# بررسی کارآیی چند جدایه‌ی بومی تریکودرما در کنترل بیولوژیک پوسیدگی ریشه‌ی چغندرقند با عامل *Pythium aphanidermatum* در شرایط گلخانه

**محبوبه عبداللهی[1]، فرخنده امتی[2] و مسعود ذاکر[2]**

۱–دانشکده‌ی کشاورزی ، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران

۲–بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شاهرود، ایران

**مسئول مکاتبات:** مسعود ذاکر، mzakerus@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۶ ۱ (۱) ۴۱-۵۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۶

## چکیده

بیماری پوسیدگی پیتیومی ریشه‌ی چغندرقند با عامل *Pythium aphanidermatum* یکی از بیماری‌های مهم خسارت‌زای این محصول در ایران می‌باشد. کنترل شیمیایی این بیماری چندان موفقیت‌آمیز نبوده است، بنابراین کنترل آن با عوامل بیولوژیک از جمله جدایه‌های تریکودرما می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای مدیریت این بیماری تلقی گردد. بررسی میزان کارآیی جدایه‌های تریکودرما در کنترل این بیماری در شرایط گلخانه طی پژوهشی در طول سال‌های ۸۷–۱۳۸۶ در مرکز تحقیقات کشاورزی شاهرود انجام گرفت. از بین ۲۲ جدایه‌ی تریکودرمای به‌دست آمده از مزارع چغندرکاری شهرستان شاهرود، تعداد ۷ جدایه متعلق به چهار گونه‌ی *Trichoderma harzianum*، *T. longibrachatum*، *T. koningii* و *T. erinaceum* که در روش کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار و غیرفرار کارآیی خوبی در بازداری از رشد میسلیومی عامل بیماری از خود نشان داده بودند، جهت بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. از بین آن‌ها گونه‌ی *T. erinaceum* برای میکوفلور ایران جدید می‌باشد. در آزمایشات گلخانه‌ای از دو روش اختلاط مایه‌ی تریکودرما با خاک و آغشته نمودن بذور (بذرمال یا تیماربذر) استفاده شد. نتایج کلی این پژوهش نشان داد که پوشش دادن بذر چغندرقند با قارچ آنتاگونیست تریکودرما یا اضافه کردن آن به خاک تأثیر چشم‌گیری در کنترل بیماری در مقایسه با شاهد آلوده دارد. براساس نتایج کلی این پژوهش، جدایه‌ی *T. harzianum* - 2736 بهترین تأثیر را درکنترل بیماری از خود نشان داد و در هر دو روش به‌میزان حدود ۷۰ درصد قادر به کنترل بیماری بود.

**واژه‌های کلیدی**: چغندرقند، بیوکنترل، *Trichoderma*، پوسیدگی ریشه، *Pythium aphanidermatum*.

## مقدمه

سطح زیر کشت چغندرقند در دنیا حدود ۷۰۰۰۰۰۰ هکتار و در ایران ۵۵۰۰۰ هکتار می‌باشد (Anonymous, 2009). میکروارگانیزم‌های مهم خاک‌زاد ازجمله قارچ‌ها از جمله عوامل خسارت‌زا به این محصول مهم می‌باشند. شبه قارچ *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. یکی از عوامل خاک‌زاد خسارت‌زای چغندرقند می‌باشد که باعث کاهش میزان قند این محصول می‌گردد (Abasi-Moghadam *et al.*, 1998). کنترل شیمیایی این بیماری علاوه‌بر کم اثر بودن، موجب آلودگی‌های زیست محیطی و ایجاد نژادهای مقاوم عامل این بیماری به قارچ‌کش‌ها می‌گردد بنابراین استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک با استفاده از عوامل آنتاگونیست ازجمله جدایه‌های تریکودرما می‌تواند جانشین خوبی برای کنترل این بیماری باشد (Gray & Garik, 1998).

بررسی توانایی گونه‌های تریکودرما به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در شرایط آزمایشگاهی طی سال‌های ۱۹۲۰ تا ۱۹۴۰ میلادی آغاز گردید (Gilman & Abbott, 1927). در حال حاضر فرمولاسیون تعدادی از گونه‌های تریکودرما به‌عنوان آفت‌کش‌های بیولوژیکی و همچنین

Archive of SID

www.SID.ir

تقویت‌کننده‌ی رشد محصولات کشاورزی در بسیاری از کشورها در دسترس کشاورزان می‌باشد که این امر باعث کاهش میزان استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی شده است. استفاده از این فرمولاسیون‌ها باعث کنترل بیماری‌های گیاهی با عوامل *Pythium* spp.، *Phytophthora* spp.، *Fusarium* spp و *Rhizoctonia solani* گردیده است (Ambrosino *et al*., 2004). (Abada 1994) طی تحقیقی به این نتیجه رسید که جدایه‌های گونه‌ی *T. harzianum* قادرند که در کنترل بیماری‌های خاک‌زاد چغندرقند و افزایش رشد غده در این محصول نقش داشته باشند. (Tran 2010) در ویتنام تأثیر جدایه‌های تعدادی از گونه‌های تریکودرما ازجمله *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* را در کنترل تعدادی از بیماری‌های خاک‌زاد بادام‌زمینی، گوجه‌فرنگی و خیار ازجمله *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii* و *Pythium* spp. را در شرایط آزمایشگاه و مزرعه مورد ارزیابی قرار داد و گزارش نمود که گونه‌های تریکودرما توانایی کنترل بسیاری از این بیماری‌ها را داشته و در ضمن در افزایش میزان محصول نیز دخیل می‌باشند.

در پژوهش‌های دیگر، ال محمدی و همکاران تحت شرایط گلخانه‌ای گونه‌های *T. viride* و *T. harzianum* را برای کنترل بیماری پوسیدگی ریشه کلم بروکلی به سه روش اختلاط مایه‌ی تریکودرما با خاک، غوطه‌ور نمودن ریشه در محلول تریکودرما و مخلوطی از دو روش قبل انجام داد و نتیجه‌گیری نمود که استفاده از *T. harzainum* با روش سوم نه‌تنها به‌نحو چشم‌گیری باعث کنترل بیماری شد، بلکه در افزایش رشد سبزینه‌ای و کیفیت محصول نیز تأثیر مثبتی داشت (El-Mohamedy *et al.*, 2011). جایاراج و همکاران (Jayaraj *et al.*, 2006) کارآیی تعدادی از فرمولاسیون‌های استرین *T. harzianum* M1 مقاوم به‌قارچ‌کش کاربندازیم را برای کنترل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی گوجه‌فرنگی با عامل *Pythium aphanidermatum* در شرایط گلخانه و مزرعه به‌صورت ضدعفونی بذر مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش نمودند که تا حدود ۷۴ درصد کنترل بیماری و رشد بهتر بوته‌ها از این طریق به‌دست آمد. آن‌ها همچنین فعالیت و کلنیزه شدن خاک اطراف ریشه‌ی بوته‌های گوجه‌فرنگی توسط *T. harzianum* را در این روش مشاهده نمودند. در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که جدایه‌ی *T. harzianum* جداسازی شده از ناحیه‌ی ریزوسفر بوته‌های جو، خیار، نخود، تربچه و گوجه‌فرنگی در مقایسه با جدایه‌های وحشی آن در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی این محصولات در مرحله‌ی قبل از رویش (pre emergence) مؤثرتر بودند (Ahmad & baker, 1988).

در ایران زمانی‌زاده و همکاران فرمولاسیون تجاری Trichomix-HV تهیه شده از *T. harzianum* strain T969 را با قارچ‌کش‌های ریدومیل و ریدومیل- مانکوزب برای کنترل قارچ *P. aphanidermatum* عامل بیماری بوته‌میری خیار گلخانه‌ای در منطقه‌ی جیرفت مورد مقایسه قرار دادند و گزارش کردند که این فرمولاسیون در مقایسه با دو قارچ‌کش ذکر شده در محیط کشت به‌میزان مشابهی از رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری جلوگیری نمود و زمانی که به‌صورت اختلاط با خاک بستر بذر استفاده شد، توانست این بیماری را به‌میزان ۸۲٪ کنترل نمایند (Zamanizadeh *et al*., 2011). آن‌ها ادعا نمودند که این فرمولاسیون قابلیت جایگزینی با قارچ‌کش‌ها را برای کنترل بیماری بوته‌میری خیار دارا می‌باشد. عمر و همکاران (Omar *et al*., 2007) شش جدایه از دو گونه‌ی *T. harzianum* و *T. viride* را در شرایط گلخانه برای کنترل بوته‌میری پنبه مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه‌گیری نمودند که در این رابطه جدایه‌های گونه‌ی نخست بر جدایه‌های گونه‌ی اخیر ارجحیت داشتند. لیو و همکاران (Liu *et al*., 2009) طی مطالعه‌ای تعداد ۳۱ جدایه‌ی تریکودرما از مواد افزودنی به کشت هیپوتونیک خیار جداسازی نمودند و آن‌ها را در مقایسه با دو فرمولاسیون تجاری *T. viride* TV1 & Remedier WP علیه بیماری بوته‌میری خیار(*P. ultimum*) در شرایط گلخانه‌ای و اتاقک رشد مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که بهترین نتیجه در کنترل بیماری زمانی به‌دست‌آمد که اینوکولوم جدایه‌های تریکودرما ۷ روز قبل

Archive of SID

www.SID.ir

از آلوده کردن خاک به عامل بیماری به آن اضافه شد. چهار جدایه‌ی آنتاگونیست مذکور تا ۹۵٪ توانستند از وقوع بیماری جلوگیری نمایند که تاثیر این‌گونه جدایه‌ها تا حدودی بهتر از تأثیر فرمولاسیون Remedier WP برآورد گردید. تعدادی از جدایه‌ها در افزایش رشد بوته‌ها نیز مؤثر بودند.

هدف از انجام این پژوهش یافتن جدایه‌های بومی تریکودرما مؤثر در جلوگیری از رشد شبه‌قارچ *Pythium aphanidermatum* و برای ایجاد بستر تحقیقات دقیق‌تر دراین‌رابطه می‌باشد. زیرا به‌نظر می‌رسد که به‌علت سازگاری جدایه‌ها با شرایط آب و هوایی در هر ناحیه می‌توان از جدایه‌های بومی به‌نحو بهتری سود جست.

## مواد و روش‌های پژوهش

### تهیه‌ی جدایه‌ی بیماری‌زای *P. aphanidermatum*

تعداد زیادی از نمونه‌های ریشه‌ی چغندرقند دارای علائم پوسیدگی نرم در پاییز از مزارع شاهرود و حومه جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس قطعاتی از بین قسمت سالم و بیمار غده ها جداسازی شده و پس از ضدعفونی سطحی با محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم در محیط کشت اختصاصی P5ARP کشت داده شدند (Jeffers & Martin, 1986). دراین رابطه تعداد زیادی جدایه‌های *Pythium* خالص‌سازی گردید و براساس کلیدهای شناسایی دیک (Dick, 1990) و وندر پلاتز (Van der Plaats, 1981) گونه‌ی غالب تشخیص داده شد. بعد از انجام آزمایشات بیماری‌زایی روی بوته‌های چغندرقند در شرایط گلخانه، جدایه‌ای از گونه‌ی *P. aphanidermatum* که قابلیت بیماری‌زایی بالایی داشت، برای انجام مطالعات بعدی انتخاب گردید.

### تهیه‌ی جدایه‌های تریکودرما

### جداسازی جدایه‌های *Trichoderma* از خاک

در این رابطه از روش ریفای (Rifai, 1969) استفاده شد. تعداد زیادی نمونه‌های خاک از ریزوسفر بوته‌های چغندرقند مزارع مختلف شاهرود و حومه جمع‌آوری گردید. بیست گرم از هر نمونه خاک با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر محتوی ۰/۰۲ درصد اسید سیتریک مخلوط گردید. سپس در شرایط سترون ۵ میلی‌لیتر از هر نمونه در درون تشتک‌های پتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر و در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس ریخته شده و برای اختلاط کامل با ملایمت تکان داده شدند. بعد از خنک شدن، قرص‌های نیم سانتی‌متری از درون این ظروف برداشته شده و به داخل ظروف پتری حاوی محیط کشت اختصاصی داوت (Davet 1979) انتقال داده‌شده و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. بعد از رشد مناسب و خالص‌سازی جدایه‌ها با استفاده از کلید شناسایی بیسست (Bissett, 1991a; Bissett,1991 b) مورد شناسایی قرار گرفتند.

### بررسی تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل عامل پوسیدگی ریشه‌ی چغندرقند (*P. aphanidermatum*) در شرایط گلخانه

هدف از انجام این آزمایش بررسی میزان کارآیی جدایه‌های تریکودرما در کنترل و یا کاهش پوسیدگی ریشه منجر به مرگ گیاهچه‌های چغندرقند در شرایط گلخانه بود. این آزمایش به‌شرح ذیل اجرا گردید.

### تهیه و تکثیر مایه‌ی جدایه‌های *Trichoderma*

دراین رابطه از محیط سبوس تخمیرشده استفاده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا مقدار کافی از سبوس گندم درون کیسه‌های پارچه‌ای ریخته و پس از خیساندن آن در آب‌مقطر با فشار دادن کیسه‌ها، آب اضافی سبوس خارج گردید، سپس در هر ارلن‌مایر ۱ لیتری، ۵۰۰ میلی‌لیتر از سبوس مرطوب ریخته شد. ارلن‌ها در دو روز متوالی هر روز درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۲۵ دقیقه استریل شدند. پس از سرد شدن ارلن‌ها در شرایط سترون به‌ازای هر۱۰۰ میلی‌لیتر سبوس، ۵ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون اسپور جدایه‌ی تریکودرما ($10^8$ /ml اسپور) اضافه گردید و ارلن‌ها در داخل ژرمیناتور با دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس زیر نور فلورسنت در رطوبت‌نسبی ۷۰ درصد به‌مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (Elad *et al*., 1980).

Archive of SID

www.SID.ir

**تهیه و تکثیر مایه‌ی *P. aphanidermatum***

جهت تکثیر عامل بیماری درون تعدادی ارلن‌مایر مقدار ۹۵ گرم ماسه‌ی سترون و ۵ گرم بلغور جو و ۲۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر ریخته و در دو روز متوالی هر روز درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۲۵ دقیقه سترون گردیدند. سپس تعداد ۱۰-۸ برش ۵ میلی‌متری از کشت ۵ روزه شبه‌قارچ عامل بیماری درون هر ارلن مایر قرار داده و درون انکوباتور در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت سه هفته نگهداری شدند (Naseby *et al*., 2000). بعد از رشد عامل بیماری روی محیط کشت فوق ارلن‌ها به‌خوبی تکان داده شده تا کاملاً مخلوط شدند و در زمان انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای محتویات ارلن‌ها توسط آسیاب‌برقی کاملاً مخلوط گردیدند.

**تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل عامل پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندرقند به‌صورت اختلاط با خاک**

در این آزمایش از تعداد هفت جدایه‌که بالاترین تأثیر را در جلوگیری از رشد بیمارگر *P. aphanidermatum* در شرایط آزمایشگاه از خود نشان داده بودند، استفاده شد. این جدایه‌ها شامل *T. harzianum* (2739, 2736, 2733)، *T. erinaceum* (2735)، *T. longibrachiatum* (2737, 2732) و *T. koningii* (2731) بودند.

برای کاشت بذر چغندرقند از رقم حساس پی‌پی ۲۲ استفاده شد. تیمارهای آزمایش شامل تیمار شاهد سالم (بدون عامل بیماری‌زا و بدون تریکودرما)، تیمار شاهد آلوده حاوی عامل بیماری‌زا (پیتیوم) و فاقد تریکودرما، تیمار گلدان‌های حاوی جدایه‌های تریکودرما و فاقد پیتیوم (به‌منظور مشخص شدن بیماری‌زا بودن احتمالی جدایه‌های تریکودرما) و تیمار گلدان‌های حاوی جدایه‌های تریکودرما + عامل بیماری(*P. aphanidermatum*) بودند.

خاک گلدان‌های آزمایشی (یک قسمت خاک مزرعه+سه قسمت خاک‌برگ) درون اتوکلاو سترون شده و به‌منظور ایجاد زه‌کشی مناسب مقداری ماسه‌ی سترون در ته هرگلدان ریخته شد. در تیمارهای حاوی تریکودرما مقدار ده گرم مایه‌ی تریکودرما روی سبوس به هر کیلوگرم خاک اضافه شد (Ashrafizadeh *et al*., 2005). مایه‌ی تلقیح عامل بیماری به‌نسبت سه درصد با خاک گلدان‌ها مخلوط شد. سپس بذرهای چغندرقند با استفاده از هیپوکلریت سدیم نیم‌درصد به‌مدت ۴ دقیقه ضدعفونی و بعداز سه بار شستشو با آب مقطر به‌تعداد ۶ عدد درون هرگلدان کاشته شد. به خاک گلدان‌های شاهد بدون تریکودرما سبوس گندم سترون به‌میزان ۱۰ گرم به کیلوگرم خاک اضافه شده، شرایط نوری ۱۴ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. آماربرداری از تعداد گیاهان سالم و میزان رشد طولی گیاهان (ارتفاع) هر سه روز یک‌بار به‌طور مرتب انجام گردید.

**تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل عامل مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند به‌صورت آغشته نمودن بذر**

در این بررسی از جدایه‌های تریکودرما مانند آزمایش قبلی استفاده شد. نوع خاک و بذور به‌کار رفته نیز مانند آزمایش قبلی بود. ابتدا جدایه‌های تریکودرما روی محیط PDA کشت گردیدند و تشتک‌های پتری‌درون انکوباتور در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۱۰ روز قرار داده شدند تا در تاریخ کاشت به اسپوردهی فراوان رسیده باشند. به‌منظور آغشته نمودن بذور چغندرقند به اسپور تریکودرما ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به‌مدت ۴ دقیقه ضدعفونی و سه بار توسط آب‌مقطر شسته شدند. بذور پس از خشک شدن در اتاقک کشت به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول دو درصد متیل سلولز قرار گرفتند (Vaartaja *et al*., 1979). سپس بذور چسبناک به‌مدت دو ساعت در سوسپانسیون اسپور تریکودرما به‌غلظت $۲\times۱۰^{۸}$ اسپور در میلی‌لیتر قرارداده شدند (Burgess & Hepworth, 1996). شمارش اسپورها با استفاده از لام هموسایتومتر انجام شد. پس از گذشت دو ساعت، بذور پوشش داده شده با سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما در گلدان‌های مورد نظر کشت گردیدند. برای تیمارهای بدون تریکودرما (شاهد غیرآلوده و شاهد آلوده)

Archive of SID

www.SID.ir

از بذرهایی که پس از پوشش داده شدن با متیل‌سلولز به‌مدت دو ساعت در آب‌مقطر قرار گرفته بودند، استفاده شد. در این آزمون خاک گلدان‌های آزمایشی غیر از تیمار شاهد سالم و تیمارهایی که تنها حاوی تریکودرما بودند، طبق روش قبلی با *P. aphanidermatum* مخلوط و تعداد شش عدد بذر درون هرگلدان کاشته شد. شرایط مساعد جهت رشد گیاهچه‌ها و روش‌های اندازه‌گیری مشابه آزمایش قبل بود.

تعداد بوته‌های سالم در هر دو روش پس از ۲۰ روز از زمان کشت شمارش و براساس آن درصد تلفات بوته‌های چغندرقند در اثر عامل بیماری از رابطه‌ی زیر به‌دست‌آمد (Behboodi *et al*., 2005).

$$\text{درصد تلفات گیاهچه‌های چغندرقند} = \frac{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم} - \text{تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار}}{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم}} \times ۱۰۰$$

## روش های آماری

آزمایشات این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. در این تحقیق، برای تجزیه‌ی واریانس کلیه‌ی اعداد خام حاصل از آزمایشات هر دو روش، از نرم‌افزار SAS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد.

## نتایج

### ۱- معرفی گونه‌ی *Trichoderma erinaceum* Bissett, Kubicek & Szakacs. به‌عنوان گونه‌ای جدید برای مایکوفلور ایران

شناسایی جدایه‌ی *T.e.* 2735 جداسازی شده از مزارع چغندرکاری شاهرود متعلق به این گونه انجام گردید. شعاع پرگنه بر محیط کشت PDA و در دمای ۳۰-۲۵ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط تاریکی ۲۵ میلی‌متر بوده و در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس ۲۵-۱۷ میلی‌متر تعیین گردید. پرگنه به‌صورت مسطح با دوایر متحدالمرکز، کنیدی‌ها سبزرنگ و گاهی زردرنگ با سطحی صاف و بیضی شکل بودند و اندازه‌ی آن‌ها ۳/۵-۳ × ۴/۷-۴ میکرومتر بود. این جدایه فاقد ترشحات رنگی بود و فیالیدهای آن روی شاخه‌های منشعب و دارای قسمت میانی متورم بود. این جدایه توسط آقای دکتر ظفری از دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان با عنوان *T. erinaceum* شناسایی گردید (Zafari *et al.*, 2002). براساس اطلاعات ما این گونه تاکنون از ایران گزارش نشده است و برای مایکوفلور ایران جدید می‌باشد.

### ۲- تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندرقند در شرایط گلخانه

#### الف- تأثیر جدایه‌ها در جلوگیری از پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندرقند در روش اختلاط با خاک

آلوده‌کردن خاک گلدان‌های آزمایشی با مایه‌ی عامل بیماری باعث مرگ ۱۰۰ درصد بذور چغندرقند شد و از سبزشدن آن‌ها جلوگیری به‌عمل آمد. هنگامی‌که جدایه‌های تریکودرما به تنهایی به خاک گلدان‌ها اضافه شدند، تمام گیاهچه‌ها رشد نمودند که این نشان‌دهنده‌ی عدم تأثیر منفی جدایه‌های تریکودرما در سبزشدن بذور بود. در این روش تیمارهای محتوی جدایه‌های تریکودرما + عامل بیماری دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با شاهد بودند. جدایه‌ی *T.h.* 2736 بهترین تأثیر را در جلوگیری از مرگ گیاهچه‌ها از خود نشان داد. کمترین میزان کنترل بیماری نیز توسط جدایه‌ی *T.h.* 2733 ایجاد گردید (شکل ۱، جدول ۱).

#### ب- تأثیر جدایه‌ها در جلوگیری از مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند در روش بذرمال یا تیمار بذر

همان‌گونه که در شکل ۱ و جدول ۱ مشاهده می‌شود، در روش بذرمال بین شاهد آلوده و تیمارهای حاوی جدایه‌های تریکودرما + عامل بیماری در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار دیده شد و جدایه‌های تریکودرما به‌طور

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند در مقایسه با شاهد.

Table 1- Effect of *Trichoderma* isolates in controlling sugar beet seed rot and damping-off compared to control.

| Treatment | % disease control (soil treatment) | % disease control (seed treatment) |
|---|---|---|
| *T. harzianum* -236 | 72.00 ab | 72.00 a |
| *T. koningii* - 2731 | 62.00 abc | 55.00 ab |
| *T. longibrachiatum* – 2737 | 50.00 bc | 45.50 bc |
| *T. harzianum* – 2739 | 50.00 bc | 55.50 ab |
| *T. erinaceum* – 2735 | 50.00 bc | 28.84 bc |
| *T. longibrachiatum* – 2732 | 27.80 c | 28.40 bc |
| *T. harzianum* – 2733 | 22.22 c | 27.80 c |
| Infested control | 0.00 d | 0.00 d |

داده‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد در روش اختلاط با خاک و در سطح احتمال ۱ درصد در روش تیمار بذر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Values in each column marked by different letters are significantly different in soil treatment ($P$=0.05), and seed treatment methods ($P$=0.01) according to LSD test.

معنی‌داری توانستند عامل بیماری را کنترل کنند. نتایج این تحقیق نشان داد که مؤثرترین جدایه‌ها در کنترل بیماری به‌ترتیب اولویت جدایه‌های *T.h.* 2736، *T.h.* 2739، و *T.k.* 2731 بودند، در حالی‌که *T.h.* 2733 نسبت به سایر جدایه‌ها کمترین تأثیر را در کنترل بیماری از خود نشان داد.

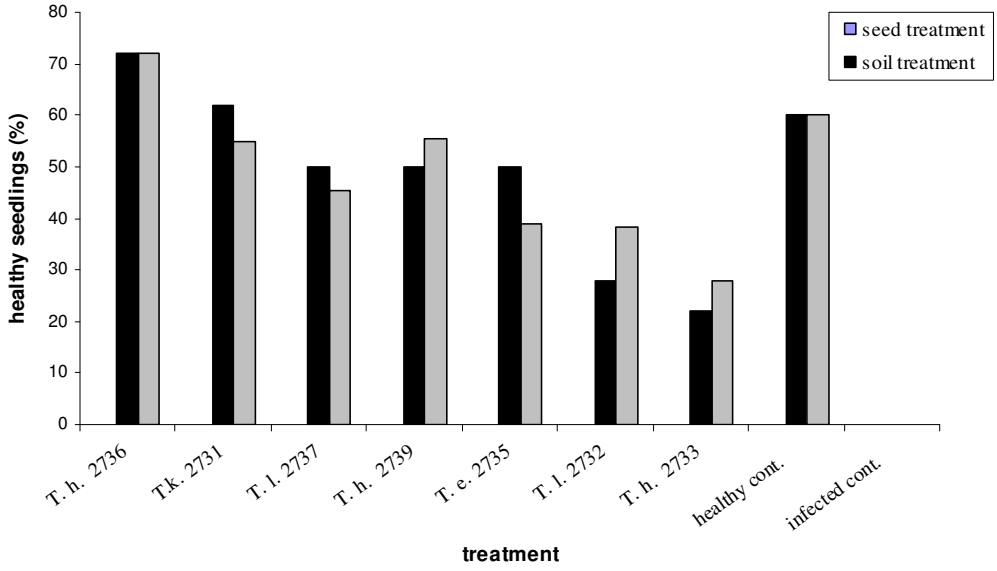
## ج- تأثیر جدایه‌ها در افزایش رشد بوته‌های چغندرقند

براساس نتایج به‌دست آمده تأثیر جدایه‌های تریکودرما در روش اختلاط با خاک در افزایش رشد بوته‌های چغندرقند بسیار محسوس بود، درحالی‌که در روش بذرمال اختلاف معنی‌داری در ارتفاع رشد تیمارهای حاوی تریکودرما در مقایسه با شاهد مشاهده نگردید (شکل ۲). اثر کاربرد قارچ‌های آنتاگونیست بر ارتفاع بوته‌های چغندرقند در مقایسه با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود. جدایه‌های *T.h.* 2733، *T.l.* 2732، *T.k.* 2731، *T.l.* 2737 به‌ترتیب با ۷/۳۷، ۷/۲، ۵/۳ و ۵/۲۵ سانتی‌متر رشد بیشترین ارتفاع بوته را نتیجه دادند که با تیمار شاهد (۴/۷۹ سانتی‌متر) اختلاف معنی‌دار داشتند. کمترین مقدار ارتفاع بوته مربوط به‌تیمار حاوی جدایه‌ی *T. erinaceum* 2735 در اندازه‌گیری میانگین ارتفاع مشاهده شد.

در مجموع در مقایسه‌ی دو حالت افزودن آنتاگونیست به خاک و بذرمال جدایه‌ی *T.h.* 2736 بهترین تأثیر را در کنترل بیماری مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند با عامل *P. aphanidermatum* از خود نشان داد و در هر دو روش به یک میزان مؤثر بود. در مورد سایر جدایه‌ها نیز میزان تأثیر بر کنترل عامل بیماری متغیر بود.

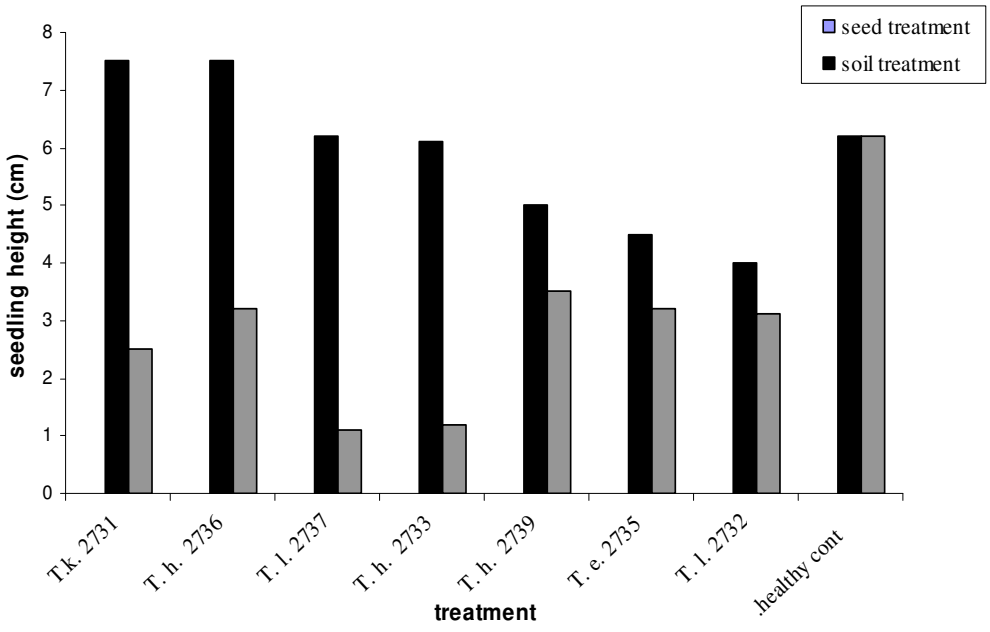
Archive of SID

www.SID.ir




شکل۱- کارآیی جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری‌های پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند در دو روش تیمار بذر و اختلاط با خاک.

Fig.1. Efficacy of *Trichoderma* isolates in controlling sugar beet root rot and seedling damping-off diseases in seed and soil treatment methods.




شکل ۲- کارآیی جدایه‌های تریکودرما در افزایش رشد طولی گیاهچه‌های چغندرقند در دو روش تیمار بذر و اختلاط با خاک

Fig. 2. Efficacy of *Trichoderma* isolates in promoting sugar beet seedling growth in seed and soil treatment methods

www.SID.ir

## بحث

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص گردید که وجود جدایه‌های تریکودرما در تیمارهای آزمایشی سبب بهبود رشد گیاهان در مقایسه با شاهد سالم شد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات کلی‌فیلد و چت (Kleifield & Chet, 1992) و هارمن و همکاران (Harman *et al*., 2004) مطابقت داشت، زیرا کلی فیلد و همکاران، افزایش رشد گیاهان توسط قارچ را به توانایی بقا و گسترش این قارچ در محیط ریزوسفر دانسته و گزارش کردند که مکانیسم احتمالی در افزایش رشد گیاهان انتقال مواد غذایی ازخاک به ریشه می‌باشد. جدایه‌های تریکودرما با کلنیزه کردن ریشه‌ها سبب انتقال موادغذایی و جذب آن‌ها توسط گیاهان می‌گردند. هارمن و همکاران گزارش نمودند که افزایش عملکرد درنتیجه‌ی کاهش فعالیت قارچ‌های غیرمفید و ترکیبات سمی در منطقه‌ی ریزوسفر و افزایش جذب مواد غذایی و مصرف نیتروژن توسط جدایه‌های تریکودرما می‌باشد.

در بررسی گلخانه‌ای و نحوه‌ی تأثیر جدایه‌های تریکودرما درکنترل پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندرقند مشخص شد، در بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه‌ی *T. h.* 2735 در هردو روش بذرمال و ترکیب با خاک با تأثیر یکسان به‌میزان ۷۲ درصد از مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند جلوگیری نموده و به‌عنوان بهترین جدایه معرفی شد. در روش بذرمال جدایه‌های *T. l.* 2732, *T. h.* 2733, *T. e.* 2739 دارای اثر نسبی بهتری نسبت به‌روش اضافه کردن به خاک بوده ولی این اختلاف چندان بالا نبوده است. اختلاف در نحوه‌ی اثر دو روش به‌کار رفته در تحقیق را می‌توان چنین توصیف نمود: افزودن آنتاگونیست‌های تکثیر شده روی سبوس گندم تخمیر شده به خاک می‌تواند بیماری را تاحد قابل‌ملاحظه‌ای کنترل کند. وقتی جدایه‌های تریکودرمای تکثیر شده روی موادآلی به خاک اضافه می‌شوند، به‌علت وجود یک زمینه‌ی غذایی، به فراوانی تکثیر شده و برای مدت طولانی در خاک باقی می‌مانند (Karr *et al*., 1986).

لوییس و پاپاویزاس (Lewis & Papavizas, 1984) نشان دادند که استقرار و تکثیر تریکودرما در خاک بستگی به‌نحوه‌ی کاربرد آن دارد و هنگامی‌که روی سبوس گندم استریل تکثیر شوند و سپس به خاک اضافه گردند، به‌میزان یک میلیون برابر تکثیر شده و استقرار و پایداری آن از زمان کاربرد در خاک ۳۶-۹ هفته به‌طول می‌انجامد. در تحقیق حاضر جدایه‌های تریکودرما به‌نسبت ۱۰ گرم به هر کیلوگرم خاک آلوده به قارچ عامل بیماری اضافه شد. طبق تحقیقات اشرفی زاده و همکاران (۱۳۸۴) افزودن ۱۰گرم مایه‌ی تریکودرما به ۲ کیلوگرم خاک، تعداد CFU $10^{5}$ – $10^{7}$ قارچ را در ریزوسفر ایجاد می‌کند، درحالی‌که حداقل میزان مؤثر آنتاگونیست تریکودرما در خاک حدود CFU $10^{5}$ در هرگرم کیلوگرم خاک است.

در بررسی‌های گلخانه‌ای مشاهده گردید که آغشته نمودن بذر به سوسپانسیون اسپور تریکودرما توانست این پاتوژن را کنترل کند که این با نتایج کوک (Cook, 1994) مطابقت دارد. کوک پیشنهاد کرده بود توانایی کلنیزه کردن میزبان توسط پیتیوم نسبت به قارچ‌های دیگر بالاست، بنابراین تیمار بذر با تریکودرما می‌تواند اثرات پیتیوم را کاهش دهد. مکانیسم‌های به‌کار رفته در کنترل پوسیدگی ریشه‌ی (مرگ گیاهچه) چغندرقند توسط جدایه‌های تریکودرما را می‌توان چنین بیان نمود که افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌ها در حضور قارچ پیتیوم سبب افزایش چشم‌گیر کربن در اطراف ریشه و پراکنده شدن موادغذایی از اطراف ریشه می‌گردد. این عمل در نهایت سبب تخریب ریشه می‌شود. این پژوهشگران همچنین نشان دادند، وجود جدایه‌های تریکودرما تأثیر پیتیوم بر آنزیم‌های خاک را کاهش داده و با کاهش فعالیت این آنزیم‌ها سبب کاهش میزان کربن در اطرف ریشه می‌گردد و بدین‌ترتیب سبب کنترل بیماری و افزایش رشد گیاه می‌شود. لیف‌شیتز و همکاران (Lifshitz *et al*., 1986) به‌بررسی مکانیسم دخیل در کنترل مرگ گیاهچه با استفاده از جدایه‌های تریکودرما در تیمار بذرمال پرداخته و عنوان نمودند که مکانیسم دیگری غیر از مایکوپارازیتیسم در کنترل مؤثر می‌باشد. آن‌ها چنین بیان نمودند که جوانه‌زنی کنیدی قارچ تریکودرما به حدود ۱۴-۱۰ ساعت زمان نیاز دارد، ولی اسپورانژهای پیتیوم ظرف ۹۰ دقیقه جوانه‌زنی می‌کند و

Archive of SID

www.SID.ir

زمان آلودگی با پیتیوم حدود ۴۸-۲۴ ساعت می‌باشند، بنابراین مکانیسم مایکوپارازیتیسم در این کارموفق نبوده و مکانیسم‌های دیگری نظیر متابولیت‌های فرار و غیرفرار تأثیرگذار می‌باشد.

باتوجه به این‌که کنترل مؤثر بیمارگرهای خاک‌زاد گیاهی توسط عوامل آنتاگونیست مستلزم سازگاری این عوامل با شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژیکی خاک به‌کاررفته برای فعالیت مؤثر این جدایه‌های آنتاگونیست روی پیتیوم می‌باشد، بنابراین ممکن است این جدایه که درشرایط گلخانه‌ای نسبت به سایر تیمارها اثر کمتری داشته اند، در شرایط مزرعه به‌دلیل سازگاری با شرایط خاک مزرعه و تعامل با میکروارگانیسم‌های موجود درخاک بتوانند اثر بهتری را نشان دهند. بنابراین مطالعه‌ی شناخت شرایط اکولوژیکی مناسب برای جدایه‌های آنتاگونیستی که در شرایط آزمایشگاه و گلخانه اثرات خوبی در کنترل عوامل بیماری‌زا نشان داده‌اند، حائز اهمیت است. با توجه به تولید ترکیبات محرک رشد توسط جدایه‌های تریکودرما مورد آزمایش در این تحقیق به‌نظر می‌رسد که آن‌ها بتوانند در شرایط مزرعه با توجه به موادآلی و میکوفلور طبیعی خاک عملکرد بهتری از خود نشان دهند. باتوجه به مورد فوق، در آزمایشات آینده لازم است این موضوع در شرایط طبیعی خاک مد نظر قرار گیرد.

همان‌گونه که از نتایج این تحقیق برمی‌آید جدایه‌ی *T. harzianum* 2736 مؤثرترین جدایه در کنترل بیماری پیتیومی چغندرقند در هر دو روش بود که این یافته بانتایج (Abada, 1994)، (El-Mohamedy *et al*., 2011)، (Ahmad &Baker, 1988)، (Jayaraj *et al*., 2006) و (Omar *et al*., 2007) کاملاً مطابقت دارد، زیرا این محققان گزارش نمودند که جدایه‌های *T. harzianum* در کنترل بیماری پیتیومی محصولات مختلف تأثیر به‌سزایی داشته و به‌خوبی این بیماری را در شرایط گلخانه کنترل نموده است. همانگونه که زمانی‌زاده و همکاران و سلطانی و همکاران در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که استفاده از فرمولاسیون‌های *T. harzianum* می‌تواند به‌ترتیب در کنترل بیماری بوته‌میری خیار (*Pythium aphanidermatum*) و بیماری پژمردگی سیب‌زمینی (*Fusarium oxysporum*) مؤثر باشد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که استفاده از این فرمولاسیون‌ها بتواند درکنترل بیماری پوسیدگی ریشه‌ی چغندرقند با عامل *P. aphanidermatum* که در نهایت منجر به مرگ و میر گیاهچه‌های چغندرقند می‌گردد، نیز مؤثر باشد (Zamanizadeh *et al*., 2011 & Soltani *et al*., 2005).

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقای دکتر دوستمراد ظفری دانشیار دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینای همدان که در زمان انجام این تحقیق در شناسایی گونه‌های مؤثر تریکودرما همکاری صمیمانه‌ای داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

## References

**Abada, K. A. 1994.** Fungi causing damping off and root rot on Sugar beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*. Agriculture Ecosystems and Enviromental. 51(3): 333-357.

**Abasi-Moghadam, A., Rastegar, M. F. & Gafarpour, B. 1998.** Etiology of sugar beet root and crown rot caused in Khorasan. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress. Iran, 125.

**Ahmad, J. S. & Baker, R. 1988.** Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology. 34(3): 229-234.

**Ambrosino, P., Scala ,V., Marra, R., Vinale, F., Soriente, I. Ferraioli, S. & Carbone, V. 2004.** Extra cellular protein of *Trichoderma harzianum* to identify proteins bio technological value. Journal of Plant Pathology. 86(4, special issue): 95-300.

**Anonymous, 2009.** Agricultural statistics, Field crops for 2007-2008. Ministery of Jihad-E-Agriculture.

Archive of SID

www.SID.ir

**Ashrafizadeh, A., Etebarian, H. R. & Zamanizadeh, H. R. 2005.** Evaluation of *Trichoderma* isolates for bio control of Fusarium wilt of Melon. Iranian Journal of Plant Pathology. 41(1): 39-57. (In Persian with English summary).

**Behboodi, K., Sharifi-Tehrani, A., Hajarood, 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(3): 345-362. (In Persian with English summary).

**Bissett, J. 1991a.** A revision of the genus *Trichoderma* II. inferageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69: 2357-2372.

**Bissett, J. 1991b.** A revision of the genus *Trichoderma* III. Section Pachybasidium. Canadian Journal of Botany. 69: 2373-2417.

**Burgess, D. R. & Hepworth, G. 1996.** Biocontrol of Sclerotinia stem rot (*Sclerotinia minor*) in Sunflower by seed treatment with *Gliocladium virense*. Plant Pathology. 45: 58.

**Cook, R. J. 1994.** Introduction of soil organisms to control root diseases. In: Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. and Grace, P. R. (eds.), Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems. CSIRO. East Melbourne, Australia. pp. 13- 22.

**Davet, P. 1979.** Technique pour 1 analyse des population de *Trichoderma* et de *Gliocladium virense* dar. lesol. Annual Phytopathology. 11: 529-533.

**Dick, M. W. 1990.** Key to *pythium*. Reading University Press. UK.

**Elad, Y., Chet, I. & Katan, J. 1980.** *Trichoderma harzianum* a bio control effective against *Sclerotium rolfsi* and *Rhizoctonia solani.* Phytopathology. 70:114-121.

**El-Mohamedy, R. S. R., Abd El-Samad, E. H., Hoda, A. M., Habib, T. & Fath El-Bab, S. H. 2011.** Effect of using bio-control agents on growth, yield, head quality and root rot control in broccoli plants grown under greenhouse conditions. International Journal of Academic Research. 3(2): 71-80.

**Gilman, J. C. & Abbott, E. V. 1927.** A summary of the soil fungi. Iowa state College. Journal of Science. 1: 225-343.

**Gray, F. A. & Gerik, J. S. 1998.** Biology and management of Sugar beet disease in the bighorn River Basins of Wyoming. university of Wyoming. Cooprative Extension Service Bulletin. B-1063. 23pp.

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

**Jayaraj, J., Radhakrishnan, N. V. & Velazhahan, R. 2006.** Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. Archives of Phytopathology & Plant Protection. 39(1): 1-8.

**Jeffers, S. N. & Martin, S. B. 1986.** Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease. 70: 1038–1043.

**Karr, A., Wyllie, T. D., Moshtay, E. L., Beleid, F. & Novacky, A. 1986.** Toxic, cytocalosmin–like component from *Macrophomina phaseolina* Phytopathology. 79: 1166. (Abstract).

**Kleifield, O. & Chet, I. 1992.** *Trichoderma harzianum*: interaction with plants and effect on growth response. Plant and Soil. 144**:** 267–272.

**Lewis, J. A. & Papavizas, G. C. 1984.** A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. Phytopathology. 74: 1240-1244.

Archive of SID

www.SID.ir

**Lifshitz, R., Windha, M. T. & Baker, R. 1986.** Mechanism of biological control of pre emergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichoderma* spp. Phytopathology. 76: 720-725.

**Liu, J. B., Gilardi, G., Gullino, M. L. & Garibaldi, A. 2009.** Effectiveness of *Trichoderma* spp. obtained from re-used soilless substrates against *Pythium ultimum* on cucumber seedlings. Journal of Plant Diseases and Protection. 116(4): 156–163.

**Naseby, D. C., Pascual, J. A. & Lynch, J. M. 2000.** Effect of bio control strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil Enzyme activities. Journal of Applied Microbiology. 88: 161-169.

**Omar, M. R., El-Samawaty, A. M. A. & El-Wakil, D. A. 2007.** Suppression of *Pythium ultimum* Involved in Cotton Seedling Damping-off by *Trichoderma* spp. Egyptian Journal of Phytopathology. 35(2): 111-124.

**Rifai, M. A. 1969.** A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers. 116: 1-156.

**Soltani, H., Zafari, D. & Rohani, H. 2005.** A study on biological control of crown, root and tuber fungal diseases of potato by *Trichoderma harzianum* under in-vivo and field condition in Hamadan. Agricultural Research (water, soil & plant in agriculture). 5(3): 13-25. (In Persian with English summary).

**Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981.** Monograph of genus *Pythium*. Studies in Mycology. 21: 1-242.

**Vaartaja, O., Pitblado, R. E., Buzzeli, R. I. & Crawford, L. G. 1979.** Chemical and Biological control of Phytophtora root and stalk rot of Soybean. Canadian Journal of Plant Science. 59: 307-11.

**Tran, N. H. 2010.** Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. Journal of International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 16(1): 17-21.

**Zafari, D., Ershad, J., Zare, R. & Alizadeh, A. 2002.** A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. Iranian journal of plant pathology.38(1-2): 21– 45. (In Persian with English summary).

**Zamanizadeh, H. R., Hatami, N., Aminaee, M. M. & Rakhshandehroo, F. 2011.** Application of biofungicides in control of damping disease off in greenhouse crops as a possible substitute to synthetic fungicides. International Journal of Environmental Science and Technology. 8(1): 129-136.

Archive of SID

www.SID.ir

# Efficacy of some native *Trichoderma* isolates in biological control of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of sugar beet root rot under green house condition

**Mahbobeh Abdollahi[1], Farkhondeh Ommati[2], Masood Zaker[2]**

1- College of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

2- Agriculture and Natural Resources Research Center of Shahrood, Iran

**Corresponding author:** Masood Zaker, Email: mzakerus@yahoo.com

**Received: Apr. 14, 2012** **1 (1) 41-52** **Accepted: Jan. 15, 2013**

## Abstract

Pythium root rot of sugar beet caused by *Pythium aphanidermatum* is an important yield reducing disease in Iran and so far its chemical control has not been achieved successfully, therefore, alternative control measures including biological control might be effective in managing this disease. A green house study was conducted to investigate the efficacy of some native *Trichoderma* isolates in controlling this disease in Agricultural Research Center, Shahrood, Iran during 2007- 2008. Out of 22 *Trichoderma* isolates collected from sugar beet fields, seven isolates belonging to four species (*Trichoderma harzianum, T. longibrachatum , T. erinaceum* and *T. koningii*), among which *T. erinaceum* is a new species for Iran mycoflora and had previously performed effective in inhibiting mycelial growth of the pathogen through dual culture and production of volatile and non-volatile metabolites were selected for green house evaluations using seed and soil treatment methods. Results of green house experiments during two years evaluations indicated significant reduction in seedling damping-off in potted plants treated with *Trichoderma* isolates either as seed or soil treatment (compared with untreated control). Plant growth promotion was also observed in plants treated with *Trichoderma* isolates in comparison with untreated control. Based on the overall results of this study, *T. harzianum* 2736 demonstrated the highest disease reduction (70%) in both methods.

**Key words**: sugar beet, root rot, biocontrol, *Trichoderma*, *Pythium aphanidermatum*.

Archive of SID

www.SID.ir