# کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی زغالی سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina* با استفاده از *Trichoderma harzianum*

**یلدا واصبی[1*]، عزیزاله علیزاده[2] و ناصر صفایی[3]**

تاریخ دریافت: 89/3/27 تاریخ پذیرش : 90/11/4

1- فارغ‌التحصیل بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
2- استاد، بازنشسته گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
3- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
* مسئول مکاتبه : E-mail: Yalda_vasebi@yahoo.com

**چکیده**

در این تحقیق اثر بازدارندگی جدایه آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* T100 روی قارچ *Macrophomina phaseolina*، عامل پوسیدگی زغالی سویا در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. در آزمون کشت متقابل جدایه آنتاگونیست بعد از متوقف کردن رشد بیمارگر به میزان 55/3 درصد، شروع به پیشروی، استقرار و اسپورزایی روی میسلیوم‌های آن نمود. بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل ریسه‌های آنتاگونیست و بیمارگر مشخص کرد که آنتاگونیست پس از نفوذ به سلول‌های هیفی بیمارگر، درون آن‌ها پیشروی کرده و موجب تخریب سلول‌های هیفی *M. phaseolina* گردیده است. ترکیبات فرار تولید شده توسط جدایه T100 علاوه بر اینکه از رشد میسلیومی بیمارگر به میزان 12/2 درصد جلوگیری نمود، باعث کاهش تولید میکرواسکلروت نیز گردید. در شرایط گلخانه‌ای جدایه آنتاگونیست در حضور بیمارگر باعث کاهش اثرات سوئ آن شد که افزایش وزن تر و خشک ریشه به میزان 57/5 درصد و 53/6 درصد و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی به میزان 22/9 درصد و 11/8 درصد در مقایسه با شاهد را موجب گردید. کاهش پوشش میکرواسکلروتی سطح ریشه و ساقه میزبان به میزان 62/5 درصد در خاک سترون در مقایسه با شاهد نوید بخش کار آمد بودن آنتاگونیست در کاهش اینوکلوم اولیه و موثر بیمارگر برای سال زراعی آتی می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی**: کنترل بیولوژیک، پوسیدگی زغالی، *Trichoderma harziaanum* T100 و *Macrophomina phaseolina*

Archive of SID

www.SID.ir

# Biological Control of Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* Using *Trichoderma harzianum*

**Y Vasebi[1*], A Alizadeh[2] and N Safaie[3]**

Received: 17 June 2010 Accepted: 29 January 2012
[1]Gratuated of science in plant pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares Universite, Tehran, Iran
[2]Prof of science in plant pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares Universite, Tehran, Iran
[3]Assoc Prof of science in plant pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares Universite, Tehran, Iran
*Corresponding author: E-mail: Yalda_vasebi@yahoo.com

## Abstract

In this study, the antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* T100 as a potential biocontrol agent against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* were evaluated in *in vitro* and *in vivo* conditions. In dual culture tests, isolate T100 inhibited the mycelial growth of pathogen (55.3 %), then over ran and sporulated on the mycelia of *M. phaseolina*. Microscopic examination of mycelial interaction sites of *T. harzianum* and *M. phaseolina* showed that T100 penetrated mycelial cells of pathogen, moved inside and lysed them. Volatile test results indicated that the antagonist inhibited the mycelial growth of pathogen (12.2 %) and decreased the production of microsclerotia in culture media. Data from greenhouse experiments showed that, treatment of soil with *T. harzianum* T100 resulted in a high percentage of fresh and dry weights of root (57.5 % and 53.6 %) and aerial parts (22.9 % and 11.8 %) of soybean in sterile soil in compared with control.

Additionally, reduction of microsclerotial formation on soybean root and steam, microsclerotial coverage, (62.5 %) showed the antagonist ability for initial inoculums reduction in later season.

**Key Words:** Biological control, Charcoal rot, *Macrophomina phaseolina* and *Trichoderma harzianum* T100

Archive of SID

**مقدمه**

سویای زراعی با نام علمی *Glycine max* (L.) Merrill، به تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا حساس بوده و بیشترین خسارت به آن از طریق بیمارگرهایی وارد می‌شود که گیاهچه و ریشه گیاه را مورد هدف قرار می‌دهند. یکی از این عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد که ریشه و طوقه را مورد حمله قرار می‌دهد، قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid عامل پوسیدگی زغالی می‌باشد. این قارچ پلی‌فاژ بوده و بیش از 500 گونه گیاهی در 100 خانواده، اعم از تک لپه و دو لپه را آلوده می‌کند (دهینگرا و سینکلر 1977، سینکلر و باخمن 1989 و جانا و همکاران 2003). میکرواسکلروت‌های قارچ منبع اولیه اینوکلوم برای آلودگی ریشه‌ها هستند و به مدت دو تا 15 سال بسته به شرایط محیطی در خاک و بقایای گیاهی بقا می‌یابند (کوک و همکاران 1973 و پاویزاس 1977). علایم پوسیدگی زغالی معمولا بعد از میانه فصل ظاهر می‌شود. در آلودگی‌های سنگین، گیاه میزبان به دلیل تولید

www.SID.ir

توکسین‌های قارچی مانند فازئولینون[1] و انسداد آوندی توسط اندام‌های قارچی از بین می‌روند (بتاچریا و همکاران 1994). به دلیل خاکزی بودن قارچ بیمارگر و توان بالای ساپروفیتی آن در خاک، استراتژی‌های کنترل موثر بیماری در اختیار نیست. روش‌های کنترل بکار گرفته شده، نوعا برای کاهش میزان میکرواسکلروت در خاک و به حداقل رساندن تماس اینوکلوم با ریشه میزبان می‌باشد. استفاده از مواد شیمیایی به جهت آلودگی‌های زیست محیطی توصیه نمی‌شوند هر چند که تا به امروز عوامل شیمیایی مناسبی که بتواند گیاه را از صدمه بیمارگر حفظ نماید، نیز شناسایی نشده‌اند. از سوی دیگر استفاده از عوامل شیمیایی توصیه شده به دلیل آسیب پذیر بودن میزبان در تمامی مراحل رشدی خود در برابر بیمارگر، در شرایط مزرعه‌ای کافی نمی‌باشد (پیرسون و همکاران 1984، سینگ و کیسر 1995، وراتر و کندیگ 1998 و لهدا و همکاران 2003). بنابراین استفاده از عوامل طبیعی آنتاگونیست مورد توجه محققین قرار گرفته و موفقیت‌هایی نیز در این زمینه به دست آمده است (گوپتا و همکاران 2002، دشوال و همکاران 2003، ال فیکی و همکاران 2004، آدکونل و همکاران 2005، اعتباریان 2006 و والینته و همکاران 2008)

کنترل بیولوژیکی استفاده از ارگانیسم‌های مفید یا تولیدات آن‌ها را شامل شده و منتج به کاهش اثرات منفی بیمارگرهای گیاهی می‌گردد (وینال و همکاران 2008). متداول ترین و مناسب ترین گونه آنتاگونیست قارچی مورد استفاده در کنترل بیمارهای گیاهی قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai می‌باشد (مونته 2001 و وینال و همکاران 2008). استفاده از گونه‌های تریکودرما به عنوان عامل بیوکنترل بیش از 70 سال است که مورد توجه می‌باشد (مونته 2001 و مونته و لیوبل 2003) .جنس *Trichoderma* از قارچ‌های رشته-ای ناقص (Deutromycetes, Dematiaceae) بوده و بیشتر گونه‌های آن مرحله جنسی ندارند اما مرحله جنسی گونه *T. harzianum* متعلق به جنس *Hypocrea* می‌باشد. گونه‌های تریکودرما به عنوان قارچ‌های ساپروفیت عمومی ریزوسفر تقریبا در هر خاکی یافت می‌شوند و در کنترل بیمارگرهای مهم خاکزاد از جمله *Macrophomina*، *Rhizoctonia*، *Sclerotinia*، *Pythium*، *Fusarium*، *Verticillium* و ... موثر بوده‌اند (پاپاویزاس و لومدن 1980، هارمن و هادر 1983، سیوان و چت 1986، جاگر و همکاران 1991 و چنگ و همکاران 2006). اصلی ترین مکانیسم-هایی را که گونه‌های تریکودرما در مقابله مستقیم با بیمارگرها به کار می‌برند میکوپارازیتیسم (پاپاویزاس 1985 و هارمن و کوبیچک 1998) و آنتی بیوز (هاول 1998 و سیواسیتامپارام و قیزالبرت 1998) می‌باشد. لوریتو (1998) و بنیتز و همکاران (1998) نقش اولیه و اساسی مکانیسم‌های میکوپارازیتیسم را در این قارچ تولید آنزیم‌های کیتیناز و گلوکوناز معرفی کردند. هدف از این تحقیق بررسی امکان کنترل بیولوژی قارچ *M. phaseolina* توسط جدایه *T. harzianum* T100 در شرایط آزمایشگاه و متعاقبا بررسی تاثیرات آن در گلخانه بر روی گیاه و بیمارگر بوده است. امید است نتایج این تحقیق مورد استفاده جامعه کشاورزی کشور قرا بگیرد.

## روش‌های بررسی

### تهیه جدایه های بیمارگر و آنتاگونیست

در این تحقیق از قارچ *M. phaseolina* M21 جدا شده از سویا استفاده گردید. این جدایه در آزمون بیماری زایی به عنوان یکی از بیماری‌زا ترین جدایه‌های این قارچ ارزیابی شده بود (واصبی 1387). جدایه آنتاگونیست مورد استفاده در این تحقیق، (*T. harzianum* T100) از آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس دریافت گردید.

### بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی ***T. harzianum* T100**

#### آزمون کشت متقابل

این آزمون بر اساس روش مورتن و استرابل (1955) به دو صورت انجام گرفت. در روش اول ابتدا یک دیسک پنج میلی متری از حاشیه فعال پرگنه قارچی

[1] Phaseolinone

Archive of SID

www.SID.ir

سه روزه *T. harzianum* به فاصله 1/5 سانتی متر از حاشیه تشتک پتری در محیط سیب زمینی-دکستروز-آگار[1] کشت گردید. سپس در سه زمان متفاوت (همزمان، 24 ساعت و 48 ساعت بعد از کشت جدایه T100) یک دیسک پنج میلی متری از حاشیه فعال پرگنه سه روزه *M. phaseolina* در طرف مقابل دیسک قارچی آنتاگونیست و به فاصله 1/5 سانتی متر از حاشیه تشتک پتری قرار داده شد. در روش دوم ابتدا پرگنه قارچی بیمارگر کشت شده و سپس پرگنه قارچ آنتاگونیست، همزمان، 24 و 48 ساعت پس از کشت پرگنه قارچ بیمارگر، کشت گردیدند. تشتک‌ها به مدت چهار روز در دمای 28 درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. در تیمار شاهد از دیسک 5 میلی متری محیط PDA استفاده شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد بر اساس فرمول یک محاسبه و یادداشت گردید. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با هشت تیمار و سه تکرار انجام گرفت و آزمایش دو مرتبه تکرار شد.

$$IG = [ (C-T)/T ] \times 100 \qquad [1]$$

IG = درصد بازدارندگی رشد میسلیومی بیمارگر

C = قطر پرگنه قارچی بیمارگر در شاهد

T = قطر پرگنه قارچی بیمارگر در تیمار

**آزمون کلنیزاسیون**

به منظور مشاهده نحوه ارتباط ریسه‌های آنتاگونیست با بیمارگر آزمونی به شرح زیر اجرا شد.

لایه نازکی از محیط PDA، داخل تشتک‌های پتری حاوی لام استریل تهیه گردید. سپس دیسک‌های پنج میلی متری از حاشه فعال پرگنه‌های قارچی سه روزه بیمارگر و آنتاگونیست در دو طرف لام پوشیده شده با محیط PDA داخل تشتک‌های پتری کشت شدند. تشتک-ها به مدت دو روز در دمای 28 درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان فوق و برخورد ریسه‌های آنتاگونیست و بیمارگر در سطح لام، محل تلاقی ریسه‌ها در زیر میکروسکوپ به دقت مورد مطالعه قرار گرفت. این آزمون با سه تکرار انجام گرفت.

**آزمون تولید متابولیت‌های فرار**

به منظور بررسی تاثیر متابولیت‌های فرار ثانوی تولید شده توسط جدایه T100 بر بیمارگر، آزمونی بر اساس روش دنیس و وبستر (1971) طراحی و اجرا گردید. ابتدا دیسک‌های پنج سانتی متری از حاشیه فعال پرگنه‌های قارچی سه روزه آنتاگونیست و بیمارگر به طور جداگانه در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA کشت شد. پس از برداشت درب پتری‌ها، تشتک-های پتری حاوی بیمارگر بر روی تشتک‌های حاوی آنتاگونیست قرار داده شده و دور تشتک‌ها با نوار پارافیلم مسدود گردید. در تیمار شاهد به جای آنتاگونیست از دیسک پنج سانتی متری محیط PDA استفاده شد. تشتک‌ها به مدت سه روز در دمای 28 درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در این مدت بر اساس فرمول یک محاسبه و یادداشت گردید. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شده، دو مرتبه تکرار گردید.

**تاثیر قارچ کش‌ها روی *M. phaseolina***

بدین منظور غلظت‌های نیم و یک در هزار قارچ کش-های مانب[2] و تیابندازول[3] در آب مقطر سترون تهیه شده و به محیط PDAی سترون 50 درجه سلسیوس اضافه شد. سپس دیسک پنج میلی متری از حاشیه فعال پرگنه قارچی سه روزه *M. phaseolina* در مرکز تشتک‌های پتری کشت گردید. در شاهد به جای قارچ کش از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در دمای 28 درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. پس از سپری شدن زمان فوق اثرات بازدارندگی قارچ کش‌ها روی قارچ عامل پوسیدگی زغالی در مقایسه با شاهد بررسی شد. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار انجام گرفت در دو نوبت انجام گرفت.

**مطالعات گلخانه‌ای**

[1] Potato dextrose agar (PDA)

[2] Dithane M-22® WP

[3] Tecto® WP

Archive of SID

www.SID.ir

در این مطالعات میزان تاثیر جدایه T100 *T. harzianum* بر فاکتورهای رشدی سویا و قارچ عامل پوسیدگی زغالی در گلخانه بررسی شد. از قارچ کش مانب به میزان یک در هزار جهت مقایسه اثرات آن در کنترل بیماری استفاده گردید. سوسپانسیون قارچ کش به مقدار 125 میلی لیتر هر 14 روز یکبار به گلدان‌ها اضافه شد. از دو نوع خاک سترون و غیر سترون با ترکیب پرلیت و پیت به نسبت 1:1:1 در گلدان‌هایی با قطر دهانه 17 و ارتفاع 25 سانتی متر استفاده شد. جدایه قارچ بیمارگر بر روی دانه‌های برنج و جدایه قارچی آنتاگونیست بر روی دانه‌های گندم تکثیر شدند. اینوکلوم هر کدام از جدایه‌های قارچی به میزان ده گرم به ازای هر کیلوگرم از خاک گلدان‌ها و به طور همزمان استفاده شدند. در این آزمون‌ها گیاهچه‌های سه برگچه-ای سویا (رقم ویلیامز) مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با 12 تیمار و سه تکرار پیاده گردید و در دو نوبت اجرا شدند. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از: شاهد آلوده به بیمارگر در خاک سترون و غیر سترون، شاهد غیر آلوده در خاک سترون و غیر سترون، تیمار آنتاگونیست در خاک سترون و غیر سترون، تیمار آنتاگونیست به همراه بیمارگر در خاک سترون و غیر سترون، تیمار قارچ کش در خاک سترون و غیر سترون و تیمار قارچ کش به همراه بیمارگر در خاک سترون و غیر سترون. داده‌ها به دست آمده از اندازه گیری شاخص‌های وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی و همچنین درصد پوشش ریشه و ساقه با میکرواسکلروت‌های بیمارگر بعد از 100 روز (با ظهور میکرواسکلروت‌های قارچ بیمارگر در تیمارهای شاهد) یادداشت برداری شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری شاخص‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

## نتایج

### کشت متقابل

نتایج به دست آمده از این آزمون نشان داد که جدایه آنتاگونیست T100 بعد از متوقف نمودن رشد بیمارگر و ایجاد هاله بازدارنده رشدی، شروع به پیشروی، کلون کردن و اسپورزایی بر روی ریسه‌های بیمارگر نمود (شکل 1). به طوری که میزان بازدارندگی از رشد رویشی *M. phaseolina* در کشت متقابل همزمان، 24 ساعته و 48 ساعته در روش اول به ترتیب 55/3، 66/7 و 83/3 درصد و در روش دوم به ترتیب 55/3، 38/6 و 15/7 درصد به دست آمد.

### کلنیزاسیون

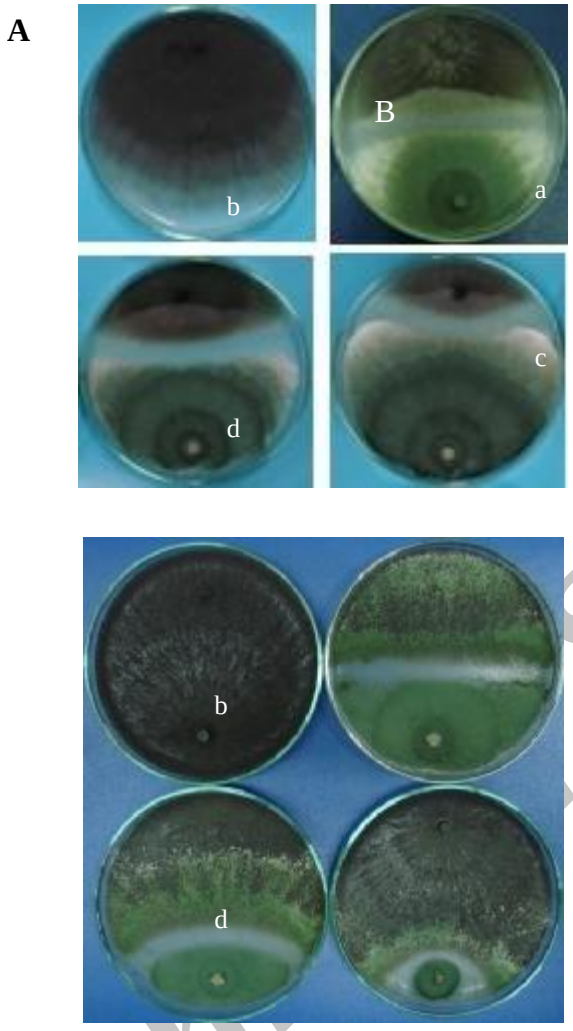
بررسی میکروسکوپی ناحیه اتصال ریسه‌های بیمارگر و آنتاگونیست نشان داد که ریسه‌های جدایه T100 پس از تماس با ریسه‌های بیمارگر، به درون سلول‌های ریسه *M. phaseolina* نفوذ کرده و موجب لیز شدن سلول‌های ریسه و واکوئله شدن و غیر طبیعی شدن شکل هیفی بیمارگر گردد (شکل 2).

### تولید متابولیت‌های فرار

نتایج نشان داد که با گذشت زمان و مسن شدن کلنی آنتاگونیست، میزان تولید متابولیت‌های فرار و تاثیر آن‌ها در بازداری رشد رویشی بیمارگر افزایش یافته است (شکل 3). به طوری که میزان بازداری در مدت سه روز به ترتیب صفر درصد، 7/37 درصد و 12/23 درصد به دست آمد.

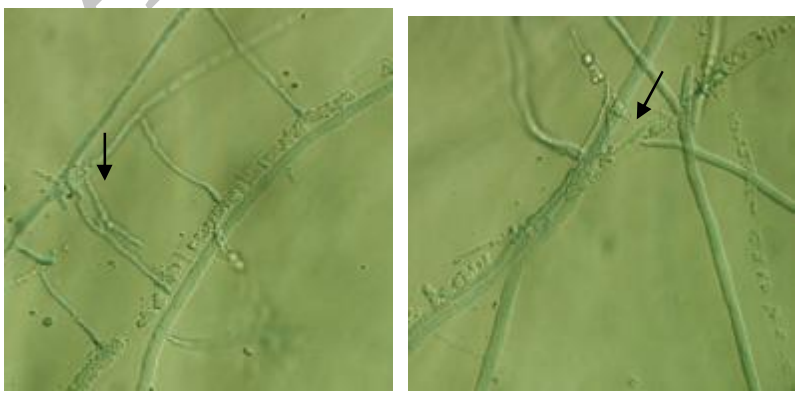
Archive of SID

www.SID.ir



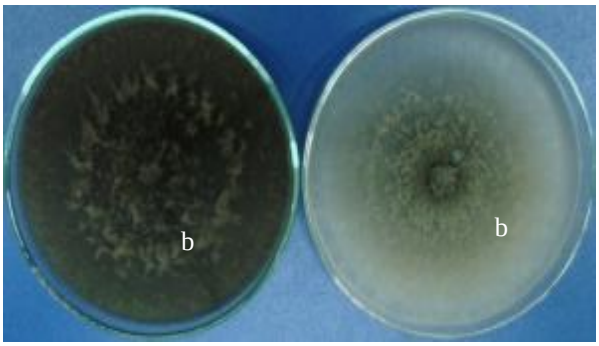

**شکل 1- آزمون کشت متقابل جدایه *Trichoderma harzianum* T100 با *Macrophomina phaseolina***

**A**- روش اول **B**- روش دوم **a**- شاهد **b**- کشت همزمان **c**- کشت 24 ساعته **d**- کشت 48 ساعته



**شکل 2- رابطه ریسه‌های *Trichoderma harzianum* T100 با *Macrophomina phaseolina*، فلش‌ها محل نفوذ و پیشروی آنتاگونیست و لیز شدن سلول‌های هیفی بیمارگر را نشان می‌دهد.**

www.SID.ir




**شکل 3- آزمون تاثیر متابولیت‌های فرار *Trichoderma harzianum* T100 در بازداری از رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina*  a- شکل کلنی *M. phaseolina* در شاهد  b- شکل کلنی *M. phaseolina* تیمار شده با *T. harzianum* T100**

**تاثیر قارچ کش‌ها**

نتایج آزمون نشان داد که قارچ کش مانب در غلظت-های مورد استفاده به میزان صد درصد مانع از رشد *M. phaseolina* گردید. در حالی که بیمارگر در تمامی غلظت‌های قارچ کش تیابندازول رشد نمود.

**مطالعات گلخانه‌ای**

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از بررسی تاثیر جدایه آنتاگونیست T100 و قارچ کش مانب بر رشد رویشی سویا و جلوگیری از پوسیدگی زغالی ناشی از *M. phaseolina* در گلخانه با استفاده از آزمون LSD نشان داد که بین تیمارها در سطح احتمال پنج درصد اختلاف آماری وجود دارد(جدول 1). در خاک‌های سترون، جدایه قارچی آنتاگونیست در حضور بیمارگر، به ترتیب موجب افزایش وزن تر و خشک ریشه به میزان 57/5 و 53/6 درصد و افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی به میزان 22/9 و 11/8 درصد در مقایسه با شاهد گردید (شکل 4). همچنین در بررسی‌های مقایسه‌ای مشخص شد که میزان افزایش وزن تر و خشک ریشه در تیمارهای قارچ کش به همراه بیمارگر در خاک سترون نسبت به شاهد به ترتیب 112 و 84/14 درصد و میزان افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی 19/8 و 0/7 درصد بوده است. مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از بررسی شاخص پوشش میکرواسکلروتی ریشه و ساقه با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد نشان داد که که بین تیمارها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد. جدایه آنتاگونیست T100 در حضور بیمارگر در خاک‌های سترون و غیر سترون به ترتیب به میزان 62/5 و 81/8 درصد موجب کاهش پوشش میکرواسکلروتی بیمارگر در سطح ریشه و ساقه سویا در مقایسه با تیمار شاهد گردید. همچنین قارچ کش مانب در حضور بیمارگر در خاک‌های سترون و غیر سترون به ترتیب به میزان 87/5 و 72/7 درصد موجب کاهش پوشش میکرواسکلروتی بیمارگر در سطح ریشه و ساقه سویا نسبت به تیمار شاهد گردید.

**بحث**

میکروارگانیسم‌های ریزوسفر خط دفاعی اولیه در برابر حمله بیمارگرها را فراهم می‌کنند (ولر 1988). گونه‌های تریکودرما متداول ترین جدایه‌های قارچی خاک‌های ریزوسفر هستند که در اکوسیستم ریشه میزبان به فراوانی یافت می‌شوند (هارمن و همکاران 2004). این گونه‌ها، قارچ‌های سریع الرشد با توانایی بالا در تولید اسپور بوده و منبع تولید آنزیم‌های لیز کننده دیواره سلولی مانند سلولاز، کیتیناز، گلوکاناز، لامیناریناز، لیپاز، پروتئاز، پکتیناز و ... و تولید کننده آنتی بیوتیک‌هایی چون ویریدین[1] و گلیوتوکسین[2] و

[1] Viridian
[2] Gliotoxin

Archive of SID

www.SID.ir

**جدول 1- اثر جدایه آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* T100 بر شاخص‌های وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی سویا در حضور و عدم حضور *Macrophomina phaseolina*، در خاک سترون و غیر سترون در مقایسه با قارچ کش مانب. تیمارهایی با حروف متفاوت در سطح پنج درصد با استفاده از آزمون LSD اختلاف معنی دار آماری دارند.**
**FRW**: وزن تر ریشه، **FAPW**: وزن تر اندام‌های هوایی، **DRW**: وزن خشک ریشه، **DAPW**: وزن خشک اندام‌های هوایی، **MC**: درصد پوشش میکرواسکلروتی ریشه و ساقه، **T**: آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* T100، **P**: بیمارگر *Macrophomina phaseolina*، **F**: قارچ کش مانب، **S**: خاک سترون **NS**: خاک غیر سترون، **C**: شاهد.

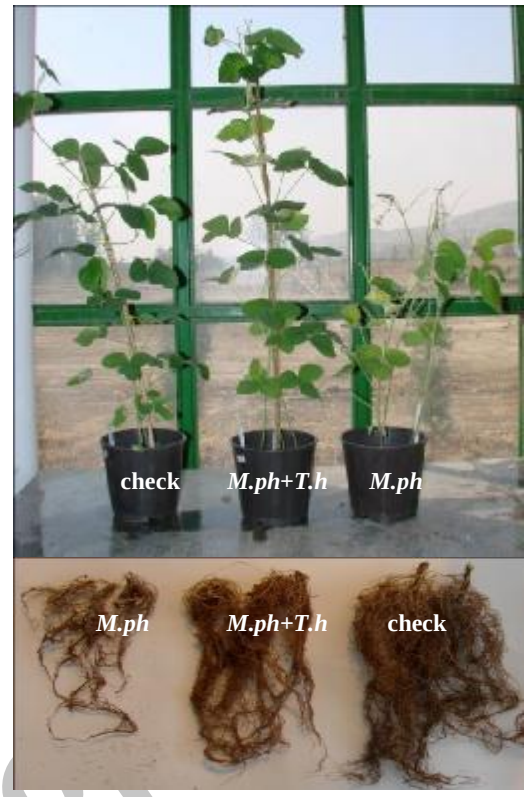
| No | Treatment | FRW | FAPW | DRW | DAPW | % MC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | T/S | 9.4ab | 71a | 2bc | 18b | - |
| 2 | T/NS | 11ab | 93a | 2.1bc | 24ab | - |
| 3 | T/P/S | 9ab | 66a | 2.2bc | 20ab | 20bc |
| 4 | T/P/NS | 10ab | 79a | 2.2bc | 19b | 13.3bc |
| 5 | F/S | 11ab | 75a | 2.4abc | 20ab | - |
| 6 | F/NS | 16a | 91a | 4.4a | 26ab | - |
| 7 | F/P/S | 12ab | 65a | 2.6abc | 18b | 6.6c |
| 8 | F/P/NS | 14ab | 90 a | 3.4abc | 25ab | 20bc |
| 9 | C/S | 14a | 67 a | 2.5abc | 23ab | - |
| 10 | C/NS | 13ab | 91a | 3.7ab | 31a | - |
| 11 | P/S | 5.6b | 54a | 1.4 c | 18b | 53.3ab |
| 12 | P/NS | 9ab | 81a | 3abc | 27ab | 73.3a |

متابولیت‌های ثانوی ضد قارچی دیگر می‌باشند (هاول و استیپانویک 1983، قیزالبرت و سیواسیتامپارام 1991، هاول و همکاران 1993، گرمیا و همکاران 1993، لوریتو و همکاران 1993، لوریتو و همکاران 1994 a , b و هارمن و کوبیچک 1998). وجود هاله شفاف در آزمون‌های کشت متقابل جدایه آنتاگونیست و بیمارگر در زمان‌های مختلف آزمایش حاکی از بازداری رشد رویشی *M. phaseolina*، پیشروی، کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه T100 در سطح کلنی بیمارگر در اثر میکوپارازیتیسم می‌باشد. در اسلایدهای تهیه شده پیشروی ریسه‌های تریکودرما در امتداد ریسه‌های بیمارگر، پیچش به دور ریسه‌ها و نفوذ به درون سلول‌های آن و همچنین لیز شدن سلول‌های هیفی بیمارگر مشاهده گردید. عبداله و همکاران (2008) فعالیت میکوپارازیتی گونه *T. harzianum* را بر علیه *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی[1] در ناحیه تقابل ریسه‌ای بررسی کردند. در این مطالعه مشخص شد که آنتاگونیست با تولید ساختارهای اپرسوریوم مانند[2] و قلاب مانند[3] به داخل سلول‌های هیفی بیمارگر نفوذ کرده و آن‌ها را منهدم نموده است. الاد و همکاران (1982) نیز وجود چنین ساختارهایی را در جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* شناسایی کردند. از سوی دیگر گونه‌های *T. harzianum* تولیدآنزیم‌های لیز کننده دیواره سلولی می‌کنند که آنتاگونیست را قادر می‌سازد به داخل سلول‌های بیمارگر نفوذ نماید. این پدیده در تحقیقات متفاوت از جمله در مطالعات ویتربو و همکاران (2002) و عبداله و همکاران (2008) به اثبات رسیده است. وجود چنین مشخصه‌ای برای یک عامل بیوکنترل بسیار مناسب می‌باشد زیرا علاوه بر متوقف نمودن رشد بیمارگر، موجب کاهش

[1] SEM
[2] Appressoria-like
[3] Hook-like

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل 4- تاثیر جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* T100 در آزمون‌های گلخانه‌ای بر رشد اندام های هوایی و ریشه گیاه سویا در حضور بیمارگر در مقایسه با شاهد**

میزان آلودگی اولیه و کاهش سرعت آلودگی را سبب می‌شود. در تحقیقات انجام شده میزان بازدارندگی از رشد رویشی *M. phaseolina* در آزمون کشت متقابل توسط گونه‌های *T. harzianum* T39 ، *T. harzianum* M و *T. harzianum* T447 به ترتیب 51،48/6 و70 درصد گزارش شده است (اعتباریان 2006 و حاجی اقراری و همکاران 2008).

نتایج آزمون تولید مواد فرار ضد قارچی در این تحقیق نشان داد که با گذشت زمان و مسن تر شدن کلنی قارچی تریکودرما، میزان تولید این متابولیت‌ها افزایش یافته و بازدارندگی بالاتری اعمال نموده شده است به طوری که میزان تولید میکرواسکلروت و تراکم آن‌ها به طرز چشم‌گیری در سطح کلنی بیمارگر کاهش یافته بود. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی جدایه‌های مختلف یک گونه طیفی از مواد فرار را تولید می‌کنند که تاثیرات متفاوتی روی قارچ‌های مختلف دارند (حاجی اقراری و همکاران 2008). ترکیبات استالدئیدی، مشتقات ایزوسیانیدی، مشتقات ترپنی، مشتقات آلفاپیرونی، مشتقات هیدرازونی، پیپرازین‌ها، پلی کتیدها، الکل‌ها، لاکتون‌ها و 6-پنتیل-2-پیرون در تحقیقات انجام شده توسط محققان مختلف به عنوان ترکیبات فرار تولید شده توسط گونه‌های مختلف تریکودرما معرفی شده‌اند (دنیس و وبستر 1971، قیزالبرت و سیواسیتامپارام 1991، سیواسیتامپارام و قیزالبرت 1998 و مونته و لیوبل 2003). در تعامل مستقیم آنتاگونیست و گیاه میزبان برخی گونه‌های تریکودرما با نفوذ به لایه‌های اپیدرم و کورتکس بیرونی، سطح ریشه را کلن می‌کنند (یدیدا و همکاران 1999) و در نتیجه رشد گیاه را تحریک کرده (بنیتز و همکاران 2004 و هارمن و همکاران 2004) مواد غذایی محلول را برای گیاه فراهم می‌کنند (هارمن و کوبیچک 1998 و یدیدا و همکاران 1999). این پدیده مشابه اثرات ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه[1] القاء مقاومت در گیاه را موجب شده و سیستم دفاعی گیاه را افزایش می‌دهند. تحقیقات نشان می‌دهد که در این مقاومت پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی[2] دخیل نیستند (الاد 1996، وان لون و همکاران 1998، استاچی و کن 1999، انکرلی و همکاران 1999 و هارمن و همکاران 2004).

در این تحقیق نیز مشخص شد که گونه T100 در تعامل مستقیم با سویا موجب افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی سویا گردید. مطالعات نشان داده است که کاربرد جدایه‌های *T. harzianum* موجب افزایش جوانه‌زنی دانه، رشد گیاه و وزن گیاه می‌شود (اینبار و همکاران 1994 و آلتومار و همکاران 1999). مجموعه نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای نشان داد که جدایه آنتاگونیست با کاهش اثرات منفی بیمارگر و کنترل بیماری پوسیدگی زغالی سویا اثراتی مشابه و هم وزن قارچ کش عمل کرده است و میزان تاثیر آن‌ها بر شاخص‌های وزن تر و خشک ریشه به دلیل خاکزی بودن بیمارگر مشهودتر می‌باشد. از آنجایی که در تیمارهای شاهد (بیمارگر شاهد و گیاه شاهد) بین شاخص‌های رشدی گیاه میزبان مخصوصا وزن تر و

[1] Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)
[2] Pr-proteins

Archive of SID

www.SID.ir

خشک ریشه در خاک‌های سترون و غیر سترون تفاوت معنی دار آماری وجود داشته و میزان شاخص‌ها در خاک‌های سترون بیشتر از غیر سترون بوده است. این امر می‌تواند حاکی از این باشد که خاک‌های غیر سترون مورد استفاده در این آزمون‌ها دارای عوامل میکروارگانیسم مفیدی می‌بوده‌اند که موجبات رشد گیاه میزبان و بازداری فعالیت بیمارگر را موجب شدند. از سوی دیگر داده‌های آماری نشان دادند که قارچ کش مانب با اعمال اثرات بازدارندگی بر میکروارگانیسم‌های مضر خاک‌های غیر سترون به طور معنی‌داری افزایش شاخص‌های رشدی گیاه میزبان (وزن تر و خشک ریشه) را در مقایسه با خاک‌های سترون موجب شدند.

کاهش درصد پوشش میکرواسکلروتی ریشه و ساقه به عنوان منبع اولیه آلودگی بیمارگر به میزان 73/7 و 78/9 درصد به ترتیب توسط آنتاگونیست و قارچ‌کش با نتایج حاصل از تاثیر فاکتورهای مزبور بر شاخص‌های رشدی سویا همخوانی داشته است. در مطالعات گلخانه-ای انجام شده توسط ایلفیکی و همکاران (2004) و اعتباریان (2006) تاثیر مثبت گونه‌های تریکودرما در افزایش رشد گیاه و کاهش مرگ گیاهچه‌ای ناشی از *M. phaseolina* روی کنجد و خربزه به اثبات رسید.

با عنایت به اینکه این بیماری یک بیماری تک چرخه‌ای با دامنه میزبانی وسیع و قدرت ساپروفیتی بالا می‌باشد و در آن میکرواسکلروت‌ها نقش اصلی را در شروع و توسعه بیماری در تمامی مراحل رشدی گیاه میزبان ایفا می‌کنند، کاهش منبع اولیه آلودگی که اصلی ترین هدف کنترل در تمامی روش‌های مدیریتی این بیماری می‌باشد حائز اهمیت فراوانی است. با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش که بیانگر توانایی بالای *T. harzianum* در کاهش تولید میکرواسکلروت توسط بیمارگر در آزمون‌های درون شیشه‌ای و کاهش پوشش میکرواسکلروتی ریشه و ساقه در آزمون‌های گلخانه‌ای می‌باشد لذا این آنتاگونیست می‌تواند در مدیریت بیماری در سال جاری از طریق کاهش آلودگی و مهمتر از آن در فصل زراعی آتی از طریق کاهش زادمایه‌های اولیه موثر واقع شود. از اینرو با توجه به نتایج بدست آمده و مطالب ارائه شده، اهداف تحقیقاتی آتی خود را در جهت شناسایی متابولیت‌های ضد قارچی تولید شده توسط جدایه T100 بر علیه عامل پوسیدگی زغالی و اثرات دقیق‌تر تعامل آنتاگونیست در گلخانه و مزرعه با بیمارگر را مد نظر قرار داده‌ایم. چرا که کنترل بیولوژیکی نتیجه تعامل بین گیاه، بیمارگر و جامعه میکروبی می‌باشد و برای استفاده بهتر و موثرتر از عوامل آنتاگونیست، شناخت بیولوژی این عوامل، گیاه و عوامل بیماریزا و بستر این‌ها (خاک) و همچنین اثرات متقابل آن‌ها ضروری است (وینال و همکاران 2008). بررسی اثرات این عوامل آنتاگونیست در مزرعه، فرموله کردن و ثبت تجاری آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است و می‌بایستی به جد مورد امعان نظر قرار گیرد. در نهایت با توجه به مشکلات متعدد در زمینه کنترل بیماری‌های خاکزاد، استفاده از کنترل تلفیقی همچون ترکیب روش-های زراعی، استفاده از آنتاگونیست‌ها به همراه دزهای پائین عوامل شیمیایی از جمله راه‌های کاربردی کنترل این بیماری‌ها پیشنهاد گردیده است (چت و اینبار 1994 و هارمن و کوبیچک 1998).

**تشکر و قدردانی**

از جناب آقای دکتر محمدی گل تپه به دلیل در اختیار قرار دادن جدایه آنتاگونیست سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایم.

**منابع مورد استفاده**

واصبی ی، 1387. کنترل بیولوژیکی پوسیدگی زغالی سویا با عامل *Macrophomina phaseolina* با استفاده از باکتری های آنتاگونیست جهش یافته. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران.

Archive of SID

www.SID.ir

Abdullah MT, Ali NY and Suleman P, 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection 27: 1354-1359.

Adekunle AT, Ikotun T, Florina DA and Cardwell KF, 2006. Field evaluation of selected formulations of *Trichoderma* species as seed treatment to control damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. African Journal of Biothechnology 5: 419-424.

Altomare C, Novell WA, Bjorkman T and Harman GE, 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai strain 1295-22. Applied Environmental Microbiology 65: 2926-2933.

Benitez T, Limon C, Delgado-Jarana J and Rey M, 1998. Glucanolytic and other enzyms and their genes. *In* Kubicek CP and Harman GE (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Taylor and Francis, Londan, pp 101-127.

Benitez T, Rinco AM, Limon MC and Codon AC, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249-260.

Bhattacharya D, Dhara TK, Siddiqui KAI and Ali E, 1994. Inhibition of germination by *Macrophomina phaseolina* related to phaseolinone production. Journal of Applied Bacteriology 77: 129-133.

Chang KF, Hwang SF, Wang H, Turnbull G and Howard R, 2006. Etiology and biological control of Sclerotinia blight of coneflower using *Trichoderma* spesies. Plant Pathology Journal 5: 15-19.

Chet I and Inbar J, 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology, 48: 37-43.

Cook GE, Boosalis MG, Duncle LD and Odvody GN, 1973. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum stalk residue. Plant Disease 57: 873-875.

Dennis C and Webster J, 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II, producing of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-47.

Deshwal VK, Dubey RC and Mahashvari DK, 2003. Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium* (Arachis) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. Current Science 84: 443-448.

Dhingra OD and Sinclair JB, 1977. An annotated bibliography of *Macrophomina phaseolina*, 1905-1975. Universided Federal, Viscosa, Brazil. 277p.

Elad Y, 1996. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Europian Journal of Plant Pathology 102: 719-73.

Elad Y, Chet I and Henis Y, 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28: 719-725.

Archive of SID

www.SID.ir

El-Fiki Aii, Mohamed FG, Hl-Deeb AA and Khalifa MMA, 2004. Some applicable methods for controlling sesame charcoal rot disease (*Macrohomina phaseolina*) under greenhouse conditions. Egypt Journal Pytopathology 32: 87-101.

Enkerli, J, Felix and Boller T, 1999. Elicitor activity of fungal xylanase does not depend on enzymatic activity. Plant Physiology 121: 391-398.

Etebarian HR, 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal Agriculture Science Technology 8: 243-250.

Geremia RA, Goldman, GH, Gacobs D, Ardiles W, Vila SB, Vanmontago M and Herrere-Estrella A, 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Mollecular Microbiology 8: 603-613.

Ghisalberti EL and Sivasithamparam K, 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology and Biochemistry 23: 1011-1020.

Gupta CP, Dubey RC, Kang SS and Maheshwari DK, 2002. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. Biology and Fertility of Soil 35: 399-405.

Hajieghrari B, Torabi-Giglou M, Momammadi M and Davari M, 2008. Biological potantial of some Iranian Trichoderma isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology 7: 967-972.

Harman GE and Hadar Y, 1983. Biological control of Pythium species.

Harman GE and Kubicek PK 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis, Londan, pp 1-393.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M, 2004. *Trichoderma* spesies-opportunictic, avirulant plant symbionts. Nature Review Microbiology 2: 43-56.

Howell CR and Stipanovic RD, 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. Canadian Journal of Microbiology 29: 321-324.

Howell CR, 1998. The role of antibiosis in bicontrol. *In* Harman GE and Kubicek CP (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor and Francis, Londan. pp 173-184.

Howell CR, Stipanovic RD and Lumsden RD, 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling disease. Biocontrol Science and Technology 3: 35-441.

Inbar J, Abramsky M, Coend D and Chet I, 1994. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedling grown under commertial conditions. Europian Journal of Plant Pathology 100: 337-346.

Jager G, Velvis H, Lamers JG, Mulder A and Roosjen J, 1991. Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. Potato Research 34: 269-284.

Archive of SID

www.SID.ir

Jana T, Sharma T, Prasad RD and Arora DK, 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. Microbiological Research 158: 249-257.

Lohda S, Sharma SK, Mathur BK and Aggarwal RK, 2003. Integration sublethal heating with *Brassica amendments* and summer irrigation for control of *Macrophomina phaseolina*. Plant Soil 256: 423-430.

Lorito M, 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. *In* Harman GE and Kubicek CP (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Taylor and Francis, Londan, pp 73-99.

Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL and Pietro A, 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology, 83: 302-307.

Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Woo S L and Harman GE, 1994a. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3-ß-glucosidase and an N-acetyl-ß-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84: 398-405.

Lorito M, Peterbauer C, Hayes CK and Harman GE, 1994b. Synergistic interaction between fungal cell degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. Micribiology 140: 623-629.

Monte E and Liobell A, 2003. *Trichoderma* in organic agriculture. Proceeding V World Avocado Congress. Actas V Congreso Mundial del Aguacate. 725-733.

Monte E, 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology 4: 1-4.

Morton DT and Stroube NH, 1955. Antagonistic and stimulatory effects of microorganism upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 45: 419-420.

Papavizas GC and Lumsden RD, 1980. Biological control soilborne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology 18: 389-413.

Papavizas GC, 1977. Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. Soil Biochemistry 9: 337-341.

Papavizas GC, 1985. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-54.

Pearson CAS, Schwenk FW, Crowe FJ and Kelly K, 1984. Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 68: 1086-1088.

Seed Science Technoligy, 11: 893-906.

Sinclair JB and Backman PA, eds, 1989. Compendium of soybean diseases. 3 nd ed. American Phytopathological Society, St, Paul, MN. 106p.

Archive of SID

www.SID.ir

Singh RDN and Kaiser SAKM, 1995. Evaluation of some systemic and non systemic fungicides against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina* of maize. Journal of Tropical Agriculture 33: 54-58.

Sivan A and Chet I, 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. Phytoathology 79: 198-203.

Sivasitamparam K and Ghisalberti EL, 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *In* Harman GC and Kubicek CP (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis, Londan. pp 139-191.

Stacey G and Keen NT, eds, 1999. Plant-microbe interaction, Vol. 4. APS Press, St. Paul.

Valinte C, Diaz K, Gacitua S and Martinez M, 2007. Control of charcoal root rot in *Pinus radiate* nurseries with antagonistic bacteria. World Journal Microbiol Biotechnol 24:557-568.

Van Loon LC, Bakker PAHM and Pieteres CMJ, 1998. Systemic resistance induced by rhizobacteria. Annual Review of Phytophatology 36: 453-483.

Vinale F, Sivasitamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL and Lorito M, 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40: 1-10.

Viterbo A, Ramot O, Chernin L, Chet I, 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in biocontrol of fungal plant pathogens. Antonia van Leeuwenhoek 81: 549-556.

Weller D, 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytophatology 26: 379-407.

Wrather JA and Kendig SR, 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. Plant Disease 82: 247-250.

Yedidia I, Benhamou N and Chet I, 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied Environmental Microbiology 65: 1061-1070.

Archive of SID

www.SID.ir