مقاله تحقیقی

فرمنتاسیون و فرمولاسیون قارچ آنتاگونیست *Trichoderma asperellum* برای کنترل زیستی بیماری مرگ گیاهچه چغندر قند

اصغر حیدری[۱]، شهرام نعیمی[۲]، لاله نراقی[۳]، رسول مرزبان[۴]، کبری گلکار[۵]

۱، ۲، ۳، ۴، ۵- دانشیار، دانشیار، دانشیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: اصغر حیدری، ایمیل: heydari1384@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳ ۹(۲)۵۹-۶۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

چکیده

مبارزه زیستی با بیماری‌های گیاهی با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی که زیان‌های بهداشتی فراوان داشته و نیز آلوده‌کننده محیط زیست می‌باشند، پذیرفته شده است. از مهمترین محدودیت‌های عوامل کنترل زیستی عدم کارایی کامل آن‌ها در شرایط مزرعه به سبب نداشتن پایداری و دردسترس نبودن فرمولاسیون‌های مناسب و کاربردی می‌باشد. در این پژوهش، با استفاده از دو سویه قارچ آنتاگونیست *Trichoderma asperellum* و بستر کشت سبوس برنج، ترکیب معدنی کائولن و ترکیبات آلی کربوکسی متیل سلولز و نیز صمغ عربی، چهار فرمولاسیون زیستی تهیه شد تا تاثیر آن‌ها در شرایط مزرعه در کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند بررسی شود. بدین منظور ابتدا دو سویه از قارچ آنتاگونیست *T. asperellum* انتخاب شده و سوسپانسیون اسپور این جدایه‌ها با سبوس برنج به‌عنوان بستر کشت، مخلوط شده و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت دو ماه قرار داده شد تا اسپورهای قارچ‌ها بر روی بستر، تکثیر شده و سطح بستر را کاملا بپوشاند (انجام واکنش فرمنتاسیون). ترکیبات پودری تهیه شده سپس جهت تهیه فرمولاسیون‌های زیستی، درمرحله بعد با پودر معدنی کائولن (به نسبت ۲۰٪ وزن بسترهای کلونیزه شده) به‌عنوان حامل یا پرکننده و نیز با ترکیبات کربوکسی متیل سلولز و صمغ عربی (هرکدام به میزان ۱٪ وزن بستر های کلونیزه شده) به عنوان چسباننده مخلوط شده و تعداد چهار فرمولاسیون زیستی جدید با کد های شناسایی Ka–CMC–Ta4, Ka–CMC–Ta5, Ka–AG–Ta4 و Ka–AG–Ta5 تهیه گردید. در ضمن قابلیت ماندگاری (Shelf life) فرمولاسیون‌های تهیه شده در زمان‌ها و دماهای مختلف تعیین گردید. علاوه بر آن، برخی خواص فیزیکی و شیمیایی مهم فرمولاسیون‌ها مانند pH، رطوبت نسبی و قابلیت سوسپانسیون شوندگی نیز محاسبه و تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، مرگ گیاهچه، *Rhizoctonia solani* ، فرمولاسیون‌های زیستی، *Trichoderma asperellum*

مقدمه

مبارزه زیستی با بیماری‌های گیاهی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی که زیان‌های بهداشتی فراوان داشته و نیز آلوده‌کننده محیط زیست می‌باشند، پذیرفته شده است (Rouhani *et al.*, 1990; Cheet *et al.*, 2007; Heydari & Pessarakli, 2010; Prathap & Kumari, 2017; Ramesh *et al.*, 2020). در پژوهش‌های متعددی که در کشورهای مختلف در مورد کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی انجام شده است از آنتاگونیست‌های مختلف باکتریایی و قارچی استفاده شده است (Marois *et al.*, 1984; Huang & Huang 2000; Naraghi *et al.*, 2003; Yobo *et al.*,2003; Ardakani *et al.*, 2010; Nikan *et al.*2018; Ramesh *et al.*, 2020).

در مورد قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* که عامل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه یا بوته‌میری گیاهان زراعی بسیاری از جمله چغندرقند می‌باشد پژوهش‌های چندی انجام شده است (Herr, 1996; Ershad & Shirazi, 1997; Draycott, 2006; Kakvan *et al.*, 2013). از موثرترین قارچ‌های آنتاگونیستی که بر علیه قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* در پژوهش‌های پیشین مورد استفاده قرار گرفته است، گونه‌هایی از قارچ *Trichoderma* می‌باشد. به عنوان مثال، در پژوهشی در ایران، روحانی و همکاران جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* را در کنترل قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* با موفقیت مورد آزمایش و بررسی قرار دادند (Rouhani *et al.*, 1990). همچنین در پژوهشی دیگر، Rehn و همکاران نقش موثر قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* را در کنترل قارچ‌های خاکزاد از جمله *Rhizoctonia solani* نشان داد ند (Rehn *et al.*, 2007).

بیماری مرگ گیاهچه یا بوته میری در بیشتراستان های محل کشت چغندرقند در ایران وجود داشته و هرساله خسارات زیادی به کشت این محصول به ویژه در سال‌های اخیر که بذور منوژرم یا تک جوانه مورد استفاده قرار می‌گیرد، وارد ساخته است (Ershad & Shirazi 1997; Kakvan *et al.*,2013). جهت کنترل این بیماری، تیمار بذور با قارچکش‌های شیمیایی مانند کاربوکسین–تیرام از رایج ترین روش‌ها می‌باشد که به سبب استفاده طولانی مدت از قارچ کش‌های موجود، این روش‌ها دیگر تاثیر چندانی ندارند.

در سال‌های اخیر از آنتاگونیست های قارچی مانند قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* برای کنترل این بیماری استفاده شده است (Chet *et al.*, 2007; Rehn *et al.*, 2007; Kakvan *et al.*, 2013). قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* بیشترین کاربرد را در کنترل این بیماری در داخل و خارج ایران داشته است (Chet *et al.*, 2007; Rehn *et al.*, 2007; Kakvan *et al.*, 2013).

یکی از مهمترین مشکلات و محدودیت‌های کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی، این است که میکرو ارگانیزم‌های آنتاگونیست در شرایط مزرعه دچار مشکل شده و کارایی آن‌ها کاهش می‌یابد. تاثیر عوامل محیطی مانند بافت خاک، ترکیبات خاک، باقی مانده علف‌کش‌ها و به ویژه ناپایداری و دوام کم میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست از مهمترین عواملی است که می تواند نقش بسیار مهمی در کاهش کارایی و عدم موفقیت روشهای کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی در مزرعه داشته باشد. (Heydari & Misaghi, 2003). نحوه استفاده از میکرو ارگانیزمهای آنتاگونیست در کنترل زیستی، و نیز دوام و بقای آنها در خاک و محیط مزرعه بستگی زیادی به نوع فرمولاسیون مورد استفاده دارد (Heydari & Pessarakli, 2010).

بر اساس نتایج پژوهش‌های پیشین، تهیه و استفاده از فرمولاسیون‌های زیستی با استفاده از ترکیبات آلی و معدنی به عنوان حامل و نیز چسباننده‌های مناسب نقش مهمی در کنترل بیماری‌های مختلف گیاهی از جمله مرگ گیاهچه چغندرقند داشته است (Huang & Huang, 2000; Prathap &Kumari, 2007; Jorjani *et al.*, 2013; Kakvan *et al.*, 2013; Nikan *et al.*, 2018).

با توجه به این که در ایران در زمینه استفاده از فرمولاسیون‌های زیستی در کنترل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط مزرعه، پژوهش‌های چندانی صورت نگرفته است و نیز سهولت و کاربردی بودن و کم هزینه بودن روش‌های کنترل زیستی نقش بسیار مهمی در ترغیب و تشویق کشاورزان در جهت استفاده از این روش‌ها در مزرعه و در سطوح کشت وسیع دارد، لذا ضروری است که در این موارد پژوهش‌ها و تلاش‌هایی انجام گیرد. با در نظر گرفتن نیازی که در این زمینه در کشور وجود دارد، در این پژوهش با استفاده از قارچ آنتاگونیست جدید *T. asperellum*، سبوس برنج به عنوان بستر کشت، پودر کائولن به‌عنوان حامل و نیز ترکیبات کربوکسی متیل سلولز و صمغ عربی به عنوان چسباننده اقدام به تهیه چند فرمولاسیون جدید زیستی شد. این فرمولاسیون‌ها به عنوان جایگزین سموم شیمیایی در کنترل بیماری مهم و خسارت‌زای مرگ گیاهچه در مزارع چغندرقند کشور مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

مواد و روش‌ها

الف– فرمانتاسیون جدایه های قارچ آنتاگونیست

در این مرحله دو جدایه از قارچ آنتاگونیست *T. asperellum* که بر اساس نتایج آزمایشات گلخانه ای در کنترل بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه چغندرقند مؤثرترین بودند، با کدهای شناسایی Ta–4و Ta–5 انتخاب شده و برای تهیه سوسپانسیون اسپور آماده گردیدند.

ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت PDA کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند تا تولید اسپور نمایند. در مرحله بعد برای کشت و تکثیر قارچ روی بستر سبوس برنج، ابتدا با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک نه سانتی‌متری و شستن اسپورهای تولید شده، سوسپانسیونی با غلظت 10^7 اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر سترون تهیه و از هر سوسپانسیون مربوط به هر جدایه، به میزان ۲۰ میلی لیتر به هر یک از کیسه های سلوفانی حاوی ۲۵۰ گرم از بستر سبوس برنج که قبلا در فشار یک و نیم اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شده بودند، اضافه و کاملا مخلوط شدند. کیسه‌های تلقیح شده به مدت دو ماه در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا با انجام مرحله فرمنتاسیون قارچ‌های آنتاگونیست رشد کرده و سطح بستر را کاملا بپوشانند. در مرحله بعد، محتویات هر کیسه خارج شده و در دمای آزمایشگاه کاملا خشک شده و ترکیبات پودری حاصل (بسترهای کلونیزه شده) جهت تهیه فرمولاسیون های تکمیلی با استفاده از روش‌های بیان شده در منابع (Naeimi *et al*., 2019; Naeimi *et al*., 2020) به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفتند:

ب– تهیه فرمولاسیون‌های زیستی

بسترهای آلی کلونیزه شده با هر یک از دو سویه Ta–4و Ta–5 قارچ آنتاگونیست *T. asperellum* پس از خشک شدن در هوا (Air Dried) با ماده حامل (Carrier) پودر کائولین (شرکت کیمیا سبزآور)، به نسبت ۲۰٪ وزنی مخلوط شد. ترکیبات چسباننده (stickers) کربوکسی متیل سلولز (Carboxy methylcellulose=CMC, BDH, England) و یا صمغ عربی (acacia ash, Alfa Aesar, Germany) در تیمارهای جداگانه با نسبت ۱٪ وزنی مخلوط و از ترکیب آن‌ها چهار فرمولاسیون زیستی جدید تهیه شد.

تعیین قابلیت ماندگاری (Shelf life) فرمولاسیون‌ها

جمعیت سویه تریکودرمای مورد نظر در هر بستر کلونیزه شده، با روش سری رقت (Serial Dilution) در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) به صورت تعداد واحدهای پرگنه‌ساز در هر گرم فرمولاسیون (CFU /g) تعیین شد. برای تعیین تعداد واحدهای کلنی‌ساز، یک گرم پودر از هر یک از تیمارها به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و پس از تهیه رقت‌های متوالی، ۲۵۰ میکرولیتر از هر رقت با سه تکرار با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای L شکل روی محیط کشت پخش شد. ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و بعد از سه روز نسبت به شمارش تعداد پرگنه‌های تریکودرما اقدام شد. تعیین جمعیت فعال (زنده) سویه‌های تریکودرما در فرمولاسیون‌ها بر حسب تعداد واحدهای کلنی‌ساز در هر گرم پودر (CFU/ g)، هر سه ماه یک بار و به مدت شش ماه در دو دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) و یخچال (۴ درجه سلسیوس) انجام شد.

تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی مهم فرمولاسیون‌ها

برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مهم فرمولاسیون‌ها شامل درصد رطوبت، pH، سوسپانسیون شوندگی (Suspensibility) مطابق روش‌های استاندارد بررسی شد. درصد رطوبت، با قرار دادن فرمولاسیون در آون ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت محاسبه شد. علاوه بر موارد فوق، pH با استفاده از دستگاه پی‌اچ متر (Ultra Basic, Denver Instrument) اندازه‌گیری شد. درصد سوسپانسیون شوندگی فرمولاسیون‌ها نیز مطابق روش CIPAC اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۰/۷۵ گرم از هر فرمولاسیون به ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و ۶۰ بار تکان داده شد. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در جای ساکن قرار داده

شد. از قسمت بالایی مخلوط، ۲۲۵ میلی‌لیتر برداشته و باقیمانده پس از خشک کردن در آون، توزین شد.

نتایج

دوره‌های رشد و نمو

نتایج به دست آمده از این پژوهش در جداول ۱ تا۳ ارائه گردیده است. جدول ۱ نشان دهنده قابلیت ماندگاری فرمولاسیون‌ها در دو دمای ۴ درجه سلسیوس (یخچال) و نیز ۲۵ درجه سلسیوس (آزمایشگاه و محیط) در زمان‌های تهیه، سه ماه بعد از تهیه و شش ماه بعد از تهیه می‌باشد. همان گونه که جدول ۱ نشان می‌دهد در زمان تهیه فرمولاسیون‌ها جمعیت قارچ آنتاگونیست در ترکیبات پودری حاصل ازفرمنتاسیون در شرایط آزمایشگاه و یخچال یکسان می‌باشد. در زمان‌های سه ماه و شش ماه پس از تهیه فرمولاسیون‌های زیستی جمعیت قارچ آنتاگونیست در ترکیبات پودری حاصل از فرمنتاسیون به تدریج کاهش یافته و در شرایط یخچال در مقایسه با شرایط آزمایشگاه بیشتر می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱– قابلیت ماندگاری (Shelf life) فرمولاسیون‌های زیستی

Table 1. Shelf life of bioformulations

Formulation	Active ingredient	Fungal antagonist population (CFU/gr)		Fungal antagonist population (CFU/gr)		Fungal antagonist population (CFU/gr)	
		Month 0		Month 3		Month 6	
		25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C
Colonized substrate1	*Trichoderma asperellum* Ta–4	10^9	10^9	4.0×10^8	2.0×10^9	5.0×10^6	3.0×10^8
Colonized substrate2	*Trichoderma asperellum* Ta–5	10^9	10^9	1.0×10^9	4.5×10^9	2.0×10^8	2.0×10^9

جدول ۲ نشان‌دهنده برخی خصوصیات مهم فیزیکی و شیمیایی فرمولاسیون های تهیه شده می باشد. همان گونه که در جدول آمده است ماده فعال فرمولاسیون‌ها قارچ آنتاگونیست *T. asperellum* (سویه های T.a–4و T.a–5) می باشند. همچنین بر اساس جدول ۲، میزان رطوبت در دو فرمولاسیون زیستی به ترتیب ۴۶ و ۴۷٪ محاسبه شده است. خاصیت سوسپانسیون شوندگی فرمولاسیون‌ها که یک فاکتور مهم می باشد نیز یکسان و برابر ۲۷٪ می‌باشد (جدول ۲). آخرین فاکتور اندازه‌گیری شده در فرمولاسیون‌ها، pH است که به ترتیب برابر ۷.۹۲ و ۷.۹۵ می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲– خواص مهم فرمولاسیون‌های زیستی تهیه شده

Table 2. Important properties of developed bioformulations

Bioformulation	Active ingredient	Humidity (%)	Suspensibility (%)	pH
Colonized substrate1	*Trichoderma asperellum* Ta–4	46	27	7.92
Colonized substrate2	*Trichoderma asperellum* Ta–5	47	27	7.95

جدول ۳ نشان دهنده فرمولاسیون‌های تهیه شده تکمیلی و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن‌ها می‌باشد. همان گونه که در جدول آمده است، در این پژوهش، چهار فرمولاسیون زیستی تهیه گردید که ماده فعال آن‌ها دو سویه از قارچ آنتاگونیست*T. asperellum* (سویه‌های ۴ و ۵)، ترکیب معدنی Kaolin به عنوان حامل (Carrier) و دو ترکیب آلی کربوکسی متیل سلولز (CMC) و صمغ عربی(AG) به‌عنوان چسباننده (Sticker) می‌باشند.

جدول ۳– فرمولاسیون‌های زیستی تهیه شده و خصوصیات آن‌ها

Table 3. Developed bioformulations and their characteristics

Bioformulation	Carrier	Antagonistic fungal strain	Sticker
Ka–CMC–Ta–4	Kaolin	*Trichoderma asperellum* (strain 4)	Carboxy methyl cellulose
Ka–AG–Ta–4	Kaolin	*Trichoderma asperellum* (strain 4)	Arabic gum
Ka–CMC–Ta–5	Kaolin	*Trichoderma asperellum* (strain 5)	Carboxy methyl cellulose
Ka–AG–Ta–5	Kaolin	*Trichoderma asperellum* (strain 5)	Arabic gum

بحث

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که با استفاده از برخی ترکیبات تکمیلی می‌توان از میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست مانند قارچ *T. asperellum*، فرمولاسیون‌هایی تهیه کرد که امکان استفاده از آن‌ها را در شرایط مزرعه فراهم می‌سازد.

یکی از محدودیت‌های استفاده از عوامل کنترل زیستی (Biological Control Agents) کاهش توان آنتاگونیستی و تاثیر آن‌ها در شرایط واقعی مزرعه در مقایسه با شرایط کنترل شده گلخانه می‌باشد. این موضوع می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. از مهمترین این دلایل می‌تواند تاثیرات بازدارنده عوامل محیطی مانند بافت خاک، دمای خاک، میزان رطوبت خاک و نیز تاثیر باقی مانده علف‌کش‌ها باشد (Heydari & Misaghi, 2003). دلیل مهم دیگر کاهش تاثیر عوامل کنترل زیستی از جمله میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست در شرایط مزرعه، ناپایداری و دوام کم آن‌ها است که می‌تواند ناشی از در دسترس نبودن فرمولاسیون‌های مناسبی از این عوامل باشد (Heydari & Pessarakli, 2010).

فرمولاسیون مناسب یکی از مهمترین فاکتورهایی است که می‌تواند نقش بسزایی در کاربرد و تاثیر عوامل کنترل زیستی از جمله باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست در مزرعه داشته باشد. در پژوهش‌های پیشین متعددی در مورد کنترل زیستی بیماری‌های مختلف گیاهی نشان داده شده است که تکثیر میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست روی بسترهای آلی و نیز افزودن ترکیبات چسباننده و حامل‌های مختلف باعث کاربرد آسان، افزایش پایداری و نیز تاثیر بیشتر این عوامل در کنترل زیستی بیماری های خاکزاد در مزرعه گشته است (Huang & Huang 2000; Prathap & Kumari, 2007; Jorjani *et al.*, 2013; Kakvan *et al.*, 2013; .Nikan *et al.*, 2018).

در این پژوهش جهت کشت و تکثیر قارچ آنتاگونیست از بستر آلی سبوس برنج استفاده گردید که استفاده از آن در پژوهش‌های پیشین متعددی گزارش شده است (Naraghi *et al.*, 2003; Kakvan *et al.*, 2013; Nikan *et al.*, 2018). استفاده از ترکیبات چسباننده جهت تیمار بذر در کنترل زیستی بیماری‌های بذر زاد و خاکزاد بسیار متداول می‌باشد زیرا که باعث آسان شدن و افزایش کارآیی و بازدهی مرحله پوشش بذور گشته و تاثیر بیشتر آنتاگونیست‌ها را باعث می‌شود که در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است (Jorjani *et al.*, 2013; Kakvan *et al.*, 2013 Huang & Huang, 2000; Naraghi *et al.*, 2003; Ardakani *et al.*, 2010).

بیماری مرگ گیاهچه یا بوته‌میری در اغلب استان‌های محل کشت چغندر قند در ایران وجود داشته و هرساله خسارات زیادی به کشت این محصول به ویژه در سال‌های اخیر که بذور منوژرم یا تک جوانه مورد استفاده قرار می‌گیرد، وارد ساخته است (Ershad & Shirazi, 1997; Kakvan *et al.*, 2013). برای کنترل این بیماری، تیمار بذور با قارچ‌کش‌های شیمیایی مانند کاربوکسین–تیرام از رایج ترین روش‌ها می‌باشد که به سبب استفاده طولانی مدت از قارچ‌کش‌های موجود، این روش‌ها دیگر تاثیر چندانی ندارند (مکاتبات شخصی).

در سال‌های اخیر از آنتاگونیست‌های باکتریایی و نیز آنتاگونیست‌های قارچی مانند قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* برای کنترل این بیماری استفاده شده است (Chet *et al.*, 2007; Rehn *et al.*, 2007; Kakvan *et al.*, 2013). قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* بیشترین کاربرد را در کنترل این بیماری در داخل و خارج ایران داشته است (Chet *et al.*, 2007; Rehn *et al.*, 2007; Kakvan *et al.*, 2013).

در راستای تلاش در معرفی روش‌های سازگار با محیط زیست و کاهش استفاده از سموم زیان بار شیمیایی، در این پژوهش با استفاده از دو سویه از قارچ آنتاگونیست *T. asperellum*، بستر (Substrate) سبوس برنج، حامل (Carrier)کائولین و دو ترکیب آلی کربوکسی متیل سلولز و صمغ عربی به عنوان چسباننده (Sticker)، چهار فرمولاسیون زیستی جدید تهیه گردید تا در پژوهش‌های بعدی در مزارع چغندرقند برای کنترل بیماری مهم و خسارت‌زای مرگ گیاهچه مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به تاثیر قارچ آنتاگونیست استفاده شده در کنترل تعدادی بیماری مهم خاکزاد که در منابع و رفرنس‌های فوق این موارد گزارش شده‌اند و نیز تاثیر این قارچ آنتاگونیست در کنترل بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه و همچنین نقش ترکیبات استفاده شده در تهیه فرمولاسیون‌های زیستی در پایداری و دوام قارچ‌های آنتاگونیست، امید آن می‌رود که این فرمولاسیون‌ها در شرایط مزرعه در کنترل و کاهش خسارت بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند موثر واقع شوند.

سپاسگزاری

نگارندگان بدین وسیله ازآقای دکتر دوستمراد ظفری، استاد محترم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه بوعلی سینا –همدان به خاطر اهدای سویه‌های قارچ آنتاگونیست سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Ardakani, S., Heydari, A., Khorasani, N. & Arjmandi, R. 2010. Development of new bioformulations of Pseudomonas fluorescens and evaluation of these products against damping–off of cotton seedlings. Journal of Plant Pathology, 92(1): 83–88.

Ershad, J. & Shirazi, G. 1997. Sugar beet damping–off disease Iranian Journal of Plant Disease. 35: 243–249.

Chet, I., Harman, G.E. & Baker, R. 2007. *Trichoderma hamatum*: Its Hyphal Interactions with Rhizoctonia solani and Pythium spp Microbial Ecology, 7(1): 29–38.

Draycott, A.P. 2006. Sugar beet. Blackwell publishing, 474pp.

Herr, L.J. 1996. Sugar beet diseases incited by Rhizoctonia species. In: Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control, eds. Sneh, B., Jabaji–Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. Kluwer Academic Publishers, 341–350.

Heydari, A. & Misaghi, I.J. 2003. The role of rhizosphere bacteria in herbicide–mediated increase in *Rhizoctonia solani*–induced cotton seedling damping–off. Plant & Soil, 257: 391–396.

Heydari, A. & Pessarakli, M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. Journal of Biological Sciences, 10(4): 272–290.

Huang, J.W. & Huang, H.C. 2000. A formulated container medium suppressive to Rhizoctonia damping– off of cabbage. Botany Bulletin Academic Scince, 41: 49–56.

Jorjani, M., Heydari, A., Zamanizadeh, H.R., Rezaee, S. & Naraghi, L. 2013. Controlling sugar beet mortality disease by application of new bioformulations. Journal of Plant Protection Research, 52(3): 303–307.

Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H., Rezaee, S. & Naraghi, L. 2013. Development of new bioformulations using Trichoderma and Talaromyces fungal antagonists for biological control of sugar beet damping–off disease. Crop Protection, 53: 80–84.

Marois, J.J., Fravel, D.R. & Papavizas, G.C. 1984. Ability of *Talaromyces flavu*s to occupy the rhizosphere. Soil Biol. Biochem, 16(4): 387–390.

Naeimi, S., Khosravi, V., Nouri, M.Z., Hoda, H., Vágvölgyi, C. & Kredics, L. 2019. Biological control of rice sheath blight disease with formulation of indigenous Trichoderma strains under paddy field condition. Acta Biologica Szegediensis, 63(1): 37–43.

Naeimi, S., Khosravi, V., Varga, A., Vágvölgyi, C. & Kredics, L. 2020. Screening of organic substrates for solid–state fermentation, viability and bioefficacy of Trichoderma harzianum AS12–2, a biocontrol strain against rice sheath blight disease. Agronomy, 10(9): 1258.

Naraghi, L., Heydari, A., Karimi Roozbehani, A. & Ershad, J. 2003. Isolation of *Talaromyces flavus* from Gorgan cotton fields and investigation of its antagonistic effects against *Verticillium dahlia* causal agent of cotton wilt disease. Iranian Journal of Plant Pathology, 39: 109–121.

Nikan, J., Heydari, A., Naraghi, L., Arjmandian, A. & Mahdizadeh Naraghi, R. 2018. Application of some fungal bioformulations for controlling garlic white rot disease in the field conditions. Biocontrol in Plant Protection, 5(2): 75–83.

Prathap, M. & Kumari, B.D. 2017. Bioformulation in Biological Control for Plant Diseases–A Review. International Journal of Biotech Trends and Technology, 7(3): 1–8.

Ramesh, N., Rezaee, S., Naeimi, S. & Fotouhifar, K. 2020. Evaluation of rice fungal endophytes for biological control of blast disease. BioControl in Plant Protection, 8(2): 1–17.

Rehn, V.N.C., Rehn, K.G., Mendonça–Hagle, L., Smalla, K. & Berg, K. 2007. Analysis of antagonistic interaction between Trichoderma isolates from Brazilian weeds and the soil–borne pathogen *Rhizoctonia solani.* Journal of Plant Disease and Protection, 14(4): 167–175.

Rouhani, H. Karimi Roozbehani, A. & Khoaparast, F. 1990. The role of Iranian isolates of Trichoderma in biological control of *Rhizoctonia solani*. Iranian Journal of Plant Pests and Diseases, 58(1–3): 17–35.

Yobo, K.S., Laing M.D., Hunter, C.H. & Morris, M.J. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani* by two Trichoderma species isolated from South African composted soil. South African Journal of Plant Soil, 21(3): 139–145.

Fermentation and formulation of *Trichoderma asperellum* for biological control of sugar beet damping–off disease

Asghar Heydari[1], Shahram Naeemi[2], Laleh Naraghi[3], Rasoul Marzban[4], Kobra Golkar[5]

1., 2., 3., 4., 5. Associate Professor, Associate Professor, Associate Professor, Associate Professor, M.Sc. student, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension (AREEO), Tehran, Iran.

Corresponding author: Asghar Heydari, email: heydari1384@yahoo.com

Received: Nov., 24, 2021 9(2) 59–66 Accepted: Feb., 05, 2022

Abstract

Biological control of plant diseases using bacterial and fungal antagonists has been accepted as a suitable alternative for the chemical control which is harmful for human health and it is also a contaminant of the agricultural environment. One of the important limitations of biocontrol agents is the ineffectiveness in the field conditions which is related to the lack of stability and duration of biocontrol agents that can mostly be due to the lack of proper formulations. In this research study, four new bioformulations were developed and prepared using two strains of a fungal antagonist (*Trichoderma asperellum)*, rice bran as the substrate, Kaolin as the carrier and carboxy methyl cellulose and arabic gum as the stickers. For the development of bioformulations, rice bran substrate was mixed with spore suspension of two most effective strains of *T. asperellum.* Plastic bags containing rice bran and fungal antagonists spore suspension were incubated for two months at 25^0C until the fungus covered the whole surface of the substrate in the bags (Fermentation phase). The containing of the bags was then evacuated and the powdery colonized substrate was used for the development of final bioformulations. The bioformulations were developed and produced by mixing Kaolin powder as the carrier by 20% of the substrate weight and two stickers including Carboxy Methyl Cellulose (CMC) and Arabic Gum (AG) each by 1% of substrate weight. Four bioformulations were produced with the identification codes of Ka–CMC–Ta–4, Ka–AG–Ta–4, Ka–CMC–Ta–5 and Ka–AG–Ta–5 respectively. In addition, the shelf life and some important physical and chemical properties of the bioformulations including percent humidity, pH and their suspensibility were also determined.

Keywords: Sugar beet, Seedling damping–off, *Rhizoctonia solani*, Bioformulations, *Trichoderma asperellum*