مهار زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی کنجد در استان خراسان رضوی با *Trichoderma harzianum* در شرایط آزمایشگاه وگلخانه

علی ناظور[۱]، مجتبی ممرآبادی[۲*] و پریسا طاهری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- ***نویسنده مسوول**: دانشیار ،گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (mamarabadi@um.ac.ir)

۳- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۵

چکیده

کنجد یکی از گیاهان زراعی با ارزش غذایی فراوان است که از حمله‌ی میکروارگانیسم‌های بیمارگر از جمله قارچ‌ها، مصون نیست. ایجاد بیماری‌هایی مانند پژمردگی آوندی در این گیاه، باعث کاهش راندمان محصول می‌گردد. تعداد ۱۷ جدایه مربوط به *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* از گیاهان کنجد مشکوک به بیماری در مناطق مختلف استان خراسان رضوی جداسازی شدند. برای بررسی امکان مهار زیستی از قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* جدایه‌ی TR5 استفاده گردید. در آزمون بیماری‌زایی تمام جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *sesami* بیماری‌زا بوده و از این نظر با هم دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان دادند که بیش‌ترین شدت بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های BA15 و BA16 هر دو با ۸۷/۵ درصد پژمردگی و کم‌ترین شدت بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های AN7 و KA33 هر دو با ۱۲/۵ درصد پژمردگی گیاه کنجد بود. در آزمون بررسی آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی از روش کشت متقابل بیمارگر با آنتاگونیست استفاده گردید که بیش‌ترین میزان بازدارندگی از رشد ناشی از اثر آنتاگونیستی *T. harzianum* مربوط به جدایه‌ی BA1 با ۸۸/٤۵ درصد و کم‌ترین میزان بازدارندگی از رشد ناشی از تقابل با آنتاگونیست مذکور مربوط به جدایه‌ی AN2 با ۷۱/۳۳ درصد بود. هم‌چنین در شرایط گلخانه‌ای میزان کاهش شدت علائم بیماری در بین جدایه‌های مورد آزمایش، متفاوت بوده و اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان دادند. بیش‌ترین تأثیر آنتاگونیستی *T. harzianum* روی جدایه‌های BA1، AN7 و K33 با کاهش شدت بیماری به میزان ۱۰۰ درصد و کم‌ترین تأثیر مربوط به جدایه‌ی AN2 با کاهش شدت بیماری به میزان ٥٤/٥٤ درصد بود.

کلمات کلیدی: پژمردگی آوندی، کنجد، مهار زیستی، *Trichoderma harzianum*.

دبیر تخصصی: دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا

مقدمه

کنجد (*Sesamum indicum* L.) یک گیاه علفی یک ساله و از خانواده Pedaliaceae است که به دلیل داشتن دانه‌های خوراکی خوش طعم و توپر کشت می‌شود. این گیاه از زمان باستان در شبه قاره هند و در سراسر بین النهرین و آناتولی شرقی رشد کرده و در قرن دوم قبل از میلاد مسیح به چین گسترش یافت (Bedigian, 2010). کشت این گیاه در مناطق با شرایط خشکی و پرتنش مناسب است. ولی کنجد نیز مانند سایر گیاهان زراعی مورد هجوم عوامل بیمارگر قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار می‌گیرد که معمولاً خسارت بالای این عوامل متعلق به بیمارگرهای قارچی است (Izadpanah et al., 2010). Sharifnabi (2010) سه عامل قارچی *Alternaria* spp.، *Cercospora* spp. و سفیدک‌های سطحی را از مهم‌ترین بیماری‌های هوابرد این گیاه دانسته است، اما در این بین بیماری‌های خاک‌برد مهم‌تر از بیماری‌های هوابرد بوده، خسارت بیش‌تری را وارد می‌کنند. عوامل قارچی پژمردگی‌های آوندی نیز از راه خاک وارد گیاه شده و از اهمیت خاصی برخوردارند.

عامل بیماری پژمردگی آوندی (*Fusarium oxysporum* Schlechtend)، دامنه‌ی وسیعی از گیاهان زراعی و باغی از جمله موز، کاهو، گوجه‌فرنگی، پنبه، کتان، خربزه، هندوانه، پیاز و غیره را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد. این قارچ میکرو و ماکروکنیدیوم و کلامیدوسپور تولید می‌کند (De Hoog et al. 2000). تکرار چندین باره‌ی چرخه‌ی بیماری نتیجه‌ی طبیعت پایای این قارچ است (Freeman et al., 2002). آلودگی بذری ناشی از این گونه فقط محدود به پوسته‌ی زیرین بذر بوده (Conway, 1996) و بقایای گیاهان آلوده مهم‌ترین منبع گسترش بیماری به سایر مناطق هستند (Suarez-Estrella et al., 2004). قارچ پس از ورود اولیه به مزرعه و با کشت میزبان حساس در همان منطقه، توسط ترشحات نوک ریشه، فعال شده و از طریق منطقه‌ی طویل شدن و یا زخم‌ها وارد گیاه می‌گردد (Freeman et al., 2002). سپس قارچ در داخل آوند چوبی رشد کرده، مانع از رسیدن آب و مواد محلول به اندام‌های بالاتر می‌شود. در نهایت باعث ایجاد علائمی از جمله زردی، کوتولگی، پژمردگی و در نهایت مرگ در گیاه می‌شود (Etebaryan, 2002).

پژمردگی عمومی یا بخشی از گیاه، تغییر رنگ و قهوه‌ای شدن ساقه در هنگام برش آن، پدیدار شدن نوارهای رنگی ارغوانی بر روی ساقه از جمله از علائم بیماری پژمردگی ناشی از فوزاریوم در گیاه کنجد هستند. گیاهان آلوده دچار تغییر رنگ به زرد و سپس پژمردگی به صورت یک طرفه شده، به دنبال آن برگ‌های زرد می‌ریزند (Dong-hua et al., 2012). بیماری‌های پژمردگی آوندی از آسیب‌رسان‌ترین بیماری‌های گیاهی هستند. در حقیقت تقریباً همه‌ی گونه‌های گیاهان زراعی، مستعد ابتلا به این نوع بیماری‌ها هستند و سالانه میلیاردها دلار خسارت به بخش کشاورزی وارد می‌کنند (Klosterman et al., 2011).

مهار بیماری‌های پژمردگی آوندی به دلیل ساختارهای زنده‌مانی فراوان و بقای طولانی مدت آن‌ها و رشد عامل این بیماری در آوندهای چوبی گیاه میزبان دشوار است. همه این عوامل باعث ناکارآمد شدن استفاده از ترکیبات شیمیایی می‌گردند (Albukhari, 2015). یکی دیگر از عوامل پژمردگی آوندی می‌توان به جنس *Verticillium* اشاره کرد. در میان گونه‌های آن، گونه‌ی *Verticillium dahlia* Kleb. از سایر گونه‌های این جنس از حیث مهار چالش برانگیزتر است. زیرا این گونه می‌تواند بیش‌تر از سایر گونه‌ها در خاک زنده بماند و نظارت بر مهار آن سخت‌تر است. ساختارهای زمستان‌گذران در *Verticillium* spp. مایه‌ی اولیه بیماری‌زا در گیاهان هستند. بنابراین مهار این بیماری نیازمند توجه ویژه به آن‌هاست (Hu et al., 2014).

مهار بیماری پژمردگی آوندی توسط سموم شیمیایی غالباً اقتصادی نبوده و دارای اثرات منفی زیست‌محیطی و ایجاد انواع مقاومت به قارچ‌کش‌هاست. از مهار زیستی به عنوان جایگزین قابل قبول زیست‌محیطی به جای روش‌های شیمیایی موجود برای مهار قارچ‌های بیماریزای خاک‌برد می‌توان استفاده کرد. چندین عامل مهار زیستی قادر به مهار بیماری‌های ریشه کنجد در مزرعه بوده‌اند که از آن‌ها می‌توان به *Trichoderma* spp. (Neven et al., 2007)، *Bacillus subtilis* Cohn (Jacobsen et al., 2004)، گونه‌های غیربیماریزای *Fusarium oxysporum* (Shishido et al., 2005) و قارچ‌ریشه‌های Glomus spp. (Sahab et al., 2001) اشاره کرد. Elewa et al. (2011) دو آنتاگونیست *B. subtilis* و *Trichoderma viride* Pers. ex Fries را برای مهار زیستی عامل پژمردگی آوندی در کنجد (*Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* و *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid) مورد بررسی قرار داده و کاهش میزان پژمردگی و پوسیدگی ریشه را به طور قابل توجهی در سیستم ریشه‌ای کنجد و فراریشه‌ی آن مشاهده کردند. Gabr et al. (1998) با استفاده از باکتری آنتاگونیست *B. subtilis* توانستند تا حد قابل قبولی عامل پژمردگی کنجد را سرکوب و از خسارت ناشی از آن‌ها جلوگیری کنند. Chung and Hong (1991) با استفاده از گونه‌های آنتاگونیست باکتری *Streptomyces* sp. موفق به مهار بیماری پژمردگی کنجد ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* تا ۷۸ درصد در شرایط گلخانه در مقایسه با تیمار شاهد شدند. در تحقیقی دیگر توانایی آنتاگونیستی ۲۴ جدایه *Trichoderma* spp. در شرایط آزمایشگاهی در برابر *F. oxysporum* f. sp. *sesami* ارزیابی شد. دو سویه *T. harzianum* (T9) و *T. viride* (T21) اثر آنتاگونیستی بالایی در برابر *F. oxysporum* f. sp. *sesami* در شرایط *in vitro* با مهار به ترتیب حدود ۷۰ و ۶۷ درصد را از خود نشان دادند. هم‌چنین ثابت شد که این دو جدایه توانایی بالایی در مهار بیماری پژمردگی فوزاریوم در شرایط گلخانه‌ای دارند (Mahmoud and Abdalla, 2018).

مطالعه‌ی حاضر با هدف شناسایی عوامل قارچی بیمارگر عامل بیماری پژمردگی آوندی در گیاه کنجد در استان خراسان رضوی و هم‌چنین امکان مهار زیستی این بیماری با آنتاگونیست قارچی *Trichoderma harzianum* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از گیاهان کنجد مشکوک به پژمردگی آوندی طی دو سال ۹۸ و ۹۹ در ماه‌های تیر تا آبان انجام شد. باتوجه به پراکنده بودن علائم بیماری، نمونه‌برداری از محل‌های مشکوک به آلودگی صورت گرفت.گیاهان دارای علائم زردی، خشکیدگی و پژمردگی یک طرفه و کوتولگی به آزمایشگاه منتقل و در چهار درجه سلسیوس نگه‌داری شدند مجموعاً ۲۱ نمونه از استان خراسان رضوی و شهرستان بردسکن (روستای هدک)، انابد (مزرعه‌ی کشت و صنعت آستان قدس رضوی) و کاشمر (روستای نای) نمونه‌برداری و جمع‌آوری گردید.

محیط کشت‌های مورد استفاده

از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار[1] برای جداسازی بیمارگرهای عامل بیماری پژمردگی کنجد و از محیط کشت برگ میخک آگار[2] برای شناسایی گونه‌های جنس فوزاریوم استفاده گردید (Snyder and Hansen., 1947).

از محیط کشت آب آگار دو درصد برای خالص‌سازی جدایه‌های به دست آمده از بافت میزبان آلوده به دو روش تک اسپور و نوک ریسه مورد استفاده قرار گرفت. محیط

1- Potato Dextrose Agar (PDA)
2- Carnation Leaf Agar (CLA)

کشت رزبنگال[1] برای جداسازی گونه‌ی *Trichoderma harzianum* از خاک فراریشه ریشه‌ی گیاهان کنجد مورد استفاده قرار گرفت. به همراه این محیط کشت آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند کلرامفنیکل[2] حل شده در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول و پنتاکلروبنزن[3] هر دو به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفتند که پس از اتوکلاو شدن و سرد شدن به محیط کشت اضافه گردید (Zhou et al., 2020).

جداسازی قارچ‌های عامل پژمردگی آوندی در کنجد

به منظور جداسازی قارچ‌های بیمارگر عامل بیماری پژمردگی آوندی کنجد، اندام‌های گیاهی در زیر جریان آب ملایم به مدت پنج دقیقه شست‌وشو داده شدند. سپس با استفاده از اسکالپل سترون ساقه‌های گیاهان مشکوک به بیماری پژمردگی آوندی، برش عرضی داده شده و از مرز سالم و آلوده در ناحیه‌ی آوندها به تکه‌های کوچک‌تری تبدیل شده و با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۴۵-۳۰ ثانیه و یا توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد و با توجه به اندازه‌ی بافت گیاهی به مدت ۲-۱ دقیقه گندزدایی گردیدند. پس از ضد عفونی، عمل شست‌وشو، سه بار با استفاده از آب مقطر سترون و هر دفعه به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. برای خشک کردن قطعات گیاهی از دولایه‌ی کاغذ صافی سترون و در زیر هود لامینار استفاده شد. پس از خشک شدن، قطعات گیاهی در شرایط سترون و زیر هود لامینار به روی تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شده و به مدت ۶-۴ روز در ۲۷ درجه‌س سلسیوس نگهداری گردیدند. خالص‌سازی قارچ‌های رشد کرده روی محیط کشت PDA، به دو روش نوک ریسه و تک اسپور صورت گرفت.

شناسایی جدایه‌های قارچی

برای این منظور از دو محیط کشت PDA و CLA وکلیدهای شناسایی Nelson et al. (1983) و Leslie and Summerell (2008) استفاده گردید. صفات ماکروسکوپی مورد بررسی شامل رنگ پرگنه از روی و پشت محیط کشت PDA و الگوی رشد آن، داشتن و یا نداشتن میسیلیوم‌های هوایی و رنگ آن‌ها بر روی محیط کشت CLA بودند. هم‌چنین از صفات میکروسکوپی مورد بررسی منوفیالیدیک و یا پلی فیالیدیک بودن و کلامیدوسپورها و شکل و اندازه‌ی میکرو و ماکروکنیدیوم‌ها بر روی محیط کشت CLA بودند. بدین منظور بعد از سپری شدن ۲۵-۷ روز از کشت جدایه‌های خالص شده‌ی فوزاریوم، ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ماکروسکوپی روی محیط کشت PDA و هم‌چنین خصوصیات میکروسکوپی فوزاریوم روی محیط کشت CLA مورد برررسی قرار گرفت.

بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه

۱) اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم

برای تهیه مایه *F. oxysporum* از روش Naing et al. (2014) استفاده گردید. بدین صورت که بذر گندم را که به مدت ۲۰-۱۵ ساعت در آب خیسانده و در فلاسک‌های ارلن یک لیتری با استفاده از اتوکلاو در ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شده بود (سه روز متوالی)، توسط چند دیسک قارچی مایه‌زنی شد. مایه‌ی بیمارگر قبل از انتقال گیاهان به گلدان‌ها، با خاک موجود در آن‌ها و به نسبت دو درصد حجمی مخلوط گردید. در این آزمایش برای هر تیمار سه تکرار و برای تیمار شاهد از خاک نسبت ذکر شده با گندم سترون فاقد قارچ بیمارگر استفاده شد. شدت بیماری برای هر جدایه مورد آزمایش پس از ۶۰ روز از تاریخ کاشت، به عنوان درصد پژمردگی بر اساس تغییر رنگ ریشه یا زردی برگ، با استفاده از سیستم پنج درجه‌ای Ziedan et al. (2011) امتیازدهی و با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Mahmoud (2016) محاسبه شد.

1- Rose bengal
2- Chloramphenicol
3- Pentachloronitrobenzene (PCNB)

۲) جداسازی *Trichoderma harzianum* از فاریشه‌ی کنجد

نمونه‌برداری از خاک فاریشه‌ی کنجد صورت گرفته و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی گونه‌ی *T. harzianum*، از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده، سری رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، ... و 10^{-5} تهیه و بر روی محیط کشت رز بنگال حاوی کلرامفنیکل برای ممانعت از رشد باکتری‌ها، پنتاکلرونیتروبنزن و سولفانات سدیم[1] به عنوان مهارکننده‌های رشد سایر قارچ‌ها، کشت گردیدند (Zhou et al., 2020). هم‌چنین در این محیط کشت از مقداری گلوگز برای بالا بردن میزان رشد و میزان اسپورزایی و تسهیل شناسایی گونه‌ی *T. harzianum* استفاده گردید. پس ازگذشت مدت زمان ۴۸ ساعت، پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. خالص‌سازی با استفاده از روش تک اسپور و شناسایی با استفاده از کلید شناسایی Samuels and Hebbar (2015) انجام گرفت.

برای انتخاب جدایه‌ی مناسب جدایه‌های به دست آمده و خالص‌سازی شده بر روی محیط کشت PDA و در شرایط یکسان با استفاده از دیسک‌های ۶ میلی‌متری برداشته شده توسط چوب پنبه سوراخ کن سترون، کشت داده شدند. به محض پر شدن تشتک پتری توسط یکی از جدایه‌ها، بقیه‌ی تشتک‌های پتری نیز از نظر قطر رشدی پرگنه و میزان اسپوردهی مورد بررسی قرار گرفته و جدایه‌ی با سرعت رشد بالاتر و میزان اسپوردهی بالاتر به عنوان گونه‌ی مناسب آنتاگونیستی در نظر گرفته شد.

۳) اثر آنتاگونیستی *T. harzianum* در شرایط آزمایشگاهی

در این آزمون از *T. harzianum* جداسازی شده از فاریشه گیاه کنجد و از روش کشت متقابل[2] استفاده گردید. برای این منظور از حاشیه‌ی پرگنه‌ی هفت روزه‌ی *T. harzianum*، یک دیسک شش میلی‌متری به محیط کشت PDA منتقل شد. سپس یک دیسک شش میلی‌متری از قارچ بیمارگر در نقطه‌ی مقابل آن، قرار داده شد. در نمونه شاهد از دیسک PDA فاقد آنتاگونیست استفاده گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ روز در ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند (Mari et al., 1996) و سپس درصد بازدارندگی از رشد شعاعی با استفاده از معادله‌ی Moslem and Kholie (2009) محاسبه گردید. این آزمون با سه تکرار و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی صورت پذیرفت.

٤) اثر آنتاگونیستی *T. harzianum* در شرایط گلخانه

برای تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* دیسک‌های پنج میلی‌متری از قارچ در محیط کشت PDA کشت داده شده و پس از گذشت دو هفته از آن، سطح محیط کشت با استفاده از ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون و اسکالپل سترون و در زیر هود لامینار شست‌وشو و از پارچه‌ی ململ عبور داده شد. غلظت سوسپانسیون اسپور به 1×10^9 در یک میلی‌لیتر رسانده شد. قبل از انجام آزمایش اثر آنتاگونیستی، ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به ازای هر گلدان اضافه و با خاک مخلوط گردید. بعد از گذشت پنج روز نشاهای ۸-۵ برگی کنجد قبل از انتقال به گلدان، به مدت یک دقیقه در سوسپانسیون‌های حاوی اسپور *F. oxysporum* f. sp. *sesami* با غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شده به روش Ghildiya and Pandey (2008) قرار گرفتند. سپس نشاها به گلدان‌های حاوی *T. harzianum*، منتقل و کشت گردیدند. در تیمار شاهد مثبت از سوسپانسیون حاوی قارچ بیمارگر و گلدان‌های حاوی خاک بدون تریکودرما و در تیمار شاهد منفی از گلدان‌های حاوی تریکودرما بدون قارچ بیمارگر استفاده شد و شدت بیماری برای هر جدایه‌ی مورد آزمایش پس از ۶۰ روز از تاریخ کاشت، به عنوان درصد بازدارندگی از پژمردگی با استفاده از سیستم پنج درجه‌ای Ziedan et al.

1- sodium sulfonate
2- dual culture

(2011) برای فوزاریوم امتیازدهی و با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Mahmoud (2016) محاسبه شد.

واکاوی آماری

واکاوی داده‌ها با استفاده از نسخه‌ی ۲۴ نرم افزار SPSS انجام گرفت و هم‌چنین مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد صورت پذیرفت. از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2016 برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

شناسایی گونه‌های خالص‌سازی شده

شناسایی گونه‌های جداسازی شده بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و کلیدهای شناسایی جنس فوزاریوم Nelson et al. (1983) و Summerell and Leslie (2008) صورت پذیرفت که بر این اساس ۱۷ جدایه متعلق به گونه‌ی *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* شناسایی شدند (جدول۱). خصوصیات ریخت‌شناختی *F. oxysporum* f. sp. *sesami* با مشخصات ذکر شده در کلیدهای شناسایی Nelson et al. (1983) و Leslie and Summerell (2008) مطابقت داشت (شکل۱).

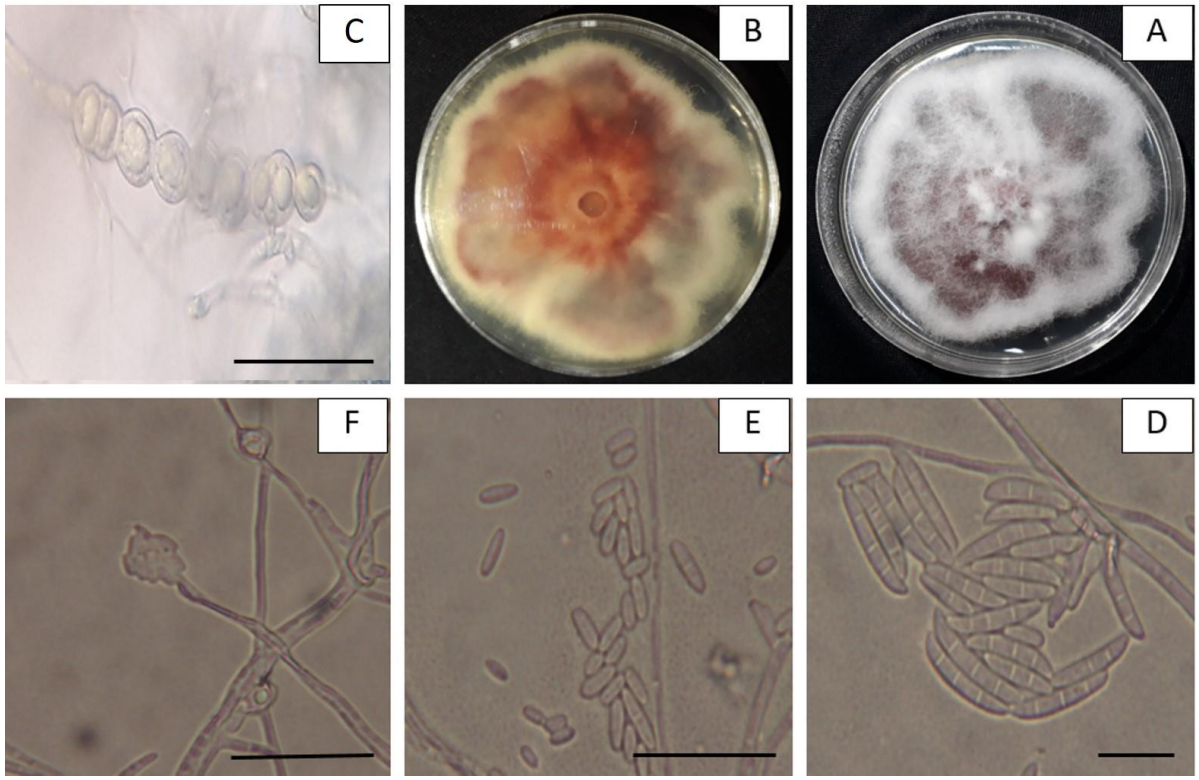
قابلیت بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم

قابلیت بیماری‌زایی ۱۹ جدایه‌ی فوزاریوم تحت شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون تمامی گونه‌های *F. oxysporum* f. sp. *sesami* بیماری‌زا بوده و شدت بیماری‌زایی متفاوتی را نسبت به یکدیگر از خود نشان داده و با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد بودند. بیش‌ترین شدت بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های BA15 و BA16 هر دو با ۸۷/۵ درصد پژمردگی و کم‌ترین شدت بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌های AN7 و KA33 هر دو با ۱۲/۵ درصد پژمردگی گیاه کنجد، بود (جدول ۲).

جدول ۱- جدایه‌های قارچی بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* جداسازی شده از بافت آوندی کنجد در مناطق مختلف خراسان رضوی

Table 1. Isolates recovered from vascular tissues of sesame plants (*Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*) in different regions of Khorasan Razavi province

Isolates codes	Sampling Date	Sampling Location
BA1	02-07-2019	Bardaskan (Hodk)
BA3	02-07-2019	Bardaskan (Hodk)
BA8	11-08-2019	Bardaskan (Hodk)
BA15	11-08-2019	Bardaskan (Hodk)
BA16	11-08-2019	Bardaskan (Hodk)
BA22	19-09-2020	Bardaskan (Hodk)
BA26	19-09-2020	Bardaskan (Hodk)
AN2	22-10-2019	Anabed (Farm)
AN4	22-10-2019	Anabed (Farm)
AN7	22-10-2019	Anabed (Farm)
KA24	10-07-2019	Kashmar (Nay)
KA23	10-07-2019	Kashmar (Nay)
KA24	10-07-2019	Kashmar (Nay)
KA32	25-08-2019	Kashmar (Nay)
KA33	25-08-2019	Kashmar (Nay)
KA4	04-10-2020	Kashmar (Nay)
KA15	04-10-2020	Kashmar (Nay)



شکل ۱- گونه‌ی *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* جداسازی شده از آوندهای گیاه کنجد بیمار. A) پرگنه‌ی هشت روزه بر روی محیط کشت PDA. B) سطح زیرین تشتک پتری PDA حاوی رنگ‌دانه قرمز. C) کلامیدوسپورهای زنجیری. D): ماکروکنیدیوم‌های خمیده و قایقی شکل. E) میکروکنیدیوم‌های دو سلولی. F) سر دورغین بر روی کنیدیوفور کوتاه. خط مقیاس برابر با ۲۰ میکرومتر است.

Figure 1. *F. oxysporum* f. sp. *sesami* isolated from vascular tissues of sesame plants with vascular wilt symptoms. A) Eight-day-old colony on PDA medium; B) Lower surface of Petri dishes containing PDA with red pigmentation; C) Chain chlamydospores; D) Curved and boat-shaped macroconidia; E) Bicellular microconidia; and F) A false head on a short conidiophore (Bar= 20 µm).

علائم در گیاهان مایه‌زنی شده خود را به شکل علائمی از قبیل پژمردگی در برگ‌ها، قهوه‌ای شدن آوندهای چوبی و ریزش برگ‌ها نشان دادند و تیمار شاهد فاقد هر گونه علائم مذکور بود. اصول کخ برای اطمینان از بیماری‌زا بودن جدایه‌ها صورت پذیرفت و مجدداً همان جدایه‌ها از گیاهان مایه‌زنی شده جداسازی گردیدند.

جداسازی گونه‌ی *Trichoderma harzianum* از خاک فراریشه‌ی کنجد

در مجموع ۱۱ جدایه با مشخصات جنس *Trichoderma* جداسازی گردید که تعداد هشت جدایه دارای مشخصات گونه‌ی *T. harzianum* بودند. این مشخصات شامل کنیدیوفورهای بزرگ، فیالید ضخیم یا متورم، با کلامیدوسپورهای انتهایی یا میانی کروی یا بیضی شکل با قطر ۵-۱۴ میکرومتر و الگوی کنیدیوم‌زایی پراکنده و یا متراکم در تشتک پتری بودند. هم‌چنین میسلیوم‌های هوایی کرکی شکل و به رنگ‌های سفید، خاکستری و زرد نیز قابل مشاهده بودند. در میان هشت جدایه‌ی شناسایی شده به عنوان گونه‌ی *T. harzianum* میزان سرعت رشد، اسپورزایی و خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و جدایه‌ی با سرعت رشد بالاتر و میزان اسپورزایی و خاصیت آنتاگونیستی

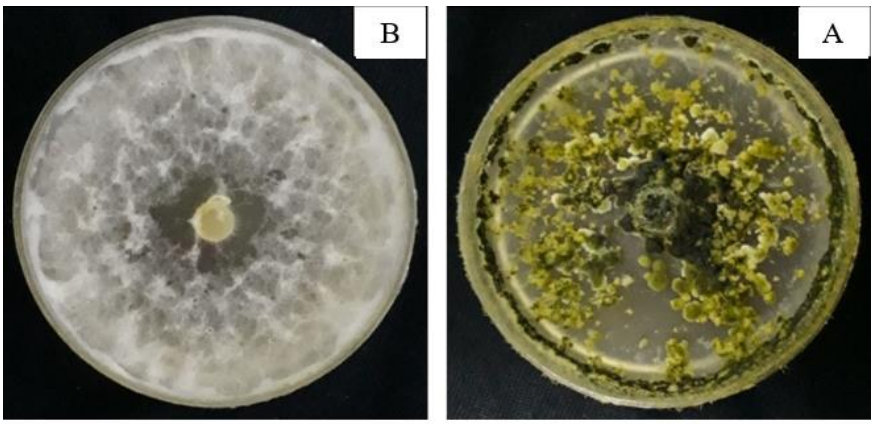
بیش‌تر برای آزمون‌های آنتاگونیستی علیه عوامل قارچی بیماری پژمردگی گیاه کنجد انتخاب گردید. شکل ۲ مربوط به دو جدایه شامل TR5 با میزان رشد قطری پرگنه و اسپورزایی بالا و TR11 با میزان رشد قطری پرگنه بالا و اسپورزایی کم است.

جدول ۲- نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* روی گیاه کنجد

Table 2. Pathogenicity test results for *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* isolates on sesame plants

Isolates	Disease Severity (%)
BA1	25^{f}
BA3	37.5^{e}
BA8	68.75^{c}
BA15	87.5^{a}
BA16	87.5^{a}
BA22	37.5^{e}
BA26	75^{b}
AN2	68.7^{c}
AN4	31.25^{ef}
AN7	12.5^{f}
KA24	68.75^{c}
KA23	18.75^{g}
KA14	25^{f}
KA32	31.25^{ef}
KA33	12.5^{h}
KA4	56.25^{d}
KA15	56.25^{d}

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد با هم دارای اختلاف معنی‌دار هستند.



شکل ۲- دو جدایه‌ی *Trichoderma harzianum* جداسازی شده از فواریشه ریشه‌ی گیاه کنجد A) TR5 با میزان رشد قطری پرگنه و اسپورزایی بالا و B) TR11 با میزان رشد قطری پرگنه بالا و اسپورزایی کم.

Figure 2. Two isolates of *T. harzianum* from sesame root rhizosphere: A) TR5 with a high growth rate and high sporulation; and B) TR11 with a high growth rate and low isolated sporulation

بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ تریکودرما در شرایط آزمایشگاهی

در این آزمون، پتانسیل آنتاگونیستی گونه‌ی *T. harzianum* جدایه‌ی TR5 در برابر ۱۷ جدایه‌ی *F. oxysporum* f. sp. *sesami* عامل پژمرگی آوندی در گیاه کنجد، در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش کشت متقابل مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمون بیش‌ترین میزان بازدارندگی از رشد ناشی از کشت متقابل با گونه‌ی *T. harzianum* مربوط به جدایه‌ی BA1 با ۸۸/۴۵ درصد و کم‌ترین میزان بازدارندگی از رشد ناشی از تقابل با آنتاگونیست مذکور مربوط به جدایه‌ی AN2 با ۷۱/۳۳ درصد بود (شکل ۳).

بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ تریکودرما در شرایط گلخانه

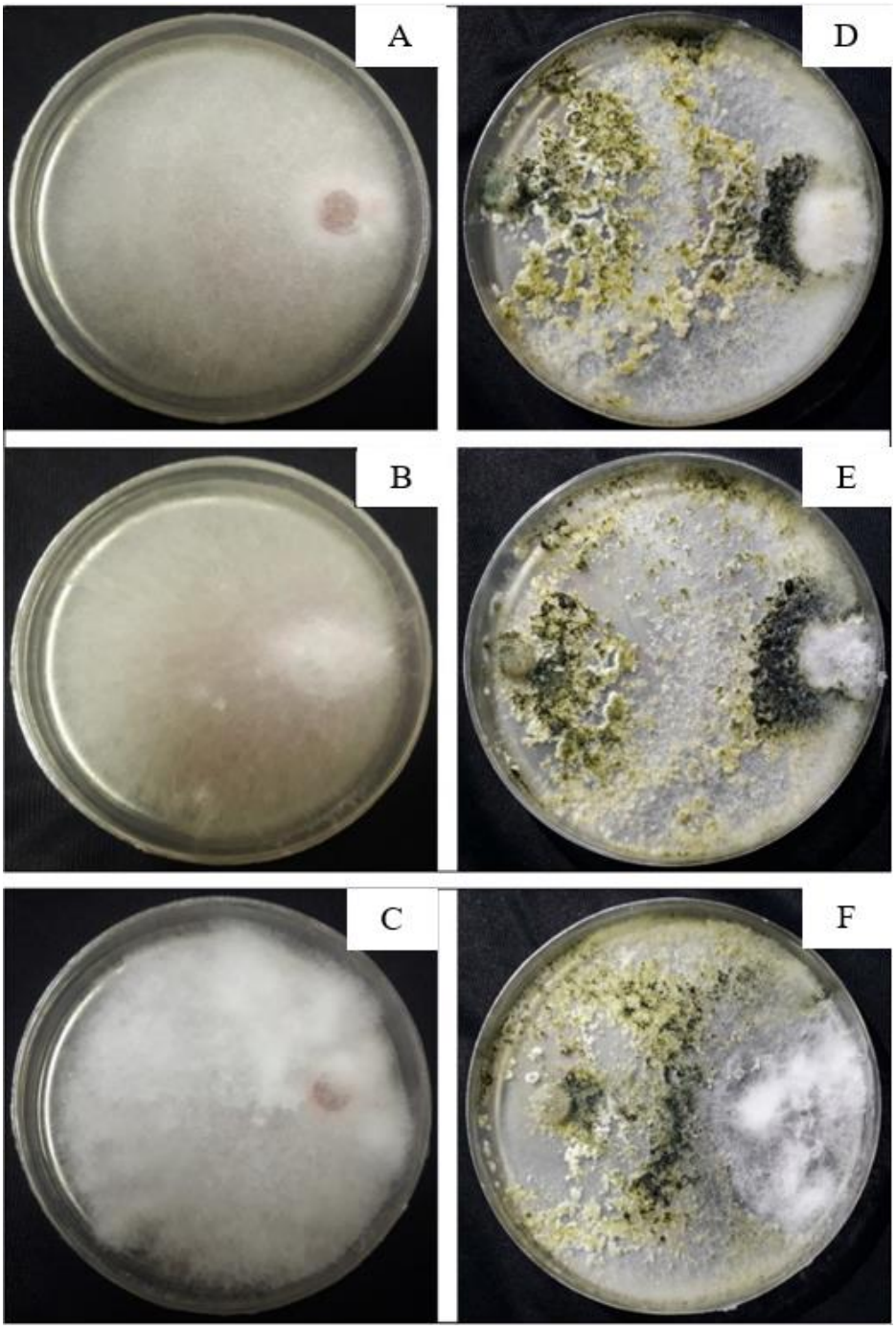
در این آزمون تأثیر بازدارندگی از رشد جدایه‌ی TR5 گونه‌ی *T. harzianum* بر روی گونه‌های *F. oxysporum* f. sp. *sesami* بررسی و در نهایت تأثیر این گونه‌ی آنتاگونیست بر کاهش علائم ناشی از بیماری پژمردگی آوندی مورد توجه قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌ی TR5 گونه‌ی *T. harzianum* بر روی بیماری ناشی از همه‌ی جدایه‌ها تأثیر مثبت داشته و باعث کاهش علائم در گیاهان کنجد مایه‌زنی شده گردیده است.

جدول ۳- نتایج مربوط به بازدارندگی از رشد جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* در آزمون کشت متقابل با جدایه‌ی TR5 قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* در شرایط آزمایشگاه

Table 3. *In vitro* growth inhibition results for different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* in dual-culture test with isolate TR5 of *T. harzianum*

Isolated	Growth inhibition
BA1	88.45^{a}
BA3	78^{fg}
BA8	80.44^{def}
BA15	75.78^{gh}
BA16	77.33^{g}
BA22	82.89^{cd}
BA26	83.11^{cd}
AN2	71.33^{i}
AN4	76.67^{g}
AN7	5.55^{abc}
KA24	76.45^{g}
KA23	81.11^{de}
KA14	82.44^{cd}
KA32	85.33^{bc}
KA33	86.89^{ab}
KA4	78.89^{efg}
KA15	73.33^{hi}

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد با هم دارای اختلاف معنی‌داری هستند



شکل ۳- آزمون کشت متقابل جدایه‌های مختلف گونه‌ی *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* در مقابل با جدایه‌ی TR5 از *Trichoderma harzianum* در شرایط آزمایشگاه بعد از ۱۰ روز. A، B و C) تشتک‌های پتری شاهد، به ترتیب حاوی جدایه‌های K4، BA1 و AN2. D، E و F) بازدارندگی از رشد *T. harzianum* به ترتیب در برابر جدایه‌های K4، BA1 و AN2.

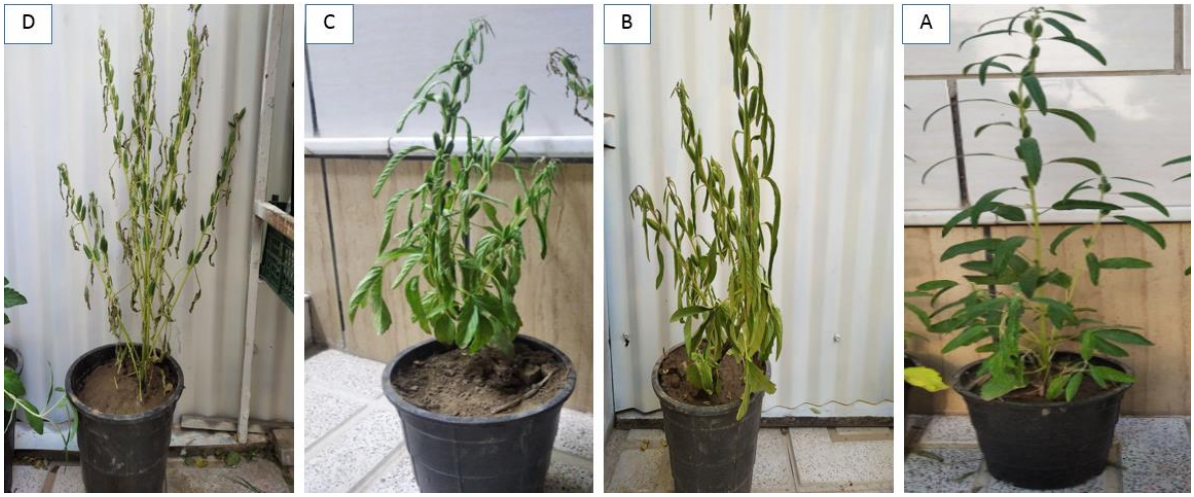
Figure 3. *In vitro* Dual-culture test of different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* versus TR5 isolate of *T. harzianum* after 10 days. A, B, & C) Control Petri plates containing isolates K4, BA1, and AN2, respectively. D, E, and F) Growth inhibition of *T. harzianum* against isolates K4, BA1, and AN2, respectively.

میزان کاهش شدت علائم بیماری در بین جدایه‌های مورد آزمایش، متفاوت بوده و با هم دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد بودند. به طوری که بیش‌ترین تأثیر آنتاگونیستی قارچ *T. harzianum* بر روی جدایه‌های BA1، AN7 و K33 با کاهش شدت بیماری به میزان ۱۰۰ درصد و کم‌ترین تأثیر مربوط به جدایه‌ی AN2 با کاهش شدت بیماری به میزان ۵۴/۵۴ درصد بود (جدول ۴ و شکل ۴).

بحث

گیاه کنجد نیز همانند تمامی گیاهان زراعی و غیرزراعی دیگر مورد حمله‌ی بیمارگرهای مختلفی قرار می‌گیرد که از جمله این عوامل می‌توان به عامل پژمردگی آوندی در این گیاه به نام *F. oxysporum* f. sp. *sesami* اشاره کرد که منجر به کاهش محصول و راندمان سالانه می‌گردد (El-Bramawy and Abd Al-Wahid, 2009). مهار شیمیایی این بیماری چندان مؤثر نبوده و علاوه بر آن دارای تأثیرات شدید و مخربی بر محیط زیست و هم‌چنین زیستگان میکروبی خاک است (Singh et al, 2018). از این رو استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید بهترین جایگزین برای روش‌های شیمیایی است (Mahmoud and Abdalla, 2018).

در این مطالعه که با هدف مهار زیستی بیمارگر عامل بیماری پژمردگی گیاه کنجد صورت گرفت، نشان داده شد که جدایه‌ی TR5 متعلق به گونه‌ی *T. harzianum* دارای پتانسیل مهاری بالایی برای مدیریت بیماری پژمردگی آوندی گیاه کنجد است. داده‌های حاصل از آزمون کشت متقابل (جدول ۳) نشان داد که جدایه‌ی TR5 گونه‌ی *T. harzianum* به طور قابل توجهی مانع از رشد جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* f. sp. *sesami* شده است.



شکل ٤- تأثیر به کاربرد جدایه‌ی TR5 گونه‌ی *Trichoderma harzianum* در برابر برخی از جدایه‌های مختلف گونه‌ی *Fusarium* oxysporum f. sp. *sesami* و مهار بیماری پژمردگی آوندی کنجد. A) به کارگیری *T. harzianum* بدون مایه زنی بیمارگر در گلدان. B) جدایه‌ی KA23 بیمارگر به همراه آنتاگونیست *T. harzianum* C) جدایه‌ی BA2 بیمارگر به همراه آنتاگونیست *T. harzianum* D) مایه زنی جدایه‌ی BA16 بیمارگر بدون آنتاگونیست *T. harzianum* (شاهد).

Figure 4. The effect of *T. harzianum* (isolate TR5) on some isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* in terms of controlling sesame wilt pathogen: A) Inoculation of *T. harzianum* with no pathogen in pot; B) Isolate KA23 of pathogen with *T. harzianum*; C) Isolates BA2 of pathogen with *T. harzianum;* D) Isolate Ba16 of pathogen with no*T. harzianum* (control).

جدول ٤- نتایج مربوط به کاربرد جدایه‌ی TR5 گونه‌ی *Trichoderma harzianum* در برابر جدایه‌های مختلف گونه‌ی *Fusarium* oxysporum f. sp. *sesami* و درصد مهار بیماری پژمردگی آوندی گیاه کنجد

Table 4. Effect of TR5 isolate of *T. harzianum* on different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* and the percentage of sesame vascular wilt disease control

Isolated	Reduction of disease (%)
BA1	100 [a]
BA3	66.66 [g]
BA8	72.72 [f]
BA15	57/42 [m]
BA16	64.28 [i]
BA22	83.33 [c]
BA26	58.33 [l]
AN2	54/54 [o]
AN4	60.8 [k]
AN7	100 [a]
KA24	63.63 [j]
KA23	73.33 [e]
KA14	80 [d]
KA32	84 [b]
KA33	100 [a]
KA4	66.66 [h]
KA15	55.55 [n]

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد با هم دارای اختلاف معنی‌داری هستند

واکاوی نتایج در سطح پنج درصد نشان داد که تیمارها با هم دارای اختلاف معنی‌داری هستند. توانایی *Trichoderma* spp. برای مهار بیماری پژمردگی فوزاریوم قبلاً در گوجه فرنگی، خیار و لوبیا گزارش شده است (Mahdy et al, 2011; Kamala and Devi, 2012; Carvalho, 2014) که با نتایج این مطالعه در یک راستا است که به توانایی بالای گونه‌ی *T. harzianum* در مهار بیماری پژمردگی اشاره کرده‌اند. هم‌چنین نتایج Sangle et al. (2004) و Elewa et al. (2011) با نتایج تحقیق حاضر مشابه بوده و نشان دادند که استفاده از گونه‌های *Trichoderma* برای سرکوب قارچ بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *sesami* بسیار کارآمد است و می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های شیمیایی مهار بیماری پژمردگی آوندی در گیاهان کنجد بیمار گردد.

Chung and Choi (1990) مهار رشد قطری پرگنه‌ی قارچی *F. oxysporum* f. sp. *sesami* را در محیط کشت PDA با استفاده از آنتاگونیست *T. viride* گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر کاهش رشد قطری پرگنه‌ی قارچ *Drechslera trici-repentis* (Died.) Shoemaker به میزان ۷۴-۵۰ درصد در کشت متقابل با گونه‌های مختلف *Trichoderma* عنوان شده است (Perello and Monaco, 2003). Hermosa et al. (2000) نتیجه گرفتند که *T. harzianum* در آزمون کشت متقابل با قارچ‌های بیماری‌زای *Phoma betae*. Frank، *Rosellinia necatrix* Berl. ex Prill، *Botrytis cinera* Pers و *F. oxysporum* f. sp. *dianthea* Snyder دارای فعالیت مهار زیستی بالقوه‌ای بر روی سه محیط کشت مختلف بودند.

این مهار رشد *F. oxysporum* f. sp. *sesami* در شرایط *in vitro* ممکن است به دلیل ترشح برخی ترکیبات باشد که می‌تواند رشد بیمارگر را متوقف و یا کُند نماید (Naher et al., 2014). نحوه عملکرد *Trichoderma*

برای سرکوب عوامل بیماری‌زا به طور گسترده‌ای بررسی شده و به تولید بسیاری از ترکیبات فعال زیستی از جمله آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و متابولیت‌های ثانویه (Vinale et al., 2008)، رقابت بر سر مواد غذایی با بیمارگرها، القای مقاومت موضعی و یا سیستمیک به گیاه (Harman et al., 2004) نسبت داده شده است. Kamala and Devi (2012) فعالیت و ترشح آنزیم‌هایی مانند پروتئازها، کیتینازها و بتاگلوکونازهای قارچ مهار زیستی جدایه‌های مختلف *Trichoderma* را در علیه *F. oxysporum* و *Rhizoctonia solani* Kühn گزارش کرده‌اند. Benitez et al. (2004) خاصیت مهار کننده‌ی زیستی گونه‌های *Trichoderma* را ناشی از ترشح بیش از حد کیتیناز در برابر بیمارگر *Botritys cinera* دانستند.

از سازوکارهای مهارکنندگی زیستی گونه‌های مختلف *Trichoderma* می‌توان به آنتی‌بیوز اشاره کرد که در آن طی فعل و انفعالات سویه‌های *Trichoderma* spp. ، ترکیبات و متابولیت‌هایی با وزن مولکولی پایین یا آنتی‌بیوتیک‌هایی به محیط انتشار پیدا کرده که رشد و کلونیزاسیون سایر میکروارگانیسم‌ها را مهار می‌کنند (Vey et al. 2001). سویه‌های *T. virens* با بهترین کارایی به عنوان عوامل مهار کننده زیستی قادر به تولید گلیویرین هستند. هم‌چنین مؤثرترین جدایه‌های *T. harzianum* در برابر *Gaeumannomyces graminis* (Sacc) Arx & Olivier *var. tritici* Walker آنتی‌بیوتیک‌های پیرون تولید می‌کنند و موفقیت سویه‌ها به طور آشکاری به پیرون‌های تولید شده آن‌ها مربوط بود (Howell, 1998).

گاهی همکاری و ترکیبی از آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به سطح بالاتری از آنتاگونیسم می‌شود به طوری که اثرات هم‌افزایی بین یک اندوکیتیناز، گلیوتوکسین، آنزیم‌های هیدرولیتیک و پپتایبول‌ها از *T. harzianum* در جوانه زنی کنیدیوم‌های *B. cinerea* کاملا شناخته شده است (Howell, 2003).

قارچ‌انگلی یکی دیگر از مزیت‌های استفاده از *Trichoderma* است که طی این فرایند این قارچ آنتاگونیست به صورت مستقیم به قارچ بیمارگر حمله کرده و آن را پارازیته می‌کند و در کل شامل مراحل پیچیده‌ای از جمله شناسایی، حمله، نفوذ و متعاقب آن، کشتن میزبان است (Gajera and Vakharia, 2012)

در این مطالعه نیز مانند مطالعات ذکر شده جدایه‌ی TR5 مربوط به گونه‌ی *T. harzianum* موجب کاهش بیماری پژمردگی آوندی در گیاه کنجد گردید که احتمال می‌رود این کاهش شدت بیماری، ناشی از ویژگی‌های آنتاگونیستی *T. harzianum* باشد و نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات مذکور مطابقت داشته و در یک راستا بود. احتمال می‌رود با توجه به تشابه نتایج محققان مذکور و نتایج مطالعه‌ی حاضر، قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* از این سازوکارها استفاده کرده و این امر موجب کاهش میزان قطر رشدی پرگنه و بازدارندگی از رشد بیماگر در شرایط آزمایشگاه و هم‌چنین کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه شده است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت مالی این پژوهش قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Albukhari, F.M. 2015. *Verticillium dahliae* causes the fungal wilting disease of cotton plants grown on the Mississippi State North Farm. Mississippi State University.

Bedigian, D. 2010. Sesame: the genus Sesamum. CRC Press.

Benitez, T, R., Limon, M.C., and Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7(4): 249-260.

Benitez, T., Delgado-Jarana, J., Rincon, A.M., Rey, M., and Limon, M.C. 1998. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In Pandalai S.G. (Ed). Recent Signpost Trivandrum. 2(1998): 129-150.

Carvalho, D.D., Lobo Junior, M., Martins, I., Inglis, P.W., and Mello, S. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. Tropical Plant Pathology, 39(5): 384-391.

Chung, B.K., and Hong, K.S.1991. Biological control with *Streptomyces* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* causing sesame wilt and blight. The Korean Journal of Mycology, 19(3): 231-237.

Chung, H.S., and Choi, W.B. 1990. Biological control of sesame damping off in the field by coating seed with antagonistic *Trichoderma viride*. Seed Science and Technology (Switzerland), 18(2): 451-459.

Conway, K.E. 1996. An overview of the influence of sustainable agricultural systems on plant diseases. Crop Protection, 15(3): 223-228.

Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z., and Samson, R.A. 2009. CBS Laboratory Manual Series. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., and Figueras, M.J. 2000. Atlas of clinical fungi (No. Ed. 2). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Dong-hua, L.I., Lin-hai, W.A.N.G., Yan-xin, Z.H.A.N.G., Hai-xia, L.V., Xiao-qiong, Q.I., Wen-liang, W.E.I., and Xiu-rong, Z.H.A.N.G. 2012. Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted sesame in China. African Journal of Microbiology Research, 6(1): 149-154.

El-Bramawy, M.A.S.A., and Abd Al-Wahid, O.A. 2009. Evaluation of resistance of selected sesame (Sesamum indicum) genotypes to Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. Tunisian Journal of Plant Protection, 4:29-39.

Elewa, I.S., Mostafa, M.H., Sahab, A.F., and Ziedan, E.H. 2011. Direct effect of biocontrol agents on wilt and root-rot diseases of sesame. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(5): 493-504.

Etebaryan, H.R. 2002. Vegetable and summer diseases and methods of combating them. Tehran University Publication (In Farsi).

Freeman, S., Zveibil, A., Vintal, H., and Maymon, M. 2002. Isolation of nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* for biological control of Fusarium wilt in cucurbits. Phytopathology, 92(2): 164-8.

Gabr, M.R., Hussein, N.A., Saleh, O.I., and Khalil, M.A. 1998. Susceptibility of Certain Varieties and Genotypes and Control of Wilt and Root Rot Diseases of Sesame Attributed to *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* and *Macrophomina Phaseoli*. Egyptian Journal of Microbiology, 33(3): 403-428.

Gajera, H.P., and Vakharia, D.N. 2012. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. Brazilian Journal of Microbiology, 43(1): 43-52.

Ghildiyal, A., and Pandey, A. 2008. Isolation of cold tolerant antifungal strains of *Trichoderma* sp. from glacial sites of Indian Himalayan region. Research Journal of Microbiology, 3(8): 559-64.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004a. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2(1): 43-56.

Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., and Chen, J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 94(2): 147-53.

Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.T., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Environmental Microbiology, 66(5): 1890-8.

Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. *Trichoderma* and *Gliocladium*, 2: 173-84.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87(1): 4-10.

Hu, D., Wang, C., Tao, F., Cui, Q., Xu, X., Shang, W., and Hu, X. 2014. Whole genome wide expression profiles on germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia. PloS one, 9(6): 100046.

Izadpanah. A., Ashkan. M., Banihashemi. Z., Rahimian. A. 2010. Plant Pathology 3. Aiiezh Publication. Forth edition (In Farsi).

Jacobsen, B.J., Zidack, N.K., and Larson, B.J. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. Phytopathology, 94(11): 1272-1275.

Kamala, T., and Devi, S.I. 2012. Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. African Journal of Biotechnology, 11(34): 8491-8499.

Klosterman, S.J., Subbarao, K.V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S.E., Thomma, B.P., Chen, Z., Henrissat, B., Lee, Y.H., Park, J., and Garcia-Pedrajas, M.D. 2011. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. PLoS Pathogens, 7(7): 1002137.

Leslie, J.F., and Summerell, B.A. 2008. The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley & Sons.

Mach, R. and Zeilinger, S. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(5): 515-522.

Mahdy, A.M.M., Sagitov, A.O., and GA, A. 2011. Efficacy of *Trichoderma* spp. in controlling Fusarium wilts of cucumber under protected houses. Annals of Agricultural Sciences, 49(1): 71-77.

Mahmoud, A.F., and Abdalla, O.A. 2018. Biocontrol efficacy of Trichoderma spp. against sesame wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 51(5-6): 277-287

Mahmoud, A.F., and Abdalla, O.A. 2018. Biocontrol efficacy of Trichoderma spp. against sesame wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 51(5-6): 277-287.

Mahmoud, A.F.A. 2016. Evaluation of certain antagonistic fungal species for biological control of faba bean wilt disease incited by *Fusarium oxysporum*. Journal of Phytopathology and Pest Management, 17: 1-4.

Mari, M., Guizzardi, M., and Pratella, G.C. 1996. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. Biological Control, 7(1): 30-37.

Moslem, M.A., and El-Kholie, E.M. 2009. Effect of neem (*Azardirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(14): 1045-1048.

Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A. and Hossain, K. 2014. *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent for sustainable management of plant diseases. Pakistan Journal of Botany, 46(4): 1489-1493.

Naing, K.W., Anees, M., Kim, S.J., Nam, Y., Kim, Y.C., and Kim, K.Y. 2014. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne

phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. Annals of Microbiology, 64(1): 55-63.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification.

Neven, A.A., Abd-El-Aal, S., and Sahab, A.F. 2007. The mutagenic activity of chitosan and its effect on the growth of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. Journal of Applied Sciences Research, 3: 450- 455.

Perello, A., Monaco, C., Simon, M.R., Sisterna, M., and Dal Bello, G.S. 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. Crop Protection, 22(9): 1099-1106.

Sahab, A.F., Elewa, I.S., Mostafa, M.H., and Ziedan, E.H. 2001. Integrated control of wilt and root-rot diseases of sesame in Egypt. Journal of Applied Sciences, 16(7): 448-462.

Samuels, G.J. and Hebbar, P.K. 2015. *Trichoderma*: identification and agricultural applications. APS Press.

Samuels, G.J., and Hebbar, P.K. 2015. *Trichoderma*: identification and agricultural applications. APS Press.

Sangle, U.R., and Bambawale, O.M. 2004. New strains of *Trichoderma* spp. strongly antagonistic against *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. Journal of Mycology and Plant Pathology, 34(1): 107-109.

Sharifnabi. B. 2010. Diseases of Iranian crops. First edition. Industrial Esfahan University (In Farsi).

Shishido, M., Miwa, C., Usami, T., Amemiya, Y., and Johnson, K.B. 2005. Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. Phytopathology, 95(9): 1072-1080.

Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B.C., Tewari, A.K., and Kumar, J. 2018. Review on plant-Trichoderma-pathogen interaction. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7: 2382-2397.

Snyder, W.C., and Hansen, H.N.1947. Advantages of natural media and environments in the culture of fungi. Phytopathology, 37(6): 420.

Suarez-Estrella, F., Vargas-Garcıa, M.C., Lopez, M.J., and Moreno, J. 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* on plant waste. Crop Protection, 23(2): 127-33.

Vey, A., Hoagland, R.E., and Butt, T.M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents: progress, problems and potential. 1: 311-346.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry, 40(1): 1-10.

Zhou, C., Guo, R., Ji, S., Fan, H., Wang, J., Wang, Y., and Liu, Z. 2020. Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. Microbiological Research, 231: 126371.

Ziedan, E.S.H., Sadek Elewa, I., Mostafa, H.M., and Sahab, A.F. 2011. Application of mycorrhizae for controlling root diseases of sesame. Journal of Plant Protection Research, 51(4): 355-361.

© 2021 Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International. (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Biological control of sesame Fusarium wilt using *Trichoderma harzianum* in Khorasan Razavi province under *in vitro* and *in vivo* conditions

A. Nazvar[1], M. Mamarabadi[*2] and P. Taheri[3]

1. M.Sc. student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad. Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad. Iran (mamarabadi@um.ac.ir)
3. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Mashhad. Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2021.17004

Received: 12 April 2021 Accepted: 27 July 2021

Abstract

Background and Objectives

Sesame is one of the most valuable crops in human nutrition and is cultivated in different regions of Iran, including Khorasan Razavi province. In this plant, various pathogens cause vascular wilt and reduce crop yield. This study aimed to detect the fungal pathogens causing vascular wilt in sesame and control its diseases using the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum* under *in vitro* and *in vivo* conditions.

Materials and Methods

Twenty-one suspected sesame samples were collected and transferred to the laboratory to be studied using valid morphological identification keys. Media such as PDA, WA, and CLA were used for the isolation, purification, and identification of the fungal samples isolated from the infected sesame plants, respectively. Pathogenicity test was conducted by the root inoculation of sesame plants grown under greenhouse conditions. The biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* (Isolate TR5) isolated from the rhizosphere of sesame roots was evaluated against the pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* under *in vitro* (dual culture) and greenhouse conditions by the root inoculation of the plants.

Results

According to the result, 17 isolates were related to *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*. The pathogenicity test was performed on the sesame plants at the 5-8-leaf stage. All *F. oxysporum* f. sp. *sesami* isolates were pathogenic as they revealed a significant difference at p=0.05. The highest level of pathogenicity was noticed for the isolates BA15 and BA16, both with 87.5% wilting, and the lowest pathogenicity was observed in the isolates AN7 and KA33, both with 12.5% wilting on the sesame plants. Regarding the antagonistic properties, the highest inhibition rate in dual culture with *T. harzianum* was observed for the BA1 isolate with 88.45% mycelial inhibition, while the lowest inhibition rate during interaction with the antagonist was exhibited in the AN2 isolate with 71.33% mycelial inhibition. Moreover, the disease severity reduction rates were different among all isolates of the pathogen tested under greenhouse conditions, and a significant difference was observed at p= 0.05. The highest antagonistic activity of *T. harzianum* was observed in the BA1, AN7,

and K33 isolates with 100% disease severity reduction; however, the lowest activity was related to the AN2 isolate with 54. 54% reduction.

Discussion

The present study indicates that the TR5 isolate belonging to *T. harzianum* has a high biocontrol potential for controlling vascular wilt on the sesame plants. Consistent with this finding, previous studies have also reported the potentials of *Trichoderma* spp. for controlling *Fusarium* wilt in tomatoes, cucumbers, and beans.

Keywords: vascular wilt, sesame, biological control, *Trichoderma harzianum*