

افزایش رشد گندم و کنترل بیولوژیکی *Pythium ultimum* Trow با آغشته کردن بذور گندم توسط استرینهای *Trichoderma harzianum* Rifai

ابراهیم پیغامی

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۸۰/۵/۷؛ تاریخ پذیرش: ۸۰/۹/۲۵

چکیده

افزایش رشد گندم با اصلاح خاک زراعی توسط تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) و سه استرین T-95، T-12B و T-12¹ آن مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت تا مشخص گردد که افزایش رشد در نتیجه اثر مستقیم تریکودرما بر رشد گیاه گندم بوده و یا تأثیر ثانوی مربوط به کنترل عامل پوسیدگی انتهای ریشه (*Pythium ultimum* var. *sporangiferum*) گندم می باشد. کاشت بذور گندم رقم های زراعی پابلندبوت^۲ و پاکوتاه اسلو^۳ روی غشاء سلوفن^۴ استریل که ترشحات پرگنه بیست و چهار ساعته قارچ تریکودرما نوع وحشی^۵ و سه استرین آن، کشت شده روی PDA در ظروف پتری به آن نشت می کرد حاکی از آن است که درصد جوانه زنی بذور گندم بر اثر این ترشحات در مقایسه با شاهد (بدون قارچ) بیشتر می باشد. در بررسی گلخانه ای، بذور گندم ارقام زراعی پابلند و پاکوتاه با سوسپانسیون قارچ تریکودرما نوع وحشی و سه استرین آن به غلظت ۱۰^۸ اسپور در هر میلی لیتر، آغشته در خاک زراعی آلوده به *P. ultimum* (CFU=۳۰۰) کاشته شد. درصد نوک ریشه های آلوده به عامل بیماری در گیاهان حاصله از بذور آغشته به انواع استرین در مقایسه با شاهد (بذور بدون آغشتگی به تریکودرما) و آغشته به نوع وحشی، کمتر

۳۱



۱ - سه استرین قارچ تریکودرما ضمن فرصت مطالعاتی در دانشگاه ایالت کلرادو در آمریکا و پژوهش در رابطه با کنترل بیولوژیکی در اختیار اینجانب قرار گرفت.

2- Butte

3- Oslo

4- Cellophane

5- Wilt type=TW

و اختلاف معنی دار بود. در این آزمایش کاربرد استرین های قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیکی عامل پوسیدگی انتهای ریشه گندم مؤثر بود. درصد قطعات ریشه آغشته به سه استرین تریکودرما بیشتر از شاهد (بذور گندم بدون آغشتگی به تریکودرما و استرین های آن) و نوع وحشی بود و اختلاف معنی دار وجود داشت. در آزمایش مربوط به اثر آغشته کردن بذور گندم با تریکودرما و کاشت آنها در خاک پاستوریزه بدون پاتوژن، وزن تر و خشک گیاهان حاصله از بذور آغشته با سه استرین و WT بیشتر از شاهد شد و اختلاف معنی دار با شاهد داشت. در این آزمایش مشخص گردید که افزایش رشد گندم در نتیجه اثر مستقیم تریکودرما بر رشد گیاه گندم امکان پذیر است.

واژه های کلیدی: ارقام زراعی گندم، عامل پوسیدگی انتهای ریشه، قارچ تریکودرما.

مقدمه

پوسیدگی انتهای ریشه توسط گونه های مختلف جنس *Pythium* در ایالت های مختلف آمریکا از جمله آریزونا، کالیفرنیا و کلرادو توسط لیف شیتس و همکاران (۱۱) و در ایران در گیاهان مختلف گزارش شده است (۳). مبارزه با عامل این بیماری روی گندم به روش های مختلف توسط کوک و همکاران (۷) توصیه شده است. *T. harzianum* Rifai با تولید ترشحات سلولی مایع و فرار خود و همچنین حالت میکوپارازیتسم و رقابت تغذیه ای عامل کنترل پاتوژن های خاکزی از جمله قارچ های فوزاریوم (۱)، فیتوفتورا (۲)، ریزوکتونیا (۴) می باشد. بنا به گزارش لور و همکاران (۱۴) افزایش رشد گندم و کنترل بیولوژیکی پی تیوم با آغشته کردن بذور گندم با پسودوموناد های فلورسنت^۱ امکان پذیر است. موضوع مورد بررسی در این پژوهش، آغشته کردن بذور گندم با نوع وحشی *T. harzianum* (با حروف WT در این طرح معرفی می شود) جدا شده از خاک زراعی در حومه شهر فورد کالینس^۲ آمریکا و سه استرین آن جهت بررسی اثر این قارچها در افزایش رشد گندم های حاصله از این

بذور و همچنین امکان بیوکنترل عامل پوسیدگی انتهای ریشه گندم توسط تریکودرما است.

مواد و روشها

تهیه قارچهای آنتاگونیست و عامل بیماری: در این بررسی *T. harzianum* از خاک زراعی حومه شهر فورت کالینز آمریکا با روش داوه و همکاران (۸) تهیه گردید. استرین *T. harzianum* (T-12) جدا شده توسط هارمن و همکاران (۹) از موسسه تحقیقات کشاورزی نیویورک، *T. (T-12B)* *harzianum* از موتواسیون *T. (T-12)* *harzianum* تهیه شد (۱۰) و همچنین (T-95) *T. harzianum* مقاوم به بنومیل (۹) مورد استفاده قرار گرفت. عامل پوسیدگی انتهای ریشه گندم (*Pythium ultimum* var. *sporangiferum*) توسط بیکر (۶) از مؤسسه بیماری های گیاهی و علفهای هرز دانشگاه ایالت کلرادو آمریکا در اختیار قرار گرفت.

تهیه ماده تلقیح پی تیوم در خاک: خاک زراعی نوم و شنی از مزارع اطراف شهر فورت کالینز از ایالت کلرادو آمریکا با pH= ۷/۵ انتخاب و جهت استفاده در آزمایشهای گنخانه ای از الکی به قطر ۴ میلی متر گذرانیده شد. پس از پاستوریزه کردن خاک مرطوب (با رطوبت ۱۵ درصد) در حرارت ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵



1- Flurrescent pseudomonads

2- Ford collins

زراعی آلوده به پیتیوم با $CFU=300$ با رطوبت ۱۵ درصد در گلدانهای سترون و سفالین به قطر ۱۰ سانتی متر کاشته و در گلخانه با حرارت حدود ۲۲-۲۶ درجه سانتی گراد با نور متناوب ۱۰ ساعت در شبانه روز نگهداری گردیدند. آبیاری پاششی هر روز یکبار (۵۰ میلی لیتر برای هر گلدان) و هفته ای یک روز با محلول غذایی KPN به نسبت هر کدام ۲۰٪ و به غلظت ۰/۵٪ (۱۳) انجام گرفت. در این آزمایش برای هر تیمار ۵ تکرار و در هر تکرار چهار بذر در گلدان کاشته و از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. مقایسه میانگین ها در سطح ۵ و ۱ درصد از طریق آزمون دانکن انجام گردید. بوته های گندم را بعد از ۴۰ روز کاشت از خاک زراعی توام با ریشه بعد از آبیاری برداشت نموده و نوک ریشه های آنها در محیط کشت انتخابی پیتیوم در ظروف پتری بطور جداگانه کشت داده شد.

جهت بررسی درصد قطعات ریشه آغشته به تریکودرما در این آزمایش، ریشه بوته های گندم را در تیمارهای مختلف با استفاده از اسکارپل استریل به قطعات ۵ میلی متر تقسیم کرده و در محیط کشت اختصاصی تریکودرما در ظروف پتری کشت داده شد. مقایسه میانگین ها از طریق آزمون دانکن در تیمارهای مختلف انجام گرفت.

روش بررسی اثر *T. harzianum* و استرین های آن بر رشد بوته های گندم: در این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی حاوی ۵ تیمار T-95, T-12B, WT و شاهد (بذور بدون آغستگی به تریکودرما و استرین های آن) و در هر تیمار پنج تکرار استفاده شد. واحد آزمایش یک گلدان حاوی نیم کیلو خاک زراعی پاستوریزه با رطوبت ۱۵٪ بود. در هر گلدان چهار بذر ضد عفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ و آغشته با سوسپانسیون اسپور 10^8 اسپور در هر میلی لیتر آب به اضافه پل جل به مقدار دو درصد (بذور به

دقیقه ۵)، در روی سکوی در آزمایشگاه جهت هوادهی و نکثیر میکروارگانیسمهای ساپروفیت در خاک پاستوریزه، به مدت یک هفته پخش شد. سپس خاک با افزایش آب، مرطوب (رطوبت ۱۵ درصد) و با سوسپانسیون زئوسپور پی تیوم که در محیط کشت انتخابی مایع (۱۲) کشت داده شده بود به مقدار $CFU=300$ مخلوط گردید.

بررسی تأثیر ترشحات *T. harzianum* و سه استرین آن به جوانه زنی بذور گندم: بذور گندم رقم پابلند بوت و پاکوتاه اسلو قبل از کاشت با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضد عفونی گردیدند. از کشت ۳ روزه تریکودرما و سه استرین آن به روی محیط کشت PDA در ظروف پتری، پلاکی به قطر ۵ میلی متر برداشته و در مرکز ظروف پتری محتوی محیط کشت استریل PDA، کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد از کشت پرده سلوفن استریل بر روی پرگنه قارچ تریکودرما و سه استرین آن در ظروف پتری قرار داده و سپس بذور ضد عفونی گندم به تعداد ۶ بذر در هر ظروف پتری بر روی پرده سلوفن کشت داده شد. در این آزمایش برای هر تیمار ۵ ظرف پتری در نظر گرفته شد.

روش بررسی درصد آلودگی نوک ریشه های گندم آلوده به پی تیوم در بذور آغشته به تریکودرما و همچنین درصد قطعات ریشه آغشته به تریکودرما: در این آزمایش بذور ضد عفونی شده ارقام گندم با هیپوکلریت سدیم، توسط کاغذ خشک کن سترون خشک و سپس با سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* و سه استرین آن با غلظت 10^8 اسپور در هر میلی لیتر آب با اضافه پل جل^۱ به عنوان ماده چسباندن به مقدار دو درصد آغشته گردید (بذور به عنوان شاهد تنها با پل جل آغشته شد). بذور حاصله در خاک

1- Palgcl



و بین شاهد و WT اختلاف معنی دار نبود (شکل ۲).

در آزمایش گلخانه ای مربوط به بررسی تأثیر آغشته کردن بذور گندم با سوسپانسیون اسپور تریکودرما با غلظت 10^8 اسپور در هر میلی لیتر آب در افزایش رشد رویشی گندم، نتیجه تجزیه واریانس و مقایسه میانگین وزن تر و خشک (شکل ۳) بوته های گندم حاصله از بذور گندم ارقام پاکوتاه و پابلند نشان داد که تریکودرما و استرین های آن بطور معنی دار موجب افزایش رشد رویشی می شود. همچنین وزن تر و خشک ساقه گندم حاصله از بذور آغشته به استرین T-12 و WT اختلاف معنی دار ندارند.

بحث

جدایه گونه های قارچ تریکودرما از خاکهای زراعی و ریزوسفر چند گیاه از جمله گندم، سیب زمینی (۲)، نخود (۱) دلالت بر وجود گونه های این قارچ در خاکهای زراعی است.

اثر جدایه های آنتاگونیست تریکودرما در رشد رویشی بوته های گندم حاکی از تجزیه مطلوب مواد آلی حیوانی و گیاهی در خاک زراعی و یا ترشح آنزیمها و هورمونهای رشد در این قارچهای است. نتایج حاصله در این طرح مؤید بررسی های انجام گرفته توسط کوک و همکاران (۷) می باشد. بررسیهای انجام گرفته توسط بیکر و همکاران (۶) حاکی از تولید توکسین های ویریدین و تریکودرمین، آنزیمهایی مانند کتیناز، سلولاز- آلفا ۱-۳، گلوکوناز و دیگر متابولیتها توسط گونه های آنتاگونیست تریکودرما بوده که در افزایش رشد گیاهان مؤثر هستند.

بررسیهای آزمایشگاهی و گلخانه ای در این طرح نشان می دهد که استرینهای گونه *T.harzicium* در کنترل بیولوژیکی عامل پوسیدگی انتهای ریشه گندم از لحاظ آماری مؤثر

عنوان شاهد تنها با پیل جل (آغشته شدند و در گلخانه با نور متناوب ۱۰ ساعت در شبانه روز و رطوبت نسبی ۷۵٪ در درجه حرارت حدود ۲۶ سانتی گراد نگهداری گردید. آبیاری مشابه آنچه در بند چهار بعمل آمد انجام گرفت. بوته های گندم، بعد از چهل روز کاشت از خاک زراعی توام با ریشه بعد از آبیاری برداشت شد و حد متوسط وزن خشک و تر آنها محاسبه گردید. جهت خشکاندن بوته ها از اتوکلاو خشک ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت پس از شستشوی ریشه و خشک نمودن آنها بوسیله کاغذ خشک کن استفاده شد.

نتایج

در بررسی آزمایشگاهی، نتیجه تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (جدول ۱) درصد جوانه زنی بذور استریل ارقام مختلف گندم در مورد کشت آنها روی غشاء سلوفن استریل که ترشحات پرگنه تریکودرما در آن نشست می کرد نشان داد که درصد جوانه زنی بذور گندم بر اثر این ترشحات بیشتر بوده و در مقایسه با شاهد (بذور روی سلوفن استریل قرار داده شده روی محیط کشت PDA در ظروف پتری) اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ دارد.

در بررسیهای گلخانه ای، درصد نوک ریشه های^۱ آلوده به پی تیوم در گیاهان حاصله از بذور آغشته با انواع استرین با مقایسه شاهد (بذور بدون آغشتهگی به سوسپانسیون تریکودرما) و WT بطور معنی دار کمتر بود (شکل ۱). در این آزمایش درصد نوک ریشه های آلوده به پی تیوم در تیمار شاهد و WT اختلاف معنی دار نداشت. همچنین درصد قطعات ریشه آغشته به زاد مایه استرین ها بیشتر از شاهد و WT مشاهده گردید

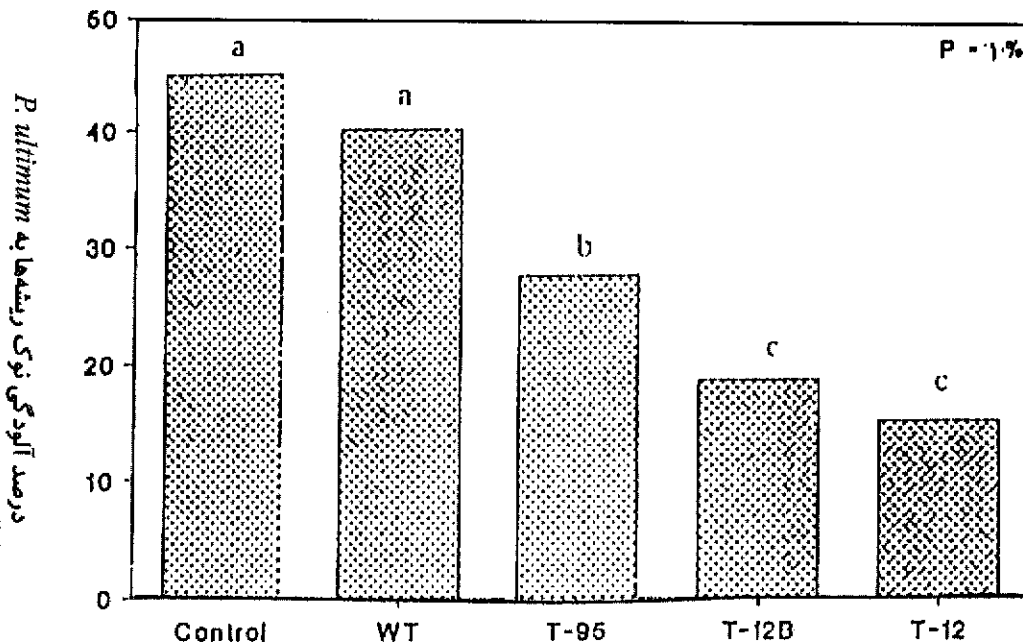
1- Root tips



جدول ۱- مقایسه میانگین درصد جوانه زنی بذور گندم در اثر ترشحات پرکنه تریکودرما و استرینها.

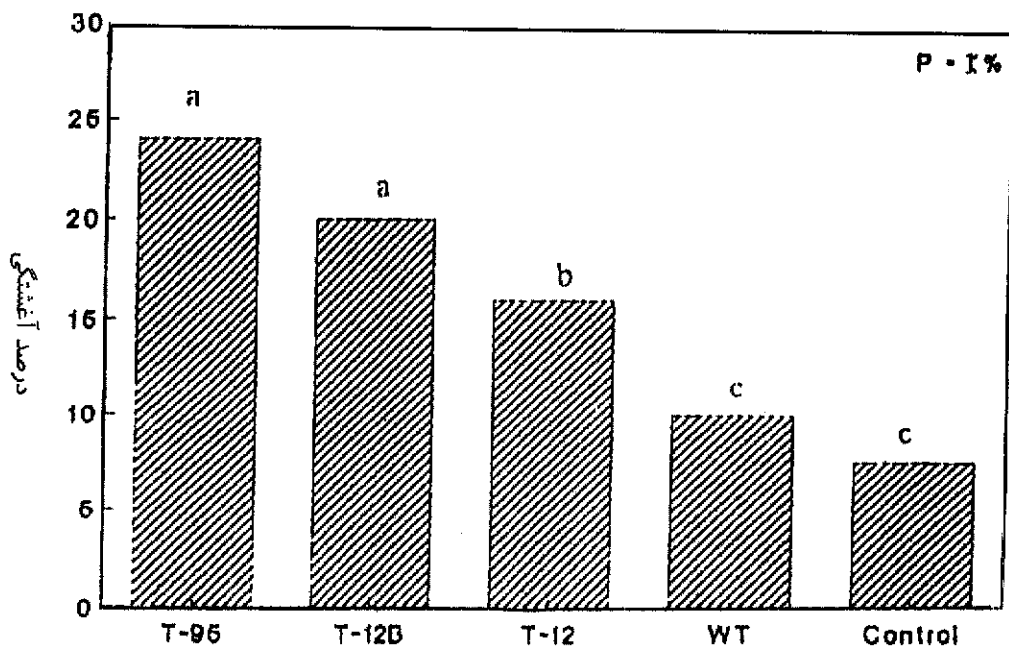
میانگین درصد جوانه زنی بذور گندم		نوع تیمار	
62a*		Control	شاهد
78b		<i>T. harzianum</i>	T-12
87c		<i>T. harzianum</i>	T-12B
84c		<i>T. harzianum</i>	T-95
91c		<i>T. harzianum</i>	WT

* تیمارهای با حروف متفاوت متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ از همدیگر دارند.

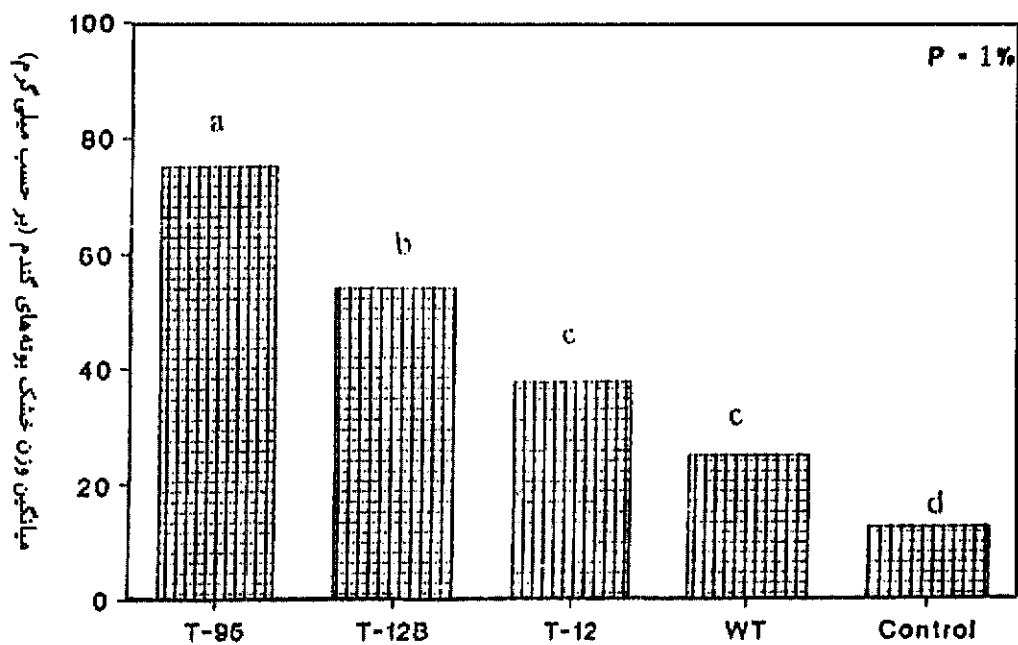


شکل ۱- درصد نوک ریشه های گندم آلوده به *P. ultimum* در پنج تیمار.*
تیمارهای با حروف متفاوت متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ از همدیگر دارند.





شکل ۲- درصد قطعات ریشه گندم آغشته به تریکودرما در پنج تیمار. * تیمارهای با حروف متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ از همدیگر دارند.



شکل ۳- اثر آغشته کردن بذور گندم به تریکودرما در حد متوسط وزن خشک بوته های گندم حاصله از آنها (بر حسب میلی گرم). * تیمارهای با حروف متفاوت اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ از همدیگر دارند.



کنترل پاتوژنهای خاکزی شوند، امکان اصلاح خاکهای زراعی و تقلیل خسارت بسیاری از پاتوژنهای خاکزاد به طریقه کنترل بیولوژیکی فراهم خواهد شد.

بوده در حالیکه نوع وحشی آن *T.harzianum* (WT) چندان کارساز نیست. در صورتی که بتوان بوسیله مهندسی ژنتیک یا به طریقی از قارچهای تریکودرما استرینهای جدید تولید کرد که ضمن افزایش رشد رویشی گیاهان موجب

منابع

۱. اخوت، م. کرمپور، ف. ۱۳۷۵. تأثیر چند جدا شده از قارچهای آنتاگونیست علیه پوسیدگی سیاه ریشه نخود (*Fusarium solani*) در شرایط گلخانه. مجله علوم کشاورزی. جلد ۲۷، شماره ۲، دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۴۵-۳۷.
۲. اخوت، م. حجارود، ق. روحانی، ح. ظفیری، د. ۱۳۷۲. بررسی اثر آنتاگونیست چند جدا شده *Trichoderma* روی *Phytophthora erythroseptica* عامل بیماری پوسیدگی صورتی غده سیب زمینی. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۵، شماره ۲، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۷۲-۶۱.
۳. ارشاد، ح. ۱۳۷۴. قارچهای ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۴. بازگیر، ع. ۱۳۷۰. بررسی اثر قارچ *Trichoderma* علیه *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی بذر. پایان نامه فوق لیسانس گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی تهران، ۱۸۰ صفحه.
5. Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. Academic Press. pp. 100-103.
6. Baker, R. and W.C. Snyder, 1989. Rhizosphere mycoflora of Potato, Prelude to biological control. Plant Dis. pp. 419-425.
7. Cook, K.J. and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogen, APS press. 539pp.
8. Davet. P., 1979. Technique pour L analyse des population de *Trichoderma* et de *Cliocladium virens* dans le soil. Annuaire phytopatology, 14, 529-533.
9. Harman, G.F. and Y. Hadar. 1983. Biological control of *Pythium* sp. Seed Sci. Technol. 11: 893-944.
10. Harman, G.E., I. Chet and R. Baker. 1980. *Trichoderma hamatum* effect on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. Phytopattology 70. 1167-1172.
11. Lifshitz, R.. and R. Baker. 1984. A new species of *Pythium* isolated from soil in Colorado. Mycotaxon 2: 33-379.
12. Lumsden, R.D., W.A. Ayers and R.L. Dow. 1975. Different isolation of *Pythium* spp. by mean of selective media. Can. J. Microbiol. 21:606-612.
13. Paulitz, T.C., C.S. Park and R. Baker. 1987. Biological control of Fusarium wilt of cucumber with non pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. Can. J. Microbiol, 33:349-353.
14. Weller, D.M. and R. Cook. 1986. Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads and implications of *Pythium* control. Can. J. Plant Pathol. 8: 328-334.



Increased growth of wheat and biocontrol of *Pythium ultimum* Trow with strains of *Trichoderma harzianum* Rifai

E. Paygami

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Increased growth of wheat resulting from amendment of soil with strains of *Trichoderma harzianum* was investigated to determine if increased growth could be attributed to a direct effect of these *Trichoderma spp.* on the plant or a secondary effect due to control of plant pathogens. Three strains of *T. harzianum* (T.95, T-12B and T-12) and its parents wild type (WT, isolated from a soil in Fort Collins) were grown on PDA. After 24h. sterile and washed cellophane membrane was placed on the growing mycelium. Seeds of wheat cv. Oslo (dwarf) and Butte (tall) were surface sterilized and placed on the membrane. The percentage of germination of seeds on the cellophane were more than the control (without *T. harzianum*). This experiment revealed that the exudates of *T. harzianum* stimulated the germination of seeds. In the greenhouse experiments, wheat seed cvs Oslo and Butte treated with suspension of 10^8 spores per ml. the strains of *T. harzianum* and type (WT), were sown in the soil infected with *P. ultimum* (300 CFU). The percentage of the infected root tips of the plants resulted from treated seeds was fewer than those of the control and wild type. The percentage of root pieces colonized by the propagules of the strains was more than the wild type. The fresh and dry weights of plants resulting from the seeds that have been treated with the *T. harzianum* were higher than the control. These experiments explore the possibility of biocontrol of some soil-borne plant pathogenic fungi with strains of *T. harzianum* and increased growth response.

Keywords: *Pythium ultimum*; *Trichoderma harzianum*; wheat cvs Oslo and Butte.

