مقاله کوتاه

پوسیدگی ریزوکتونیائی ریشه و طوقه پسته در کرمان و کنترل بیولوژیکی آن*

RHIZOCTONIA ROOT AND CROWN ROT OF PISTACHIO IN KERMAN AND IT'S BIOLOGICAL CONTROL

لاله ایلخان[۱]، رضا فرخی نژاد[۱]، محمد مهدی امینایی[۲] و حمید رحیم‌زاده بهزادی[۲]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۳/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۲۲)

چکیده

در این پژوهش از نهالستان‌های پسته مهم استان کرمان ۹۹ جدایه *Rhizoctonia solani* از بافت گیاهی و خاک جداسازی شد. جدایه‌ها براساس خصوصیات ریسه‌ها، تعداد هسته‌ها و تعیین گروه آناستوموزی شناسایی شدند که در بین آنها، ۹۶ جدایه چند هسته‌ای با گروه آناستوموزی چهار و سه جدایه دو هسته‌ای(BNR)با گروه آناستوموزی B-I بودند. همه جدایه‌های چند هسته‌ای قادر به ایجاد بیماری روی نهال پسته بوده و تنها در شدت بیماری ایجاد شده با یکدیگر تفاوت داشتند. هیچ یک از جدایه‌های دو هسته‌ای قادر به بیماری‌زایی روی پسته نبودند. از جدایه‌های دو هسته‌ای برای کنترل بیماری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه استفاده شد. در کشت‌های دوگانه جدایه‌های چند هسته‌ای و دوهسته‌ای هیچ گونه لیزشدن، هیپرپارازیتیسم یا سایر اعمال آنتاگونیستی دیده نشد و تنها واکنش قابل توجه پیچش ریسه‌های دو هسته‌ای به دور ریسه‌های چند هسته‌ای بود. در گلخانه مایه‌زنی هم‌زمان دو هسته‌ای و چند هسته‌ای موجب کنترل بیماری نشد و هنگامی که جدایه‌های دو هسته‌ای دو هفته قبل از چند هسته‌ای به گیاهچه‌ها مایه‌زنی شدند، بیماری به طرز قابل توجهی کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: پسته، گروه آناستوموزی، رایزوکتونیا، ریشه، طوقه

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: lalehilkhan@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲. اعضای هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان

مقدمه

پسته به عنوان یک محصول استراتژیک جایگاه خاصی را در بین تولیدات کشاورزی کشور دارا می‌باشد. در حال حاضر سطح زیر کشت پسته ایران بیش از ۳۶۰۰۰۰ هکتار می‌باشد که استان کرمان با مجموع بیش از ۲۷۰۰۰۰ هکتار باغ‌های بارور و غیر بارور، ۷۷ درصد محصول کل کشور را تولید و به عنوان منطقه پسته‌کاری ایران و دنیا محسوب می‌شود(Panahi *et al.* 2002, Tajabadi 1997). گونه‌های ***Rhizoctonia*** از بیمارگرهای بسیار مهم خاکزاد می‌باشند ودر تمام خاک‌های زراعی و غیر زراعی پراکنده‌اند ***R. solani*** Kühn. . (Sneh *et al.* 1991) تاکنون از محصولات فراوانی مانند هویج، حبوبات، سیب‌زمینی، چغندر قند، برنج، تربچه، پسته، پنبه و انواع چمن‌ها از سراسر دنیا گزارش شده است (Banniza 1999, Carling *et al.* 1994 & 2002, Cereisini *et al.* 2003, Dorance 2003, Grishsam & Anderson 1983, Kucharek 2000, Martin & Lucas 1983, Philips 1992)

در ایران اولین بار *ابوسعیدی و همکاران*(۱۹۹۶) این بیماری را از خزانه‌کاری‌های پسته استان کرمان گزارش نمودند. این قارچ یکی از مهم‌ترین عوامل بیماریزای قارچی در نهالستان‌های پسته بوده و موجب خسارت اقتصادی در این محصول ارزشمند می‌گردد. علائم این بیماری در پسته به صورت زردی برگ‌ها، زوال، رنگ-پریدگی و بافت‌مرده شدن ریشه‌های فرعی و اصلی، پوسیدگی، سیاه شدگی و ایجاد شانکر در ناحیه طوقه و ریشه می‌باشد. تاکنون گروه آناستوموزی ۴ از پسته در ایران و جهان جداسازی وشناسایی شده است (Stapleton *et al.* 1996, Abusaeedi *et al.* 1996). ریزوکتونیاهای دو هسته‌ای(BNR) به عنوان عامل بیوکنترل ***R. solani*** چند هسته‌ای در بسیاری از محصولات زراعی نیز معرفی شده‌اند. اولین گزارش‌های استفاده BNR به عنوان عامل بیوکنترل توسط *بل و همکاران*(۱۹۸۴) و *بورپی و همکاران*(۱۹۸۰) ارائه شد. ارتباط بین BNR وگیاه و مکانیزم بیوکنترل به طور کامل روشن نیست. محققان این طور اظهار می‌کنند که ممکن است به دلیل رقابت بر سر مواد غذایی یا به وجود آوردن مقاومت در گیاه توسط BNR به وجود آید (Frisina & Benson 1988). تاکنون هیچ‌گونه شاهدی دال بر لیز شدن، هیپر پارازیتیسم، جلوگیری از رشد یا سایر اشکال آنتاگونیسمی بین این دو قارچ دیده نشده است(Cardoso & Echandi 1985).

روش بررسی

از نهالستان‌های عمده استان واقع در شهرستان‌های رفسنجان، زرند، سیرجان، شهر بابک و مناطق اطراف آنها از ریشه و طوقه نهال‌های خسارت دیده و هم‌چنین خاک اطراف آنها نمونه‌برداری صورت‌گرفت. جهت جداسازی قارچ ریزوکتونیا ازخاک‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف نمونه‌برداری شده، از سه روش استفاده شد: روش باقی‌مانده قطعات گیاهی (Boosalis & Scharen 1959)، روش طعمه‌گذاری (Papavizas & Lewis 1982) و روش رقت تشتک (Sneh *et al.* 1991). برای جداسازی قارچ از طوقه و ریشه، پس از شستشو با آب، بخش‌هایی از حد فاصل بافت بیمار و سالم جدا و بعد از ضد عفونی سطحی با اتانول ۹۶ درصد به مدت یک دقیقه، با اسکالپل برش داده شد. سپس برش‌ها با کاغذ صافی سترون خشک شده و در تشتک‌های پتری حاوی محیط آب- آگار (WA) +۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلرامفنیکل قرار گرفتند. پس از آن تشتک‌های کشت در دمای $۲۷C^{\circ}$ نگهداری شدند. تشتک‌ها

۴۸ ساعت بعد مورد بررسی قرارگرفتند و ریسه‌های شبیه رایزوکتونیا خالص‌سازی وبه محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) انتقال داده شدند. برای خالص‌سازی از روش نوک ریسه (hyphal tip) استفاده شد. جهت شناسایی از روش کشت روی اسلاید پوشیده از آگار (Herr & Roberts 1980) استفاده شد. در این بررسی‌ها، زاویه انشعاب، فرو رفتگی در محل انشعاب، وجود بند در نزدیکی محل انشعاب و بند بشکه‌ای جهت شناسایی ریسه‌های ریزوکتونیا در نظر گرفته شد. قطر ۱۰۰ ریسه از هر جدایه با عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شد و میانگین آنها در همین آزمون در سه تکرار بررسی و محاسبه‌گردید. هم‌چنین در این بررسی یاخته‌های تسبیحی و سختینه‌ها نیز روی محیط PDA مورد بررسی و اندازه‌گیری قرارگرفتند. برای تعیین تعداد هسته، ریسه‌های قارچ با معرف رنگی سافرانین O رنگ‌آمیزی شد (Bandoni 1979). گروه‌های آناستوموزی بر اساس روش *کرولند* و *استانگلینی* تعیین شدند (Kroland & Stanghellinii 1988). برای اثبات بیماری‌زایی ابتدا از دانه‌های جو طبق روش *اسنه* و *همکاران* (Sneh *et al.* 1991) مایه تهیه و سپس چهار عدد بذر جو آلوده در کنار طوقه نهال‌های دو هفته‌ای قرار داده شد. پس از چهار تا ۱۰ روز از نواحی خسارت دیده که شامل اطراف طوقه و ریشه‌های فرعی می‌شد، نمونه‌برداری صورت‌گرفت و از قطعات خسارت دیده برای جداسازی مجدد عامل بیماری استفاده شد. به منظور مقایسه شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها۱۰ جدایه با شدت تهاجم بالاتر نسبت به سایرین انتخاب شدند. پس از یک هفته علائم ایجادشده روی نهال‌ها بررسی شد. شدت بیماری زایی طبق روش *پروماتو* و *همکاران* (Promato *et al.* 1998) از صفر تا پنج امتیازبندی شد. در این آزمون برای هر جدایه ۲۰ تکرار و شاهد (بدون قارچ) در نظر گرفته شد و مایه‌زنی طبق روش ذکر شده در بالا انجام گردید. برای انجام آزمون کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه مشابه آزمون اثبات بیماری‌زایی بذرها آماده شده، در تشتک‌های پتری قرار گرفت. ۴۵ تشتک برای این منظور انتخاب و در هر تشتک دو عدد بذر پسته جای گرفت. شصت ساعت پس از جوانه زدن بذور، تکه‌های بسیار کوچک محیط کشت WA حاوی ریسه‌های سه روزه جدایه چند هسته‌ای مربوط به AG-4 و جدایه‌های دوهسته‌ای مربوط به گروه آناستوموزی Ag-BI اطراف هیپوکوتیل یا ریشه‌های پسته قرار داده شد. سپس گیاهچه‌ها در دمای ۲۳ درجه در تاریکی قرارگرفت. رطوبت تشتک‌های پتری با پنج میلی لیتر آب سترون در روز حفظ شد. شدت بیماری به طور غیر مستقیم پنج روز پس از مایه زنی با شمردن گیاهچه‌های سالم (بدون هیچ‌گونه علائم) و بیمار اندازه‌گیری شد (امتیازبندی مانند آزمون بیماری‌زایی). این بررسی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و برای هر تیمار۱۵ تکرار انجام شد. به منظور بررسی تقابل جدایه‌های چند هسته ای(AG-4) و دو هسته‌ای(AG-BI)، ابتدا جدایه‌هایی از آنها روی PDA کشت و در دمای ۲۳ درجه نگهداری شدند. سپس قطعات سه میلی‌متری از کشت‌های دو روزه این جدایه‌ها در فاصله سه سانتی‌متری یکدیگر روی محیط کشت قرار داده شد. کشت‌های دوگانه پس از پنج روز بررسی شد. برهمکنش ریسه‌های دو جدایه زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. ریسه‌ها قبل از بررسی با محلول‌های لاکتوفنول وسافرانین رنگ‌آمیزی شدند. در گلخانه نیزطبق روش‌های ذکر شده آماده‌سازی بذرها و گلدان‌ها، ضد عفونی و کاشت بذرها در گلدان‌ها صورت گرفت. از دو جدایه چند هسته‌ای که در آزمون بیماری‌زایی قدرت تهاجم بیشتری نشان داده

بودند، استفاده شد. از دو جدایه‌های دو هسته‌ای CPR31 و AHK101 نیز به عنوان عامل احتمالی کنترل بیو لوژیک استفاده گردید. جدایه اول بومی استان و جدایه دوم از دانشکده کشاورزی اهواز گرفته شد. مایه از جدایه‌ها طبق روش‌های قبلی تهیه شد. این آزمون در دو مرحله انجام گردید. در مرحله اول خاک گلدان‌ها با مایه جدایه‌های دوهسته‌ای به نسبت چهار عدد بذر جو آلوده برای خاک اطراف طوقه هر نهال که دو هفته از کاشت آن در گلدان می گذشت، استفاده گردید. دو هفته بعد مایه‌زنی با جدایه چند هسته‌ای در کنار طوقه هر نهال و در نزدیکی محل مایه‌زنی جدایه‌های دو هسته‌ای، صورت گرفت. نتایج آزمایش با نمره بندی مشابه بخش آزمون کنترل بیولوژیک درآزمایشگاه انجام گرفت. این بررسی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و ۱۰ تکرار انجام شد. مرحله دوم نیز از همه جهات مشابه مرحله اول انجام گرفت، منتها در این آزمایش جدایه‌های چند و دو هسته‌ای به طور هم زمان به خاک نزدیک طوقه نهال‌های پسته مایه‌زنی شدند.

نتیجه و بحث

خصوصیات ۹۹ جدایه چندهسته‌ای مورد بررسی با نوشته *اسنه* و همکاران(Sneh *et al.*1999) و *اگوشی* (Ogoshi 1975) مطابقت داشت. هسته‌ها رنگ‌آمیزی شده و تعداد آنها برای هر جدایه به جز دوهسته‌ای‌ها بین سه تا شش عدد متغیر بود. گروه آناستوموزی چند هسته‌ای‌ها به گروه (AG-4) چهار و سه جدایه دوهسته‌ای به AG-BI متعلق بود. در بررسی اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های دو هسته‌ای آلودگی ایجاد نکردند ولی گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های چند هسته‌ای همگی آلوده شدند.

نتیجه آزمایش کنترل بیولوژیک درون آزمایشگاه نشان داد که رشد هر دو نوع جدایه در کناره‌های قطعات آگار مایه‌زنی شده دیده شد. در مایه‌زنی جدایه‌های چند هسته‌ای به تنهایی، ریسه‌ها رشد گسترده‌ای داشتند، در حالی که در مایه‌زنی توام دو و چند هسته ای تعداد کمی از ریسه‌های چند هسته ای روی بافت گسترده شده بودند.

با توجه به جدول ۱، جدایه‌های چند هسته‌ای از نظر شدت بیماری‌زایی روی پسته با یکدیگر اختلاف معنی داری داشتند($P= 0/01$) . شدت بیماری‌زایی جدایه CPR55 با میانگین شدت بیماری‌زایی ۳/۶۶ بیشتر از جدایه CPR77 با میانگین شدت بیماری‌زایی ۰/۹ بود. هم‌چنین در حضور جدایه دو هسته‌ای CPR31 شدت بیماری‌زایی ***R . solani*** به طور میانگین برای دو جدایه چند هسته‌ای ۱/۶۶ بود، در حالی‌که میانگین شدت بیماری‌زایی دو جدایه چند هسته‌ای ***R. solani*** هنگامی‌که در تقابل با جدایه دو هسته‌ای AHK101 قرار گرفتند، ۲/۹ بود و این توانایی جدایه CPR31 را در کنترل بیماری ایجاد شده توسط ***R solani*** در مقایسه با جدایه AHK101 می‌رساند. هم‌چنین تأثیر جدایه‌های دو هسته‌ای بر کنترل بیماری ایجاد شده توسط جدایه‌های چند هسته‌ای معنی‌دار بوده است($P = 0/01$). آثار متقابل بهترین نتیجه بازدارندگی از بیماری توسط جدایه CPR31 در برابر جدایه چند هسته‌ای CPR77 با میانگین شدت بیماری‌زایی ۰/۵۳ بود. کمترین بیوکنترل را جدایه دو هسته‌ای AHK101 در برابر جدایه چند هسته‌ای CPR55 با میانگین شدت بیماری‌زای ۴/۵۳ نشان داد. هم‌چنین میانگین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های چند هسته‌ای در برابر جدایه‌های دو هسته‌ای با یکدیگر در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار داشتند ($P =0/01$). در کشت‌های مقابل ریسه‌ها درون هم فرو نرفتند. لیز شدن، هیپرپارازیتیسم یا سایر اعمال آنتاگونیستی دیده نشد. تنها پیچش ریسه‌های دوهسته‌ای به دور ریسه‌های چند هسته‌ای بود (شکل ۱). این نتیجه

جدول۱. تجزیه واریانس مقایسه بیماری‌زایی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* حاصل از پسته

Table 1. Analysis of variance of data related to comparison of virulence level in *Rhizoctonia solani* isolates of pistachio

F	MS	SS	df	S. V.
23.074**	20.042	180.38	9	*Rhizoctonia solani* isolates
	0.84	160.40	190	E
CV= 23.80		340.78	199	G

**= significant (p=1%) ns = non significant

شکل۱. پیچش ریسه جدایه دو هسته‌ای CPR31 به دور ریسه جدایه چند هسته‌ایCPR55

Fig. 1. Coiling of BNR isolate CPR31 hyphae around MNR isolate CPR55

با گزارش محققان دیگر مطابقت دارد (Howang & Benson 2002, Honeycutt & Benson 2001, Promato *et al* 1998).

در آزمایش‌های گلخانه‌ای و با توجه به جدول‌های ۲ و۳، داده‌های مربوط به آزمون بیوکنترل در گلخانه، در مایه زنی هم‌زمان جدایه‌های چند هسته‌ای و دو هسته‌ای اثر عامل بیوکنترل معنی‌دار نبوده و زمانی که جدایه‌های چند هسته‌ای دو هفته بعد از جدایه‌های دو هسته‌ای به گیاهچه‌های پسته مایه‌زنی شدند، اثر عامل بیو کنترل معنی‌دار بوده است(P=0/05).جداسازی قارچ از بافت‌های آلوده گیاهچه‌ها بیشتر از ناحیه ریشه‌های اصلی و فرعی (بیشتر فرعی) به دست آمد تا از طوقه، وایجاد شانکر روی طوقه تنها توسط ۱۰ جدایه بیماری‌زا دیده شد. این امر ممکن است به این دلیل باشد که چون در پسته آلوده‌سازی قارچ از ریشه‌های فرعی آغاز می‌شود، در نتیجه خسارت بیماری روی گیاهچه‌های پسته به خسارت به ریشه‌های اصلی و فرعی محدود شده و طوقه کمتر آسیب می‌بینند. این مطلب منطبق با نتایج *ابو سعیدی و همکاران*(۱۹۹۵) بود. نتایج جداسازی قارچ از خاک نیز از هر سه روش به کار برده شده مثبت بود، ولی در روش باقی‌مانده قطعات تعداد بیشتری جدایه از خاک جداسازی شد. در این روش تمام سختینه‌های موجود در خاک که عامل بقای قارچ محسوب می شوند به دام افتاده و از لحاظ جداسازی قارچ رایزوکتونیا روش کاملاً مناسبی می‌باشد (Boosalis & Scharen 1959). وجود این بیماری در همه نهالستان‌های استان دلایل بسیاری می‌تواند داشته باشد: روش تجربی کشت کردن نهال‌های پسته که در این روش

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر جدایه‌های BNR در آزمایش‌های کنترل بیولوژیک در گلخانه (مایه‌زنی جدایه‌های دو هسته‌ای و چند هسته‌ای به طور هم‌زمان)

Table 2. Analysis of variance of data related to biocontrol experiment in greenhouse (*Rhizoctonia solani* and BNR were coinoculated)

F	MS	SS	df	S. V.
16.17**	11.091	33.27	3	T
35.02**	24.02	24.02	1	R. solani isolates
10.53**	7.22	7.22	1	BNR isolates
2.95ns	2.02	2.02	1	R. solani ×BNR
	0.68	24.70	36	E
	c.v.= 57.97		39	G

**= significant (p=1%) ns = non significant

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر جدایه های BNR در آزمایش‌های کنترل بیولوژیک در گلخانه (مایه‌زنی جدایه‌های دو هسته‌ای دو هفته قبل از جدایه‌های چند هسته‌ای)

Table 3. Analysis of variance of data related to biocontrol experiment in greenhouse(BNR isolates were inoculated two weeks before Rhizoctonia solani isolates)

F	MS	SS	DF	S.V.
30.56**	18.16	18.16	3	T
54.50**	34.40	34.40	1	*R. solani* isolates
32.97**	19.16	19.6	1	BNR **isolates**
4.21*	2.5	2.5	1	*R. solani* ×BNR
	0.59	21.40	36	E
	C.V.= 75.90		39	G

**= significant (p=1%) *=significant (p=5%) ns = non significant

بذرها قبل از کشت ضدعفونی نشده، خاک مورد استفاده ضد عفونی نشده و کود حیوانی بیش از حد مورد نیاز استفاده می‌شود. در صورتی‌که در تنها نهالستان مکانیزه استان (نهالستان طوبی) که قبل از کشت خاک مورد استفاده خود را با روش آفتاب‌دهی خاک ضد عفونی کرده و هم‌چنین بذرهای پسته را با قارچ کش ضد عفونی می‌کنند، در بررسی‌های انجام شده هیچ‌گونه آلودگی نسبت به این قارچ دیده نشد. درمورد بیماری‌زایی این نتیجه حاصل شد که تمام جدایه‌های چند هسته‌ای آزمایش شده به دست آمده از بافت گیاه وخاک اطراف نهال‌های پسته، روی پسته بیماری‌زا بودند. از جدایه‌های دو هسته‌ای هیچ کدام روی پسته بیماری‌زا نبودند. مقایسه شدت بیماری‌زایی نشان داد که برخی از جدایه‌ها مهاجم‌تر هستند. از بین ۱۰ جدایه مهاجم‌تر نیز سه جدایه CPR87، CPR55، CPR11 قدرت بیماری‌زایی شدیدتری از بقیه داشتند. این جدایه‌ها همگی قادر به ایجاد شانکر روی طوقه و سیاه شدگی در این ناحیه بودند (Akino & Ogoshi 1991 and Sneh *et al.* 1996). در قسمت کنترل بیولوژیک که هم در آزمایشگاه و هم در

گلخانه انجام گرفت، از دو جدایه مهاجم‌تر و جدایه‌های دو هسته‌ای CPR31 (به دست آمده از منطقه کبوترخان رفسنجان) و AGK101 (جدایه اهواز) استفاده شد. نتایج نشان داد که جدایه CPR31 در کنترل بیماری بهتر از جدایه AHK101 عمل کرده است. نتیجه بهتر این عامل شاید به دلیل بومی بودن این جدایه در منطقه باشد. عوامل بیوکنترل یک منطقه که با شرایط آب و هوایی آن منطقه سازگاری پیدا کرده‌اند، بهتر قادر به کنترل بیماری هستند. در آزمایش‌های بیوکنترل در آزمایشگاه نیز جدایه دو هسته‌ای بومی CPR31 بهتر از جدایه AHK101 عمل نمودکه این نتایج با نتایج آزمایشات در گلخانه نیز کاملاً مطابقت داشت (Honeycutt & Benson 2001, Khan & Nelson 2004). هم‌چنین جدایه CPR31 هم‌زمان با جدایه‌های بیماری‌زا از خاک جداسازی شد، در حالی که از زمان جداسازی جدایه AHK101 از خاک مدت زمان بیشتری نسبت به جدایه CPR31 گذشته بود و این می‌تواند در توانایی قارچ در انجام فعالیت‌های زیستی آن تأثیر به سزایی بگذارد (Herr & Robberts 1980). در گلخانه بهترین نتیجه در اثر متقابل جدایه دو هسته‌ای بومی CPR31 با جدایه CPR11 که ضعیف‌ترین جدایه بیماری‌زا بود، به دست آمد و کمترین کنترل را جدایه AHK101 در برابر مهاجم‌ترین جدایه که CPR55 بود، نشان داد. طی انجام آزمایشات بیوکنترل در گلخانه که در دو مرحله انجام شد، در مرحله اول مایه‌زنی عوامل بیوکنترل و بیماری‌زا هم زمان صورت گرفت ولی در مرحله دوم مایه‌زنی جدایه‌های دو هسته‌ای و چند هسته‌ای با تأخیر زمانی انجام گرفت. به این صورت که جدایه‌های دو هسته‌ای ۲ هفته قبل از جدایه‌های چند هسته‌ای به گیاهچه‌ها در آزمایشگاه و نهال‌ها در گلخانه مایه‌زنی شدند. نتایج نشان داد که عوامل بیوکنترل در مرحله دوم، یعنی تأخیر در مایه‌زنی بهتر عمل کردند زیرا عوامل بیوکنترل در این مدت زمانی قادر بودند که خود را در خاک مستقر نموده و ریشه‌های گیاه را کلنیزه کنند و موجب القاء مقاومت به گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای خاکزی شوند. در صورتی که در مایه‌زنی هم‌زمان عوامل بیوکنترل و بیماری‌زا، عوامل بیوکنترل این فرصت را نداشته، ممکن است در رقابت با عوامل بیماری‌زا شکست بخورند (Howang & Benson Promato *et al* 1998 ,2002, Honeycutt & Benson 2001).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (23-21) متن انگلیسی مراجعه شود.