کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *Rhizoctonia solani* AG-2-2 با استفاده از تیمار بذور با قارچ‌های اندوفیت و ترکیبات القاء کننده مقاومت

الهام کریمی[۱]، ناصر صفایی[۲]*، مسعود شمس بخش[۳] و سیدباقر محمودی[۴]

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲*- **نویسنده مسوول:** دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، (nsafaie@modares.ac.ir)

۳- دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، کرج

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۵

چکیده

بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *Rhizoctonia solani* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند است که خسارت‌های اقتصادی زیادی به تولیدکنندگان این محصول وارد می‌کند. در این تحقیق، توانایی بیوکنترلی ۱۶ جدایه تریکودرما و یک جدایه *Piriformospora indica* مقابل *R. solani* AG-2-2 در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. از بین جدایه‌های مورد بررسی دو جدایه *Trichoderma harzianum* 65 و 60 *Trichoderma viride* موثرترین آنتاگونیست‌ها در شرایط درون شیشه‌ای بودند و توانستند در آزمون‌های کشت متقابل و تولید مواد خارج سلولی از رشد میسلیوم بیمارگر جلوگیری کنند. با این حال، بیشترین درصد کنترل بیماری در گلخانه توسط جدایه *T. harzianum* 65 با ۷۳/۶ درصد به دست آمد که اثر یکسان با تیمار قارچ‌کش (کربوکسین-تیرام) در کنترل بیماری داشت و تیمار *P. indica* با درصد کنترل بیماری ۶۹/۸ در رتبه بعدی قرار داشت. تیمار بذور چغندرقند با این دو قارچ رشد گیاهان را بهبود بخشید و وزن تر ریشه گیاهچه‌ها را افزایش یافت. همچنین، کارایی غلظت‌های متفاوتی از سه ترکیب القاء کننده مقاومت BABA، MeJA و SA برای کنترل *R. solani* AG-2-2 در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین مقدار کنترل بیماری زمانی مشاهده شد که بذور با غلظت ۱۰ میلی‌مولار BABA و غلظت ۱ میلی‌مولار MeJA تیمار شدند که احتمالا این ترکیبات با القاء مکانیسم‌های دفاعی چغندرقند مقاومت گیاهچه‌ها را به *R. solani* AG-2-2 افزایش داده‌اند. این اولین گزارش از کنترل بیماری رایزوکتونیایی مرگ گیاهچه چغندر قند با استفاده از *P. indica* و سه ترکیب القاء کننده مقاومت BABA، MeJA و SA می‌باشد.

کلید واژه‌ها: بیوکنترل، *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma viride*، *Piriformospora indica*، بتا-آمینوبوتیریک اسید، متیل جازمونات، اسید سالسیلیک

مقدمه

بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *Rhizoctonia solani* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند است که خسارت‌های اقتصادی زیادی به تولیدکنندگان این محصول وارد می‌کند (ویتنی و دوفوس[۱]، ۱۹۸۶). جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی (Anastomosis group; AG) ۱، ۲-۲ و ۴ باعث مرگ گیاهچه چغندرقند می‌شوند که از بین آن‌ها گروه‌های ۲-۲ و ۴ توان بیماریزایی بالاتری دارند

1- Whitney & Duffus

(ویندیس و نابن[1]، ۱۹۸۹). کنترل این بیماری به دلیل عدم وجود ارقام تجاری مقاوم و حساس بودن اکثر ارقام با عملکرد بالا بسیار مشکل است. از این رو، روش متداول کنترل این بیماری پوشش بذور با قارچ‌کش‌ها می‌باشد (والر[2]، ۱۹۸۸) ولی نگرانی‌های زیست محیطی و ایجاد نژادهای مقاوم به قارچ‌کش محدودیت‌های استفاده از این ترکیبات را افزایش داده است (گرهاردسون[3]، ۲۰۰۲). بنابراین، روش‌های مبتنی بر کاربرد میکروارگانیسم‌های سودمند، کنترل بیولوژیکی، (ویپس[4]، ۲۰۰۱، ولبوم و همکاران[5]، ۲۰۰۴) و القاء پاسخ-های دفاعی گیاه که می‌تواند به سطح بالایی از حفاظت بادوام گیاهان مقابل بیمارگرها منجر شود (هامرشمیخ و همکاران[6]، ۲۰۰۱) و سازگار با محیط زیست و سلامتی انسان هستند می‌توانند جایگزین سموم شیمیایی مضر شوند.

گونه‌های قارچی زیادی به عنوان عوامل بیوکنترل گزارش شده‌اند ولی گونه‌های تریکودرما به دلیل رشد سریع و توانایی کنترل بیمارگرهای قارچی متنوع به صورت گسترده در کنترل بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (ویپس و لومسدن[7]، ۲۰۰۱). یکی از ویژگی‌های بارز اعضای جنس تریکودرما توانایی پارازیته کردن سایر قارچ‌ها، معروف به میکوپارازیت، است که با تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و ترکیبات سمی دیگر می‌توانند قارچ‌های هدف را از بین ببرند (بنیتز و همکاران[8]، ۲۰۰۴؛ چت[9]، ۱۹۸۷؛ هول[10]، ۲۰۰۳). آن‌ها همچنین می‌توانند آنتی‌بیوتیک‌ها، پپتابیول‌ها و ترکیبات فعال زیستی دیگری تولید کنند که اثر آنتی‌بیوز دارند (موخرجی و همکاران[11]، ۲۰۱۲؛ وینال و همکاران[12]، ۲۰۰۶؛ ویست و همکاران[13]، ۲۰۰۲). بنابراین، میکوپارازیتیسم و آنتی‌بیوز به عنوان مکانیسم‌های اصلی بیوکنترل برای گونه‌های تریکودرما در نظر گرفته شده‌اند (هول، ۲۰۰۳؛ هول، ۲۰۰۵؛ هارمن و شورش[14]، ۲۰۰۷؛ ورما و همکاران[15]، ۲۰۰۷). رقابت برای فضا و مواد غذایی با دیگر میکروارگانیسم های موجود در ریزوسفر و نیز رقابت برای ترشحات بذور که باعث القاء جوانه‌زنی پروپاگول‌های قارچ‌های بیماریزای گیاه می‌شوند یکی دیگر از مکانیسم‌های بیوکنترلی گونه‌های تریکودرما می‌باشد (هول، ۲۰۰۲). همچنین، می‌توانند باعث افزایش رشد گیاه شوند (هارمن[16]، ۲۰۱۱a ، ۲۰۱۱b) و مقاومت گونه‌های گیاهی متنوعی را به صورت موضعی و سیستمیک القاء کنند (مستوری و همکاران[17]، ۲۰۱۲؛ متیس و همکاران[18]، ۲۰۱۲؛ سالداجنو و همکاران[19]، ۲۰۱۴؛ شورش و همکاران[20]، ۲۰۱۰). علاوه بر اعضای جنس تریکودرما در سال‌های اخیر مطالعات نسبتا زیادی روی قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* به منظور کنترل بیماری‌های گیاهی (دشموخ و کوگل[21]، ۲۰۰۷؛ فخرو و همکاران[22]، ۲۰۱۰؛ کومار و همکاران[23]، ۲۰۰۹؛ سارما و همکاران[24]، ۲۰۱۱؛ استین و همکاران[25]، ۲۰۰۸؛ سرفلینگ و همکاران[26]، ۲۰۰۷؛ والر و همکاران[27]، ۲۰۰۵) و به عنوان یک کود زیستی برای

1- Windeis & Nabben
2- Weller
3- Gerhardson
4- Whipps
5- Welbaum *et al.*
6- Hammerschmidt *et al.*
7- Whipps & Lumsden
8- Benítez *et al.*
9- Chet
10- Howell

11- Mukherjee *et al.*
12- Vinale *et al.*
13- Wiest *et al.*
14- Harman & Shoresh
15- Verma *et al.*
16- Harman
17- Mastouri *et al.*
18- Mathys *et al.*
19- Saldajeno *et al.*
20- Shoresh *et al.*
21- Deshmukh & Kogel
22- Fakhro *et al.*
23- Kumar *et al.*
24- Sarma *et al.*
25- Stein *et al.*
26- Serfling *et al.*
27- Waller *et al.*

افزایش رشد گیاهان صورت گرفته است (کومار و همکاران، ۲۰۱۲؛ منا و همکاران[1]، ۲۰۱۰؛ ناوتیال و همکاران[2]، ۲۰۱۰؛ رای و همکاران[3]، ۲۰۰۱؛ رای و والسالاکومار[4]، ۲۰۱۰). همچنین، این قارچ اندوفیت می‌تواند مقاومت گیاه میزبان را القاء کند و از آن‌ها مقابل بیمارگرهای مختلف محافظت کند (کومار و همکاران، ۲۰۰۹؛ مولیتور و کوگل[5]، ۲۰۰۹؛ مولیتور و همکاران[6]، ۲۰۱۱؛ پدروتی و همکاران[7]، ۲۰۱۳؛ وهابی و همکاران[8]، ۲۰۱۵).

علاوه بر میکروارگانیسم‌های سودمند (ون ویس و همکاران[9]، ۲۰۰۸) ترکیبات طبیعی و شیمیایی مختلف مانند اسید سالسیلیک (Salicylic acid; SA) (کایوس و جبلیک[10]، ۱۹۹۵)، اسید جازمونیک (Jasmonic acid; JA) (فروست و همکاران[11]، ۲۰۰۸)، ویتامین B (آن و همکاران[12]، ۲۰۰۷)، سیتوکینین (دروینیس و همکاران[13]، ۲۰۱۰)، و بتا-آمینوبوتیریک اسید (β-aminobutyric acid; BABA) (جاکاب و همکاران[14]، ۲۰۰۱) می‌توانند با استفاده از مکانیسم‌های مختلف مقاومت موضعی و سیستمیک گیاه را القاء و بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی گونه‌های گیاهی مختلف را کنترل کنند (کسمن و همکاران[15]، ۱۹۹۴؛ ااستندرپ و همکاران[16]، ۲۰۰۱). مطالعات زیادی روی کاربرد این ترکیبات به صورت اسپری‌پاشی روی برگ به منظور کنترل بیمارگرهای هوازاد صورت گرفته است. با این وجود، گزارش‌های بسیار کمی از کاربرد این ترکیبات برای کنترل قارچ‌های خاکزاد مانند *R. solani* وجود دارد (کاتاریا و همکاران[17]، ۱۹۹۷؛ الموگی[18]، ۲۰۰۴؛ المقربی[19]، ۲۰۰۸؛ متنی و الجار[20]، ۲۰۱۴).

مطالعات بسیار کمی روی کنترل بیولوژیک بیماری‌های ناشی از *R. solani* روی چغندرقند صورت گرفته است. تنها دو گونه تریکودرما شامل *T. harizianum* (موسی[21]، ۲۰۰۲) و *Trichoderma gamsii* (انیس و همکاران[22]، ۲۰۱۰) و یک جدایه *Corticium* sp. (ادودی و همکاران[23]، ۱۹۸۰) به عنوان قارچ‌های آنتاگونیست موثر برای کنترل *R. solani* AG-2-2 گزارش شده‌اند. همچنین، هیچ گزارشی از کنترل این بیمارگر روی چغندرقند با استفاده از ترکیبات القاء کننده مقاومت در دسترس نیست. بنابراین، انجام یک تحقیق جامع با هدف کنترل مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* AG-2-2 با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست و ترکیبات القاء کننده مقاومت ضروری می‌باشد. برای این منظور، چندین آزمون درون شیشه‌ای برای بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های آنتاگونیست متعلق به جنس تریکودرما و قارچ اندوفیت *P. indica* مقابل *R. solani* AG-2-2 و انتخاب جدایه‌های با قدرت آنتاگونیستی بالا انجام شد. سپس، فعالیت بیوکنترلی جدایه‌های منتخب و کارایی چندین ترکیب القاء کننده مقاومت با تیمار کردن بذور برای کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

1- Meena *et al.*
2- Nautiyal *et al.*
3- Rai *et al.*
4- Ray & Valsalakumar
5- Molitor & Kogel
6- Molitor *et al.*
7- Pedrotti *et al.*
8- Vahabi *et al.*
9- Van Wees *et al.*
10- Kauss & Jeblick
11- Frost *et al.*
12- Ahn *et al.*
13- Dervinis *et al.*
14- Jakab *et al.*
15- Kessmann *et al.*
16- Oostendorp *et al.*
17- Kataria *et al.*
18- El-Mougy
19- Al-Mughrabi
20- Matny & Al-Jarrh
21- Moussa
22- Anees *et al.*
23- Odvody *et al.*

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم ها و بذور چغندرقند

بذور چغندرقند رقم شیرین ۳ که حساس به رایزوکتونیا می‌باشد، جدایه *R. solani* 133 با توان بیماریزایی بالا روی چغندرقند که متعلق به AG 2-2 می‌باشد و تعدادی از جدایه‌های تریکودرما از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند دریافت شدند. برخی از جدایه‌های تریکودرما از کلکسیون بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. جدایه *P. indica* از دانشگاه ارومیه دریافت شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های درون شیشه‌ای

کشت متقابل قارچ بیمارگر با قارچ‌های آنتاگونیست

جهت بررسی قدرت رقابت ساپروفیتی ۱۶ جدایه تریکودرما و یک جدایه *P. indica* (جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) از روش مورتون و استروبل (مورتون و استروب، ۱۹۵۵) با کمی تغییرات استفاده شد. دیسک‌هایی به قطر پنج میلی متر از حاشیه فعال کلونی هفت روزه قارچ آنتاگونیست و Rs 133 مقابل یکدیگر و به فاصله نیم سانتی متر از حاشیه تشتک حاوی محیط سیب‌زمینی-دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar; PDA) قرار داده شدند. در تیمار شاهد به جای قارچ آنتاگونیست، از یک دیسک PDA سترون استفاده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. در هر سه آزمون درون شیشه-ای انجام شده سه روز بعد از انجام آزمون میزان رشد شعاعی Rs 133 مقابل آنتاگونیست‌ها وهمچنین در تیمار شاهد اندازه‌گیری شده و درصد کاهش رشد میسلیوم آن با استفاده از رابطه زیر برای هر تیمار محاسبه گردید. آزمون‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی، شامل ۱۷ تیمار در سه تکرار و دو مرتبه انجام شدند.

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر} = \frac{\text{قطر کلونی قارچ در تیمار مورد نظر} - \text{قطر کلونی قارچ در تیمار شاهد}}{\text{قطر کلونی قارچ در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰$$

بررسی تولید ترکیبات فرار ضد قارچی

آزمون تاثیر ترکیبات فرار تولید شده توسط قارچ های آنتاگونیست با استفاده از روش دنیس و وبستر[1] (۱۹۷۱a) با اندکی تغییرات انجام شد. دیسک‌هایی به قطر پنج میلی متر از حاشیه فعال کلونی هفت روزه قارچ آنتاگونیست و جدایه Rs 133 به صورت جداگانه در مرکز هر تشتک PDA قرار داده شد. سپس در کنار شعله تشتک حاوی جدایه Rs 133 به طور وارونه روی تشتک حاوی قارچ آنتاگونیست قرار داده شد و دور تشتک‌ها توسط پارافیلم کاملا مسدود گردید. در تیمار شاهد به جای قارچ آنتاگونیست، از دیسک PDA سترون استفاده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

بررسی تاثیر مواد مایع خارج سلولی

اثر مواد مایع خارج سلولی تولید شده توسط جدایه-های تریکودرما و *P. indica* با استفاده از روش دنیس و وبستر (۱۹۷۱b) با اندکی تغییرات انجام شد. چهار دیسک به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه فعال کشت هفت روزه جدایه‌های آنتاگونیست در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی-لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع سیب زمینی-دکستروز (Potato Dextrose Broth; PDB) و یا محیط مایع عصاره مالت-عصاره مخمر-پپتون-گلوکز (MYPGB؛ عصاره مالت ۳ گرم، عصاره مخمر ۳ گرم، پپتون ۵ گرم و گلوکز ۱۰ گرم در لیتر) قرار داده شدند و فلاسک‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس بر روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. میسلیوم کشت ها بر روی کاغذ صافی سترون در زیر هود جمع آوری شده و کشت‌ها برای حذف اسپورها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در

1- Dennis & Webster

دمای اتاق سانتریفوژ شدند. سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری مایع سترون شده و درون فالکون های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. مایع سترون شده به نسبت ۲۵ درصد به محیط PDA در حالت مذاب اضافه گردید و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از آن به داخل هر تشتک سترون ریخته شد. در تیمار شاهد محیط PDB و یا MYPGB به محیط PDA مذاب اضافه شد. بعد از انجماد محیط یک دیسک به قطر پنج میلی متر از حاشیه فعال کشت هفت روزه Rs 133 در مرکز هر تشتک قرار گرفت و تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

تهیه مایه تلقیح *R. solani* AG-2-2

به منظور تهیه مایه تلقیح ابتدا ۲۰۰ گرم بذر ذرت خیس خورده به فلاسک‌های ۵۰۰ میلی لیتری افزوده و دو روز متوالی به مدت بیست دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. سپس ده دیسک، به قطر پنج میلی متر، از حاشیه فعال کشت سه روزه جدایه بیمارگر مورد نظر به فلاسک‌ها افزوده و به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند.

تهیه مایه تلقیح قارچ‌های آنتاگونیست و ترکیبات القاء کننده مقاومت برای تیمار بذور

کارایی سه قارچ *Trichoderma harzianum* 65، *Trichoderma viride* 60 و *P. indica* برای کنترل بیمارگر Rs 133 در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، غلظت‌های متفاوتی از ترکیبات شیمیایی القاء کننده مقاومت گیاه شامل SA با غلظت-های یک میلی‌مولار، سه میلی‌مولار و شش میلی‌مولار؛ BABA با غلظت‌های یک میلی‌مولار، پنج میلی‌مولار و ده میلی‌مولار و متیل جازمونات (methyl jasmonate; MeJA) با غلظت‌های ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میلی‌مولار و یک میلی‌مولار در آب مقطر سترون آماده و مورد آزمون قرار گرفتند. همه این مواد از شرکت سیگمای آمریکا خریداری شدند، به استثنای MeJA که از شرکت دوچفا هلند تهیه شد. جدایه‌های تریکودرما و *P. indica* به ترتیب در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط PDB و MYPGB کشت داده شدند و فلاسک‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس بر روی شیکر با سرعت ۱۶۵ دور در دقیقه به مدت هشت روز قرار گرفتند. میسلیوم و اسپورها به وسیله کاغذ صافی سترون جمع‌آوری و سپس با آب مقطر سترون دو بار شستشو داده شدند. توده میسلیومی بر روی کاغذ صافی سترون قرار گرفت و به مدت یک ساعت در زیر هود قرار گرفت تا آب اضافی آن خارج شود. سپس میسلیوم هر کدام از قارچ‌های آنتاگونیست به نسبت ۱:۱ (وزنی/حجمی) با کربوکسی متیل سلولز یک درصد (carboxymethyl cellulose; CMC) فرموله شد و غلظت اسپورها با استفاده از لام شمارش CFU/mL^{-} 10^{8} تنظیم شد. بذور چغندرقند ابتدا با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت دو دقیقه ضد عفونی سطحی شده و سپس چند بار با آب مقطر شسته شدند. بذور در ترکیبات القاء کننده مقاومت و قارچ‌های آنتاگونیست فرموله شده در محلول CMC یک درصد خیسانده شدند و به مدت سه ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. بذور تیمار شده به مدت یک شب زیر هود قرار گرفتند تا به آرامی خشک شوند. بذور تیمار شده با CMC یک درصد، PDB، MYPGB و قارچکش کربوکسین-تیرام (۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر) به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شدند.

ارزیابی بیماری مرگ گیاهچه در گلخانه

مخلوط خاک ترکیبی از خاک مزرعه، پیت ماس و پرلیت به نسبت ۳:۱:۱ به مدت یک ساعت در دو روز متوالی اتوکلاو شد. خاک با مایه تلقیح Rs 133 مخلوط گردید (هشت گرم پودر بذر ذرت اینوکوله شده با جدایه های بیمارگر در هر کیلوگرم خاک) و گلدان‌ها با آن پر شدند. به گلدان‌های شاهد پودر بذر ذرت اینوکوله شده با دیسک‌های سترون PDA اضافه شد. در هر گلدان ۴۰ بذر کاشته شد و گلدان‌ها در اتاقک رشد با شرایط ۴۰ درصد رطوبت، ۱۶ ساعت روشنایی، هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

به منظور بررسی اینکه آیا ترکیبات شیمیایی و قارچ‌های فرموله شده اثر منفی روی رشد گیاهان چغندرقند دارند، بذور تیمار شده در گلدان‌های فاقد مایه تلقیح Rs 133 کاشته شدند. آزمایش با چهار تکرار در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی اجرا شد و این آزمایش دو بار تکرار گردید. تعداد گیاهچه‌های سالم ۱۴ روز پس از کاشت بذرها یادداشت برداری شد (گریشام و اندرسون[1]، ۱۹۸۳).

بررسی تاثیر *T. harzianum* 65 و *P. indica* روی رشد گیاه

به منظور بررسی اثر تیمار بذور با *T.* (Th 65) *harzianum* 65 یا *P. indica* (Pi) و یا ترکیب هر دو قارچ (Th 65/Pi) روی رشد چغندرقند ۴۰ بذر در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک سترون کاشته شد. گلدان‌ها در شرایط ذکر شده در بالا نگهداری شدند و وزن تر ریشه بیست گیاه برای هر تیمار بعد از یک ماه اندازه‌گیری شد. این آزمایش با چهار تکرار در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی اجرا شد و دو بار تکرار گردید.

رنگ آمیزی ریشه

به منظور بررسی نحوه کلونیزه شدن ریشه ها توسط *T. harzianum* 65 و یا *P. indica* پانزده نمونه ریشه برای هر تیمار هفت و ۱۴ روز پس از کاشت بذور تیمار شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ریشه گیاهچه-های سبز شده از بذور تیمار نشده به عنوان شاهد نمونه-برداری شد. در ابتدا برای حذف خاک ریشه‌ها چندین بار با آب شستشو داده شدند. به منظور رنگ‌بری ریشه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در محلول KOH ده درصد و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. به منظور رنگ آمیزی قارچ ها ریشه‌ها به مدت پنج دقیقه در محلول جوهر سیاه (ساخت شرکت پلیکان آلمان)- اسید استیک هشت درصد و در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای حذف رنگ اضافی ریشه‌ها سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اسید استیک هشت درصد و در دمای اتاق قرار داده شدند (ویرهیلینگ و همکاران[2]، ۱۹۹۸). ریشه‌ها به تکه‌های یک سانتی‌متری بریده شدند و در محلول گلیسرول ۶۰ درصد نگهداری شدند و از آنها اسلاید تهیه شد. اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری نیکون بررسی شدند و با استفاده از دوربین چشمی Dino-Eye ساخت شرکت دینو-لایت آمریکا از آنها عکس گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمون‌های درون شیشه‌ای و گلخانه با استفاده از برنامه SAS نسخه 9.1.3 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) تجزیه و تحلیل شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار فیشر در سطح یک درصد با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

اثر آنتاگونیستی چند جدایه تریکودرما و یک جدایه *P. indica* توسط آزمون‌های درون شیشه‌ای شامل کشت متقابل، تولید ترکیبات فرار ضدقارچی و مواد مایع خارج سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از سه آزمون در جدول ۱ خلاصه شده است. در آزمون کشت متقابل دو جدایه *T. harzianum* 65 و *T. viride* 60 به ترتیب با دارا بودن ۳۷/۸ و ۳۷/۵ درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر به عنوان موثرترین آنتاگونیست‌ها شناخته شدند (جدول ۱).

1- Grisham & Anderson

2- Vierheilig *et al.*

جدول ۱- جلوگیری از رشد میسلیوم *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) توسط قارچ‌های آنتاگونیست در آزمون-های درون شیشه‌ای[a]

درصد بازدارندگی رشد میسلیوم *R. solani* AG-2-2 (Rs 133)			
کد جدایه‌ها	کشت متقابل	تولید ترکیبات فرار ضد قارچی	مواد مایع خارج سلولی
Trichoderma R1	۲۳/۲ b [b]	۱۱/۹ fg	۱۷/۲ i
Trichoderma CS7	۲۲/۱ bc	۱۳/۰ ef	۲۰/۲ fg
Trichoderma Cy9	۲۱/۰ bcd	۳۰/۳ a	۱۹/۲ fghi
Trichoderma A6	۲۰/۸ bc	۲۲/۸ b	۱۸/۱ ghi
Trichoderma SA	۱۹/۶ cdef	۱۰/۵ gh	۵۲/۱ c
T. atroviride 1	۱۷/۱ efg	۱۵/۴ d	۱۳/۳ j
T. atroviride 2	۲۱/۰ cdef	۱۶/۰ d	۱۸/۲ ghi
T. harzianum 9	۱۸/۴ cd	۷/۰ i	۱۸/۶ ghi
T. harzianum 12	۱۹/۳ def	۱۴/۳ de	۱۷/۶ hi
T. harzianum 64	۲۱/۰ bcd	۷/۰ i	۲۰/۱ fgh
T. harzianum 65	۳۷/۸ a	۹/۸ h	۷۲/۴ a
T. harzianum 93	۱۹/۶ cdef	۶/۲ ij	۱۶/۹ i
T. harzianum 128	۲۱/۰ bcd	۱۴/۱ de	۲۱/۲ f
T. viride 59	۱۶/۸ fg	۱۹/۶ c	۳۵/۳ e
T. viride 60	۳۷/۵ a	۱۲/۰ fg	۶۸/۹ b
T. koningii	۲۰/۲ bcde	۷/۵ i	۴۱/۳ d
P. indica	۱۰/۵ e	۴/۲ j	۲۰/۲ e

[a] داده‌ها میانگین سه تکرار هستند.

[b] میانگین‌های دارای حروف یکسان در هر ستون یکسان بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار فیشر از نظر آماری (در سطح یک درصد) معنی‌دار نیستند.

نتایج آزمون تولید ترکیبات فرار ضدقارچی نشان داد که در بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه *Trichoderma* Cy9 توانایی بالاتری برای تولید ترکیبات فرار ضدقارچی و جلوگیری از رشد میسلیوم بیمارگر دارد (جدول ۱). افزودن مواد مایع خارج سلولی تولید شده توسط جدایه *T. harzianum* 65 به نسبت ۲۵ درصد به محیط PDA منجر به ممانعت از رشد میسلیوم Rs 133 تا مقدار ۷۲/۴ درصد شد. همچنین، مواد مایع خارج سلولی تولید شده توسط جدایه *T. viride* 60 نیز توانست مانع رشد میسلیوم Rs 133 شود ولی با درصد کمتری نسبت به جدایه *T. harzianum* 65 (جدول ۱). در مجموع، بر اساس نتایج آزمون‌های درون شیشه‌ای دو جدایه *T. harzianum* 65 و *T. viride* 60 با فعالیت بازدارندگی بیش از ۳۷ درصد در دو آزمون کشت متقابل و تولید مواد مایع خارج سلولی برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. با وجودی‌که جدایه *P. indica* در آزمون‌های درون شیشه‌ای فاقد فعالیت بازدارندگی از رشد میسلیوم Rs 133 بود ولی فعالیت بیوکنترلی آن در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا تعداد زیادی منابع گزارش کرده‌اند که این قارچ نه تنها رشد گیاه را افزایش می‌دهد بلکه مقاومت گیاهان میزبان را مقابل بیمارگرهای قارچی القاء می‌کند.

به منظور ارزیابی فعالیت بیوکنترلی سه قارچ *T.*

T. harzianum 65، *T. viride* 60 و *P. indica* بذور چغندرقند با این میسلیوم و اسپورهای فرموله شده این قارچ‌ها در CMC یک درصد تیمار شد. نتایج نشان داد که جدایه *T. harzianum* 65 پتانسیل بالایی برای کنترل بیمارگر رایزوکتونیا در گلخانه دارد و قادر به کنترل بیماری تا ۷۳/۶ درصد است و جدایه *P. indica* با دارا بودن ۶۹/۸ درصد کنترل بیماری در رتبه بعدی قرار دارد (جدول ۲، شکل ۱الف، شکل ۱ب). با وجودی‌که جدایه *T. viride* 60 فعالیت آنتاگونیستی بالایی در آزمون‌های درون شیشه‌ای از خود نشان داد ولی در گلخانه موفق عمل نکرد و نتوانست بیماری را کنترل کند (جدول ۲). برعکس جدایه *P. indica* نتوانست در آزمون‌های درون شیشه‌ای از رشد میسلیوم Rs 133 جلوگیری کند در صورتی که کاربرد آن در گلخانه به صورت تیمار بذور توانست درصد ایستادگی گیاهچه‌ها را افزایش دهد و بیماری را تا مقدار ۶۹/۸ درصد کنترل کرد (جدول۲ و شکل ۱ب). همچنین، هیچ کدام از تیمارها اثر منفی روی رشد گیاه نداشتند.

به منظور کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند بذور رقم شیرین ۳ با غلظت‌های مختلف برخی ترکیبات شیمیایی القاء کننده مقاومت گیاه مانند MeJA، SA و BABA تیمار شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت این ترکیبات، درصد کنترل بیماری و ایستادگی گیاهچه نیز افزایش یافت (جدول ۳). بیشترین مقدار کنترل بیماری زمانی مشاهده شد که بذور با غلظت ۱۰ میلی‌مولار BABA و غلظت ۱ میلی‌مولار MeJA تیمار شدند که به ترتیب بیماری تا ۶۸/۱ و ۶۷/۷ درصد کنترل شد (جدول ۳، شکل ۱ج، شکل ۱د). همچنین، هیچ کدام از ترکیبات مورد استفاده اثر منفی روی رشد گیاه نداشتند (داده‌ها نشان داده نشده است).

تاثیر *T. harzianum* 65 و *P. indica* و ترکیب هر دو تیمار (Th 65/Pi) روی رشد گیاه یک ماه پس از کاشت بذور تیمار شده در گلدان‌های حاوی خاک سترون با اندازه‌گیری وزن تر ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که قارچ‌های *T. harzianum* 65 و *P. indica* رشد گیاهان چغندرقند را افزایش دادند. در واقع، گیاهانی که از بذور تیمار شده با هر یک از این دو قارچ سبز شده بودند نسبت به گیاهان کنترل (از بذور تیمار نشده سبز شده بودند) رشد بیشتری داشتند به طوری‌که وزن تر ریشه آنها حدود ۱/۸ برابر وزن تر ریشه گیاهان کنترل بود (وزن تر ریشه هر گیاه کنترل ۰/۶۵ گرم و هر گیاه تیمار شده با Th 65 یا Pi وزن تر ریشه آن حدود ۱/۳-۱/۲ گرم بود (شکل ۲).

به منظور بررسی این‌که *T. harzianum* 65 و *P. indica* قادر به کلونیزه کردن ریشه‌های چغندرقند هستند، ریشه‌های گیاهان ۱۴ روز پس از کاشت بذور تیمار شده با هر یک از قارچ‌ها رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار رفتند. بررسی‌ها نشان داد که قارچ *P. indica* در سلول‌های ریزودرمی کلامیدوسپورهای گلابی شکل تشکیل داده بود (شکل ۳الف). هیف‌های *T. harzianum* 65 سطح ریشه را به صورت گسترده کلونیزه کرده‌اند (شکل ۳ب). همچنین، هیف‌های این قارچ وارد ریشه‌ها شده و در فضاهای بین سلولی اپیدرم ریشه رشد کردند (شکل ۳ ج). هیچ‌کدام از دو قارچ در بخش‌های مرکزی ریشه دیده نشدند.

در تحقیق حاضر از آزمون‌های درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای به منظور بررسی توانایی بیوکنترلی چند جدایه تریکودرما و یک جدایه قارچ اندوفیت *P. indica* و تاثیر آنها روی گیاهچه‌های چغندرقند در حضور و عدم حضور بیمارگر *R. solani* AG-2-2 استفاده شد. نتایج آزمون‌های درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های *T. harzianum* 65 و *P. indica* موثرترین آنتاگونیست‌ها بودند و توانستند بیماری مرگ گیاهچه‌های چغندرقند ناشی از بیمارگر *R. solani* AG-2-2 را به ترتیب به مقدار ۷۳/۶ و ۶۹/۸ درصد کنترل کنند (جدول ۲). همچنین، کارایی غلظت‌های متفاوتی از ترکیبات القاء کننده مقاومت برای کنترل

جدول ۲- کارایی جدایه‌های قارچی در کنترل بیماری مرگ گیاهچه‌های چغندرقند ناشی از *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) در گلخانه[a]

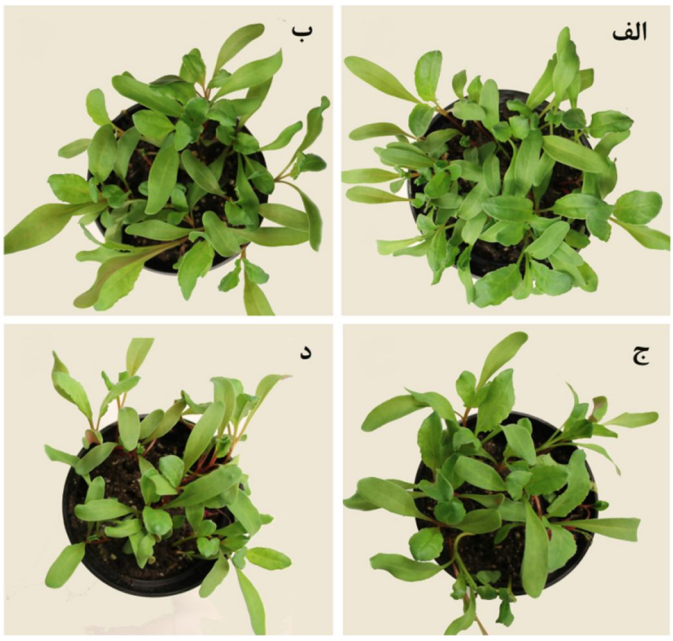
تیمار[b]	درصد ایستادگی گیاهچه	درصد کنترل بیماری
P. indica	۵۰/۵ d[c]	۶۹/۸ b
MYPGB	۲۲/۶ f	۳۶/۰ d
T. viride 60	۳۰/۴ e	۵۲/۴ c
T. harzianum 65	۵۹/۱ c	۷۳/۶ a
PDB	۲۲/۶ f	۳۶/۲ d
CMC	۲۲/۲ f	۳۵/۱ d
کربوکسین-تیرام	۸۰/۳ b	۷۶/۷ a
بدون تیمار/+Rs	۲۰/۱ f	-
بدون تیمار/-Rs	۱۰۰ a	-

[a] داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند.

[b] بذور چغندرقند واریته شیرین ۳ با قارچ‌های فرموله شده با CMC 1% در گلدان‌های مایه‌زنی شده کاشته شدند. مایه‌زنی با افزودن ۸ گرم پودر بذر ذرت اینوکوله شده با جدایه *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) در هر کیلوگرم خاک صورت گرفت. تعداد گیاهچه‌های سالم ۱۴ روز پس از کاشت بذور یادداشت شد. بذور تیمار شده با CMC 1%، MYPGB، PDB و قارچ‌کش کربوکسین تیرام (۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

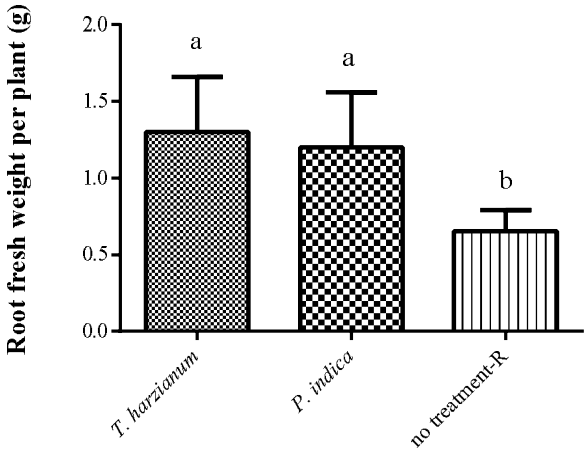
[c] میانگین‌های دارای حروف یکسان در هر ستون یکسان بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار فیشر از نظر آماری (در سطح یک درصد) معنی‌دار نیستند.

MYPGB= محیط مایع مالت- عصاره مخمر-پپتون-گلوکوز؛ PDB= محیط مایع سیب زمینی-دکستروز؛ CMC= محلول کربوکسی متیل سلولز یک درصد؛ Rs 133= *R. solani* AG-2-2 (Rs 133)



شکل ۱- محافظت از گیاهچه‌های چغندرقند مقابل بیمارگر *R. solani* AG-2-2 (Rs 133).

گیاهچه‌های ۱۴ روزه سبز شده از بذور چغندرقند واریته شیرین که با (الف) *T. harzianum* 65، (ب) *P. indica*، (ج) غلظت ۱۰ میلی مولار BABA، (د) MeJA غلظت ۱ میلی‌مولار تیمار شده و سپس در گلدان‌های مایه‌زنی شده با مایه تلقیح *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) کاشته شدند.



شکل ۲- افزایش رشد گیاهان چغندرقند توسط *T. harzianum* 65 و *P. indica*.

تاثیر تیمارها روی رشد گیاه با اندازه‌گیری وزن تر ریشه یک ماه پس از کاشت بذور تیمار شده در گلدان‌های حاوی خاک سترون مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. ستون‌های دارای حروف یکسان بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار فیشر از نظر آماری (در سطح یک درصد) معنی‌دار نیستند.

جدول ۳- کارایی غلظت‌های مختلف ترکیبات شیمیایی القاء کننده مقاومت گیاه در کنترل بیماری مرگ گیاهچه-های چغندرقند ناشی از *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) در گلخانه[a]

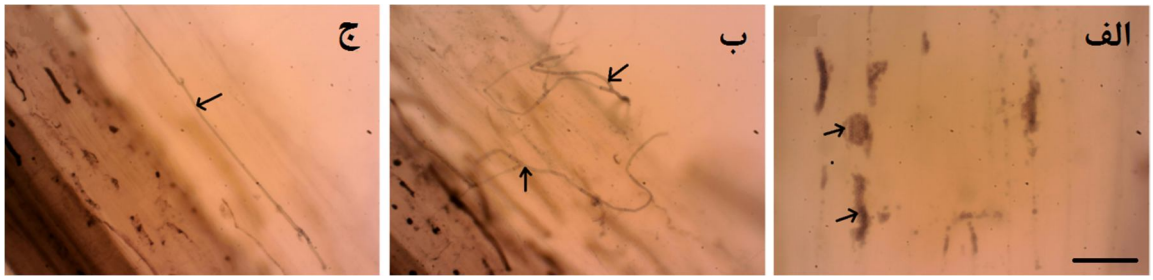
تیمار[b]	درصد ایستادگی گیاهچه	درصد کنترل بیماری
SA 1 mM	۳۵/۷ de [c]	۵۹/۲ d
SA 3 mM	۳۴/۸ e	۵۸/۵ d
SA 6 mM	۳۸/۳ cde	۶۲/۱ c
MeJA 50 mM	۳۶/۹ cde	۶۰/۷ c
MeJA 0.5 mM	۳۷/۴ bcd	۶۱/۳ c
MeJA 1mM	۴۳/۵ c	۶۷/۷ b
BABA 1 mM	۴۰/۹ cde	۶۴/۷ c
BABA 5 mM	۴۲/۶ cd	۶۵/۰ c
BABA 10 mM	۴۴/۱ c	۶۸/۱ b
CMC	۲۲/۶ f	۳۵/۰ e
کربوکسین-تیرام	۸۰/۳ b	۸۲/۱ a
بدون تیمار/+Rs	۲۰/۱ f	-
بدون تیمار/-Rs	۱۰۰ a	-

[a] داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند.

[b] بذور چغندرقند واریته شیرین ۳ با غلظت های مختلف ترکیبات شیمیایی القاء کننده مقاومت گیاه که با CMC 1% فرموله شده و در گلدان‌های مایه‌زنی شده کاشته شدند. مایه‌زنی با افزودن ۸ گرم پودر بذر ذرت اینوکوله شده با جدایه *R. solani* AG-2-2 (Rs 133) در هر کیلوگرم خاک صورت گرفت. تعداد گیاهچه‌های سالم ۱۴ روز پس از کاشت بذور یادداشت شد. بذور تیمار شده با CMC 1% و قارچ‌کش کربوکسین تیرام (۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

[c] میانگین‌های دارای حروف یکسان در هر ستون یکسان بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار فیشر از نظر آماری (در سطح یک درصد) معنی‌دار نیستند.

SA= اسید سالیسیلیک؛ MeJA= متیل جازمونات؛ BABA= بتا-آمینوبوتیریک اسید؛ CMC= محلول کربوکسی متیل سلولز یک درصد؛ Rs= *R. solani* AG-2-2 (Rs 133)



شکل ۳- الگوی کلونیزه کردن ریشه‌های چغندرقند توسط *T. harzianum* 65 و *P. indica* چهارده روز پس از تیمار بذور.
(الف) قارچ *P. indica* در سلول‌های ریزودرمی کلامیدوسپورهای گلابی شکل تشکیل داد. (ب) هیف‌های *T. harzianum* 65 سطح ریشه را به صورت گسترده کلونیزه کردند. (ج) همچنین، هیف‌های این قارچ وارد ریشه‌ها شده و در فضاهای بین سلولی اپیدرم ریشه رشد کردند. هیچ‌کدام از دو قارچ در بخش‌های مرکزی ریشه دیده نشدند. ساختارهای قارچی پس از رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با محلول جوهر سیاه ۵ درصد مشاهده شدند. نوار مقیاس برای همه شکل‌ها ۵۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد.

بیماری مرگ گیاهچه‌های چغندرقند در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمار بذور چغندقند با سه ترکیب القاء کننده مقاومت BABA، MeJA و SA از گیاهچه‌های چغندرقند مقابل *R. solani* محافظت کردند (جدول ۳).

در مطالعه حاضر فعالیت آنتاگونیستی ۱۶ جدایه تریکودرما از گونه‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. از بین جدایه‌های مورد بررسی دو جدایه *T. harzianum* 65 و *T. viride* 60 توانستند در آزمون‌های کشت متقابل و تولید مواد خارج سلولی از رشد میسلیوم بیمارگر جلوگیری کنند. در آزمون کشت متقابل سرعت رشد این دو جدایه بیشتر از بیمارگر بود لذا در رقابت برای فضا و جذب مواد مغذی موجود در محیط کشت نسبت به بیمارگر موفق بودند. همچنین، نتایج آزمون تولید مواد خارج سلولی نشان داد که این دو جدایه با تولید متابولیت‌های ضدقارچی قابل حل در آب می‌توانند بدون تماس مستقیم با بیمارگر از رشد میسلیوم آن ممانعت کنند. ناحیه بازدارندگی مشاهده شده در کشت متقابل این دو جدایه با *R. solani* ممکن است است به دلیل تولید متابولیت‌های ضدقارچی باشد. بنابراین، می‌توان گفت که آنتی‌بیوز یا تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی همانطور که در منابع اشاره شده است (هارمن و شورش، ۲۰۰۷) یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی این دو جدایه تریکودرما مقابل *R. solani* AG-2-2 می‌باشد.

گزارش‌های زیادی از پتانسیل گونه‌های تریکودرما، به خصوص *T. harzianum*، به عنوان عوامل بیوکنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی از جمله بیماری‌های ناشی از *R. solani* روی میزبان‌های مختلف موجود می‌باشد (اسد و همکاران[1]، ۲۰۱۴؛ گالو و همکاران[2]، ۲۰۰۹؛ گروش و همکاران[3]، ۲۰۰۶؛ لهلالی و هیجری[4]، ۲۰۱۰؛ منتلگره و همکاران[5]، ۲۰۱۰؛ رینی و سولچانا[6]، ۲۰۰۷). مطالعات هنیس و همکاران[7] (۱۹۷۸) نشان داد که افزودن مایه تلقیح *T. harzianum* به خاک، بیماری مرگ گیاهچه تربچه ناشی از *R. solani* را کاهش داد و همچنین جوانه‌زنی بذور تربچه در خاک استریل را افزایش داد. افزودن برخی از جهش یافته‌های *T. harzianum* که با آلجینات فرموله شده بودند توانستند مرگ و میر گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی را تا

1- Asad *et al.*
2- Gallou *et al.*
3- Grosch *et al.*
4- Lahlali & Hijri
5- Montealegre *et al.*
6- Rini & Sulochana
7- Henis *et al.*

مقدار ۱۰۰ درصد کاهش دهند و نیز وزن تر و خشک بخش‌های هوایی را افزایش داد (منتلگره و همکاران، ۲۰۱۰). در تحقیق حاضر نتایج آزمون‌های درون شیشه‌ای و گلخانه‌ای نشان داد که جدایه *T. harzianum* 65 موثرترین آنتاگونیست است و با تیمار قارچ‌کش (کربوکسین-تیرام) در یک گروه آماری قرار گرفت. تیمار بذور چغندرقند با این جدایه بیماری مرگ گیاهچه‌های چغندرقند ناشی از بیمارگر *R. solani* را به مقدار ۷۳/۶ درصد کنترل کرد (جدول ۲) که با نتایج مطالعه موسی (۲۰۰۲) مطابقت داشت. این محقق نشان داد که تیمار بذور چغندرقند با *T. harzianum* درصد وقوع بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند ناشی از *R. solani* را حدود ۸۴/۸ درصد کاهش داد.

اگرچه، در آزمون‌های درون شیشه‌ای جدایه *T. viride* 60 پتانسیل خوبی برای جلوگیری از رشد میسلیوم‌های بیمارگر نشان داد ولی در گلخانه نتوانست همانند جدایه *T. harzianum* 65 موفق عمل کند. با توجه به این‌که کنترل موثر بیمارگرهای خاکزاد گیاهی توسط عوامل آنتاگونیست مستلزم سازگاری این عوامل با شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژیکی خاک موجود در آن می‌باشد لذا می‌توان گفت که *T. viride* 60 سازگار با شرایط خاک به کار رفته نبوده و شاید این جدایه رقابت کننده خوبی در شرایط طبیعی و ریزوسفر نباشد. نتایج مشابهی توسط انیس و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است. مطالعات این محققین نشان داد که *T. harzianum* 45 جدا شده از ریزوسفر چغندرقند در آزمون‌های درون شیشه‌ای از رشد میسلیوم AG-2-2 *R. solani* جلوگیری می‌کند ولی در گلخانه نمی‌تواند مرگ گیاهچه هویج را کنترل کند.

گزارش‌های نسبتا زیادی از کنترل بیمارگرها روی میزبان‌های مختلف توسط *P. indica* وجود دارد (دشموخ و کوگل، ۲۰۰۷؛ فاخرو و همکاران، ۲۰۱۰؛ کومار و همکاران، ۲۰۰۹؛ سارما و همکاران، ۲۰۱۱ سرفلینگ و همکاران، ۲۰۰۷؛ استین و همکاران، ۲۰۰۸).

در تحقیق حاضر نیز این قارچ توانست بیماری مرگ رایزوکتونیایی گیاهچه چغندرقند را به مقدار ۶۹/۸ درصد کنترل کند و بعد از تیمار *T. harzianum* 65 و قارچ‌کش که در یک گروه آماری قرار داشتند، موثرترین تیمار بود (جدول ۲). از طرف دیگر این قارچ فعالیت آنتاگونیستی در آزمون‌های درون شیشه‌ای نشان نداد (جدول ۱). بنابراین این احتمال وجود دارد که *P. indica* با القاء مقاومت در گیاهچه‌های چغندرقند توانسته از آنها مقابل بیمارگر رایزوکتونیا محافظت کند که این با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (مولیتور و کوگل، ۲۰۰۹؛ پدروتی و همکاران، ۲۰۱۳؛ سرفلینگ و همکاران، ۲۰۰۷؛ والر و همکاران، ۲۰۰۵).

نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار بذور چغندرقند با *T. harzianum* 65 یا *P. indica* اثر مثبت روی رشد گیاهان دارد و باعث افزایش وزن تر ریشه می‌شود (شکل ۱) که این اولین گزارش از افزایش رشد گیاه چغندرقند توسط این دو قارچ می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که جذب مواد مغذی از خاک، و رشد ریشه و قسمت‌های هوایی گیاهان مایه‌زنی شده با *T. harzianum* افزایش یافته است (هارمن و همکاران[1]، ۲۰۰۴؛ اینبار و همکاران[2]، ۱۹۹۴؛ یدیدیا و همکاران[3]، ۲۰۰۱). گیاهان مایه زنی شده با *P. indica* نیز احتمالا به دلیل تراکم ریشه بیشتر می‌توانند مواد مغذی موجود در ریزوسفر را بهتر و بیشتر جذب کنند. این قارچ اسید فسفاتازهای نسبتا زیادی برای به حرکت درآوردن طیف وسیعی از فرم‌های پیچیده و غیرقابل حل فسفات در ریزوسفر تولید می‌کند لذا گیاه میزبان دسترسی به فسفر کافی در خاک دارد (سینگ و همکاران[4]، ۲۰۰۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار بذور چغندرقند با غلظت‌های مختلف ترکیبات القاء کننده مقاومت مانند BABA، MeJA و SA منجر به کنترل

1- Harman *et al.*
2- Inbar *et al.*
3- Yedidia *et al.*
4- Singh *et al.*

بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* AG-4 شد که با نتایج سایر محققین از کاربرد این ترکیبات برای کنترل *R. solani* روی گیاهان دیگر مطابقت دارد (کاتاریا و همکاران، ۱۹۹۷؛ الموگی، ۲۰۰۴؛ الموقرابی، ۲۰۰۸؛ متنی و الجار، ۲۰۱۴). نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که با افزایش غلظت این ترکیبات، درصد کنترل بیماری و ایستادگی گیاهچه نیز افزایش یافت. بیشترین مقدار کنترل بیماری زمانی مشاهده شد که بذور با غلظت ۱۰ میلی‌مولار BABA و غلظت ۱ میلی‌مولار MeJA تیمار شدند (جدول ۳). لیلجروس و همکاران[1] (۲۰۱۰) نشان دادند که هنگامی که با BABA در غلظت‌های کمتر از ۲/۵ میلی‌مولار روی گیاهان سیب زمینی پاشیده شوند قادر به محدود کردن رشد میسلیوم *Phytophthora infestans* نبوده و برای موثر واقع شدن BABA و کاهش نرخ آلودگی *P. infestans* غلظت ۵ میلی‌مولار آن ضروری است. مطابق با نتایج تحقیق حاضر در مطالعه‌ای دیگر نیز نشان داده شد که تیمار واریته دزیره (Desiree) سیب زمینی با غلظت ۱۰ میلی‌مولار BABA به طور معنی‌داری اندازه زخم‌های نکروتیک ناشی از *P. infestans* را کاهش داد در صورتی که این امر در مورد غلظت ۱ میلی‌مولار BABA مشاهده نشد (بنگتسون و همکاران[2]، ۲۰۱۴).

اثر قارچ‌کشی و سمیت این ترکیبات القاء کننده مقاومت به خصوص BABA روی بیمارگرهای مختلف در شرایط درون شیشه‌ای و در داخل گیاه در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته است (جاکاب و همکاران، ۲۰۰۱). در بیشتر موارد این ترکیبات مستقیما فعالیت ضدمیکروبی نشان نداده‌اند (کوهن و همکاران[3]، ۱۹۹۹؛ همیدوزامن و همکاران[4]، ۲۰۰۵؛ هی و ولین[5]، ۲۰۰۵؛ ویجایان و همکاران[6]، ۱۹۹۸). بررسی‌های صورت گرفته با استفاده از BABA نشان‌دار شده با کربن ۱۴ (^{14}C-labelled BABA) نشان داده است که این ترکیب در گیاهان گوجه‌فرنگی (کوهن و گیسی[7]، ۱۹۹۴) یا آرابیدوبسیس (جاکاب و همکاران، ۲۰۰۱) متابولیزه نمی‌شود لذا مشارکت متابولیتی از BABA به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی در گیاه را نقض می‌کند. بنابراین، می‌توان گفت که در تحقیق حاضر احتمالا این ترکیبات به واسطه القاء مکانیسم‌های دفاعی چغندرقند باعث مقاومت گیاهچه‌ها مقابل *R. solani* AG-2-2 شده‌اند. همان‌گونه که در مطالعات بسیاری اثبات شده است مکانیسم عمل این ترکیبات در کنترل بیماری‌های گیاهی القاء پاسخ‌های دفاعی گیاه است (بنگتسون و همکاران، ۲۰۱۴؛ هی و ولین، ۲۰۰۵؛ می و همکاران[8]، ۲۰۰۶). این احتمال وجود دارد که به دلیل طولانی بودن طول دوره جوانه‌زنی بذور چغندرقند این ترکیبات برای ایجاد تغییرات در مقاومت چغندرقند و به عبارت دیگر القاء مقاومت آن قبل از حمله *R. solani* به گیاهچه‌ها زمان کافی را داشته‌اند. در مطالعه صورت گرفته توسط کاتاریا و همکاران (۱۹۹۷) تیمار بذور لوبیا با SA منجر به کاهش بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* AG-4 شد در صورتی‌که تیمار بذور خیار با این ترکیب تاثیری در کنترل بیماری و مرگ گیاهچه‌ها نداشت. این محققین عنوان کردند که این نتیجه می‌تواند ناشی از کوتاه بودن دوره جوانه‌زنی خیار و عدم وجود زمان کافی برای این ترکیب در القاء مقاومت باشد. از طرف دیگر، کارایی ترکیبات شیمیایی القاء کننده مقاومت برای ایجاد تغییرات در پاسخ‌های دفاعی گیاه اختصاصی گونه و حتی واریته‌های یک گونه گیاهی است که این می‌تواند دلیل دیگر برای عدم کارایی تیمار بذور خیار با SA برای کنترل بیماری مرگ رایزوکتونیایی خیار باشد.

1- Liljeroth *et al.*
2- Bengtsson *et al.*
3- Cohen *et al.*
4- Hamiduzzaman *et al.*
5- He & Wolyn
6- Vijayan *et al.*
7- Cohen & Gisi
8- Mei *et al.*

نتایج تحقیق حاضر برای اولین بار نشان داد که تیمار بذور چغندرقند با *P. indica* و ترکیبات القاء کننده مقاومت مانند BABA، MeJA و SA بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند ناشی از *R. solani* AG-2-2 را کنترل کرد. نتایج نشان داد که تیمار *T. harzianum* 65 در کنترل این بیماری بسیار موثر بود و حتی می‌تواند جایگزین قارچ‌کش کربوکسین-تیرام شود که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیز می‌باشد. با این حال، مطالعات بیشتر به منظور ارزیابی کارایی این قارچ‌ها برای کنترل بیماری رایزوکتونیایی مرگ گیاهچه‌های چغندرقند در مزرعه و در مناطق مختلف جغرافیایی، فرمولاسیون مناسب آن‌ها و بررسی مدت زمان پایداری و نگهداری بذور تیمار شده و بررسی‌های بیشتر برای تشخیص مکانیسم‌های مورد استفاده توسط این قارچ‌ها برای کنترل *R. solani* در گلخانه ضروری می‌باشد.

منابع

1. Ahn, I.P., Kim, S., Lee, Y.H., and Suh, S.C. 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the NPR1 gene in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 143: 838-848.

2. Al-Mughrabi, K.I. 2008. Salicylic acid induces resistance in potatoes against *Rhizoctonia solani*, the cause of black scurf and stem canker. International Journal of Biological Chemistry, 2: 14-25.

3. Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L.G., Héraud, C., and Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal biology, 1: 691-701.

4. Asad, S.A., Ali, N., Hameed, A., Khan, S.A., Ahmad, R., Bilal, M. Shahzad, M., and Tabassum, A. 2014. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. Polish Journal of Microbiology**,** 63: 95-103.

5. Bengtsson, T., Weighill, D., Proux-Wéra, E., Levander, F., Resjö, S., Burra, D.D., Moushib, L.I., Hedley, P.E., Liljeroth, E., Jacobson, D., Alexsandersson, E., and Andreasson, E. 2014. Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. BMC genomics, 15: 315.

6. Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., and Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology**,** 7: 249-260.

7. Chet, I. 1987. *Trichoderma*-application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Chet, I. (ed.), Innovative Approaches to Publisher Plant Disease Control. Wiley, pp: 137-60.

8. Cohen, Y., and Gisi, U. 1994. Systemic translocation of 14 C-DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 45: 441-456.

9. Cohen, Y., Reuveni, M., and Baider, A. 1999. Local and systemic activity of BABA

(DL-3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. European Journal of Plant Pathology, 105: 351-361.

10. Dennis, C., and Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderm*a: II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57: 41-IN44.

11. Dennis, C., and Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57: 25-IN23.

12. Dervinis, C., Frost, C., Lawrence, S., Novak, N., and Davis, J. 2010. Cytokinin primes plant responses to wounding and reduces insect performance. Journal of Plant Growth Regulation, 29: 289-296.

13. Deshmukh, S., and Kogel, K. 2007. *Piriformospora indica* protects barley from root rot caused by *Fusarium graminearum*. Journal of Plant Diseases and Protection**,** 114: 263-268.

14. El-Mougy, N.S. 2004. Preliminary evaluation of salicylic acid and acetylsalicylic acid efficacy for controlling root rot disease of lupin under greenhouse conditions. Egyptian Journal of Phytopathology, 32: 11-21.

15. Fakhro, A., Andrade-Linares, D.R., von Bargen, S., Bandte, M., Büttner, C., Grosch, R. Schwarz, D., and Franken, P. 2010. Impact of *Piriformospora indica* on tomato growth and on interaction with fungal and viral pathogens. Mycorrhiza, 20: 191-200.

16. Frost, C.J., Mescher, M.C., Carlson, J.E., and De Moraes, C.M. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. Plant Physiology, 146: 818-824.

17. Gallou, A., Cranenbrouck, S., and Declerck, S. 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology, 124: 219-230.

18. Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology, 20: 338-343.

19. Grisham, M., and Anderson, N. 1983. Pathogenicity and host specificity of *Rhizoctonia solani* isolated from carrots. Phytopathology, 73: 1564-1569.

20. Grosch, R., Scherwinski, K,. Lottmann, J., and Berg, G. 2006. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. Mycological Research, 110: 1464-1474.

21. Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.M., and Mauch-Mani, B. 2005. β-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts

through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. Molecular Plant-Microbe Interactions, 18: 819-829.

22. Hammerschmidt, R., Métraux, J.P., and van Loon, L.C. 2001. Inducing Resistance: A summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, corfu, may 2000. European Journal of Plant Pathology, 107: 1-6.

23. Harman, G.E. 2011a. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. New Phytologist, 189: 647-649.

24. Harman, G.E. 2011b. *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica, 39: 103-108.

25. Harman, G.E., and Shoresh, M. 2007. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. In: Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management, Springer, pp: 131-155.

26. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2: 43-56.

27. He, C., and Wolyn, D. 2005. Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to *Fusarium oxyspo*rum f. sp. *asparagi*. Plant Pathology, 54: 227-232.

28. Henis, Y., Ghaffar, A., and Baker, R. 1978. Integrated control of *Rhizoctonia solani* damping-off of radish: Effect of successive plantings, PCNB, and *Trichoderma harzianum* on pathogen and disease. Phytopathology, 68: 900-907.

29. Howell, C. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology, 92: 177-180.

30. Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87: 4-10.

31. Howell, C.R. 2005. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology, 96: 178-180.

32. Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D., and Chet, I. 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. European Journal of Plant Pathology, 100: 337-346.

33. Jakab, G., Cottier, V., Toquin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Métraux, J.P., and Mauch-Mani, B. 2001. β-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. European Journal of Plant Pathology, 107: 29-37.

34. Kataria, H., Wilmsmeier, B., and Buchenauer, H. 1997. Efficacy of resistance inducers,

free-radical scavengers and an antagonistic strain of *Pseudomonas fluorescens* for control of *Rhizoctonia solani* AG-4 in bean and cucumber. Plant Pathology, 46: 897-909.

35. Kauss, H., and Jeblick, W. 1995. Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H2O2. Plant Physiology, 108: 1171-1178.

36. Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E. Uknes, S., and Ryals, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual review of phytopathology, 32: 439-459.

37. Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., and Johri, A.K. 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. Microbiology, 155: 780-790.

38. Kumar, V., Sarma, M., Saharan, K., Srivastava, R., Kumar, L., Sahai, V., Bisaria, V.S., and Sharma, A.K. 2012. Effect of formulated root endophytic fungus *Piriformospora indica* and plant growth promoting rhizobacteria fluorescent *Pseudomonads* R62 and R81 on *Vigna mungo*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 595-603.

39. Lahlali, R., and Hijri, M. 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. FEMS Microbiology Letters, 311: 152-159.

40. Liljeroth, E., Bengtsson, T., Wiik, L., and Andreasson, E. 2010. Induced resistance in potato to *Phytphthora infestans*-effects of BABA in greenhouse and field tests with different potato varieties. European Journal of Plant Pathology, 127: 171-183.

41. Mastouri, F., Björkman, T., and Harman, G.E. 2012. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25: 1264-1271.

42. Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerckhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., Cammue, B.P., and Coninck, B. 2012. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. Frontiers in Plant Science, 3: 108.

43. Matny, O., and Al-Jarrh, N. 2014. Induce systemic resistance against black scarf disease caused by *Rhizoctonia solani* in potato (*Solanum tuberosum*). Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 2: 337-342.

44. Meena, K.K., Mesapogu, S., Kumar, M., Yandigeri, M.S., Singh, G., and Saxena, A.K. 2010. Co-inoculation of the endophytic fungus *Piriformospora indica* with the phosphate-solubilising bacterium *Pseudomonas striata* affects population dynamics and plant growth in chickpea. Biology and Fertility of Soils, 46: 169-174.

45. Mei, C., Qi, M., Sheng, G., and Yang, Y. 2006. Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19: 1127-

1137.

46. Molitor, A., and Kogel, K.H. 2009. Induced resistance triggered by *Piriformospora indica*. Plant Signaling and Behavior, 4: 215-216.

47. Molitor, A., Zajic, D., Voll, L.M., Pons-Kühnemann, J., Samans, B., Kogel, K. H., and Waller, F. 2011. Barley leaf transcriptome and metabolite analysis reveals new aspects of compatibility and *Piriformospora indica*-mediated systemic induced resistance to powdery mildew. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24: 1427-1439.

48. Montealegre, J., Valderrama, L., Sánchez, S., Herrera, R., Besoain, X., and Pérez, L.M. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. Electronic Journal of Biotechnology, 13: 1-2.

49. Morton, D., and Stroube, W. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology, 45: 417-420.

50. Moussa, T.A. 2002. Studies on biological control of sugarbeet pathogen *Rhizoctonia solani* Kühn. Online Journal of Biological Science, 2: 800-804.

51. Mukherjee, P.K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M.E., Druzhinina, I.S., and Kenerley, C.M. 2012. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. Microbiology, 158: 155-165.

52. Nautiyal, C.S., Chauhan, P.S., DasGupta, S.M., Seem, K., Varma, A., and Staddon, W.J. 2010. Tripartite interactions among *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, *Piriformospora indica* DSM 11827, and *Cicer arietinum* L. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26: 1393-1399.

53. Odvody, G., Boosalis, M., and Kerr, E. 1980. Biological control of *Rhizoctonia solani* with a soil-inhabiting basidiomycete. Phytopathology, 70: 655-658.

54. Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B., and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. European Journal of Plant Pathology, 107: 19-28.

55. Pedrotti, L., Mueller, M.J., and Waller, F. 2013. *Piriformospora indica* root colonization triggers local and systemic root responses and inhibits secondary colonization of distal roots. PloS one, 8: e69352.

56. Rai, M., Acharya, D., Singh, A., and Varma, A. 2001. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. Mycorrhiza, 11: 123-128.

57. Ray, J., and Valsalakumar, N. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* individually and in combination with *Rhizobium* on green gram. Journal of Plant Nutrition, 33: 285-298.

58. Rini, C., and Sulochana, K. 2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. Journal of Tropical Agriculture, 45: 21-28.

59. Saldajeno, M.G.B., Naznin, H.A., Elsharkawy, M.M., Shimizu, M., and Hyakumachi, M. 2014. Enhanced Resistance of Plants to Disease Using *Trichoderma* spp. In. Gupta, V.K., Herrera-Estrella, M.S., Druzhinina, R.S.U., and Tuohy, M.G. (eds), Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam, Holland, pp: 477-493.

60. Sarma, M., Kumar, V., Saharan, K., Srivastava, R., Sharma, A., Prakash, A., Sahai, V., and Bisaria, V.S. 2011. Application of inorganic carrier-based formulations of fluorescent *Pseudomonads* and *Piriformospora indica* on tomato plants and evaluation of their efficacy. Journal of Applied Microbiology, 111: 456-466.

61. Serfling, A., Wirsel, S.G., Lind, V., and Deising, H.B. 2007. Performance of the biocontrol fungus *Piriformospora indica* on wheat under greenhouse and field conditions. Phytopathology, 97: 523-531.

62. Shoresh, M., Harman, G.E., and Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology, 48: 21-43.

63. Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.-H., and Varma, A. 2000. Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: Piriformospora indica-A revolutionary plant growth promoting fungus. Current Science-Bangalore, 79: 1548-1554.

64. Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., and Waller, F. 2008. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. Plant and Cell Physiology, 49: 1747-1751.

65. Vahabi, K., Sherameti, I., Bakshi, M., Mrozinska, A., Ludwig, A., Reichelt, M., and Oelmüller, R. 2015. The interaction of *Arabidopsis* with *Piriformospora indica* shifts from initial transient stress induced by fungus-released chemical mediators to a mutualistic interaction after physical contact of the two symbionts. BMC Plant Biology, 15: 58.

66. Van Wees, S.C.M., Van der Ent, S., and Pieterse, C.M.J. 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Current Opinion in Plant Biology, 11: 443-448.

67. Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R., Surampalli ,R., and Valero, J. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderm*a spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37: 1-20.

68. Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., and Piché, Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 64: 5004-5007.

69. Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., and Cook, R.J. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95: 720- 729.

70. Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., and Sivasithamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology, 43: 143-148.

71. Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M. Heier, Hückelhoven, R., Neumann, C. von Wettstien, D., Franken, P., and Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 13386-13391.

72. Welbaum, G.E., Sturz, A.V., Dong, Z., and Nowak, J. 2004. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. Critical Reviews in Plant Sciences, 23: 175-193.

73. Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407.

74. Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.

75. Whipps, J.M., and Lumsden, R.D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential. In: T. Butt, C. Jackson, N. Magan (Eds.), Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, Wallingford, pp: 9-22.

76. Whitney, E., and Duffus, J.E. 1986. Compendium of beet diseases and insects: APS press St. Paul, Minnesota.

77. Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B.-W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J. Bodo, B., and Kenerley, C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. Journal of Biological Chemistry, 277: 20862-20868.

78. Windeis, C., and Nabben, D.J. 1989. Characterization and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolated from *Beta vulgaris*. Phytopathology, 79: 83-88.

79. Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., and Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil, 235: 235-242.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 38(4), Winter, 2016

Control of seedling damping-off disease on sugar beet caused by *Rhizoctonia solani* ag-2-2 by endophytic fungi and resistance inducer compounds as seed treatment

E. Karimi[1], N. Safaie[2]*, M Shamsbakhsh[3], and S.B. Mahmoudi[4]

1. Ph.D. candidate, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, (nsafaie@modares.ac.ir).
3. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Sugar Beet Seed Institute. Karaj, Iran.

Received: 2 June, 2015 Accepted: 6 September, 2015

Abstract

Seedling damping-off caused by *Rhizoctonia solani* is one of the most important diseases of sugar beet resulting in substantial economic losses to the producers of this crop. In this study, the biocontrol capability of 16 *Trichoderma* isolates and one *Piriformospora indica* isolate against *R. solani* AG-2-2 was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Among the tested isolates, *Trichoderma harzianum* 65 and *Trichoderma viride* 60 were the most effective antagonists *in vitro* and could inhibit mycelia growth of the pathogen in dual culture and culture filtrate assays. However, the maximum damping-off disease control in greenhouse experiments was achieved by *T. harzianum* 65 with 73.6% disease control that was as effective as fungicide treatment (carboxin-thiram) and followed by *P. indica* with 69.8% disease control. Moreover, sugar beet seeds treatment with these fungi promoted plants growth and increased root fresh weight. In addition, the efficiency of different concentrations of three resistance inducer compounds BABA, MeJA, and SA to control *R. solani* AG-2-2 in greenhouse was assessed. The maximum disease control was observed when seeds were treated with 10 mM BABA and 1 mM MeJA. It is likely that these compounds by induction of defence mechanisms in sugar beet have increased seedlings resistance to *R. solani* AG-2-2. Herein, for the first time we report control of *Rhizoctonia* seedling damping-off by using *P. indica* and resistance inducer compounds BABA, MeJA and SA.

Keywords: Biocontrol, Trichoderma harzianum, Trichoderma viride, Piriformospora indica, β-aminobutyric acid, Methyl jasmonate, Salicylic acid