Archive of SID

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۲، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۳

# ارزیابی جدایه‌های *Trichoderma* برای کنترل بیولوژیک بیماری بوته‌میری جالیز (*Phytophthora drechsleri*) در گلخانه[۱]

**Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of *Phytophthora drechsleri* in glasshouse**

**شبنم حیدری فاروقی[۱]، حسن‌رضا اعتباریان[۲] و حمیدرضا زمانی‌زاده[۱]**
۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی
۲- گروه گیاه‌پزشکی مجتمع آموزش عالی ابوریحان
(تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۸۲، تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۳)

## چکیده

برای بررسی امکان کنترل بیولوژیک *Phytophthora drechsleri* پنج جدایه *Trichoderma virens* DAR74290، *T. harzianum* T39، *T. harzianum* M، *T. viride*، *Trichoderma* sp. 96 در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی فعالیت‌آنتاگونیستی جدایه‌های فوق از روش کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و سلوفان استفاده و در گلخانه آنتاگونیست‌های فوق در دو سری آزمایش جداگانه به بذر و خاک اضافه گردید. نتایج آزمایش‌ها نشان داد که همه جدایه‌های تریکودرما در روش سلوفان، کشت متقابل و متابولیت‌های فرار، رشد *P. drechsleri* را کاهش دادند و این کاهش رشد در جدایه‌های مختلف متفاوت بود. درصد کاهش رشد در روش متقابل بین ۱۷/۸۲ تا ۸۲/۶۵ و در روش سلوفان بین ۱۵/۹۶ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. همچنین‌تأثیر متابولیت‌های فرار بین ۱۱ تا ۵۶٪ متغیر بود.

---

۱- این مقاله بر اساس قسمتی از نتایج به دست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۷۲۱/۱/۳۱۸ دانشگاه تهران تهیه گردیده است و بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.



www.SID.ir

Archive of SID

متابولیت‌های تولید شده توسط *T. virens* DAR74290 کاملاً از رشد عامل بیماری جلوگیری کرد و خاصیت قارچ‌کشی داشت. تعداد گیاهان زنده در گلدان‌هایی‌که فقط با تریکودرما یا تریکودرما به اضافه‌ی عامل بیماری تیمار شده بودند بیشتر از گلدان‌هایی بود که فقط‌با عامل بیماری آغشته شدند ($P \leq 0.001$). جمعیت عامل بیماری و تریکودرما (cfu/g) در ۱۰ و ۴۰ روز بعد از کاشت مورد بررسی قرار گرفت. جمعیت عامل بیماری و تریکودرما در طول آزمایش‌ها تقریباً ثابت ماند.

**واژه‌های کلیدی:** بوته‌میری‌جالیز، مبارزه بیولوژیک، *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma virens*، *Trichoderma viride*، *Phytophthora drechsleri*.

**مقدمه**

بیماری بوته‌میری جالیز که عامل آن قارچ *Phytophthora drechsleri* Tucker می‌باشد به گیاهان مختلف جالیزی از قبیل خیار، خربزه، طالبی، هندوانه و کدو حمله می‌کند و در مناطق مختلف ایران شایع است (Ershad & Mostofipoor, 1969; Etebarian, 2002). با توجه به خسارت زیاد بیماری از نظر کمی و کیفی به مزارع و گلخانه‌ها و نظر به اینکه مبارزه شیمیایی مستلزم هزینه زیاد می‌باشد و مشکلات زیادی را از نظر بهداشتی فراهم می‌آورد، مبارزه بیولوژیک با بیماری مورد توجه قرار گرفته است. یکی از عوامل آنتاگونیست مؤثر روی عوامل بیماری‌زا، گونه‌های جنس *Trichoderma* می‌باشد که فعالیت آنتاگونیستی آنها در برابر عوامل بیماری‌زا به طور گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. به عنوان مثال، افزودن بقایای گیاهی مانند سبوس برنج به خاک، جمعیت گونه‌های *T. harzianum* Rifai را افزایش داد و در نتیجه شیوع بیماری فیتوفترایی فلفل در اثر *P. capsici* Leonin بعد از اضافه کردن سبوس برنج کاهش یافت. البته اگر ماده آلی فوق همراه با هر یک از آنتاگونیست‌های یاد شده باشد تأثیر افزایش پیدا می‌کند (Nam *et al.*, 1988). گونه‌های فوق به صورت دو نوع فرمولاسیون بر علیه بیماری مذکور در مزرعه نیز آزمایش شدند که هر دو مؤثر بودند (Kim *et al.*, 1990). استفاده از (J. H. Miller, J. E. Giddens & Foster) Arx *Trichoderma* (Gliocladium) *virens* که یک مایکوپارازیت قوی و تولید کننده آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر علیه عوامل بیماری‌زایی قارچی است در کنترل مرگ گیاهچه ناشی از *P. ultimum* Throw نتایج موفقیت‌آمیزی داشته است (Howell, 1991). همچنین اثر آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما



www.SID.ir

Archive of SID

روی قارچ *P. erythroseptica* Pethbridge در شرایط آزمایشگاه توسط Okhovat *et al.*, (1994) گزارش شده است. جدایه‌های *T. virens* DAR 74290 جدا شده از فلفل در جنوب استرالیا و *T. harzianum* T39 ماده فعال ترکیب تجاری Trichodex در کنترل *P. erythroseptica* در آزمایشگاه و گلخانه مؤثر بوده و میزان محصول سیب‌زمینی را افزایش دادند (Etebarian *et al.*, 2000)، استفاده از *T. harzianum* در شرایط گلخانه سبب کاهش ٤٥ درصدی بیماری بوته‌میری خیار ناشی از *P. drechsleri* گردید و همچنین وزن گیاهچه خیار در مقایسه با شاهد افزایش یافت (Sharifi-Tehrani & Nazari, 2002). در این تحقیق اثر آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *Trichoderma* روی *P. drechsleri* در آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن ارائه می‌شود. پیش از این گزارش کوتاهی در مورد این بررسی در پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ارائه شده است (Heidari Faroughi, 2001).

## روش بررسی

**جدایه‌های *Trichoderma* و *Phytophthora drechsleri*:** در این بررسی از جدایه T39 *T. harzianum* که از ترکیب تجارتی Trichodex جدا شده بود (Etebarian *et al.*, 2000) و همچنین *Trichoderma virens* DAR74290 با نام قبلی *Gliocladium virens* DAR74290 که توسط دکتر آیلین اسکات دپارتمان بیولوژی مولکولی کاربردی دانشگاه آدلایداسترالیا از جدایه‌های M *T. harzianum* و *T. viride* Pers.ex Gray که توسط دکتر روحانی از دانشگاه بوعلی‌سینا همدان در اختیار قرار گرفته بود استفاده شد. جدایه *Trichoderma* sp. 96 که از ریزوسفر بوته‌های خیار گلخانه‌ای در منطقه ورامین جدا شده بود به کاربرده شد (Heidari Faroughi, 2001; Ashrafizadeh, 2001). در این آزمایش از جدایه‌های Pd1، Pd2، Pd3، Pd4، Pd5 و Pd6 از قارچ *Phytophthora drechsleri* که قبلاً بیماری‌زایی آنها به اثبات رسیده و شناسایی شده بودند استفاده شد (Heidari Faroughi, 2001).

**تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* روی *P. drechsleri* در کشت متقابل:** در این آزمایش‌ها اثر جدایه‌های *Trichoderma* روی *P. drechsleri* در دو سری، کشت همزمان تریکودرما و عامل بیماری، و کشت زودتر عامل بیماری بررسی شد (Dennis & Webster, 1971c).

**کشت همزمان تریکودرما و *P. drechsleri*:** در این آزمایش در یک طرف تشتک پتری ۹



www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌متری حاوی محیط کشت آرد ذرت آگار قرصی به قطر ٦ میلی‌متر به فاصله ١ سانتی‌متر از لبه تشتک پتری از حاشیه کشت ٣ روزه *P. drechsleri* کشت داده شد و در طرف دیگر نیز قرصی به قطر ٦ میلی‌متر به فاصله ١ سانتی‌متر از لبه پتری از حاشیه کشت ٣ روزه *Trichoderma* قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ٢٦ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. این آزمایش با ٥ تیمار (جدول ١) و ٥ تکرار انجام شد. رشد شعاعی عامل بیماری با استفاده از یک خط‌کش از پشت تشتک پتری در ٤ نوبت به فاصله‌های زمانی ٤٨، ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ ساعت پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* نسبت به شاهدی که فقط قارچ عامل بیماری کشت داده شده بود، بعد از ٩٦ ساعت تعیین و در محاسبات منظور گردید.

**کشت غیر همزمان گونهٔ تریکودرما و *P. drechsleri*:** نظر به اینکه عامل بیماری کندتر از گونه‌های تریکودرما رشد می‌کند قارچ *P. drechsleri* دو روز زودتر کشت داده شد. سایر مراحل شبیه آزمایش قبلی بود. اندازه‌گیری رشد شعاعی پرگنه عامل بیماری در ٤ نوبت به فاصله‌های زمانی آزمایش قبلی انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* در فاصله زمانی ٩٦ ساعت پس از کشت تعیین گردید. تیمارها و تعداد تکرار در این آزمایش شبیه آزمایش قبلی بود. در هر دو این آزمایش‌ها در تشتک‌های پتری شاهد به جای آنتاگونیست یک قرص از محیط کشت PDA قرار داده شد.

**بررسی میکروسکوپی چگونگی تأثیر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* روی *P. drechsleri*:** در این آزمایش اثر ٥ جدایه تریکودرمای ذکر شده از نظر میکروسکوپی روی *P. drechsleri* مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور مشاهده چگونگی ارتباط بین هیف‌های جدایه‌های مختلف *Trichoderma* با هیف‌های *P. drechsleri* از نظر پارازیته کردن، لیز کردن و چگونگی تماس هیفی بین آنها به شرح زیر عمل شد:

پس از تهیه محیط کشت CMA، در یک تشتک پتری ٩ سانتی‌متری سترون مقدار ٤٠ میلی‌لیتر محیط‌کشت ریخته شد و در حالیکه محیط گرم و مایع بود (دمای حدود ٦٠ درجه‌ی سانتی‌گراد یا بیشتر) لام‌های تمیز و سترون با استفاده از پنس سترون از یک طرف در محیط فرو برده شد تا سطح لام کاملاً به محیط کشت آغشته شود. آنگاه برای خارج نمودن محیط



www.SID.ir

Archive of SID

اضافی، لام‌ها کج گرفته شد تا لایه نازکی از محیط در سطح لام‌ها باقی بماند. سپس لام روی یک کاغذ صافی سترون و مرطوب در تشتک‌های پتری سترون قرار داده شدند و پس از انجماد محیط در سطح لام، در یک طرف آن یک قرص به قطر ٦ میلی‌متر از کشت جوان و ٤ روزه *P. drechsleri* گذاشته شد. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ٢٦ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٢ روز قرار داده شد. پس از این مدت، در طرف دیگر آن قرصی به قطر ٦ میلی‌متر از کشت جوان و ٣ روزه جدایه‌های تریکودرما گذاشته شد و دوباره تشتک‌های پتری به انکوباتور منتقل‌شدند (برای هر جدایه تریکودرما ٥ تشتک پتری در نظر گرفته شد). بعد از هر ٢٤ ساعت یک تشتک پتری از هر جدایه از نظر چگونگی تأثیر تریکودرما روی عامل بیماری‌زا در زیر میکروسکوپ مورد بررسی‌قرار گرفت. این عمل تا ٧ روز ادامه یافت (Burgess & Hepworth, 1996).

**بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri***: هدف از این آزمایش بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* بود. برای انجام آزمایش از روش قرار دادن ورقه‌های سلوفان (Cellophane overlays) استفاده شد (Etebarian *et al.*, 2000; Dennis & Webster, 1971a). آزمایش‌ها روی محیط کشت CMA در تشتک‌های پتری ٩ سانتی‌متری انجام شد. ورقه‌های سلوفان (Australia cellophane, victoria) به قطر ٩ سانتی‌متر بریده و در میان ورقه‌های کاغذ صافی‌قرار داده شدند. سپس درون یک بشر حاوی آب مقطر به مدت ١٢٠ دقیقه در ١٢١ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ١/٢ اتمسفر اتوکلاو گردیدند. ورقه‌های سلوفان پس از خنک شدن، در زیر هود سترون با پنس سترون روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت CMA قرار داده شدند و برای خشک شدن، تشتک‌های پتری به مدت ١٠ دقیقه زیر هود قرار گرفتند (Istifadah, 1997). پس از آن قرص‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر از حاشیه کلنی فعال تریکودرما در مرکز هر کدام از ورقه‌های سلوفان قرار داده شد. در تشتک‌های پتری شاهد، یک قرص از محیط PDA سترون گذاشته شد. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای ٢٦ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این بررسی کاغذ سلوفان در سه فاصله زمانی مختلف (٢٤، ٤٨ و ٣٦) ساعت از روی محیط کشت برداشت گردید. در آزمایش‌های مربوط به٢٤ و ٤٨ ساعت از جدایه Pd6 عامل



www.SID.ir

Archive of SID

بیماری و برای آزمایش مربوط به ۳۶ ساعت از جدایه‌های Pd6 و Pd3 استفاده گردید. در این آزمایش‌ها برای هر جدایه عامل‌بیماری و تریکودرما ۵ تکرار در نظر گرفته شد.

در تمام آزمایش‌های ذکر شده اندازه‌گیری قطر پرگنه عامل بیماری در ٤ نوبت، ٤٨، ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ ساعت پس از مایه‌زنی انجام شد. اما نتایج ٩٦ ساعت بعد از مایه‌زنی در محاسبات منظور گردید.

برای تعیین اثر قارچ‌کشی (Fungicidal) و یا قارچ ایستایی (Fungistasis) مواد ترشح شده، در مواردی که *P. drechsleri* اصلاً رشد نکرد، قرص اینوکولوم به محیط تازه CMA منتقل و مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ٢٦ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

**بررسی اثر متابولیت‌های فرار (گازی) *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri*:** در این آزمایش اثر متابولیت‌های فرار ٥ جدایه تریکودرمای ذکر شده، از نظر جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* مورد بررسی قرار گرفت ( Dennis & Webster, 1971 b). جدایه‌های تریکودرما ٢٤ ساعت قبل از *P. drechsleri* کشت داده شدند. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت PDA تهیه و در هر تشتک پتری سترون به قطر ٩ سانتی‌متر مقدار ٢٠ میلی‌لیتر از این محیط ریخته شد. برای هر جدایه ٥ تکرار در نظر گرفته شد و در وسط هر تشتک یک قرص به قطر ٦ میلی‌متر از حاشیه کشت جوان ٣ روزه *P. drechsleri* قرار داده شد. سپس در کنار شعله و با رعایت شرایط سترونی درهای تشتک‌های پتری حاوی *P. drechsleri* و قارچ *Trichoderma* برداشته شد و تشتک پتری حاوی فیتوفتورا به طور وارونه روی تشتک پتری حاوی قارچ تریکودرما قرار داده شد تا بدین ترتیب فقط متابولیت‌های فرار قارچ تریکودرما بتوانند روی قارچ فیتوفتورا مؤثر باشند. دور تشتک‌های پتری روی هم قرار داده شده با نوارهای پارا فیلم به خوبی بسته شد تا ارتباط داخل دو تشتک‌پتری با محیط خارج کاملاً قطع شود. تشتک‌های پتری در انکوباتور با حرارت ٢٦ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و اندازه‌گیری قطر پرگنه عامل بیماری در فاصله‌های ٤٨، ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ ساعت پس از مایه‌زنی انجام شد.

**بررسی تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از مرگ گیاهچه‌های طالبی در شرایط گلخانه:** هدف از این آزمایش بررسی میزان تأثیر جدایه‌های قارچ تریکودرما در کنترل و یا کاهش مرگ گیاهچه‌های طالبی در اثر *P. drechsleri* در شرایط گلخانه بود. این آزمایش به



www.SID.ir

Archive of SID

دو صورت زیر انجام شد:

**۱- افزودن مایه جدایه‌های *Trichoderma* به خاک:**

در این بررسی از جدایه‌های *Trichoderma* sp. 96، *T. virens* DAR 74290، *T. harzianum* M، *T. harzianum* T39، *T. viride* و یک جدایه تجاری شامل مخلوط دو جدایه تریکودرما Bi (تریکودرمین B) که از خاک‌های ایران جدا شده بود به میزان ۵۰ درصد و ۵۰ درصد دیگر جدایه *T. viride* M (شرکت کشت و صنعت تلفیق دانه) استفاده شد. در این آزمایش از رقم طالبی سبز ورامین که به *P. drechsleri* حساس است، استفاده شد. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۱٤ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی به شرح زیر بود:

- شاهد غیرآلوده
- شاهد آلوده
- *T. virens* DAR 74290
- *T. harzianum* T39
- *T. harzianum* M
- *T. viride*
- *Trichoderma* sp. 96
- *T. viride* M + *T. harzianum* Bi
- *P. drechsleri* + *T. virens* DAR74290
- *P. drechsleri* + *T. harzianum* T39
- *P. drechsleri* + *T. harzianum* M
- *P. drechsleri* + *T. viride*
- *P. drechsleri* + *Trichoderma* sp. 96
- *P. drechsleri* + ( *T. viride*M + *T. harzianum* Bi)

خاک گلدان‌های آزمایشی (۱ قسمت خاک مزرعه و ۳ قسمت خاک برگ) ۳ بار در سه روز پی‌درپی اتوکلاو شد. به منظور ایجاد زهکشی مناسب مقداری ماسه سترون زیر هر گلدان ریخته شد.



www.SID.ir

Archive of SID

اینوکلوم *P. drechsleri* که روی لوبیا کشت داده شده بود به نسبت ۵ گرم به ازای یک کیلوگرم خاک به نسبت مساوی از هر ٦ جدایه (Pd1, Pd2, Pd3, Pd4, Pd5, Pd6) اضافه شد. بدین منظور ابتدا اینوکلوم ٦ جدایه به مقدار مساوی به نسبت فوق با هم مخلوط شد. سپس با آب‌مقطر سترون با مخلوط‌کن کاملاً مخلوط گردید و شیرابه بدست آمده به خاک تیمارهای حاوی *P. drechsleri* اضافه شد (Etebarian *et al.*, 2000). برای تیمارهای بدون *P. drechsleri* به عنوان شاهد از لوبیای سترون به میزان ۵ گرم در یک کیلوگرم خاک استفاده شد.

اینوکلوم جدایه‌های تریکودرما (تکثیر شده روی سبوس گندم) نیز به نسبت ۵ گرم به ازای یک کیلوگرم خاک، اضافه گردید (Etebarian *et al.*, 2000). جدایه تجاری، مخلوط تریکودرمین B و *T. viride* نیز به مقدار توصیه شده به خاک افزوده شد. برای تیمارهای بدون تریکودرما از سبوس گندم سترون به میزان ۵ گرم در کیلوگرم خاک استفاده شد.

مایه *P. drechsleri* یک روز قبل از کاشت اضافه شد و برای استقرار عامل بیماری، گلدان‌ها آبیاری شدند. اینوکلوم جدایه‌های تریکودرما در روز کاشت بذرها، به خاک گلدان‌ها اضافه شد (Etebarian *et al.*, 2000). بذر طالبی به مدت ٤ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سپس ۳ بار با آب مقطر سترون شسته شد. قطر گلدان‌ها ۹ سانتی‌متر و ارتفاع آنها ۱۳ سانتی‌متر بود و در هر گلدان ٦ بذر کاشته شد. گلدان‌ها در تناوب نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. دمای روز حداکثر ۲۷ و حداقل ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و دمای شب حداکثر ۲۲ و حداقل ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. به هر گلدان روزانه حدود ۲۰ میلی‌لیتر آب داده شد.

از گیاهچه‌های طالبی مبتلا به بیماری نمونه‌برداری شد و روی محیط کشت BNPRAH که شامل بنومیل ۵۰٪، ۲۰ میلی‌گرم، نیستاتین ۲۵ میلی‌گرم، PCNB ۷۵٪، ۵۰ میلی‌گرم، ریفامپیسین ۱۰ میلی‌گرم، آمپی‌سیلین ۵۰۰ میلی‌گرم، هایمگزازول ۲۰ میلی‌گرم و محیط کشت آرد ذرت آگار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بود، (Masago *et al.*, 1997) کشت داده شد. تعداد گیاهچه‌های سالم و ارتفاع گیاهچه‌ها ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ روز پس از کاشت ثبت شد. درصد گیاهچه‌های سالم ۲۰ روز پس از کاشت نسبت به شاهد سالم بدست آمد و در محاسبات منظور گردید.

**۲- آغشته کردن بذر به سوسپانسیون جدایه‌های *Trichoderma*:**

در این بررسی نیز از جدایه‌های تریکودرمای ذکر شده استفاده شد. جهت کاشت از



www.SID.ir

Archive of SID

بذرهای رقم طالبی‌سبز ورامین استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل ۱۲ تیمار در ۳ تکرار انجام شد. ابتدا جدایه‌های تریکودرما ۱۰ روز قبل روی محیط PDA کشت گردید. تشتک‌های پتری کشت شده در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا در تاریخ کاشت در گلدان به اسپوردهی فراوان رسیده باشند.

جهت تهیه سوسپانسیون اسپور تریکودرما اسپورها از سطح محیط کشت با لوپ سترون برداشت شد و در تشتک‌های پتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون سوسپانسیونی با غلظت $^{8}$ ۱۰×۰/۲ اسپور در میلی‌لیتر تهیه گردید (Burgess & Hepworth, 1996). شمارش اسپورها با لام هموسایتومتر انجام شد. سپس بذرهای طالبی سبز ورامین به مقدار لازم برای کشت گلدان‌ها (۳ تکرار برای هر تیمار) به مدت ٤ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و ۳ بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از خشک شدن بذرها در زیر هود به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ سی‌سی از محلول ۲ درصد متیل‌سلولز (Vaartaja *et al.*, 1979) قرار داده شدند. سپس بذور چسبناک روی سطح پتری سترون به مدت۱۰ دقیقه در زیر هود قرار داده شد و بعد به مدت ۲ ساعت در سوسپانسیون‌های به دست آمده ازجدایه‌های تریکودرما قرار گرفتند (Burgess & Hepworth, 1996). پس از گذشت ۲ ساعت بذور پوشش داده شده با سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما، در گلدان‌های مورد نظر کاشته شدند. برای سایر تیمارهای بدون تریکودرما (شاهد غیرآلوده و شاهد آلوده) از بذرهایی که پس از پوشش داده شدن با متیل‌سلولز به مدت ۲ ساعت در آب مقطر سترون قرار داده شده بودند استفاده شد. همچنین از میان بذرهای پوشش یافته با پروپاگول‌ها، از هر جدایه به صورت تصادفی ۳ بذر جهت آزمایش تعیین CFU در هر بذر انتخاب شد. سایر مراحل کار گلدانی از قبیل اضافه نمودن مایه قارچ عامل بیماری به خاک شبیه آزمایش قبلی بود.

داده‌های اصلی مربوط به ارتفاع گیاهچه‌ها ۲۰ روز پس از کاشت مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن $P \leq 0.001$ انجام شد.

### آنالیز آماری

درصدهای بدست آمده از آزمایش‌های مربوط به کشت متقابل، کشت سلوفان و همچنین



www.SID.ir

Archive of SID

درصد گیاهچه‌های سالم پس از تبدیل به $ArcSin\sqrt{Y}$ (Y = درصد بازداری از رشد قارچ عامل بیماری یا درصد گیاهچه‌های سالم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. داده‌های اصلی مربوط به ارتفاع گیاهچه‌ها ۲۰ روز پس از کاشت مستقیما مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن $P \leq 0.001$ انجام شد (Little & Hill, 1978).

**ارزیابی جمعیت عامل بیماری و تریکودرما در خاک و جمعیت تریکودرما به همراه بذر:** جمعیت *P.drechsleri* و جدایه‌های تریکودرما در هرگلدان در ۲ نوبت ۱۰ و ۴۰ روز پس از کاشت با روش زیر تخمین زده شد. از هر گلدان ۵ گرم خاک از قسمت‌های مختلف به طوری که به گیاهچه‌ها آسیب نرسد، برداشته شد و در تشتک‌های پتری سترون ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت که خاک‌ها در مجاورت هوا خشک شدند (از هر تیمار ۳ گلدان و از هر گلدان ۵ گرم خاک) ابتدا خاک تکرارهای هر تیمار خوب هم زده شد. سپس از هر تیمار ۱ گرم خاک وزن شد و به یک لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و به مدت یک دقیقه روی دستگاه شیکر لوله قرار داده شد و برای هر تیمار به روش سری رقت، رقت $10^{-4}$ تهیه شد. برای تعیین جمعیت عامل بیماری از رقت $10^{-4}$، میزان ۱ میلی‌لیتر روی محیط کشت انتخابی BNPRAH به طور یکنواخت پخش گردید. برای تخمین جمعیت *Trichoderma* از رقت $10^{-4}$ میزان ۱ میلی‌لیتر روی محیط انتخابی (Elad *et al.*, 1981) استفاده شد و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. تعداد پرگنه‌های ظاهر شده در هر تشتک پتری پس از ٤ و ۸ روز شمارش گردید.

برای تعیین CFU هر بذر در یک لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت ۱ دقیقه روی دستگاه شیکر لوله قرار داده شد و رقت $10^{-4}$ تهیه گردید و ۱ میلی‌لیتر از این رقت روی محیط اختصاصی تریکودرما مطابق روش فوق پخش و سپس CFU هر بذر تعیین گردید.

## نتیجه و بحث

**بررسی تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* روی *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه:** جدایه‌های تریکودرما در کشت متقابل همزمان و غیر همزمان از نظر درصد بازداری از رشد



www.SID.ir

Archive of SID

میسلیوم *P. drechsleri* با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. با مقایسه میانگین‌ها که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود در کشت متقابل همزمان ممانعت جدایه‌های *Trichodrma harzianum* M، *Trichoderma* sp.96 و *Trichoderma virens* DAR74290 از رشد میسلیوم *P. drechsleri* بیشتر از جدایه *T. viride* بود. میزان کاهش رشد در جدایه‌های فوق به ترتیب ۸۲/٦۵ ، ۸۰/۳۵ ، ۷۹/۷٤ و ۷٦/٦۲ درصد بود.

در کشت متقابل (dual culture) غیر همزمان به احتمال ۹۹/۹ درصد جدایه‌های تریکودرما از نظر بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. با مقایسه میانگین‌ها در جدول ۱ ملاحظه می‌شود که ممانعت جدایه‌های *Trichoderma harzianum* T39، *T. virens* DAR74290 و *T. harzianum* M از رشد میسلیوم *P. drechsleri* بیشتر از جدایه‌های *Trichoderma* sp.96 و *T. viride* بود و میزان کاهش رشد در جدایه‌های فوق به ترتیب ٤۸/۸۵، ٤٤/۳٦، ٤۲/۵، ۲۰/۷۱ و ۱۷/۸۲ درصد بود.

**بررسی میکروسکوپی چگونگی تأثیر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* روی *P. drechsleri*:** بررسی‌های میکروسکوپی در این آزمایش نشان داد که در سطح نازک محیط کشت روی لام‌ها، هیف‌های تمام جدایه‌های تریکودرمای مورد بررسی، در مراحل اولیه برخورد با هیف‌های *P. drechsleri* در قسمتی از طول آنها در مجاورت و یا با تماس هیفی به موازات هیف‌های *P. drechsleri* رشد کرده و با گذشت زمان این مجاورت و یا تماس هیفی افزایش یافت، ولی اثری از نفوذ مستقیم هیف‌های تریکودرما به داخل هیف‌های *P. drechsleri* مشاهده نشد. همچنین در هیچکدام از جدایه‌های تریکودرما پیچش هیفی مشاهده نشد.

**بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri*:** ترشحات مایع خارج سلولی جدایه *T. virens* DAR 74290 بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد عامل بیماری داشت و به میزان ۱۰۰ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* گردید. جدایه *T. viride* نیز کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* داشت. تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *T. harzianum* M و *Trichoderma* sp.96 به ترتیب در بین این دو حد قرار داشت (جدول ۲).



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تأثیر جدایه‌های تریکودرما در ممانعت از رشد میسلیوم‌های *P. drechsleri* در کشت متقابل همزمان و غیر همزمان

**Table 1**- Effect of *Trichoderma* isolates on growth inhibition of *P. drechsleri* (dual culture)

| | کشت متقابل غیر همزمان<br>Insimultaneous dual culture | کشت متقابل همزمان<br>Simultaneous dual culture |
|---|---|---|
| جدایه تریکودرما<br>*Trichoderma* isolates | میانگین درصد بازداری از رشد<br>% inhibition growth | میانگین درصد بازداری از رشد<br>% inhibition growth |
| *T. harzianum* T39 | 48.85 a | - |
| *T. virens* DAR74290 | 44.36 a | 79.74 a |
| *T. harzianum* M | 42.53 a | 82.65 a |
| *Trichoderma* sp. 96 | 20.71 a | 80.35 a |
| *T. viride* | 17.82 a | 76.62 a |

اعدادی که در متن جدول آمده‌اند. میانگین ۵ تکرار هستند.

- = تیمار مورد آزمایش قرار نگرفته است.

میانگین‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون چند دامنه دانکن در سطح $P \leq 0.001$ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند.

Data are means of five replicates.

- = Treatment was not included

Means within columns followed by different letter, according to Duncan's multiple Range Test, differ significantly at $P \leq 0.001$

هنگامی که ورقه‌های سلوفان به مدت ۲٤، ٤٨، و ٣٦ ساعت بر روی محیط کشت قرار داشت ترشحات مایع خارج سلولی جدایه *T. virens* DAR 74290 به میزان صد درصد از رشد قارچ *P. drechsleri* جلوگیری نمود. اما تأثیر ترشحات خارج سلولی سایر جدایه‌های مورد آزمایش در ٣٦ ساعت استقرار سلوفان در روی محیط کشت بین ٥٠/٧٦ تا ٦٩/٩٣ و در زمان ٤٨ ساعت استقرار سلوفان در روی محیط کشت بین ٦٦/٠١ تا ٧٠/٢٧ درصد متغیر بود (جدول ۲).



www.SID.ir

Archive of SID

در هیچکدام از آزمایش‌های تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه *T. virens* DAR 74290، قطعه حامل میسلیوم پس از انتقال به محیط تازه رشد نکرد.

**تأثیر متابولیت‌های فرار (گازی) جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri*:** به احتمال ۹۹/۹ درصد بین متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در کاهش رشد میسلیوم *P. drechsleri* اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

با مقایسه میانگین‌ها در جدول ۳ ملاحظه می‌شود که ترشحات فرار جدایه *T. viride* در تمام موارد بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* داشته و از نظر آماری در گروه اول قرار می‌گیرد. تأثیر ترشحات فرار جدایه‌های *T. virens* DAR 74290 و *T. harzianum* M و *T. viride* نیز ۹۶ ساعت پس از تلقیح از نظر آماری در گروه اول قرار گرفت. سایر جدایه‌های فوق در درجه دوم اهمیت قرار داشتند.

**تأثیر جدایه‌های تریکودرما در وقوع بیماری بوته‌میری طالبی:** با توجه به جدول ٤ ملاحظه می‌شود که به احتمال ۹۹/۹ درصد بین تیمارها در هر دو آزمایش تیمار بذر و تیمار خاک تفاوت معنی‌دار وجود دارد. همانطوریکه ملاحظه می‌شود، تیمار *Trichoderma* sp. 96 + *P. drechsleri* با ۳۹/۲۳ و جدایه *P. drechsleri* + *T. viride* با ۳۸/۰٦ درصد گیاه سالم و مخلوط *P. drechsleri* + (*T. viride* M + *T. harzianum* Bi) با ۳۸/۸۵ درصد گیاهان سالم بهترین اثر را در کنترل بیماری داشته‌اند. اما در آزمایش مربوط به اثر افزودن آنتاگونیست به بذر، تیمارهای عامل بیماری + *Trichoderma* sp. 96 با ٤۸/۸ و عامل بیماری +*T. harzianum* M با ۳۷/۳۵ درصد گیاهان سالم بهترین اثر را در کنترل بیماری داشته‌اند. در این بررسی جمعیت CFU تریکودرما در هر بذر به هنگام کاشت $۳/۹ \times ۱۰^{٤}$ تعیین گردید.



www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۲**- میانگین درصد بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* در اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما پس از ۲٤، ۳٦ و ٤۸ ساعت استقرار آنها روی ورقه‌های سلوفان ۹٦ ساعت پس از مایه‌زنی

**Table 2-** Effect of *Trichoderma* cell free metabolites on % inhibition growth of *P. drechsleri* 24, 36 and 48 hours after removing cellophane 96h after inoculation.

| جدایه تریکودرما<br>*Trichoderma* isolates | ۲٤ ساعت<br>24 h | ۳٦ ساعت<br>86 h | ٤۸ ساعت<br>48 h |
|---|---|---|---|
| *T. virens* DAR74290 | 100 a | 100 a | 100 a |
| *T. harzianum* M | 41.05 b | 54.48 c | 68.81 b |
| *Trichoderma* sp. 96 | 23.71 c | 51.61 d | 68.43 b |
| *T. viride* | 15.96 d | 69.93 b | 66.01 b |
| *T. harzianum* T39 | - | 50.76 d | 70.27 b |

اعداد مربوط به آزمایش‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت میانگین ۵ تکرار است در این دو آزمایش از جدایه Pd6 عامل بیماری استفاده گردید و اعداد مربوط به آزمایش ۳٦ ساعت میانگین ۱۰ تکرار می‌باشد. در این آزمایش از دو جدایه Pd6 و Pd3 عامل بیماری استفاده شد. میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P \leq 0.001$ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند.

Means within column followed by different letter, differ significantly at $P \leq 0.001$ according to Duncan's Multiple Range Test.

Data in experiments for 24 and 48h are means of 5 replications and data in experiment for 36h are means of 10 replications. In experiments 24 and 48h the isolate Pd6 and for 36h the isolates Pd6 and Pd3 were used.

**ارزیابی جمعیت عامل بیماری و تریکودرما:** میانگین جمعیت *P. drechsleri* و جدایه‌های *Trichoderma* در طول دوره رشد گیاه در فاصله‌های زمانی ۱۰ و ٤۰ روز پس از کاشت در روش اضافه کردن اینوکلوم جدایه‌های تریکودرما به خاک و در روش آغشته کردن بذر به سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما در جدول‌های ۵ و ٦ نشان داده شده است. همانطوری که ملاحظه می‌شود جمعیت تریکودرما و عامل بیماری در طول دورهٔ رشد تقریبا ثابت ماند.



www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی چگونگی تقابل مستقیم جدایه‌های تریکودرما و *P. drechsleri* در کشت متقابل (dual culture) مشاهده شد که جدایه‌های تریکودرما به دلیل سرعت رشد بیشتر و اشغال سریع‌تر سوبسترا در رقابت تغذیه‌ای نسبت به *P. drechsleri* موفق‌تر بودند. همچنین تمام جدایه‌های تریکودرمای مورد بررسی توانایی رشد روی میسلیوم‌های *P. drechsleri* را دارا بودند. به ویژه در آزمایش کشت همزمان، تمام جدایه‌ها بیش از ۷۰ درصد موجب بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* شدند. در کشت غیر همزمان نیز با وجود اینکه عامل بیماری‌زا ٤٨ ساعت زودتر در محیط مستقر شده بود جدایه‌های تریکودرما بین ٤٨/٨٥ - ١٧/٨٢ درصد موجب جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* شدند.

**جدول ۳-** تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* در زمان‌های مختلف پس از تلقیح

**Table 3-** Effect of *Trichoderma* volatile metabolites on % inhibition growth of *P. drechsleri*, different times after inoculation.

| جدایه تریکودرما | میانگین درصد بازداری از رشد % inhibition growth | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ٤٨ ساعت | ٧٢ ساعت | ٩٦ ساعت | ١٢٠ ساعت |
| *Trichoderma* isolates | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
| *T. viride* | 56.05 a | 36.69 a | 29.23 a | 38.31 a |
| *T. virens* DAR74290 | 17.24 b | 17.03 b | 29.01 a | 21.17 c |
| *T. harzianum* T39 | 14.99 b | 21.63 b | 16.93 b | 11.04 d |
| *Trichoderma* sp. 96 | 12.74 b | 16.33 b | 12.32 b | 30.02 b |
| *T. harzianum* M | 12.74 b | 18.23 b | 28.70 a | 27.13 b |

اعدادی که در متن جدول آمده‌اند میانگین ۵ تکرار هستند.

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P \leq 0.001$ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Data are means of five replicates.

Means within columns followed by different letter, differ significantly at $P \leq 0.001$ according to Duncan's Multiple Range Test.



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری بوته میری طالبی

**Table 4-** Effect of Trichoderma isolates on control of cantaloup root rot.

| تیمار<br>Treatment | تیمار خاک<br>Soil Treatment | | تیمار بذر<br>Seed Treatment | |
|---|---|---|---|---|
| | درصد گیاهان سالم<br>% Plant surviving | ارتفاع گیاهچه‌ها<br>Plant height | درصد گیاهان سالم<br>% Plant surviving | ارتفاع گیاهچه‌ها<br>Plant height |
| شاهد غیر آلوده healthy control | - | 18.11 abc | - | 17.18 ab |
| شاهد آلوده Infected control | 0 c | 8.51 d | 0 d | 6.3 c |
| *T. virens* DAR74290 | 100 a | 20.5 ab | 100 a | 20.13 a |
| *Trichoderma* sp. 96 | 100 a | 20.42 ab | 100 a | 18.83 ab |
| *T. harzianum* M | 100 a | 22.67 a | 100 a | 19.63 ab |
| *T. harzianum* T39 | 100 a | 21.11 a | 100 a | 20.38 a |
| *T. viride* | 100 a | 22.17 a | 100 a | 20.20 a |
| (*T. viride* + *T. harzianum* Bi) | 100 a | 20.53 ab | - | - |
| *P. drechsleri* + *T. virens* DAR74290 | 8.85 bc | 12.33 bcd | 25.18 bcd | 19.72 ab |
| *P. drechsleri* + *Trichoderma* sp. 96 | 39.23 b | 18.33 abc | 48.8 b | 17.94 ab |
| *P. drechsleri* + *T. harzianum* M | 8.58 bc | 10.53 cd | 37.35 bc | 17.89 ab |
| *P. drechsleri* + *T. harzianum* T39 | 17.71 bc | 12.68 bcd | 25.18 bcd | 21.5 a |
| *P. drechsleri* + *T. viride* | 38.06 b | 11.55 cd | 12.59 cd | 14.72 b |
| *P. drechsleri* + (*T. viride* + *T. harzianum* Bi) | 38.85 b | 12.00 cd | - | - |

اعدادی که در متن جدول آمده‌اند میانگین ۳ تکرار هستند.

- = تیمار مورد نظر آزمایش نشده است.

میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P \leq 0.001$ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Data are means of five replicates.

- = The treatment is not included

Means within columns followed by different letter, differ significantly at $P \leq 0.001$ according to Duncan's Multiple Range Test.



www.SID.ir

Archive of SID

از آنجایی که رقابت‌های موجود در خاک نیز مانند محیط کشت برای دستیابی به مواد غذایی است و رقابت در دسترسی به بستر لازم برای رشد و مواد غذایی ضروری، عامل اصلی محدودکننده در خاک است (Clarck, 1965) و منطقه ریزوسفر نیز از نظر تراکم مواد غذایی غنی است، رقابت سخت و فشرده‌ای در آن منطقه حاکم می‌باشد و سرعت رشد زیاد هیف، تولید اسپور فراوان و جوانه‌زنی سریع اسپورها از قابلیت‌های رقابت محسوب می‌شود (Garrett, 1970). بنابراین جدایه‌های، *T. viride* DAR74290, *Trichoderma* sp. 96 M *T. harzianum* و *T. harzianum* T39، مورد آزمایش که سرعت رشد زیاد و اسپوردهی فراوان دارند ممکن است در تسخیر منطقه ریزوسفر و ایجاد حفاظی در برابر عوامل بیماری‌زا مؤثر باشند.

نتایج آزمایش‌های کشت متقابل با نتایج حاصل از بررسی اثر دو جدایه *T. virens* DAR74290 و *T. harzianum* T39 روی *P. erythroseptica* مطابقت داشت. جدایه‌های مذکور علاوه بر جلوگیری از رشد *P. erythroseptica* توانایی کلنیزاسیون سریع میسلیوم‌های عامل بیماری را نیز داشتند (Etebarian *et al.*, 2000). بررسی اثر ۵۰ جدایه تریکودرمای گونه‌های مختلف در کشت متقابل با *P. cactorum* روی محیط PDA حاوی بنومیل، نشان داد که ۳۵ جدایه دارای اثرات بازداری بودند (Lederer *et al.*, 1992) در بررسی اثر کشت متقابل جدایه‌های *T. virens* و *T. harzianum* با *P. ultimum* روی محیط کشت آگاردار مشاهده شد که جدایه‌های فوق توانایی بازداری از رشد *P. ultimum* را دارند (Marchetti *et al.*, 1992).

در بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه‌های تریکودرما با *P. drechsleri* مشاهده شد که هیف‌های جدایه‌های تریکودرما به سمت هیف *P. drechsleri* دارای کشش و تروپیسم مثبت هستند که این کشش را می‌توان به یک سری مواد شیمیایی در دیواره *P. drechsleri* نسبت داد. در دیوارهٔ اثومسیت‌ها ترکیباتی مانند سلولز، هیدروکسی پرولین، بتا ۱و۳- گلوگان و بتا ۱و۶- گلوگان وجود دارد. رشد هیف‌های جدایه‌های تریکودرما به موازات هیف‌های *P. drechsleri* نیز مشاهده شد که این مساله نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

آزمایش بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* به روش سلوفان (cellphane overlay) در شرایط آزمایشگاه مبین وجود ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما می‌باشد که اثر ممانعت



www.SID.ir

Archive of SID

کننده آنها روی قارچ‌های دیگر توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Dennis & Webster, 1971a; Etebarian *et al.*, 2000). در آزمایش‌های انجام شده مشاهده شد که با افزایش مدت زمان استقرار جدایه‌های تریکودرما روی ورقه‌های سلوفان درصد بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* افزایش می‌یابد که می‌تواند به دلیل فرصت بیشتر جدایه‌ها در ترشح مواد بازدارنده و یا کاهش مواد غذایی محیط باشد. به ویژه در مورد جدایه‌های *T. viride* به دلیل سرعت رشد کم تفاوت زیادی بین درصد بازداری مشاهده می‌شود. در آزمایش نخست که جدایه مذکور ۲٤ ساعت فرصت رشد داشت احتمالاً به دلیل سرعت کم رشد، میزان ترشحات کافی نبود و در میان جدایه‌ها کمترین درصد بازداری را داشت در حالیکه در مواردی که ۳٦ و یا ٤۸ ساعت فرصت رشد داشت درصد بازداری به طور چشمگیری افزایش یافت و از حداکثر ۱۵/۹٦ درصد بازداری در حالت اول به حداکثر ٦۹/۹۳ درصد در ٤۸ ساعت بعد رسید. تنها در مورد جدایه *T. virens* DAR 74290 هیچ اختلافی در آزمایش‌های انجام شده مشاهده نگردید و در تمام موارد ۱۰۰ درصد موجب بازداری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* شد. از آنجا که پس از انتقال پلاگ‌های عامل بیماری روی محیط تازه *P. drechsleri* رشد نکرد به نظر می‌رسد ترشحات جدایه مذکور روی *P. drechsleri* خاصیت کشندگی دارد.

اثر آنتی‌بیوز ۱۰ جدایه تریکودرما روی زئوسپورها و اسپور *P. cactorum* (Lebret et Cohn) Schroet روی محیط کشت PDA (قبلا جدایه‌های تریکودرما روی ورقه‌های سلوفان کشت شده بودند) مورد بررسی قرارگرفت و نتایج نشان داد که ترشحات مایع خارج سلولی ۳ جدایه موجب لیز شدن و مرگ زئوسپورها شد. سوسپانسیون کنیدی جدایه‌های تریکودرما نیز موجب لیز شدن زئوسپورها گردید. با افزایش مدت زمان استقرار جدایه‌های تریکودرما روی ورقه‌های سلوفان اثرات بازداری از جوانه‌زنی اسپور و عدم تولید لوله تندش (germ tube) افزایش یافت و مشخص شد که ماده فعال مؤثر در این فرایند یک ماده پپتیدی به نام peptaibols است که موجب لیز شدن زئوسپورها و اسپورها می‌شود (Lederer *et al.*, 1992). جدایه‌های *T. harzianum* تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991) و آنزیم‌ها (Lorito *et al.*, 1994) را علیه قارچ‌های مختلف تولید می‌کنند. هر چند که ترشحات ترکیبات بازدارنده جدایه‌های *T. harzianum* M و *T. harzianum* T39 شناسایی نشده است. ترشح آنتی بیوتیک تریکوتسین (trichothecene) با اثر بازدارندگی قارچی در غلظت 100ug/ml



www.SID.ir

Archive of SID

گزارش شده است که روی فعالیت باکتری‌های گرم منفی وگرم مثبت تأثیری ندارد (Corley *et al.*, 1994). این موجب می‌شود که بتوان جدایه‌های *T. harzianum* را همراه با باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک علیه قارچ‌ها استفاده کرد.

در آزمایش‌های گلخانه‌ای در روش افزودن مایه جدایه‌های تریکودرما به خاک به میزان ۵ گرم به ازای یک کیلوگرم خاک آلوده به ۵ گرم مایه مخلوط جدایه‌های *P. drechsleri* به ازای یک کیلوگرم خاک اگر چه کاهش بیماری توسط جدایه‌های تریکودرما معنی‌دار بود ولی کنترل در سطح بسیار مطلوبی فراهم نشد. جدایه *T. harzianum* که توسط Sharifi-Tehrani & Nazari (2002) برای کنترل مرگ گیاهچه خیار در اثر قارچ *P. drechsleri* به کار برده شد نتوانست بیش از ٤٥ درصد از مرگ گیاهچه جلوگیری کند در صورتیکه سم متالاکسیل توانست ٦٠ درصد از مرگ گیاهچه خیار جلوگیری نماید. درصد گیاهان سالم با جدایه *Trichoderma* sp. 96 که از خاک‌های منطقه ورامین بدست آمده بود در آزمایش‌های تیمار خاک و تیمار بذر به ترتیب ۳۹/۲۳ و ٤٨/٨ درصد بود که تقریباً با آزمایش‌های Sharifi-Tehrani & Nazari (2002) برابری می‌کند.

عدم کنترل کنندگی آنتاگونیست‌های فوق در سطح مطلوب ممکن است مربوط به روش، مقدار یا زمان افزودن آنتاگونیست به خاک باشد که در این خصوص تحقیقات بیشتری باید صورت پذیرد. برخی معتقدند که میسلیوم جوان گونه‌های تریکودرما قدرت آنتاگونیستی بیشتری دارند و مثلاً اینوکلوم ۳ روزه و ۸ روزه *T. hamatum* روی سبوس گندم در کنترل *R. solani* kuhn مؤثرتر از اینوکلوم ۱۵ و ٤٠ روزه بود (Lewis & Papavizas, 1987). در روش آغشته کردن بذرها به سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما نتایج به دست آمده در افزایش درصد گیاهان سالم در مقایسه با روش افزودن اینوکلوم به خاک بهتر بود. در تمام جدایه‌ها به غیر از جدایه *T. viride* میزان کنترل بیماری افزایش یافت. بنابراین روش تیمار بذر در سطح گلخانه و مزارع قابل توصیه است. کشاورزان نیز این روش را به سایر روش‌ها ترجیح می‌دهند.

در هر دو روش افزایش رشد گیاهچه‌ها در تیمارهای حاوی جدایه‌های تریکودرما به تنهایی یا همراه با عامل بیماری به طورمحسوس مشاهده شد. در یک بررسی استفاده از جدایه‌های *T. harzianum* T95، *G. virens* G872 موجب افزایش میزان جوانه‌زنی بذرها، وزن خشک جوانه‌ها و ریشه‌ها و میزان محصول میوه خیار در گلخانه شد (Seuk *et al.*, 1995).



www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- جمعیت *P. drechsleri* و جدایه‌های Trichoderma (cfu/gr) در آزمایش اضافه کردن اینوکلوم جدایه‌های تریکودرما به خاک

**Table 5**- Population of *P. drechsleri* and *Trichoderma* (cfu/g $^{-1}$) in soil treatment test.

| تیمارها<br>**Treatments** | ۱۰ روز پس از کاشت<br>**10 days after planting** | | ۴۰ روز پس از کاشت<br>**40 days after planting** | |
|---|---|---|---|---|
| | ***P. drechsleri*** | ***Trichoderma*** | ***P. drechsleri*** | ***Trichoderma*** |
| healthy control شاهد غیر آلوده | - | - | - | - |
| Infected control شاهد آلوده | $(2 \pm 1.73)\ 10^3$ | - | $(1.83 \pm 1.16)\ 10^3$ | - |
| *T. virens* DAR74290 | - | $8 \times 10^4$ | - | $(4.6 \pm 1.69)\ 10^5$ |
| *Trichoderma* sp. 96 | - | $(10.5 \pm 1.06)\ 10^5$ | - | $(4.35 \pm 0.56)\ 10^5$ |
| *T. harzianum* M | - | $(3.92 \pm 1.13)\ 10^6$ | - | $(8.45 \pm 0.21)\ 10^6$ |
| *T. harzianum* T39 | - | $(2.01 \pm 0.01)\ 10^6$ | - | $(2.4 \pm 0.05)\ 10^6$ |
| *T. viride* | - | $(2.5 \pm 0.7)\ 10^4$ | - | $(2.95 \pm 0.77)\ 10^5$ |
| (*T. viride* M + *T. harzianum* Bi) | - | $(8.05 \pm 2.33)\ 10^5$ | - | $(1.7 \pm 4.17)\ 10^5$ |
| *P. drechsleri* + *T. virens* DAR74290 | $(1.66 \pm 0.57)\ 10^3$ | $(2.5 \pm 0.7)\ 10^4$ | $(1.33 \pm 1.52)\ 10^3$ | $(4.5 \pm 0.7)\ 10^4$ |
| *P. drechsleri* + *Trichoderma* sp. 96 | $(1.66 \pm 0.52)\ 10^3$ | $(4.5 \pm 0.7)\ 10^3$ | $2 \times 10^3$ | $(3.5 \pm 0.7)\ 10^4$ |
| *P. drechsleri* + *T. harzianum* M | $(1.66 \pm 0.54)\ 10^3$ | $(8.6 \pm 0.56)\ 10^5$ | $(1.33 \pm 0.57)\ 10^3$ | $(4.5 \pm 0.63)\ 10^5$ |
| *P. drechsleri* + *T. harzianum* T39 | $2 \times 10^3$ | $(3.51 \pm 0.01)\ 10^6$ | $(1.66 \pm 1.54)\ 10^3$ | $(9.36 \pm 0.12)\ 10^6$ |
| *P. drechsleri* + *T. viride* M | $(1.33 \pm 0.52)\ 10^3$ | $10^4$ | $(1.66 \pm 1.52)\ 10^3$ | $(3 \pm 1.41)\ 10^4$ |
| *P. drechsleri* + (*T. viride* M+ *T. harzianum* Bi) | $(2 \pm 1.73)\ 10^3$ | $(4.8 \pm 4.94)\ 10^5$ | $(1.33 \pm 1.15)\ 10^3$ | $(9.8 \pm 0.38)\ 10^6$ |

Values are means of three replicate plates ± SE.

اعدادی که در متن جدول آمده‌اند میانگین سه تکرار هستند.

± showing SD of population in each treatment

علامت ± انحراف معیار جمعیت را در هر تیمار نشان می‌دهد.



www.SID.ir

Archive of SID

**جدول ۶**- جمعیت *P. drechsleri* و جدایه‌های *Trichoderma* (cfu/gr) در آزمایش آغشته کردن بذر به سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما

**Table 6-** Population of *P. drechsleri* and *Trichoderma* (cfu/g $^{-1}$) in seed treatment test.

| تیمارها<br>**Treatment** | ۱۰ روز پس از کاشت<br>**10 days after planting** | | ۴۰ روز پس از کاشت<br>**40 days after planting** | |
|---|---|---|---|---|
| | ***P. drechsleri*** | ***Trichoderma*** | ***P. drechsleri*** | ***Trichoderma*** |
| شاهد غیر آلوده healthy control | - | - | - | - |
| شاهد آلوده Infected control | $(2.66 \pm 0.57)\ 10^3$ | - | $2 \times 10^3$ | - |
| *T. virens* DAR74290 | - | $(1.3 \pm 0.69)\ 10^4$ | - | $10^5$ |
| *Trichoderma* sp. 96 | - | $(1.52 \pm 0.77)\ 10^5$ | - | $(7.66 \pm 0.73)\ 10^4$ |
| *T. harzianum* M | - | $(7.13 \pm 0.35)\ 10^5$ | - | $(1.7 \pm 0.35)\ 10^5$ |
| *T. harzianum* T39 | - | $(1.85 \pm 0.53)\ 10^5$ | - | $(3.36 \pm 0.26)\ 10^5$ |
| *T. viride* | - | $10^4$ | - | $(7.91 \pm 0.69)\ 10^5$ |
| *P. drechsleri* + *T. virens* DAR74290 | $(1.66 \pm 0.54)\ 10^3$ | $(1.69 \pm 0.26)\ 10^4$ | $(2.33 \pm 1.52)\ 10^3$ | $(2.17 \pm 2.33)\ 10^4$ |
| *P. drechsleri* + *Trichoderma* sp. 96 | $(1.66 \pm 0.52)\ 10^3$ | $(2.53 \pm 0.5)\ 10^4$ | $(1.33 \pm 1.15)\ 10^3$ | $(4.61 \pm 0.37)\ 10^4$ |
| *P. drechsleri* + *T. harzianum* M | $(2 \pm 1)\ 10^3$ | $(2.78 \pm 0.73)\ 10^5$ | $(2.66 \pm 0.57)\ 10^3$ | $(3.69 \pm 2.08)\ 10^5$ |
| *P. drechsleri* + *T. harzianum* T39 | $(1.66 \pm 1.3)\ 10^3$ | $(2.51 \pm 0.61)\ 10^5$ | $(2.66 \pm 2.51)\ 10^3$ | $(9.36 \pm 0.81)\ 10^5$ |
| *P. drechsleri* + *T. viride* | $(2.33 \pm 0.57)\ 10^3$ | $(1.12 \pm 2.66)\ 10^4$ | $(2 \pm 1.73)\ 10^3$ | $(2.67 \pm 1.66)\ 10^5$ |

Values are means of three replicate plates ± SE.

اعدادی که در متن جدول آمده‌اند میانگین سه تکرار هستند.

± showing SD of population in each treatment

علامت ± انحراف معیار جمعیت را در هر تیمار نشان می‌دهد.



www.SID.ir

Archive of SID

Sharifi-Tehrani & Nazari (2002) نیز افزایش وزن تر اندام هوایی با کاربرد قارچ *T. harzianum* در کنترل بیماری مرگ گیاهچه و در اثر قارچ *P. drechsleri* را مشاهده نمودند. جمعیت جدایه‌های تریکودرما و عامل بیماری در دو مرحله در طول رشد اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که جمعیت جدایه‌های تریکودرما در طول رشد با کاهش جدی مواجه نبوده است و تقریباً ثابت مانده است البته در بسیاری از موارد نیز افزایش نشان داده است. براساس مطالعات انجام شده (Etebarian *et al.*, 2000) جمعیت تریکودرما ۳۰ روز پس از کاشت $۱۰^{۵}$-$۱۰^{٤}$ در هر گرم از خاک گلدان بوده است. برخی مشاهدات نشان می‌دهد که حداقل جمعیت تریکودرما برای دستیابی به کنترل عامل بیماری ۱۰۵ cfu/g خاک است (Adam, 1990). بررسی‌های انجام شده در مورد اثر متالاکسیل روی رشد میسلیومی جدایه‌های تریکودرما موید این مسئله است که متالاکسیل روی این جدایه‌ها مؤثر نیست (مذاکرات شخصی با Charoenwet). بنابراین امکان استفاده توأم متالاکسیل و جدایه‌های تریکودرما مقدور است و موجب کاهش مصرف سم می‌شود.

مطالعه بیشتر در مورد مکانیزم‌های مؤثر، شناسایی متابولیت‌های آنتاگونیست‌ها و در سطح مولکولی شناسائی ژن‌های کدکننده ترشح آنزیم‌ها و سایر متابولیت‌ها و بررسی امکان انتقال ژن‌های مؤثر به گیاهان میزبان می‌تواند گام‌های مهم به سوی کنترل بهتر بیماری باشد.

---

**نشانی نگارندگان:** شبنم حیدری فاروقی و حمیدرضا زمانی‌زاده، گروه بیماری‌شناسی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ حسن‌رضا اعتباریان، گروه گیاه‌پزشکی مجتمع آموزش عالی ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران.



www.SID.ir