بررسی کارآیی *Pythium oligandrum* درکنترل بیولوژیک *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند در شرایط گلخانه

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

۱- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه زابل

۲- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۳- گروه گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

مسئول مکاتبات: محمد حاجیان شهری، پست الکترونیک: Mhag52570@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۰۱ ۷۱-۵۷ (۱) ۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۲۶

چکیده

چغندرقند، در ایران یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی به‌شمار می‌آید و بیماری مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و سوختگی برگ ناشی از *Rhizotonia solani* یکی از مهم‌ترین علل کاهش عملکرد آن می‌باشد. ازآنجایی که استفاده از روش شیمیایی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی موجب بروز مشکلات زیست محیطی عدیده‌ای می‌شود، لذا در این تحقیق، از شش جدایه‌ی *Pythium oligandrum* به‌دست آمده از خاک مزارع چغندرقند استان خراسان رضوی که در شرایط آزمایشگاه دامنه‌ی میانگین بازدارندگی‌شان از رشد *R. solani* ۳۲/۰۹ تا ۷۱/۳۶ درصد بود، استفاده شد و کارآیی آن‌ها در کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه‌ی ناشی از *R. solani* درگلخانه با شرایط متفاوت (روش‌ها و زمان‌های مختلف کاربرد آنتاگونیست در خاک سترون و غیرسترون) بررسی گردید. این تحقیق به‌صورت ۵ آزمایش جداگانه و هر یک در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با ۵ تا ۶ تیمار بر حسب آزمایش و ۴ تکرار انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در میان جدایه‌های مختلف آنتاگونیست، جدایه‌ی تربت جام بیشترین تأثیر را درکنترل بیماری مرگ گیاهچه داشته است. افزودن زادمایه *P. oligandrum* یک هفته قبل از *R. solani* به‌خاک، علاوه برافزایش میزان جوانه‌زنی بذر چغندرقند نسبت به شاهدآلوده، بیماری مرگ گیاهچه را نیز به‌ترتیب به‌میزان ۶۶ و۳۶ درصد در خاک سترون و غیرسترون کاهش داد. همچنین، در شرایط خاک سترون و غیرسترون، تیمار بذری متأثر از *P. oligandrum* در مقایسه با شاهد، به‌ترتیب به‌میزان ۶۴ و۴۳ درصد، وقوع بیماری مرگ گیاهچه را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، مرگ گیاهچه، پیتیوم، رایزوکتونیا

مقدمه

گونه‌ی *Beta vulgaris* L. از نظر تولید ساکارز، گونه‌ای منحصر به‌فرد است و به‌همین دلیل چغندرقند یکی از محصولات زراعی مهم دراکثر کشورهای مناطق معتدله و محصولی زمستانی در نواحی گرمسیری است (Letschert, 1994). یکی از مهم‌ترین علل کاهش تولید چغندرقند، آفات و بیماری‌های گیاهی چغندرقند است. بیماری پوسیدگی ریشه، مرگ گیاهچه و سوختگی برگ که توسط *Rhizoctonia solani* Kühn ایجاد می‌شود می‌تواند موجب مرگ گیاهچه قبل از سبزشدن شود ولی معمولاً گیاهچه‌ها را بعد از سبز شدن نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Harman *et al.*, 2000). نفوذ این پاتوژن، به گیاهچه‌ها از طریق منافذ طبیعی و یا زخم ها می‌باشد (Gray & Geric, 1998). *R. solani* نسبت به پارازیت شدن طبیعی توسط سایر میکروارگانیسم‌های خاک حساس است، اما این عمل در طبیعت در حد پایینی اتفاق می‌افتد (Jacobsen *et al.*, 1999). میکرو ارگانیسم‌های متعددی از خاک‌های زراعی جدا و شناسایی شده‌اند که قابلیت بیوکنترل آن‌ها روی این قارچ آزمایش شده است، در میان آن‌ها گونه‌هایی از قارچ‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترلی این بیماری شناسایی شده‌اند (Truter, 2005). جدایه‌هایی از قبیل گونه‌های *Trichoderma* spp. و همچنین

Gladiocladiom spp. توانایی آنتاگونیستی شدیدی علیه این قارچ دارند و باعث کاهش جمعیت هیف و اسکلروت *R. solani* در خاک می‌شوند (Howell. & Stipanovic, 1995 ; Elad *et al.*, 1980). همچنین اغلب جدایه‌های رایزوکتونیا که باعث بیماری بوته میری و مرگ گیاهچه در بین گیاهان مختلف می‌شوند از گروه‌های آناستوموزی AG3 یا AG4 می‌باشند (Baird *et al.*, 1993). در ایران، برای اولین‌بار میناسیان بیماری‌زائی قارچ *R. solani* را روی چغندر قند به اثبات رساند وآن‌را به‌عنوان عامل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند معرفی نمود (Momeni *et al.*, 2004). شهیری و همکاران (۱۳۸۵) کنترل بیولوژیک پوسیدگی رایزوکتونیایی چغندرقند توسط قارچ *Trichoderma* و چند باسیل آنتاگونیست دیگر را در گلخانه و آزمایشگاه بررسی و کاهش معنی‌دار بیماری را به‌وسیله‌ی این آنتاگونیست‌ها اعلام داشتند (Shahiri-Tabarestani *et al.*, 2005).

Pythium oligandrum Dreschler روی بسیاری از گونه‌های قارچی فعالیت مایکوپارازیتی دارد (Plaats-Nitherink, 1981). فعالیت آنتاگونیستی *P. oligandrum* یک فعالیت چند بعدی علیه گونه‌های قارچی مورد تهاجم است (Benhamou *et al.*, 1999). این قارچسان علاوه بر اثر مستقیم بر هیف قارچ‌های مورد تهاجم، توانایی کلونیزه کردن سطح گیاهان در ناحیه ریشه و حتی تحریک رشد آن‌ها را داراست و می‌تواند به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرارگیرد. انجام کنترل بیولوژیک توسط *P. oligandrum* نتیجه فرایند پیچیده‌ای است که شامل کنترل مستقیم بیماری یا تأثیر غیرمستقیم وابسته به *P. oligandrum* از طریق مقاومت القایی یا افزایش رشد میزبان است. این قارچسان ارتباط غیر معمولی با گیاهان دارد و به‌سرعت در بافت‌های ریشه نفوذ می‌کند اما نمی‌تواند در گیاه زنده بماند و بعد از کلونیزاسیون ریشه، با تحریک سیستم گیاهی میزبان، آن را در مقابل طیف زیادی از عوامل بیماری‌زا حفاظت می‌کند (Gerbore *et al.*, 2013). *P. oligandrum* از طریق تولید تریپتامین (ترکیب شبه اکسینی) و الیگاندرین (الیسیتورگلیکو پروتئینی) حفاظت گیاهان را از طریق بیوکنترل عوامل بیماری‌زا انجام می‌دهد (Vallance *et al.*, 2009). فرمولاسیون‌های تجاری مختلفی در نقاط مختلف جهان برای این منظور ساخته شده است که پلی‌ورسوم (Polyversoum) و پلی‌گاندرون (Polygandron) ازآن جمله‌اند (Brozova, 2002). علیرغم این که *P. oligandrum* یک قارچسان اوومیستی ساپروفیت و خاکزی است اما توانایی این را دارد که به‌عنوان یک انگل، قارچ‌های بیماری زای زیادی را آلوده کرده و روی هیف آن‌ها زندگی کند (Plaats-Nitherink, 1981; Deacon, 1976). He و همکاران (1992) در تحقیقات خود دریافتند که تیمار بذر گوجه‌فرنگی با اووسپور *P. oligandrum*، پوسیدگی بذر و بوته میری ناشی از *P. ultimum* و *R. solani* را به‌ترتیب ۷۹ ٪ و۶۴٪ کاهش می‌دهد. Takenaka و همکاران (2008) نشان دادند کلونیزاسیون منطقه‌ای ریزوسفر گوجه‌فرنگی توسط *P. oligandrum*، جمعیت باکتری *Ralestonia solanacearum* را در ریزوسفر گوجه‌فرنگی کاهش می‌دهد این موضوع نشان می‌دهد رقابت مکانی برای آلودگی و تغذیه‌ای در ریشه میزبان، مکانیزم اولیه بیوکنترل باکتری‌های عامل پژمردگی توسط *P. oligandrum* نیست. Martin & Hancock (1987) گزارش کردند که یک روز پس از کاشته شدن بذور چغندرقند در خاک آلوده به *P. ultimum*، ۷۷٪ از بذور تیمار نشده با جدایه‌ی آنتاگونیست *P. oligandrum* با عامل بیماری *P. ultimum* پوشانده شد، در حالی‌که، این میزان برای تیمارهای متأثر از آنتاگونیست *P. oligandrum* به ۱۰ درصد کاهش یافت. وی همچنین گزارش کرد که بذور تیمار شده بر رشد جوانه و گیاه تأثیر نمی‌گذارند و کاهش رشد در گیاه و نکروز بافت‌ها مشاهده نشده است. Whipps و همکاران (1993) از مطالعات خود نتیجه گرفتند که بوته میری چغندرقند ناشی از *R. solani* در محیط مصنوعی ماسه به‌وسیله‌ی تیمار بذر چغندرقند با اووسپور *P. oligandrum* کاهش می‌یابد و میزان کنترل بیماری در این بررسی برابر با سم پاشی با قارچ‌کش‌ها بود. Vesely (1978) دریافت که با استفاده از فرم تجاری *P. oligandrum* به‌نام پلی گاندرون، چغندرقند

گیاه سالم‌تری را به‌وجود می‌آورند که هم از نظر تعداد بذر جوانه زده و هم از لحاظ ارتفاع بوته و وزن تر در مقایسه با شاهد تیمار نشده بسیار متفاوت و در شرایط مناسب‌تری قرار دارد و اثر پلی گاندرون بر بیماری بوته میری چغندرقند تقریباً برابر با قارچ‌کش تیرام بوده است. رهنما و کوک (۱۹۹۸) بیولوژی *P. ultimum* و قارچسان انگل آن *P. oligandrum* را بررسی کرده و تخریب اندام‌های رویشی *P.ultimum* را توسط اپرسوریوم *P oligandrum*، به‌وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی نشان دادند. ایشان همچنین نتیجه گرفت که فعالیت آنزیم بتا-گلوکوناز در *P. oligandrum* باعث از بین رفتن مرحله‌ی زایشی و غیر جنسی *P.ultimum* می‌شود (Rahnama & Cooke, 1998). از آنجا که گزارش‌های فراوانی از تأثیر این انگل قارچسان بر قارچ رایزوکتونیا در محصولات مختلف از جمله چغندرقند وجود دارد، بنابراین می‌توان *P. oligandrum* را به‌عنوان یک عامل کنترل در مبارزه با بیماری بوته میری و مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* در نظرگرفت (Vesely, 1978 ;Vesely & Koubova, 1993 ; Vilgalys, 1988).

به‌دلیل خسارت سالانه ناشی از بیماری مذکور به‌محصول چغندرقند در ایران به‌ویژه در استان خراسان رضوی و عدم کارآیی روش‌های رایج کنترل، هدف از این تحقیق، دست‌یابی به‌روشی مؤثر برای کنترل این بیماری بود. بنابراین، نسبت به‌بررسی کارآیی جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* در کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه رایزوکتونیایی چغندرقند در شرایط گلخانه اقدام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی جدایه‌ی بیماری‌زای *R. solani*

جدایه‌ی *R. solani* (AG4) از موسسه‌ی تحقیقات چغندرقند کشور تهیه و به‌منظور اطمینان بیشتر، خالص سازی آن براساس روش نوک هیف انجام شد و زادمایه آن براساس روش Papavizes & Davey (1962) تهیه شد. اثبات بیماری‌زائی جدایه‌ی فوق براساس اصول کخ انجام و برای اندازه گیری میزان بیماری مرگ گیاهچه از روش Takenaka *et al.*, (2003) استفاده و برحسب نوع علائم بیماری، از صفر تا پنج به‌شرح ذیل نمره دهی شدند:

مرگ گیاهچه پیش از جوانه‌زنی(Pre emergence) نمره‌ی ۵

مرگ گیاهچه پس از جوانه‌زنی قبل از ۷ روز نمره‌ی ۴

مرگ گیاهچه پس از جوانه‌زنی بعد از ۷ روز نمره‌ی ۳

گیاهچه زنده با درصد پوسیدگی ریشه بالاتر از ۲۰٪ نمره‌ی ۲

گیاهچه زنده با پوسیدگی ریشه کمتر از ۲۰٪ نمره‌ی ۱

گیاهچه زنده با ریشه کاملاً سالم نمره‌ی صفر

جداسازی و شناسایی *P. oligandrum* از خاک مزارع چغندرقند

از خاک مزارع چغندرقند شهرستان‌های مشهد، نیشابور، سبزوار، تربت جام و چناران که از مناطق اصلی کشت چغندرقند استان خراسان رضوی هستند، تعداد ۵ مزرعه از هر شهر و در هر مزرعه از ۵ نقطه مختلف نمونه‌برداری انجام شد. کلیه‌ی نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی سیاه بسته‌بندی شده و تا زمان جداسازی در یخچال معمولی نگهداری شدند. از دو روش مختلف برای جداسازی *P. oligandrum* از خاک مزارع چغندرقند شامل کشت سری رقت‌های عصاره‌ی خاک و تله‌گذاری با قارچ *Fusarium culmurom* (W.G. Smith) Sacc استفاده شد (Foley & Deacon, 1986; Martin, 1992). تمامی جدایه‌های به‌دست آمده پیتیوم به‌روش نوک هیف خالص‌سازی شدند. جهت شناسایی جدایه‌های *P. oligandrum* از منابع شناسایی گونه‌های پیتیوم، براساس خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ، شکل و سرعت رشد پرگنه روی محیط CMA، قطر اووگونیوم، تیپ آنتریدی، شکل و قطر اسپورانژیوم و قطراووسپور استفاده شد (Plaats-Nitherink, 1981; Dick, 1990).

بررسی‌های گلخانه‌ای

در این بررسی، توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* در کنترل بیماری مرگ گیاهچه‌ی ناشی از *R. solani* در خاک سترون و غیرسترون، با به‌کارگیری آنتاگونیست به‌شکل پوشش بذر و اضافه کردن آن به‌خاک در زمان‌های مختلف ارزیابی شد.

بررسی کارآیی *P. oligandrum* درکنترل بیماری مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک سترون

برای تهیه‌ی زادمایه‌ی *P. oligandrum* براساس روش Fletcher و همکاران (1990) ابتدا ۵۰۰ گرم ارزن در ارلن یک لیتری ریخته و با آب مقطر حجم آن به یک لیتر رسانده‌شد. این مخلوط بر روی شعله‌ی ملایم برای مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد، سپس حدود ۲۰۰ گرم از این مخلوط به ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. برای جلوگیری از چسبیدن دانه‌های ارزن به همدیگر ۵ گرم کربوکسی‌متیل‌سلولز به ازاء هر کیلوگرم ارزن به آن‌ها اضافه و درب ارلن‌ها با پنبه و فویل آلومینیوم بسته شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر سترون گردید. پس از سرد شدن ارلن‌ها، در شرایط سترون به هر ارلن، چهار دیسک ۱۰ میلی‌متری از کلونی سه روزه *P. oligandrum* تکثیر شده بر روی CMA مایه‌زنی گردید. سپس، ارلن ها در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت سه هفته نگهداری شدند. پس از این مدت پوشش سفید رنگی سطح داخل ارلن را پوشاند که نشان دهنده‌ی رشد *P. oligandrum* بر روی دانه‌های ارزن بود و در ادامه از روش Papavizes & Davey (1962) برای تهیه‌ی زادمایه عامل بیماری‌زا استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار و چهار تکرار با اندکی تغییر براساس روش Chang (1993) انجام شد. برای انجام این آزمایش مقداری خاک مزرعه چغندرقند پس از الک شدن، دو بار و به فاصله‌ی یک روز به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر سترون گردید. تیمارها شامل دو تیمار شاهد آلوده و غیرآلوده و۶ جدایه‌ی آنتاگونیست بودند که به‌همراه عامل بیماری به‌صورت هم‌زمان به‌خاک اضافه شدند. تمام جدایه‌ها به‌نسبت وزنی ۳٪ به تفکیک با خاک گلدان‌ها مخلوط و عامل بیماری به‌نسبت وزنی ۲٪ به‌صورت اینوکولوم ماسه- ذرت به‌خاک گلدان‌ها اضافه شدند. خاک گلدان‌های تیمار شاهد غیرآلوده به‌نسبت وزنی ۳٪ با ارزن سترون مایه‌زنی نشده و به‌نسبت وزنی ۲٪ با مخلوط ۹:۱ ماسه و ذرت استریل مخلوط و تیمار شاهدآلوده شامل خاک سترون بود که به‌نسبت وزنی۲٪ با اینوکولوم *R. solani* و به‌نسبت ۳٪ وزنی با ارزن سترون مایه‌زنی نشده به‌صورت کامل مخلوط گردید. پس از آماده سازی گلدان‌ها در هرگلدان ۵ عدد بذر چغندرقند رقم رایج پائولینا در عمق ۳ سانتی‌متر کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و ۱۴ ساعت روشنایی در شبانه روز قرارگرفتند و هر۳ روز یک بارآبیاری شدند تا رطوبت مورد نیاز برای استقرار قارچ‌ها در خاک تأمین گردد. به‌مدت ۳۰ روز بررسی گلدان‌ها به‌صورت روزانه انجام گرفت و تعداد گیاهان جوانه نزده، تعداد گیاهچه‌هایی که پس از جوانه‌زنی دچار مرگ گیاهچه شده بودند و تعداد گیاهان سالم، یادداشت برداری شدند و در انتها درصد کنترل بیماری مرگ گیاهچه توسط *P. oligandrum* به‌وسیله‌ی فرمول (DC- DT) / DC×100 که در آن DC تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار شاهد، و DT تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار می‌باشد، محاسبه شد (Behboodi *et al*., 2005).

ارزیابی کارآیی مایه‌زنی *P. oligandrum* در زمان‌های مختلف بر شدت بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک سترون

ابتدا زادمایه عامل بیماری به‌ترتیبی که در آزمایش قبل گفته شد، تهیه گردید. زادمایه جدایه‌ی تربت جام آنتاگونیست نیز که طبق بررسی‌های آزمایشگاهی از قدرت بالایی در کنترل *R. solani* برخوردار بود مطابق روش ذکر شده در آزمایش قبل، تهیه شد. خاک مورد استفاده، خاک مزرعه چغندرقند بود که همانند روش قبل سترون گردید. هرگلدان با ۳۰۰ گرم از خاک فوق پر شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۶ تیمار و ۴ تکرار انجام و تیمارها به‌شکل زیر آماده شدند:

در تیمار اول (P+R) *P. oligandrum* (نسبت وزنی ۳٪) و *R. solani* (نسبت وزنی ۲٪) به‌صورت هم‌زمان به‌خاک سترون اضافه شدند. در تیمار دوم (P7+R) ابتدا خاک سترون به‌نسبت وزنی۳٪ با زادمایه *P. oligandrum* مخلوط و پس از مرطوب شدن خاک در دمای ۲۶درجه‌ی سلسیوس در تاریکی در انکوباتور قرار گرفت، پس از گذشت یک

هفته و مستقر شدن آنتاگونیست در خاک، خاک مذکور به‌نسبت وزنی ۲٪ با زادمایه *R. solani* مخلوط شد (Windels & Brantner, 2000)، در تیمار سوم (R7+P) ابتدا زادمایه *R. solani* به نسبت وزنی ۲٪ به خاک سترون اضافه گردید و پس از یک هفته نگهداری در دمای ۲۵درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور، زادمایه *P. oligandrum* به‌نسبت وزنی ۳٪ به‌خاک مزبور اضافه شد.

تیمار چهارم خاک حاوی آنتاگونیست به‌تنهایی بود که به‌نسبت وزنی ۳٪ با زادمایه *P. oligandrum* و به‌نسبت وزنی ۲٪ مخلوط ماسه و ذرت به‌خاک سترون اضافه گردید، به‌تیمار شاهد غیرآلوده (Control) نیز ارزن سترون مایه‌زنی نشده به‌نسبت وزنی ۳٪ و مخلوط ماسه و ذرت به‌نسبت وزنی ۲٪ اضافه شد. در تیمار شاهدآلوده (R.s.)، خاک سترون به‌نسبت وزنی ۲٪ با زادمایه *R. solani* و به‌نسبت ۳٪ وزنی با ارزن سترون مایه‌زنی نشده به‌طور کامل مخلوط گردید (Bytler, 1980).

پس از آماده‌سازی گلدان‌ها در هر گلدان ۵ عدد بذر چغندرقند رقم پائولینا در عمق ۳ سانتی‌متری سطح خاک کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و ۱۴ ساعت روشنایی در شبانه روز قرارگرفتند. هر ۳ روز آبیاری انجام شد تا رطوبت مورد نیاز برای استقرار میکروارگانیزم ها در خاک تأمین گردد. ارزیابی گیاهچه‌ها به‌منظور بررسی تأثیر *P. oligandrum* بر میزان کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در این آزمایش نیز همانند آزمایش قبل پس از ۳۰ روز انجام شد.

ارزیابی کارآیی مایه‌زنی *P. oligandrum* در زمان‌های مختلف بر شدت بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند ناشی از *R. solani* در خاک غیرسترون

این آزمایش همانند آزمایش قبلی در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۶ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. با این تفاوت که در این آزمایش از خاک غیرسترون مزرعه چغندرقند استفاده شد. تیمارها به‌طور کامل مطابق آزمایش قبل آماده گردیدند وگلدان‌ها در گلخانه نگهداری شدند. ارزیابی گیاهچه‌ها به‌منظور بررسی کارآیی *P. oligandrum* برکنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در این آزمایش پس از ۳۰ روز همانند آزمایش قبل انجام شد.

بررسی تأثیر پوشش بذر با اووسپر *P. oligandrum* برکنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک سترون

در این آزمایش میزان تأثیر پوشش بذر چغندرقند با اووسپور آنتاگونیست و اضافه کردن آنتاگونیست به‌خاک به‌صورت هم‌زمان در کاهش بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند در خاک سترون بررسی شد. جهت تکثیر قارچ *P. oligandrum* و تولید اووسپور از روش Lutchmeah & Cooke (1985) استفاده شد. پس از آماده سازی محیط فوق درون هر تشتک پتری، یک دیسک ۵ میلی متری از جدایه‌ی تربت جام *P. oligandrum* کشت شد و تشتک‌های پتری درون انکوباتور با دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز محیط کشت حاوی آنتاگونیست در اتاق کشت و زیر لامینار فلو برای مدت ۱۰ ساعت قرار داده شد تا به‌خوبی خشک گردید، سپس محیط فوق به‌وسیله‌ی هاون چینی به‌آرامی پودر شد و پودر حاصله با نسبت وزنی مساوی با آب مقطر سترون مخلوط و برای هر ۱۰۰ گرم محیط کشت یک گرم کربوکسی متیل سلولز به‌آن اضافه گردید تا چسبندگی آن افزایش یابد. برای هر بذر چغندرقند رقم پائولینا یک گرم از مخلوط فوق درون ظرف سترون ریخته شد و با بذرها به‌خوبی مخلوط گردید تا تمام سطح بذور با خمیر مذکور پوشیده شد. سپس بذور در زیر لامینار فلو قرار داده شدند تا به‌خوبی خشک شوند. به‌منظور تعیین تعداد اووسپور چسبیده به‌سطح هر بذر تعداد ۱۰ عدد بذر تیمار شده به‌طور تصادفی انتخاب و به‌یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون منتقل و به‌خوبی هم زده شدند تا اووسپورها از سطح بذر جدا شده و درون آب شناور شوند. سپس تعداد اووسپور در هر میلی لیتر این سوسپانسیون با لام گلوبول شمار شمارش شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی شامل ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. تیمار اول به‌عنوان شاهد شامل خاک سترون بود که با نسبت وزنی ۲٪ با مخلوط ماسه

و آرد ذرت سترون و با نسبت ۳٪ وزنی با ارزن سترون مایه‌زنی نشده کاملاً مخلوط گردید. تیمار R.s. نیز شامل خاک سترون بود که به‌نسبت وزنی ۲٪ با زادمایه *R. solani* و به‌نسبت ۳٪ وزنی با ارزن سترون مایه‌زنی نشده به‌خوبی مخلوط گردید، تیمار سوم آنتاگونیست (P.o) با مخلوط کردن خاک سترون با نسبت وزنی ۳ ٪ با زادمایه‌ی *P. oligandrum* و با نسبت ۲٪ وزنی با مخلوط ماسه و ذرت سترون آماده گردید، تیمار چهارم (R/soil +P/seed) شامل بذر پوشش داده شده با اووسپور *P. oligandrum* بود که در خاک سترون آلوده شده با زادمایه‌ی *R. solani* با نسبت ۲٪ کاشته شد. در تیمار پنجم (P+R/soil) آنتاگونیست و عامل بیماری با نسبت وزنی به‌ترتیب ۳٪ و ۲٪ به‌صورت هم‌زمان با خاک سترون مخلوط گردید. در هر گلدان ۵ عدد بذر در عمق ۳ سانتی‌متری کاشته شد. در این آزمایش نیز از جدایه‌ی تربت جام آنتاگونیست استفاده شد. گلدان ها در گلخانه با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و ۱۲ ساعت روشنایی در شبانه روز قرارگرفتند. ارزیابی گیاهچه‌ها به‌منظور بررسی تأثیر *P. oligandrum* بر میزان کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* نیز همانند آزمایش‌های قبل پس از ۳۰ روز انجام شد.

بررسی تأثیر پوشش بذر با اووسپور *P. oligandrum* بر کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک غیرسترون

این آزمایش همانند آزمایش قبلی به‌صورت طرح کاملاً تصادفی شامل ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام شد. با این تفاوت که در این آزمایش از خاک غیرسترون استفاده شد. تیمارها کاملاً مطابق آزمایش قبل آماده شدند. پس از آماده ساختن گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و۱۲ ساعت روشنایی در شبانه روز قرار داده شدند. ارزیابی گیاهچه‌ها به‌منظور بررسی تأثیر *P. oligandrum* بر میزان کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در این آزمایش نیز همانند آزمایش های قبل پس از ۳۰ روز انجام شد.

نتایج

آزمون بیماری‌زایی(AG4) *Rhizoctonia solani*

جدایه‌ی *R. solani* (AG4) تهیه شده از موسسه‌ی تحقیقات چغندرقند کشور نسبت به شاهد ۸۴/۴٪ بیماری‌زایی داشت. علائم بیماری شامل پوسیدگی بذر، پوسیدگی ریشه که از یک زخم در زیر ناحیه طوقه شروع شد و به سمت پایین ادامه یافت، همچنین، از بین رفتن ریشه‌های فرعی، ضعف گیاه، پوسیدگی طوقه و محور زیر لپه و گاهی اوقات پوسیدگی برگ‌های گیاهچه، پژمردگی و مرگ گیاهچه مشاهده گردید. میانگین تعداد گیاهچه سالم برای هرگلدان آلوده ۱/۵ و برای گلدان شاهد ۴/۵ محاسبه‌شد. پس از ضدعفونی وکشت گیاهچه‌هایی که در خاک آلوده به زادمایه‌ی *R. solani* کاشته شده ودر حین آزمایش دچار پوسیدگی بذر یا بوته میری شده بودند، *R. solani* جداسازی و شناسایی شد.

جداسازی آنتاگونیست *P. oligandrum* از خاک مزارع چغندرقند

در این مرحله، پنج جدایه از *P. oligandrum* جداسازی و شناسایی شدند. این جدایه‌ها عبارت بودند از: M (جدایه به‌دست آمده از مزرعه چغندرقند مشهد)، N (جدایه به‌دست آمده از مزرعه چغندرقند نیشابور)، S (جدایه به‌دست آمده از مزرعه چغندرقند سبزوار)، CH (جدایه به‌دست آمده از مزرعه چغندرقند چناران)، T (جدایه به‌دست آمده از مزرعه چغندرقند تربت‌جام) و SH (جدایه به‌دست آمده از کلکسیون قارچ‌های ایران متعلق به‌آقای دکتر بنی‌هاشمی از دانشگاه شیراز).

بررسی کارآیی *P. oligandrum* برکنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک سترون

کلیه جدایه‌های *P. oligandrum* در مقایسه با تیمار شاهدآلوده باعث کاهش بسیار معنی‌دار میزان مرگ گیاهچه و کنترل این بیماری در سطح احتمال خطای $P < 0.01$ شدند (جدول ۱).

جدول۱- تجزیه‌ی واریانس داده‌های حاصل از تأثیر جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* بر کنترل مرگ گیاهچه چغندرقند در خاک سترون.

Table 1. Analysis of variance of the data resulted from the effect of different isolates of *P. oligandrum* on sugarbeet damping-off disease control in sterile soil.

Source of Variance	Degree of Freedom (df)	Mean Square	
		Seedling Viability	%Damping-off Control
Treatment	7	5.57 **	91.4 **
Error	24	0.45	3.91

**= معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**= significant at p≤0.01.

مقایسه‌ی میانگین میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها و کنترل بیماری مرگ گیاهچه برای هر تیمار بر اساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد در جدول ۲ نشان داده شده است. کلیه‌ی جدایه‌های *P. oligandrum* نسبت به‌شاهدآلوده باعث افزایش زنده‌مانی گیاهچه‌ها شدند. چهار جدایه‌ی N (نیشابور)، S (سبزوار)، SH (شیراز) و CH (چناران) از لحاظ میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با هم نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند. جدایه‌ی T (تربت جام) و جدایه‌ی M (مشهد)، کارآیی بیش‌تری نسبت به‌جدایه‌های دیگر در افزایش میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها از خود نشان دادند (به‌ترتیب با میانگین ۳/۲۵ و ۳/۵۱ عدد گیاهچه سالم در هر گلدان) و در گروه آماری متفاوتی قرار گرفتند (جدول ۲). از نظر میزان کنترل بیماری مرگ گیاهچه نیز، جدایه‌های تربت جام و مشهد به‌ترتیب با ۵۳٪ و ۴۸٪ بیش‌ترین میزان کنترل بیماری را داشتند، سایر تیمارها نیز در گروه های آماری متفاوتی قرارگرفتند (جدول ۲).

بررسی کارآیی مایه‌زنی *P. oligandrum* در زمان‌های مختلف برکنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک سترون و غیرسترون

نتایج نشان دادند که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، میان تیمارها در خاک سترون و غیر سترون از لحاظ میزان زنده‌مانی گیاهچه ها و کنترل بیماری وجود دارد (جدول ۳).

جدول۲- مقایسه‌ی میانگین تأثیر جدایه‌های مختلف *P. oligandrum* برکنترل بیماری مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند در خاک سترون.

Table 2. Mean comparison of effectivness different isolates of *P.oligandrum* on control sugarbeet damping-off disease in sterile soil.

Treatment	Sterile Soil	
	Seedling Viability	Damping-off Control (%)
CH	1.75 c	33 c
M	2.51 d	48 d
N	2.25 c	39 c
S	1.75 c	26 c
T	3.25 d	53 d
SH	1.51c	28 c
Inoculated Control	0.75 b	0.00 b
Non Inoculated Control	4.50 a	92 a

در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه از نظرآماری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means with the same letter in cach column are not significantly different at P≤ 0.05.

جدول ۳- تجزیه‌ی واریانس داده‌های حاصل از کارایی تلقیح *P. oligandrum* در زمان‌های مختلف بر کنترل بیماری مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند در خاک سترون و غیرسترون.

Table 3. Analysis variance of the data resulted from efficacy of *P. oligandrum* inoculation at different times to control of sugarbeet damping-off disease in sterile and non sterile soil.

Source of Variance	Degree of Freedom (df)	Mean Sqaure			
		Sterile Soil		Non Sterile Soil	
		Seedling Viability	%Damping-off Control	Seedling Viability	%Damping-off Control
Treatment	5	13.25 **	200.95 **	6.22 **	69.57 **
Error	18	0.34	19.29	0.57	6.61

** = معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**=significant at P≤0.01.

مقایسه‌ی میانگین میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها براساس آزمون کم‌ترین اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار در خاک سترون در جدول ۴ نشان داده شده است. براساس نتایج، تیمار P.o. که شامل خاک حاوی آنتاگونیست به تنهایی بود، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت و بیشترین تعدادگیاهچه‌ی سالم در هر گلدان در این دو تیمار و کمترین آن در تیمار شاهدآلوده (R.s.) دیده شد، اضافه کردن زادمایه‌ی *P. oligandrum* و *R. solani* در خاک (P+R) به‌صورت هم‌زمان، اضافه کردن *P. oligandrum* به‌خاک هفت روز قبل از تلقیح *R. solani* (P7+R) و اضافه کردن *P. oligandrum* به‌خاک هفت روز قبل از تلقیح *R. solani* (P7+R) باعث افزایش معنی‌دار تعداد گیاهچه‌ی زنده نسبت به‌تیمارشاهدآلوده (R.s.) پس از ۳۰ روز شدند و اضافه کردن زادمایه‌ی *R. solani* به‌خاک یک هفته پیش از مایه‌زنی *P. oligandrum* (تیمار R7+P) نیز باعث از بین رفتن تمامی گیاهچه‌ها شد و تفاوت معنی‌داری با شاهدآلوده (R.s.) نداشت. مقایسه‌ی میانگین میزان کنترل بیماری مرگ گیاهچه در این آزمون نشان دهنده‌ی کاهش میزان بیماری درکلیه تیمارها نسبت به‌تیمار شاهدآلوده (R.s.) بود. بیشترین میزان کنترل بیماری در تیمارهای شاهد (Control) و P.o. به‌ترتیب با ۸۳ و ۹۱ درصد، وکمترین میزان کاهش بیماری مربوط به‌تیمار شاهدآلوده (R.s.) با صفردرصد اندازه‌گیری شد. تیمار P7+R و تیمار P+R نیز به‌ترتیب به‌میزان ۶۶ و ۴۷ درصد بیماری را کنترل کردند ولی تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار نبود وهردو تیمار در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴).

مقایسه‌ی میانگین‌های میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار در خاک غیرسترون نیز در جدول ۴ نشان داده شده است. در این آزمون میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها در سه تیمار P7+R، تیمار P.o. و P+R تفاوت معنی‌داری با شاهد (Control) نداشتند. تیمارR7+P باعث از بین رفتن تمامی گیاهچه‌ها شد و تفاوت معنی‌داری با شاهدآلوده (R.s.) نداشت. کمترین میزان بیماری در دو تیمار شاهد (Control) با ۹۸٪ و در تیمار P.o. با ۸۳٪ و بیشترین میزان بیماری در تیمارشاهدآلوده (R.s.) با صفردرصد اندازه‌گیری شد. تیمار P7 +R و تیمار P+R نیز به‌ترتیب ۳۶ و ۲۹ درصد بیماری را کنترل کردند ولی تفاوت بین آن‌ها معنی‌دار نبود وهر دو تیمار در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴).

بررسی اثر پوشش بذر با اووسپر *P. oligandrum* برکنترل بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* در خاک سترون و غیرسترون

اندازه گیری تعداد اووسپور چسبیده به‌هر بذر در این آزمون نشان داد که میانگین $۱/۲ \times ۱۰^{۳}$ عدد اووسپور *P. oligandrum* جدایه تربت جام به‌سطح هر بذر تیمار شده چسبیده بود. همچنین اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین تیمارها در خاک سترون و غیر سترون به‌لحاظ افزایش زنده مانی گیاهچه ها و کنترل بیماری دیده شد (جدول ۵).

جدول۴- مقایسه‌ی میانگین کارآیی تلقیح *P. oligandrum* در زمان‌های مختلف بر کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند در خاک سترون و غیرسترون.

Table 4. Mean comparison of efficacy of *P. oligandrum* inoculation at different times to sugarbeet damping-off disease control in sterile and non sterile soil.

Treatment	Sterile Soil		Non Sterile Soil	
	Seedling Viability	Damping-off Control (%)	Seedling Viability	Damping-off Control (%)
Control	4.75 c	91c	3.75 b	98 c
P.o.	4.75 c	83 c	4.25 b	83 c
R.s.	0.00 a	0.00 a	1.5 a	0.00 a
P+R	3.00 b	47 b	3.1 b	29 b
P7+R	3.75 b	66 b	3.1 b	36 b
R7+P	1.00 a	7 a	1.75 a	11 a

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون از نظرآماری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال $P \leq 0.05$ با هم ندارند.

Means with the same letter are in each column not significantly different at $P \leq 0.05$.

جدول ۵- تجزیه‌ی واریانس داده‌های حاصل از اثر پوشش بذر با اووسپر بر کنترل بیماری مرگ گیاهچه در خاک سترون و غیرسترون.

Table 5. Analysis of variance the data resulted from seed coating with oospore on control damping-off disease in sterile and non sterile soil.

Source of Variance	Degree of Freedom (df)	Mean Sqaure			
		Sterile Soil		Non Sterile Soil	
		Seedling Viability	Damping-off Control %	Seedling Viability	Damping-off Vontrol %
Treatment	4	11.75 **	213.18 **	5.57 **	74.96 **
Error	15	0.70	7.8	0.68	9.66

**=significant at P<0.01. **= معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول۶- مقایسه‌ی میانگین داده‌های حاصل از تأثیر بررسی اثر پوشش بذر با اووسپور بر کنترل بیماری مرگ گیاهچه در خاک سترون و غیرسترون.

Table 6. Mean comparison of the data resulted from seed coating with oospore on control damping-off disease in sterile and non sterile soil.

Treatment	Sterile Soil		Non Sterile Soil	
	Seedling Viability	%Damping-off Control	Seedling Viability	%Damping-off Control
Control	4.5 c	c 82	4.00 b	58 b
P.o.	5.00 c	90 c	4.25 b	76 b
R.s.	0.75 a	0 a	1.25 a	0 a
R/soil +P/seed	3.75 b	64 c	3.00 b	43 b
P+R/soil	3.00 b	47 b	3.25 b	38 b

در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه از نظرآماری تفاوت معنی داری در سطح احتمال $P\leq 0.05$ با هم ندارند.

Means with the same letter in each colmmn are not significantly different at $P\leq 0.05$

با شمارش تعداد گیاهچه‌های زنده در هر گلدان پس از ۳۰ روز، گروه‌بندی آماری براساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال۱٪ در خاک سترون انجام‌شد. مقایسه‌ی میانگین میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها در هر تیمار و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار در خاک سترون در این آزمون در جدول۶ نشان داده شده است. براساس نتایج، تیمار .P.o که شامل خاک حاوی آنتاگونیست به‌تنهایی بود، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت و بیشترین تعدادگیاهچه سالم در هر گلدان در این دو تیمار، وکمترین تعدادگیاهچه سالم در هر گلدان در تیمار شاهدآلوده (.R.s) دیده شد. تیمارهای بذر پوشش داده شده با اووسپور آنتاگونیست همراه با تلقیح عامل بیماری در خاک (R/soil +P/seed) و خاک تلقیح شده با آنتاگونیست و عامل بیماری (P+R/soil) باعث زنده‌مانی گیاهچه‌ها به‌ترتیب با میانگین ۳/۷۵ و۳ عدد گیاهچه جوانه زده شدند. نتایج مقایسه‌ی میانگین میزان کنترل بیماری نیز در این آزمون نشان داد، بیشترین میزان بیماری در تیمار شاهدآلوده (.R.s) و کمترین میزان بیماری در تیمار .P.o دیده شد. در این آزمایش تیمار بذر پوشش داده شده با اووسپور آنتاگونیست و عامل بیماری (R/soil +P/seed) به‌میزان ۶۴٪ باعث کنترل بیماری نسبت به‌تیمار شاهدآلوده (.R.s) شد، و تأثیر این تیمار، به‌لحاظ آماری$P<0.01$ از تأثیر تیمار .P.o در کنترل بیماری کمتر بود. مقایسه‌ی میانگین میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار براساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال$P<0.01$ در خاک غیرسترون نیز در جدول ۶ نشان داده شده است. در این آزمون میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها در سه تیمار بذر پوشش داده شده با اووسپور آنتاگونیست و عامل بیماری (R/soil +P/seed)، تیمار خاک تلقیح شده با آنتاگونیست و عامل بیماری (P+R/soil) و تیمار .P.o خاک

حاوی آنتاگونیست به‌تنهایی، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند. همچنین مقایسه‌ی میانگین میزان کنترل بیماری نیز در این آزمون نشان دهنده‌ی کاهش میزان بیماری درکلیه تیمارها نسبت به‌تیمار شاهدآلوده (R.s.) بود، و سه تیمار R/soil +P/seed، P+R/soil و P.o تفاوت معنی‌داری با شاهد (Control) نداشتند.

بحث

R. solani (AG4) در بین گروه‌های آناستاموزی رایزوکتونیا عامل اصلی مرگ گیاهچه محصولات مختلف ازجمله چغندرقند می‌باشد (Truter, 2005); Sneh, *et al*., 1991; Kuninaga *et al*., 1979 و Benson & Baker,1974). این گروه آناستاموزی از مهمترین عوامل مرگ گیاهچه چغندرقند در استان خراسان رضوی است و خسارت شدیدی به‌تولید چغندرقند در استان وارد می‌کند (Momeni *et al*., 2004).

در آزمون بیماری‌زایی که روی چغندرقند انجام شد، جدایه‌ی *R. solani* (AG4) بیماری‌زایی شدیدی از خود نشان داد، تا حدی که در برخی موارد، بیماری منجر به‌مرگ گیاهچه پیش از جوانه‌زنی و باعث پوسیدگی بذر شد. بنابراین برای کنترل بیولوژیک چنین قارچی، آنتاگونیست نیز باید از قدرت بالایی برخوردار باشد تا بتواند آن را مهار کند. اگرچه *P. oligandrum* یک گونه قارچسان دائمی در خاک رایزوسفر چغندرقند نیست (Mc Quilken *et al*., 1990) اما این قارچسان در خاک‌های استان خراسان رضوی موجود است و به‌نظر می‌رسد با شرایط اکولوژیکی خاک‌های این استان سازگار شده است زیرا از تمام نمونه‌های خاک گرفته شده از رایزوسفر چغندرقند در مزارع شهرهای مختلف استان خراسان رضوی جداسازی شد.

در این تحقیق تمامی آزمایش‌ها در گلخانه و در خاک سترون و غیرسترون انجام شدند که شرایط آزمایش تا حدودی به‌شرایط خاک مزرعه نزدیک‌تر گردد، به‌جز آزمون مقایسه‌ی کارایی جدایه‌های *P. oligandrum* در کنترل بیماری مرگ گیاهچه که فقط در خاک سترون اجرا شد زیرا این جدایه‌ها از خاک مزارع چغندرقند شهرستان‌های مختلف استان جدا سازی شدند و امکان داشت در خاک غیرسترون وجود سایر میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و بر هم کنش آن‌ها منجر به ارزیابی نادرست کارایی این جدایه‌ها شود. در این آزمون جدایه‌ی‌های تربت جام و مشهد، کارآیی بیش‌تری نسبت به‌جدایه‌های دیگر در افزایش میزان زنده‌مانی گیاهچه‌ها و کنترل مرگ گیاهچه از خود نشان دادند این دو جدایه در بررسی‌های آزمایشگاهی نیز کارآیی بیشتری در کنترل *P. oligandrum* از خود نشان داده بودند (Farrokhi *et al*., 2014).

در آزمون بررسی کارآیی مایه‌زنی *P. oligandrum* در زمان های مختلف برکنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* در خاک سترون و غیرسترون، اضافه کردن زادمایه *P. oligandrum* به‌خاک در شرایط سترون چه به‌صورت هم‌زمان با عامل بیماری و چه به‌صورت اضافه شدن آن یک هفته قبل از زادمایه عامل بیماری باعث کاهش میزان بیماری مرگ گیاهچه نسبت به‌شاهدآلوده (R.s.) گردید. تأثیر *P. oligandrum* در کاهش میزان بیماری مرگ گیاهچه هنگامی که یک هفته قبل از *R. solani* به‌خاک اضافه گردید تا حدی از تأثیر افزودن آنتاگونیست به‌صورت هم‌زمان با عامل بیماری بیشتر بود که احتمالاً به‌دلیل استقرار بهتر آنتاگونیست در خاک نسبت به‌عامل بیماری می‌باشد ولی این تفاوت در کارآمدی دو تیمار کمتر از حدی بود که از لحاظ آماری معنی‌دار باشد. هنگامی که زادمایه‌ی *R. solani* یک هفته زودتر از زادمایه‌ی *P. oligandrum* به‌خاک اضافه شد، تمامی گیاهچه‌ها پس از ۳۰ روز از بین رفتند و شدت بیماری حتی نسبت به‌تیمار شاهد آلوده (R.s.) افزایش یافت. این مسئله نیزاحتمالاً به‌دلیل استقرار بهتر *R. solani* در خاک سترون و کلونیزاسیون سریع خاک گلدان بوده است، در نتیجه *P. oligandrum* قادر به‌کنترل حجم زیاد بیومس *R. solani* در خاک نشده است، تحقیقات Fletcher و همکاران (1990) نیز احتمال این موضوع را تأیید می‌کند. در خاک غیرسترون افزودن زادمایه عامل بیماری به‌خاک به‌صورت هم‌زمان با آنتاگونیست و به‌صورت تقدم ۷ روزه آنتاگونیست نسبت به‌عامل بیماری منجر به‌کاهش کاهش بیماری مرگ گیاهچه

گردید ولی این‌بار هیچ تفاوتی مشخصی بین میزان بیماری در تیمار تلقیح هم‌زمان آنتاگونیست و عامل بیماری با تیمار تقدم هفت روزه آنتاگونیست دیده نشد، احتمالاً در خاک غیرسترون *P. oligandrum* با سرعت کمتری موفق به اشغال محیط خاک میگردد که ناشی از وجود سایر میکروارگانیسم‌ها در خاک می‌باشد. همچنین در خاک غیرسترون، اضافه کردن عامل بیماری هفت روز پیش از *P. oligandrum* نسبت به‌خاک سترون باعث کاهش میزان بیماری گیاهچه شد. احتمالاً این مسئله ناشی از ناتوانی *R.solani* در رقابت با سایر میکروارگانیسم ها در خاک غیرسترون و کلونیزه شدن تمام فضاهای خالی رخ داده است زیرا *R. solani* در هنگام ورود به‌خاک برخلاف شرایط خاک سترون برای اشغال فضاهای خاک و رسیدن به‌ریشه باید با میکروارگانیسم های خاک رقابت می‌کرد، اما با این وجود به‌دلیل تلقیح زودتر عامل بیماری در خاک نسبت به‌آنتاگونیست شدت مرگ گیاهچه در میزان بالایی قرارداشت و با شاهدآلوده (R.s.) تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۴). اضافه کردن زادمایه آنتاگونیست به‌تنهایی نیز، چه در خاک سترون و چه در خاک غیرسترون موجب کاهش جوانه‌زنی گیاهچه چغندرقند نشد، که نشان دهنده عدم تأثیر سوئ این آنتاگونیست در جوانه‌زنی بذر و استقرار گیاهچه چغندرقند می باشد.

در آزمون بررسی اثر پوشش بذر با اووسپور *P. oligandrum* برکنترل بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani*، در خاک سترون، تیمارهای R/soil +P/seed و اضافه کردن زادمایه آنتاگونیست به‌خاک هردو باعث کاهش میزان بیماری مرگ گیاهچه شدند ولی تیمار R/soil + P/seed تأثیر بیشتری در کنترل بیماری از خود نشان داد، ولی میزان این تأثیر در افزایش زنده‌مانی گیاهچه‌ها معنی‌دار نبود اما در مورد کاهش شدت بیماری تیمار R/soil +P/seed به‌طور معنی‌داری نسبت به‌اضافه شدن آنتاگونیست به‌خاک در کنترل بیماری مؤثرتر بود، این نتایج با تحقیقات He و همکاران (1992) مطابقت دارد. در خاک غیرسترون برخلاف خاک سترون دو تیمار R/soil +P/seed و اضافه کردن زادمایه آنتاگونیست به‌خاک در کنترل بیماری تفاوت چندانی نشان ندادند، هرچند تیمار R/soil +P/seed در حد بسیارکمی نسبت به‌اضافه کردن آنتاگونیست به‌خاک در کاهش شدت بیماری مؤثرتر بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود. در خاک غیرسترون، تیمارهای R/soil +P/seed و *P.o.* با شاهد در یک گروه آماری قرارگرفتند که این مساله احتمالاً ناشی از تأثیرآنتاگونیست بر کنترل بیشتر بیماری نیست بلکه می‌تواند به‌علت جوانه‌زنی کمتر بذر در تیمارشاهد، به‌دلیل وجود میکروارگانیسم‌های مختلف در خاک غیرسترون رخ داده باشد، به‌همین دلیل نیز در خاک غیرسترون نسبت به‌خاک سترون، بهبود وضعیت جوانه‌زنی تیمار خاک حاوی آنتاگونیست نسبت به‌شاهد به‌صورت مشخص تری نمود پیدا کرد، زیرا احتمالاً *P. oligandrum* باعث کنترل میکروارگانیسم‌ها، در خاک غیرسترون شده است.

در نتیجه‌گیری کلی، در این تحقیق نشان داده شد که تمامی جدایه‌های *P. oligandrum* جداسازی شده از خاک‌های مزارع چغندرقند استان باعث کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند شدند اما میزان این تأثیر متفاوت بود، جدایه‌های تربت جام و مشهد، که در بررسی‌های گلخانه‌ای بیشترین میزان کنترل بیماری را داشتند، در بررسی‌های آزمایشگاهی نیز بیشترین تأثیر را در آزمون های رقابت تغذیه‌ای، تولید ترکیبات گازی فرار و ترشح متابولیت‌های خارج سلولی، در کاهش رشد *R. solani* را نشان دادند، در شرایط گلخانه نیز نتایج تأثیر شیوه‌های مختلف بکارگیری *P. oligandrum* برای یک کنترل موفق بیولوژیک رضایت بخش به‌نظر می‌رسد و *P. oligandrum* قادر به‌کنترل *R. solani* در آزمون‌های گلخانه‌ای بود. لذا با توجه به‌حضور این قارچ در خاک مزارع استان خراسان رضوی، تحقیق در زمینه چگونگی افزایش جمعیت این قارچ مایکوپارازیت در خاک‌های زراعی استان احتمالاً منجر به‌کاهش خسارت بسیاری از بیماری‌های قارچی خاکزاد از جمله مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* خواهد شد.

References

Baird, R.E., Bell, D.K., Sumner, D.R., Mullinix, B.G. & Culbreath, A.K. 1993. Survival of *Rhizoctonia solani* AG 4 in residual peanut shells in soil. Plant Disease, 77: 973-975.

Behboodi, K., Sharifi-Tehrani, A., Hedjarood, G. & Zaad, J. 2005. Antagonistic effects of Trichoderma species on *Phytophthora capsici*, the causal agent of pepper root and crown rot. Iranian journal of Plant Pathology, 41: 345-362. (In Persian with English summary).

Benhamou, N., Rey, P., Picard, K. & Tirilly, Y., 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite, *Pythium oligandrum*, and soilborne pathogens. Phytopathology, 89: 506–517.

Benson, D.M, & Baker, R. 1974. Epidemiology of *Rhizoctonia solani* pre emergence damping-off of radish. Phytopathology, 64: 1163-1168.

Brozova, J. 2002. Expolitation the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. Plant Protection Science, 1: 29-35.

Bytler, E.E. 1980. A method for long-time culture storage of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 70: 820-821.

Chang, T. 1993. Investigation and pathogenicity tests of Pythium species from rhizospher of *Cinnamomum osmophiloeum*. Plant Pathology, 2: 66-70.

Deacon, J.W. 1976. Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. Transaction British Mycological Society, 66: 383-391.

Dick, M.W. 1990. Keys to Pythium. White knights: College of Estate Management. White knights, Reading, RG6 2AW, 64 pp.

Elad, Y., Chet, I. & Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 70: 119-121.

Farrokhi, F., Hajian-Shahri, M., Salari, M. & Rouhani, H. 2014. Evaluation of some antagonistic aspects of *Pythium oligandrum* (Dresch) for biological control of Rhizoctonia solani (Kuhn) causal agent of sugar beet damping-off in laboratory, Quarterly Journal of Research in Plant Pathology. (In Press) (In Persian with English summary).

Fletcher, J.T., Smewin, B.J. & O'Brien, A. 1990. *Pythium oligandrum* associated with a cropping disorder of *Agaricus bisporus*. Plant Pathology, 39: 603–605.

Foley, M.F. & Deacon, J.W. 1986. Susceptibility of *Pythium* spp. and other fungi to antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Soil Biology and Biochemistry, 18: 91–95.

Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C. & Rey, P. 2013. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. Environmental Science Pollution Research, 1: 1-16.

Gray, F.A. & Geric, J.S. 1998. Biology and management of sugar beet diseases in the Bighorn and Wind River Basin of Wyoming: College of agricultural.University of Wyoming Press, Wyoming.

Harman, G.E., Chet, I. & Baker, R. 2000. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp or *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 70: 1167-1172.

He, S.S., Zhang, B. X. & Ge, Q.X. 1992. On the antagonism by hyperparasite *Pythium oligandrum*. Acta Phytopathologica, 22: 77-82.

Howell, C.R. & Stipanovic, R.D. 1995. Mechanisms in the damping off in cress and sugarbeet by commercial seed-coating by *Gliocladium virens*: antibiosis. Phytopathology, 85: 469–472.

Jacobsen, B.J., Bergman, J. & Eckhoff, J. 1999. Control of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugarbeet with fungicides and antagonistic bacteria. Sugar Beet Research Extension Expreimental, 29: 278-280.

Kuninaga, S., Yokosawa, R. & Ogoshi, A. 1979. Some Properties of anastomosis group 6 and BI in *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Phytopathology Society Japan, 45: 207-217.

Letschert, J.P. 1994. Taxonomy of *Beta* section *Beta*. Journal of Sugar Beet Research, 31: 69-85.

Lutchmeah, R.S. & Cooke, R.C. 1985. Pelleting of seed with the antagonist *Pythium oligandrum* for biological control of damping-off. Plant Pathology, 34: 528-531.

Martin, F.N. 1992. The genus Pythium. pp. 39–49. In: Singleton, J. D. Mihail & C. M. Rush, (eds.), Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi. APS Press, St Paul, MN.

Martin, F.N. & Hancock, J.G. 1987. The use of *Pythium oligandrum* for biological control of damping-off caused by *P. ultimum.* Phytopathology, 77: 1013-1020.

McQuilken, M.P., Whipps, J.M. & Cooke, R.C. 1990. Control of damping off in cress and sugar-beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. Plant Pathology, 39: 452–462.

Momeni, j., Falahati-Rastegar, M. & 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 (In Persian with English summary)

Papavizes, G.C., & Davey, C.B. 1962. Isolation and pathognicity of *Rhizoctonia* aprophytically exiting in soil. Pythopothology, 52: 834-840.

Plaats-Nitherink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, 21: 1-242.

Rahnama, K. & Cooke, R.C. 1998. Evaluation of mycoparasitism effect on oospore and sporangia of *P. ultimum* by *P. oligandrum.* Proceeding of the 13th Iranian Plant Protection Congress, 23-27 August. Karaj-Iran, p. 302.

Shahiri-Tabarestani, M., Falahati-Rastegar, M., Jafarpour, B. & 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 (In Persian with English summary).

Sneh, B., Burpee, L. & Ogoshi, A. 1991. Identification of Rhizoctonia Species. APS Press, St Paul, MN.

Takenaka, S., Nishio, Z. & Nakamura, Y. 2003. Induction of defense reactions in sugarbeet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum.* Phytopathology, 10: 1028-1032.

Takenaka, S., Sekiguchi, H., Nakaho, K., Tojo, M., Masunaka, A. & Takahashi, H. 2008. Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser-scanning microscopy. Phytopathology, 98: 187-195.

Truter, M. 2005. Etiology and alternative control of potato rhizoctoniasis in south Africa. M.Sc. thesis. Department of Microbiology and Plant Pathology. Univercity of Pretoria.

Vallance, J., Le Floch, G., Levesque, C.A., Deniel, F., Rey, P. & Barbier, G. 2009. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. Appplied and Environmental Microbiology, 14: 4790–4800.

Vesely, D. 1978. Parasitic relationships between *Pythium oligandrum* and some other species of the oomycetes class. Zentralblatt für Bakteriologie, 133: 341-349.

Vesely, D. & Koubova, D. 1993. The effect of *Pythium oligandrum* on the health condition of winter wheat roots. Ochrana Rostlin, 29: 193-202.

Vilgalys, R. 1988. Genetic Relatedness among anastomosis groups in Rhizoctonia as measured by DNA/DNA hybridization. Phytopathology, 78: 698-702.

Whipps, J.M., McQuilken, M.P. & Budge, S.P. 1993. Use of fungal antagonist for biocontrol of damping-off and sclerotiana disease. Pesticide Science, 37: 307-319.

Windels, C.E. & Brantner, J.R. 2000. Band and broadcast-applied quadrics for control of Rhizoctonia on sugar beet. Journal of Sugarbeet Research, 30: 266-270.

The efficacy of *Pythium oligandrum* in the biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of sugar beet damping-off under greenhouse conditions

Fariborz Farrokhi [1], Mohammad Hajian Shahri[2], Mohammad Salari[1], Hamid Rouhani[3]

1. Department of Plant Protection, Zabol University, Zabol, Iran

2. Department of Plant Protection, Khorasan Razavi Agriculture and Natural Resource Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, Iran

3. Department of Plant Protection, Ferdowsi University, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, Iran

Corresponding author: Mohammad Hajian Shahri, email: Mhag52570@yahoo.com

Received: April, 21, 2014 3 (1) 57-71 Accepted: August, 17, 2015

Abstract

Sugar beet is one of the most important crops in Iran. Damping-off, root rot and leaf blight diseases caused by *Rhizoctonia solani* (Kuhn) rank first in sugar beet yield reduction. Since soilborne fungi chemical control have ecological consecutions, therefore in this study, six strains of *Pythium oligandrum* were isolated from sugar beet fields soil in Khorasan Razavi province to be used as biological control agents. These isolates have already shown 32.09-71.36inhibitory effect on *R. solani* under laboratory conditions. Selected isolates were evaluated using pasteurized and non-pasteurized soil under greenhouse conditions, by adding antagonistic fungi to the soil and seed coating with oospore (seed treatment) methods. This study was consisted of five separate experiments with five to six treatments each with four replicates. All experimrnts were conducted in a randomized complete block desgin. The results showed that among the antagonists Torbat-jam isolate had the most reducing effects on sugar beet damping-off disease. Adding *P. oligandrum* inoculum to the soil containing *R. solani* increased sugarbeet seed germination compared to the control and reduced the damping-off disease in both pasteurized and non-pasteurized soil by 66% and 36% respectively. Sugarbeet seed coating by oospores of *P. oligandrum* increased sugarbeet seed germination while reduced damping-off disease in both pasteurized and non-pasteurized soil by 64 and 43% respectively.

Keywords: sugar beet, damping-off, *Rhizoctonia solani*, *Pythium oligandrum*