مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره پنجم، آذر ـ دی ۱۳۸٦
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

بررسی امکان کنترل بیولوژیکی قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (عامل بیماری مرگ نارون) توسط دو گونه قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* و*T. virens* در شرایط آزمایشگاهی

میرمعصوم عراقی[۱]، *کامران رهنما[۲]، دوستمراد ظفری[۳] و میثم تقی نسب[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینای همدان،
[٤]مربی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۵/۹/٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٦/۲/۱۷

چکیده

اثـر آنتاگونیسـتی ٤ جدایـه Th1 , Th2 , Th3و Th4 قـارچ *Trichoderma harzianum* و ۲ جدایـه Tv1 و Tv2 قارچ *T.virens* جدا شده از خاک برروی جدایه ONU5 قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (عامل بیماری مرگ هلنـدی درختـان نـارون) در شـرایط آزمایشـگاهی مـورد بررسـی قـرار گرفـت. بـدین‌منظـور مکانیسـم‌هـای آنتاگونیسـتی مختلـف نظیرمایکوپارازیتیسم، قدرت رقابت تغذیهای، قدرت کلونیزاسیون، تأثیر متابولیت‌های ترشحی خارج سـلولی فـرار و غیرفـرار جدایه‌های مزبور روی جدایه ONU5 قارچ *O.novo-ulmi* مورد آزمایش قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپی نشان داد که تمامی جدایه‌های فوق از طریق رفتارهای مایکوپارازیتیسم باعث اختلال رشد و بد شکلی ریسه شده‌اند. نتایج حاصل نشان داد که جدایه های مختلف قارچ تریکودرما از نظر مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی روی قارچ عامل بیماری بسیار متفاوت عمل می کنند. از میان ٦ جدایه فوق الذکر، جدایه Tv2 با بیشترین میزان سرعت رشد در کشت دوطرفه با قارچ عامـل بیمـاری، از نظر رقابت تغذیه‌ای بهتر از سایرین عمل کرد، به‌طوری که پس از ٤ روز کل سطح محیط کشت و پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری را پوشانید. جدایه Th3 نیز از نظر قدرت کلونیزاسیون و اسـپورزایی روی کشـت ۳ روزه قـارچ عامـل بیمـاری بهتـر از بقیـه جدایهها عمل نمود. در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه Tv1 به‌ترتیب با ۹۲/۷٤ و ۵۸/۷۵ درصـد بیشـترین تـأثیر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری را داشته است. امکان بکارگیری این جدایه‌ها برای کنترل بیولوژیکی علیه قارچ عامل بیماری مرگ نارون قابل بحث می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیماری مرگ نـارون، کنتـرل بیولـوژیکی، *Ophiostoma novo-ulmi* , *Trichoderma harzianum* و *T. virens*.

* – مسئول مکاتبه: kamran_ra@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

درخت نارون با دارا بودن قامتی بلند دارای زیبایی قابل ملاحظه‌ای بوده و به دلیل خصوصیات مفیدش از دیرباز در زمینه‌های مختلف اعم از صنعتی و زینتی مورد استفاده قرار گرفته است (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۲). بیماری مرگ هلندی نارون[1] یکی از مهمترین، زیانبارترین و مخربترین بیماری‌های آوندی این درختان در نیمکره شمالی محسوب می‌شود (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱). این بیماری تاکنون با از بین بردن میلیون‌ها درخت نارون در اروپا و آمریکای شمالی موجب بیلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی شده است (سینکلیر و کامپانا، ۱۹۷۸). امکان انتشار عامل بیماری به وسیله سوسک‌های پوستخوارخانواده *Scolytidae* این بیماری را از خیلی از بیماری‌های مشابه متمایز می‌کند. در یک قرن گذشته، انتشار سریع عامل بیماری به مناطق دوردست از یک سو و حساسیت ارقام مختلف نارون از سوی دیگر، به‌ترتیب در دهه ۱۹۱۰ و ۱۹٤۰ باعث بروز دو اپیدمی با درجات شدت مختلف شده است (بریزیر، ۱۹۹۰). اپیدمی اول مربوط به گونه غیرمهاجم *Ophiostoma ulmi* با شدت بیماریزایی کمتر و اپیدمی بعدی مربوط به گونه مهاجم با نام *O. novo-ulmi* با شدت بیماریزایی بیشتر می‌باشد (بریزیر، ۱۹۹۱). بریزیر جدایه‌های با منشأ اروپایی را به نام نژاد اروپا-آسیایی (اوراسیایی) و جدایه‌های با منشأ آمریکای شمالی را به نام نژادهای آمریکای شمالی نامید (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱؛ بریزیر و کیرک، ۲۰۰۱). اخیراً گونه سومی به نام *O. himal-ulmi* در ارتباط با بیماری مرگ درختان نارون در هیمالیا یافت شده است که یک بیماری اندمیک در این ناحیه محسوب می شود (بریزیرومهروترا، ۱۹۹۵). اعتقاد بر اینست که این بیماری از چین منشأ گرفته و سپس طی جنگ جهانی اول به اروپا و آمریکای شمالی راه پیدا کرده است (بریزیر، ۱۹۹۰).

تاریخچه پیدایش بیماری در ایران به درستی معلوم نیست، زیرا تا قبل از سال ۱۳۳۸ (۱۹٦۰) نامی از این بیماری در نشریات ایران برده نشده است ولی بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۳۸ در جنگل‌های گلستان و در ارتفاعات پایین کرنفکتر و کندسکوی بر روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد و بعد در بقیه نواحی جنگلی و حتی فضای سبز شهری گسترش یافت (رهجو و همکاران، ۲۰۰۰). گونه جدید عامل بیماری نه تنها باعث زوال شدید درختان نارون شده است، بلکه به گونه جدیدی از درختان جنگلی در شمال کشور به نام آزاد با نام علمی *Zelkova carpinifolia* نیز حمله کرده است و این اولین گزارش رسمی از وجود بیماری مرگ درختان آزاد در استان گلستان می‌باشد (رهنما و طاهری، ۲۰۰٤). با توجه به اهمیت بسیار زیاد بیماری تاکنون روش‌های متعددی برای کنترل بیماری بکار گرفته شده است که می‌توان به استفاده از حشره‌کش‌ها جهت کاهش ناقل بیماری (کات برت و همکاران، ۱۹۷۳)، تیمار خاک برای جلوگیری از انتقال عامل بیماری از طریق پیوند ریشه‌ای (نیلی و هیملیک، ۱۹٦۵). استفاده از قارچکش‌های سیستمیک (استیپز، ۱۹۷۵؛ لانیر، ۱۹۸۷)، ریشه‌کنی درختان آلوده یا هرس اندام‌ها و شاخ و برگ آلوده درختان (مارسدن، ۱۹۵۲)، معرفی و استفاده از ارقام مقاوم (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۲) و روش‌های بیولوژیکی (برنیر و همکاران، ۱۹۹٦؛ سولا و جیل، ۲۰۰۳) اشاره کرد. از یک طرف، افزایش بی‌رویه مصرف آفتکش‌ها و مشکلات زیست محیطی تیمارهای شیمیایی بر علیه قارچ و ناقلین حشره‌ای و از سوی دیگر هزینه‌های بسیار بالای تهیه ارقام مقاوم درختان نارون در مقایسه با نهال‌های مشابه و یا محصولات زراعی، زمان بر بودن روش‌های اصلاح مقاومت و از همه مهمتر خطر شکستن مقاومت در برابر نژادهای مختلف عامل بیماری، سبب گردیده تا محققین اهمیت کنترل بیولوژیکی را بیشتر مدنظر قرار دهند (رهنما، ۱۳۷۵؛ بیکر و کوک، ۱۹۷٤). گونه‌های بسیار زیادی از باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌ها

1- Dutch elm disease

Archive of SID

www.SID.ir

خاصیت آنتاگونیستی نسبت به عامل بیماری مرگ نارون تحت شرایط آزمایشگاه یا در شرایط گیاه نشان داده‌اند که می‌توان به‌موارد زیر اشاره کرد: استرین‌هایی از *Streptomyces albovinaceus* و *S.griseus* (ابراین و همکاران، ۱۹۸٤)، استرین‌هایی از باکتری *Pseudomonas syringae* (مایرز و استروبل، ۱۹۸۳)، *P. fluorescens* (موردک و همکاران، ۱۹۸٤)، *P.maltophilia* (گرگوری و همکاران، ۱۹۸٦)، تأثیر باکتری *Bucillus subtilis* (شریبر و همکاران، ۱۹۸۸)، تحریک نهال با جدایه غیر بیماری‌زا قارچ *erticillium dahliae* (الگرسما و همکاران، ۱۹۹۳؛ سولا و جیل، ۲۰۰۳؛ وتن، ۲۰۰۳)، *Phaeotheca dimorphospora* (برنیر و همکاران، ۱۹۹٦)، *Trichoderma viride* و *T. harzianum* (ریکارد، ۱۹۸۱ و۱۹۸۳).

همچنین ترکیبی از قارچ *T. viride* و *Scytallidium* sp. که دارای یک ترکیب ضد قارچی به‌نام Scytalidin است، بطور مشابهی به کار گرفته شده است (شفر و استروبل، ۱۹۸۸). به‌طور کلی گونه‌های تریکودرما جزء قارچ‌هایی هستند که از آنها به‌عنوان عوامل بیوکنترل تجاری استفاده می‌شود. تنوع در مکانیسم‌های موجود در گونه‌های تریکودرما برای توقف بیمارگرها، این قارچ را به‌عنوان عامل بیوکنترلی مطلوب مطرح می سازد (پاپاویزاس، ۱۹۸۵؛ ساموئل، ۱۹۹٦). در ایران تاکنون مطالعات انجام شده توسط گونه‌های تریکودرما فقط روی قارچ‌های بیماریزای مهم در کشاورزی مانند انواع فوزاریوم‌ها بوده است (پیغامی و نیشابوری، ۱۹۹۱؛ پیغامی، ۱۹۹۲؛ رهنما و همکاران، ۲۰۰۵). لذا نظر به اهمیت بیماری‌های جنگلی و به ویژه بیماری مرگ هلندی نارون، هدف از انجام این مطالعه بررسی امکان کنترل بیولوژیکی قارچ *O. novo-ulmi* (عامل جدید بیماری مرگ نارون) توسط دو گونه قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. virens* در شرایط آزمایشگاهی و بررسی رفتارهای مختلف آنتاگونیستی جدایه‌های این دو گونه برروی عامل بیماری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) قارچ‌های بیمارگر و آنتاگونیست: برای انجام این طرح از یک جدایه قارچ عامل بیماری *Ophiostoma novo-ulmi ssp. novo-ulmi* که قبلاً از روی اوجا جداسازی شده بود و بیشترین سرعت رشد شعاعی را در بین جدایه‌ها داشت (رهنما، ۲۰۰۳) و ٦ جدایه مربوط به دو گونه قارچ *T. harzianum* (٤ جدایه) و *T. virens* (۲ جدایه) جداسازی شده از خاک (که از کلکسیون قارچ بخش گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینای همدان دریافت گردید) که با استفاده از منابع معتبر (ریفایی، ۱۹٦۵؛ گمس و بیست، ۱۹۹۸) شناسایی و تأیید شدند مورد استفاده قرار گرفت (ظفری و همکاران، ۲۰۰۲). برای خالص‌سازی جدایه‌ها نیز از روش تک اسپور کردن بر روی محیط کشت آب-آگار (WA) استفاده شد. پس از اطمینان از خلوص جدایه‌ها، بر روی محیط کشت PDA منتقل و برای انجام آزمایش‌های بیولوژیک در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند.

ب) بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه های تریکودرما روی هیف‌های قارچ بیمارگر: برای انجام این آزمایش ابتدا داخل هر ظرف پتری نه سانتی‌متری سترون، یک لام سترون قرار داده و سپس ۱۵- ۱۰ میلی‌لیتر محیط PDA ریخته به‌طوری که لایه‌ای نازک از محیط کشت روی لام را بپوشاند. بعد از منعقد شدن محیط، یک دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه جدایه ONU5 قارچ بیمارگر و یک دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه هر کدام از جدایه‌های قارچ تریکودرما در دو طرف لام کشت داده شد. در تیمارهای شاهد نیز از کشت جدایه بیمارگر با یک دیسک ۵ میلی‌متری از محیط کشت فاقد قارچ آنتاگونیست استفاده شد. برای هر جدایه تریکودرما ٤ تکرار در نظر گرفته شد. ظروف پتری پس از کشت به انکوباتور منتقل و در دمای ۱± ۲٤ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ٤۸ و ۷۲ ساعت که هیف‌های قارچی رشد کردند، اقدام به بررسی نحوه تأثیرجدایه های تریکودرما در رشد و مورفولوژی هیف‌های قارچ بیمارگر زیر میکروسکوپ شد.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- کنیدی و کنیدیوفورهای گونه *Trichoderma virens* (X۱۰۰۰).

ج) بررسی رقابت تغذیه‌ای جدایه‌های تریکودرما در کشت متقابل با قارچ بیمارگر: به‌منظور مقایسه قدرت رقابت تغذیه‌ای جدایه های مختلف تریکودرما با قارچ بیمارگر، از کشت دو طرفه (Dual Culture) استفاده شد. بدین‌ترتیب که یک دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه جدایه ONU5 قارچ بیمارگر و یک دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه هر کدام از جدایه‌های قارچ تریکودرما در دو طرف ظرف پتری حاوی PDA کشت داده شدند. برای هر جدایه ٤ تکرار در نظر گرفته شد. در تیمارهای شاهد نیز از کشت جدایه بیمارگر با یک دیسک ۵ میلی‌متری از محیط کشت فاقد قارچ آنتاگونیست استفاده شد. ظروف پتری پس از کشت به انکوباتور منتقل و در دمای ۱± ۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان سرعت رشد روزانه جدایه قارچ بیمارگر در کشت متقابل با جدایه های تریکودرما در مقایسه با کشت شاهد محاسبه شد.

د) بررسی قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه های تریکودرما روی پرگنه قارچ بیمارگر: برای این منظور یک دیسک ۵ میلی‌متری از هر جدایه تریکودرما به وسط کشت ۳ روزه قارچ بیمارگر منتقل و در دمای ۱±۲٤ در انکوباتور نگهداری شدند. با انجام بازدیدهای روزانه قدرت کلونیزاسیون جدایه‌های تریکودرما بدست آمد. همچنین به منظور مقایسه میزان اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما بر روی کشت ۳ روزه جدایه بیمارگر، اقدام به تهیهٔ لام میکروسکوپی از ناحیه کلونیزاسیون و شمارش آنها با بزرگنمایی X۱۰۰۰ در زیر میکروسکوپ گردید. این آزمایش با ٤ تکرار و۱۰ مشاهده برای هر ظرف پتری انجام شد. داده های بدست آمده نهایتاً مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

هـ) بررسی اثر ترکیبات فرار (Volatile metabolites) جدایه های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: این آزمایش در ٤ حالت و به شرح زیر انجام گرفت:

۱- کشت همزمان *O. novo-ulmi* با تریکودرما

۲- کشت تریکودرما ۲٤ ساعت قبل از *O. novo-ulmi*

۳- کشت تریکودرما ٤۸ ساعت قبل از *O. novo-ulmi*

٤- کشت تریکودرما ۷۲ ساعت قبل از *O. novo-ulmi*

در این آزمایش ازروش پتری‌های روی هم استفاده گردید، به‌طوری که ظروف پتری حاوی قارچ بیمارگر در بالا و ظروف پتری حاوی جدایه‌های آنتاگونیست در پایین قرار گرفتند. دور ظروف پتری روی هم قرار گرفته با پارافیلم بخوبی مسدود شد تا ارتباط دو پتری با محیط خارج کامل قطع شده و از خروج ترکیبات فرار به خارج جلوگیری گردد. در تیمارهای شاهد نیز به جای استفاده از جدایه‌های تریکودرما (در پتری پایینی) از دیسک حاوی محیط کشت PDA استفاده شد. پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۱± ۲٤ نگهداری شده و به فواصل زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت اقدام به اندازه گیری قطر پرگنه در تیمارهای

Archive of SID

www.SID.ir

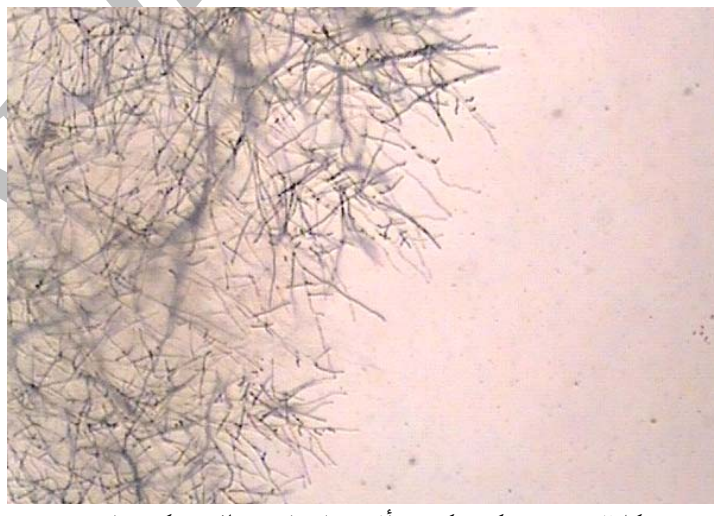
مختلف و مقایسه آنها با تیمار شاهد گردید. نهایتاً درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه $X=\frac{A-B}{A}\times 100$ محاسبه گردید. در این رابطه X- درصد بازدارندگی، A- قطر رشد پرگنه در پتری شاهد و B- قطر رشد پرگنه در هر یک از تیمارها می باشد. این آزمایش در قالب طرح اسپیلت پلات در زمان با چهار تکرار انجام گردید.

و) بررسی اثر ترکیبات غیرفرار (Culture filtrate): جدایه های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: پس ازکشت جدایه‌های تریکودرما به‌صورت چهار دیسک ۵ میلی‌متری در داخل ارلن های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB فاقد آنتی بیوتیک و نگهداری بر روی شیکر با ٦٠ تکان در دقیقه به‌مدت ۱۰ روز وعصاره‌گیری با استفاده از کاغذ صافی میکروبیولوژیکی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون، محیط کشت‌های PDA حاوی رقت های ۵، ۱۵، ۲۵و۵۰ درصد از عصاره فیلتر شده تهیه و سپس اقدام به کشت دیسک‌های ۵ میلی‌متری از قارچ بیمارگر گردید. پتری ها در دمای ۱± ۲٤ درجه‌سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت اقدام به اندازه گیری قطر رشد پرگنه قارچ بیمارگر شد و درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از رابطه $X=\frac{A-B}{A}\times 100$ بدست آمد.

تمام آزمایش‌ها بجز آزمایش ترکیبات فرار از نوع فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. آزمایش ترکیبات فرار نیز از نوع اسپیلت پلات در زمان در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SAS استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها نیز با آزمون ال. اس. دی و در دو سطح احتمال $\alpha=$ ۰/۰۵ و $\alpha=$ ۰/۰۱ انجام گرفت.

نتایج

الف) بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه های تریکودرما روی هیف‌های قارچ بیمارگر: بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که جدایه‌های مختلف تریکودرما با ایجاد تغییر شکل، تورم و خمیدگی انتهای هیف و واکئوله کردن باعث کاهش رشد قارچ عامل بیمارگر شده، اما اثری از نفوذ مستقیم هیف مشاهده نشد (شکل‌های ۲، ۳ و ٤).

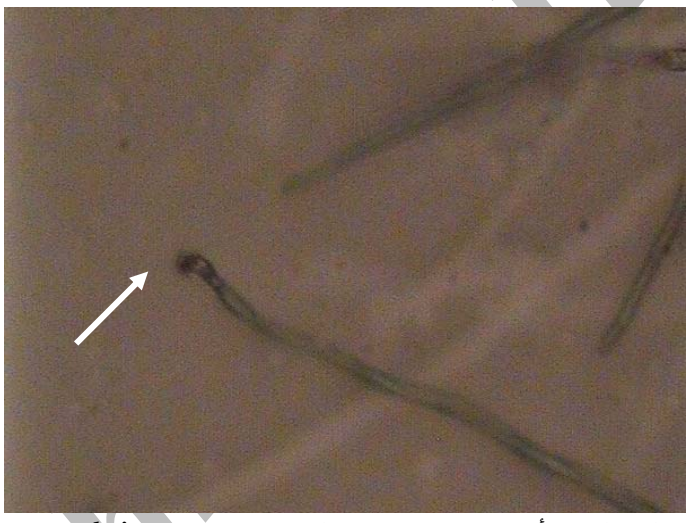


شکل۲- بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی هیف‌های *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۷۲ ساعت (X۱۰۰).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۳- بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی هیف‌های *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۷۲ ساعت (X٤٠٠) (فلش‌ها پیچش، دفورمه شدن، تورم و خمیدگی‌های هیفی قارچ عامل بیماری را نشان می‌دهند).

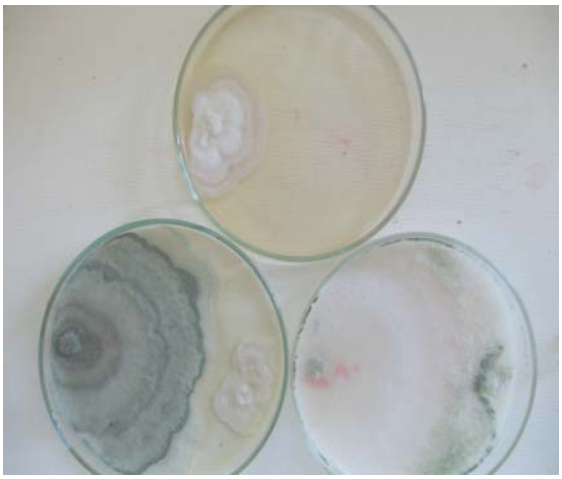


شکل ٤- بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی ریسه‌های *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۷۲ ساعت (X١٠٠٠) (فلش خمیدگی انتهای ریسه را نشان می‌دهد).

ب) بررسی رقابت تغذیه‌ای جدایه‌های تریکودرما در کشت متقابل با قارچ بیمارگر: در این آزمایش مشخص شد که تمام جدایه‌های تریکودرما بعد از رشد و برخورد با پرگنه‌های قارچ بیماری‌زا مانع رشد و توسعه آن شده سپس شروع به پیشروی و کلونیزاسیون و اسپورزایی روی هیف‌های عامل بیماری‌زا کردند ولی در این میان دو جدایه Tv2 و Th3 بیشترین و جدایه Th4 کمترین سرعت رشد و رقابت تغذیه‌ای را داشتند (شکل ٥). از میان ٦ جدایه بکار رفته، جدایه Tv2 بیشترین سرعت پیشروی و رشد را از خود نشان داد به‌طوری‌که پس از ٥ روز به‌طور کامل سطح پرگنه قارچ بیمارگر را پوشاند (شکل ٦). میزان سرعت رشد روزانه جدایه قارچ بیمارگر در کشت متقابل با جدایه‌های تریکودرما در مقایسه با کشت شاهد نیز محاسبه گردید (جدول ١).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۵- مقایسه قدرت رقابت تغذیه‌ای دوجدایه *T. virens*2 (سمت راست، پایین) و Th4 (سمت چپ، پایین) با جدایه ONU5 عامل بیمارگر در کشت متقابل، با کشت شاهد (بالا) پس از ۵ روز بر روی محیط کشت PDA.

شکل٦- قدرت رقابت تغذیه‌ای و کلونیزاسیون جدایه *T. virens*2 (سمت چپ) بر روی قارچ عامل بیمارگر (سمت راست) در کشت متقابل پس از ۵ روز بر روی محیط کشت PDA.

جدول ۱ - مقایسه میانگین سرعت رشد قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (NOU5) در کشت متقابل با جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما *T. virens*(Tv) و *T. harzianum*(Th) .

جدایه	قطر رشد کلونی پس از ٦ روز (میلی‌متر)*
شاهد (NOU5)	۳۹/۲۵**a
Th4/ NOU5	۲٤/۲۵b
Th2/ NOU5	۲۱/۷۰bc
Th1/ NOU5	۲۰/۵۰bc
Th3/ NOU5	۱۹/۵۰c
Tv1/ NOU5	۱۹/۵۰c
Tv2/ NOU5	۱۹/۲۵c
LSD(α=۰/۰۵)	۳/۹۸

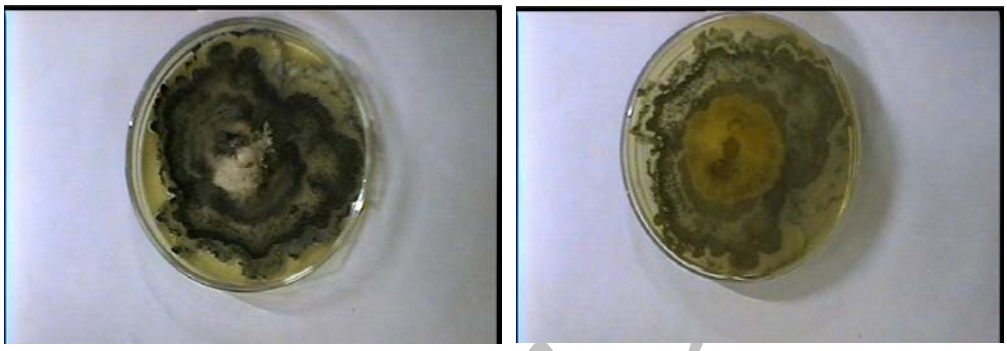
*داده‌ها مربوط به میانگین ٤ تکرار می‌باشد.

** حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

ج) بررسی قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما روی پرگنه قارچ بیمارگر: از بین جدایه‌های مورد آزمایش جدایه Th3 و Th4 نسبت به بقیه جدایه‌ها از قدرت بیشتری برخوردار بود و پس از ۵ روز تمام پرگنه عامل بیماری را پوشانده و به شدت اسپورزایی کرده بود (شکل ۷). جدایه Tv2، Tv1 و Th4 پس از ۷ روز تمام پرگنه عامل بیماری را پوشانده و بقیه جدایه‌ها حتی پس از ۱۰ روز نیز ضعیف عمل کردند. مقایسه میزان اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما برروی کشت ۳ روزه جدایه بیمارگر نیز نشان داد که جدایه Th3 بیشترین میزان اسپورزایی را در میان جدایه‌ها دارد (جدول ۲).



شکل۷ – نمایش قدرت کلونیزاسیون جدایه Th3 روی پرگنه قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۵ روز.

جدول ۲– مقایسه میزان اسپورزایی جدایه های تریکودرما بر روی کشت ۳ روزه قارچ *Ophiostoma novo-ulmi*.

تیمار	تعداد اسپور*
Th3	٦٩٩/٤٧**a
Th4	٦٩٢/٦٠a
Th2	٤٣٢/٠٧b
Th1	٤٠١/٣٠b
Tv1	٢١٠/٧٠cd
Tv2	٢٠٠/٣٥d
LSD (α=٠/٠٥)	٦٥/٧٢

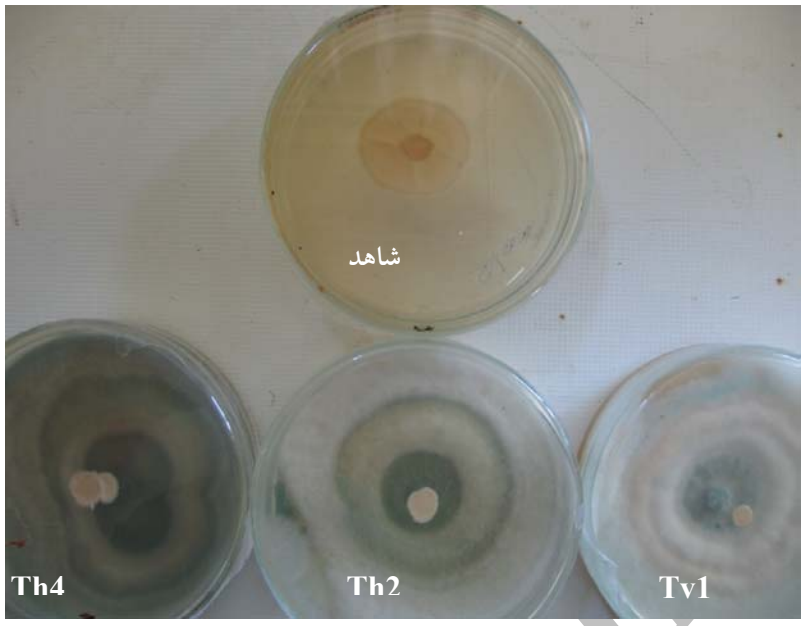
* شمارش شده در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی X٤٠٠.

** داده‌ها مربوط به میانگین۱۰ مشاهده و ۳ تکرار می‌باشد

د) بررسی اثر ترکیبات فرار (Volatile metabolites) جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: در این آزمایش مشخص شد که از میان ٦ جدایه بکار رفته تنها سه جدایه Tv1، Th2 و Th4 در حالی که ۷۲ ساعت زودتر از عامل بیمارگر کشت شدند بهتر عمل کرده و در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دارند (جدول ۳). سه جدایه دیگر فعالیت آنتی بیوز بسیار کمتری در این آزمایش از خود نشان دادند. بیشترین میزان کنترل در این حالت نیز مربوط به Tv1 بوده که به میزان ۹۲/۱درصد از رشد قارچ بیمارگرجلوگیری کرد (شکل۸).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۸ – تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های مختلف تریکودرما (Th) *T.harzianum* و (Tv) *T.virens* در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *O. novo-ulmi* (کشت ۷۲ساعته).

جدول ۳- تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های مختلف تریکودرما در جلوگیری از رشدپرگنه قارچ *O.novo-ulmi* (قارچ بیماری‌زا در معرض کشت ۷۲ ساعته جدایه‌های تریکودرما).

جدایه	درصد بازدارندگی*
شاهد	۰/۰**a
Th3	۲۶/۷ab
Th1	٤۰/۰bc
Tv2	٥۳/۷bcd
Th4	۷۷/۰de
Th2	۸۲/۷e
Tv1	۹۲/۷٤e
LSD (α=۰/۰٥)	**۲٦/۹**

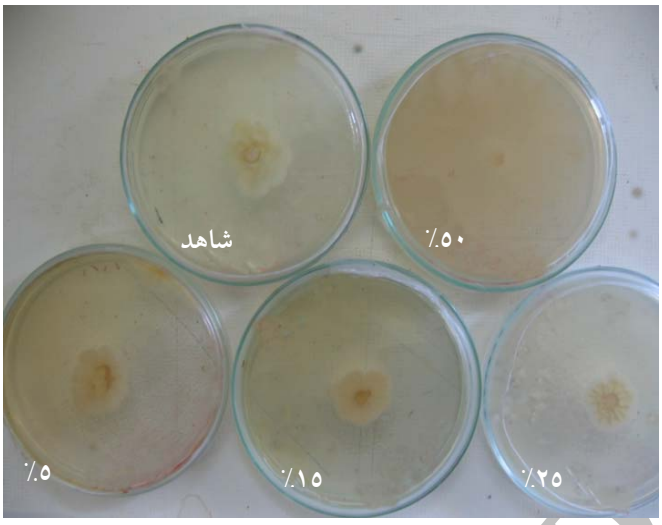
* داده‌ها مربوط به میانگین ٤ تکرار می‌باشد.

**حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥درصد می‌باشد.

هـ): بررسی اثر ترکیبات غیرفرار (Culture filtrate) جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: در این آزمایش مشخص گردید که جدایه Tv1 در غلظت ۵۰ درصد بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد پرگنه عامل بیماری داشته و به میزان ۷۹/۷۸ درصد باعث جلوگیری از رشد پرگنه شد (شکل۹) (جدول ٤).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۹- بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) قارچ Tv1 در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *O. novo-ulmi*.

جدول ٤- تأثیرترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) قارچ Tv1 در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *Ophiostoma novo-ulmi*

غلظت (بر حسب درصد)	درصد بازدارندگی*
۰ (شاهد)	۰/۰۰**a
۵	٦/۳۷۵a
۱۵	۱٤/۷۵a
۲۵	۵۸/۷۵b
۵۰	۷۹/۷۸c
LSD(α=۰/۰۵)	۱۰/۰۱

* داده‌ها مربوط به میانگین ٤ تکرار می‌باشد.

**حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد می‌باشد.

بحث

قارچ تریکودرما یکی از عوامل بیوکنترل قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* است که مکانیسم کنترلی آن به چهارصورت رقابت، مایکوپارازیتیسم، اثر ترشحات مایع خارج سلولی[۲] و ترکیبات فرار[۲] ظاهر می شود. این مکانیسم‌ها در کار خیلی از محققان دیگر از جمله دنیس و وبستر(۱۹۷۱) و ریکارد (۱۹۸۱ و ۱۹۸۳) مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است.

نکته مهمی که بسیاری از محققان به آن اشاره کرده اند وجود اختلاف بین گونه‌ها و بخصوص جدایه‌های مختلف یک گونه از نظر مکانیسم‌های کنترلی ذکرشده و شدت و ضعف این مکانیسم‌ها است که نتایج این تحقیق نیز این مطلب را تأیید می‌کند. نتایج حاصله حاکی ازتوانایی قارچ تریکودرما در رقابت تغذیه‌ای در برابر قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* می‌باشد. رشد سریع و اسپورزایی فراوان از ویژگی‌هایی هستند که قارچ تریکودرما را قادر می‌سازد تا بهره‌برداری مطلوبی از زیستگاهش به عمل آورد و حتی در شرایط و

1- Culture filtrate
2- Volatile antibiotics
3- Ttrichodermin
4- trichotoxin
5- paracelsin
6- dermadin
7- alamethicin

Archive of SID

www.SID.ir

زیستگاه‌های نامطلوب بقاء آن را حفظ نماید. یک چنین خصوصیتی باعث شده تا از این قارچ به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک مناسب بر علیه عوامل بیماری‌زای مختلف استفاده شود (باتناگار، ۱۹۹۶). نتایج حاصل از کلونیزاسیون و به ویژه اسپورزایی نشان داد که قارچ تریکودرما احتمالاً در شرایط طبیعی در داخل آوند گیاه بتواند با انجام کلونیزاسیون، اسپورزایی زیاد و از طرفی کاهش میزان اسپور قارچ عامل بیماری با فعالیت آنتی بیوزی باعث کاهش سرعت انتشار عامل بیماری در داخل آوند شود. اگرچه میزان تراکم موثر اینوکولوم آنتاگونیست می تواند از جمله عوامل مهم در بالا بردن عملکرد آن باشد. طبق تحقیقات ریکارد (۱۹۸۱ و ۱۹۸۳) جدایه های قارچ *T. viride* و *T. harzianum* در شرایط طبیعی توان آنتاگونیستی مناسبی را در برابر قارچ عامل بیماری مرگ نارون نشان داده اند.

البته باید به این نکته توجه کرد به‌دلیل این که در شرایط طبیعی مجموعه پیچیده‌ای ازعوامل مختلف برروی روابط عامل بیمارگر، آنتاگونیست و میزبان اثر می‌گذارند، ارتباط دادن ویژگی‌ها یا توانایی‌های آزمایشگاهی جدایه‌ها با توان کنترل‌کنندگی آنها در شرایط طبیعی بسیار سخت و مشکل است. نتایج حاصل از آزمایش مواد فرار و ترشحات مایع خارج سلولی نیز با نتایج محققانی نظیرژیس آلبرتی و رولند (۱۹۹۳)، ریکارد(۱۹۸۳) و ریچاردز (۱۹۸۸) مطابقت داشته است. تحقیقاتی که توسط پاپاویزاس (۱۹۸۵)، دنیس و وبستر(۱۹۷۱) و ژیس آلبرتی و رولند (۱۹۹۳) انجام گرفته نشان داده که متابولیت های غیر فرار تریکودرما حاوی آنزیم های سلولاز، کیتیناز، لامینارینازو β- ۳، ۱ گلوکاناز و آنتی بیوتیک‌هایی نظیر تریکودرمین[3]، تریکوتوکسین[4]، پاراسلسین[5]، درمادین[6] و آلامتیسین[7] هستند که تعداد و میزان ترشح این مواد در گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی در جدایه‌های مربوط به یک گونه ممکن است متفاوت باشد به‌طوری که انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌های ایزونیتریلی در تشخیص برخی گونه‌های مهم تریکودرما نظیر *T. harzianum*، *T. viride*، *T. hammatum* و *T. koningii* نقش مهمی دارد (اکودا و همکاران، ۱۹۸۲).

گلیوتوکسین[1] و گلیوورین[2] از مهمترین ترکیبات آنتی بیوتیکی گونه *T. virens* محسوب می‌شوند. این ترکیبات عمدتاً بر روی غشاء قارچ بیمارگر اثر گذاشته و باعث اختلال در دیواره میسلیوم و نهایتاً اختلال در رشد و بد شکلی آن می‌شوند (الاد و همکاران، ۱۹۷۹؛ کروز و همکاران، ۱۹۹۳). کلایدون و همکاران (۱۹۸۷) و همچنین سرانو و همکاران (۱۹۹۲) بوی نارگیلی تولید شده توسط برخی از جدایه‌های *T. viride* و *T. harzianum* را به یک ترکیب پیرونی غیر اشباع با خاصیت ضدقارچی به نام 6-pentyl-α-pyrone نسبت دادند (اسکارسلتی و فاول، ۱۹۹٤). طبق تحقیقات دنیس و وبستر (۱۹۷۱) استالدئید به‌عنوان عمده‌ترین ترکیب کربنیل دار متابولیت‌های فرار برخی از گونه‌های تریکودرما مشخص گردید. آنها همچنین توانستند مشتقات هیدرازونی را از ترشحات این قارچ پیدا کنند. با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش‌ها مشخص می‌شود که گونه‌ها و حتی جدایه‌های یک گونه از نظر مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی و بیوکنترلی برعلیه عامل بیمارگر متفاوت عمل می‌کنند. بنابراین بایستی جدایه‌های بسیار بیشتری جداسازی و مورد آزمایش و بررسی‌های بیشتری قرار بگیرند. از طرفی، عدم وجود همبستگی مناسب بین نتایج آزمایشگاهی و نتایج مزرعه‌ای در مورد بیوکنترل عامل بیماری مرگ نارون به‌ویژه نژادهای مهاجم بیماری در موارد بسیاری به اثبات رسیده است (برنیر، ۱۹۹۶). بنابراین در کنار این آزمایش‌ها، انجام مطالعات گلخانه‌ای باعث گزینش مناسبتر و دقیقتر جدایه‌های مورد آزمایش بر علیه عامل بیماری می‌گردد.

1- Gliotoxin
2- Glioviridin

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1.Baker, R., and Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.h. Freeman, Sanfrancisco, 433pp.

2.Bernier, L., Yang, D., Ouellette, G.B., and Dessureault, M. 1996. Assessment of *Phaeotheca dimorphospora* for biological control of Dutch elm disease pathogens, *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi*. Plant Pathology. 45: 609-617.

3.Bhatnagar, H. 1996. Influence of environmental condition on antagonistic activity *Trichoderma* spp. against *Fusarium udum*. Indian. PL. Pathol. 26:58-65.

4.Brasier, C.M. 1990. China and the origin of Dutch elm disease an appraisal Plant Pathology. 39: 5-16.

5.Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. Nov., Causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia. 115:151-161.

6.Brasier, C.M., and Mehrotra, M. D. 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. Mycol. Res., 99: 205-215.

7.Brasier, C.M., and Kirk, S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. Mycol. Res. 105(5): 547-554.

8.Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., and Avent, A.G. 1987. Antifungal alkyo pyrones of *Trichoderma harzianum*. Transactions of the British Mycological Society. 88: 503-513.

9.Cruz, J., Hidalgo, A., Lora, J. M., Bbenitez, T., Pintor-Toro, J., and Lobll, A. 1993. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry. 206: 859-869.

10.Cuthbert, R.A., Barger, J.H., and Reed, P.A. 1973. Formulation and application of methoxycholor for elm bark beetle control. Washington; US. Forest service Research Paper NE. 283.

11.Denis, C., and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological Society. 57: 363-369.

12.Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1979. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology. 28: 719-725.

13.Elgersma, D.M., Roosier, T., and Scheffer, R.J. 1993. Biological control of Dutch elm disease by exploiting resistance in host. In; M.B. Sticklen and J.L. Sherald. (eds.), Dutch Elm Disease Research , Cellular and Molecular Approaches. New York: Springer-Verlag. 188-192.

14.Gams, W., and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of Trichoderma. 3-34. In: C.P. Kubicek and G. Harman (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, Londan.Vol 1.278 pp.

15.Gams, W., and Meyer, W. 1998. What exactly is Trichoderma *harzianum*?. Mycologia. 90(5): 904-915.

16. Ghisalberti, E., and Rowland, G.Y. 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum.* Journal of Natural Products. 56: 1799-1804.

17.Gregory, G., Lewis, R., Schreiber, L., Roberto, N., Ichida, J., and Thomas, J. 1986. A Pseudomonas species isolated from live oaks antagonistic to several tree pathogens. Phytopathology. 76:652-653.

18.Lanier, G.N. 1987. Fungicides for Dutch elm disease; comparative evaluation of commercial products. Journal of Arboriculture. 13: 189-195.

19.Marsden, D.H. 1952. Pruning elms affected with Dutch elm disease. Phytopathology. 42:113-114.

20.Murdoch, C.W., Campana, R.J., and Hoch, J. 1984. On the biological control of *Ceratocystis ulmi* with *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology. 74: 805.

21.Myers, D.F., and Strobel, G.A. 1983. *Pseudomonas syringae* as a microbial antagonist of *Ceratocystis ulmi* in the apoplast of American elm. Transactions of the British Mycological Society. 80: 389-394.

22.Neely, D., and Himelick, E.B. 1965. Effectiveness of vapam in preventing root graft transmission of the Dutch elm disease fungus. Plant Disease Reporter. 49: 106-108.

23.Ó Brien, J.G., Blanchette, R.A., and Stherland, J.B. 1984. Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of Dutch elm disease. Plant Disease. 65: 104-106.

24.Okuda, T., Fujiwara, A., and Fujiwara, M., 1982. Correlation between species of Trichoderma and production of isonitrile antibiotics. Agricultural and Biological Chemistry. 46: 1811-1822.

25.Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathology. 23: 23-57.

Archive of SID

www.SID.ir

26.Peighami, E. 1992. Investigation of potential biological control of *Stigmina carpophila* (Lev.) Ellis. by *Trichoderma harzianum*. Journal of Agri. Sci. Tabriz University. 2 (3, 4).
27.Peighami, E. and Neishaboori. 1991. Investigation of potential biological control of Cucumber fusarium wilt by *Trichoderma harzianum*. Journal of Agri. Sci. Tabriz University. 2 (3, 4).
28.Rahjo, V., Mojdehi, H., Zamanizadeh, H., and Mosahebi, GH. 2000. Investigation of distribution of Dutch elm disease, in Tehran and Karaj cities, and initial evaluation effect of some fungicides against *Ophiostoma ulmi*. Scientific Reaserch Journal of Agri. Sci. Islamic Azade Univ. Press. 15-32.
29.Rahnama, K. 1996. Biotechnology: and its importance on the biological control of Pests and Plant Diseases in modern agriculture. Journal of Agri. Sci. and Natur. Reso. 3(3): 20-28.
30.Rahnama, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. In Proceeding: The Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. 34pp.
31.Rahnama, K., and Taheri, A.H. 2004. Distribution of Dutch elm disease pathogens, aggressive and non-aggressive isolates in Iran. Canadian Journal of Plant Pathology. 26: 121-126.
32.Rahnama, K., Mohammadzadeh, A., and Razavi, S.E. 2005. Investigation of effect pH and temperature on growth *Trichoderma koningi* and comparation with causal agents of ear blight, and antagonistic activity *T.koningi* against their diseases. Journal of Agri. Sci. and Natur. Reso. 12(1):127-136.
33.Ricard, J.L. 1981. Commercialization of a Trichoderma_based mycofungicide some problems and solutions. Biocontrol News and information. 2: 95-98.
34.Ricard, J.L. 1983. Field observations on the biocontrol of Dutch elm disease with *Trichoderma viride* pellets. European Journal of Forest Pathology. 13: 60-62.
35.Richards, N.T. 1988. Trichothecin revisited ?. Mycologist. 2: 123-124.
36.Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus Trichoderma. Mycol. Pap. 116:1-56.
37.Samuels, G.J. 1996. Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus (Centenary Review). Mycol. Res., 100(8): 923-935.
38.Santini, A., Fagnani, A., Ferrini, F., and Mittem pergher, L. 2002. "San Zanobi" and "Plinio" Elm Trees. Hortscience. 37(7): 1139-1141.
39.Scarselletti, R., and Faull, J.L. 1994. In vitro activity of 6-pentyl-I-pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Mycol. Res., 98:1207-1209.
40.Scheffer, R.J., and Strobel, G.A. 1988. Dutch Elm Disease, a model tree disease for biological control, In; K.G. Mukeri, and K.l. Garg (eds.). Biocontrol of Plant Disease. CRC. Press. Inc., B. ca. Raton, FL., 103-119.
41.Schreiber, L., Gregory, G.F., Krause, C.R., and Ichida, J.M. 1988. Production partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana* , Canadian Journal of Botany. 66: 2338-2346.
42.Serrano-carreon, L., Hathout, Y., Bensoussan, M., and Belin, J. M. 1992. Lipid accumulation in Trichoderma species. FEMS Microbiological Letters. 93: 181-188.
43.Sincliar, A., and Campana, R.J. 1978. Dutch Elm Disease; Perspectives after 60 years. Agric. Pl. Pathol., 8(5): pp.55.
44.Solla, A., and Gil, L. 2003. Evaluating *Verticillium dahliae* for biological control of *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*. Pl. Path., 52:579-585.
45.Stipes, R.J. 1975. Chemical control of *Ceratocystis ulmi*; an overview. In; D.A. Burdekin, and H.M. Heybrock (eds.), Dutch Elm Disease: Procedings of the IUFRO Congress. 1974. pp.1-15. Saint Paul, MN: USFS.
46.Stipes, R.J., and Campana, R.J. 1981. Compendium of elm disease. APS. Press. Pp. 96.
47.Voetten, J. 2003. Dutch Trig®: A decade of successful biological control Dutch elm disease in Europe and the USA, In Proceeding: second International Elm Conference Valsain, Segovia, Spain. Pp. 35.
48.Zafari, D., Ershad, D. Zare, R. and Alizadeh, A. 2002. A contribution to the identification of Trichoderma species in Iran. Iranian J. of Pl. Pathol. 38(1-2). 21-47.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(5), Dec2007-Jan 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Investigating biological control of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of Dutch Elm Disease by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro

M.M. Iraqi[1], *K. Rahnama[2], D. Zafari[3] and M. Taghinasab[4]
[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Associate Prof, Dept. of Plant Protection Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]Assistant Prof, Dept. of Plant Protection, Abuali Sina Univ. of Hamadan, Iran, [4]Instructor of Dept. of Plant protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

Antagonistic effect of four *Trichoderma harzianum* (Th) and two *T. virens* (Tv) soil isolates were studied against one isolates of *Ophiostoma novo-ulmi* in vitro. In this aim, different ntagonistic mechanisms such as; mycoparasitism, competition and antibiosis (effect of volatile metabolites and culture filtrate) were investigated. Microscopic studies indicated that all isolates of *Trichoderma* spp. had adverse effect on the development of *Ophiostoma novo-ulmi*. All isolates differed in antagonistic mechanisms against the causal agent. Tv2 isolate, showed the most growth rate in dual culture and competition with *O.novo-ulmi* and covered the colony of *O.novo-ulmi* after four days. Th3 isolate, had the highest colonization and sporulation rate on the three days culture of *O.novo-ulmi*. Volatile metabolites and culture filtrate of Tv1 isolate, showed the highest effect on growth inhibition of pathogen fungal mycelia, 92.74 and 78.75 percent, respectively. The potential of using *Trichoderma* spp. isolates for biological control against the causal agent Dutch Elm Disease is worth considering.

Keywords: Antagonist; Dutch elm disease; Biological control; *Ophiostoma novo-ulmi; Trichoderma harzianum; T. virens*

*- E-mail: kamran_ra@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir