جداسازی و شناسایی *Paecilomyces fumosoroseus* قارچ جدا شده از نماتد سیست چغندرقند *Heterodera schachtii*

Isolation and introduction of *Paceilomyces fumosoroseus* from beet cyst nematode *Heterodera schachtii*

صدیقه فاطمی[۱]، امیر احمدیان یزدی[۲]

۱- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

۲- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی مشهد

چکیده

سیست‌های نماتد *Heterodera schachtii* از خاک مزارع چغندرقند منطقه چناران خراسان استخراج گردید. محتویات تخم و لارو سیست‌ها پس از ضد عفونی سطحی در شرایط استریل به محیط کشت آب آگار حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شد و نسبت به جداسازی نماتدهای آلوده به قارچ اقدام گردید. جهت شناسائی ایزوله قارچ، آن را بر روی پ.د.آ[(1)] کشت داده و مشخصات ماکروسکپی مانند توپوگرافی، میزان رشد و رنگ کلنی یادداشت گردید. جهت بررسی مشخصات میکروسکپی نسبت به تهیه اسلاید کشت قارچ اقدام شد و مشخصات مزبور پس از ۳ و ۶ روز در روی پ.د.آ بررسی گردید. پس از ۱۵ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی قارچ مورد مطالعه ۴/۳ سانتی‌متر، رنگ آن در ابتدا سفید و سپس به صورتی گرایید و پس از اسپورزائی فراوان، صورتی پر رنگ شد. جدار هایفی صاف، شفاف، کنیدی بر تک شاخه‌ای یا سنبله‌ای مشتمل بر ۶-۴ فیالید در راس بود. کنیدیها استوانه‌ای تا هلالی شکل و ابعاد آنها ۱/۹۸ × ۲/۶۱ میکرون تعیین شد. این قارچ با توجه به مشخصات ارائه شده در

1- PDA

کلیدها *Paecilomyces fumosoroseus* تشخیص داده شد.

مقدمه

نماتد سیست چغندرقند *H. schachtii Schmidt* می‌تواند موجب خسارت جدی به محصول چغندرقند در اغلب مناطق چغندرکاری دنیا گردد (۳، ۱۳ و ۱۵). در ایران به ویژه در منطقه خراسان این نماتد در سطح وسیع پراکنده بوده و یکی از عوامل عمده کاهش محصول چغندرقند به شمار می‌رود (۶). یک روش به تنهایی جهت کنترل ین نماتد مؤثر نمی‌باشد و تلفیقی از تناوب، روشهای زراعی، واریته‌های مقاوم و کنترل بیولوژیکی بایستی مورد بررسی قرار گیرند تا راه حلی مؤثر، اقتصادی و بی‌خطر جهت مدیریت این نماتد حاصل گردد.

قارچهای بسیاری به سیست نماتدها حمله می‌نمایند. کاهش طبیعی جمعیت *H. schachtii* در مناطقی از آلمان،کالیفرنیا و هلند که به طور دائم زیرکشت چغندرقند هستند، مشاهده گردیده و در این رابطه، قارچهائی مانند *Verticillium chlamydosporium Goddard ,Catenaria auxiliaris (Kuhn) Tribe ,Fusarium Acremonium strictum Gams* و *Cylindrocarpon destractans (Zms.) Fusarium oxysporum Schlect*،شناسائی شده‌اند (۱۱، ۱۴، ۱۶ و ۱۷). در ایران تحقیقات بر روی وضعیت قارچهای پارازیت نماتد سیست چغندرقند در سالهای اخیر رو به افزایش نهاده است و در این ارتباط قارچهای مختلفی نیز گزارش گردیده است (۱ و ۹).

به منظور بررسی قارچهای کنترل کننده نماتد سیست چغندرقند، در قالب یک طرح ملی که برای اولین بار در کشور به مرحله اجرا گذاشته شده ضمن نمونه‌برداری از مزارع چغندرقند و جداسازی قارچهای آنتاگونیست نماتد مزبور، قارچ *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith جدا گردید و نسبت به شناسائی آن اقدام شد. در این مقاله مراحل مختلف جداسازی و شناسائی این قارچ گزارش می‌گردد.

مواد و روشها

۱- جداسازی قارچ

۱۰۰ گرم خاک مرطوب و ۵۰۰ میلی لیتر آب را در یک لگن ریخته چند بار سریع به هم زده

و آب رویی از الکهای ۸۵۰ و ۲۵۰ میکرون عبور داده شد. پس از شستشوی فراوان محتویات الک ۲۵۰ میکرون به یک بشر منتقل گردید. سیست‌ها توسط پنس، دانه دانه از محلول آب و خاک جدا شدند. توسط استریو میکروسکپ سیست‌های *H. schachtii* از سایر گونه‌های Heterodera را جدا نموده و برای تشخیص دقیق گونه آن اقدام به تهیه کن تاپ[1] از ۱۰ عدد سیست گردید و با استفاده از کلیدهای معتبر (۱۰) شناسائی نماتد صورت گرفت.

پس از خرد نمودن سیست‌ها در شرایط استریل با کمک قیف‌های بوخنز شیشه‌ای ۲۵۰ و ۱۰ میکرون و پمپ خلاء، محتویات تخم و لارو از پوسته سیست جدا گردید و چند بار با آب مقطر استریل شسته شدند.

در یک سری پتری استریل به قطر ۹ سانتی‌متر مقدار ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت پ.د.آ (پوتیتودکستروز آگار)[2] ریخته شد. سری دیگر حاوی ۱۵ میلی لیتر آب آگار ۰/۰۸٪ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام استرپتومایسین سولفات، کلر آمفنیکول و تتراسایکلین آماده گردید. محیط کشت‌ها ابتدا در اتوکلاو با ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد حرارت و فشار ۱۵ پی‌اس‌آی به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند و پس از کاهش درجه حرارت ارلن حاوی آب آگار به ۴۵ درجه سانتی‌گراد آنتی‌بیوتیک‌ها را اضافه نموده و محیط کشت بلافاصله در پتری دیش‌ها ریخته شد.

با استفاده از پیپت استریل ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول تخم و لارو به پتری‌های آب آگار منتقل و توسط میله شیشه‌ای در سطح پتری کاملاً پخش گردید و پتریها در تاریکی در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط استریل تخمها و لاروهای آلوده به قارچ، به محیط پ.د.آ منتقل گردید و در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۴ و ۵).

۲- خالص سازی قارچ

در شرایط استریل مقداری از محیط پ.د.آ حاوی کشت ۱۰ روزه قارچ توسط سوزن استریل به یک ظرف حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید به همین

1- Cone top

2- PDA (Potato Dextrose Agar)

ترتیب ۳ رقت :10^{-3} :10^{-2} :10^{-1} تهیه شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از هر رقت را در سطح پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری حاوی آب آگار ۱/۵٪ کاملاً پخش نموده و پس از ۲۴ ساعت با کمک استریومیکروسکپ اسپورهای جوانه‌زده را در محیط پ.د.آ کشت داده و پتریها در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

۳- آماده‌سازی قارچ جهت شناسائی

الف- بررسی ماکرسکپی - لوله آزمایش ۲×۲۰ سانتی‌متر حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط پ.د.آ پس از مسدود نمودن دهانه با پنبه و فویل آلومینیوم، در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ پی‌اس‌آی به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید و سپس به صورت مورب قرار داده شد تا سطح تماس لازم جهت رشد قارچ ایجاد گردد. در شرایط استریل ایزوله قارچ روی محیط کشت نامبرده توسط سوزن استریل کشت داده شد و پس از ۸ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشخصات ظاهری کلنی مانند توپوگرافی سطحی، رشد حاشیه‌ای، میزان رشد، رنگ سطح و زیر کلنی یادداشت گردید.

ب- بررسی میکرسکپی - به منظور تهیه اسلاید از کشت قارچ یک قطعه نی نوشابه به طول ۱۰ سانتی‌متر به مدت ۱۵ دقیقه در وایتکس تجارتی (۵٪) ضد عفونی و ۵ بار با آب مقطر استریل شسته شد. سپس آن را به صورت عدد ۷ خم نموده در داخل پتری ۹ سانتی‌متری به ارتفاع ۲ سانتی‌متر حاوی ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل قرار داده شد.

یک تکه مکعب پ.د.آ به ابعاد ۳×۱۲×۱۲ سانتی‌متر (طول × عرض× ارتفاع) در وسط یک لام استریل قرار داده، چهار طول بالایی مکعب را توسط قارچ آلوده نموده و پس از قراردادن یک لامل استریل (۲۰×۲۰ سانتی‌متر) بر روی مکعب، لام بر روی نی گذاشته شد. دو پتری دیش را بدین نحو تهیه نموده و پس از گذشت ۳ و ۶ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط استریل، لام را از پتری خارج نموده، لامل را به آرامی از سطح مکعب برداشته و مکعب پ.د.آ نیز خارج شد. یک لامل استریل بر روی محل رشد قارچ روی لام قرار داده و لامل پوشاننده سطح مکعب نیز بر روی یک لام دیگر قرار گرفت به این ترتیب دو اسلاید تهیه گردید. اسلایدها توسط یک قطره لاکتوفنل حاوی ۰/۰۵٪ آبی پنبه رنگ‌آمیزی شد و سپس اطراف آنها با لاک مسدود گردید. این روش بررسی میسلیومها، کنیدیفورها، کنیدیها و سایر اندامهای قارچ را در حالت رشد طبیعی

امکان‌پذیر می‌سازد.

نتایج و بحث

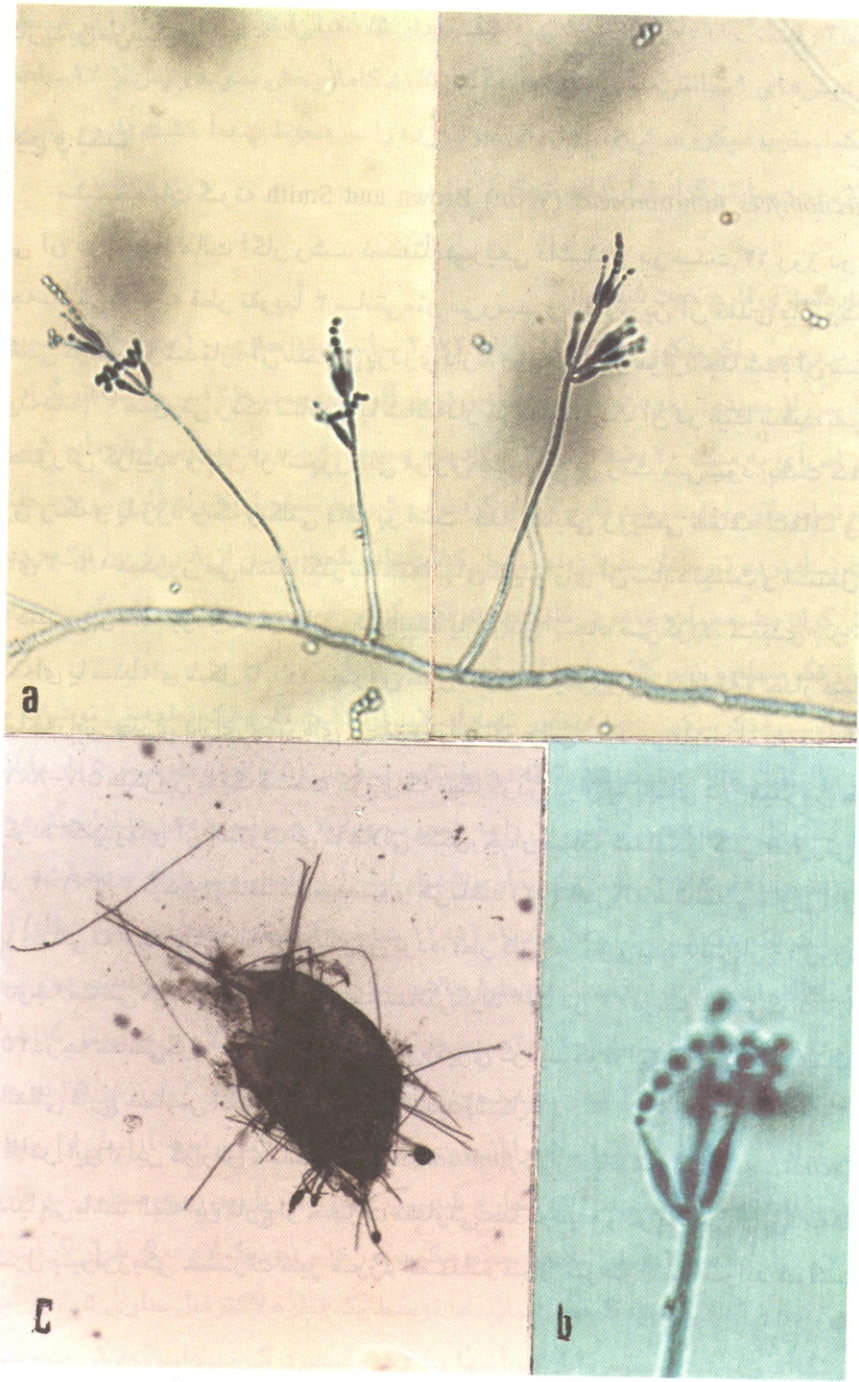
مشخصات گونه *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown and Smith:

کلنی آن در محیط مالت آگار رشد نسبتاً سریعی داشته و در مدت ۱۴ روز در ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد به قطر تقریباً ۴ سانتی‌متر می‌رسد. رشد زیرین آن نمدی با پوشش سطحی کرکی و رشد تازه آن سطحی پودری دارد. در بعضی از موارد جدا شده آن سنبله (سینه‌ماتا)[1] صورتی رنگ، ساده و یا شاخه‌دار می‌باشد. رنگ آن در ابتدا سفید، سپس به صورتی گراییده و پس از اسپورزائی فراوان صورتی پر رنگ می‌شود. پشت کلنی بدون رنگ و یا زرد رنگ و کلنی فاقد بو است. جدار هایفی رویشی صاف، شفاف و به پهنای ۳-۱/۵ میکرون می‌باشد. اکثر ساختمانهای کنیدیازای آن ساده نیست و مشتمل بر یک کنیدی بر قائم بوده که از هایفی خوابیده یا هوائی ایجاد می‌گردد. کنیدی بر تک شاخه‌ای یا سنبله‌ای شکل تا ۱۰۰ میکرون طول، ۲-۱/۵ میکرون پهنا داشته و جدار صاف و شاخه‌زائی چتری دارای چنبره‌ای از ۶-۴ فیالید در راس خود می‌باشد. اندازه فیالید ۲-۱×۸-۵/۷ میکرون با یک قسمت کروی که بیک گردن دراز به پهنای ۰/۵ میکرون ختم می‌گردد. کنیدیهای آن استوانه‌ای تا هلالی شکل، جدار صاف شفاف یا کمی صورتی به ابعاد ۲-۱×۴-۳ میکرون فاقد کلامیدسپور می‌باشد (۱۲). ایزوله منطقه چناران دارای اسپورهائی به ابعاد ۱/۹۸×۲/۶۱ میکرون بوده، قطر کلنی بر روی پ.د.آ پس از ۱۰ روز در ۱۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۵۳ در ۲۰ درجه سانتی‌گراد ۲/۴، در ۳۰ درجه سانتی‌گراد ۱/۳ و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۰ سانتی‌متر اندازه‌گیری گردید. گونه این قارچ توسط انستیتو بین‌المللی قارچ شناسی انگلستان[2] تأیید گردید (شکل ۱).

ظاهراً این اولین گزارش جداسازی *P. fumosoroseus* از نماتدها و نماتد *H. schachtii* در دنیا می‌باشد. البته این قارچ از حشرات متفاوتی جدا گردیده و در بعضی از برنامه‌های کنترل بیولوژیکی حشرات نیز مورد استفاده قرار گرفته است. تولید توکسین

1- Synnemata

2- CMI (IMI)



شکل شماره ۱

باوریسین[۱] و توکسین‌های دیگر توسط این قارچ علیه حشرات گزارش گردیده است (۱۲). قارچ معمولاً میزبان خود را می‌کشد و اثرات آن بر روی کرم ابریشم در ژاپن مطالعه شده است (۲). در محیط کشت مصنوعی این قارچ درصد بالائی از نماتدها را آلوده نموده است (شکل ۱) (۷ و ۸). آزمایشات تست بیماریزائی این قارچ بر روی نماتدهای پارازیت گیاهی در دست بررسی می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1- Ahmadi, A.; Hejarood, G.; Sharifi, A.; Kheiri, A. & Akhyani, A. 1995. Isolation of Fusarium solani from beet cyst nematode and its pathogenicity on eggs. XII Iran. P1. Prot. Cong: 355.

2- Aoki & Yanase, 1970. Sericulture science, Tokyo, 39: 285-292.

3- Cooke, D.A. & Thomason, I. 1978. The distribution of Heterodera schachtii in California. Plant Dis. Rep. 62: 989- 993.

4- Crump, D.H. 1987. Effect of time of sampling, method of isolation & age of nematode on the species of fungi isolated from females of Heterodera schachtii & Heterodera avenae. Revue de Nematologie. 10: 369- 373.

5- Crump, D.H. & Kerry, B.R. 1987. Studies on the population dynamics & fungal parasitism of Heterodera schachtii from a sugar beet mononculture. Crop protection, 6,1: 49-55.

6- Eshtiaghi, H. & barooti, S. 1992. A review of beet cyst nematode problems in Iran. Zytoon, 107: 12- 15.

7- Fatemy, S. 1994. An assessment of pathogenicity of Paecilomyces fumosoroseus. as a biological control agent of Meloidogyne Javanica. 22nd Int. Symp. European. Soc. Nematol. Belgium.

8- Fatemy, S. 1995. Parasitism of Heterodera schachtii by Paecilomyces

---

1- Beauvericin

fumosoroseus. XIII Int. Pl. Protec. Cong. July. the Hague, the Netherlands: 305.

9- Hojatjalali, A. & Coosemans, Y. 1995. Antagonistic fungi of sugar beet cyst nematode of Iran. XII Iran P1. Prot. Cong: 128.

10- Mulvey, R.H. & Golden, M.A. 1983. An illustrated key to the cyst forming Genera & Species of Heteroderidae in the western hemisphere with species morphometrics and distribution. J. Nematol. 15, 1: 1-59.

11- Nigh, E.A., Thomason, I.J. & Van Gundy, S.D. 1980. Identification distribution of fungal parasites of Heterodera schachtii eggs in California. Phytopath. 70, 9: 1884- 1889.

12- Onions, A.H.A. 1957. Paecilomyces fumosoroseus (Wise) Brown & Smith. Transactions of the British mycol. Soc. 40:67.

13- Roberts, P.A. & Thomason, I.J. 1981. Sugar beet pest management: Nematodes, special publication : 3272, Div. Agr. Sci., Univ. Calif., Berkeley.

14- Sayre, R.M. 1986. Pathogens for biological control of nematodes. Crop protection, 5: 268- 276.

15- Steel., A.E. 1984. Nematode parasites of sugar beet. In: plant & insect nematodes (W.R. Nickle. Ed), PP. 507- 569. Dekker, N. York.

16- Tribe, H.T. 1977. A parasite of white cysts of Heterodera : Catenaria auxiliaris. Transaction of the British Mycological Soc. 69: 367- 376.

17- Tribe, H.T. 1980. Prospect for the biological control of plant parasitic nematodes. Parasitology 81: 619- 159.