پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی/ جلد ۸ شماره۲/ سال ۱۳۹۸

کنترل زیستی بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم با استفاده از استرین‌های تجاری و محلی تریکودرما، جداسازی شده از ریزوسفر گیاه گندم

ابوالفضل نرمانی[۱*]، مهدی ارزنلو[۲]، اسدالله بابای اهری[۲] و حسن ماستری فراهانی[۳]

۱- پژوهشگر، مرکز تحقیقات و نوآوری سازمان اتکا.
۲- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۳- پژوهشگر، مرکز دانش‌بنیان شرکت مزارع نوین ایرانیان.
*مسئول مکاتبه: Abolfazl.narmani2@gmail.com
تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۲۲

چکیده

بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم (FHB) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم بوده که هر ساله خسارت قابل توجهی ایجاد می‌کند. روش های رایج مدیریت بیماری از کارایی چندانی برخوردار نمی باشند، بنابراین استفاده از راهکارهای جدید در مدیریت این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، در تحقیق حاضر کارایی جدایه‌های تجاری و محلی *Trichoderma* در کنترل بیماری سوختگی فوزاریومی خوشه‌ی گندم بررسی شد. به منظور جداسازی بیمارگر و آنتاگونیست‌ها، نمونه‌برداری از سنبله‌های آلوده و ریزوسفر گندم صورت پذیرفت. شناسایی جدایه‌های قارچی (*Trichoderma* و *Fusarium*) بر اساس تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی صورت گرفت و در نتیجه، هویت ۱۰ جدایه‌ی بیمارگر و ۱۳ جدایه‌ی آنتاگونیست به ترتیب *Fusarium graminearum* و *T. harzianum* تعیین گردید. بعد از غربالگری اولیه، یک جدایه‌ی برتر *Trichoderma* جداسازی شده از ریزوسفر بوته‌ی گندم (*T. harzianum* Tr5)، یک جدایه‌ی قارچ آنتاگونیست تجاری (*T. harzianum* T22) و جدایه‌ی تهیه شده از کلکسیون قارچی دانشگاه تبریز (*T. longibrachiatum* N)، جهت ارزیابی خواص آنتاگونیستی بر علیه قارچ *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انتخاب شدند. همچنین قابلیت جدایه‌های آنتاگونیست در تولید آنزیم‌های کیتیناز و پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که تمامی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی در مقایسه با شاهد به صورت معنی‌داری باعث بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زا می‌شوند. در آزمون‌های کشت متقابل، بیشترین درصد بازدارندگی با استفاده از آنتاگونیست‌های *T. harzianum Tr5* و *T. longibrachiatum* N مشاهده گردید. همچنین فقط جدایه *T. harzianum* Tr5 قادر به پارازیته کردن مستقیم ریسه‌های بیمارگر بود. ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست کمترین اثر را روی قارچ بیمارگر از خود نشان دادند که نسبت به هم دیگر تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. در آزمون‌های ترکیبات غیرفرار بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه‌ی *T. longibrachiatum* N مشاهده گردید. همه‌ی آنتاگونیست‌ها قادر به تولید میزان قابل توجهی از آنزیم‌های کیتیناز و پروتئاز بودند که قابلیت جدایه‌های محلی بیشتر بود. در نهایت، نتایج آزمایشات گلخانه‌ای با بررسی‌های آزمایشگاهی کنترل بیماری مطابقت داشت. نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های آنتاگونیست به طور قابل توجهی اثرات بیمارگر در کاهش وزن دانه‌ی گندم را مهار کردند.

واژه‌های کلیدی: *Triticum aestivum* L.، سوختگی سنبله‌ی گندم، کنترل زیستی، استرین‌های تجاری و محلی *Trichoderma*، آنتاگونیست، شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای.

مقدمه

بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم می‌باشد که هر ساله خسارت قابل توجهی ایجاد می‌کند. مرکز تحقیقات بین المللی گندم و ذرت (CIMMYT) سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم را به عنوان فاکتور اصلی محدود کننده‌ی تولید گندم در

بسیاری از نقاط جهان معرفی کرده است (Ireta and Gilchrist, 1994). این بیماری توسط چند گونه *Fusarium* به‌ویژه گونه‌ی *F. graminearum* Schwabe ایجاد می‌شود. در سال های اخیر، تناوب گسترده‌ی گندم و ذرت باعث افزایش سطح مایه‌ی تلقیح بیمارگر و گسترش شیوع بیماری در مزارع گندم شده است (Zhang and Nan, 2007). اپیدمی‌های شدید این بیماری منجر به افت شدید محصول ناشی از کاهش مستقیم عملکرد و آلودگی بذور به زهرابه‌های قارچی مثل زیرالنون[1] می‌شود (Parry et al., 1995; Davari et al., 2013). اپیدمی‌های این بیماری در سراسر دنیا شایع بوده و از تمام مناطق کشت گندم در آمریکا، اروپا، آسیا، آفریقا و اقیانوسیه گزارش گردیده است (Suga et al., 2008; Zhang et al., 2012; Davari et al., 2013). از روش‌های مختلف مدیریت این بیماری می‌توان به کاشت ارقام مقاوم، تناوب زراعی و کنترل شیمیایی اشاره کرد. کنترل بیماری با استفاده از ترکیبات قارچ‌کش به صورت ضدعفونی بذور و سمپاشی چندان موفقیت‌آمیز نبوده و درعین حال، استفاده از ترکیبات شیمیایی ممکن است منجر به اثرات نامطلوب زیست محیطی شود و یا زمینه را برای بروز مقاومت در جمعیت‌های بیمارگر فراهم کند (Mesterhazy, 1995). با توجه به محدودیت‌های موجود از جمله پیچیدگی‌های ژنتیکی بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم، تاکنون هیچ رقم زراعی با مقاومت کامل در برابر این بیماری تولید و استفاده نشده است (Parry et al., 1995; Wegulo et al., 2015) بنابراین استفاده از راهکارهای جدید در مدیریت این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی به عنوان یک روش جایگزین به تنهایی و یا در برنامه های مدیریت تلفیقی بیمارگرهای گیاهی مطرح می‌باشد (Vinale et al., 2008). گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* دارای اثر بازدارندگی روی طیف وسیعی از قارچ‌های بیمارگر می‌باشند و در برنامه‌های مدیریت برخی از بیماری‌های قارچی گیاهان در کنار سایر روش‌های مدیریت بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاکنون در حدود ۲۰۰ گونه از جنس *Trichoderma* بر اساس داده‌های مولکولی شناسایی شده اند که در ۱۶ بخش (کلاد) گروه‌بندی شده‌اند (Mukherjee et al., 2013). به طور کلی گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* بر علیه بیمارگرهای خاکزاد مثل *Verticillium*، *Fusarium*، *Pythium*، *Scelerotium* و حتی بیمارگرهای اندام‌های هوایی مثل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندر قند موثر شناخته شده‌اند (موسوی و ارزنلو ۱۳۹۴; Papavizas, 1985). گونه‌های *Trichoderma* علاوه براینکه از پتانسیل پوده‌رستی قوی برخوردار می‌باشند، دارای فاز اپیفیتی[2] قابل توجهی بوده و همچنین از پتانسیل بالایی در درون‌زی[3] بودن برخوردارند و در داخل بافت‌های گیاهی سالم به صورت ریسه‌های غیر فعال و بدون ایجاد خسارت روی میزبان زندگی می‌کنند (Hermosa et al., 2012). گونه‌های این جنس از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند مایکوپارازیتیسم[4]، تولید متابولیت‌های محلول و متابولیت فرار، قارچ‌های بیمارگر را کنترل می‌کنند. بعضی گونه‌های *Trichoderma* از جمله *T. harzianum* و *T. viride* با برخورداری توام از خواصی مثل مایکوپارازیتیسم، آنتی‌بیوزیس[5] و قابلیت رقابت ساپروفیتی قادرند جمعیت قارچ‌های بیمارگر را به میزان قابل توجهی کاهش دهند (Howell, 1998). همچنین گونه‌های *Trichoderma* با فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه میزبان از طریق القای مقاومت سیستمیک[6] (ISR) نقش مهمی در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی مختلف دارند (Keel and Defago, 1997) بنابراین مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی کنترل زیستی بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم در کشت و صنعت نوین ایرانیان در واحد میاندوآب با استفاده از گونه‌های آنتاگونیست محلی جنس *Trichoderma* جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان گندم و مقایسه‌ی تاثیر آنها با جدایه‌ی تجاری، انجام گرفت.

[1] Zearalenone

[2] Epiphyte
[3] Endophyte
[4] Mycoparasitism
[5] Antibiosis
[2] Induced systemic resistance

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی گونه‌های *Fusarium*

به منظور جداسازی و خالص‌سازی عوامل قارچی بیمارگر و آنتاگونیست، در طول سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ نمونه‌برداری در چند مرحله از مزارع کشت و صنعت نوین ایرانیان (واحد میاندوآب) انجام گرفت. به منظور جداسازی و خالص‌سازی گونه‌های *Fusarium*، سنبلچه‌های گندم از سنبله‌های آلوده‌ی گندم جدا شده و ابتدا ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۴۰ ثانیه انجام گردید. سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو شده و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. سپس در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار[1] اسیدی کشت داده شدند. تشتک‌های پتری حاوی قطعات کشت شده در داخل انکوباتور با دمای ۲۵ °C و دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی قرار داده شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها با روش تک‌اسپور کردن[2] انجام گرفت. کشت‌های خالص به میکروتیوپ‌های حاوی محیط کشت آگار تغذیه‌ای مصنوعی[3] انتقال داده شدند و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس در کلکسیون کشت‌های زنده گروه گیاه‌پزشکی (CCTU[4]) با درج کد اختصاصی برای هر جدایه نگهداری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی گونه‌های *Trichoderma* آنتاگونیست عامل بیماری

برای این منظور از روش تهیه‌ی سری رقت استفاده گردید. در تهیه‌ی سری رقت از هر نمونه‌ی خاک، یک گرم در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و غلظت-های مختلف به صورت سریالی تهیه گردید. از رقت‌های 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5} به اندازه‌ی ۱۰۰۰ میکرولیتر بر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار اسیدی شده منتقل گردید و تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. سپس روزانه تشتک‌های پتری بررسی و در صورت مشاهده رشد قارچ‌ها، کلنی‌های قارچ به تشتک‌های حاوی محیط کشت تازه منتقل گردید. خالص‌سازی جدایه‌های قارچی با استفاده از روش تک اسپور صورت پذیرفت. کشت‌های خالص به میکروتیوپ‌های حاوی محیط کشت SNA انتقال داده شدند و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس در کلکسیون کشت‌های زنده گروه گیاه‌پزشکی (CCTU) با درج کد اختصاصی برای هر جدایه نگهداری شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

شناسایی بر اساس صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها انجام شد. برای جدایه‌های *Trichoderma*، ویژگی‌هایی مثل فشردگی میسیلیوم، نوع حاشیه، رنگ، نرخ رشد پرگنه، مکانیسم کنیدی‌زایی و دیگر خصوصیات ریخت‌شناختی مورد بررسی قرار گرفت (Domsch et al., 2007; Samuels et al., 1998). مشخصات ریخت‌شناختی گونه‌های جنس *Fusarium*، از قبیل رنگ پرگنه، نرخ رشد، وجود یا عدم وجود رنگدانه، میسلیوم هوایی و مشخصات حاشیه‌ی کلنی، سطح زیر کلنی جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA و مشخصات ماکروکنیدی، میکروکنیدی و کلامیدوسپور روی محیط کشت SNA و برگ میخک آگار[5] مورد بررسی قرار گرفتند (Leslie and Summerell, 2006).

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی جداسازی شده

برای این منظور، استخراج DNA مطابق روش مولر و همکاران (Moller et al., 1992) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت شناسایی مولکولی گونه‌های *Trichoderma* ناحیه‌ی ITS-rDNA با استفاده از آغازگر رفت (ITS1) و برگشت (ITS4) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید (White et al., 1990). در مورد جدایه‌های قارچی *Fusarium* قسمتی از توالی ژن بتاتوبولین با استفاده از آغازگرهای رفت (Bt2a) و

[1]Potato Dextrose Agar, PDA, Merck, Germany
[2]Single spore
[3]Syntetic Nutrient Agar (SNA)
[4]Culture Collection of Tabriz University
[5]Carnation Leaf Agar (CLA)

آغازگر برگشت (Bt2b) تکثیر گردید (O'Donnell and Cigelnik, 1997).

فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۱/. میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم‌بروماید در بافر 1X TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (Gel documentation) تحت نور ماورا بنفش مشاهده و بررسی شدند و محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت انستیتوپاستور ایران فرستاده شد. داده‌های خام توالی بعد از ویرایش با نرم افزار سکمن (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA)، با استفاده از نرم افزار بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و هویت جدایه‌های قارچی تعیین گردید.

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر جهت انجام بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

برای انجام آزمایشات این قسمت، یک جدایه ***F. graminearum*** جداسازی شده در این تحقیق، برای انجام آزمایشات انتخاب گردید. برای انتخاب جدایه‌ی برتر آنتاگونیست جهت انجام آزمایشات، تمامی جدایه‌های ***Trichoderma*** با جدایه ***F. graminearum*** منتخب در شرایط آزماشگاهی به روش کشت متقابل کشت داده شدند. همچنین دو آنتاگونیست *Trichoderma* N *T. longibrachiatum* (تهیه شده از کلکسیون قارچی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز) و جدایه‌ی تجاری T22 *T. harzianum* (تهیه شده از موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی، تهران) برای انجام آزمایشات انتخاب گردیدند.

بررسی اثر کنترل زیستی جدایه‌های ***Trichoderma*** بر علیه ***F. graminearum*** در شرایط آزمایشگاهی آزمون کشت متقابل

این آزمایش مطابق روش ارائه شده توسط فوکما (Fokkema, 1978) انجام گرفت. به این صورت که بلوک‌های پنج میلی‌متری قارچ بیماری‌زای *F. graminearum* و قارچ‌های آنتاگونیست با فاصله‌ی نیم سانتی‌متری از حاشیه‌ی تشتک پتری نه سانتی‌متری در مقابل همدیگر کشت شدند. سپس دور تشتک پتری توسط نوار پارافیلم مسدود گردیده و به درون دستگاه انکوباتور که دمای آن °C ۲۵ بود، منتقل گردید. تشتک‌های پتری روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایش تا زمانی که پرگنه‌ی تیمارهای شاهد به نزدیک لبه تشتک پتری رسیدند، ادامه داشت. در تیمارهای شاهد به جای قرص حاوی پرگنه‌ی قارچ آنتاگونیست، از قرص محیط کشت سترون استفاده شد. به منظور تعیین میزان بازدارندگی قارچ بیماری‌زای گیاهی توسط قارچ‌های آنتاگونیست، داده‌های به دست آمده در فرمول پیشنهاد شده توسط ادینگتون و همکاران (Edington et al., 1971) جای‌گذاری شده و درصد بازدارندگی مورد محاسبه قرار گرفت.

$$L(\%) = [(C-T)/C]\times 100 \qquad [۱]$$

در این فرمول L درصد بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زا، C شعاع رشد پرگنه در تیمار شاهد قارچ بیمارگر و T شعاع رشد پرگنه‌ی قارچ بیماری‌زای گیاهی در تعامل با قارچ آنتاگونیست می‌باشد.

بررسی پارازیتیسم[1]

به منظور بررسی پارازیتیسم مستقیم، بیمارگر و آنتاگونیست‌ها روی محیط کشت‌های SNA (با توجه به شفاف بودن محیط کشت و راحتی مشاهده‌ی پارازیتیسم) و PDA در مقابل همدیگر کشت داده شدند و بعداز رسیدن ریسه‌ها به همدیگر، در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی پتانسیل تاثیر مواد فرار ترشح شونده توسط جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست بر روی رشد قارچ ***F. graminearum***

به منظور مطالعه‌ی اثر ترکیبات فرار تولید شده توسط قارچ آنتاگونیست بر روی قارچ عامل بیماری‌زای گیاهی از روش ارائه شده توسط دنیس و وبستر (Dennis and Webster, 1971) استفاده شد. برای این منظور بلوک‌های پنج میلی‌متری از کشت تازه‌ی قارچ‌های آنتاگونیست و بیمارگر به طور جداگانه در وسط تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند. در مورد

[1]Parasitism

تیمارهای شاهد به جای قرص حاوی پرگنه‌ی قارچ آنتاگونیست، قرص حاوی محیط کشت PDA سترون در وسط تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌های پتری درون دستگاه انکوباتور با دمای ۲۵ °C قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، تشتک حاوی پرگنه‌ی قارچ بیمارگر به صورت وارونه بر روی پرگنه‌ی قارچ آنتاگونیست قرار داده شد و دور آن‌ها به‌وسیله نوار پارافیلم مسدود گردید تا امکان خروج مواد فرار متصاعد شده توسط قارچ آنتاگونیست فراهم نیاید. سپس نمونه به درون انکوباتور با دمای ۲۵ °C انتقال داده شد. بعد از ۴۸ ساعت قطر پرگنه‌های قارچ *F. graminearum* به طور روزانه اندازه‌گیری و یادداشت برداری گردید. یادداشت برداری تا زمانی که پرگنه‌ی تیمار شاهد به نزدیک لبه‌ی تشتک پتری برسد، ادامه داشت. درصد بازدارندگی توسط فرمول ذکر شده در بالا محاسبه گردید.

بررسی پتانسیل مواد غیر فرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده‌ی قارچ‌های آنتاگونیست در مهار رشد میسلیومی *F. graminearum*

جهت بررسی تاثیر ترکیبات خارج سلولی عوامل بیوکنترل، دو ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز[1] (۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) توسط دو قطعه دیسک میسلیومی به قطر هفت میلی‌متر از کشت تازه قارچ‌های عامل کنترل زیستی تلقیح شدند. ارلن‌ها در دمای آزمایشگاه نگه‌داری شدند. پس از یک ماه، محتویات ارلن‌ها در شرایط سترون با استفاده از کاغذ صافی سترون به‌وسیله‌ی پمپ خلاء عصاره‌گیری شدند. محیط حاوی ترشحات قارچی به منظور حذف مواد جامد در درون دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول حاصل به منظور حذف اسپورهای قارچ وآلودگی‌های زیستی احتمالی در زیر اتاقک هود لامیناری از خلال فیلتر زیستی به سوراخ‌هایی به قطر ۲۲/ میکرون عبور داده شد. عصاره‌های صاف شده پس از افزودن ۲۰ گرم آگار به ازای هر لیتر اتوکلاو شدند و در تشتک‌های پتری ریخته‌شدند. قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA تهیه شده با عصاره‌ی قارچ‌های آنتاگونیست کشت داده شد. قارچ بیمارگر رشد یافته بر روی محیط‌کشت PDA نیز به عنوان شاهد استفاده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ °C تحت شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. قطر پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید و پس از پنج روز که میسلیوم‌های قارچ بیمارگر در شاهد به لبه‌ی تشتک پتری رسیدند، اندازه‌گیری نهایی صورت گرفت. درصد بازدارندگی از رشد شعاعی میسلیوم قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول بالایی محاسبه شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی غلظت‌های مختلف متابولیت‌های غیرفرار سه جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست علیه *F. graminearum* و اثر حرارت بر روی خواص آنتاگونیستی آنها

به منظور بررسی تاثیر رقت‌های مختلف مواد خارج سلولی غیرفرار عوامل بیوکنترل از محیط‌کشت‌های PDA حاوی رقت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد از عصاره‌ی کشت اتوکلاو شده و رقت‌های مختلف ۲۵، ۵۰ و۷۵ درصد از عصاره‌ی کشت اتوکلاو نشده استفاده شد. به منظور تهیه‌ی محیط‌های غذایی حاوی عصاره‌ی کشت اتوکلاو شده، عصاره‌ی کشت قارچ‌های آنتاگونیست مطابق روش ارزنلو و همکاران (Arzanlou et al., 2014) تهیه شدند. برای تهیه محیط‌کشت PDA، عصاره‌های صاف شده‌ی قارچ‌ها با استفاده از کاغذ صافی به مدت پنج دقیقه با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اسپورهای قارچ آنتاگونیست رسوب کنند. برای از بین بردن قدرت جوانه‌زنی اسپورهای باقی مانده قارچ آنتاگونیست، عصاره‌ی صاف و سانتریفیوژ شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C نگه‌داری شدند و در نهایت محیط‌کشت‌های PDA حاوی رقت‌های مورد نظر از عصاره‌ی کشت اتوکلاو نشده مطابق روش ارزنلو و همکاران (Arzanlou et al., 2014) تهیه شدند. از تشتک حاوی محیط‌کشت PDA بدون عصاره نیز به عنوان شاهد استفاده شد. قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌ها کشت داده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۵ °C و در

[1]Potato Dextrose Broth (PDB)

شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. پس از پنج روز درصد بازدارندگی از رشد شعاعی با استفاده از فرمول فوق الذکر (۱) محاسبه شد.

بررسی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی آزمون تولید پروتئاز[1]

با توجه به نقش پروتئازها به عنوان یکی از سازوکارهای کنترل زیستی، بررسی تولید آنزیم پروتئاز براساس روش کریمی و همکاران (Karimi et al., 2019) با استفاده از محیط کشت شیر پس چرخ آگار[2] (چهار گرم پودر شیر پس چرخ، پنج گرم کلرید سدیم، پپتون یک گرم، ۲۰۰ میلی گرم CTAB و ۱۶ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون) صورت گرفت. بعد از اتوکلاو شدن و بستن محیط کشت در تشتک‌های پتری، نصف محیط کشت با استفاده از اسکالپل سترون از تشتک پتری حذف گردید و نصفه‌ی خالی آن با محیط کشت PDA پر گردید. جدایه‌های قارچی آنتاگونیست در بخش حاوی محیط کشت PDA تلقیح گردیدند و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ °C نگهداری شدند. تشکیل هالهٔ بی‌رنگ در اطراف پرگنه‌ها در طول این مدت نشانه‌ی فعالیت پروتئازی جدایه‌ها در نظر گرفته شد (Karimi et al., 2019) و میزان آن اندازه‌گیری شد.

تهیه‌ی کلوییدال کیتین[3] و آزمون بررسی تولید کیتیناز[4]

ابتدا محیط کشت مایع PDB در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی لیتری تهیه گردید و سپس هر کدام از آنها با استفاده از پنج بلوک پنج میلی‌متری از کشت تازه *Rhizoctonia solani* (با توجه به تولید بیوماس سلولی بالا) تلقیح گردیدند. بطری‌های مایه‌زنی شده به مدت دو الی سه هفته روی شیکر در دور ۱۲۵ rpm و در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. بعد از این مدت میسلیوم‌های قارچی با استفاده از قیف بوخنر و پمپ خلأ جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ °C در داخل دستگاه آون خشک شده و با استفاده از هاون کوچک در داخل بوته‌ی چینی سترون خرد گردیدند و پودر به‌دست آمده در دمای ۲۰ °C- در داخل فریزر نگهداری شد. به منظور تهیه‌ی کلوییدال کیتین (منبع کیتین برای ارزیابی تولید آنزیم کیتیناز توسط آنتاگونیست‌ها)، چهار گرم پودر به‌دست آمده در ۱۰ میلی لیتر اسید هیپو کلریدریک ۱۰ نرمال ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. سپس به میزان ۹۹۰ میلی لیتر اتانول ۱۰۰ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. در نهایت، محلول حاصل در دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل دوبار با الکل سفید ۷۰ درصد شسته شد. کلوییدال کیتین به‌دست آمده در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس جهت انجام آزمون‌های بعدی نگهداری گردید.

به منظور بررسی تولید کیتیناز توسط جدایه‌های قارچی، محیط کشت ضعیفی شامل ۴/۵ گرم کلوییدال کیتین، ۳/. گرم سولفات منیزیم، سه گرم سولفات آمونیوم، دو گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم، یک گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، ۱۵ گرم آگار، ۱۵/. گرم پودر رنگی بروموکرزول پارپل[5]، ۲۰۰ میکرو لیتر توین ۸۰ و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه گردید. اسیدیته محیط در ۴/۷ تنظیم گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C سترون گردید. بعد از آماده شدن محیط، مرکز تشتک‌های پتری توسط یک بلوک پنج میلی‌متری از حاشیه‌ی کشت پنج روزه‌ی قارچ‌های آنتاگونیست تلقیح و به مدت دو الی سه روز در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. از محیط کشت‌های فاقد پودر کلوییدال کیتین به عنوان شاهد استفاده شد و اختلاف اندازه‌ی هاله‌ی بنفش رنگ اطراف پرگنه‌های رشد کرده در دو محیط اندازه‌گیری و به منزله‌ی تولید آنزیم کیتیناز در نظر گرفته شد (Agrawal and Kotasthane, 2012).

آزمایشات گلخانه‌ای

به منظور انجام آزمایشات گلخانه‌ای، یکی از واحد-های گلخانه گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انتخاب گردید.

[1] Protease
[2] Skim Milk Agar (SMA)
[3] Colloidal chitin
[4] Chitinase

[1] Bromocresol purple

بهاره سازی بذور گندم

برای این منظور، بذور گندم رقم زرین بعد از ضدعفونی سطحی به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۱۵ ساعت در آب خیسانده شدند. بعد از خیساندن، بذور گندم روی کاغذ صافی سترون خشک شدند و به داخل ظروف شیشه‌ای خشک و سترون انتقال داده شدند. سپس جهت بهاره سازی در داخل یخچال در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰-۴۰ روز نگهداری شدند.

آماده سازی بستر کشت

خاک زراعی مورد استفاده برای کاشت بذور گندم به نسبت ۱:۲ با کوکوپیت مخلوط شد و دو بار (به فاصله زمانی ۲۴ ساعت) در دمای ۱۲۰ °C ، فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شد، سپس مخلوط سترون شده‌ی خاک با کوکوپیت به داخل گلدان‌های سترون با قطر دهانه‌ی ۱۵ سانتی متر برای کاشت گندم‌های بهاره سازی شده انتقال داده شد.

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح جدایه‌های قارچی آنتاگونیست و کاشت بذور گندم

جهت انجام آزمایش گلخانه‌ای و به منظور تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های مذکور بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و پس از یک هفته نگهداری در دمای ۲۵ °C ، پس از افزودن آب مقطر سترون، سطح پرگنه‌های قارچ با لوپ خراش داده شد و پس از صاف کردن سوسپانسیون اسپورها با استفاده از پشم شیشه، تعداد اسپورها در واحد حجم با لام هماتوسیتومتر (گلبول شمار) شمارش شدند. سوسپانسیون اسپورها با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر جهت مایه زنی بذور گندم تهیه و توئین ۸۰، به مقدار ۰/۲درصد به آن اضافه شد. سپس سوسپانسیون اسپوری تهیه شده از سه آنتاگونیست روی بذور گندم در تیمارهای تکی و مخلوط باهم (جدول ۱) در حالت‌های مختلف پاشیده شد. بذور تلقیح شده در بستر مناسب کشت، کاشته شدند. در تیمار شاهد بدون آنتاگونیست، روی بذور فقط آب سترون پاشیده شد. گلدان‌ها در دمای ۲۵±۲ °C در گلخانه نگهداری شدند. گلدان‌ها هفته‌ای یک بار آبیاری شدند. بعد از ۴۵ روز دوباره سوسپانسیون اسپوری قارچ‌های آنتاگونیست تهیه و ده سی سی با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر به خاک گلدان‌های گندم‌های روییده شده اضافه گردید و برای شاهد فقط از آب استفاده شد.

تهیه‌ی سوسپانسون اسپوری از قارچ بیمارگر و آنتاگونیست‌ها به منظور مایه‌زنی سنبله‌ی گندم‌های کاشته شده

به منظورتهیه‌ی سوسپانسیون اسپوری قارچ بیمارگر، جدایه‌ی مربوطه روی محیط کشت SNA کشت داده شد و مطابق روش ذکر شده در بالا، غلظت سوسپانسیون در حد ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر جهت مایه زنی سنبله‌های گندم تهیه شد. همچنین برای قارچ‌های آنتاگونیست نیز سوسپانسیون اسپوری با غلظت مشابه، مطابق روش ذکر شده در بالا تهیه گردید.

به منظور بررسی اثرات جدایه‌های آنتاگونیست در کنترل زیستی بیماری، بذور گندم در موقع کشت با قارچ‌های آنتاگونیست به صورت تکی و تلفیقی با یکدیگر مایه‌زنی شده و دوباره ۴۵ روز بعد، قارچ‌های آنتاگونیست پای بوته‌ها به صورت سرک استفاده شد. در تعدادی از تیمارها نیز بذور گندم فقط در موقع کشت با قارچ‌های آنتاگونیست به صورت تکی و تلفیقی با یکدیگر مایه‌زنی شده و قارچ‌های آنتاگونیست به صورت سرک استفاده نشد. در یک تیمار هم بذور گندم چه در موقع کشت و چه در سایر مراحل رشدی با هیچ قارچ آنتاگونیستی مایه‌زنی نشد. در نهایت در زمان سنبله رفتن گیاهان گندم، سنبله‌های گندم ابتدا با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست اسپور پاشی شدند. به منظور مایه‌زنی سنبله‌های گندم با استفاده از سرنگ انسولین آغشته به قارچ بیمارگر در سه قسمت سنبله زخم ایجاد گردید و با استفاده از سوسپانسیون اسپوری قارچ بیمارگر، سنبله‌های گندم اسپور پاشی شدند. جهت حفظ رطوبت لازم برای فعالیت قارچ‌های بیمارگر و آنتاگونیست از یک نایلون پلاستیکی روی سنبله‌های مایه‌زنی شده به مدت ۷۲ ساعت استفاده شد. در مجموع ۱۸ تیمار به قرار جدول ۱ انجام گردید.

جدول ۱- خلاصه تیمارهای انجام شده در این پژوهش.

Table 1. Summary of the treatments performed in this research.

Treatment code (کد تیمار)	Treatment code (کد تیمار)	Treatment code (کد تیمار)
T22 +F	(T22+Tr5) +F	(T22+Tr5+N) +F
T22	T22+Tr5	T22+Tr5+
Tr5 +F	(T22+N) +F	$T22_{first}$ +F
Tr5	T22+N	$Tr5_{first}$ +F
N +F	(Tr5+N) +F	N_{first} +F
N	Tr5+N	F*

***Due to the lack of spike production of wheat plants in this treatment, the amount of grain production was considered zero (با توجه به سنبله ندادن گیاهان گندم در این تیمار میزان بذر تولیدی برای این تیمار صفر در نظر گرفته شد)**

T22: *Trichoderma harzianum*, commercial isolate prepared from the Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran (جدایه‌ی تجاری تهیه شده از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، تهران)

Tr5: *Trichoderma harzianum*, local isolate obtained from rizospher of wheat plant (جدایه‌ی محلی به‌دست آمده از ریزوسفر گیاهان گندم)

N: *Trichoderma longibrachiatum*, isolate prepared from fungal collection of University of Tabriz (جدایه تهیه شده از کلکسیون قارچی دانشگاه تبریز)

F: Plant pathogenic *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* قارچ بیمارگر)

first: Only one treatment with antagonists at the time of planting seeds (تیمار با آنتاگونیست فقط یکبار در زمان کشت بذور)

بررسی کاهش عملکرد وزن دانه‌های گندم تیمار شده و نشده با قارچ‌های آنتاگونیست

با توجه به اینکه قارچ عامل بیماری به طور مستقیم باعث آلودگی بذور گندم می‌شود و دانه‌های آلوده شده دارای وزن کمتر و چروکیده هستند، برای اینکه ارزیابی دقیق‌تری از میزان کاهش بیماری یا به نوعی میزان عملکرد دانه گندم در تیمارهای مختلف داشته باشیم، میانگین وزن دانه برای هر سنبله ملاک سنجش در نظر گرفته شد. برای این منظور، سنبله‌های تیمار شده برداشت گردید و بعداز جداسازی دانه‌ها از سنبله‌ها، وزن دانه‌های تیمارهای مختلف با ترازوی حساس دیجیتالی برای کل سنبله محاسبه و سپس وزن مورد نظر به ازای هر دانه ثبت گردید.

محاسبات آماری

در بررسی فعالیت آنتاگونیستی در آزمایشگاه و گلخانه برای صفت بازدارندگی قارچ‌های آنتاگونیست علیه قارچ بیمارگر و همچنین میزان بهبود ویژگی‌های رشدی بوته‌های گندم تیمار شده، هر کدام از آزمایش‌ها جداگانه در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید. برای تجزیه‌ی داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام گردید.

نتایج

شناسایی جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست

براساس تلفیق داده‌های ریخت شناختی و مولکولی حاصل از توالی‌یابی ژن بتاتوبولین، ۱۰ جدایه‌ی به دست آمده از سنبله‌ی گندم‌های آلوده، *F. graminearum* شناسایی گردیدند. همچنین با توجه به نتایج حاصل از شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی بر اساس ناحیه‌ی ITS-rDNA، ۱۳جدایه *Trichoderma* به دست آمده از

این تحقیق *T. harzianum* senso stricto شناسایی گردیدند.

انتخاب جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر جهت انجام بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

نتایج حاصل از سنجش اولیه، قابلیت کنترلی جدایه‌های آنتاگونیست در برابر بیمارگر به روش کشت متقابل نشان داد که جدایه‌ی *T. harzianum* Tr5 از قابلیت کنترلی بالاتری نسبت به سایر جدایه‌های آنتاگونیست جداسازی شده برخوردار است. بنابراین در این تحقیق برای ارزیابی کنترل زیستی سوختگی فوزاریومی خوشه‌ی گندم جدایه *T. harzianum* Tr5 جداسازی شده از مزارع کشت و صنعت نوین ایرانیان (واحد میاندوآب) به همراه دو جدایه ذکر شده در بالا برای انجام آزمایشات انتخاب گردیدند.

نتایج بررسی آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی گونه‌های *Trichoderma* بر علیه قارچ *F. graminearum*

مهار رشد میسلیومی در روش کشت متقابل

طبق نتایج آزمون نرمال بودن، داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند. مطالعه‌ی پتانسیل قارچ‌های آنتاگونیست در رقابت با جدایه‌ی قارچ *F. graminearum* نشان داد که همه‌ی جدایه‌های مورد مطالعه قارچ‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد بدون تولید هاله‌ی بازدارنده اثر بازدارندگی معنی داری بر روی قارچ بیماری‌زا دارند. نتایج حاصل از محاسبه‌ی میانگین درصد بازدارندگی تیمارها و مقایسه‌ی آن‌ها، نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی بدون تفاوت معنی‌دار در تعامل بین جدایه *F. graminearum* با آنتاگونیست‌های *T. harzianum* Tr5 و *T. longibrachiatum* N به ترتیب با ۶۷ و ۶۶/۱ درصد بازدارندگی می‌باشد. کمترین درصد بازدارندگی در تعامل جدایه‌ی تجاری *T. harzianum* T22 با بیمارگر به میزان ۶۰/۶ درصد محاسبه گردید. همچنین نتایج این بررسی روشن ساخت که در روش کشت متقابل آنتاگونیست *T. harzianum* Tr5 به طور معنی‌داری اثرات کنترلی قابل قبولی نسبت به جدایه‌ی تجاری از خود نشان داد (شکل ۱).

پارازیتیسم

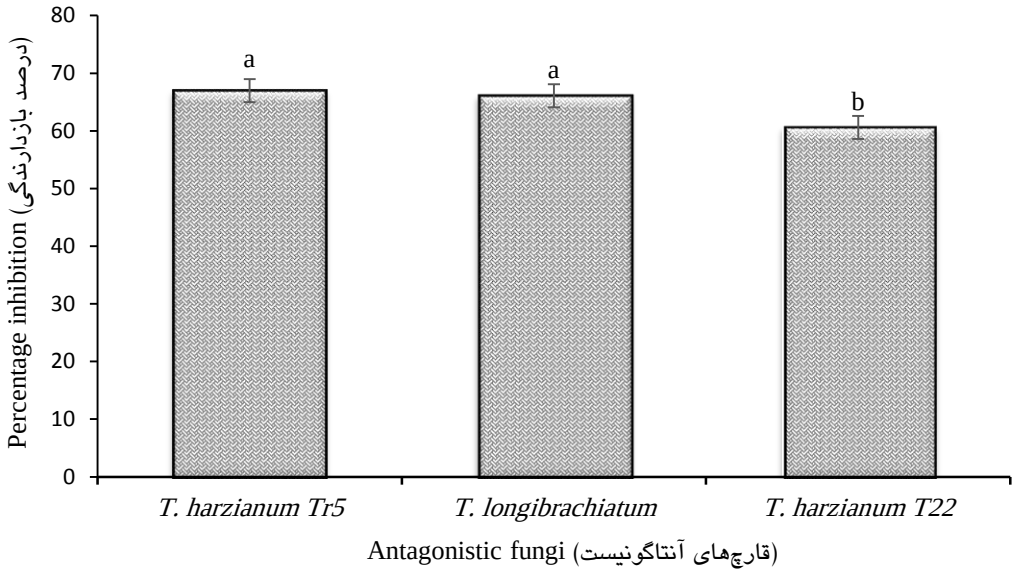
در بررسی که روی محیط کشت WA و SNA صورت گرفت، مشخص گردید که فقط جدایه‌ی *T. harzianum* Tr5 قادر به پارازیتیسم مستقیم ریسه های قارچ *F. graminearum* می‌باشد که با پیچیدن دور ریسه‌های بیمارگر و تشکیل اندام‌های پهن منشعب روی ریسه‌های قارچ بیمارگر، از آن تغذیه می‌کند و در دو آنتاگونیست دیگر، ریسه‌های آنتاگونیست و بیمارگر بدون تشکیل اندام تغذیه‌ای در کنار یکدیگر رشد کردند (شکل ۲).

پتانسیل کنترلی ترکیبات فرار ترشح شونده

مواد فرار تولید شده از همه جدایه‌های قارچ آنتاگونیست تاثیر خفیف در بازدارندگی از رشد *F. graminearum* نشان دادند. درصد بازدارندگی بسته به گونه‌ی قارچ آنتاگونیست تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد و درصد بازدارندگی به‌وسیله *T. harzianum* Tr5، *T. longibrachiatum* N و *T. harzianum* T22 به ترتیب ۱۳/۴، ۱۵/۳ و ۱۵/۵ مشاهده گردید (شکل ۳ و ۴). همچنین مشاهده شد که ترکیبات فرار هر سه جدایه‌ی آنتاگونیست، تولید رنگدانه در میسلیوم‌های بیمارگر را کاهش دادند.

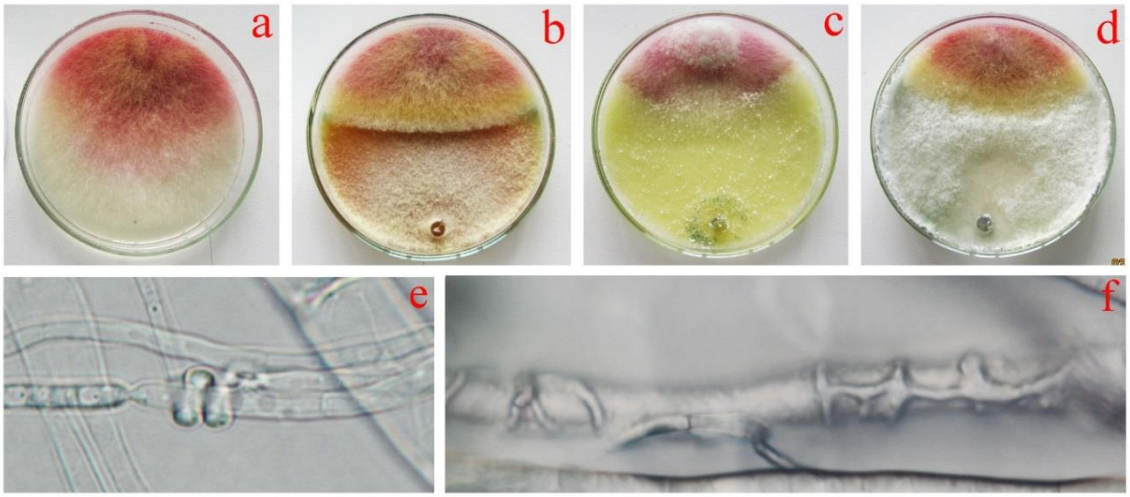
پتانسیل کنترلی ترکیبات برون سلولی غیر فرار و آنتی بیوتیک‌ها

مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه جدایه‌ی *F. graminearum* توسط مواد غیرفرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده قارچ‌های آنتاگونیست نشان داد که رشد جدایه‌ی بیمارگر مورد مطالعه به طور معنی‌داری توسط مواد مذکور متوقف شد. در این میان بیشترین درصد بازدارندگی ترکیبات غیر فرار اتوکلاو شده مربوط به تعامل *T. longibrachiatum* N با جدایه‌ی بیمارگر به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به تعامل *T. harzianum* T22 با بیمارگر به میزان ۶۰/۹ درصد بود (شکل ۵).



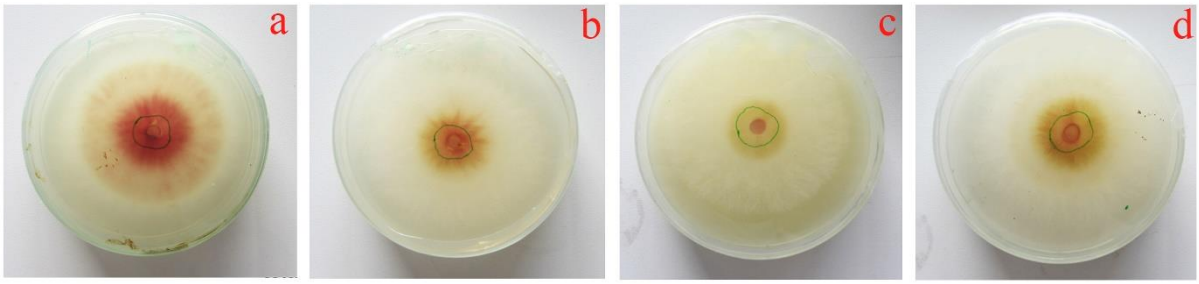
شکل ۱- درصد بازدارندگی جدایه‌های *Trichoderma* از رشد جدایه *Fusarium graminearum* در آزمون کشت متقابل.

Figure 1. The inhibitory percentage of *Trichoderma* isolates on the growth of *Fusarium graminearum* isolate in dual culture assay.



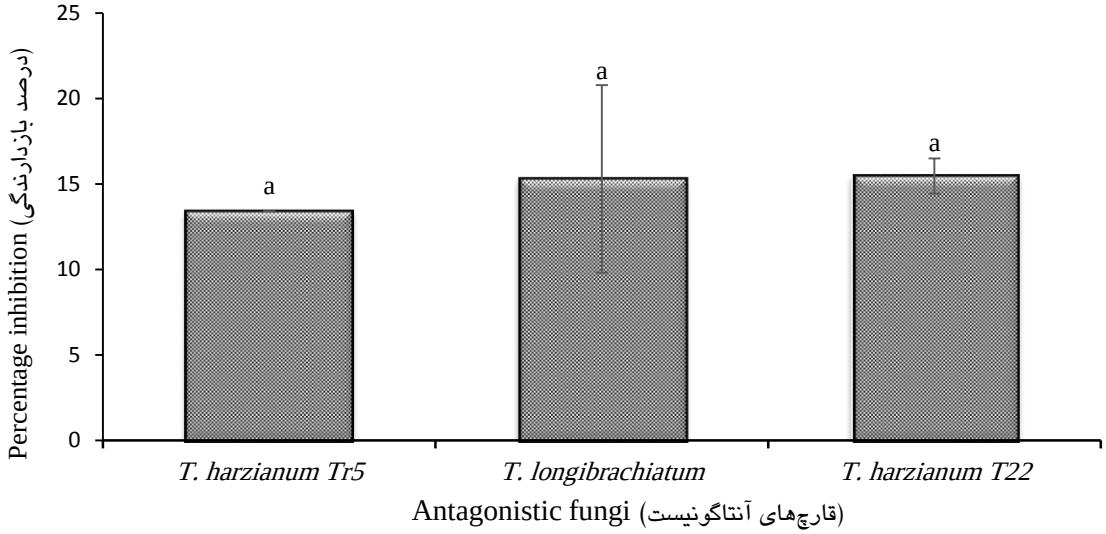
شکل ۲- آزمون کشت متقابل. a- شاهد، b- *Trichoderma harzianum* T22، c- *Trichoderma longibrachiatum* N، d- *Trichoderma harzianum* Tr5 (جدایه‌ی محلی منطقه)، e-f- پارازیتیسم مستقیم ریسه‌ی بیمارگر توسط *Trichoderma harzianum* Tr5

Figure 2. Dual culture assay. A-control, b- *Trichoderma harzianum* T22, c- *Trichoderma longibrachiatum* N, d- *Trichoderma harzianum* Tr5 (local isolate). e-f- Direct parasitism of pathogen hyphae by *Trichoderma harzianum* Tr5.



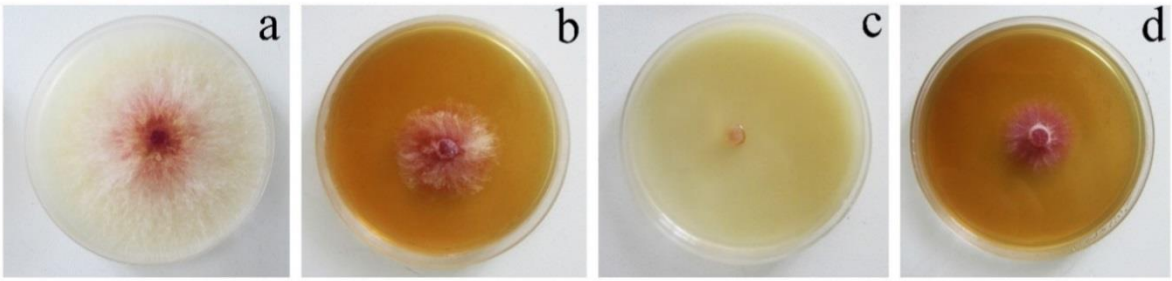
شکل ۳- بررسی پتانسیل تاثیر مواد فرار ترشح شونده توسط سه جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست بر روی رشد قارچ عامل بیماری ***Fusarium graminearum***. a- شاهد، b- ***Trichoderma harzianum*** T22، c- ***Trichoderma longibrachiatum*** N، d- ***Trichoderma harzianum*** Tr5 (جدایه محلی).

Figure 3. Assesement of the inhibitory potential of the volatile compounds of three antagonistic fungi on the growth of the causal agent of the disease, *Fusarium graminearum*. a- control, b- *Trichoderma harzianum* T22, c- *Trichoderma longibrachiatum* N, d- *Trichoderma harzianum* Tr5 (local isolate).



شکل ۴- درصد بازدارندگی مواد فرار جدایه‌های آنتاگونیست روی جدایه‌ی ***Fusarium graminearum*** در سطح احتمال پنج درصد.

Figure 4. Percentage inhibition of volatile compounds of antagonistic isolates on *Fusarium graminearum* isolate at 5% probability level.

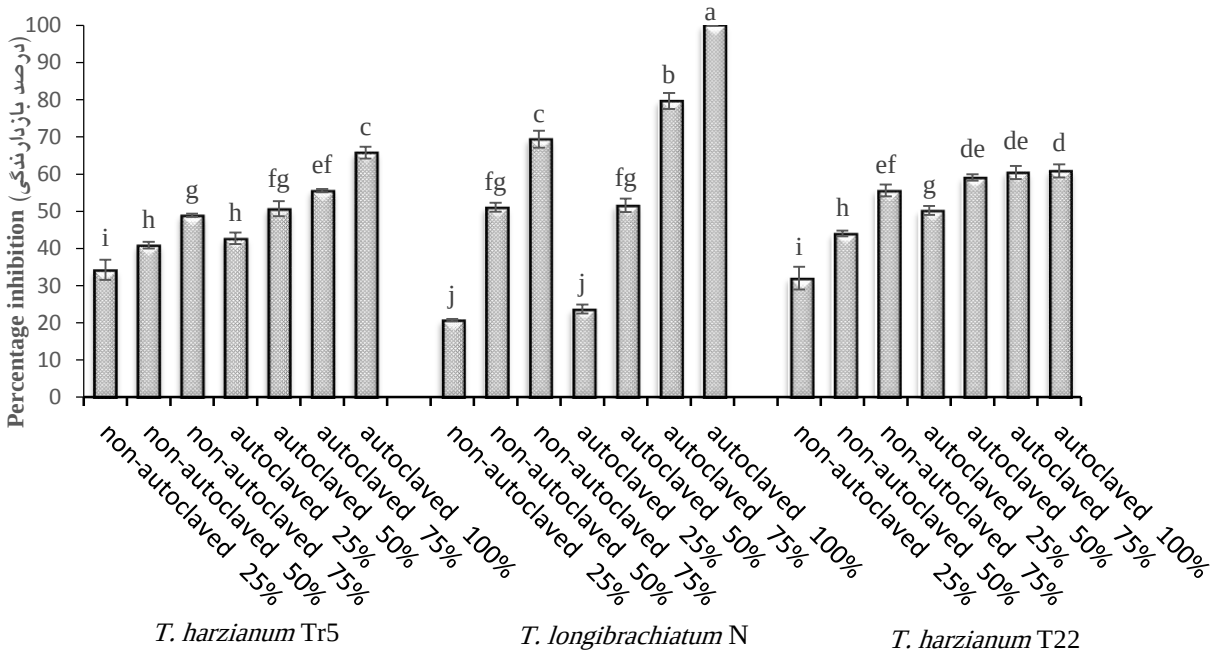


شکل ۵- بررسی خواص آنتاگونیستی مواد غیر فرار استحصالی از جدایه‌های آنتاگونیست در مهار رشدی قارچ ***Fusarium graminearum***. a- شاهد، b- ***Trichoderma harzianum*** T22، c- ***Trichoderma longibrachiatum*** N، d- ***Trichoderma harzianum*** Tr5 (جدایه‌ی محلی منطقه).

Figure 5. Evaluation of the antagonistic properties of non-volatile compounds from antagonistic isolates on the growth inhibition of *Fusarium graminearum*. a- control, b- *Trichoderma harzianum* T22, c- *Trichoderma longibrachiatum* N, d- *Trichoderma harzianum* Tr5 (local isolate).

تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیبات برون سلولی غیر فرار و آنتی بیوتیک‌ها

در شرایط آزمایشگاهی تاثیر غلظت‌های مختلف مواد غیر فرار سه آنتاگونیست به طور معنی‌داری باعث بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر گردید. مقایسه‌ی میانگین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه‌ی *F. graminearum* توسط غلظت‌های مختلف مواد غیرفرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده‌ی گونه‌های *Trichoderma* نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه‌ی مربوط به غلظت ۱۰۰ درصد ترکیبات غیر فرار اتوکلاو شده *T. longibrachiatum* N در تعامل با بیمارگر به میزان ۱۰۰ درصد و کمترین بازدارندگی نیز مربوط به غلظت ۲۵ درصد ترکیبات غیر فرار اتوکلاو نشده *T. longibrachiatum* N در تعامل با بیمارگر به میزان ۲۰/۷ درصد بود (شکل ۶).

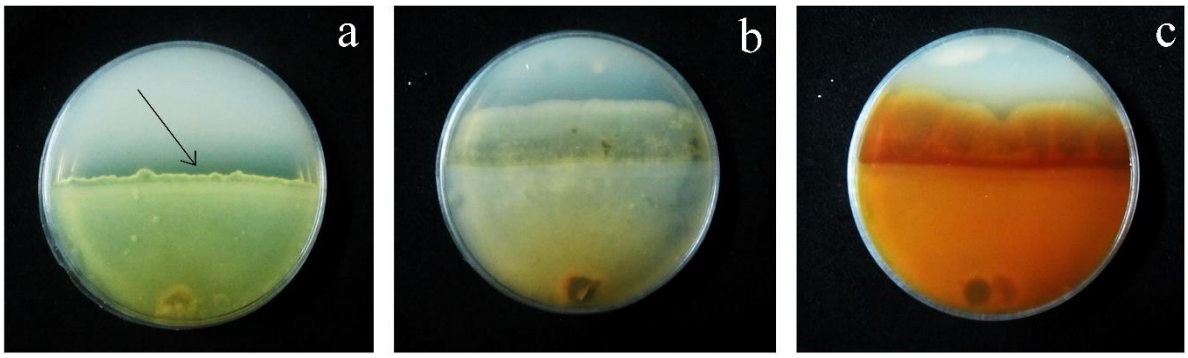


شکل ۶- درصد بازدارندگی از رشد غلظت‌های مختلف مواد غیر فرار گونه‌های مختلف *Trichoderma* روی جدایه‌ی *Fusarium graminearum* در سطح احتمال پنج درصد.

Figure 6. Percentage inhibition of various concentrations of non-volatile compounds of antagonistic isolates on *Fusarium graminearum* isolate at 5% probability level.

بررسی تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی تولید پروتئاز

در آزمون توانایی تولید پروتئاز روی محیط کشت حداقل غنی شده با شیر پس چرخ، تشکیل هاله‌ی بی‌رنگ برای همه‌ی آنتاگونیست‌های بررسی شده‌ی مشاهده گردید. آنالیز داده‌های آماری نشان داد که جدایه‌ی *T. longibrachiatum* N نسبت به جدایه‌های دیگر بیشترین فعالیت را در تولید پروتئاز از خود نشان داد (با قطر هاله‌ی a ۶±۰ میلی‌متر) و جدایه‌ی *T. harzianum* Tr5 از نظر تولید پروتئاز در ردیف بعدی قرار داشت (با قطر هاله‌ی b ۵/۱۶±۰/۱۷ میلی‌متر). در نهایت جدایه تجاری *T. harzianum* T22 کمترین فعالیت را در تولید پروتئاز از خود نشان داد (با قطر هاله‌ی c ۱/۳۳±۰/۱۷ میلی‌متر) (شکل ۷).



شکل ۷- قابلیت جدایه‌های مختلف ***Trichoderma*** در تولید آنزیم پروتئاز (تولید هاله‌ی شفاف به عنوان شاخص تولید آنزیم پروتئاز در نظر گرفته می‌شود). **a-** ***Trichoderma longibrachiatum*** **N ،b-** ***Trichoderma harzianum*** **Tr5 ،c-** ***Trichoderma harzianum*** **T22.**

Figure 7. The ability of different *Trichoderma* isolates in production of protease enzyme (clear halo formation is considered as the indicator for protease enzyme production). a- *Trichoderma longibrachiatum* N, b- *Trichoderma harzianum* Tr5, c- *Trichoderma harzianum* T22.

تولید کیتیناز

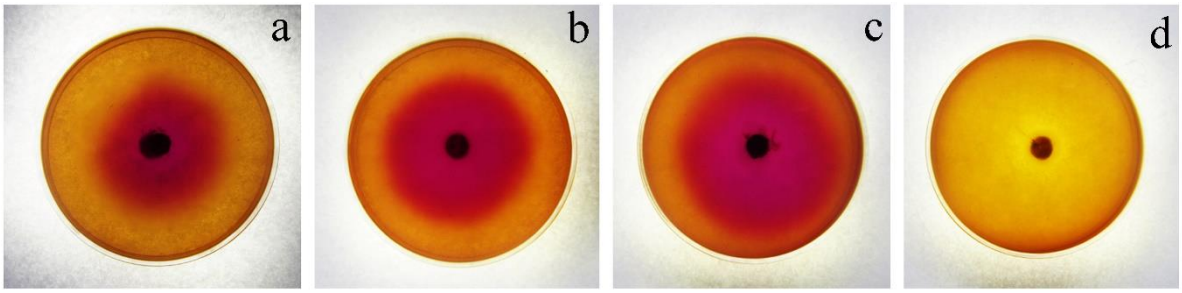
در این آزمون تمامی جدایه‌های *Trichoderma* قادر به افزایش اسیدیته‌ی محیط کشت، حداقل شامل کلوییدال کیتین و تشکیل هاله‌ی بنفش رنگ در سطح محیط بودند. سطح تشتک‌های پتری شش سانتی متری بعد از چهار روز توسط همه‌ی جدایه‌ها بنفش گردید (شکل ۸) اما ابعاد و مساحت ناحیه‌ی بنفش شده در بین جدایه‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد. جدایه‌ی محلی به طور محسوسی نسبت به دو جدایه‌ی دیگر فعالیت کیتینازی بیشتری نشان داد (با اختلاف شعاع هاله‌ی بنفش به اندازه a ۰/۳۳±۶/۶۶ میلی‌متر). جدایه‌های *T. harzianum* T22 (با اختلاف شعاع هاله‌ی بنفش به اندازه ab ۰/۳۳±۶/۳۳ میلی‌متر) و *T. longibrachiatum* N (با اختلاف شعاع هاله‌ی بنفش به اندازه‌ی c ۰/۶۶±۴/۳۳ میلی‌متر) از نظر فعالیت کیتینازی در ردیف بعدی قرار داشتند.

آزمایشات گلخانه‌ای

بررسی میزان کاهش وزن دانه‌های گندم تیمار شده با بیمارگر و قارچ‌های آنتاگونیست

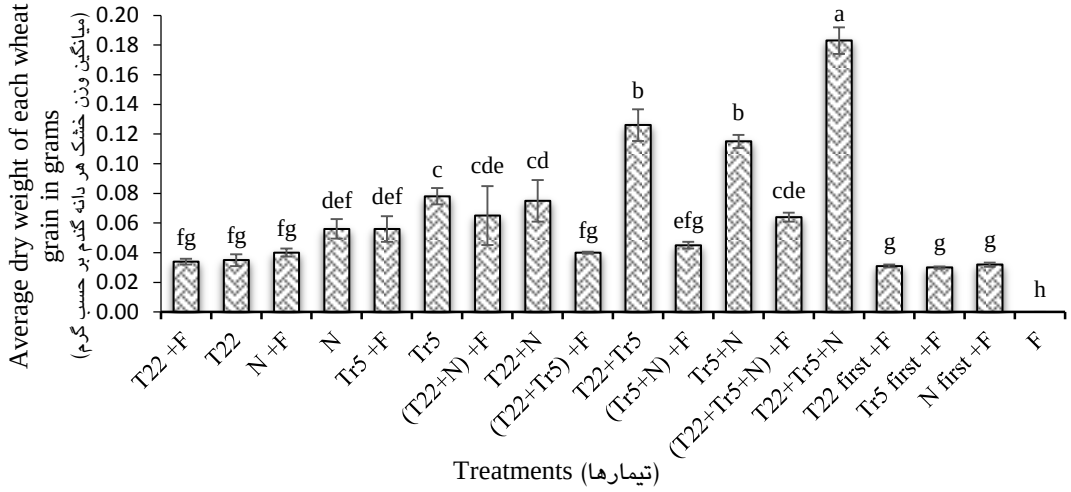
نتایج حاصل از بررسی کاهش اثرات عامل بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم در تیمار با قارچ‌های آنتاگونیست نشان داد که تیمار گندم با قارچ‌های *Trichoderma* به طور معنی‌داری اثرات متفاوتی از کاهش بیماری ایجاد شده توسط *F. graminearum* نشان می‌دهند. سنبلچه‌های آلوده، علایم سوختگی و بذور آلوده علایم چروکیدگی، کاهش وزن و رنگ پریدگی را از خود نشان دادند. بیشترین میانگین وزن دانه‌ی گندم در تیمار *T. harzianum* Tr5 و تیمار مخلوط سوسپانسیون اسپوری حاصل از سه گونه آنتاگونیست، بدون مایه‌زنی با قارچ بیمارگر، به میزان ۰/۱۹۷ گرم و ۰/۱۸۳ گرم به ازای هر دانه گندم مشاهده گردید. کمترین وزن دانه‌ی گندم در تیمار گیاهان گندم با قارچ بیمارگر که در آن گیاهان گندم فقط در زمان کشت با *T. harzianum* Tr5 مایه زنی شده بودند، به میزان ۰/۰۳۰ گرم مشاهده گردید. لازم به ذکر است که گیاهان شاهد آلوده‌ای که با هیچ یک از قارچ‌های آنتاگونیست تیمار نشده بودند، هیچ سنبله‌ای تولید نکردند و در نتیجه وزن دانه‌ی گندم برای آن صفر در نظر گرفته شد. میانگین وزن دانه‌ی گندم در حالت تیمار با قارچ *F. graminearum* و در تعامل با قارچ *T. longibrachiatum* N به میزان ۰/۰۴۰ گرم، در تعامل با جدایه‌ی محلی *T. harzianum* Tr5 به میزان ۰/۰۵۶ گرم و در تعامل با جدایه‌ی تجاری *T. harzianum* T22 به میزان ۰/۰۳۴ گرم به ازای هر دانه محاسبه گردید که به طور معنی‌دار نشان دهنده‌ی وزن بیشتر دانه در تیمار با جدایه‌ی محلی *T. harzianum* Tr5 می‌باشد. به طور کلی بر اساس مشاهدات صورت گرفته، اثر کنترلی جدایه‌های مورد بررسی به غیر از جدایه‌ی محلی، در صورتی که به صورت ترکیب با هم مورد

استفاده قرار گرفتند، بیشتر از حالتی بود که بـه صـورت تکی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۹).



شکل ۸- قابلیت جدایه‌های مختلف ***Trichoderma*** در تولید آنزیم کیتیناز در قیاس با شاهد (تولید هاله‌ی بنفش رنگ به عنوان شاخص تولید آنزیم کیتیناز در نظر گرفته می‌شود). **a-** ***Trichoderma longibrachiatum*** **N**، **b-** ***Trichoderma harzianum*** **T22**، **c-** ***Trichoderma harzianum*** **Tr5**، **d-** شاهد.

Figure 8. The ability of different *Trichoderma* isolates in production of chitinase enzyme in comparison with the control (violet halo formation is considered as the indicator for chitinase enzyme production). a- *Trichoderma longibrachiatum* N, b- *Trichoderma harzianum* T22, c- *Trichoderma harzianum* Tr5, d- control.



شکل ۹- اثرات مایه‌زنی با قارچ‌های آنتاگونیست بر وزن خشک دانه (بر حسب گرم) گندم مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر ***Fusarium graminearum***. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بر مبنای آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 9. The effects of inoculation with the antagonistic fungi on grain dry weight (in gram) of wheat treated with *Fusarium graminearum*. Different letters represent a significant difference at the 5% probability level based on Duncan's test.

بحث

تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی عامل بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم، جداسازی و شناسایی گونه‌های آنتاگونیست *Trichoderma* در ریزوسفر گیاهان گندم در کشت و صنعت نوین ایرانیان در واحد میاندوآب و در نهایت ارزیابی پتانسیل کنترل زیستی جدایه‌های آنتاگونیست جداسازی شده از ریزوسفر گندم در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای صورت پذیرفت. گونه‌های متعددی از جنس *Fusarium* در بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم دخیل می‌باشند با این وجود گونه‌ی مرکب *Fusarium graminearum* senso stricto به عنوان عامل اصلی بیماری سوختگی سنبله گندم در

اغلب مناطق دنیا، از جمله ایران شناخته شده است. در تحقیق حاضر نیز با تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی حاصل از ژن *β- Tubulin* گونه‌ی *F. graminearum* senso stricto به عنوان تنها عامل بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم در کشت و صنعت نوین ایرانیان در منطقه میاندوآب شناسایی گردید.

گونه‌های جنس *Trichoderma* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل کنترل زیستی شناخته شده‌اند. گونه‌ی *T. harzianum* یکی از شناخته شده‌ترین این گونه‌ها می‌باشد و تقریبا از مناطق مختلف جغرافیایی، در ایران گزارش شده است (موسوی و ارزنلو، ۱۳۹۴; Mukherjee et al., 2013). از نقطه نظر تاکسونومیکی، امروزه گونه‌ی مرکب *T. harzianum* حداقل ۱۴ گونه را در بر می‌گیرد و بعضی از گونه‌ها در بخش *harzianum* (*T. harzianum senso lato*)، منحصرا به عنوان اندوفیت ظاهر می‌شوند (قاسمی و ارزنلو، ۱۳۹۶) در حالی که بقیه‌ی گونه‌ها تنها از خاک جداسازی می‌شوند (Chaverri et al., 2015). امروزه تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی حاصل از ژن *RPBII* و ناحیه‌ی ITS، شناسایی گونه‌های *Trichoderma* را رضایت بخش کرده است خصوصا داده‌های حاصل از ژن *RPBII* به صورت موفقیت آمیزی در شناسایی گونه‌ها به کار می‌رود (Mukherjee et al., 2013).

امروزه کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی همواره مورد توجه محققان بوده و کارهای خوبی در این باره صورت گرفته است. اگرچه کنترل زیستی سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم به صورت تجاری مرسوم نگشته، اما امکان‌پذیر بودن این عمل ثابت شده است (Stockwell et al., 2001). در تحقیق حاضر نیز جدایه‌های *Trichoderma* به عنوان آنتاگونیست از ناحیه‌ی ریزوسفر گندم جداسازی گردید که با تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی حاصل از ناحیه‌ی ITS تمامی آنتاگونیست‌ها *T. harzianum* شناسایی گردیدند.

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی آزمایشگاهی شیوه‌های مختلف آنتاگونیستی جنس‌های مورد بررسی بر روی قارچ *F. graminearum* نشان داد که جدایه‌های قارچی آنتاگونیست مورد آزمایش (*T. harzianum* Tr5 (جدایه محلی)، *T. longibrachiatum* N و *T. harzianum* T22 (جدایه‌ی تجاری) قادر هستند رشد قارچ *F. graminearum* را محدود نمایند. در حالت کلی، آنتاگونیست‌های *T. harzianum* Tr5 و *T. longibrachiatum* N به طور معنی‌داری اثرات کنترلی قابل قبولی را نسبت به جدایه‌ی تجاری *T. harzianum* T22 در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان دادند. همچنین پدیده‌ی مایکوپارازیتیسم در مورد هیف‌های *Trichoderma* پس از رشد و برخورد با میسلیوم‌های *F. graminearum* فقط در تعامل با جدایه محلی *T. harzianum* Tr5 مشاهده گردید که با تولید اندام‌های پنجه‌ای شکل روی ریسه‌ی بیمارگر و از طریق حلقه زدن دور هیف‌های *F. graminearum* از آن تغذیه می‌کند. همچنین اخیرا خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. longibrachiatum* N و *T. harzianum* T22 بر روی *Phaeoacremonium minimum* در شرایط آزمایشگاهی گزارش گردیده است (نرمانی و همکاران، ۱۳۹۷).

تولید رنگدانه در میسلیوم برای قارچ‌ها حیاتی بوده و در مقاومت به شرایط نامساعد محیطی ضروری می‌باشد (Keller et al., 2005). با توجه به تولید متابولیت‌های فرار و غیر فرار توسط گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به‌ویژه *T. longibrachiatum* N و *T. harzianum* Tr5، که باعث کاهش تولید رنگدانه در ریسه‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاه گردید در شرایط طبیعی به نظر می‌رسد این ترکیبات به دلیل فشار بخار بالا و تبخیر سریع آن‌ها و امکان نفوذ در خلل و فرج خاک می‌توانند به مرور زمان باعث از بین رفتن قارچ عامل بیماری شوند (Kai et al., 2016).

اغلب عوامل کنترل زیستی، آنزیم‌های هیدرولیتیک تولید می‌کنند که در کنترل زیستی نقش مهم دارند. آنزیم‌های مختلفی که توسط گونه‌های

جنس *Trichoderma* تولید می‌شوند، در تخریب دیواره‌ی سلولی میزبان نقش اساسی دارند (Harman et al., 2004). در این میان، آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز از آنزیم‌های تخریب‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی قارچ‌ها هستند که نقش مهمی در بازدارندگی از رشد قارچ‌ها دارند (Ahamadzadeh and Sharifi Tehrani, 2009). گونه‌های متعلق به جنس *Trichoderma* با ترشح آنزیم‌های لایتیک مستقیماً به بیمارگرهای گیاهی هجوم می‌برند (Elad et al., 1982; Haran et al., 1996). ماتارس و همکاران (Matarese et al., 2012) نشان دادند که آنزیم‌های کیتینولیتیک متعلق به خانواده‌های A، B و C دارای نقش مشخصی در پارازیتیسم گونه‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* توسط گونه *T. gamsii* هستند که کیتیناز C، به دلیل مدل‌های چندگانه پیشنهادی برای اتصال به کربوهیدرات، دارای نقش مهم‌تری می‌باشد. در تحقیق حاضر نیز تمام جدایه-های *Trichoderma* قادر به تولید آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز با کمیت و کیفیت متفاوت بودند که این نتایج حکایت از توانایی جدایه‌های محلی ریزوسفر گندم در تولید آنزیم‌هایی می‌باشد که بدنه‌ی اصلی سازوکارهای کنترل زیستی را تشکیل می‌دهند (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۴).

در تحقیق حاضر نیز به کارگیری جدایه‌های آنتاگونیست به طور معنی‌داری موجب مهار بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم و کاهش کمتر در میانگین وزن بذور گندم (به عنوان ملاک سنجش میزان بیماری) نسبت به شاهد گردید. به طوری که جدایه‌ی *T. longibrachiatum* N نسبت به شاهد آلوده، افزایش وزن خشک بیش از دو برابری را نشان داد. دو جدایه‌ی محلی و تجاری (*T. harzianum* Tr5 و *T. harzianum* T22) نیز به ترتیب در ردیف بعدی قرار داشتند. همچنین با توجه به این که هیچ مواد مغذی به خاک اتوکلاو شده گلدان‌ها اضافه نگردیده بود، در تیماری که هرگز با جدایه‌های *Trichoderma* مایه‌زنی نشده بود، گیاهان گندم به مرحله‌ی ساقه دهی وارد نشده و هیچ بذری تولید نکردند. بنابراین امکان اسپور پاشی با بیمارگر روی سنبله فراهم نگردید. با توجه به اینکه خاک گلدان‌ها اتوکلاو شده بود و اینکه هیچ مواد مغذی نیز به خاک گلدان‌ها اضافه نشده بود، گیاهان گندم در این گلدان‌ها از یک طرف با کمبود مواد غذایی و از طرف دیگر به دلیل اتوکلاو شدن خاک با تجمع مواد سمی ناشی از حرارت دیدن مواد آلی خاک مانند تجمع آمونیاک روبه‌رو بودند بنابراین در این تیمار گیاهان به نوعی با تنش روبه‌رو بوده و قادر به تولید سنبله نبودند. بسیاری از دانشمندان بر این باورند که جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* با تولید هورمون‌های محرک رشد گیاهی و یا القای تولید این هورمون‌ها درگیاه، باعث تحریک رشد گیاهان می‌شوند و یا باعث کاهش اثرات ممانعت از رشد برخی ترکیبات، توکسین‌های زیستی و شیمیایی موجود در خاک و حتی تغییر در میزان عناصر محلول در خاک می‌شوند (Vinale et al., 2008) که به نوعی نتایج تحقیق حاضر نیز با یافته‌های محققان قبلی همخوانی داشت. در یک مطالعه که توسط شیسلر و همکاران (Schisler et al., 2002) صورت پذیرفت، مشخص شده است که *Cryptococcus* sp. و *C. nodaensis* قادر به کنترل موفق بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله‌ی گندم در شرایط طبیعی هستند و نشان دهنده‌ی پتانسیل بالای این مخمرها در کنترل بیماری سوختگی فوزاریومی در شرایط طبیعی می‌باشد. همچنین جوکوم و همکاران (Jochum et al., 2006) نشان دادند که کاربرد همزمان باکتری *Lysobacter enzymogenes* strain C3 و قارچ‌کش تبوکونازول بهترین اثر کنترلی را روی بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم در شرایط طبیعی دارد، در صورتی که کاربرد جداگانه‌ی عامل کنترل زیستی و قارچ‌کش، کارایی کمتری در کنترل از خود نشان دادند. همچنین در یک مطالعه‌ی دیگر، کارایی گونه‌های *T. gamsii* و *T. velutinum* در کاهش تولید توکسین DON توسط گونه‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* مورد بررسی قرار گرفته است که نشان دهنده‌ی کارایی این گونه‌های آنتاگونیست در کاهش تولید توکسین توسط این بیمارگرها می‌باشد (Matarese et al., 2012). هو و همکاران (Hue et al., 2009) نشان دادند که گونه‌ی *Clonostachys rosea* دارای

پتانسیل کنترل زیستی روی بیماری سوختگی سنبله‌ی گندم می‌باشد. با توجه به اینکه سنبله‌های غلات در دوره‌ی زمانی کوتاهی نسبت به عامل سوختگی فوزاریومی حساس هستند، استفاده از عوامل کنترل زیستی می‌تواند مؤثر واقع شود. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نیز با نتایج سایر محققان همخوانی داشته و نشان دهنده‌ی قابلیت بالقوه جدایه‌های محلی در کنترل زیستی بیماری سوختگی سنبله گندم می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از آقای مهندس حسین هاتف، مهندس اروجی، مهندس کامبیز خامنه و مهندس مسعود قزوینی به خاطر کمک‌های بی‌دریغشان ابراز میدارند.

منابع مورد استفاده

حبیبی ر، رهنما ک و تقی‌نسب م. ۱۳۹۴. ارزیابی کارایی گونه‌های بومی تریکودرما در تولید آنزیم‌های خارج سلولی هنگام برهمکنش با عامل بیمارگر *Fusarium oxysporum*. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی. جلد ۴ شماره ۲. صفحه‌های ۷۳ تا ۸۵.

قاسمی س، ارزنلو م. ۱۳۹۶. شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت درختان بلوط در جنگل های ارسباران. نشریه پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی. جلد ۶ شماره ۳. صفحه‌های ۵۳ تا ۶۶.

موسوی س و ارزنلو م. ۱۳۹۴. پتانسیل بازدارندگی برخی جدایه‌های قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ *Cercospora beticola*، عامل بیماری لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی. جلد ۴ شماره ۲. صفحه‌های ۱۷۱ تا ۱۸۹.

نرمانی ا، ارزنلو م و بابای اهری ا. ۱۳۹۷. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های درون‌زی و تجاری تریکودرما روی قارچ *Phaeoacremonium minimum*، عامل بیماری نوار برگی انگور. نشریه پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی. جلد ۷ شماره ۱. صفحه‌های ۱۵۱ تا ۱۶۹.

Agrawal T and Kotasthane AS, 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India .SpringerPlus 1: 73.

Ahamadzadeh M and Sharifi Tehrani A, 2009. Evaluation of fluorescens *pseudomonas* for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. Biological Control 48: 101–107.

Arzanlou M, Khodaei S, Narmani A, Bababi-ahari A and Motallebi Azar A, 2014. Inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on growth of *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf spot disease on sunflower, under laboratory conditions. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47 (13): 1592–1599.

Chaverri P, Branco-Rocha F, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T and Samuels GJ, 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia 107(3): 558–590.

Davari M, Wei SH, Babai-Ahari A, Arzanlou, M, Waalwijk C, van der Lee TAJ, Zare R, Gerrits van den Ende AHG, de Hoog SG and van Diepeningen AD, 2013. Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. World Mycotoxin Journal 6(2): 137–150.

Dennis C and Webster J, 1971. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* I, production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25–39.

Domsch KH, Gams W and Anderson TH, 2007. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press (London) Ltd..

Edington LV, Khew KL and Barron GI, 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42–44.

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

Fokkema NJ, 1978. Fungal antagonism in the phylosphere. Annals of Applied Biology 89:115–117.

Haran S, Schikler H and Chet I, 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142: 2321–2331.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M, 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews 2:43–56.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I and Monte E, 2012. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. Microbiology 158(1):17–25.

Howell CR, 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis, Padstow, pp 173–184.

Hue AG, Voldeng HD, Savard ME, Fedak G, Tian X and Hsiang T, 2009. Biological control of fusarium head blight of wheat with Clonostachys rosea strain ACM941. Canadian Journal of Plant Pathology 31(2):169–179.

Ireta MJ and Gilchrist L, 1994. *Fusarium* head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat Special Report No. 21b. Mexico, DF, CIMMYT.

Jochum CC, Osborne LE and Yuen GY, 2006. Fusarium head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3, Biological Control 39 (3): 336–344.

Kai M, Effmert U and Piechulla B, 2016. Bacterial-plant-interactions: approaches to unravel the biological function of bacterial volatiles in the rhizosphere. Frontiers in microbiology 7:108.

Karimi K, Narmani A, Pertot I and Arzanlou M, 2019. Rapid and easy modified plate-based screening methods for quantitative and qualitative detection of protease production by Fungi. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica (NOT published)

Keel C and Defago G, 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. In: Gange A.C., Brown V.K. (eds). Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems, pp. 27–46. Blackwell Scientific Publishers, London, UK.

Keller NP, Turner G and Bennett JW, 2005. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. Nature Reviews Microbiology 3: 937–947.

Leslie JF and Summerell BA, 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell. 388 pp.

Matarese F, Sarrocco S, Gruber S, Seidl-Seiboth V and Vannacci G. 2012. Biocontrol of Fusarium head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. Microbiology 158(1):98–106.

Mesterhazy A, 1995. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. Plant breeding 114 (5): 377–386.

Moller E M, BahnwegG, SandermanH and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20: 6115-6116.

Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M and Schmoll M, 2013. *Trichoderma:* biology and applications. CABI.

O'Donnell K and Cigelnik E, 1997. Two divergent intragenomic rDNAITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7:103–116.

Parry DW, Jenkinson P and McLeod L, 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. Plant Pathology 44(2): 207–238.

Papavizas GC, 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Annual review of phytopathology 23(1):23–54.

Samuels GJ, Petrini O, Kuhls K, Lieckfeldt E and Kubicek CP, 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. Studies in Mycology 41: 154.

Schisler DA, Khan NI, Boehm MJ and Slininger PJ, 2002. Greenhouse and field evaluation of biological control of Fusarium head blight on durum wheat. Plant disease 86(12):1350–1356.

Stockwell CA, Bergstrom GC and Luz WD, 2001. Biological control of Fusarium head blight with Bacillus subtilis TrigoCor 1448. In Proceedings of the 2001 National Fusarium Head Blight Forum (pp. 8–10).

Suga H, Karugia GW, Ward T, Gale LR, Tomimura K, Nakajima T, Miyasaka A, Koizumi S, Kageyama K and Hyakumachi M, 2008. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Japan. Phytopathology 98(2):159–166.

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

Wegulo SN, Baenziger PS, Nopsa JH, Bockus WW and Hallen-Adams H, 2015. Management of Fusarium head blight of wheat and barley. Crop Protection 73:100–107.

White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor JL, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods andvapplications. (pp. 315–322). New York, NY, USA: Academic Press, Inc.

Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, Chen W, Xu J, Xu J, Zhang Y and Feng J, 2012. Population analysis of the Fusarium graminearum species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates. PLoS One 7(2), p.e31722.

Zhang YP and Nan Z, 2007. Growth and anti-oxidative systems changes in Elymus dahuricus is affected by *Neotyphodium* endophyte under contrasting water availability. Journal of Agronomy and Crop Science 193(6): 377–386.

Biological Control of Wheat Fusarium Head Blight Using Antagonistic Strains of Commercial and Local *Trichoderma,* Isolated from Wheat Plant Rhizosphere

A Narmani[1], M Arzanlou[2], A Babai-Ahari[2] and H Mastari –Farahani[3]

[1]Researcher of Research and Innovation Center of ETKA Organization, ETKA Organization, Tehran, Iran

[2]Professor of Plant Pathology and Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

[3]Director of the Knowledge Base Center of the Iranian Modern Farms Company, ETKA Organization, Tehran, Iran

*Corresponding author: Abolfazl.narmani2@gmail.com

Received: 27 January 2019 Accepted: 12 June 2019

Abstract

Fusarium Head Blight (FHB) is one of the most important diseases of wheat causing considerable yield losse annually. Commonly management practices of the disease are not effective, so adopting new strategies to control are seriously needed. For this purpose, in the present study, efficiency of commercial and local *Trichoderma* strains was evaluated in the control of Fusarium Head Blight on wheat. For isolation of the pathogen and antagonists, samples were taken from infected wheat spicke and wheat rhizosphere, respectively. Identification of fungal isolates (*Trichoderma* and *Fusarium* isolates) was performed based on combination of morphological characteristics and molecular data. Accordingly, the identity of the 10 isolates of the pathogen and 13 isolates of the antagonists was determined as *Fusarium graminearum* and *Trichoderma harzianum*, respectively. In lab, after a preliminiary screening, a superior *Trichoderma* isolate from wheat rhizosphere (*T. harzianum* Tr5), one commercial product (*T. harzianum* T22) and *T. longibrachiatum* N (prepared from culture collection of Tabriz University,) were used to study their antagonistic activity against *F. graminearum* under laboratory and greenhouse conditions. Antagonistic strains were furhter assessed in the production of chitinase and protease enzymes. The results of laboratory tests showed that all fungal antagonist strains significantly inhibited the growth of the pathogen compared to control. In dual culture assay, the highest inhibitory percent was detected in the interaction of *F. graminearum* with *T. harzianum* Tr5 and *T. longibrachiatum* N. Furthermore, only *T. harzianum* Tr5 was able to show mycoparasitism mechanism directly. The volatile compounds of the antagonist strains showed the lowest inhibitory against pathogen, without any significant difference between them. In non-volatile compounds assay, the highest inhibitory percentage was detected for *T. longibrachiatum* N and the lowest inhibitory percentage was detected for *T. harzianum* Tr5 and *T. harzianum* T22, respectively. All antagonists were able to produce chitinase and protease enzymes, with more capability for local isolates. Finally, the results of the greenhouse assay were positively in consistent with the laboratory tests. The results of greenhouse assay showed that the antagonist isolates significantly inhibited the adverse effects of the pathogen on weight loss of wheat grain.

Keywords: *Triticum aestivum* L., Fusarium Head Blight, biological control, Commercial and local *Trichoderma* strains, Laboratory and greenhouse conditions.