کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۸، شمارهٔ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۸ (۱۴۱-۱۳۷)
DOI: 10.22059/jbioc.2020.290666.279

کنترل بیولوژیک پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه کنجد با استفاده از *Trichoderma* و *Rhizophagus intraradices*

لاله ایلخان*[۱]، ابراهیم صداقتی[۲]، حسین علایی[۳] و حمید رحیم زاده بهزادی[۴]
دانشجوی دکتری قارچ شناسی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
دانشیارگروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
دانشجوی دکتری حشره شناسی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۱- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۷)

چکیده

نمونه‌برداری از گیاهان کنجد مبتلا به پوسیدگی طوقه و ریشه از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان صورت گرفت. ***Rhizoctonia solani*** جداسازی و شناسایی جدایه‌ها صورت گرفت. این جدایه‌ها همگی چند هسته‌ای و متعلق به گروه آناستوموزی **AG3** و بیماری‌زا بودند. امکان کنترل پوسیدگی ریزوکتونیایی کنجد با استفاده از ***Trichoderma harizianum*** و ***Rhizophagus intraradices*** مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش با ۷تیمار (مایه‌زنی خاک با تریکودرما، مایه‌زنی خاک با میکوریزآربسکولار، مایه‌زنی خاک با تریکودرما و میکوریزآربسکولار توام، مایه‌زنی بذر با تریکودرما، مایه‌زنی بذر با میکوریز آربسکولار و مایه‌زنی بذر با تریکودرما و میکوریز آربسکولار توام و شاهد بدون عوامل آنتاگونیست) و ٤ تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. با توجه به نتایج به‌دست آمده در میان تیمارهای مختلف، شدت بیماری در تیمارهای مایه‌زنی خاک با تریکودرما (میانگین=۰,۱۹)، مایه‌زنی خاک با تریکودرما و مایکوریز (میانگین=۰,۱۹۳) و مایه‌زنی بذر با تریکودرما و میکوریز آربسکولار توام بیشترین کاهش (میانگین = ۰,۱۱) را نشان‌دادند.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی رایزوکتونیایی، کنجد، ***Trichoderma***، میکوریز آربسکولار

Biological control of sesame *Rhizoctoiana* root and crown rot with *Trichoderma* and *Rhizophagus intraradices*

Lale Ilkhan*[1], Ebrahim Sedaghati[2], Hossein Alaee[3] and Hamid Rahimzade Behzadi[4]
1-PhD student of mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran. Corresponding Author: Laleilkhan@gmail.com
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.
3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.
4- PhD student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.
(Received: October 13, 2019 - Accepted: June 6, 2020)

ABSTRACT

Sampling was done from sesame plants from research field of Vali-e-Asr University of Rafsanjan. *Rhizoctonia solani* was isolated and identified. These isolates were all multi-nucleotide, pathogenic and belonging to the AG3 anastomosis group. The possibility of biological control of *Rhizoctonia* rot of sesame was investigated using of *Trichoderma harizianum* and *Rhizophagus intraradices*. This experiment was conducted with 7 treatments (inoculated soil with *Trichoderma*, inoculated soil with arbuscular mycorrhiza, inoculated soil with *Trichoderma* and arbuscular mycorrhiza, inoculated seed with *Trichoderma*, inoculated seed with arbuscular mycorrhiza, inoculated seed with *Trichoderma* and arbuscular mycorrhiza and control without antagonistic agents) and 4 replicates for each treatment. According to the results obtained from different treatments, the inoculated soil with *Trichoderma*(mean=0.19), the inoculated soil with *Trichoderma* and arbuscular mycorrhiza(mean=0.193) and the inoculated seed with *Trichoderma* and arbuscular mycorrhiza(mean=0.11) showed the highest amounts of disease control.

Key words: *Rhizoctonia* rot, Sesame, *Trichoderma*, Arbuscular mycorrhiza.

* Corresponding author E-mail: laleilkhan@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کنجد با نام علمی *Sesamum indicum* L. گیاهی علفی و یکساله است که به خانواده Pedaliaceae تعلق دارد. ترکیب شیمیایی کنجد نشان می‌دهد که بذر آن منبع مهمی از روغن (۴۸ تا ۶۰درصد) و پروتئین (۱۸ تا ۲۳/۵ درصد) است (Ahmad 2011). علاوه بر این روغن کنجد به دلیل داشتن مواد آنتی اکسیداتیو مانند سزامولین، سزامین و سزامول در مقایسه با سایر روغن های گیاهی برتری دارد (Elewa *et al.* 2011) . *Rhizoctonia solani* یکی ازمهم‌ترین عوامل قارچی مرگ گیاهچه و پوسیدگی‌های ریشه کنجد است(Ahmad 2011). قارچ‌های میکوریز آربسکولار به صورت هم‌زیست اجباری با تقریبا همه ریشه‌های گیاهان خشکی‌زی، شامل انواع گونه‌های مفید محصولات کشاورزی (زراعی و باغی) وجود دارند. این قارچ‌ها موجب تقویت رشد گیاه، تحمل گیاه به استرس‌های زنده و غیرزنده، سلامت گیاه، به چرخه درآوردن مواد غذایی و بهبود کیفیت خاک می‌شوند(Horii and Ishii 2014). *Trichoderma harizianum* یکی از عوامل بیوکنترل موثر بوده که در حال حاضر به صورت تجاری برای کنترل چندین قارچ پاتوژن خاکزاد به صورت موفق به کار می‌رود. هدف این تحقیق، ارزیابی استفاده از *Trichoderma* و میکوریز در بیوکنترل پوسیدگی رایزوکتونیای طوقه و ریشه کنجد است.

مواد و روش‌ها

نهال‌های آلوده کنجد به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی قارچ، بخش‌هایی از حد فاصل بافت بیمار و سالم جدا و بعد از کشت، ریسه‌های رایزوکتونیا خالص‌سازی شدند. به منظور تعیین تعداد هسته هیف‌ها از روش رنگ آمیزی با معرف سافرانین O (Priyatmojo *et al.* 2001) و برای تعیین گروه‌های آناستوموزی بر اساس روش (Kroland and Stanghellnii 1988) و تهیه ایناکولوم قارچ عامل بیماری بر اساس روش اسنه و همکاران عمل شد. در این روش ۵۲۰ گرم بذر جو خشک و ۳۰۰ میلی لیتر از آب در یک ارلن یک لیتری مخلوط کرده تا ۲۴ ساعت بماند. پس از اتوکلاو بذرها با قرص‌های ۵ میلی‌متری میسیلیوم *Rhizoctonia solani* از محیط کشتی که سه روز از رشد آن گذشته بود، آلوده گشته و به مدت سه هفته در دمای اتاق نگهداری شدند(Sneh *et al.* 1991). آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده انجام شد. برای آلوده کردن نهال کنجد سه روزه دو عدد بذر جو آلوده در کنار طوقه هر نهال قرار داده شد. پس از ۴ تا ۱۰روز از نواحی خسارت دیده نمونه برداری صورت گرفت و قطعات آلوده ریشه وطوقه خسارت دیده برای جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل و بر روی محیط‌های کشت عمومی کشت داده شدند (Priyatmojo *et al.* 2001). برای انجام آزمایشات کنترل بیولوژیک جدایه‌های قارچ‌های آنتاگونیست (*Trichoderma harizianum* و *Rhizophagus intraradices*) مذکور از گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ولی‌عصر(عج) تامین گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷تیمار(مایه‌زنی خاک با تریکودرما، مایه‌زنی خاک با میکوریزآربسکولار، مایه‌زنی خاک با تریکودرما و میکوریزآربسکولار توام، مایه زنی بذر با تریکودرما، مایه زنی بذر با میکوریز آربسکولار و مایه‌زنی بذر با تریکودرما و میکوریز آربسکولار توام و شاهد بدون عوامل آنتاگونیست) و ۴ تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. در گلدان‌های خاک کاربرد با مایکوریز، ۵۰ گرم ایناکولوم خاکی حاوی اسپور و ریسه *Rhizophagus intraradices* اضافه شد. همچنین در تیمارهای خاک مایه‌زنی شده با تریکودرما، ۸۰ گرم مایه ایناکولوم تهیه شده به روشی که در بالا برای تولید ایناکولوم رایزوکتونیا انجام شد، به هر گلدان اضافه گردید. در گلدان‌های تیمار بذرمال، سه عدد بذر کنجد که در محلول ۲ درصد کربوکسی متیل سلولز (CMC) آغشته و چسبناک شده بودند (De camargo *et al.* 2017) در خاک حاوی اسپور و ریسه مایکوریز تلقیح شده و در گلدان‌ها کشت داده شدند. تیمارهای شاهد نیز فاقد هرگونه عامل بیوکنترل و تنها حاوی ۴ کیلوگرم خاک

www.SID.ir

Archive of SID

استریل بودند. پس از یک ماه از رشد نهال‌های کنجد، تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها توسط قارچ میکوریز براساس روش بیرمن و لیندرمن، انجام شد (Biermann and Linderman 1981). سپس برای آلوده کردن گیاه چهار عدد بذر جو آلوده با پنس سترون در کنار طوقه هر گیاه قرار داده شد. ارزیابی تیمارهای مختلف بر اساس شدت علایم بیماری صورت گرفت. همچنین اثر عوامل بیوکنترل روی خصوصیات مرفولوژیکی مانند طول ساقه و وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه مورد بررسی قرار گرفت. شدت بیماری به قرار زیر امتیاز بندی شد:۰=عدم بیماری،۱=۱ میلیمتر توسعه بیماری،۲=۱ تا ۲ میلیمتر توسعه بیماری،۳= توسعه بیماری ۲ تا ۳ میلیمتر،۴= توسعه بیماری ۳ تا ۴ میلیمتر،۵= گیاهچه از بین رفته (Promato *et al.* 1998).

نتایج

ریسه‌ها از نظر انشعابات ۹۰ درجه، فرو رفتگی در محل انشعاب، دیواره عرضی بشکه‌ای شکل، مورد بررسی قرار گرفتند و همه این موارد در مورد ریسه‌های جدایه‌های مشکوک به رایزوکتونیا صدق می‌کرد. همه جدایه‌ها چند هسته‌ای و متعلق به گروه آناستوموزی ۳ بودند. نتایج رنگ‌آمیزی ریشه نیز کلنیزاسیون ریشه‌ها توسط *Rhizophagus intraradices* را نشان داد. که بیشترین مقدار(میانگین=۸۵٪) متعلق به تیمار مایه‌زنی خاک با مایکوریز بود. پس از بررسی علائم ایجاد شده، بیماری‌زایی هر جدایه روی گیاهان کنجد مشاهده شد. با توجه به جدول همه تیمارها به طور معناداری بیماری را کاهش دادند. همچنین میکوریز به تنهایی و همراه با تریکودرما به طور معنی‌داری وزن تر اندام‌های هوایی را افزایش داد. دراین بین میکوریز وتریکودرما به روش بذرمال نسبت به بقیه تیمارها بیشترین تاثیر در کاهش بیماری (میانگین= ۰,۱۱) و افزایش وزن تر اندام‌های هوایی (میانگین=۶,۲) و طول ساقه (میانگین=۲۲,۶۷) را نشان‌دادند. با توجه به مقایسه میانگین‌های وزن تر ریشه، میکوریز و تریکودرما به روش بذرمال بیشترین وزن تر ریشه (میانگین=۵,۱۶) را نشان‌داد. همچنین تیمار تریکودرما به روش خاک کاربرد بیشترین وزن خشک ریشه (میانگین=۳,۰۴) و تیمار مایکوریز و تریکودرما به روش خاک کاربرد بیشترین وزن خشک اندام هوایی (میانگین=۳,۲۳) که از نظر آماری با سایر تیمارهای فاقد عوامل آنتاگونیست تفاوت معناداری داشت.

جدول ۱- مقایسه میانگین کاربرد قارچ‌های *Rhizophagus intraradices* و *Trichoderma harzianum* در دو روش خاک و بذر کاربرد روی نهال‌های کنجد آلوده به *Rhizoctonia solani*

Table 1. Comparison of the average application of *Rhizophagus intraradices* and *Trichoderma harizianum* in soil and seed application on sesame seedlings infected with *Rhizoctonia solani*

Treatment	Disease** severity	Fresh shoot weight*	Fresh root weight**	Shoot length*	Dry root weight**	Dry shoot weight*	Colonization percentage**
Control	0.58[a]	0.96 [d]	[d] 0.36	3 [d]	0.11 [e]	0.2 [d]	0 [e]
Inoculated soil with Mycorrhizae	0.34 [b]	3.03 [c]	[c] 2.4	[c] 12.67	1.26 [cd]	1.03 [c]	0.85 [a]
Inoculated soil with *Trichoderma*	19 [cd].0	[bc] 53.3	[ab] 7.2	[c] 12.67	04 [a].3	5 [bc].1	0 [e]
Inoculated seed with Mycorrhizae	28 [bc].0	[b] 96.3	[bc] 03.3	[bc] 16	2.04 [bc]	1.53 [bc]	0.71 [b]
Inoculated seed with *Trichoderma*	0.31 [b]	[b] 4.26	[bc] 2.76	[bc] 17	0.86 [d]	1.83 [b]	[e] 0
Inoculated soil with *Trichoderma* and mycorrhizae	0.193 [cd]	[a] 5.63	[bc] 3.5	[ab] 18.67	1.23 [cd]	3.23 [a]	0.55 [d]
Inoculated seed with *Trichoderma* and mycorrhizae	0.11 [d]	[a] 6.2	5.16 [a]	[a] 22.67	2.76 [ab]	3.1 [b]	0.67 [c]

**Significant in 1% level
*Significant in 5% level
The averages that have at least one common alphabet are not statistically significant.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این تحقیق تاثیر میکوریز و تریکودرما بر روی بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی کنجد بررسی شد که به طور نسبی این عوامل بیوکنترل علایم بیماری را کاهش و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه را افزایش‌دادند. جدایه‌های عوامل بیوکنترل از زمان کافی (۲ ماه) جهت استقرار و کلنیزاسیون ریشه گیاه کنجد برخوردار بودند که این یک از فاکتورهای موفقیت این عوامل در کنترل عامل خاکزاد بیماری‌زا می‌باشد. قارچ‌های میکوریز آربسکولار و تریکودرما در کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد گیاهان در اکثر مواقع موفقیت‌آمیز بوده است (Cruz *et al*. 2014, Schouteden *et al*. 2015). برخی محققین مکانیسم عمل کنترل بیماری‌زا توسط تریکودرما را تولید آنزیم‌های کیتیناز، گلوکاناز و مواد فرار ذکر کرده‌اند. این ترکیبات علاوه بر کاهش رشد میسیلیوم‌های *Rhizoctonia solani* ، موجب فعال شدن ژن‌هایی می‌شوند که در سیستم مقاومت گیاه نقش‌دارند. هم‌چنین افزایش قابل توجه محصولات فنلی، مشتقات اسید سینامیک و کاتکین‌ها نیز در مکانیزم کنترل تریکودرما علیه رایزوکتونیا مشاهده شده است(Nawrocka *et al*. 2017). در همین رابطه زیدان و همکاران با به کار بردن توام قارچ‌های مایکوریز آربسکولار و تریکودرما علیه پوسیدگی فوزاریومی ریشه کنجد به نتایج مشابهی دست یافتند (Ziedan *et al*. 2011). در بررسی دیگر که توسط دهنه و همکاران در سال ۱۹۷۸ انجام‌شد، این نتیجه به دست‌آمد که کاربرد مایکوریز در خاک موجب حذف عوامل بیماری‌زا از ریزوسفر کنجد شده و یا فعالیت آنها را کاهش داده و موجب مقاومت به دلیل افزایش آنزیم کیتیناز در ریشه می گردد(Dehne *et al*. 1978).

بر طبق بررسی که بر روی پنبه انجام گرفت اثر تقابل سه گونه از قارچ‌های میکوریز با قارچ عامل پژمردگی *Verticillium dahlia* آزمایش‌شد. بر طبق این آزمایش کلونیزه‌شدن ریشه گیاه با گونه‌های میکوریزی باعث افزایش فاکتورهای رشدی از جمله وزن تر و خشک اندام هوایی، ارتفاع گیاه، سطح کلی برگ و فتوسنتز گیاه پنبه شد. این نتایج می‌تواند ناشی از تغییر یا افزایش هیدراتاسیون برگ، پتانسیل اسمزی برگ، هدایت یونی، فتوسنتز و تعرق گیاه باشد که همه آن‌ها با افزایش کلنیزاسیون ریشه رابطه مستقیم دارند(Augé 2001). هم‌چنین تغییر شکل ریشه‌ها که باعث جذب بیشتر مواد غذایی می‌شود نیز در این موضوع نقش‌دارد. گونه‌های قارچ میکوریز در این آزمایش باعث کنترل این بیماری شدند که با نتایج به عمل آمده توسط ما مطابقت داشت (Kobra *et al.* 2009). اثر سینرژیست بین تریکودرما و میکوریز می‌تواند به علت تحریک قارچ میکوریز توسط تریکودرما به تولید اسپور باشد و در همین راستا محققان متعددی ثابت کرده‌اند که قارچ های ساپروفیت مانند *Trichoderma pseudokoningii*می‌توانند رشد میسیلیوم میکوریزی مانند *Gigaspora rosea* را افزایش‌داده و در نتیجه تولید اسپور را القاکنند (Martinez *et al*. 2004). همچنین در بررسی دیگر که روی برهم‌کنش مایکوریز و تریکودرما و سایر عوامل میکروبی مفید و تاثیر آن‌ها روی رشد و جذب عناصر غذایی گیاه و کنترل پوسیدگی پیتیومی انجام‌شد، مشخص‌گردید که تولید آنزیم‌های کیتیناز توسط تریکودرما در ریشه‌های کلنیزه شده توسط مایکوریز بیشتر است. همچنین در حضور مایکوریز تاثیرات مثبت تریکودرما روی رشد گیاه افزایش می‌یابد(Vázquez *et al*. 2000).

REFERENCES

Ahmad MA, EH S (2011) Anti-nutritional factors as screening criteria for some diseases resistance in sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes. Journal of Plant Breeding and Crop Science 3: 353-367.

Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11: 3-42.

Biermann B, Linderman R (1981) Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. New Phytologist 87: 63-67.

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Cruz A, Soares W, Blum L (2014) Impact of the arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria on biocontrol of white root rot in fruit seedlings. Journal of Plant Physiology Patholology 2:1-5.

De Camargo F. R. T, Isneider S, Campos, A (2017) Physiological quality of soybean seeds treated with carboxymethyl cellulose and fungicide. American Journal of Plant Sciences 8(11): 2748.

Dehne H (1978) Increased susceptibility of mycorrhizal plants to rust, powdery mildew and anthracnose. 3rd International Congress of Plant Pathology 16:8.

Dugassa G, Von Alten H, Schönbeck F (1996) Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health *Oflinum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. Plant and Soil 185: 173-182.

Elewa I, Mostafa M, Sahab A, Ziedan E (2011) Direct effect of biocontrol agents on wilt and root-rot diseases of sesame. Archives of Phytopathology and plant protection 44: 493-504.

Horii S, Ishii T (2014) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and their partner bacteria on the growth of sesame plants and the concentration of sesamin in the seeds. American Journal of Plant Sciences 5: 3066.

Kobra N, Jalil K, Youbert G (2009) Effects of three *Glomus* species as biocontrol agents against *Verticillium*-induced wilt in cotton. Journal of Plant Protection Research 49: 185-189.

Kronland W, Stanghellini M (1988) Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 78:820-822.

Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, GancelChollet-Imbert M, Jacques P (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Applied and environmental microbiology 71: 4577-4584.

Martinez A, Obertello M, Pardo A, Ocampo JA, Godeas A (2004) Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. Mycorrhiza 14: 79-84.

Nawrocka J, Szczech M, MałolepSza U (2017) *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. Plant Protection Science 54: 17-23.

Priyatmojo A, Yotani Y, Hattori K, Kageyama K, Hyakumachi M (2001) Characterization of *Rhizoctonia spp*. causing root and stem rot of miniature rose. Plant disease 85: 1200-1205.

Poromato S, H Nelson B, Freeman T (1998**)** Assocation of binucleate *Rhizoctonia* with soybean and mechanism of biocontrol of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 88: 1056-1067.

Schouteden N, De Waele D, Panis B, Vos CM (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi for the biocontrol of plant-parasitic nematodes: a review of the mechanisms involved. Frontiers in microbiology 6: 1280.

Sneh B, Burpee L, Ogoshi A (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS, USA.

Ziedan ES, Elewa I, Mostafa M, Sahab A (2011) Application of mycorrhizae for controlling root diseases of sesame. Journal of Plant Protection Research 51: 355-361.

Vázquez M, César S, Azcón R, Barea J (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. Applied Soil Ecology 15: 261-272.

www.SID.ir