DOI: http://dx.doi.org/10.22092/bcpp.2016.108151

بررسی کارایی جدایه‌های *Trichoderma* spp. در کنترل بیماری پوسیدگی زغالی سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina* در شرایط گلخانه

شعبان کیا[۱]، کامران رهنما[۲]

۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان

۲- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده تولید گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، گرگان

مسئول مکاتبات: شعبان کیا، پست الکترونیک: shabankia@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۲/۱۵ ۴ (۱) ۱-۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۰

چکیده

بیماری پوسیدگی زغالی ناشی از *Macrophomina phaseolina* از معمول‌ترین بیماری‌های سویا در بسیاری از نقاط دنیا می‌باشد. به‌دلیل خاکزی بودن قارچ بیمارگر و توان بالای ساپروفیتی آن در خاک، عدم کنترل مؤثر بیماری و ایجاد آلودگی‌های زیست‌محیطی در اثر استفاده از سموم شیمیایی، از عوامل آنتاگونیست طبیعی مانند جدایه‌های قارچی متعلق به جنس *Trichoderma* برای مهارزیستی این بیماری می‌توان استفاده کرد. در این پژوهش تأثیر دو جدایه متعلق به‌گونه‌های *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma atroviride* در کنترل *M. phaseolina* و همچنین القای مقاومت گیاه نسبت به این بیمارگر در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در تیمارهای آلوده سازی خاک با بیمارگر، جدایه‌ی *T. harzianum* در خاک‌های سترون و غیرسترون به‌ترتیب موجب کاهش بیماری به‌میزان ۶۲ و ۶۵ درصد شد. جدایه *T. atroviride* نیز بیماری را در خاک‌های سترون و غیرسترون، به‌ترتیب ۵۹ و ۶۲ درصد کاهش داد. تلفیق دو جدایه‌ی تریکودرما با هم، به‌ترتیب بیماری را ۶۷ و ۷۰ درصد را کاهش دادند. براساس نتایج به‌دست آمده، در تیمارهای آلوده‌سازی نوک ساقه‌ی سویا با بیمارگر، گونه‌ی *T. harzianum* در خاک‌های سترون و غیرسترون به‌ترتیب موجب ۵۶ و ۵۸ درصد کاهش بیماری شد. جدایه‌ی *T. atroviride* نیز در خاک‌های سترون و غیرسترون به‌ترتیب موجب کاهش بیماری به‌میزان ۵۲ و ۵۳ درصد شد. تلفیق دو جدایه‌ی تریکودرما با هم، به‌ترتیب بیماری را ۶۰ و ۶۳ درصد کاهش دادند. در مجموع، در این پژوهش، جدایه‌های تریکودرما در خاک غیرسترون کارایی بیش‌تری در کاهش بیماری و القای مقاومت نشان دادند. جدایه‌های تریکودرما در تیمارهای آلوده‌سازی خاک با بیمارگر تأثیر بیش‌تری در کاهش بیماری داشتند. جدایه *T. harzianum* نسبت به جدایه *T. atroviride* موجب کاهش بیش‌تر بیماری در هر دو روش کاربرد بیمارگر شده است. تلفیق دو جدایه تریکودرما نیز تأثیر بیش‌تری در کاهش بیماری و القای مقاومت داشتند.

واژه‌های کلیدی: مهار زیستی، پوسیدگی زغالی، القای مقاومت، تریکودرما

مقدمه

سویا (*Glycine max* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی و پروتئینی به‌شمار می‌رود. دانه‌ی سویا به‌طور متوسط دارای ۴۰٪ پروتئین و ۲۰٪ روغن می‌باشد. بیمارگرهای گیاهی از جمله عواملی هستند که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول سویا می‌شوند. یکی از این بیمارگرها، قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid عامل بیماری پوسیدگی زغالی از معمول‌ترین بیماری‌های سویا در بسیاری از نقاط دنیاست. عامل بیماری در سطح وسیعی گسترش داشته و به‌بیش از ۵۰۰ گونه‌ی گیاهی مختلف زراعی و علف هرز از جمله سویا، آفتابگردان، پنبه، کنجد، ذرت، توتون و سورگوم حمله می‌کند (Wrather *et al*., 2008). بیماری پوسیدگی زغالی سویا در حال حاضر یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی این محصول در مزارع سویا در شمال کشور به‌شمار می‌رود و هر ساله به‌خصوص در سال‌های خشک و کم باران باعث آلودگی مزارع سویا وکاهش کمی و کیفی محصول می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ عامل بیماری پوسیدگی زغالی می‌تواند گیاه را در تمام طول فصل مورد حمله قرار دهد. در گیاهچه‌های آلوده بخش هیپوکوتیل به‌رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه در آمده و ممکن است در شرایط گرم و خشک از بین بروند. در گیاهان بالغ، برگ‌ها کوچک‌تر، زرد رنگ و پژمرده شده اما متصل باقی می‌مانند. پس از گلدهی، بافت‌های اپیدرمی یا زیر اپیدرمی در ریشه اصلی و قسمت پایینی ساقه به‌رنگ خاکستری روشن یا نقره‌ای در می‌آیند . ریزسختینه‌ها (میکرواسکلروت) در عناصر آوندی مغز چوب ساقه وبافت‌های زیر اپیدرمی تشکیل شده وممکن است مسیر جریان آب در آوندها را مسدود کنند. همچنین بافت‌های آوندی ریشه و مغز چوب ساقه به‌رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز در می‌آیند. قارچ عامل بیماری مدت‌ها به‌صورت ریزسختینه سیاه رنگ در خاک یا در بقایای میزبان در خاک‌های خشک باقی می‌ماند (Sinclair and Backman, 1993).

به‌دلیل خاکزی بودن قارچ بیمارگر و توان بالای ساپروفیتی آن در خاک، شیوه‌های معمول کنترل بیماری مؤثر نیست. استفاده از مواد شیمیایی نیز به‌جهت آلودگی‌های زیست محیطی و عدم حفاظت مؤثر گیاه از آسیب بیمارگر توصیه نمی‌شود (Singh & Kaiser, 1995; Wrather & Kendig, 1998; Lohda *et al*., 2003). نتایج تحقیقات پیشین نشان داده که استفاده از عوامل طبیعی آنتاگونیست موجب کاهش معنی‌دار بیماری پوسیدگی زغالی در گیاهان مختلف شده است (Etebarian, 2006; Adekunle *et al*., 2006).

در حال حاضر متداول‌ترین و مؤثرترین عوامل آنتاگونیست قارچی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی، گونه‌های جنس *Trichoderma* Presoon: Fr. می‌باشد (Monte, 2001; Vinale *et al*., 2008; Jat & Agalave, 2013). گونه‌های تریکودرما با ترشح ترکیبات آنتی بیوتیک و آنزیم‌های مختلف خارج سلولی در خاک، کلونیزاسیون فاریشه، قدرت هم‌زیستی در ریشه، اسپورزایی بالا، تحمل بالا نسبت به عناصر سنگین و سایر ترکیبات موجود در محیط خاک و ریشه، رقابت تغذیه‌ای بالا نسبت به بیمارگرها در محیط فاریشه و نیز القای مقاومت در گیاه با تحریک آن در تولید ترکیبات ضد میکروبی، به‌عنوان یک قارچ آنتاگونیست مؤثر در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی معرفی می‌شود (Ahmed *et al*., 2000; Howell, 2003; Benitez *et al*., 2004; Reino *et al*., 2008).

برخی گونه‌های تریکودرما به‌عنوان ساپروفیت عمومی فاریشه در کنترل بیمارگرهای مهم خاکزاد از جمله *Macrophomina phaseolina*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Phytophthora* spp.، *Fusarium oxysporum* مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آن‌ها موفقیت آمیز بوده است (Ashrafizadeh *et al*., 2005; Behboudi *et al*., 2005; Chang *et al*., 2006; Heidari Faroughi *et al*., 2004; Khavasi *et al*., 2013; Montazernya *et al*., 2008; Nejhadnasrollah *et al*., 2009; Norouzi *et al*., 2014;Vasebi et al., 2012).

هدف از این پژوهش، بررسی و مقایسه تأثیر گونه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* در کنترل *M. phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی زغالی سویا در مرحله‌ی گیاهچه‌ای در شرایط گلخانه بود. در این پژوهش همچنین القای مقاومت گیاه سویا نسبت به‌قارچ عامل بیماری پوسیدگی زغالی توسط دو گونه تریکودرما مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست

در این بررسی یک جدایه از *M. phaseolina* (جدایه‌ی GK92) جدا شده از گیاه سویا در منطقه‌ی گرگان به‌عنوان جدایه‌ی بیمارگر استفاده شد. در مورد جدایه‌های آنتاگونیست، از یک جدایه *T. harzianum* (جدایه‌ی احمدآباد) و یک جدایه *T. atroviride* (جدایه‌ی ۶۰۲۲) براساس تحقیقات انجام شده در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (Montazernya *et al*., 2008) استفاده شد.

تهیه زادمایه قارچ بیمارگر و آنتاگونیست

برای تهیه زادمایه قارچ بیمارگر، ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم ذرت خرد شده داخل ظرف ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و با اضافه کردن ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن، دو بار در دو روز متوالی و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱

Archive of SID

www.SID.ir

درجه‌ی سلسیوس و در فشار یک اتمسفر داخل اتوکلاو سترون شدند. سپس داخل هر ظرف، پنج قرص هشت میلی‌متری از کشت سه روزه قارچ بیمارگر اضافه شد و ظروف به‌مدت سه هفته در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند.

برای تهیه زادمایه قارچ‌های آنتاگونیست، ابتدا جدایه‌های خالص تریکودرما روی محیط کشت PDA کشت داده و تشتک‌ها داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. مقدار ۲۰۰ گرم دانه گندم داخل ظرف ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شده و با اضافه کردن ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن، دو بار در دو روز متوالی و هر بار به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و در فشار یک اتمسفر داخل اتوکلاو سترون شدند. پس از سرد شدن، پنج قرص هشت میلی‌متری از کشت سه روزه جدایه‌های تریکودرما به‌صورت جداگانه به هر ظرف اضافه شد و ارلن‌ها به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

بررسی تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی زغالی سویا در شرایط گلخانه

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با سه فاکتور در قالب طرح کاملا تصادفی و سه تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. سه فاکتور عبارت بودند از: ۱- جدایه‌ی آنتاگونیست در سه سطح شامل کاربرد هر یک از دو جدایه به‌صورت جداگانه و توام، ۲- جدایه بیمارگر در دو سطح شامل کاربرد در خاک و در نوک ساقه و ۳- نوع خاک در دو سطح سترون و غیرسترون. تیمارهای آزمایشی و نام‌های اختصاری آن‌ها به‌شرح جدول شماره یک عبارت بودند از: تیمارهای یک تا ۱۲ در خاک سترون (۱- شاهد بدون آنتاگونیست و بیمارگر؛ ۲ تا ۴- کاربرد هر یک از سه حالت آنتاگونیست بدون بیمارگر؛ ۵- کاربرد بیمارگر در خاک بدون آنتاگونیست؛ ۶ تا ۸- کاربرد بیمارگر در خاک با کاربرد هر یک از سه حالت آنتاگونیست؛ ۹- کاربرد بیمارگر در نوک ساقه بدون آنتاگونیست؛ ۱۰ تا ۱۲- کاربرد بیمارگر در نوک ساقه با کاربرد هر یک از سه حالت آنتاگونیست)؛ ۱۳ تا ۲۴- اعمال تیمارها در خاک غیرسترون دقیقا به‌همان ترتیب ذکر شده در خاک سترون بوده است.

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی و نام‌های اختصاری آن‌ها.

Table 1. Treatments and their abbreviated names.

No.	Treatment	Abbreviated name
1	Control without antagonist and pathogen (sterilized soil)	T0M0S1
2	*T. harzianum* without pathogen (sterilized soil)	T1M0S1
3	*T. atroviride* without pathogen (sterilized soil)	T2M0S1
4	*T. harzianum* + *T. atroviride* without pathogen (sterilized soil)	T3M0S1
5	*M. phaseolina* in soil without antagonists (sterilized soil)	T0M1S1
6	*T. harzianum* + *M. phaseolina* in soil (sterilized soil)	T1M1S1
7	*T. atroviride* + *M. phaseolina* in soil (sterilized soil)	T2M1S1
8	*T. harzianum* + *T. atroviride* + *M. phaseolina* in soil (sterilized soil)	T3M1S1
9	*M. phaseolina* in stem tip without antagonists (sterilized soil)	T0M2S1
10	*T. harzianum* + *M. phaseolina* in stem tip (sterilized soil)	T1M2S1
11	*T. atroviride* + *M. phaseolina* in stem tip (sterilized soil)	T2M2S1
12	*T. harzianum* + *T. atroviride* + *M. phaseolina* in stem tip (sterilized soil)	T3M2S1
13	Control without antagonists and pathogen (non sterilized soil)	T0M0S2
14	*T. harzianum* without pathogen (non sterilized soil)	T1M0S2
15	*T. atroviride* without pathogen (non sterilized soil)	T2M0S2
16	*T. harzianum* + *T. atroviride* without pathogen (non sterilized soil)	T3M0S2
17	*M. phaseolina* in soil without antagonists (non sterilized soil)	T0M1S2
18	*T. harzianum* + *M. phaseolina* in soil (non sterilized soil)	T1M1S2
19	*T. atroviride* + *M. phaseolina* in soil (non sterilized soil)	T2M1S2
20	*T. harzianum* + *T. atroviride* + *M. phaseolina* in soil (non sterilized soil)	T3M1S2
21	*M. phaseolina* in stem tip without antagonists (non sterilized soil)	T0M2S2
22	*T. harzianum* + *M. phaseolina* in stem tip (non sterilized soil)	T1M2S2
23	*T. atroviride* + *M. phaseolina* in stem tip (non sterilized soil)	T2M2S2
24	*T. harzianum* + *T. atroviride* + *M. phaseolina* in stem tip (non sterilized soil)	T3M2S2

Archive of SID

www.SID.ir

خاک مورد استفاده در این آزمایش شامل یک قسمت خاک مزرعه، دو قسمت خاک برگ و یک قسمت ماسه بود. یک گروه از خاک‌ها دو بار و در دو روز متوالی هر روز به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و در فشار یک اتمسفر داخل اتوکلاو سترون شدند و گروه دیگر سترون نشدند. یک روز قبل از کاشت بذور، زادمایه بیمارگر (دانه‌های ذرت خرد شده حاوی میسلیوم و ریزسختینه) به‌میزان ۱۵ گرم در هر کیلوگرم خاک گلدان اضافه شد. برای تیمارهای بدون بیمارگر، فقط ذرت خرد شده سترون به‌همان نسبت به‌خاک گلدان‌ها اضافه شد. گلدان‌ها برای استقرار بیمارگر آبیاری شدند.

در این آزمایش از بذر خالص سویا رقم ویلیامز (حساس به‌بیماری پوسیدگی زغالی) استفاده شد. ابتدا بذور سویا به‌مدت چهار دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. تعداد ۱۰ عدد بذر در گلدان‌هایی به ابعاد ۲۵×۲۰×۱۵ سانتی‌متر کاشته شد. هم‌زمان با کاشت بذر زادمایه جدایه‌های تریکودرما (دانه‌های گندم حاوی میسلیوم و کنیدیوم) نیز به‌گلدان‌های مربوط به‌میزان ۱۵ گرم در هر کیلوگرم خاک گلدان اضافه شد. برای تیمارهای بدون جدایه‌های تریکودرما فقط دانه‌های گندم سترون به‌همان نسبت به‌خاک گلدان‌ها اضافه شد. تمام گلدان‌های کشت شده در داخل گلخانه با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس در روز، ۲۰ درجه‌ی سلسیوس در شب، رطوبت نسبی ۷۰ درصد، شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار داده و هر دو روز یک‌بار آبیاری می‌شدند. طول نکروز (سوختگی) ساقه به‌عنوان شدت بیماری در تیمارهای مختلف از دو هفته پس از سبز شدن تا یک ماه انجام شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه‌ی میانگین‌ها و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

درصد کاهش بیماری (Disease Reduction) نیز با استفاده از فرمول DR%=(1-DT)/DC به‌دست آمد که در آن DT شدت بیماری در تیمار آلوده و DC شدت بیماری در تیمار شاهد می‌باشد (Sivan *et al.*, 1986).

نتایج

نتایج به‌دست آمده از تأثیر گونه‌های آنتاگونیست در کاهش بیماری پوسیدگی زغالی سویا در شرایط گلخانه نشان داد که اثر هر یک از عوامل آنتاگونیست، نوع کاربرد بیمارگر و نوع خاک به‌طور جداگانه و همچنین اثر متقابل بین عوامل آنتاگونیست و نوع کاربرد بیمارگر در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند. اثر متقابل بین عوامل آنتاگونیست و نوع خاک ، اثر متقابل نوع کاربرد بیمارگر و نوع خاک و اثر متقابل بین عوامل آنتاگونیست، نوع کاربرد بیمارگر و نوع خاک در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بودند.

مقایسه‌ی میانگین داده‌های به‌دست آمده از میزان شدت بیماری در تیمارهای مختلف نشان داد که جدایه‌های آنتاگونیست از نظر کاهش میزان بیماری با یکدیگر اختلاف داشتند، به‌طوری‌که گونه‌ی *T. harzianum* نسبت به *T. atroviride* موجب کاهش بیش‌تر بیماری در هر دو روش کاربرد بیمارگر شده است (جدول ۲). میزان شدت بیماری ایجاد شده توسط بیمارگر و همچنین میزان کاهش بیماری توسط جدایه‌های آنتاگونیست در هر دو نوع خاک سترون و غیرسترون متفاوت بود، به‌طوری‌که میزان کاهش بیماری در خاک غیرسترون بیش‌تر از خاک سترون بوده است. درصد کاهش بیماری به‌وسیله‌ی جدایه‌های تریکودرما در تیمارهای کاربرد بیمارگر در خاک نسبت به‌تیمارهای کاربرد بیمارگر در نوک ساقه بیش‌تر بود (جداول ۲ و ۳).

براساس نتایج به‌دست آمده، گونه‌ی *T. harzianum* در حضور بیمارگر در خاک‌های سترون و غیرسترون به‌ترتیب موجب کاهش بیماری در بوته های سویا به‌میزان ۶۲ و ۶۵ درصد در مقایسه با تیمار شاهد آلوده به‌بیمارگر بدون آنتاگونیست شد. گونه‌ی *T. atroviride* نیز در حضور

Archive of SID

www.SID.ir

بیمارگر در خاک‌های سترون و غیرسترون به‌ترتیب موجب ۵۹ و ۶۲ درصد کاهش بیماری در مقایسه با تیمار شاهد آلوده به‌بیمارگر بدون آنتاگونیست شد. همچنین تلفیق دو گونه تریکودرما با هم در همین شرایط به‌ترتیب ۶۶ و ۷۰ درصد بیماری را کاهش دادند (جدول ۳).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل جدایه‌های تریکودرما و نوع کاربرد بیمارگر، جدایه‌های تریکودرما و نوع خاک، نوع کاربرد بیمارگر و نوع خاک روی شدت بیماری پوسیدگی زغالی سویا.

Table 2. Mean comparisons of the effect of *Trichoderma* isolates and use of pathogen, *Trichoderma* isolates and soil type, use of pathogen and soil type on charcoal rot of soybeans severity.

Treatments	Disease Severity (%)
Trichoderma isolates × Pathogen application	
T0×M0	0 f
T1× M0	0 f
T2× M0	0 f
T3× M0	0 f
T0× M1	53.2 a
T1× M1	19.6 d
T2× M1	20.8 d
T3× M1	17.3 e
T0× M2	49.0 b
T1× M2	20.3 d
T0× M2	25.0 c
T1× M2	17.5 e
Trichoderma isolates × Soil type	
T0× S1	36.5 a
T1× S1	13.8 cd
T2× S1	16.0 c
T3× S1	12.2
T0× S2	31.5 b
T1× S2	12.7 d
T2× S2	14.5 cd
T3× S2	11.0 d
Pathogen application × Soil type	
M0× S1	0 c
M1× S1	29.3 a
M2× S1	29.6 a
M0× S2	0 c
M1× S2	26.2 b
M2× S2	26.3 b

میانگین‌ها با حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند (P<0.05).

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at P<0.05 level according to LSD test.

جدول ۳- اثر جدایه‌های تریکودرما روی شدت بیماری پوسیدگی زغالی سویا و درصد کاهش بیماری در خاک‌های سترون و غیرسترون.

Table 3. The effect of *Trichoderma* isolates on charcoal rot of soybeans severity and disease reduction in sterilized and non-sterilized soil.

Treatment	Disease Severity (%)	Disease Reduction (%)
T0×M0×S1	0 i	-
T1×M0×S1	0 i	-
T2×M0×S1	0 i	-
T3×M0×S1	0 i	-
T0×M1×S1	58.3 a	-
T1×M1×S1	22.3 fg	62bc
T2×M1×S1	24.2 ef	59c
T3×M1×S1	20.2 fgh	66ab
T0×M2×S1	54.8 b	-
T1×M2×S1	24.5 ef	56cd
T2×M2×S1	26.8 e	52d
T3×M2×S1	22.3 fg	60c
T0×M0×S2	0 i	-
T1×M0×S2	0 i	-
T2×M0×S2	0 i	-
T3×M0×S2	0 i	-
T0×M1×S2	49.8 c	-
T1×M1×S2	17.5 gh	65b
T2×M1×S2	19.4 fgh	62bc
T3×M1×S2	15.2 h	70a
T0×M2×S2	47.9 d	-
T1×M2×S2	20.4 fgh	58c
T2×M2×S2	22.7 fg	53d
T3×M2×S2	17.8 gh	63bc

میانگین‌ها با حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند (P<0.05).

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at P<0.05 level according to LSD test.

T0: بدون آنتاگونیست، T1: آنتاگونیست *T. harzianum*، T2: آنتاگونیست *T. atroviride*، T3: تلفیق آنتاگونیست‌های *T. harzianum* + *T. atroviride*، M0: بدون بیمارگر، M1: بیمارگر *M. phaseolina* در خاک، M2: بیمارگر *M. phaseolina* در نوک ساقه، S1: خاک سترون، S2: خاک غیرسترون.

T0: without antagonist, T1: *T. harzianum*, T2: *T. atroviride*, T3: *T. harzianum* + *T. atroviride*, M0: without pathogen, M1: *M. phaseolina* in soil, M2: *M. phaseolina* in stem tip, S1: sterilized soil, S2: non sterilized soil.

نتایج به‌دست آمده از تأثیر گونه‌های تریکودرما در القای مقاومت سویا به بیمارگر در تیمارهای کاربرد بیمارگر در نوک ساقه‌ی سویا نشان داد که گونه‌ی *T. harzianum* نسبت به‌گونه‌ی *T. atroviride* تأثیر بیش‌تری در القای مقاومت و کاهش بیماری داشته است. همچنین تأثیر تلفیق دو گونه تریکودرما با هم در مقایسه با تأثیر هرکدام به‌تنهایی

Archive of SID

www.SID.ir

بیش‌تر بوده است. برهمین اساس گونه‌ی *T. harzianum* در خاک‌های سترون و غیرسترون و در حضور بیمارگر در نوک ساقه به‌ترتیب موجب ۵۶ و ۵۸ درصد کاهش بیماری در بوته‌های سویا در مقایسه با تیمار شاهد آلوده به‌بیمارگر بدون آنتاگونیست شد. گونه‌ی *T. atroviride* در خاک‌های سترون و غیرسترون و در حضور بیمارگر در نوک ساقه به‌ترتیب موجب کاهش بیماری به‌میزان ۵۲ و ۵۳ درصد شد. همچنین تلفیق دو گونه تریکودرما با هم در همین شرایط به‌ترتیب ۶۰ و ۶۳ درصد بیماری را کاهش دادند (جدول ۳).

بحث

براساس نتایج به‌دست آمده، میزان کاهش بیماری پوسیدگی زغالی در هر دو روش آلوده‌سازی خاک و نوک ساقه با بیمارگر توسط جدایه‌های تریکودرما در خاک‌های غیرسترون بیش‌تر از خاک‌های سترون بوده است. این می‌تواند ناشی از وجود میکروارگانیزم‌های مفید در خاک‌های غیرسترون باشد که باعث بازدارندگی بیشتر فعالیت بیمارگر شده است. واصبی و همکاران (Vasebi *et al.*, 2012) با بررسی تأثیر جدایه‌ی T100 گونه‌ی *T.harzianum* روی بیماری پوسیدگی زغالی ناشی از *M. phaseolina* در گلخانه نشان دادند که این جدایه در حضور بیمارگر در خاک‌های سترون و غیرسترون به‌ترتیب موجب ۶۲/۵ و ۸۱/۸ درصد کاهش پوشش میکرواسکلروتی بیمارگر در سطح ریشه و ساقه سویا شد.

تأثیر مثبت گونه‌های تریکودرما در کاهش مرگ گیاهچه کنجد ناشی از *M. phaseolina* در شرایط گلخانه‌ای توسط El-Fiki *et al.* (2004) نشان داده شد.

اعتباریان (Etebarian, 2006)، نقش جدایه‌ی *T. harzianum* در کنترل بیولوژیک پوسیدگی زغالی خربزه ناشی از *M. phaseolina* را به اثبات رساند. در یک بررسی، قارچ *T. harzianum* با افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز، کیتیناز، پلی فنل اکسیداز و بتا-۱و۳-گلوکاناز موجب القای مقاومت سیستمیک و کنترل *M. phaseolina* شد. گووینداپا و همکاران (Govindappa *et al.*, 2010) و منتظرنیا و همکاران (Montazernya *et al.*, 2008) با بررسی اثر گونه‌های تریکودرما روی *M. phaseolina* نشان دادند که گونه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* سبب کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر در کشت متقابل شد. همچنین در آزمایش مایه‌زنی بذر با جدایه‌های تریکودرما، جدایه‌ی *T. harzianum* MKR115 بهترین اثر را در کاهش بیماری و سلامت گیاه داشت.

مقایسه‌ی میزان کاهش بیماری پوسیدگی زغالی با استفاده از جدایه‌های تریکودرما در دو روش آلوده‌سازی خاک و نوک ساقه با بیمارگر نشان می‌دهد که جدایه‌های تریکودرما در تقابل با بیمارگر در خاک نسبت به نوک ساقه تأثیر بیش‌تری در کاهش بیماری داشتند. این امر می‌تواند در اثر سازوکارهای مختلف مانند رقابت، مایکوپارازیتیسم و تولید آنتی‌بیوتیک توسط گونه‌های تریکودرما در تقابل مستقیم با بیمارگر در خاک باشد (Howell, 2003). فعالیت مایکوپارازیتی و آنتی بیوزی گونه‌ی *T. harzianum* در تقابل با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. ساختارهای فوق علاوه بر متوقف نمودن رشد بیمارگر موجب کاهش میزان بیماری می‌شود (Abdullah, *et al.*, 2008).

گونه‌های تریکودرما از فراوان‌ترین قارچ‌های خاک هستند که در محیط فراریشه گیاهان میزبان نیز یافت می‌شوند (Harman *et al.*, 2004). این گونه‌های قارچی رشد سریع و توانایی بالا در تولید اسپور داشته و آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی مانند سلولاز، کیتیناز، گلوکاناز، لیپاز، پروتئاز، پکتیناز و غیره و آنتی بیوتیک‌هایی مانند ویریدین، گلیوتوکسین و متابولیت ثانویه قارچی دیگر تولید می‌کنند (Lorito *et al.*, 1993; Harman & Kubicek, 1998).

گونه‌های تریکودرما با سازوکارهایی مانند مایکوپارازیتیسم، تولید آنتی بیوتیک، رقابت و القای مقاومت، موجب کنترل بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (Howell, 2003). مکانیزم های دفاعی در گیاهان به‌وسیله‌ی القاءکننده‌های گوناگون زنده و غیرزنده مانند عوامل آنتاگونیست القاء و به‌عنوان مولکول‌های پیام دهنده واسطه SAR منجر به‌افزایش بیان ژن‌های دفاعی کدکننده کیتیناز،

Archive of SID

www.SID.ir

بتا-۱و۳-گلوکاناز، پراکسیداز، ترکیبات فنلی و آنزیم‌های دخیل در سنتز فیتوآلکسین‌ها می‌شود (Govindappa *et al*., 2010).

گونه‌های تریکودرما در تعامل با گیاه میزبان، سطح ریشه را کلونیزه کرده و به‌داخل لایه‌های اپیدرم و کورتکس نفوذ کرده و باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند (Benitz *et al*., 2004; Harman *et al*., 2004). علاوه بر این همانند باکتری‌های ریزوبیوم، موجب القای مقاومت در گیاه در برابر بیمارگرها و افزایش سیستم دفاعی گیاه می‌شوند (Harman *et al*., 2004).

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش بیانگر توانایی دو جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. atroviride* در کاهش بیماری و القای مقاومت گیاه میزبان در برابر قارچ عامل بیماری پوسیدگی زغالی سویا *M. phaseolina* می‌باشد. بنابراین می توان از این جدایه های آنتاگونیست در مهار زیستی این بیماری خاکزاد استفاده کرد.

پیشنهادات

جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی در این تحقیق می‌توانند در مدیریت بیماری پوسیدگی زغالی سویا از راه کاهش زادمایه‌ی اولیه بیماری، کاهش شدت بیماری و همچنین القای مقاومت به‌گیاه میزبان در برابر این بیماری مؤثر باشند. از این رو بررسی مکانیزم‌های مؤثرکنترل، شناسایی متابولیت‌های ضد قارچی تولید شده توسط این آنتاگونیست‌ها و اثرات آن‌ها در تعامل آنتاگونیست - بیمارگر- گیاه میزبان در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای باید مورد بررسی دقیق قرار گیرد. از طرف دیگر ژن‌ها و پروتئین‌های مؤثر در القای مقاومت میزبان در برابر بیمارگرها و اثرات آن‌ها و همچنین امکان انتقال این ژن‌ها به‌گیاهان میزبان باید مورد بررسی قرار گیرد.

References

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

Adekunle, A.T., Ikotun, T., Florina, D.A. & Cardwell, K.F. 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.

Ahmed, A. S., Sanchez, C. P., & Candela, M. E. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology, 106: 817-824.

Ashrafizadeh, A., Etebarian, H.R. & Zamanizadeh, H.R. 2005. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of Fusarium wilt of melon. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 39-57 (In Persian with English summary).

Behboudi, K., Sharifi Tehrani, A., Hejaroud, Gh. & Zad, J. 2005. Antagonistic effects of *Trichoderma* species on *Phytophthora capsici,* the causal agent of pepper root and crown rot. Iranian Journal of Plant Pathology, 41: 345-362 (In Persian with English summary).

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. & Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249-260.

Chang, K.F., Hwang, S.F., Wang, H., Turnbull, G. & Howard, R., 2006. Etiology and biological control of Sclerotinia blight of coneflower using *Trichoderma* species. Plant Pathology Journal, 5: 15-19.

Archive of SID

www.SID.ir

El-Fiki, All., Mohamed, F.G., Hl-Deeb, A.A. & Khalifa, M.M.A. 2004. Some applicable methods for controlling sesame charcoal rot disease (*Macrohomina phaseolina*) under greenhouse conditions. Egypt Journal Phytopathology, 32: 87-101.

Etebarian, H.R. 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.

Govindappaa, M., Lokeshb, S., Raib, V.R., Naikc, V.R. & Raju, S.G. 2010. Induction of systemic resistance and management of safflower *Macrophomina phaseolina* root-rot disease by biocontrol agents. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43: 26-40.

Harman, G.E. & Kubicek, P.K. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis, Londan, pp. 1-393.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunictic, avirulant plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2: 43-56.

Heidari Faroughi, Sh., Etebarian, H. R. & Zamanizadeh, H.R. 2004. Evaluation of *Trichoderma* isolates for the biological control of *Phytophthora drechsleri* in glasshouse. Plant Pests and Diseases, 72: 113-134 (In Persian with English summary).

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: 4-10.

Jat, J.G. & Agalave, H.R. 2013. Antagonistic properties of *Trichoderma* species gainst oilseed-borne fungi. Science Research Reporter, 3: 171-174.

Khavasi, H., Rahnama, K, Sadeghi Pour, H. & Razavi, S.E. 2013. Impact of native *Trichoderma* species from kitchen garden farms on *Phytophthora nicotianae* pseudo-fungus. National Conference of Environmental Research, Hamadan, University of Shahid Mofateh (In Persian with English summary).

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

Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L. & Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology, 83: 302-307.

Montazernya, B., Rahnama, K., Barari, H. & Naeimi, Sh. 2008. Evaluation impact of *Trichoderma* species isolated from soybean crops against the causal agent of charcoal rot *Macrophomina phaseolina*. Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran (In Persian with English summary).

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

Nejhadnasrollah, F., Rahnama, K., Zafari, D., Sadravi, M., Nasrollahnejhad, S. & Vakilizarej, Z. 2009. Study on antagonistic ability of *Trichoderma* species on rapeseed stem white rot disease. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 16(1-B): 446-455.

Archive of SID

www.SID.ir

Norouzi, S., Rahnama, K., Rabbani nasab, H. & Taqi nasab, M. 2014. Evaluation of efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates in biological control of melon *Fusarium* wilt. Biocontrol in Plant Protection. 2(1): 43-55, (In Persian).

Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R. & Collado, I. G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews, 7(1): 89-123.

Sinclair, G.B. & Backman, P.A. 1993. Compendium of Soybean Diseases (Translated by Rajabi, A.). University Publication Center, Tehran, 392 pp. (In Persian with English summary).

Singh, R.D.N. & Kaiser, S.A.K.M. 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., Ucko, O. & Chet, I. 1986. *Trichoderma harzianum* and effective biocontrol agent of *Fusarium* spp. Microbial Communities in soil, 447 pp.

Vasebi, Y., Alizadeh, A. & Safaie, N. 2012. Biological Control of Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* Using *Trichoderma harzianum*. Agriculture knowledge and sustainable production, 22: 41-54 (In Persian with English summary).

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

Wrather, J.A. & Kendig, S.R. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. Plant Disease, 82: 247-250.

Archive of SID

www.SID.ir

Study on the efficiency of *Trichoderma* isolates in controlling charcoal rot disease of soybean caused by *Macrophomina phaseolina* under greenhouse conditions

Shaban Kia[1], Kamran Rahnama[2]

1. Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran
2. University of Agriculture Sciences and Natural Resources of Gorgan, College of Plant Production, Department of Plant Protection, Gorgan, Iran

Corresponding author: Shaban Kia, email: shabankia@gmail.com

Received: May, 05, 2015 4 (1) 1-10 Accepted: Jan., 30, 2016

Abstract

The charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* is the most common disease of soybean in many parts of the world. Because of the soil-born and high saprophytic nature of the fungus in the soil, lack of effective control of the disease and environmental contamination due to the application of chemical pesticides, beneficial microorganisms such as *Trichoderma* species can be used for biocontrol of plant diseases. In this study, two isolates of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* were studied in biocontrol of *M. phaseolina* and in the induction of plant resistance to pathogen under greenhouse conditions. The results showed that in treatments of soil inoculated with pathogen, *T. harzianum* isolate reduced the disease by 62 and 65 percent in sterile and non-sterile soil, respectively. The *T. atroviride* isolate reduced the disease by 59 and 62 percent in the sterile and non-sterile soil, respectively. The combination of two *Trichoderma* isolates reduced the disease by 67 and 70 percent, respectively. According to the results, in the treatment of soybeans inoculated with pathogen, *T. harzianum* isolate reduced the disease by 56 and 58 percent in sterilized and non-sterilized soil, respectively. The *Trichoderma atroviride* isolate reduced the disease by 52 and 53 percent in sterile and non-sterile soil, respectively. The combination of two *Trichoderma* isolates reduced the disease by 60 and 63 percent, respectively. *Trichoderma* isolates in the non-sterile soil were more effective in reducing disease. *Trichoderma* isolates in treatments of inoculated soil with the pathogen were more effective in reducing disease. *T. harzianum* isolate decreased the disease more than *T. atroviride* isolate in both methods that pathogen was used. The combining of two *Trichoderma* isolates also had a greater impact on the reduction of disease and resistance induction.

Keywords: biological control, charcoal rot, induction of resistance, *Trichoderma*

Archive of SID

www.SID.ir