فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال دوم، شماره سوم، بهار ۱۳۹۳
صص ۷۰-۵۱

ارزیابی جنبه های مختلف آنتاگونیستی *Pythium oligandrum* درکنترل بیولوژیک *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند در آزمایشگاه

فریبرز فرخی[۱]، محمد حاجیان شهری*[۲]، محمد سالاری[۳]، حمید روحانی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۹

چکیده

چغندرقند، از مهم ترین محصولات زراعی ایران است و بیماری های مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه ناشی از *R. solani* از مهمترین علل کاهش عملکرد چغندرقند، می باشند. در این تحقیق جنبه های مختلف آنتاگونیستی ۶ جدایه از *P. oligandrum*در کنترل *R. solani* با روش های آزمایشگاهی شامل بررسی های میکروسکوپی نحوه ارتباط هیفی، رقابت غذایی، اثر متابولیت های گازی فرار، اثر ترشحات مایع خارج سلولی در محیط کشت مصنوعی، خاک و وجود متابولیت های ضد قارچی مقاوم به حرارت در محیط کشت مصنوعی ارزیابی شدند. در بررسی های میکروسکوپی رفتار هیف *P. oligandrum* به شکل پیچیدن به دور هیف، چروکیدگی و جداشدن پروتوپلاست از دیواره سلولی، تشکیل اووسپور بر روی و داخل هیف *R. solani* دیده شد. در سایر آزمایش ها، جدایه های تربت جام و مشهد آنتاگونیست بیشترین قابلیت رقابت غذایی با *R. solani* را در محیط کشت داشتند و متابولیت های گازی فرار کلونی ۳۶ ساعته جدایه تربت جام آنتاگونیست با۵۶/۴۱ درصد بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *R. solani* داشت. بررسی کارایی ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* در ممانعت از رشد میسلیوم *R. solani* در محیط کشت نشان داد جدایه مشهد با۷۱/۳۱درصد بیشترین بازدارندگی از رشد *R. solani* و غلظت های۳۰٪، ۴۰٪ و۵۰٪ ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تربت جام بیشترین اثر بازدارندگی از رشد *R. solani* را در محیط کشت داشتند. در بررسی کارایی ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* در ممانعت از رشد میسلیوم *R. solani* در خاک مشخص شد، تیماری که خاک مورد استفاده در آن تنها با اینوکولوم *P. oligandrum* آلوده شده بود با ۳۲/۰۹ درصد بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *R. solani* داشت. همچنین جدایه تربت جام، با ۷۱/۳۶ درصد بیشترین بازدارندگی از رشد *R. solani* را در آزمون مقایسه توانایی تولید متابولیت های ضد قارچی مقاوم به حرارت در محیط کشت، را داشت.

کلمات کلیدی: کنترل بیولوژیک، چغندرقند، *R. solani* و *P. oligandrum*

---

[۱]- عضو هیات علمی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
[۲]- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
[۳]- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران.
[۴]- استاد گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: mhag52570@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

چغندرقند، به دلیل استفاده در صنعت قند و شکر و شرایط آب و هوایی مناسب کاشت آن، یکی از محصولات زراعی مهم در ایران به شمار می رود. از مهمترین علل کاهش عملکرد چغندرقند، حمله آفات، بیماری های گیاهی و علفهای هرز می‌باشد. بیماری مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه، و سوختگی برگ از جمله بیماری هایی است که توسط *R. solani* (Kohn) ایجاد می‌شود (Gray and Gerick,1998; Goltappeh *et al.*, 1999). اگرچه در بین روشهای کنترل بیماری‌های گیاهی، کنترل زراعی، فیزیکی و به خصوص شیمیایی از اهمیت غیرقابل انکاری برخوردارند اما متاسفانه روش مبارزه شیمیایی برای مبارزه با قارچهای خاکزی بخصوص *R. solani* به صورت ضدعفونی بذر چغندرقند خیلی موثر نیست (Olaya and Abawi, 1994) و سالهاست که به دلیل زیان‌آور بودن سموم برای انسان، جانوران و گیاهان، محققین به دنبال یافتن راهی مناسب، ارزانتر و با خطر کمتر برای اکوسیستم می‌باشند. از جمله روشهای نوینی که می تواند برای کنترل عوامل بیماری زای گیاهی مورد توجه قرارگیرد، روش مبارزه بیولوژیک است که در کنار روش هایی مانند به زراعی و تولید ارقام مقاوم یکی از ارکان کنترل تلفیقی عوامل بیماریزای گیاهی به حساب می‌آید (Jacobsen *et al*., 1999; Paulitz and Belanger, 2001). *P. oligandrum* روی بسیاری از گونه های قارچی فعالیت مایکوپارازیتی دارد (Plaats-Nitherink, 1981) و می تواند به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار گیرد (Brozova, 2002). گزارش های فراوانی از تاثیر این مایکوپارازیت بر قارچ *Rhizoctonia* در محصولات مختلف از جمله چغندرقند وجود دارد (Vesely, 1977; Vesely and Hejdanek,1984; Vilgalys, 1988;). تحقیقات نشان داده است که *R. solani* در خاک نسبت به پارازیته شدن طبیعی توسط سایر میکروارگانیسم‌های خاک حساس است اما این عمل در طبیعت در حد پایینی اتفاق می افتد (Jacobsen *et al*.,1999). بوته میری ریزوکتونیایی از مهمترین بیماریهای چغندرقند در تمام مناطق چغندر کاری جهان می باشد و به شکل پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه و بوته میری باعث کاهش تراکم بوته های چغندرقند در مزرعه می‌گردد (Gray and Gerick,1998; Herr, 1976). طبق گزارش *بایرد و همکاران* (۱۹۹۳) اغلب جدایه های ریزوکتونیا که باعث بیماری مرگ گیاهچه و بوته میری میگردند از گروههای آناستوموزی AG4 یا AG2-2 می‌باشند. *کیونیک و جاکوبسون* (۲۰۰۱) در تلاش برای کنترل تلفیقی بیماری بوته میری چغندرقند ناشی از *R. solani* دریافتند که گروه آناستاموزی AG2-2 عامل اصلی پوسیدگی ریشه چغندرقند است در حالیکه گروه آناستوموزی AG4 بیشتر در مرگ گیاهچه نقش دارد. *هارمن و همکاران* (۲۰۰۰) و *لاتچمه و کوک* (۱۹۸۴) گروه آناستوموزی AG4 را مهمترین عامل مرگ گیاهچه و بوته میری در بین سایر گروههای آناستوموزی ریزوکتونیا می‌دانند. در ایران نیز برای اولین بار *حجارود و علیزاده* (۱۹۷۱) *R. solani* را، عامل بیماری پوسیدگی قهوه ای ریشه چغندرقند و *عباسی مقدم و همکاران* (۱۹۹۸) *R. solani* را عامل مهم پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند در استان خراسان معرفی کردند. *مومنی و همکاران* (۲۰۰۴) ضمن جمع آوری جدایه های *R. solani* از مزارع مختلف چغندرقند در سطح استان خراسان آنها را در دو گروه آناستوموزی قرار داده و نتیجه گرفتند گروه آناستوموزی *R. solani* (AG4) عامل مرگ گیاهچه و بوته میری چغندرقند بیش از *R. solani* (AG2-2) عامل پوسیدگی ریشه در این منطقه یافت می شود. *رهنما و کوک* (۱۳۷۷) نیز با مطالعه بیولوژی *P. ultimum* و قارچ مایکوپارازیت آن *P. oligandrum*، تخریب اندامهای رویشی *P. ultimum* توسط اپرسوریوم *P. oligandrum* را با میکروسکوپ الکترونی نشان دادند.

P. oligandrum قارچی خاکزی است که در شرایط مختلف آب و هوایی و در خاک های زراعی بخصوص در مناطق حاره ای و درکشورهایی مانند آفریقای جنوبی شمال استرالیا، هاوایی، آلمان و هلند به فراوانی یافت می شود (Brozova, 2002؛ Deacon, 1976؛ Plaats-Nitherink, 1981). با اینکه *P. oligandrum* یک قارچ ساپروفیت خاکزی است اما این توانایی را

Archive of SID

www.SID.ir

دارد که قارچ‌های زیادی را پارازیت کرده و روی هیف آنها زندگی کند (Deacon,1976؛ Plaats-Nitherink, 1981). در ایالات متحده آمریکا *P. oligandrum* اولین بار از بوته های نخود بیمار از ناحیه ادنا جداسازی شد و بعدها از خاک و گیاهان مختلف بسیاری از کشورها گزارش شد (Deacon, 1976؛ Plaats-Nitherink, 1981). *مک کوئیلکن و همکاران*(۱۹۹۰) با بررسی قارچ های رایزوسفر چغندرقند دریافتند که *P. oligandrum* یکی از اجزای رایزوسفر ریشه چغندرقند نیست و بایستی به روشی مناسب برای استفاده از توانایی آنتاگونیستی آن به خاک اضافه شود. *مارتین و هانکوک* (۱۹۸۷) گزارش کردند یک روز پس از کاشتن بذور تیمار شده چغندرقند با اووسپور *P. oligandrum* در خاک آلوده به *P.ultimum*، ۷۷٪ از بذور تیمار نشده و ۱۰٪ از بذرهای تیمار شده با اووسپور *P. oligandrum* توسط *P.ultimum* کلونیزه شدند. *ویپس و همکاران* (۱۹۹۳) نیز نتیجه گرفتند که بوته میری چغندرقند ناشی از *R.solani* با تیمار بذر چغندرقند با اووسپور *P. oligandrum* کاهش می‌یابد. آنها همچنین دریافتند که میزان بوته میری چغندرقند ناشی از *Aphenomyces cochlioides* و *P.ultimum* نیز توسط *P. oligandrum* کاهش می یابد. *وسلی و کوبوا* (۱۹۹۳) دریافتند تیمار بذور چغندرقند با استفاده از فرم تجاری *P. oligandrum* به نام پلی گاندرون بوته های سالم تری را بوجود می آورند و اثر پلی گاندرون بر کاهش بیماری بوته میری چغندرقند تقریباً برابر با تاثیر قارچکش تیرام در کنترل این بیماری می‌باشد.

به دلیل خساراتی که هر ساله بیماری مرگ گیاهچه و بوته میری چغندرقند ناشی از *R. solani* به محصول چغندرقند در کشورمان و مخصوصا در استان خراسان رضوی وارد می کند و به دلیل فقدان کارایی روشهای کنترل فعلی، انگیزه تحقیق در زمینه یافتن راه مناسب تری برای مبارزه با این بیماری بر اساس روش بیولوژیک بوجود آمد. از سوی دیگر با توجه به اینکه طبق مطالعات انجام شده در مزارع چغندرقند استان خراسان رضوی، سهم گروه آناستوموزی AG4 بیش از سایر گروه های آناستوموزی ریزوکتونیا در بروز بیماری بوته میری و مرگ گیاهچه، است (Momeni *et al*., 2004) لذا در این تحقیق امکان کنترل این گروه آناستوموزی *R. solani* توسط جنبه های مختلف آنتاگونیستی قارچ *P. oligandrum* در شرایط مختلف آزمایشگاهی بررسی گردید.

مواد و روشها

تهیه جدایه *Rhizoctonia solani* (AG4)

جدایه *Rhizoctonia solani* (AG4) مورد استفاده در این تحقیق از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند تهیه و خالص سازی مجدد آن بر اساس روش نوک ریسه انجام شد (Onkar and James, 1995).

جداسازی *P. oligandrum* از خاک مزارع چغندرقند

از خاک مزارع مناطق اصلی کشت چغندرقند استان خراسان رضوی شامل شهرستان های مشهد، نیشابور، سبزوار، تربت جام و چناران، به صورت تصادفی نمونه برداری شد، کلیه نمونه ها در کیسه های پلاستیکی سیاه و در بسته تا زمان جداسازی در یخچال معمولی نگهداری شدند. از دو روش مختلف برای جداسازی*P. oligandrum* از خاک مزارع چغندرقند شامل کشت سری رقت های عصاره خاک (Martin, 1992) و روش تله گذاری با قارچ *Fusarium culmurom* (W.G. Smith) Sacc استفاده شد (Foley and Deacon, 1986). جهت شناسایی جدایه های *P. oligandrum* از منابع شناسایی گونه های پیتیوم، بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ، شکل و سرعت رشد کلونی روی محیط CMA، قطر اووگونیوم، تیپ آنتریدی، شکل و قطر اسپورانژیوم و قطر اووسپور استفاده شد (Plaats-Nitherink, 1981).

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی میکروسکوپی نحوه ارتباط هیفی *P. oligandrum* و *R. solani*

هدف از این آزمایش ها، بررسی میکروسکوپی نحوه ارتباط هیف به هیف قارچ آنتاگونیست با قارچ عامل بیماری و نحوه پارازیته شدن *R. solani* توسط *P. oligandrum* بود، جهت این بررسی از دو روش مختلف استفاده شد.

روش اول: در این روش یک قرص ۵ میلی متری از کلنی ۵ روزه *R. solani* در یک طرف تشتک پتری روی محیط کشت CMA و یک قرص ۵ میلی متری از کلنی ۵ روزه هر یک از جدایه های *P. oligandrum* در سمت دیگرتشتک پتری به صورت جدا در مقابل بیمارگر قرار داده شد. سپس بوسیله تیغ، دو برش متقاطع بر روی محیط کشت ایجاد و قطعه مثلثی را که قاعده آن حداکثر ۲ سانتیمتر بود از وسط پتری خارج کرده تا هیف‌های دو قارچ بتوانند بر روی سطح شیشه کف تشتک پتری به هم برسند و امکان مشاهده میکروسکوپی نحوه تماس و رشد میسلیوم های هر دو گونه قارچی وجود داشته باشد (Onkar and James, 1995).

روش دوم: در روش دوم نیز شرایط کشت مانند روش اول بود با این تفاوت که به جای برداشتن قسمتی از محیط کشت، یک لام میکروسکوپی پس از ضد عفونی با الکل و حرارت شعله با کمی فشار در وسط پتری قرار داده شد تا میسلیوم های هریک از دو قارچ از دو سمت بتواند روی آن رشد کنند و به هم برسند. دو روز بعد لام میکروسکوپی مزبور برداشته شد و پس از رنگ آمیزی میسلیوم ها بوسیله لاکتوفنل و آبی پنبه ۱٪، مورد مشاهده میکروسکوپی قرار گرفت و ارتباط هیف به هیف دو گونه مشاهده شده و عکسبرداری از آن انجام شد (Onkar and James, 1995).

بررسی رقابت غذایی بین جدایه های *P. oligandrum* و *R. solani*

به منظور اندازه گیری میزان رقابت غذایی بین *P. oligandrum* و *R. solani* آزمایش زیر، در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. منظور از رقابت غذایی در این آزمایش، میزان پیشروی میسلیوم قارچ و استفاده از محیط غذائی در مقابل قارچ دیگر بود. رشدکلنی قارچ ها معمولا بصورت دایره ای می باشد و چون نقطه شروع رشد کلنی قارچی در این آزمایش از حاشیه هر تشتک پتری بود، لذا رشد کلنی قارچی فقط به سمت مرکز تشتک پتری ممکن بود و براین اساس رقابت غذایی بین جدایه های *P. oligandrum* و *R. solani* با اندازه گیری میزان شعاع رشدکلنی هرکدام به تنهایی انجام شد. در روش اول روی محیط کشت CMA در چهار تکرار، یک قرص ۵ میلیمتری از کشت ۳ روزه جدایه های آنتاگونیست در مرکز یک تشتک پتری و سه دیسک *R. solani* در سه گوشه به صورت جدا از هم کشت و یک گوشه تشتک پتری به عنوان شاهد خالی گذاشته شد. در روش دوم یک دیسک *R. solani* در مرکز پتری و سه دیسک *P. oligandrum* دراطراف قرار داده شد و یک گوشه نیز بعنوان شاهد خالی گذاشته شد (Elad *et al.*, 1980). سپس تشتک های پتری در انکوباتور و در شرایط تاریکی و دمای۲۶ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از رشد کلنی *P. oligandrum* در گوشه های تشتک پتری در آزمایش اول و رشد کلنی *R. solani* در آزمایش دوم، قطرکلنی هر دو قارچ درتمامی تشتک های پتری یادداشت برداری و برای ارزیابی میزان رقابت غذایی بین جدایه های آنتاگونیست و بیمارگر از معیار زیراستفاده شد (Shahiri- Howell and Stipanovic, 1995; Tabarestani, 2000).

اگر قارچ آنتاگونیست کمتراز نصف پتری(۴۵mm) رشد کند رقابت غذایی ندارد.

اگر قارچ آنتاگونیست تا دو سوم پتری(۶۰mm) رشد کند رقابت تغذیه ای خوب دارد.

اگر قارچ آنتاگونیست تا پنج ششم پتری (۷۵mm) رشد کند رقابت تغذیه ای شدید دارد.

اگر قارچ آنتاگونیست تا بیش از (۷۵mm) رشد کند رقابت تغذیه ای بسیار شدید دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی اثر متابولیت های گازی فرار سنین مختلف کلنی جدایه های *P. oligandrum* بر رشد میسیلیوم *R. solani*

در این آزمایش اثر متابولیت های گازی فرار۶ جدایه *P. oligandrum* بر رشد میسیلیوم *R. solani* در کشت همزمان آنتاگونیست و عامل بیماری و کلنی‌های ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعته جدایه های *P. oligandrum* در قالب طرح کامل تصادفی شامل۷ تیمار و۴ تکرار بررسی شد (Howell and Stipanovic,1995). تیمارها شامل ۶ جدایه *P. oligandrum* و شاهد بودند. برای هر تیمار ۴ تشتک پتری حاوی محیط CMA به عنوان تکرار در نظر گرفته شد. در تیمارکشت همزمان قرصی به قطر ۵ میلی متراز کشت ۴ روزه *R. solani* و یک دیسک ۵ میلی متری از کشت ۴ روزه *P. oligandrum* به هر تشتک پتری انتقال یافت و برای تیمار های دیگر ابتدا هر۶ جدایه قارچ آنتاگونیست *P. oligandrum* در ۴ تکرار به مدت ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد رشد داده شدند و بعد از این مدت قرصی به قطر ۵ میلیمتر از کشت ۴ روزه *R. solani* درون تشتک پتری کشت شد. سپس با برداشتن درب تشتک پتری دیش ها در شرایط استریل تشتک های پتری حاوی کلنی های *R. solani* و آنتاگونیست روی هم قرار گرفتند به طوری که تشتک پتری حاوی *P. oligandrum* در پایین و تشتک پتری حاوی کلنی *R. solani* روی آن قرار گرفت، به منظور تجمع ترکیبات گازی آنتاگونیست در فضای بین دو تشتک پتری بوسیله نوار پارافیلم درز بین دو پتری مسدود شد. در تیمار شاهد دیسک هایی به قطر ۵ میلی متر بدون آنتاگونیست به محیط کشت CMA انتقال یافت و این تشتک پتری بر روی پتری تشتک های پتری حاوی *R. solani* قرار گرفت (Onkar and James, 1995). کلیه تشتک های پتری در انکوباتور با درجه حرارت ۲۶ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، پس از ۳ روز شعاع رشد کلنی *R. solani* در دو جهت عمود بر هم در هر تشتک پتری بر حسب میلی متر اندازه گیری و درصد بازداری از رشد *R. solani* در اثر متابولیت های گازی *P. oligandrum* بر اساس روش کیونیک و جاکوبسون (۲۰۰۱) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد بازداری از رشد میسلیوم عامل بیماری = (میانگین قطررشد کلونی درشاهد − میانگین قطررشد کلونی درتیمار) / میانگین قطررشد کلونی درشاهد × ۱۰۰

بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسیلیوم *R. solani* در محیط کشت

این آزمایش با هدف بررسی نقش ترشحات مایع خارج سلولی جدایه های *P. oligandrum* در ممانعت از رشد میسلیوم *R. solani* انجام شد. برای انجام این آزمایش ابتدا محیط کشت مایع عصاره ارزن تهیه شد (Onkar and James, 1995) سپس به ۳ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، ۱۵۰ میلی لیتر از محیط کشت مذکور اضافه و محتویات ارلن ها برای مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. پس از سرد شدن محیط کشت، یک قرص به قطر یک سانتی متر از کشت سه روزه سه جدایه آنتاگونیست شامل تربت جام، نیشابور و مشهد که بر اساس آزمایش های قبلی پتانسیل قابل قبولی در ممانعت از رشد میسلیوم *R. solani* داشتند بر روی محیط CMA در۳ ارلن تلقیح گردید و به ارلن شاهد نیز یک قرص یک سانتی متری از محیط CMA اضافه شد. ارلن ها بعد از تلقیح به مدت۱۰ روز روی دستگاه تکان دهنده با۶۰ تکان در دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند. پس از آنکه رشد قارچ به صورت تشکیل گلوله های هیفی درون ارلن ها مشخص شد محتوای ارلن ها بوسیله کاغذ های صافی استریل با قطر ۰/۴۵ میکرومتر و به وسیله پمپ خلاء، مایع موجود در هرارلن در شرایط استریل صاف گردید (انکار و جیمز، ۱۹۹۵). پس از ۳ روز شعاع رشد کلونی رایزوکتونیا در دو قطر عمود بر هم برحسب میلی متر در هر تکرار نسبت به رشد

Archive of SID

www.SID.ir

کلونی شاهد مربوط به آن تکرار محاسبه و درصد بازداری از رشد *R. solani* بر اساس روش *کیونیک و جاکوبسون* (۲۰۰۱) محاسبه شد.

بررسی اثر غلظت ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسیلیوم *R. solani* در محیط کشت

برای انجام این آزمایش ابتدا همانند آزمایش قبل ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تربت جام *P. oligandrum* که در آزمایش های قبلی به عنوان جدایه ای با بیشترین کارایی شناسایی شده بود، در محیط کشت مایع عصاره ارزن تهیه گردید. سپس آزمایشی به صورت طرح کامل تصادفی با ۷ تیمار و ۴ تکرار انجام گردید. تیمارها شامل تیمار شاهد و شش غلظت مختلف (۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد) عصاره ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تربت جام *P. oligandrum* در محیط PDA بودند. تیمار شاهد به این صورت تهیه شد که محیط کشت PDA به نسبت همان تیمار با عصاره حاصل از فیلتراسیون محیط کشت مایع تلقیح نشده مخلوط شد. پس از آماده سازی تشتک‌های پتری در هرکدام یک قرص ۵ میلی متری از کلونی۴ روزه *R. solani* کشت و درون انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند (Paulitz and Belanger, 2001) پس از۳ روز شعاع رشد کلونی رایزوکتونیا در دو قطر عمود بر هم برحسب میلی متر در هر تکرار نسبت به رشد کلونی شاهد مربوط به آن تکرار محاسبه و درصد بازداری از رشد *R. solani* بر اساس روش *کیونیک و جاکوبسون* (۲۰۰۱) محاسبه شد.

بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسیلیوم *R. solani* در خاک

ابتدا مقداری خاک مزرعه چغندرقند متعلق به مزرعه نمونه آستان قدس رضوی دو بار به فاصله یک روز، به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر در اتوکلاو استریل شد. در ادامه اینوکولوم *P. oligandrum* (جدایه تربت جام) بر اساس روش *فلجر و همکاران*(۱۹۹۰) به شرح زیر تهیه گردید. حدود۵۰۰ گرم ارزن در ارلن یک لیتری ریخته شد و با آب مقطرحجم آن به یک لیتر رسانده شد این مخلوط بر روی شعله ملایم برای مدت۲۰ دقیقه جوشانده شد، پس از جوشیده شدن، حدود۲۰ گرم از ارزن جوشانده شده به ارلن های۲۰۰ میلی لیتری منتقل شد. برای جلوگیری از چسبیدن دانه های ارزن ۵ گرم کربوکسی متیل سلولز به ازاء هر کیلوگرم ارزن به آنها اضافه شد. درب ارلن ها با پنبه و فویل آلومینیوم بسته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۲۱ و فشار ۱/۵ اتمسفردر اتوکلاو استریل گردید. پس از خارج کردن ارلن ها از اتوکلاو و سرد شدن در شرایط کاملا استریل به هر ارلن ۴ دیسک۱۰ میلی متری از کلونی ۳ روزه *P. oligandrum* اضافه شد. پس از تلقیح، ارلن ها در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳ هفته نگهداری گردید. پس از این مدت پوشش سفید رنگی سطح داخل ارلن را پوشاند که نشان دهنده رشد *P. oligandrum* بر روی دانه های ارزن بود . برای تهیه اینوکولوم *R. solani* از روش *سنه و همکاران* (۱۹۹۱) به شرح زیر استفاده شد.

ابتدا آرد ذرت و ماسه به نسبت وزنی۱ به ۹ مخلوط شدند سپس به هر ارلن۲۵۰ میلی لیتری، ۱۰۰ گرم از این مخلوط اضافه گردید. پس از اضافه کردن۲۰ میلی لیترآب مقطر به محتویات آنها در اتوکلاو با درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت یکساعت استریل شدند. سپس ۴ حلقه به قطر۱ سانتی متر از محیط کشت ۴ روزه *R. solani* بر رویPDA به هر کدام از ارلن ها اضافه گردید. سپس ارلن ها به مدت ۳ هفته در انکوباتور با درجه حرارت ۲۵ سانتی گراد و در فاصله۳۰ سانتی متر از لامپ فلورسنت نگهداری شدند تا اینوکولوم *R. solani* آماده شود. سپس با استفاده از خاک فوق، اینوکولوم *P. oligandrum* و *R. solani* تیمارهای زیر در چهار تکرار تهیه شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مخلوط۳٪ وزنی اینوکولوم جدایه تربت جام *P. oligandrum* درخاک فوق

۲- مخلوط۳٪ وزنی اینوکولوم جدایه تربت جام *P. oligandrum* و ۲٪ وزنی اینوکولوم *R. solani* در خاک فوق

۳- مخلوط۳٪ وزنی اینوکولوم جدایه تربت جام *P. oligandrum* درخاک فوق، که پس از نگهداری در شرایط آزمایشگاه به مدت سه هفته به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ در اتوکلاو استریل گردید.

۴- مخلوط۳٪ وزنی اینوکولوم جدایه تربت جام *P. oligandrum* مخلوط با ۱۰گرم ریشه چغندرقند ضد عفونی شده در خاک فوق که تاثیر وجود ریشه چغندرقند بر میزان ترشحات خارج سلولی *P. oligandrum* بررسی گردد.

۵- تیمار پنجم نیز شاهد در نظر گرفته شد و شامل خاک استریل همراه با مخلوط وزنی۳٪ ارزن استریل بود.

در ادامه ۵ گرم از خاک هر تیمار با ۵ میلی لیترآب آگار۲٪ که در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد بوسیله حمام ماری نگهداری شده بود درون پتری ریخته شده و بوسیله میله شیشه ای استریل با هم مخلوط و در ۴ تکرار آماده گردید. پس از انعقاد تشتک های پتری بر روی آنها ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت اختصاصی ریزوکتونیا اضافه شد. پس از انعقاد این محیط، در هر تشتک پتری یک دیسک ۵ میلیمتری از کلونی ۳ روزه *R. solani* در شرایط استریل کشت شد. سپس تشتک های پتری در انکوباتور با دمای درجه ۲۶ سانتی گراد قرار داده شدند. پس از سه روز که رشد قارچ در تیمار شاهد کامل گردید شعاع رشد کلونی ها در دو جهت عمود برهم اندازه گیری و درصد بازداری از رشد *R. solani* بر اساس روش *کیونیک و جاکوبسون* (۲۰۰۱) محاسبه شد.

بررسی امکان تولید متابولیت های ضد قارچی مقاوم به حرارت در *P. oligandrum*

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار و ۴ تکرار انجام گرفت. جهت آماده سازی تیمار اول، در چهار تشتک پتری حاوی محیط کشت CMA یک قرص۵ میلیمتری از کلونی۳ روزه جدایه تربت جام *P. oligandrum* کشت و در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از گذشت ۳ روز تشتک های پتری مربوطه برای ۱۵ دقیقه در اتوکلاو و با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفرحرارت داده شدند و در شرایط استریل هیف های از بین رفته *P. oligandrum*، بوسیله پنس استریل از محیط کشت مذاب درون تشتک پتری خارج و محیط در زیر هود استریل قرار داده شد تا دوباره منعقد شود. پس از۳۰ دقیقه یک قرص ۵ میلیمتری از کلونی۳ روزه *R. solani*، روی محیط مذکور کشت داده شد. برای بررسی نقش کاهش مواد غذایی محیط کشت بر رشد *R. solani*، در تیمار دوم به جای کشت *P. oligandrum*، ابتدا یک حلقه از کلونی۴ روزه *R. solani* در تشتک پتری حاوی محیط کشت CMA کشت داده شد و پس از یک هفته در اتوکلاو استریل و بقیه مراحل مانند تیمار اول انجام داده شد. به دلیل احتمال نقش حرارت در ایجاد تغییرات در محیط کشت CMA و تاثیر این مواد بر رشد *R. solani*، تشتک های پتری حاوی محیط CMA، همانند تیمار های قبل به مدت۳۰ دقیقه استریل و پس از سرد و انعقاد یک حلقه ۵ میلیمتری از کلونی۳ روزه *R. solani* روی آن کشت شد و به این ترتیب تیمار سوم آماده گردید. تیمار شاهد نیز به عنوان تیمار چهارم در نظر گرفته شد و یک قرص۵ میلیمتری از کلونی۳روزه *R. solani* روی محیط CMA درون پتری کشت داده شد. پتری ها در انکوباتور و در دمای۲۶ سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ۳ روز شعاع رشد کلونی ها در دو جهت عمود بر هم در کلیه تیمارها اندازه گیری و درصد بازداری از رشد *R. solani* بر اساس روش *کیونیک و جاکوبسون* (۲۰۰۱) محاسبه شد.

مقایسه توانایی تولید متابولیت های ضد قارچی مقاوم به حرارت درجدایه های مختلف *P. oligandrum*

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۷ تیمار و ۴ تکرار انجام گرفت. جهت آماده سازی تیمارها، در چهار تشتک پتری حاوی محیط کشت CMA یک قرص ۵ میلیمتری از کلونی۳ روزه هر کدام از جدایه های *P. oligandrum* کشت و در

Archive of SID

www.SID.ir

انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۳ روز تشتک های پتری مربوطه برای ۱۵ دقیقه در اتوکلاو و با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفرحرارت داده شدند و در شرایط استریل هیف های مرده *P. oligandrum*، بوسیله پنس استریل از محیط کشت مذاب درون تشتک پتری خارج و محیط در زیر هود استریل قرار داده شد تا دوباره منعقد شود. پس از ۳۰ دقیقه یک حلقه ۵ میلیمتری از کلونی۳ روزه *R. solani*، روی محیط مذکور کشت و پتری ها در انکوباتور و در دمای۲۶ سانتی گراد نگهداری شدند. پس از ۳ روز شعاع رشد کلونی ها در دو جهت عمود بر هم در کلیه تیمارها اندازه گیری و درصد بازداری از رشد *R. solani* بر اساس روش *کیونیک و جاکوبسون* (۲۰۰۱) محاسبه شد.

نتایج

جداسازی *P. oligandrum* از خاک مزارع چغندرقند

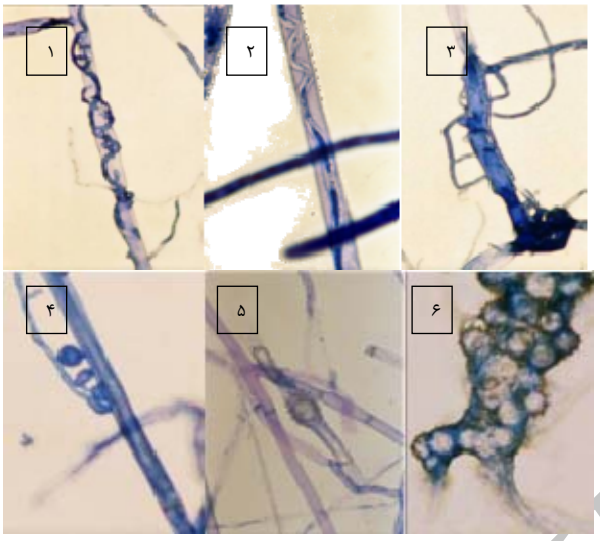
در این تحقیق ۵ جدایه از*P. oligandrum* شامل جدایهM (مشهد), N (نیشابور)، S (سبزوار)، CH (چناران)، T (تربت جام) جداسازی و شناسایی شدند و یک جدایه نیز تحت نام SH (شیراز) که از خاک مزرعه چغندرقند استان فارس جداسازی گردید بود، ازکلکسیون قارچ های ایران متعلق به اقای دکتر بنی هاشمی از دانشگاه شیراز تهیه شد.

بررسی میکروسکوپی نحوه تماس هیفی *P. oligandrum* و *R. solani*

بر اساس بررسی های میکروسکوپی هیف *P. oligandrum* پس از رسیدن به هیف *R. solani* رفتارهای مختلفی از خود نشان می دهد. هیف *P. oligandrum* معمولا به موازات هیف *R. solani* رشد کرده و در چند نقطه توسط هوستوریوم های بسیار ظریف از آن تغذیه می کند یا به دور هیف *R. solani* پیچیده و از آن تغذیه می کند. تراکم هیف *P. oligandrum* پس از کلونیزاسیون هیف رایزوکتونیا به حدی زیاد بود که هیف *R. solani* دیده نمی‌شد (شکل۱و۲). گاهی نیز با ایجاد سوراخی در هیف *R. solani* وارد هیف آن می شد (شکل۳). از این طریق *P. oligandrum* به راحتی درون هیف*R. solani* پیشروی کرده و از داخل آن را کلونیزه می‌کند. هنگامی که هیف جوان *R. solani* در مراحل ابتدایی رشد در معرض هیف آنتاگونیست قرار می گیرد دچار چروک های سطحی شده و پس از مدتی آثار اختلال سلولی و جدا شدن پروتوپلاست از دیواره سلولی پدیدار می شود. پس از این که *P. oligandrum* به درون هیف *R. solani* نفوذ می کند هیف *P. oligandrum* رفتار های متفاوتی از خود نشان میدهد. تشکیل کلاف های مدور هیفی (که از خصوصیات *P. oligandrum* است) پیچش به دور هیف های دیگر *P. oligandrum* و حتی تغییر شکل هیف و تغییر زاویه انشعاب های آن از آن جمله است. برخی مواقع رشد فراوان هیف *P. oligandrum* یک شبکه شبه تار عنکبوتی ایجاد می کرد که رشد *R. solani* را محدود کرده و سپس بر روی آن اووگونیوم فراوان تولید می کرد. تولید اسپورانژیوم توسط *P. oligandrum* نیز گاهی بر روی هیف *R. solani* دیده می شد (شکل۴). *P. oligandrum* بر روی هیف *R. solani* اندام های جنسی فراوانی تولید می کرد و پس از کلونیزه کردن داخلی *R. solani* با تولید اووسپوردرون هیف *R. solani* سبب بروز تورم هیفی در آن می‌شد (شکل۵) و گاهی اوقات تولید اووسپور به حدی زیاد بود که کل هیف *R. solani* را پوشانده و یک توده خاردار بوجود می آورد (شکل۶).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱: پیچش و نفوذ *P. oligandrum* بر روی هیف *R. solani* (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر). عکس اصلی

شکل۲: نفوذ هیف *P. oligandrum* به درون هیف*R. solani* و پیشروی درون هیف (بزرگنمایی ۱۰۰۰). عکس اصلی

شکل۳: تشکیل اسپورانژیوم *P. oligandrum* بر روی هیف *R. solani* (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر). عکس اصلی

شکل٤: تشکیل حلقه هیفی توسط رایزوکتونیای آلوده به *P. oligandrum* تشکیل این حلقه از خصوصیات *P.oligandrum* است (بزرگنمایی برابر ۱۰۰۰). عکس اصلی

شکل۵: توانایی *P. oligandrum* در تولید اووسپور درون هیف *R. solani* و تورم هیف ناشی از آن(بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر). عکس اصلی

شکل٦: فراوانی تولید اووسپور *P. oligandrum* درون هیف *R. solani* (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر). عکس اصلی

بررسی رقابت غذایی بین جدایه های مختلف *P. oligandrum* و *R. solani*

تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری رقابت غذایی بین جدایه های مختلف *P. oligandrum* و *R. solani* نشان داد که تمامی جدایه های آنتاگونیست در هر دو روش قادر به رقابت غذایی با *R. solani* بوده و اختلاف معنی دار (LSD) در سطح ۱٪ با یکدیگرداشتند (جدول۱). مقایسه میانگین و گروه بندی آماری تیمارها نیز بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح ۱٪ تعیین شد (جدول۲). پس از رشد کامل کلونی *R. solani* در تیمار شاهد، میزان رقابت غذایی بین جدایه های مختلف *P. oligandrum* با *R. solani* اندازه گیری و جدایه های *P. oligandrum* بر این اساس در گروه های با رقابت بسیار شدید غذایی تا فاقد رقابت غذایی طبقه بندی شدند. بیشترین رقابت غذایی مربوط به جدایه های تربت جام و مشهد با میانگین قطر رشد کلونی به ترتیب ۸۵ و ۸۱ میلیمتر و فاقد رقابت غذایی متعلق به جدایه چناران با میانگین قطر رشد کلونی ۳۹ میلیمتر در روش اول بود. در روش دوم به جز جدایه چناران تمامی جدایه های *P. oligandrum* با *R. solani* در محیط CMA رقابت تغذیه ای داشتند و شدید ترین رقابت غذایی مربوط به جدایه تربت جام بود و سایر جدایه ها بین این دو قرار گرفتند(جدول۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱: تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری رقابت غذایی بین جدایه های مختلف *P. oligandrum* و *R. solani*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		روش اول	روش دوم
تیمار	۵	**۹۳۵/۶	**۵۹۳/۲
خطا	۱۸	۱۰۵/۱۲	۶۵/۱۷

*= معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول۲: مقایسه میانگین داده های حاصل از اندازه گیری میزان رقابت غذایی جدایه های مختلف *P. oligandrum* با *R. solani*

تیمار(نام جدایه)	میانگین قطر کلونی *P. oligandrum*	
	روش اول	روش دوم
چناران	۳۹b	۳۵b
مشهد	۸۱e	۸۲e
نیشابور	۶۸d	۶۴d
سبزوار	۴۹c	۵۰c
تربت جام	۸۵e	۸۳e
شیراز	۴۷c	۴۵c
شاهد	a صفر	a صفر
LSD	۵/۱۱	۵/۸۶

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح $P\leq0.05$ بر اساس آزمون LSD ندارند.

بررسی اثر سن کلنی *P. oligandrum* در تولید متابولیت های گازی فرار بر رشد میسیلیوم *R. solani*

تجزیه واریانس داده های حاصل از اثر سن کلنی *P. oligandrum* در تولید متابولیت های گازی فرار بر رشد میسیلیوم *R. solani* نشان داد که تمامی جدایه های آنتاگونیست توانایی تولید متابولیت های گازی فرار را داشته و اختلاف معنی دار (LSD) در سطح ۱٪ با شاهد داشتند (جدول۱). مقایسه میانگین و گروه بندی آماری تیمارها نیز بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح ۱٪ تعیین شد (جدول۲). در آزمایش کشت همزمان دو قارچ، جدایه تربت جام با ۱۳/۹۵درصد بیشترین میزان بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* را داشت و با توجه به نتایج هرچند اختلاف بین تیمارها و شاهد معنی دار بود اما بین جدایه های مختلف آنتاگونیست اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ وجود نداشت. در آزمایش کشت ۲۴ساعته آنتاگونیست *P. oligandrum* نتایج نشان داد که جدایه تربت جام (شعاع رشد کلنی ۳۲/۵۰ میلیمتر) با ۲۷/۶۳ درصد بیشترین میزان بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* را داشت اما با جدایه‌های مشهد و نیشابور اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ درصد نداشت و هر سه جدایه در یک گروه آماری قرار گرفتند، کمترین میزان بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* متعلق به جدایه چناران بود که به همراه جدایه های سبزوار و شیراز در یک گروه آماری قرار گرفتند. در آزمایش کشت ۳۶ ساعته *P. oligandrum*، متابولیت های گازی فرار کشت ۳۶ ساعته تمامی جدایه های آنتاگونیست توانایی بالایی در

Archive of SID

www.SID.ir

بازدارندگی از رشد میسلیوم *R. solani* از خود نشان دادند. جدایه تربت جام (شعاع رشد کلنی۱۹/۱۲ میلیمتر) با ۵۶/۴۱ درصد بیشترین میزان بازدارندگی از رشد را داشت و جدایه سبزوار دارای کمترین تاثیر بود. در آزمایش کشت ۴۸ و۷۲ ساعته آنتاگونیست هیچیک از جدایه های *P. oligandrum* قادر به کاهش معنی دار رشد *R. solani* نسبت به شاهد نبودند و اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایش مشاهده نگردید. حتی میزان بازداری از رشد میسلیوم *R. solani* ۷۲ ساعته نسبت به کلونی های ۴۸ ساعته نیز کمتر بود و اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایش در سطح۱٪ مشاهده نگردید(جدول۲).

جدول۳: تجزیه واریانس داده های حاصل از تاثیر سنین مختلف کلونی *P. oligandrum* در تولید متابولیت های گازی فرار بر رشد میسلیوم *R. solani*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		کشت همزمان	کلنی با سن ۲۴ ساعت	کلنی با سن ۳۶ ساعت	کلنی با سن ۴۸ ساعت	کلنی با سن ۷۲ ساعت
تیمار	۶	۱۶/۰۱**	۵۹/۵۷ **	۲۳۰/۸۷ **	۲۲/۰۹	۴/۷۴
خطا	۲۱	۳/۶۰	۱۰/۴۴	۴/۴۵	۱۰/۵۸	۲/۶۹

**= معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول٤: مقایسه میانگین داده های حاصل از اندازه گیری تاثیر سنین مختلف کلونی*P. oligandrum* در تولید متابولیت های گازی فرار بررشد میسلیوم *R. solani*

تیمار(نام جدایه)	میانگین شعاع کلونی *R. solani* (mm)				
	کشت همزمان	کلنی ۲۴ ساعت	کلنی ۳۶ ساعت	کلنی ۴۸ ساعت	کلنی ۷۲ ساعت
چناران	۳۹/۳۷b	۳۸/۲۷b	۳۰/۷۵b	۴۰/۱۲ a	۴۱/۶۲a
مشهد	۳۸/۷۵ b	۳۵/۰۰c	۲۵/۸۷c	۳۷/۱۲a	۴۰/۶۲a
نیشابور	۳۸/۶۲ b	۳۵/۵۰c	۲۱/۵۷d	۳۸/۱۲a	۴۱/۷۵a
سبزوار	۳۹/۲۵b	۳۸/۲۲b	۳۰/۸۷b	۳۸/۰۰a	۴۰/۳۷a
تربت جام	۳۷/۷۵ b	۳۲/۵۰c	۱۹/۱۲d	۳۷/۰۰a	۴۰/۱۲a
شیراز	۳۸/۸۷b	۳۸/۱۲b	۲۵/۷۵c	۴۰/۲۵a	۴۱/۷۵a
شاهد	۴۳/۸۷ a	۴۴/۷۵ a	۴۳/۳۳ a	۴۳/۳۷ a	۴۳/۲۵ a
LSD	۳/۷۹	۶/۴۵	۴/۲۱	۶/۶۰	۹/۲۴

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح $P\leq0.05$ بر اساس آزمون LSD ندارند.

بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسیلیوم *R. solani* در محیط کشت

تجزیه واریانس داده های حاصل از اثر ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* سه جدایه مشهد، تربت جام و نیشابور بر رشد میسلیوم *R. solani* که در این آزمون استفاده شدند، نشان داد که ترشحات مایع خارج سلولی هر سه جدایه آنتاگونیست قادر به کاهش رشد میسلیوم *R. solani* بوده و اختلاف معنی دار (LSD) در سطح۱٪ با شاهد داشتند (جدول۵). مقایسه میانگین و گروه بندی آماری تیمارها نیز بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح ۱٪ تعیین شد(جدول۶).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج به دست آمده نشان دادند، ترشحات مایع خارج سلولی هر سه جدایه *P.oligandrum* میتوانند در سطح بالایی، مانع از رشد میسلیومی *R. solani* شوند، جدایه مشهد با میانگین شعاع کلونی ۱۲/۳۷میلیمتر بیشترین میزان بازداری از رشد میسلیوم (۷۱/۳۱ ٪) را داشت هرچند بین دو جدایه مشهد و تربت جام از این جهت اختلاف معنی داری مشاهده نشد و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول۶).

جدول ۵: تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری اثر ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani* در محیط کشت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۷۶۰/۵۹**
خطا	۱۲	۳/۶۹

** معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول۶: مقایسه میانگین داده های حاصل از اندازه گیری اثر ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani* در محیط کشت

تیمار(نام جدایه)	میانگین شعاع کلونی *R. solani* (mm)	درصد بازداری از رشد میسلیوم *R. solani*
تربت جام	۱۵/۸۷c	۶۳/۱۹
نیشابور	۲۶/۰۰b	۳۹/۷۰
مشهد	۱۲/۳۷c	۷۱/۳۱
شاهد	۴۳/۱۲a	صفر
LSD	۴/۱۱	

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح $P\leq 0.05$ بر اساس آزمونLSD ندارند.

بررسی اثر غلظت مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani* در محیط کشت

تجزیه واریانس داده های حاصل از اثر غلظت های مختلف ترشحات مایع خارج سلولی *P.oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani* نشان داد که تمامی غلظت های ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تربت جام آنتاگونیست قادر به کاهش رشد میسلیوم *R. solani* بوده و اختلاف معنی دار(LSD) در سطح۱٪ با شاهد داشتند(جدول۷). مقایسه میانگین و گروه بندی آماری تیمارها نیز بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار(LSD) در سطح ۱٪ تعیین شد(جدول۸). نتایج به دست آمده نشان دادند، ترشحات خارج سلولی *P. oligandrum* حتی با غلظت کم نیز میتواند در سطح بالایی، مانع از رشد میسلیومی *R. solani* شود و با افزایش غلظت این ترشحات از ۵ تا۵۰ درصد رشد میسلیومی *R. solani* کاهش یافت. هرچند بین غلظتهای ۵٪،۱۰٪ و۲۰٪ اختلاف معنی داری مشاهده نشد و در یک گروه آماری قرار گرفتند، غلظت های۳۰٪،۴۰٪ و۵۰٪ نیز اگرچه به ترتیب افزایش غلظت، بازداری از رشد میسلیوم بیشتری داشتند اما اختلاف بین آنها به لحاظ آماری معنی دار نبود و در یک گروه آماری قرار گرفتند(جدول۸).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۷: تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری اثر غلظتهای مختلف ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تربت جام *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۵	**۱۸۷/۱۲
خطا	۱۸	۶/۴۴

**= معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول۸: مقایسه میانگین داده های حاصل از اندازه گیری اثر غلظتهای مختلف ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تربت جام *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani*

تیمار(غلظت)	میانگین شعاع کلونی *R. solani* (mm)	درصد بازداری از رشد میسلیوم *R. solani*
٪۵	۳۲/۲۵b	۳۶/۹۶
٪۱۰	۲۹/۷۵b	۳۹/۴۲
٪۲۰	۲۵/۳۷b	۴۴/۶۴
٪۳۰	۱۹/۲۵a	۵۸/۶۵
٪۴۰	۱۷/۲۵ a	۶۸/۷۸
٪۵۰	۱۵/۸۷a	۷۶/۱۱
LSD	۵/۱۳	

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح $P\leq0.05$ بر اساس آزمون LSD ندارند.

بررسی کارایی ترشحات مایع خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani* در خاک

نتایج این آزمایش بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال۱٪ بین تیمارها نسبت به شاهد بود(جدول۹). تیمار اول که خاک مورد استفاده در این تیمار تنها با اینوکولوم *P. oligandrum* آلوده شده بود با ۳۲/۰۹ درصد بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *R. solani* داشت. استریل کردن خاک پس از آلودگی به آنتاگونیست در تیمار دوم باعث کاهش شدید بازدارندگی شد اما تیمار مذکور باز هم دارای مقداری بازدارندگی بود و با شاهد اختلاف معنی دار داشت. در تیمار سوم نیز که خاک مورد استفاده علاوه بر *P. oligandrum* به *R. solani* آلوده شده بود میزان بازدارندگی به طورمعنی داری کمتر از اول بود. بنابراین به نظر می رسد وجود *R. solani* در خاک تحریک کننده ترشح متابولیت های ممانعت کننده رشد توسط *P. oligandrum* نیست. اضافه کردن ریشه چغندرقند پس از *P. oligandrum* نیز تفاوت معنی داری نسبت به تیمار اول که نشان دهنده تحریک یا افزایش فعالیت *P. oligandrum* باشد نشان نداد (جدول۱۰).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۹: تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری اثر ترشحات خارج سلولی *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani* در خاک

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۴	۱۳۸/۱۳**
خطا	۱۵	۷/۸

*- معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول۱۰: مقایسه میانگین داده های حاصل از اندازه گیری تاثیر متابولیت های تولید شده درخاک توسط *P. oligandrum* در بازداری از رشد میسلیوم *R. solani*

تیمار	درصد بازداری از رشد میسلیوم *R. solani*
خاک حاوی *P. oligandrum* به تنهایی	۳۲/۰۹d
خاک حاوی *P. oligandrum* استریل شده پس از سه هفته	۱۲/۷۱b
خاک حاوی *P. oligandrum* و *R. solani*	۲۰/۸۰c
خاک حاوی *P. oligandrum* و ریشه چغندرقند	۳۱/۵۱d
شاهد	aصفر
LSD	۵/۵۰

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح P≤0.05 بر اساس آزمونLSD ندارند.

بررسی امکان تولید متابولیت های ضد قارچی مقاوم به حرارت در *P. oligandrum*

گروه بندی آماری نتایج این آزمایش بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار(LSD) در سطح ۱٪ تعیین شد که بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها بود (جدول۱۱). نتایج آزمایش نشان دهنده اختلاف آماری بین تیماری که قبلا *P. oligandrum* در آن تشکیل کلونی داده و سپس محیط استریل شده و کلنی *R. solani* بر روی آن کشت شده بود با بقیه تیمارها است. در این تیمار میانگین بازدارندگی از رشد *R.solani* ۷۳/۳۶درصد بود(جدول۱۲). دو تیمار دیگر با شاهد اختلاف معنی داری نداشتند و با هم یک گروه آماری را تشکیل دادند. بازداری از رشد بسیار بالا در تیمار فوق بیانگر مقاومت متابولیت های تولید شده توسط *P. oligandrum* در برابرحرارت می باشد.

جدول۱۱: تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری اثر ترکیبات مقاوم به حرارت در *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۹۰۴/۷**
خطا	۱۲	۶/۲۷

**= معنی دار در سطح ۱ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱۲: مقایسه میانگین داده های حاصل از اثر ترکیبات مقاوم به حرارت در *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani*

تیمار	درصد بازداری از رشد میسلیوم *R. solani*
کشت ریزوکتونیا بر روی محیط کشتی که قبلا بر روی آن *P.oligandrum* کشت شده بود	۷۳/۳۶b
کشت ریزوکتونیا بر روی محیط کشتی که قبلا بر روی آن ریزوکتونیا کشت شده بود	۱۰/۴۷a
کشت ریزوکتونیا بر روی محیط CMA دوبار اتوکلاو شده	۶/۷۹a
شاهد	aصفر
LSD	۵/۳۹

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح $P\leq0.05$ بر اساس آزمونLSD ندارند.

مقایسه توانایی تولید ترکیبات مقاوم به حرارت جدایه های *P. oligandrum*

گروه بندی آماری بین تیمارها بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی دار (LSD) در سطح۱٪ تعیین شد. تمامی تیمارها با شاهد اختلاف معنی دار در سطح احتمال۱٪ داشتند(جدول۱۳). ۳ جدایه چناران، شیراز و مشهد با هم اختلاف معنی دار نداشته و در یک گروه قرارگرفتند. دو جدایه (تربت جام و نیشابور) با جدایه های چناران، شیراز و مشهد اختلاف معنی دار داشتند و در گروه آماری متفاوتی قرار گرفتند و جدایه سبزوار نیز در گروهی مجزا قرار گرفت. بیشترین میزان بازدارندگی از رشد *R. solani* مربوط به جدایه تربت جام با ۷۱/۳۳ و کمترین آنها مربوط به جدایه سبزوار با ۲۸/۲۹ درصد بود(جدول۱۴).

جدول۱۳: تجزیه واریانس داده های حاصل از اندازه گیری اثر ترکیبات مقاوم به حرارت جدایه های مختلف *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani*

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۶	۴۳۳/۷۷**
خطا	۲۱	۸/۸۱

**= معنی دار در سطح ۱ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول١٤: مقایسه میانگین داده های حاصل اثر ترکیبات مقاوم به حرارت جدایه های مختلف *P. oligandrum* بر رشد میسلیوم *R. solani*

تیمار	میانگین شعاع کلونی *R. solani* (mm)	درصد بازداری از رشد میسلیوم *R. solani*
چناران	٢٣/٨٧c	۴۵/۵۸
مشهد	٢۵/۵٠c	۴١/٨٧
نیشابور	١٧/۶٢d	۵٩/٨٣
سبزوار	٣١/٣٧b	٢٨/۴٩
تربت جام	١٢/۶٢e	٧١/٣٣
شیراز	٢۴/٠٠c	۴۵/٢٩
شاهد	۴٣/٨٧a	صفر
LSD	۵/٩١	

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح $P\leq0.05$ بر اساس آزمونLSD ندارند.

بحث

R. solani یکی از مهمترین عوامل بیماری مرگ گیاهچه در محصولات زراعی مختلف، از جمله چغندرقند می‌باشد. در بین گروه های آناستاموزی ریزوکتونیا، گروه آناستاموزی AG4 عامل اصلی مرگ گیاهچه چغندرقند می‌باشد (Benson and Baker,1974؛ Kuninaga and Yokosawa,1984؛ Bugbee, 1982؛ Truter, 2005). پارازیته شدن ریسه‌ی *R. solani* بوسیله *P. oligandrum* یک روند چند بعدی است (Benhamou *et al*., 1999) و *P. oligandrum* توانایی زیادی درکنترل دامنه گسترده ای از عوامل بیماری زای قارچی را دارد (Brozova, 2002; Lutchmeah and Cooke, 1984; Yokoyama and Ogoshi, 1986). در این تحقیق مشاهده شد *P. oligandrum* می تواند در کنار هیف *R. solani* رشد کرده و یا به دور آن بپیچد و با هوستوریوم بسیار باریک و ظریف خود از این قارچ تغذیه کند. اثر ترشحات و آنزیم های قارچ آنتاگونیست در تماس هیفی با قارچ بیمارگر به صورت بروز چروکیدگی هایی در سطح دیواره های سلولی هیف *R. solani* و در برخی موارد لیز شدن دیواره سلولی به چشم می خورد که با نتایج تحقیقات *بن هامو و همکاران* (١٩٩٩) مطابقت دارد. همچنین تولید زیاد اندامهای جنسی *P. oligandrum* بر روی هیف *R. solani* این موضوع را نشان می دهد که احتمالا *R. solani* یکی از میزبان‌های اصلی *P. oligandrum* به شمار می‌رود (Plaats-Nitherink, 1981). از طرفی نفوذ هیف *P. oligandrum* به درون هیف *R. solani* و کلونیزاسیون هیف ریزوکتونیا از درون توسط *P. oligandrum* و حتی تشکیل اووگونیوم درون هیف ریزوکتونیا پدیده ای قابل توجه می باشد که موارد مشابه آن کمتر دیده شده است (شکل ۵). نفوذ آنتاگونیست به درون هیف قارچ مورد حمله می‌تواند امتیاز زیادی در روند آنتاگونیسم به همراه داشته باشد، زیرا علاوه برآن که آنتاگونیست می‌تواند عامل بیماری را از درون بوسیله ترشحات بازدارنده از رشد و آنزیمهای تجزیه کننده خود مورد حمله قرار دهد، از شرایط محدود کننده (خشکی،کمبود مواد غذایی وآنتاگونیسم سایر میکرو ارگانیسمها) نیز در امان و در این شرایط به احتمال زیاد حتی در برابر قارچکش های اختصاصی حساسیت کمتری داشته باشد. توانایی تکمیل مرحله جنسی و ایجاد اندام های جنسی درون هیف نیز موجب آزاد شدن اسپورها و بخصوص زئوسپورها در محیطی مناسب برای رشد آنها می‌شود و به پراکندگی آنتاگونیست در جمعیت بیمارگرکمک می نماید. رشد فراوان توده‌ای ریسه‌های *P. oligandrum* بر روی *R. solani* نیز باعث محدود شدن رشد پاتوژن می‌شود و اگر نظیر این روابط میزبان و پارازیتی در خاک نیز انجام شود به کنترل بیولوژیک مناسب و کارآمدی خواهیم رسید.

Archive of SID

www.SID.ir

رقابت تغذیه‌ای جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* تا حدودی موجب کنترل رشد *R. solani* می‌شود میزان توانایی جدایه‌ها *P. oligandrum* در رقابت تغذیه‌ای با *R. solani* در این تحقیق متفاوت بود. جدایه تربت جام و جدایه مشهد آنتاگونیست دارای رقابت تغذیه‌ای بسیار بالایی در برابر *R. solani* بودند. رقابت تغذیه‌ای نشانگر قدرت ساپروفیتی بالای آنتاگونیست در استفاده از محیط کشت است که یکی از دلایل محدودیت رشد پاتوژن است. دلیل دیگر آن می تواند کلونیزه شدن هیف *R. solani* و لیز شدن آن باشد. تاثیر ترکیبات گازی فرار متصاعد شده از *P. oligandrum* در کشت همزمان به میزان بسیار کمی موجب کاهش رشد میسیلیومی *R. solani* گردید و هنگامی که سن کلونی *P. oligandrum* ۲۴ساعت بود تاثیر ترکیبات گازی فرار مقداری بیشترشد و هنگامی که سن کلونی آنتاگونیست به ۳۶ ساعت رسید بازداری از رشد *R. solani* به حداکثر خود رسید ولی با پیرتر شدن کلونی *P. oligandrum* میزان بازدارندگی از رشد *R. solani* کاهش یافته و پس از گذشت ۷۲ ساعت این ممانعت از رشد بسیار ناچیز شد. این روند در مورد تمام جدایه‌های *P. oligandrum* مورد آزمایش مشاهده شد. نتایج این آزمایش همچنین نشان داد اختلاف بین تیمارها و در نتیجه رابطه بین سن کلونی آنتاگونیست و میزان ممانعت از رشد بوسیله ترکیبات فرار یک رابطه معنی دار است. این افزایش وکاهش در ممانعت از رشد احتمالا مربوط به چرخه زندگی آنتاگونیست و افزایش و کاهش تولید متابولیت‌های گازی در مراحل مختلف زندگی قارچ می‌باشد. با توجه به نتایج بررسی تغییرات ۴۸ ساعت اول رشد کلونی *P. oligandrum* مشخص شد که *P. oligandrum* تا حدود۴۰ ساعت در مرحله رویشی به رشد خود ادامه می دهد و پس از آن وارد مرحله زایشی می‌شود و اسپورزایی انجام می‌گردد. میزان ترشحات فرار آن نیز احتمالا تحت تاثیر مراحل زندگی قارچ می‌باشد به نحوی که در۴۰ ساعت اول رشد، که آنتاگونیست در مرحله رشد رویشی خود می‌باشد با افزایش رشد و مقدار ریسه‌ها در محیط کشت، تراکم ترکیبات گازی فرار درون فضای محصور تشتک های پتری افزایش می‌یابد به همین دلیل در تیمارسن کلونی ۳۶ ساعته آنتاگونیست، زمانی که کلونی ریزوکتونیا رشد خود را آغاز می کند کلونی آنتاگونیست دارای بیشترین رشد رویشی بوده و بیشترین ترشح ترکیبات گازی فرار را نیز ترشح می‌کند اما پس از آن با ورود قارچ به مرحله زایشی و صرف انرژی بیشتر در جهت اسپورزایی میزان این ترکیبات کمتر شده تا آنجا که تیمارسن کلونی ۷۲ ساعته آنتاگونیست، که کلونی قارچ مملو از اووسپور و اسپورانژیوم است مقدار ترشحات گازی فرار تولید شده توسط آنتاگونیست و در نتیجه میزان ممانعت از رشد *R. solani* به کمترین میزان خود می‌رسد.

از آنجایی که ترکیبات گازی فرار تولید شده توسط آنتاگونیست می‌توانند براحتی از خلل و فرج خاک بگذرند و در ریزوسفر گیاه پخش شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که نقش و میزان این ترکیبات گازی در کنترل عامل بیماری می‌تواند بسیار کارآمد است باشد. ترشحات مایع خارج سلولی آنتاگونیست حتی در غلظت های کم تاثیر نسبتا خوب و در غلظت های بالای۳۰ درصد تاثیر شدیدی بر کاهش رشد میسیلیوم *R. solani* داشتند. در میان جدایه‌های بررسی شده، ترشحات جدایه تربت جام و نیشابور *P. oligandrum* به میزان قابل توجهی از رشد عامل بیماریزا در تشتک پتری کاستند. با این وجود بدلیل امکان جذب ترشحات مایع خارج سلولی توسط کلوئیدهای خاک و یا مواد محلول در محیط آبی، تاثیرترکیبات گازی درکنترل عامل بیماری در خاک بیشتر است. اگرچه با توجه به ارتباط هیفی مستقیم بین *P. oligandrum* و *R. solani* در شرایط خاک، ترشحات مایع خارج سلولی می توانند از رشد هیف ریزوکتونیا جلوگیری کرده و موجب تجزیه آن شود. همچنین بررسی های آزمایشگاهی نشان داد جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* قادر به تولید ترکیبات ممانعت کننده از رشد *R. solani* در خاک نیز می باشند. جدایه مشهد بیشترین مقدار متابولیت های ممانعت کننده از رشد را در خاک تولید کرد اما هنگامی که هردو اینوکولوم آنتاگونیست و *R. solani* به طور همزمان به خاک اضافه شدند تاثیری در افزایش تولید متابولیت های ممانعت کننده از رشد ریزوکتونیا توسط *P. oligandrum* که نشان دهنده تحریک بیشترآنتاگونیست توسط عامل بیماری باشد دیده

Archive of SID

www.SID.ir

نشد، همچنان که اضافه کردن ریشه چغندرقند به خاک نیز تاثیری برمیزان تولید ترکیبات ممانعت کننده از رشد ریزوکتونیا در خاک نداشت.

وجود ترکیبات مقاوم به حرارت ممانعت کننده از رشد در محیط کشتی که *P. oligandrum* برروی آن تشکیل کلونی داد، از نتایج جالب توجه در این تحقیق بود که برای اطمینان از صحت نتایج، این آزمایش چندین بار تکرار شد. کشت *R. solani* بر روی محیط کشتی که قبلا *P. oligandrum* برروی آن تشکیل کلونی داده بود، حتی پس از استریل شدن در اتوکلاو، باز هم در سطح بالایی از رشد *R. solani* جلوگیری کرد (جدول۱۰). جدایه های مختلف *P. oligandrum* نیز همگی در سطوح مختلفی قادر به تولید این ترکیبات بودند اما بیشترین تاثیر را از این حیث جدایه تربت جام داشت. آزمایش هایی با فرض‌های مختلف انجام شد تا علت قابل توجیهی جهت این ممانعت از رشد بیان شود. از جمله به عنوان مثال در آزمایشی، با این فرض که، دلیل بازدارندگی از رشد *R. solani* در این آزمون، مصرف مواد غذایی توسط *P. oligandrum* در محیط کشت مورد نظرمی‌باشد هنگامیکه بر روی محیط مورد نظر مجددا *P. oligandrum* کشت داده شد هیچ کاهش مشخصی در رشد آن بر روی محیط فوق مشاهده نشد. فرض دیگرمبنی بر این بود که محیط کشتی که قبلا *P. oligandrum* برروی آن تشکیل کلونی داده است در اثر اتوکلاوشدن دوباره و پس از انجماد دارای تغییراتی می شود که مواد آن برای *R. solani* قابل مصرف نیست. ولی هنگامی که محیط کشتی که هیچ قارچی بروی آن رشد داده نشده بود دوباره در اتوکلاو استریل شد، کلونی ریزوکتونیا بدون هیچ مشکلی بر روی آن رشد نمود. لذا با توجه به نتایج به دست آمده احتمالا بررسی بیوشیمیایی و آنالیز این ترکیبات می تواند حاوی اطلاعات ارزنده ای در زمینه های مختلف باشد که حتی فراتر از کاربرد آنها درکنترل بیولوژیک باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Abbasi A. 2000. Etiology of root and crown disease sugar beet fungi in Khorasan [M.Sc thesis]. [Mashad (Iran)]: Ferdowsi University.
2. Abbasi Moghadam A, Falahati Rastegar M and Jafarpour B. 1998. Etiology of sugar beet crown and root rot in Khorasan province. Paper presented at: 13th Iranian Plant Protection Congress; 23–27 August; Isfahan, Iran.
3. Baird RE, Bell DK, Sumner DR, Mullinix BG and Culbreath AK. 1993. Survival of *Rhizoctonia solani* AG4 in residual peanut shells in soil. Plant Disease 77: 973–975.
4. Benhamou N, Rey P, Picard K and Tirilly Y. 1999. Ultra structural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite, *Pythium oligandrum*, and soil-borne pathogens. Phytopathology 89: 506–517.
5. Benson DM and Baker R. 1974. Epidemiology of *Rhizoctonia solani* pre emergence damping-off of radish. Phytopathology 64: 1163–1168.
6. Brozova J. 2002. Exploitation the mycoparasitic fungus *pythium oligandrum* in plant protection. Plant Protection Science 1: 29–35.
7. Bugbee WM. 1982. Sugar beet disease research. Sugar Beet Research 12: 155–165.
8. Deacon JW. 1976. Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. Transaction British Mycological Society 66: 383–391.
9. Elad Y, Chet I and Katan J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 119–121.
10. Foley MF and Deacon JW. 1986. Susceptibility of *Pythium* spp. and other fungi to antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Soil Biology and Biochemistry 8: 91–95.
11. Goltappeh A, Pakdaman B and Rezaee-Danesh Y. 1999. Pest and disease of sugarbeet. Tehran: Tarbeet-e Modarres University Press.
12. Gray FA and Gerick JS. 1998. Biology and management of sugar beet diseases in the Bighorn and Wind River Basin of Wyoming. College of agricultural. University of Wyoming.
13. Hedjaroud Gh and Alizadeh A. 1971. *Rhizoctonia solani* Kuhn cause of sugarbeet root brown rot. Iranian Journal of Plant Pathology 6: 23–34. (In persian with english summary)
14. Herr LJ. 1976. In field survival of *Rhizoctonia solani* in soil and in diseased sugarbeets. Canadian Journal Microbiology 22: 983–988.
15. Howell CR and Stipanovic RD. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *R. solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. Phytopathology 85: 469–472.
16. Jacobsen BJ, Bergman J and Eckhoff J. 1999. Control of Rhizoctonia crown and root rot of sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. Sugarbeet Research and Exension Report 29: 278–280.
17. Kiewnick S and Jacobsen BJ. 2001. Antagonistic bacteria and fungicides for control of Rhizoctonia crown and root rot on sugar beet. Plant Disease 12: 30–37.
18. Kuninaga S and Yokosawa R. 1984. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. Genetic relatedness within AG-6. Annual Phytopathology Society Japan 50: 346–351.
19. Lutchmeah RS and Cooke RC. 1984. Aspects of antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Transaction British Mycological Society 83: 696–700.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Martin FN and Hancock JG. 1987. The use of *Pythium oligandrum* for biological control of damping-off caused by *P. ultimum.* Phytopathology 77: 1013–1020.
21. Martin FN. 1992. The genus Pythium. pp 39–49, *In* LL Singleton, JD Mihail and CM Rush (eds). Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press.
22. McQuilken MP, Whipps JM and Cooke RC. 1990. Control of damping off in cress and sugar-beet by commercial seed-coating with *P. oligandrum*. Plant Pathology 39: 452–462.
23. Momeni J, Falahati-Rastegar M and Jafarpour B. 2004. Evaluation of DNA polymorphism anastomosis group of *Rhizoctonia solani* in sugarbeet by using RAPD-pcr in Khorasan. Iranian Journal of Plant Pathology 4: 9–15.
24. Olaya G and Abawi GS. 1994. Influence of inoculums type and moisture on development of *Rhizoctonia solani* on foliage of table beets. Plant Disease 78: 805–810.
25. Onkar D and James B.1995. Basic plant pathology methods. London: Lewis publisher.
26. Paulitz TC and Belanger R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annuual Review Phytopathology 39: 103–133.
27. Plaats-Nitherink AJ. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 1–242.
28. Rahnama K and Cooke RC. 1998. Evaluation of mycoparasitism effect on oospore and sporangia of *Pythium ultimum* by *Pythium olygandrum.* Paper presented at: 13th Iranian Plant Protection Congress; 23–27 August; Karaj, Iran.
29. Shahiri-Tabarestani M. 2000. Investigation on biological control of sugar beet damping-off disease by some isolates of *Trichoderma harizanum*, *Glicladium* sp. and some Bacillus species [M.Sc thesis]. [Mashad (Iran)] Ferdowsi University.
30. Shahiri-Tabarestani M. Falahati-Rastegar M. Jafarpour B and Rohani M. 2005. Investigation on biological control of sugarbeet damping-off disease by some isolates of *Trichoderma harizanum* Rafai. Journal of sugarbeet 21: 57–75.
31. Truter M. 2005. Etiology and alternative control of Potato rhizoctoniasis in South Africa [M.Sc. thesis]. [Pretoria] University of Pretoria.
32. Vesely D and Koubova D. 1993. The effect of *Pythium oligandrum* on the health condition of winter wheat roots. Ochrana Rostlin 29: 193–202.
33. Vesely D. 1977. Potential biological control of damping-off pathogens in emerging sugar beet by *Pythium oligandrum* Drechsler. Phytopathology 90: 113–115.
34. Vesely R and Hejdanek S. 1984. Microbial relations of *Pythium oligandrum* and problems in the use of this organism for the biological control of damping off of sugar beet. Zentralblatt für Mikrobiologie 139: 257–262.
35. Vilgalys R. 1988. Genetic Relatedness among anastomosis groups in Rhizoctonia as measured by DNA/DNA hybridization. Phytopathology 78: 698–702.
36. Whipps JM, McQuilken MP and Budge SP. 1993. Use of fungal antagonist for biocontrol of damping-off and Sclerotinia disease. Pesticide Science 37: 307–319.
37. Yokoyama K and Ogoshi A. 1986. Studies on hyphal anastomosis of *Rhizoctonia solani*. Observation of imperfect fusion by light and electron microscopy. Mycological Society 27: 399–413.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of some antagonistic aspects of *Pythium oligandrum* (Dresch) for biological control of *Rhizoctonia solani* (Kuhn), the causal agent of sugar beet damping-off in laboratory

F. Farokhi[1], M. Hajian Shahri[2]*, M. Salari[3], H. Rohani[4]

Abstract

Sugar beet is among the most important crops in Iran. One of the main causes of the decline in sugar beet production is root rot, damping off and leaf blight caused by *R. solani* (Kuhn). Unfortunately, chemical control method against soil-borne fungi especially *R. solani* in sugar beet is not very effective. In this study the control of *R. solani* by antagonistic aspects of *P. oligandrum* using six isolates were studied under various laboratory methods including microscopic investigation of the relation of hyphae between antagonist and pathogen, food competition, the effect of volatile compounds, the effects of extracellular fluid secretion in cultured and heat-stable antifungal metabolites. Microscopic observations showed that *P. oligandrum* hyphae upon contact with *R. solani* hyphae wrapped around them, caused protoplast shrinkage which resulted in detachment of the protoplast from the cell walls of *R. solani*, also oospore formed on the hyphae of *R. solani*. The results of dual culture tests showed that Torbat-e-jam and Mashhad isolates of *P. oligandrum* had the most food competition with *R solani*. In volatile compounds tests using 36 hrs-old colony of the antagonist, the isolate of Torbat-e-jam had maximum inhibitory effect (56.41%) on *R. solani in vitro*. The extracellular fluids of isolate of Mashhad was %71.31 percent more effective than the control and concentrations of 30%, 40% and 50% extracellular fluid of isolates from Torbat-e-jam had the most growth inhibition on *R. solani* mycelium in culture medium, However there was no significant difference among the mentioned concentrations. Evaluation of efficiency of *P. oligandrum* in inhibition of mycelial growth of *R. solani* in soil showed that the most inhibition of mycelium growth of *R. solani* (32%) was occurred when soil was solely inoculated with *P. oligandrum*. The heat-resistant extracellular fluids of isolate of Torbat-e-jam were %71.36 percent more effective than the control in inhibiting the growth of *R. solani.*

Key words: Biological control, *P. oligandrum*, *R. solani*, sugar beet

Archive of SID

[1] - Research Instructor, Department of Plant Protection, Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, Iran.
[2] - Research Assistant Professor, Department of Plant Protection, Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, Iran.
[3] - Associate professor, Department of Plant Protection, Zabol University, Zabol, Iran.
[4] - Professor, Department of Plant Protection, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
*Corresponding author: mhag52570@yahoo.com

www.SID.ir