	Chickpea	November 2016	34.15571°N -45.91321°E
K46	Kermanshah (Gilan-e Gharb)	Chickpea	November 2016	34.17508°N -45.87913°E
K48	Kermanshah (Gilan-e Gharb)	Chickpea	November 2016	34.19838°N -45.87890°E
K50	Kermanshah (Gilan-e Gharb)	Lentil	November 2016	34.13475°N -45.95634°E
K110	Kermanshah (Harsin)	Chickpea	November 2016	34.26640°N -47.57093°E
K115	Kermanshah (Harsin)	Chickpea	November 2016	34.26535°N -47.57650°E
K126	Kermanshah (Kangavar)	Chickpea	November 2016	34.48369°N -47.92833°E
K31	Kermanshah (Kermanshah)	Chickpea	November 2016	34.72094°N -46.92075°E
K29	Kermanshah (Kermanshah)	Lentil	November 2016	34.61644°N -47.14195°E
K39b	Kermanshah (Kermanshah)	Lentil	November 2016	34.72767°N -46.89508°E
K39d	Kermanshah (Kermanshah)	Lentil	November 2016	34.72767°N -46.89508°E
K47	Kermanshah (Kermanshah)	Lentil	November 2016	34.72767°N -46.89508°E
K78	Kermanshah (Kermanshah)	Lentil	November 2016	34.33030°N -47.13569°E
K87	Kermanshah (Ravansar)	Chickpea	November 2016	34.71991°N -46.64458°E
K85	Kermanshah (Ravansar)	Lentil	November 2016	34.70118°N -46.65840°E
K118	Kermanshah (Sahneh)	Chickpea	November 2016	34.44701°N -47.66824°E
K109	Kermanshah (Sarab-e Niloofar)	Lentil	November 2016	34.40827°N -46.86437°E
U304 b	West Azerbaijan (Uromia)	Pine	August 2017	37.77599°N -45.16592°E
U375 a	West Azerbaijan (Uromia)	Turfgrass	August 2017	37.78386°N -45.16712°E
U375 b	West Azerbaijan (Uromia)	Turfgrass	August 2017	37.78305°N -45.16780°E
YP1	Yazd (Yazd)	Pistachio	November 2015	54.19933°N -31.75725°E
YP2	Yazd (Yazd)	Pistachio	November 2015	54.19940°N -31.75720°E



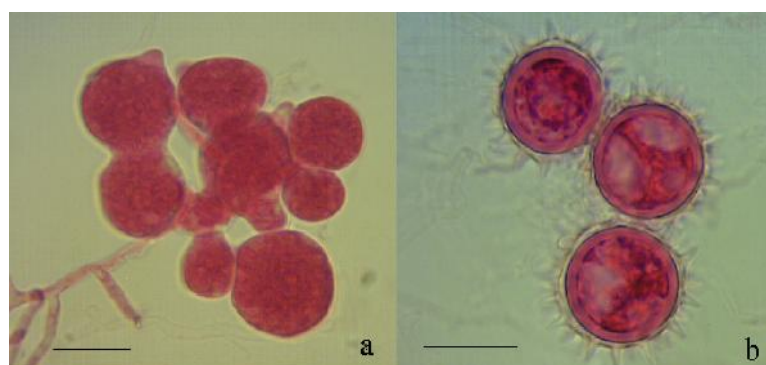
شکل ۱- پراکنش جدایه‌های *Pythium oligandrum* جمع‌آوری شده در استان‌های مختلف.

Fig.1. Distribution of *Pythium oligandrum* isolates recovered from different provinces of Iran

(شکل ۲، a). اُگونیوم انتهایی یا بین ریشه‌ای و سطح آن پوشیده از برآمدگی‌های نوک تیز و مخروطی بود. در جدایه‌های این گونه آنتریدیوم به ندرت مشاهده شد. با این حال در برخی جدایه‌ها به ازای هر اُگونیوم، یک تا ندرتاً دو عدد آنتریدیوم پراماده (paragynous) دیده شد. در این گونه اُسپور ناپرساز بود (شکل ۲، b). همه‌ی جدایه‌هایی که *P. oligandrum* تشخیص داده شده بودند پس از فزون‌سازی با آغازگرهای مبتنی بر آی‌تی‌اس (شکل ۳) و آغازگرهای طراحی شده مبتنی بر ژن الیگاندترین (شکل ۴) به ترتیب قطعات ۳۸۴ و ۲۶۷ جفت بازی را تولید کردند.

### شناسایی جدایه‌های *P. oligandrum* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی

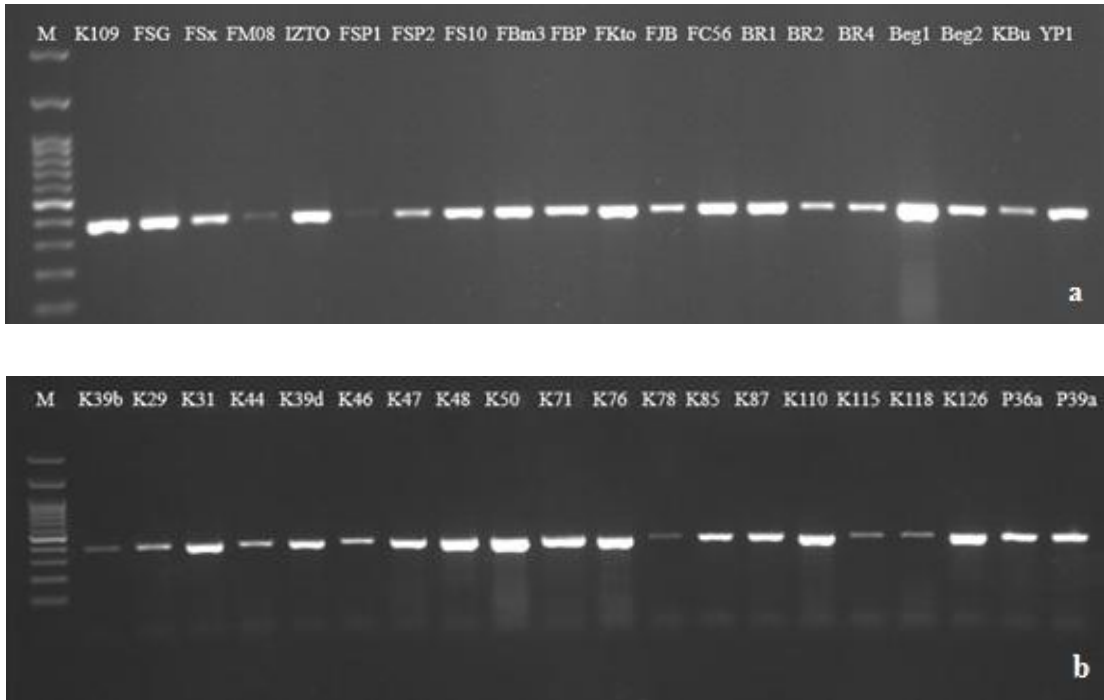
در جدایه‌های به دست آمده الگوی رشد پراکنه روی محیط کشت‌های PDA و MEA به صورت گل‌سرخ، روی HSA به صورت شعاعی، روی CMA به صورت زیرسطحی و یک‌نواخت و روی CA فاقد الگوی رشد مشخص بود. هیچ‌گونه کلایدوسپور، چنگک یا آماس ریشه در جدایه‌های مورد آزمون دیده نشد. اسپورانژیوم از ساختارهای به هم پیوسته تشکیل شده بود که مجموعه‌های نامنظمی را به وجود می‌آوردند. این ساختارهای تقریباً کروی شکل و با اجزای رشته‌ای به یک‌دیگر وصل می‌شدند



شکل ۲- ریخت‌شناسی گونه *Pythium oligandrum* (جدایه‌ی K48): a. اسپورانژیوم مرکب شامل قطعات کروی؛ b. اُگونیوم کروی با دیواره‌ی خاردار، اُسپور ناپرساز بدون حضور آنتریدیوم (خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

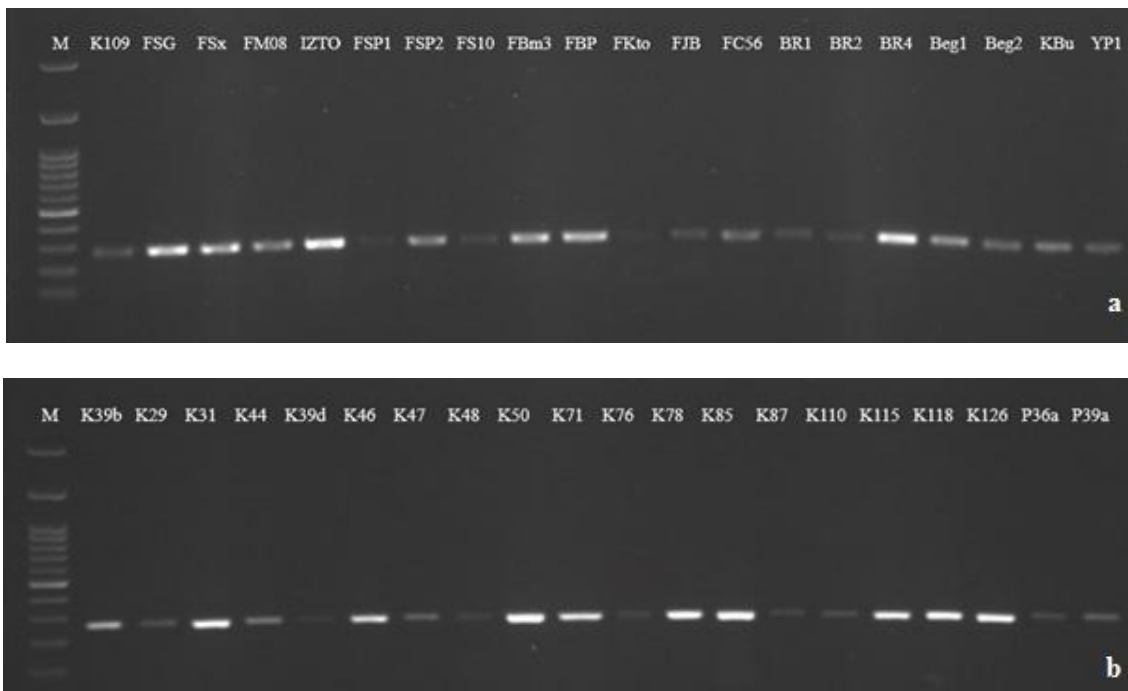
Fig. 2. Morphology of *Pythium oligandrum* (isolate K48): a. Contiguous sporangia with globose elements, b. Globose oogonia with acute spines and aplerotic oospore without antheridium (scale bar = 20µm).





شکل ۳- فزون سازی نواری ۳۸۴ جفت بازی در جدایه های *Pythium oligandrum* با استفاده از آغازگرهای P.OLIG.F1 و P.OLIG.R04 مبتنی بر فاصله ترانویسی شده داخلی دی این ای ریپوزومی (a و b). M= نشانگر ۱۰۰ جفت بازی.

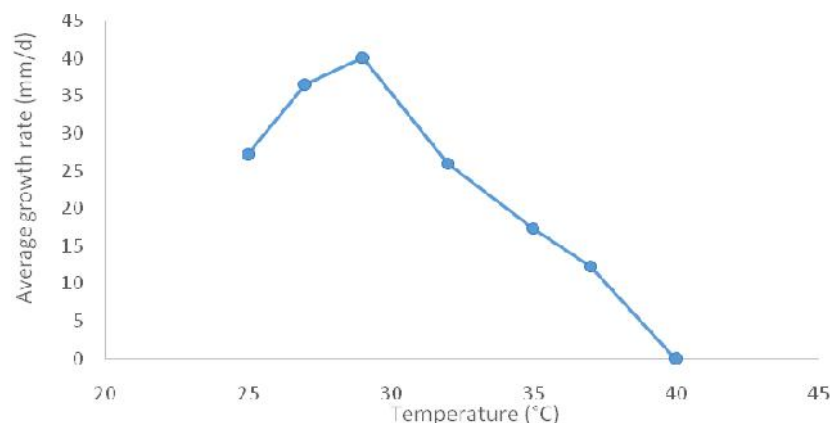
Fig. 3. Amplification of 384 bp band in *Pythium oligandrum* isolates using P. OLIG.F1 and P. OLIG.R04 primers based on ribosomal internal transcribed spacer region. M= 100 bp DNA ladder.



شکل ۴- فزون سازی نواری ۲۶۷ جفت بازی در جدایه های *Pythium oligandrum* با استفاده از آغازگرهای OliganF1 و OliganR1 مبتنی بر ژن الیکاندرین (a و b). M= نشانگر ۱۰۰ جفت بازی.

Fig. 4. Amplification of 267 bp band in *Pythium oligandrum* isolates using OliganF1 and OliganR1 primers based on oligandrin gene. M= 100bp DNA ladder.

تعیین شد (شکل ۵). در برخی از جدایه‌ها از جمله U304، FS110، YP2، دمای بهینه ۲۷ درجه سلسیوس مشاهده شد جدایه‌های *P. oligandrum* قادر به رشد در ۴۰ درجه سلسیوس نبودند و دمای بیشینه رشد برابر با ۳۷ درجه سلسیوس مشاهده گردید.



شکل ۵- میانگین رشد جدایه‌های ایرانی *Pythium oligandrum* در دماهای مختلف.

Fig. 5. Average growth rate of Iranian isolates of *Pythium oligandrum* at different temperatures.

جدول ۲- رشد شعاعی (میلی‌متر در روز) جدایه‌های *Pythium oligandrum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در دماهای مختلف روی محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی-آگار.

Table 2. Radial growth rate (mm/d) of *Pythium oligandrum* isolates recovered from various regions of Iran at different temperatures on PDA medium.

Isolate	Temperature (°C)						
	25	27	29	32	35	37	40
Bg1	33.5	38.1	<b>42.5</b>	26.8	13.1	14.5	0
Bg2	32.6	38.1	<b>41.3</b>	26.8	15.2	13.1	0
BR1	39.6	40	<b>46</b>	28.9	16.3	14	0
BR2	33.6	33.8	<b>43</b>	38.3	16.8	17.3	0
BR4	37.6	38.5	<b>43.6</b>	3.5	16.6	21.1	0
FBm3	34.1	34	<b>39.8</b>	34.9	15.1	17.3	0
FC56	28.6	<b>42</b>	31.1	26.2	13.8	1.9	0
FKto	29.5	34	<b>35.8</b>	22.5	18.7	14	0
FM08	29.5	46	<b>39.1</b>	34.4	24	13	0
FS110	25.5	<b>31.6</b>	29.6	21.9	12.9	9.6	0
FSG	22.6	<b>37.8</b>	29.3	29.9	11	6	0
FSP1	33.3	34.5	<b>39</b>	27.8	16.7	18.7	0
FSP2	29	34.5	<b>36.5</b>	29.5	15.2	18.7	0
FSX	3.1	35.6	<b>37.3</b>	27.6	17.4	14.5	0
GK1	22.8	24.6	<b>28.1</b>	14	9.5	3.8	0
GM1	29.5	32.6	<b>35.5</b>	3.3	12.4	12.9	0
GZ1	2.1	29.6	<b>32.1</b>	27.3	1.3	1.5	0
IZTO	3.8	37.3	<b>36.1</b>	33.3	29.1	21.6	0

K109	28.6	34.3	<b>36.5</b>	31.9	19.3	13.9	0
K110	28.6	36.3	<b>31.3</b>	26.6	12.9	9.8	0
K115	33.8	31.1	<b>41.1</b>	31.3	24.1	25.1	0
K118	24.8	32	<b>38.8</b>	25	22.1	12.5	0
K126	32.5	26.8	<b>42.3</b>	26.6	16	1.1	0
K29	29.5	36.5	<b>39.8</b>	25.3	14.5	14.7	0
K31	25	33.1	<b>36</b>	22.8	15	13.8	0
K39b	15.6	26.1	<b>35.3</b>	3.3	17.5	15.3	0
K39d	16	25.5	<b>56.8</b>	31	16	14.7	0
K44	29	26.3	<b>37.5</b>	34	25.3	23.1	0
K46	28	<b>37.5</b>	36.5	27.6	15.5	12.9	0
K47	31.6	32.5	<b>35.3</b>	29.8	22.1	14.5	0
K48	34.1	36.1	<b>44.3</b>	29.7	14	1.5	0
K50	31	35.6	<b>41.5</b>	26	14.9	17.7	0
K71	29.8	33.8	<b>38.6</b>	22.6	14	13.1	0
K76	28	35.8	<b>42.5</b>	24.5	12.7	12.9	0
K78	13.8	26.1	<b>37.6</b>	29.5	17	16.2	0
K85	19.3	3.8	<b>23.5</b>	17.5	9.5	1.8	0
K87	34.1	<b>37.6</b>	32	27.6	14.5	13.7	0
KBu	19.6	31.8	<b>37.5</b>	26.7	17.2	9.3	0
P36a	24.3	<b>28.1</b>	27.8	26.1	6.6	2.1	0
P39a	22.6	<b>28</b>	26.5	26	6.1	1.1	0
U304	32.1	<b>43</b>	42.3	29.5	17	2.4	0
U375a	32	35.8	<b>47.1</b>	42.9	18.9	15.6	0
U375b	31.1	<b>38.6</b>	4.5	26.6	26	15.6	0
YP1	22.5	26.5	28	<b>29.4</b>	13.4	5.5	0
YP2	15.1	<b>33.6</b>	26.5	19.5	8.6	8	0

اعداد تیره نشان دهنده آهنگ رشد روزانه در دمای بهینه هستند.

Bold numbers show daily radial growth rate at optimum temperature.

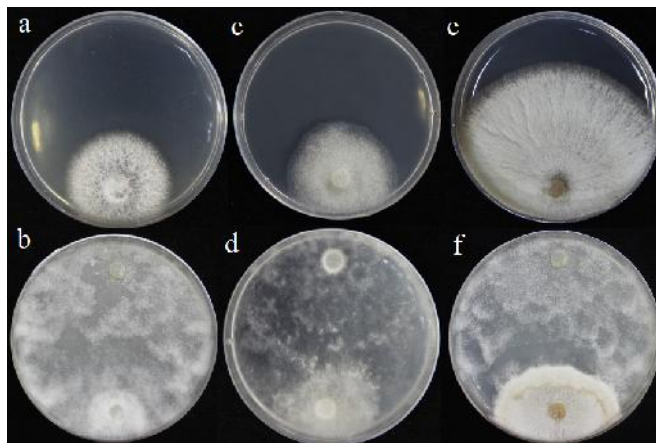
بازدارندگی بیشتری روی رشد بیمارگر نشان دادند (شکل ۸). در بررسی قارچ *F. redolens* تنها سویه‌های تجاری *(F. oxysporum) Fo47* و *(C. rosea) CYS* که به عنوان شاهد به کار برده شدند، توانستند در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی داری روی کاهش رشد این قارچ نشان دهند (شکل ۹). در مورد *F. oxysporum f. sp. pisi* اختلاف معنی داری بین جدایه‌های *P. oligandrum* مشاهده نشد. با این حال جدایه‌ی K39 عملکرد بهتری نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد (شکل ۱۰) در بازدارندگی از رشد جدایه‌های *P. oligandrum* روی *F. oxysporum f. sp. lycopersici* نیز

### بررسی اثر کشت متقابل جدایه *P. oligandrum* روی بیمارگرهای خاک برد

نمونه‌ای از اثر متقابل جدایه‌های منتخب *P. oligandrum* و بیمارگرهای مورد مطالعه در شکل ۶ آمده است. در این بررسی تمام جدایه‌های *P. oligandrum* در مقایسه با شاهد بازدارندگی معنی داری را روی *R. solani* نشان دادند. اما میزان بازدارندگی اکثر جدایه‌های *P. oligandrum* (K31)، K50، K85، K87، IZTO و FSX نسبت به هم معنی دار نبود (شکل ۷). در *F. solani* جدایه‌های IZTO و K31 در سطح احتمال پنج درصد نسبت به جدایه‌های دیگر

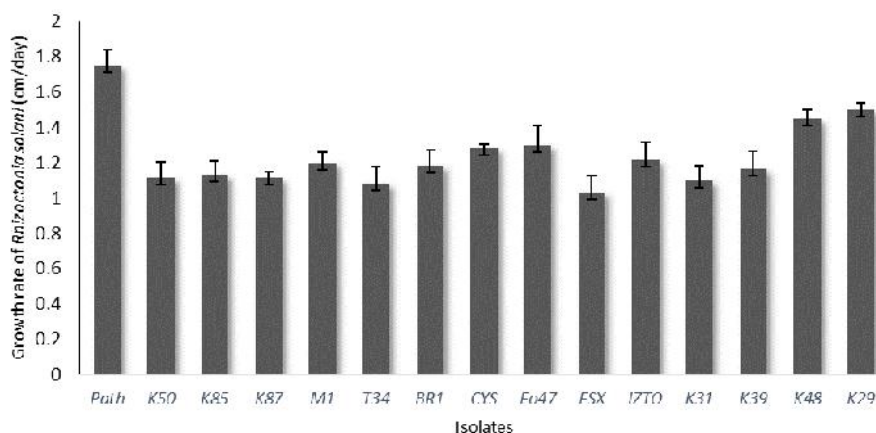
دادند، اما میزان بازدارندگی از رشد همه‌ی جدایه‌ها یکسان ارزیابی شد (شکل ۱۲).

تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل ۱۱). همچنین در اثر متقابل جدایه‌های *P. oligandrum* روی *P. parasitica* جدایه‌ها اثر قابل توجهی در کاهش رشد بیمارگر نشان



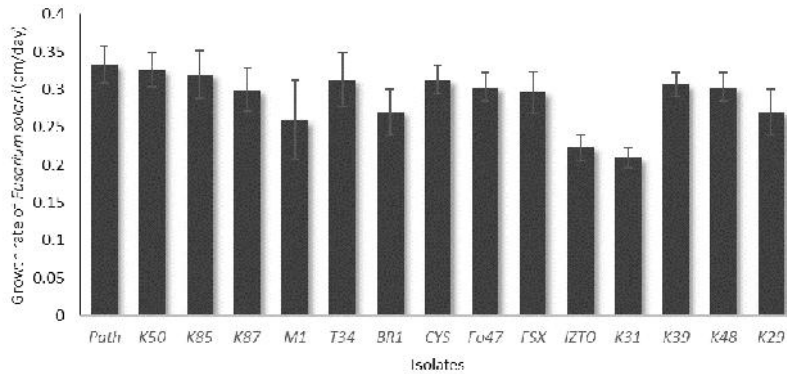
شکل ۶- اثر متقابل جدایه‌های *Pythium oligandrum* روی قارچ‌های بیمارگر (ردیف پایین) در مقایسه با شاهد بدون آنتاگونیست (ردیف بالا). a-b. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; c-d. *Phytophthora parasitica*; e-f. *Rhizoctonia solani*.

Fig. 6. Dual culture interaction between *Pythium oligandrum* isolates and some plant pathogenic fungi (lower row) compared with controls without antagonist (upper row). a-b. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*; c-d. *Phytophthora parasitica*; e-f. *Rhizoctonia solani*.



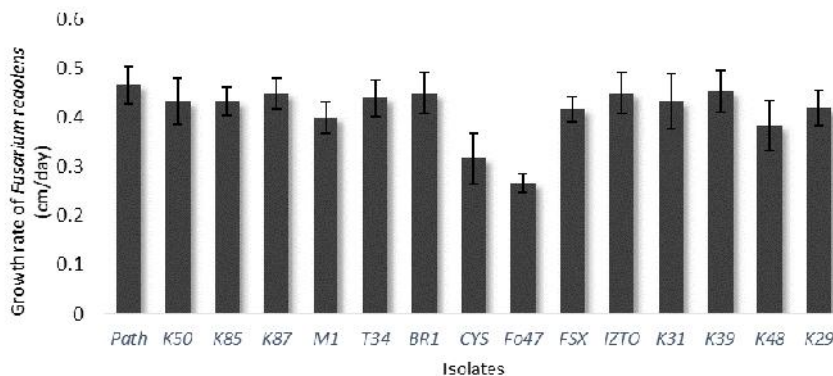
شکل ۷- اثر عوامل زیست‌مهار بر میزان رشد رویشی *Rhizoctonia solani* در محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی-آگار در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس. عوامل زیست‌مهار شامل جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO)، فرم تجاری *P. oligandrum* (Polyversum, M1)، *Clonostachys rosea* (CYS)، *Fusarium oxysporum* (Fo47) و *Trichoderma asperellum* (T34) بودند. Path= شاهد فاقد عامل زیست‌مهار. نوارهای خطا نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 7. Dual culture interaction of biocontrol agents on the growth rate of *Rhizoctonia solani* on PDA at 25°C. Biological agents included *Pythium oligandrum* isolates (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO), commercial form of *P. oligandrum* (Polyversum, M1), *Clonostachys rosea* (CYS), *Fusarium oxysporum* (Fo47) and *Trichoderma asperellum* (T34). Path= pathogen without biocontrol agent. Error bars represent the 95% confidence interval.



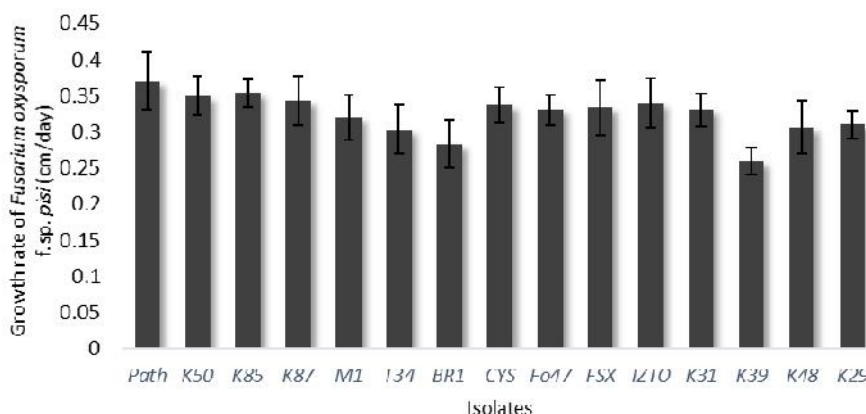
شکل ۸- اثر عوامل زیست‌مهار بر میزان رشد رویشی *Fusarium solani* در محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی-آگار در ۲۵ درجه‌ سلسیوس. عوامل زیست‌مهار شامل جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO) و فرم تجاری *P. oligandrum* (Polyversum, M1)، *Fusarium oxysporum* (Fo47) و *Clonostachys rosea* (CYS)، *Trichoderma asperellum* (T34) بود. Path= شاهد فاقد عامل زیست‌مهار. نوارهای خطا نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 8. Dual culture interaction of biocontrol agents on the growth rate of *Fusarium solani* on PDA at 25°C. Biological agents included *Pythium oligandrum* isolates (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO), commercial form of *P. oligandrum* (Polyversum, M1), *Clonostachys rosea* (CYS), *Fusarium oxysporum* (Fo47) and *Trichoderma asperellum* (T34). Path= pathogen without biocontrol agent. Error bars represent the 95% confidence interval.



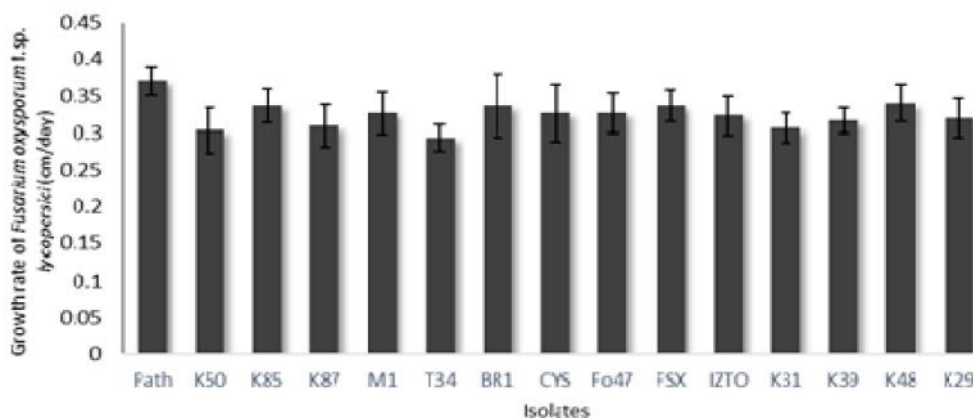
شکل ۹- اثر عوامل زیست‌مهار بر میزان رشد رویشی *Fusarium redolens* در محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی-آگار در ۲۵ درجه‌ سلسیوس. عوامل زیست‌مهار شامل جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO) و فرم تجاری *P. oligandrum* (Polyversum, M1)، *Fusarium oxysporum* (Fo47) و *Clonostachys rosea* (CYS)، *Trichoderma asperellum* (T34) بود. Path= شاهد فاقد عامل زیست‌مهار. نوارهای خطا نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 9. Dual culture interaction of biocontrol agents on the growth rate of *Fusarium redolens* on PDA at 25°C. Biological agents included *Pythium oligandrum* isolates (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO), commercial form of *P. oligandrum* (Polyversum, M1), *Clonostachys rosea* (CYS), *Fusarium oxysporum* (Fo47) and *Trichoderma asperellum* (T34). Path= pathogen without biocontrol agent. Error bars represent the 95% confidence interval.



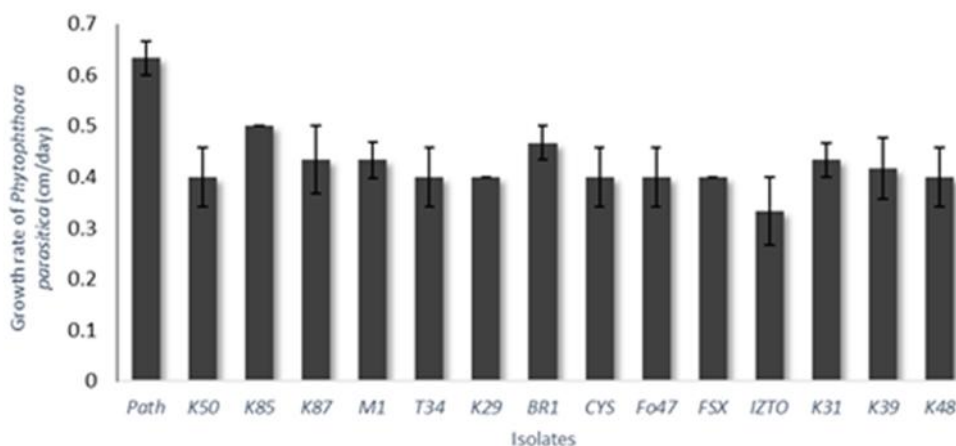
شکل ۱۰- اثر عوامل زیست‌مهار بر میزان رشد رویشی *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi در محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی-آگار در ۲۵ درجهٔ سلسیوس. عوامل زیست‌مهار شامل جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 و IZTO)، فرم تجاری *P. oligandrum* (Polyversum, M1)، *Clonostachys rosea* (CYS)، *Fusarium oxysporum* (Fo47) و *Trichoderma asperellum* (T34) بود. Path= شاهد فاقد عامل زیست‌مهار. نوارهای خطا نشان دهنده فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 10. Dual culture interaction of biocontrol agents on the growth rate of *Fusarium oxysporum* f.sp. pisi on PDA at 25°C. Biological agents included *Pythium oligandrum* isolates (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO), commercial form of *P. oligandrum* (Polyversum, M1), *Clonostachys rosea* (CYS), *Fusarium oxysporum* (Fo47) and *Trichoderma asperellum* (T34). Path= pathogen without biocontrol agent. Error bars represent the 95% confidence interval.



شکل ۱۱- اثر عوامل زیست‌مهار بر میزان رشد رویشی *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici در محیط کشت عصارهٔ سیب‌زمینی-آگار در ۲۵ درجهٔ سلسیوس. عوامل زیست‌مهار شامل جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 و IZTO)، فرم تجاری *P. oligandrum* (Polyversum, M1)، *Clonostachys rosea* (CYS)، *Fusarium oxysporum* (Fo47) و *Trichoderma asperellum* (T34) بود. Path= شاهد فاقد عامل زیست‌مهار. نوارهای خطا نشان دهنده فاصلهٔ اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 11. Dual culture interaction of biocontrol agents on the growth rate of *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici on PDA at 25°C. Biological agents included *Pythium oligandrum* isolates (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO), commercial form of *P. oligandrum* (Polyversum, M1), *Clonostachys rosea* (CYS), *Fusarium oxysporum* (Fo47) and *Trichoderma asperellum* (T34). Path= pathogen without biocontrol agent. Error bars represent the 95% confidence interval.



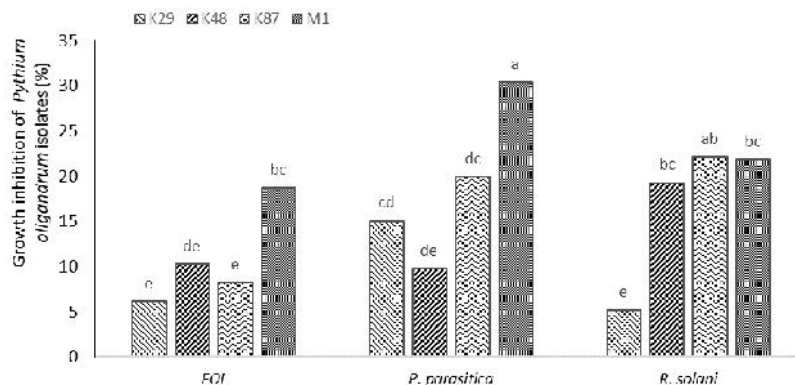
شکل ۱۲- اثر عوامل زیست‌مهار بر میزان رشد رویشی *Phytophthora parasitica* در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-آگار در ۲۵ درجه سلسیوس. عوامل زیست‌مهار شامل جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 و IZTO)، فرم تجاری *P. oligandrum* (Polyversum, M1)، *Clonostachys rosea* (CYS)، *Fusarium oxysporum* (Fo47) و *Trichoderma asperellum* (T34) بود. Path= شاهد فاقد عامل زیست‌مهار. نوارهای خطا نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵ درصد است.

Fig. 12. Dual culture interaction of biocontrol agents on the growth rate of *Phytophthora parasitica* on PDA at 25°C. Biological agents included *Pythium oligandrum* isolates (K29, K31, K48, K50, K85, K87, FSX, BR1 and IZTO), commercial form of *P. oligandrum* (Polyversum, M1), *Clonostachys rosea* (CYS), *Fusarium oxysporum* (Fo47) and *Trichoderma asperellum* (T34). Path= pathogen without biocontrol agent. Error bars represent the 95% confidence interval.

قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* بیشترین درصد بازدارندگی از رشد مربوط به سویه تجاری M1 بود. در حالی که بین جدایه‌های *P. oligandrum*، اختلاف معنی‌داری در میزان بازدارندگی از رشد پرگنه‌ی بیمارگر مشاهده نشد. همچنین بیشترین میزان اثر کنترلی ترکیبات فرار روی *P. parasitica* در سویه تجاری M1 مشاهده شد. اما جدایه‌های *P. oligandrum* عملکرد یکسانی روی این بیمارگر نشان دادند. به طور کلی مقایسه اثر کنترلی ترکیبات فرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی قارچ‌های بیمارگر نشان داد که این جدایه‌ها در برابر *P. parasitica* و *R. solani* عملکرد بهتری داشتند.

### تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی بیمارگرهای گیاهی خاک‌برد

اثر ترکیبات فرار جدایه‌های *P. oligandrum* به روش تشتک پتری معکوس، روی میزان رشد بیمارگرهای *R. solani* و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* در بررسی اثر جدایه‌های *P. oligandrum* روی *R. solani*، آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح پنج درصد نشان داد که بین جدایه‌های K48، K87 و سویه تجاری M1 اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. کمترین میزان بازدارندگی در جدایه‌ی K29 روی *R. solani* مشاهده گردید. در مورد



شکل ۱۳- درصد بازدارندگی از رشد ترکیبات فرار جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K48, K87 و M1) روی

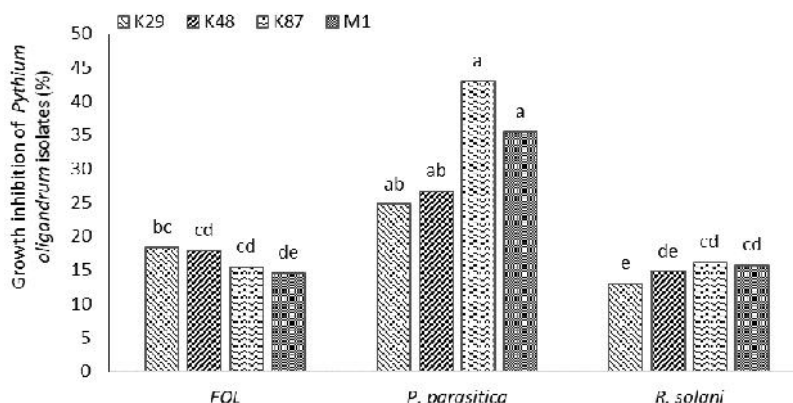
بیمارگرهای *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora parasitica*، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL)

Fig.13. The percentage of the growth inhibition of volatile compounds of *Pythium oligandrum* isolates (K29, K48, K87 and M1) on plant pathogens including *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *Phytophthora parasitica* and *Rhizoctonia solani*.

و سویه تجاری M1 روی قارچ‌های *F. oxysporum* f. sp. از نظر میزان بازدارندگی *P. parasitica* و *lycopersici* تفاوتی مشاهده نشد. در این آزمون مقایسه کلی اثر کنترلی ترکیبات غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی قارچ‌های بیمارگر نشان داد که این جدایه‌ها در برهمکنش با *P. parasitica* عملکرد بهتری نسبت به سایر بیمارگرهای مورد آزمون داشتند.

### تأثیر ترکیبات غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی بیمارگرهای گیاهی خاک‌برد

ارزیابی اثر ترکیبات غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* نشان داد که رشد شعاعی پرگنه در عوامل بیمارگر به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۱۴). واکاوی آماری داده‌ها نشان می‌دهد که جدایه‌های K48، K87 و سویه تجاری M1 اثر بازدارندگی یکسانی روی *R. solani* داشتند. در حالی که بین جدایه‌های *P. oligandrum*



شکل ۱۴- درصد بازدارندگی از رشد ترکیبات غیرفرار جدایه‌های *Pythium oligandrum* (K29, K48, K87 و M1) روی

بیمارگرهای *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora parasitica*، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL)

Fig. 14. The percentage growth inhibition of non-volatile compounds of *Pythium oligandrum* isolates (K29, K48, K87 and M1) on plant pathogens including *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), *Phytophthora parasitica* and *Rhizoctonia solani*.



## بحث

در بررسی Vesely (1978) مشاهده شده که جدایه‌هایی از *P. oligandrum* در شرایط آزمایشگاهی در محدوده‌ی دمایی بین پنج تا ۳۰ درجه سلسیوس در مهار زیستی مؤثر بودند. بنابراین شناسایی و انتخاب جدایه‌هایی که در دماهای پایین‌تر سازگار هستند می‌تواند در آزمون‌های غربال‌گری مؤثر باشد. با این حال در مناطق گرمی مانند ایران استفاده از جدایه‌هایی با دمای بهینه بالا کاربرد بیشتری خواهد داشت و اهمیت جدایه‌های بومی به دست آمده را نشان می‌دهد. گرچه در تعداد معدودی از جدایه‌های ایرانی دمای بهینه رشد حدود ۲۷ درجه سلسیوس بود، این دما برای اکثر جدایه‌های ایرانی *P. oligandrum* ۲۹ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد که نزدیک به دمای بهینه ۳۰ درجه سلسیوس در سایر گزارش‌هاست (van der Plaäts–Niterink, 1981; McQuilken *et al.*, 1992). از طرف دیگر در مناطق سردتر اُسپوره‌های این گروه از جدایه‌های *P. oligandrum* را می‌توان در طول فصول گرم به عنوان عامل زیست‌مهار به کار برد (AL–Rawahi & Hancock, 1998). همچنین جدایه‌های با دمای بهینه پایین را می‌توان در مناطقی با دمای میانگین پایین برای کاربرد به عنوان عامل زیست‌مهار مورد ارزیابی قرار داد.

در بررسی به عمل آمده قابلیت جدایه‌های *P. oligandrum* در برهمکنش با عوامل بیمارگر متفاوت ارزیابی گردید. به طوری که جدایه‌های *P. oligandrum* روی *R. solani* عملکرد مناسبی نشان دادند اما روی *F. oxysporum* f. sp. *pisi* و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* اثر قابل توجهی مشاهده نشد. این نتایج در مورد دیگر عوامل زیست‌مهار مانند تریکودرما نیز دیده می‌شود که میزان فعالیت مهار زیستی هر جدایه در برابر بیمارگرهای مختلف متفاوت است (Dubey & Soroush, 2006). در بررسی جدایه‌های *P. oligandrum* بیشترین بازدارندگی از رشد در برهمکنش با *R. solani* و *P. parasitica* مشاهده شد. در تماس بین *P. oligandrum* و *R. solani* رشد ریشه متوقف شد و در محل تماس تراکم ریشه قارچ *R. solani* کاهش یافت. در مطالعه مشابه، بررسی اثر جدایه‌های *Trichoderma harzianum* Rifai

در این پژوهش جدایه‌هایی از *P. oligandrum* از مناطق مختلف ایران جداسازی و شناسایی شدند. نتایج به دست آمده از آغازگرهای طراحی شده با نتایج بررسی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای سایر ژن‌ها مطابقت داشت. با توجه به این که ژن الیگاندرین به صورت انحصاری در تبار D از گونه‌های پیثیوم فقط در گونه *P. oligandrum* وجود دارد، استفاده از آغازگرهای مبتنی بر این ژن نسبت به مناطقی مانند آی‌تی‌اس که دارای تکامل همگرا هستند، ارجحیت دارد (Villa *et al.*, 2006; Hyde *et al.*, 2014).

نتایج به دست آمده نشان داد که پراکنش و فراوانی جدایه‌های این گونه در مناطق مختلف ایران متفاوت است. به نظر می‌رسد که میزان بازیابی این گونه در همه‌ی استان‌ها یک‌سان نیست و بیشترین فراوانی جدایه‌ها در استان کرمانشاه مشاهده شده است. با این حال گرچه نمونه‌برداری در استان‌های اصفهان و همدان منجر به یافتن این گونه نشد، اما با توجه به نتایج سایر استان‌ها در این پژوهش و پایین بودن فراوانی این گونه در نمونه‌برداری‌های سایر پژوهش‌های مشابه (Mostowfizadeh–Ghalamfarsa & Banihashemi, 2005) نمونه‌برداری، ممکن است بتوان در نمونه‌برداری‌های آتی این گونه را، هرچند در فراوانی کم، بازیابی کرد.

با توجه به داده‌ها، میزان متوسط رشد جدایه‌ها در دماهای مختلف یک‌سان نبود. همچنین برخی جدایه‌ها نسبت به متوسط کل، دمای بیشینه، کمینه یا بهینه متفاوتی داشتند. جدایه‌های *P. oligandrum* حداکثر قادر به رشد در ۳۷ درجه سلسیوس بودند اما در ۴۰ درجه سلسیوس رشد نمی‌کردند که این یافته‌ها با گزارش‌های پیشین در مورد این گونه مطابقت دارد (van der Plaäts–Niterink, 1981). با این حال زمان انتقال جدایه‌ها از ۴۰ درجه سلسیوس به دمای اتاق، مجدداً رشد کردند. بنابراین دمای ۴۰ درجه سلسیوس، دمای کشنده برای جدایه‌ها محسوب نمی‌شود و افزایش دما تا این دما فقط موجب توقف رشد رویشی می‌گردد.

می‌شود. مدت زمان رسیدن و برقراری تماس بین *P. oligandrum* و *R. solani* دو روز به طول می‌انجامد. در مورد *R. solani* و *T. harzianum* نیز همین مدت زمان مشاهده شده است (Barari & Dalili, 2017). اولین تماس از طریق تشکیل حلقه به دور ریشه *R. solani* ایجاد می‌شود. این تماس منجر به انعقاد سیتوپلاسمی ریشه‌های *R. solani* و به دنبال آن رخنه *P. oligandrum* در ریشه‌ی بیمارگر می‌گردد (Ikea et al., 2012). نفوذ *P. oligandrum* به درون سلول‌های میزبان موجب تخریب کامل سیتوپلاسم سلول‌های آن می‌شود، که این تخریب در نهایت با مرگ میزبان همراه است (Benhamou et al., 1997, 1999). نتایج مشابه در برهمکنش *P. oligandrum* با دیگر گونه‌های پیتوم مانند *P. ultimum* نیز مشاهده می‌شود (Abdelzاهر et al., 1997). این روابط می‌تواند در شرایط طبیعی و در خاک موجب کاهش جمعیت بیمارگر و غالب شدن عامل زیست‌مهار گردد.

بررسی ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* اثر معنی‌داری روی بازدارندگی از رشد بیمارگرهای مورد مطالعه نشان داد. نتایج نشان داد که درصد بازدارندگی با توجه به نوع جدایه‌ی زیست‌مهار و قارچ بیمارگر متفاوت است. در آزمون ترکیبات فرار و غیرفرار، مقایسه جدایه‌های مورد مطالعه با سویه تجاری M1 نشان داد که اثر کنترلی مشابهی روی بیمارگرها دارند. به طوری که در بیمارگر *R. solani* اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های K48، K87 و سویه تجاری M1 مشاهده نگردید. در بررسی مشابه، اثر *P. oligandrum* روی شبه‌قارچ *Phytophthora megasperma* Drechsler نشان داد که تحت شرایط مهار زیستی بدون تجزیه دیواره سلولی و با فاصله از *P. oligandrum* ریخت‌شناسی ریشه‌های این شبه‌قارچ تغییر می‌کند و ریشه‌ها تحلیل می‌روند (Benhamou et al., 1999). همچنین تولید ترکیبات فرار در *P. oligandrum* موجب کاهش رشد دو بیمارگر *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum و *Mycosphaerella pinodes* Berk. & A. Bloxam در نخودفرنگی شد (Rey et al., 2008). اثر ترکیبات فرار و

روی *R. solani* نشان داد که این جدایه‌ها پس از متوقف کردن رشد ریشه‌ای، موجب کلنیزه کردن کامل پرگنه *R. solani* می‌شوند؛ و در نهایت ریشه قارچ نازک و متلاشی می‌گردد (Shahiri-Tabarestani et al., 2005).

در این مطالعه، اثر دیگر عوامل زیست‌مهار نیز با اثر جدایه‌های *P. oligandrum* مقایسه شد. قارچ‌های *C. rosea* و سویه Fo47 از *F. oxysporum* در برابر *F. redolens* بازدارندگی بهتری نسبت به سایر عوامل زیست‌مهار نشان دادند. در حالی که در برهمکنش با سایر عوامل بیمارگر اختلاف معنی‌داری بین این عوامل و جدایه‌های *P. oligandrum* مشاهده نشد. اثر متقابل سویه Fo47 از *F. oxysporum* در برابر بیمارگرهای گیاهی مانند *P. ultimum* با بازدارندگی مستقیم از طریق ترکیب پادزیستی و قارچ‌انگلی مشاهده می‌شود (Thongkamngam & Jaenaksorn, 2017). با این حال این قارچ زیست‌مهار عمدتاً از طریق پادزیستی عمل می‌کند. لمانسو (Lemanceau, 1993) نشان داد که این الگو بین سویه بیمارگر *F. oxysporum* و سویه غیربیمارگر Fo47 نیز اتفاق می‌افتد. همچنین در برهمکنش فرم تجاری گونه *T. asperellum* با عوامل بیمارگر مورد بررسی اختلاف معنی‌داری بین این گونه و جدایه‌های *P. oligandrum* مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که عملکرد عوامل زیست‌مهار و سازوکارهای آن‌ها در برابر بیمارگرها با یکدیگر متفاوت است.

در روش اثر متقابل، مهار بیمارگر می‌تواند به دلیل تفاوت جدایه‌های *P. oligandrum* با عوامل بیمارگر در سرعت رشد و حرکت روی محیط کشت و برخورد سریع‌تر با ریشه‌های بیمارگر باشد. به طوری که جدایه‌های *P. oligandrum* بدون حضور بیمارگر در مدت دو روز سطح تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA را می‌پوشانند. بنابراین سرعت رشد بالا موجب برخورد سریع ریشه *P. oligandrum* با ریشه‌ی بیمارگر شده و مانع از رشد آن می‌شود (Farrokhi et al., 2014). مشاهدات ما نشان داد که در برهمکنش *R. solani* و *P. oligandrum*، رشد سریع پرگنه *P. oligandrum* موجب محدود شدن بیمارگر

قارچ میزبان متفاوت بودند. به طوری که جدایه K87 در آزمونهای ترکیبات فرار و غیرفرار، عملکرد بهتری نسبت به جدایه‌های دیگر *P. oligandrum* نشان داد. با این حال در بررسی اثر متقابل، تفاوت معنی‌داری با سایر جدایه‌های *P. oligandrum* مشاهده نشد. می‌توان چنین استنباط کرد که جدایه‌های مختلف ممکن است در یک یا چند سازوکار زیست‌مهار قوی عمل کنند؛ در حالی که در سازوکارهای دیگر ضعیف هستند.

مطالعات زیادی روی کارایی و نحوه‌ی عمل گونه *P. oligandrum* در برابر بیمارگرهای گیاهی و سازوکارهای دخیل در مهار زیستی آن انجام گرفته است (Gerbore et al., 2014; Yacoub et al., 2016, 2018). این مطالعات نشان می‌دهند که *P. oligandrum* عملکرد متفاوتی در برابر بیمارگرهای مختلف نشان می‌دهد. این حالت به تنوع سازوکارهای این گونه مربوط می‌شود. نتایج تحقیق حاضر علاوه بر نشان دادن تنوع کارکردی جدایه‌های بومی *P. oligandrum* نقش آن‌ها را در مهار بیمارگرهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی، موفقیت‌آمیز نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان عملکرد آن دسته از جدایه‌ها را که پتانسیل بازدارندگی قابل توجه روی بیمارگرهای مختلف داشته و دارای دمای بهینه مناسب هستند، در قالب آزمایش‌های گلخانه‌ای و در مزرعه مورد ارزیابی قرار داد. همچنین بررسی روند تولید ترکیبات فرار و غیرفرار در مراحل رشدی جدایه‌های *P. oligandrum* و شناسایی این ترکیبات با استفاده از روش طیف‌سنجی جرمی (Mass spectrometry) می‌تواند به شناسایی دقیق سازوکارهای مهار زیستی و غربال کردن جدایه‌های *P. oligandrum* به منظور انتخاب جدایه‌های مناسب برای فرمول‌بندی و تولید فرم تجاری این زیست‌مهار کمک کند.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، طبق طرح شماره ۹۶۰۰۸۱۹۱ انجام گرفته است.

غیرفرار جدایه‌های *P. oligandrum* روی شبه‌قارچ *P. aphanidermatum* نیز در مطالعه حاضر انجام شد (داده‌ها نشان داده نشده است) در این آزمایش نتایج نشان داد که هیچ کدام از جدایه‌ها اثر معنی‌داری روی این بیمارگر نداشتند. با این حال در آزمون ترکیبات فرار رشد ریشه‌های هوایی این شبه قارچ نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده بود بدون این که تغییری در میزان رشد پرگنه آن دیده شود. بنابراین اثر ترکیبات فرار و غیرفرار می‌تواند نقش مهمی در مهار بیمارگرها به وسیله عوامل زیست‌مهار داشته باشد.

تولید ترکیبات فرار به عواملی مانند مرحله رشدی ریزجاندار، دما، مدت زمان نگهداری و در دسترس بودن مواد مغذی بستگی دارد (Schulz-Bohm et al., 2017). میزان تولید ترکیبات فرار و ضد قارچی با گذشت زمان و مسن تر شدن پرگنه قارچ افزایش یافته و بازدارندگی بیشتری مشاهده می‌شود. در مورد جدایه‌های *P. oligandrum* بیشترین اثر بازدارندگی در روز دوم رشد مشاهده می‌شود که ممکن است به دلیل بیشترین مقدار تولید مواد فرار در زمان رشد رویشی *P. oligandrum* باشد. با شروع رشد زایشی قارچ تولید ترکیبات فرار کاهش می‌یابد. این ترکیبات نقش مهمی در بازدارندگی رشد بیمارگر دارند و یک سازوکار مهم به شمار می‌روند به عنوان مثال بدون تماس مستقیم بین سویه‌ها، ترکیبات فرار عامل زیست‌مهار قارچ *F. oxysporum* موجب بازدارندگی رشد سویه بیمارگر *F. oxysporum* می‌شود (Morath et al., 2012).

در مطالعه حاضر، کشت متقابل جدایه‌های *P. oligandrum* با عوامل بیمارگر موجب کاهش رشد بیمارگرها گردید. این بررسی نشان داد که جدایه‌های *P. oligandrum* می‌توانند روی مهار بیمارگرهای مختلف مربوط به شاخه‌های مختلف قارچی تأثیرگذار باشند. ارزیابی ترکیبات ضد میکروبی جدایه‌های *P. oligandrum* نیز نشان داد که ترکیبات فرار و غیرفرار موجب بازدارندگی رشد پرگنه بیمارگر می‌شوند و احتمالاً نقش مهمی در مهار زیستی دارند. جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* از نظر توانایی تولید ترکیبات فرار و غیرفرار و ممانعت از رشد

## References

- Abad, P., Zafari, D. & Mirabolfathi, M. 2011. Identification of four new species of *Pythium* in Hamedan Province. Journal of Research in Plant Pathology, 1: 77–98. (In Persian with English summary)
- Abdelzaher, H.M., Elnaghy, M.A. & Fadl–Allah, E.M. 1997. Isolation of *Pythium oligandrum* from Egyptian soil and its mycoparasitic effect on *Pythium ultimum* var. *ultimum* the damping-off organism of wheat. Mycopathologia, 139: 97–106.
- Alabouvette, C., Olivain, C. & Steinberg, C. 2006. Biological control of plant diseases: The European situation. European Journal of Plant Pathology, 114: 329–341.
- Babai–Ahary, A., Abrinnia, M. & Heravan, I.M. 2004. Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off in sugar beet in northwest Iran. Australasian Plant Pathology, 33: 343–347.
- Banihashemi, Z., MacDonald, J.D. & Stite, J. 1992. Combine baiting and ELISA to detect and quantify *Phytophthora* spp. in container media. Phytopathology, 82: 1101.
- Barari, H. & Dalili, A. 2016. Antagonistic effects of *Trichoderma* spp. in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and in comparison with chemical fungicides. Journal Management System, 4: 13–26. (In Persian with English summary)
- Benhamou, N., Rey, P., Chérif, M., Hockenull, J. & Tirilly, Y. 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology, 87: 108–122.
- Benhamou, N., Bélanger, R.R., Rey, P. & Tirilly, Y. 2001. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. Plant Physiology and Biochemistry, 39: 681–696.
- Benhamou, N., Le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., & Rey, P. (2012). *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. Microbiology, 158: 2679–2694.
- Benhamou, N., Rey, P., Picard, K. & Tirilly, Y. 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soil-borne plant pathogens. Phytopathology, 89: 506–517.
- Berger, H., Yacoub, A., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., Sessitsch, A. & Compant, S. 2016. Draft genome sequence of biocontrol agent *Pythium oligandrum* strain Po37, an oomycota. Genome Announcement, 4: 215–216.
- Brožová, J.A.N.A. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. Plant Protection Science, 38: 29–35.
- Chang, H.S. 1988. *Phytophthora* species associated with strawberry fruit rot in Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica (Taipei), 29: 61–67.
- Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II, producing of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57: 41–47.
- Dick, M.W. 1990. Keys to *Pythium*. University of Reading, Reading, UK.
- Drechsler, C. 1930. Some new species of *Pythium*. Journal of the Washington Academy of Sciences, 20: 398–418.
- Dubey, S.C. & Suresh, M. 2006. Randomly amplified polymorphic DNA markers for *Trichoderma* species and antagonism against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. Journal of phytopathology, 154: 663–669.
- Farrokhi, F., Hajian Shahri, M., Salari, M. & Rohani, H. 2014. Evaluation of different antagonistic aspects of *Pythium oligandrum* in biological control of *Rhizoctonia solani* causing sugar beet seedling disease in laboratory. Plant Disease Research, 2: 51–70. (In Persian with English summary)
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault–Roger, C., & Rey, P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. Environmental Science and Pollution Research, 21: 4847–4860.
- Hsieh, H.J., & Chang, H.S. 1976. Five species of *Pythium*, two species of *Pythiogeton* new for Taiwan and *Pythium afertile*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 17: 141–150.
- Hyde, K.D., Nilsson, R.H., Alias, S.A., Ariyawansa, H.A., Blair, J.E., Cai, L. & Gorczak, M. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). Fungal Diversity, 67: 21–125.
- Ikeda, S., Shimizu, A., Shimizu, M., Takahashi, H. & Takenaka, S. 2012. Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*. Biological Control, 60: 297–304.
- Jeffers, S.N. & Martin, S.B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease, 70: 1035–1043.
- Le Floch, G., Rey, P., Déniel, F., Benhamou, N., Picard, K. & Tirilly, Y. 2003. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. Agronomie, 23: 455–460.

- Le Floch, G., Tambong, J., Vallance, J., Tirilly, Y., Lévesque, A. & Rey, P. 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 61: 317–326.
- Masunaka, A., Sekiguchi, H., Takahashi, H. & Takenaka, S. 2010. Distribution and expression of elicitor-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology*, 158: 417–426.
- McQuilken, M.P., Whipps, J.M. & Cooke, R.C. 1990. Oospores of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* bulk-produced in liquid culture. *Mycological Research*, 94: 613–616.
- McQuilken, M. P., Whipps, J.M. & Cooke, R.C. 1992. Use of Oospore formulations of *Pythium oligandrum* for biological control of *Pythium* damping-off in cress. *Journal of Phytopathology*, 135: 125–134.
- Meszka, B. & Bielenin, A. 2010. Polyversum WP a new biological product against strawberry grey mould. *Phytopathologia*, 58: 13–19.
- Mohammadi, S. Mansoori, B. & Zamanizadeh, H.R. 2009. Antagonistic mechanisms of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of chickpea wet root rot disease. *Plant Protection Journal*, 1: 71–85. (In Persian with English summary)
- Morath, S.U., Hung, R. & Bennett, J.W. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26: 73–83.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., & Banihashemi, Z. 2005. Identification of soil *Pythium* species in Fars province of Iran. *Iranian Journal of Science and Technology*, 29: 79–87.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 103–133.
- Rey, P., Le Floch, G., Benhamou, N. & Tirilly, Y. 2008. *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. *Plant-microbe interactions* pp. 43–67. Edited by E. Ait-Barka & C. Cle´ment. India: Research Signpost.
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L. & Garbeva, P. 2017. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2484.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* pp. 365–386, Humana Press, Totowa, NJ.
- Shahiri Tabarestani, M., Falahati Rastgar, M., Jafarpour Brojeni, M. & Rouhani, H. 2005. Investigation on biological control of sugar beet damping-off disease by some isolates of *Trichoderma harizanum* Rifai. *Journal of Sugar Beet*, 21: 57–75. (In Persian with English summary)
- Salmaninezhad, F. and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2019. Three new *Pythium* species from rice paddy fields. *Mycologia*, 111: 274–290.
- Singleton, L.L., Mihail, J.D. & Rush, C.M. 1992. *Methods for research on soil-borne phytopathogenic fungi*. APS Press., St. Paul, Minnesota, USA.
- Tuit, J. 1969. *Plant pathological methods*. USA: Burgess Publishing Co.
- van der Plaats-Niterink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*. No. 21. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Vasseur, V., Rey, P., Bellanger, E., Brygoo, Y. & Tirilly, Y. 2005. Molecular characterization of *Pythium* group F isolates by ribosomal- and intermicrosatellite-DNA regions analysis. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 301–310.
- Vesely, D. 1978. Studies of the mycoparasitism in rhizosphere of emerging sugar-beet. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 133: 195–200.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T. & Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITA rDNA, cytochrome oxidase II and  $\alpha$ -tubuline gene sequences. *Mycologia*, 98:410–422.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M. C., Corio-Costet, M.F., Guyoneaud, R. & Rey, P. 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological Control*, 92: 7–16.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Haidar, R., Compant, S. & Rey, P. 2018. Transcriptional analysis of the interaction between the oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, and the roots of *Vitis vinifera* L. *Biological Control*, 120: 26–35.

## Identification, distribution and functional diversity of Iranian isolates of *Pythium oligandrum*

Zeinab Haghi, Reza Mostowfizadeh–Ghalamfarsa, Habiballah Hamzehzarghani

Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Corresponding author: Reza Mostowfizadeh–Ghalamfarsa, rmostofi@shirazu.ac.ir

Received: May, 30, 2020

7(2) 91-112

Accepted: Sept., 06, 2020

### Abstract

*Pythium oligandrum* is known as an important biological agent against plant pathogens. Isolates from different regions of Iran including Bushehr, Bakhtiari, Chaharmahal, Fars, Golestan, Ilam, Kermanshah, Kerman, West Azerbaijan and Yazd were identified based on morphological and molecular characteristics. The highest recovering frequency of isolates was observed in Kermanshah and Fars provinces. The functional diversity of isolates based on their growth temperature and biological control effect under laboratory conditions was evaluated. The antagonistic effects of native *P. oligandrum* isolates were evaluated against soil-borne fungal pathogens including *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *pisi* using nonparametric statistics, and compared with commercial products of various biocontrol agents such as *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum*, *P. oligandrum* and *Trichoderma* spp. The native isolates of *P. oligandrum* were diverse in their growth temperature and biocontrol activities. The highest mycelial growth inhibition was found in the interaction between *P. oligandrum* isolates and *R. solani*. A significant difference between *P. oligandrum* isolates was found by evaluating their volatile compounds. The isolates of *P. oligandrum* showed maximum inhibition on *P. parasitica* and *R. solani* and minimum inhibition on *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The non-volatile compounds had the highest significant effect on *P. parasitica* as well. The result of this study showed that the growth characteristics and the *in vitro* biocontrol ability of the native isolates of *P. oligandrum* on various plant pathogens were different. This variety can be employed in biochemical and greenhouse screening of the isolates.

**Keywords:** biological control, diversity, mechanisms, *Oomycota*, soil-borne plant pathogens