Archive of SID

مطالعه بیوکنترلی قارچ *Trichoderma atroviride* PTCC5220 علیه قارچ *Rhizoctonia solai* AG2-2 عامل بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند

امیر جلالی[۱]، مصطفی مطلبی[۲*]، و محمدرضا زمانی[۲]

[۱] اصفهان، میمه، مؤسسه آموزش عالی غیردولتی- غیرانتفاعی نوردانش

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۱۲

چکیده

قارچ تریکودرما، به دلیل ترشح انواعی از آنزیمهای کیتینازی، بعنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار می گیرد. این آنزیمها، غالباً با فرو پاشیدن اجزای ساختاری قارچها، به مبارزه با این عوامل بیماریزا می پردازند. از آنجا که جدایه *Trichoderma atroviride* PTCC5220 دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیمهای کیتینازی می باشد، بنابراین در این تحقیق در آزمایشات مایکوپارازیتی از این جدایه (*T. atroviride*) علیه قارچ *R. solani* عامل ایجاد بیماری پوسیدگی ریشه (root rot) در چغندرقند در شرایط میکروسکوپی و ماکروسکوپی و همچنین در مطالعات گلخانه‌ای استفاده گردید. مطالعه اثر بیوکنترلی قارچ *T. atroviride* بر قارچ *R. solani* به چهار روش کشت متقابل (dual culture) ، کشت روی اسلاید (slide culture) و مطالعه شرایط باز دارندگی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای نشان داد که قارچ *T. atroviride* می تواند با مکانیزمهای بیوکنترلی رشد قارچ بیماریزای *R.solani* را مهار نماید.

واژه های کلیدی: *Trichoderma atroviride*، *Rhizoctonia solani*، اثر آنتاگونیستی، سنجش زیستی، گروه آناستوموزی۲-۲

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤٥٨٠٣٦٣، پست الکترونیک:motalebi@nigeb.ac.ir

مقدمه

یکی از بیماریهای مهم چغندر قند که توسط قارچ *Rhizoctonia solani* AG2 ایجاد می شود بیماری پوسیدگی ریشه می باشد که باعث ایجاد خسارتهای سنگین به محصول این گیاه می گردد. براساس گزارشات موجود میزان خسارت این بیماری در کشتزارهای چغندرقند بعضی از مناطق ایران تا ۲۰ درصد می رسد. این در حالی است که بهمراه قارچ *R. solani* ، عوامل بیماریزای دیگری نیز فرصت فعالیت پیدا کرده به نحوی که میزان خسارت این بیماری را در بعضی از مناطق تا نزدیک ۵۰ درصد افزایش می دهد (۱).

یکی از راههای کنترل بیماریهای قارچی که خسارت زیادی را به گیاهان زراعی وارد می سازد استفاده از قارچ کشها در سطح وسیع می باشد که این امر باعث هزینه های سنگین می گردد. برای بسیاری از قارچها قارچ کش مناسب و مؤثری وجود نداشته و یا عده ای از قارچها خاکزی بوده لذا از قارچ کشها باید به مقدار زیاد استفاده شود که باعث آلودگی محیط زیست، آلودگی منابع آبهای زیرزمینی و محصولات کشاورزی می شود.

یکی از راههای مناسب جهت کنترل بیماریهای ناشی از قارچهای بیماریزا که تأثیر نامطلوب فوق را نیز نداشته باشد، استفاده از روشهای کنترل بیولوژیکی می باشد. قارچ تریکودرما یکی از قارچهای مهم بوده که بالقوه از عوامل کنترل بیولوژیک علیه قارچهای بیماریزا محسوب می گردد (۷ و ۹). بررسیها نشان می دهد که این قارچ با کنترل

www.SID.ir

Archive of SID

فلور میکروبی خاک در ناحیه ریزوسفر گیاهان، به افزایش رشد گیاه کمک می کند (٤). توانایی گونه های مختلف جنس تریکودرما در کنترل رشد بسیاری از قارچها و باکتریهای خاکزی، این قارچ را به عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی تبدیل کرده است.

مطالعه میکروسکوپی میان کنش قارچ *Trichoderma harzianum* و *R. solani* نشان می دهد که در اثر فعالیت قارچ مهاجم *T. harzianum*، ساختار دیواره قارچ میزبان دستخوش تغییر می شود. بررسیها نشان می دهد که در ابتدای فعالیت مایکوپارازیتی قارچ، رشته های میسلیوم تریکودرما به دور میسلیوم میزبان حلقه می زند و سپس، با نفوذ به داخل آن، به تغییر در ساختمان دیواره، بر هم زدن تعادل اسمزی، جدایی غشای پلاسمایی از دیواره و در نهایت، به بر هم ریختن ساختار سیتوپلاسم می انجامد (٥).

در این تحقیق تأثیر بیوکنترلی جدایه قارچ *T. atroviride* PTCC5220 علیه قارچ *R. solani* AG2-2 عامل ایجاد پوسیدگی ریشه در چغندرقند در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جدایه های *Trichoderma atroviride* PTCC5220 (تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای عفونی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران) و *R. solani* AG2-2 (اهدایی جناب آقای دکتر بنی هاشمی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز) در طول این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایشات قبلی این گروه نشان داده است که جدایه *Trichoderma atroviride* PTCC5220 درمیان ۳۰ جدایه مختلف قارچ *Trichoderma* مورد مطالعه دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیتینازی می باشد. جهت نگهداری قارچ از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده گردید. برای تهیه این محیط پودر PDA به میزان ۳۹ گرم در لیتر در آب مقطر حل شده و پس از سترون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش زیستی: جهت بررسی فعالیت ضد قارچی *T. atroviride* علیه قارچ *R. solani* عامل بیماری پوسیدگی ریشه (root rot) در چغندرقند از چهار روش زیر استفاده گردید:

الف- مطالعه مایکوپارازیتی قارچ *T. atroviride* (کشت متقابل): یک دیسک میسلیومی به ابعاد ۲×۲ میلی متر از محیط کشت هفت روزه قارچ *R. solani* و یک دیسک میسلیومی از کشت هفت روزه *T. atrovitide* در فاصله ۳ سانتیمتری از یکدیگر در پلیت حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲۱). قطر کلنیها پس از ٤٨, ۷۲ و ۹٦ ساعت اندازه‌گیری شد و از آنها عکسبرداری بعمل آمد.

ب- مطالعه بازدارندگی رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی: برای انجام این آزمایش از روش تغییر یافته Broglie و همکاران (۱۹۹۱)(٦) استفاده گردید. یک دیسک میسلیومی به ابعاد ۲×۲ میلی متر از محیط کشت هفت روزه قارچ *R. solani* در مرکز پلیت حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. هنگامی که قطر کلنی رشد یافته حدود ٤ سانتیمتر رسید، در چاهکهایی که در فاصله ٥ میلی متری از لبه کلنی قارچ رشد یافته ایجاد شده بود هر ۸ ساعت یکبار مقدار µl ۲۰ مخلوط آنزیمی (µl ۱۰ از محیط کشت تلقیح شده با قارچ *T. atroviride* و µl ۱۰ از بافر استات سدیم ۱۵ میلی مولار با pH برابر ٤) اضافه و بمدت دو روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد و از آن عکسبرداری گردید. از آب مقطر و محیط کشت تلقیح نشده با قارچ بعنوان شاهد استفاده گردید.

ج- مطالعه تأثیر متقابل قارچ *T. atroviride* و *R. solani* به روش کشت روی اسلاید: برای انجام این آزمایش از

www.SID.ir

Archive of SID

روش Sivakumar و همکاران (۲۰۰۰)(۲۳) استفاده گردید. یک لام آزمایشگاهی(اسلاید) تمیز روی دو میله شیشه ای L شکل در درون یک پتری دیش ۱۲ سانتیمتری قرار داده شده و سترون گردید. سپس مقداری water agar (۲ درصد) مذاب روی اسلاید ریخته شد تا یک لایه نازک آگار روی آن تشکیل گردد. دیسکهای میسلیومی کوچک مربوط به قارچ *T. atroviride* و قارچ پاتوژن (*R. solani*) در فاصله ۲ سانتیمتری از یکدیگر روی اسلاید قرار داده شدند. برای جلوگیری از خشک شدن چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر پلیت اضافه گردید. پلیتها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند, پس از رسیدن میسلیوم قارچها به یکدیگر اسلایدها در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفته و از آنها عکسبرداری شد.

د- مطالعه بازدارندگی قارچ *T. atroviride* در شرایط گلخانه ای: با توجه به اینکه در این تحقیق، اثر آلودگی قارچی روی ریشه گیاه چغندرقند و کنترل بیماری توسط عامل کنترل بیولوژیکی مد نظر بوده است بدین منظور از روش Aziz و همکاران (۱۹۹۷)(۲) همراه با تغییراتی استفاده گردید. همچنین جهت تهیه پودر حاوی جدایه قارچی برای تیمار خاک استریل از روش تغییر یافته Sneh & Ichielevich-Auster (۱۹۹۸)(۲۵) استفاده گردید. به ۲۰۰ گرم سبوس گندم ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد و ۲۵ میلی گرم کلرامفنیکل به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دو روز متوالی اتوکلاو گردید. پلیتهای حاوی محیط آماده شده با میسلیوم قارچ *Trichoderma* و یا *R. solani* تلقیح گردید. پس از ۱۰ روز نگهداری پلیتها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، محیط کشتها در شرایط سترون خشک و در لوله های ۱/۵ میلی‌لیتری تا هنگام استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

بذرهای چغندر قند نیز در محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی و با آب مقطر سترون شستشو و با کاغذ صافی سترون خشک گردیدند.

آزمایش در چهار گروه بشرح ذیل انجام گردید: گروه اول: خاک سترون تیمار شده با پودر حاوی کونیدیومهای جدایه قارچ *T. atroviride* بعنوان شاهد منفی (بمیزان ۲/۵ گرم بازای هر کیلو گرم خاک)، گروه دوم: خاک سترون تیمار شده با پودر حاوی جدایه قارچ *R. solani* بعنوان شاهد مثبت (۲/۵ گرم بازای هر کیلو گرم خاک)، گروه سوم: خاک استریل تیمار شده با مخلوطی از پودرهای حاوی قارچهای فوق الذکر (در این گروه مقادیر ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ گرم از پودر حاوی کونیدیومهای قارچ *T. atroviride* بازای هر کیلو گرم خاک مورد استفاده قرار گرفت. میزان پودر مربوط به قارچ *R. solani* در این تیمار یکسان و بمیزان ۲/۵ گرم بازای هر کیلو گرم خاک در نظر گرفته شد)، گروه چهارم: خاک سترون بدون تیمار با قارچ بعنوان گروه شاهد.

پس از اضافه کردن پودر قارچها، تمام خاکها به مدت دو هفته در رطوبت مناسب، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردیدند. سپس بذرهای سترون در آنها کشت داده شدند و به مدت ۲۱ روز در دما، رطوبت و دوره نوری یکسان رشد کردند. آزمایش در سه تکرار صورت گرفت.

گیاهچه‌های چغندر قند پس از ۲۱ روز از خاک خارج و پس از شستشو با آب مقطر سترون، میزان ضایعه ایجاد شده توسط *R. solani* در ریشه آنها از صفر تا ۱۰۰درصد درجه بندی و یادداشت برداری گردید.

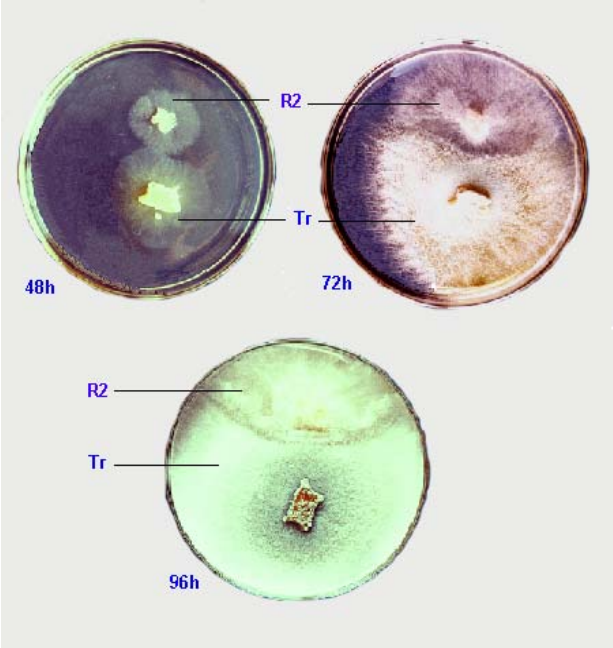
میزان تخریب ایجاد شده توسط جدایه *R. solani* روی ریشه گیاهچه های چغندر قند توسط میانگین وزنی داده‌های خام با استفاده ازرابطه $\Sigma ni\rho/N$ محاسبه گردید (در این رابطه ni تعداد گیاهچه‌هایی است که ریشه آنها دارای

www.SID.ir

Archive of SID

درصد آلودگیρ است و N تعداد کل گیاهچه‌های چغندر قند مورد آزمایش در گلدانها می‌باشد).

بمنظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده از نرم افزارSPSS استفاده گردید. در این برنامه، جهت مقایسه بین دو متغیر و بررسی معنی دار بودن اختلاف بین آنها از روش آنالیز واریانس(ANOVA) یک طرفه استفاده شده است. همچنین بمنظور مقایسه چند گروه از داده ها و دسته بندی گروهها، آزمون دانکن مورد استفاده قرار گرفت و اختلاف معنی دار بین گروه ها بررسی گردید.



شکل ۱- کشت متقابل (dual culture) قارچ *T. atroviride* (Tr) و *R. solani* (R2) در پلیت حاوی PDA در زمانهای ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت.

نتایج

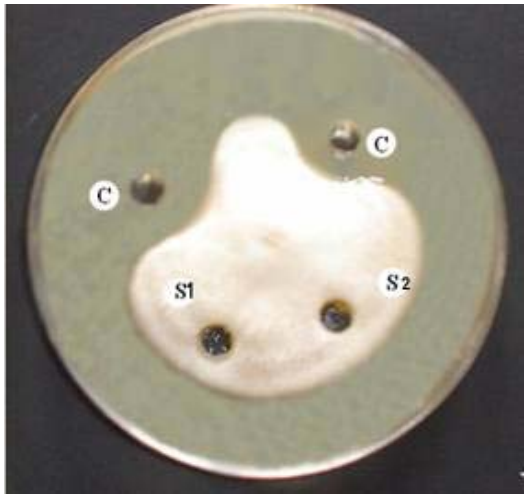
برای مطالعه اثر بیوکنترلی *T. atroviride* PTCC5220 بر قارچ *R. solani* AG2 عامل بیماری پوسیدگی ریشه در چغندرقند از چند روش استفاده گردید.

الف- مطالعه مایکوپارازیتی در کشت متقابل: در این روش پس از کشت قارچهای *T. atroviride* و *R. solani* در پلیت حاوی PDA به روش کشت متقابل و نگهداری آن، اثر متقابل آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که رشد قارچ *T. atroviride* در محیط کشت در طول زمان باعث کاهش رشد قارچ *R. solani* گردیده و نهایتاً رشد قارچ *R. solani* را مهار می نماید (شکل ۱).

ب- مطالعه بازدارندگی رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی: در این روش قارچ *R. solani* در مرکز پلیت حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد. پس از رشد قارچ، محیط کشت بدست آمده از رشد قارچ *T. atroviride* به حفره های تعبیه شده در اطراف کلنی قارچ رشد یافته اضافه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که پس از ٤٨ ساعت، میزان بازدارندگی رشد قارچ *R. solani* در اطراف حفره حاوی محیط کشت بدست آمده از قارچ *T. atroviride* در مقایسه با شاهد (آب مقطر سترون و نیز محیط کشتی که در آن قارچ *T. atroviride* کشت نشده باشد) بصورت هاله ای از عدم رشد (Inhibition zone) میسلیومهای قارچ مذکور قابل مشاهده می باشد (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



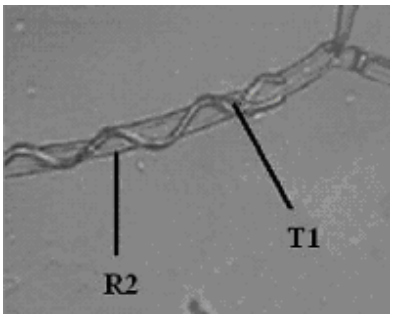
شکل ۲- اثر بازدارنده محیط کشت بدست آمده از رشد قارچ *T. atroviride* بر رشد میسلیومهای قارچ *R.solani* :

C - چاهک دارای محیط کشت القائی صاف شده قارچ *T. atroviride*

S1 - (شاهد) چاهک حاوی محیط کشت تلقیح نشده با قارچ

S2 - (شاهد) چاهک حاوی بافر فاقد آنزیم

ج- مطالعه تأثیر متقابل دو قارچ به روش slide culture: در این روش، قارچهای *T. atroviride* و *R. solani* در فاصله ۳ سانتیمتری روی لامهایی با پوشش نازکی از water agar کشت داده شده و ناحیه تماس میسلیوم قارچها زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. مشاهدات میکروسکوپی، پیچیدن میسلیومهای *T. atroviride*، و نیز تشکیل حلقه‌ها (coil) و قلابهایی توسط این قارچ بدور میسلیومهای قارچ *R. solani* و نیز نفوذ به درون آنها را نشان می‌دهد (شکل ۳).



شکل ۳- تصویر میکروسکوپی حاصل از اثر بیوکنترلی قارچ *T. atroviride* (T1) بر میسلیوم قارچ *R. solani* (R2)

د- مطالعه بازدارندگی قارچ *T. atroviride* در شرایط گلخانه ای: مطالعات گلخانه‌ای به منظور بررسی میزان کنترل بیولوژیکی قارچ *T. atroviride* علیه قارچ *R. solani* عامل ایجاد بیماری root rot در چغندرقند صورت گرفت. پس از آلوده کردن خاک سترون موجود در گلدانها با جدایه *R. solani* و جدایه *T. atroviride* و طراحی آزمایش در گروههای شاهد (خاک سترون)، شاهد مثبت (خاک آلوده با جدایه *R. solani*)، شاهد منفی (خاک آلوده با جدایه *T. atroviride*) و گروه تیمار (خاک آلوده با جدایه *R. solani*) و سه مقدار مختلف ۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم از پودر حاوی کونیدیومهای قارچ *T. atroviride*، بذرهای سترون شده چغندرقند در خاک این گلدانها کشت داده شدند. برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد و گیاهان در شرایط دمایی، نوری و رطوبتی یکسانی رشد داده شدند. پس از ۲۱ روز رشد، گیاهچه‌ها برای بررسی میزان ضایعات ایجاد شده توسط قارچ *R. solani* از خاک خارج و مورد مطالعه قرار گرفتند.

شکل ٤- درجات بیماریزایی قارچ *R. solani* (R2) در حضور *T. atroviride*(T1) در گیاه چغندر قند پس از ۲۱ روز رشد در شرایط گلخانه‌ای (از چپ به راست چغندر رشد کرده در خاک استریل، کنترل منفی،۵۰ درصد، ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد بیماریزایی)

نتایج به دست آمده نشان داد که گیاهچه های رشد یافته در خاک سترون (شاهد) و یا خاک آلوده با قارچ *T. atroviride* (شاهد منفی) هیچگونه علائمی از بیماری مورد نظر را نشان ندادند. ریشه گیاهچه های رشد یافته در خاک

www.SID.ir

Archive of SID

آلوده با قارچ *R. solani* (شاهد مثبت) تخریب زیادی را نشان می دادند. در محاسبات میزان ضایعات شاهد مثبت برابر صد در صد در نظر گرفته شد (شکل ٤). در گلدانهایی که گیاهچه ها در خاک آلوده با هر دو قارچ *R. solani* و *T. atroviride* رشد یافته بودند با توجه به مقادیر کونیدیوم به کار رفته از قارچ *T. atroviride* عوارض بیماری متفاوتی را از خود نشان می دادند (شکل ٤ و ٥).

شکل ٥ تأثیر سه مقدار مختلف از کونیدیهای *T. atroviride* بر میزان بیماریزایی قارچ *R. solani* در شرایط گلخانه‌ای روی گیاه چغندر قند را در مقایسه با شاهد نشان می‌دهد. افزودن پودر حاوی کونیدیومهای این قارچ بمیزان ۲/۵، ٥ و ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان سبب کاهش بیماریزایی قارچ *R. solani* بترتیب برابر ٤۲/۳، ٥٤ و ۷۳ درصد می‌گردد (شکل ٥). آنالیز واریانس یک طرفه داده ها (ANOVA) نیز وجود اختلاف معنی‌دار بین نمونه های مورد آزمایش در سطح ۰/۰٥ را نشان داد (جدول ۱). آنالیز نتایج با استفاده از آزمون دانکن نشان می‌دهد که گروههای شاهد (خاک سترون) و شاهد منفی (خاک تیمار شده با قارچ *T. atroviride*) با تیمارهای دیگر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). از طرف دیگر بین تیمارهایی که در آنها مقادیر متفاوت از کونیدیومهای *T. atroviride* به خاک آلوده با *R. solani* اضافه شده است با گروه شاهد مثبت (خاک آلوده شده با قارچ *R. solani*) تفاوت معنی‌دار دیده می‌شود. بعبارت دیگر افزایش مقدار قارچ *T. atroviride* در کاهش میزان بیماری‌پوسیدگی ریشه در چغندرقند مؤثر بوده است (جدول ۲).

جدول ۱- آنالیز واریانس یک طرفه مربوط به اثرات *Trichoderma atroviride* بر بیماری‌زایی قارچ *R. solani* روی چغندر قند در شرایط گلخانه‌ای

ANOVA

VAR00002

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	164.667	5	32.933	74.100	.000
Within Groups	5.333	12	.444		
Total	170.000	17			

جدول ۲- آزمون دانکن مربوط به اثرات ***T. atroviride*** بر بیماریزایی قارچ ***R. solani*** روی چغندر قند در شرایط گلخانه‌ای

Duncan[a]

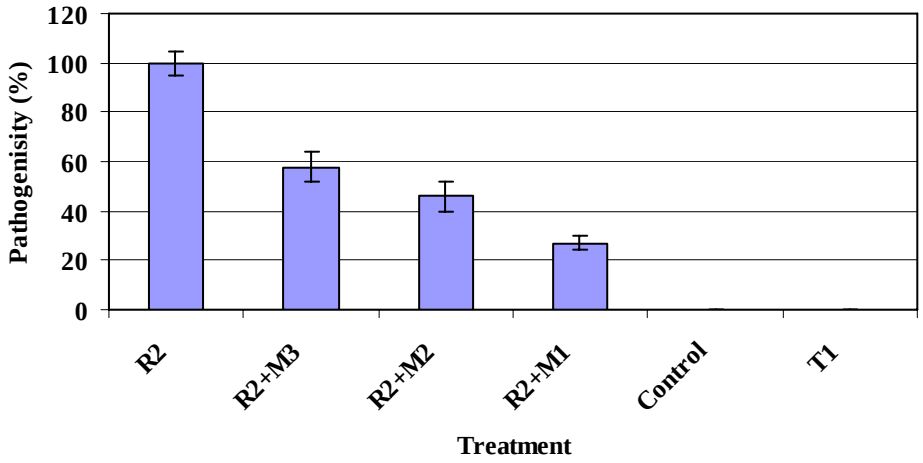
		Subset for alpha = .05			
VAR00001	N	1	2	3	4
Control	3	.0000			
T1	3	.0000			
R2+M1	3		2.3333		
R2+M2	3			4.0000	
R2+M3	3			5.0000	
R2	3				8.6667
Sig.		1.000	1.000	.091	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵) اثر قارچ (T1) *T. atroviride* بر کنترل بیماریزایی قارچ (R2) *R. solani* در گیاه چغندرقند. M1، M2 و M3 بترتیب ۱۰، ۵ و ۲/۵ گرم پودر حاوی کونیدی قارچ تریکودرما، control پودر حاوی کونیدی قارچ تریکودرما

تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده همچنین نشان می‌دهد که نمونه‌های مورد آزمایش در چهار دسته قرار می‌گیرند: دسته اول شامل گروه شاهد (گیاهچه های رشد یافته در خاک سترون) و گروه شاهد منفی (گیاهچه های رشد یافته در خاک آلوده شده با قارچ *T. atroviride*)، دسته دوم شامل تیماری است که در آن مقدار ۱۰ گرم از کونیدیومهای قارچ *T. atroviride* (M1) به خاک آلوده شده با قارچ *R. solani* اضافه شده است. در دسته سوم تیمارهایی قرار دارند که در آنها دو مقدار ۵ و ۲/۵ گرم از پودر حاوی کونیدیومهای *T. atroviride* (بترتیب M2 و M3) به خاک آلوده شده با *R. solani* اضافه شده است. بعبارت دیگر تیمار قارچ *R. solani* همراه با ۵ گرم از پودر حاوی کونیدیومهای *T. atroviride* (R2 + M2) دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار قارچ *R. solani* و ۲/۵ گرم از پودر حاوی کونیدیومهای *T. atroviride* (R2 + M3) نبوده و اثر این دو تیمار در کاهش بیماری تقریباً برابر می باشد. دسته چهارم شامل گروه شاهد مثبت (R2) (گیاهچه های رشد یافته در خاک آلوده شده با قارچ *R. solani*) می‌باشد که این تیمار با تمام نمونه‌های دیگر دارای اختلاف معنی‌دار می باشد.

بحث

گونه های مختلفی از قارچ *Trichoderma* sp. در کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بعنوان مثال از گونه *T. harzianum*، به تنهایی یا همراه سایر گونه‌های *Trichoderma*، در کنترل بیماریهای ناشی از قارچ *Rhizoctonia* در ترب (۱۸)، در ذرت و سویا (۱۵)، در کنترل بیماری کپک خاکستری (Grey mould) گوجه فرنگی (۲۰)، در انگور و توت فرنگی (۸) در کنترل بیماریهای ناشی از قارچ *Colletotrichum* (۲۷) و گونه های *Phytophthora* spp. (۲٤) در سیب، قارچ *R. solani* در خیار (۱۷) و انواع دیگری از بیماریهای قارچی از جمله بیماریهای ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* در نخود (۱٤)، *S. minor* در کاهو (۲۸)، *Verticillium dahliae* در کتان (۱۹)، *Fusarium udum* در نخود فرنگی (۲۲) و بیماری ناشی از *F. oxysporum* در گوجه فرنگی (۱٦) استفاده شده و نشان داده شده است که در کنترل این بیماریها نقش داشته اند. بررسیهای آزمایشگاهی نیز، نقش مهاری *T. harzianum* در کشتهای *Sclerotium rolfsii* و *R. solani* و نژاد تراریخت *T. virens* Gv29-8 در کشت *R. solani* را تأیید می‌کند (۳). گونه های *T. virens* و *T. longibrachiatum* در کنترل بیماری ناشی از *R. solani* در ساقه و ریشه گیاه بادام زمینی نقش مؤثری ایفا کرده‌اند (۲٦). علاوه بر این نشان داده شده است که بکار بردن

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ *T. virens* همراه با قارچ کشهای شیمیایی، اثر این مواد را به نحو چشمگیری افزایش می‌دهد (۱۳).

برخی از قارچهای *Trichoderma* sp. با ترشح آنزیمهای هیدرولیز کننده باعث تجزیه دیواره سلولی غنی از کیتین قارچهای بیماریزا می گردد (۵). از جمله مهمترین آنزیمهای هیدرولیتیک که توسط قارچهای تریکودرما تولید می شوند آنزیمهای کیتینازی می باشند (۱۱ و ۱۲). کیتینازها آنزیمهای هیدرولازی هستند که بیوپلیمر کیتین را با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی β-1,4 به زیر واحدهای تشکیل دهنده آن یعنی N–استیل گلوکز آمین تجزیه می‌نمایند. این آنزیمها با تجزیه اجزای سازنده دیواره قارچها باعث کنترل عوامل بیماریزا می شوند. از آنجا که در تحقیقات قبلی نشان داده شده است که جدایه *T. atroviride* در میان ۳۰ جدایه مختلف قارچ تریکودرما در سنجش فعالیت آنزیمهای کیتینازی دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بوده است (۱۰)، بنابراین در این تحقیق در آزمایشات مایکوپارازیتی از این جدایه (*T. atroviride*) علیه قارچ *R. solani* عامل ایجاد بیماری پوسیدگی ریشه در چغندرقند که خسارت زیادی به این محصول وارد می نماید، در شرایط میکروسکوپی و ماکروسکوپی و همچنین در مطالعات گلخانه‌ای استفاده گردید.

مطالعه اثر بیوکنترلی قارچ *T. atroviride* بر قارچ *R. solani* به روش کشت متقابل نشان داد که قارچ *T. atroviride* قادر است رشد قارچ *R.solani* را کاهش داده و متوقف نماید. در آزمایش کشت روی اسلاید که اثر متقابل قارچ *T. atroviride* بر قارچ بیماریزای *R.solani* مطالعه شد نیز نشان داده شد که میسلیومهای قارچهای تریکودرما به دور میسلیومهای *R. solani* پیچیده و با ایجاد ساختارهای حلقه و قلاب مانند به دور آنها، به درون میسلیومهای این قارچ نفوذ نموده و از این طریق از رشد قارچ بیماریزا ممانعت به عمل می آورد. این نتایج با گزارش Benhamou & Chet (۱۹۹۳)(۵) که نقش آنتاگونیستی *T. harzianum* علیه *R. solani* را مورد مطالعه قرار داده بودند مطابقت دارد.

همچنین محیط کشت به دست آمده از رشد قارچ *T. atroviride* قادر به بازدارندگی رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی می باشد که می تواند نشان دهنده ترشح آنزیمهای کیتینازی در محیط کشت قارچ باشد. این نتایج در مقایسه با نتایج گزارش شده توسط Broglie و همکاران (۱۹۹۱)(٦) میزان باز دارندگی بیشتری را نشان می دهد.

نتایج بررسیهای آزمایشگاهی در این تحقیق نشان داد که قارچ *T. atroviride* دارای پتانسیل کنترل بیولوژیکی مناسبی بوده و احتمالاً این قابلیت را دارد که در شرایط گلخانه‌ای نیز شدت بیماریزایی قارچهای بیماریزا را کاهش دهد. بدین منظور اثر این قارچ در شرایط گلخانه ای نیز بر قارچ *R. solani* مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید که اثر بیماریزایی *R. solani* تحت تأثیر قارچ *T. atroviride* کاهش چشمگیری پیدا کرده است (بمیزان ۷۳ درصد).

در مجموع نتایج به دست آمده از اثر آنتاگونیستی قارچ *T. atroviride* بر قارچ *R. solani* در این تحقیق نشان می دهد که می‌توان از جدایه *T. atroviride* بعنوان یک عامل مؤثر کنترل بیولوژیک، برای کنترل قارچ بیمارگر *R. solani* (پس از مطالعات زیست محیطی) استفاده نمود.

منابع

۱- بی نام، ۱۳۸۲. بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند. خبرنامه شکر شکن، شماره ۸۱- خبرنامه علمی- تخصصی. شرکت توسعه نیشکر و توسعه جانبی.

www.SID.ir

Archive of SID

2- Aziz, N. H., El-Fouly, M. Z. El-Essawy, A. A. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. Bot. Bull. Acad. Sin. *38*: 33-39.

3- Baek, J., M.,, Howell, C. R., Kenerley, C. M. 1999. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. Curr Genet *35:* 41-50.

4- Baker R. 1988. Trichoderma sp. as plant-growth stimulants. Critical reviews in Biotechnology *7:* 97-106.

5- Benhamou, N., Chet, I. 1993. Hyphal Interaction Between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and Gold Cytochemistry of the Mycoparasitic Process. Phytopathology *83:* 1062-1071.

6- Broglie K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle PH., Knowlton S., Mauvais C.J., and Broglie R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science 254: 1194-1197.

7- Cohen-Kupiec R., Chet I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. Current Opinion in Biotechnology *9:* 270-277.

8- Elad Y., O. N. T., Cohen A., Schtlenberg O. 1995. Factors influencing control of gray mold by means of Trichodex (*Trichoderma harzianum* T39) under field conditions. In Fifth international *Trichoderma* and *Gliocladium* workshop (Beltsville).

9- El-Katatny M. H., W. Somitsch, K. H. Robra, M. S. El-Katany and G. M. Gubitz. 2000. "production of chitinase and beta-1, 3-glucanase by *T. harizianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotinum rolfsii*. Food Technology and Biotechnology, 38: 173-180.

10- Harighi M.J., Motallebi M., and Zamani M.R. 2006. Purification of chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. Iranian Journal of Biology. 19(2): 203- 214.

11- Harman G.E., T. A. G., Stasz T.E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Disease *73:* 631-637.

12- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. Phytopathology *83:* 313-318.

13- Howell C. R., DeVay, J. E., Garber R. H., Batson W. E. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. Journal of Cotton Science *1:* 15-20.

14- Knudsen G. R., Eschen D. J. 1991. Potential for biocontrol of *sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. Plant Disease *75:* 466-480.

15- Kommedahl T., Windels C. E. , Sarbini G., Wiley H. B. 1981. Variability in performance of biological and fungicidal seed treatments in corn, peas and soybeans. Protection Ecology *3:* 55-61.

16- Larkin, R. P., Fravel, D. R. (1998). Efficacy of Various Fungal and Bacterial BIocontrol Organisms for Control of Fusarium Wilt of Tomato. Plant Dis. *82*, 1022-1028.

17- Lewis J. A., Papavizas G. C. 1980. Integrated control of Rhizoctonia fruit rot of cucumber. Phytopathology *70*: 85-89.

18- Lifshitz R., L. S., Baker R. 1985. Decrease in incidence of Rhizoctonia preemergence damping-off by the use of integrated and chemical controls. Plant Disease *69:* 4341-4344.

19- Linda, E. H. 2000. Reduction of Verticillium Wilt Symptoms in Cotton Following Seed Treatment with *Trichoderma virens*. The Journal of Cotton Science *4:* 224-231.

20- Migheli Q., H.-E. A., Avantaneo M., Gullino M. L. 1994. Fate of transformed *Trichoderma harzianum* in the phylloplane of tomato plants. Molecular Ecology *3:* 153-159.

21- Nielsen, M. N., Sorensen, J., Fels, J., Pedersen, H. C. 1998. Secondary Metabolite- and Endochitinase-Dependent Antagonism toward Plant-Pathogenic Microfungi of *Pseudomonas fluorescens* Isolates from Sugar Beet Rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology *64:* 3563-3569.

22- Prasad, R. D., Rangeshwaran, R., Hegde, S. V., Anuroop, C. P. 2002. Effect of soil and seed aplication of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused bt *Fusarium udum* under field conditions. Crop Protection *21:* 293-297.

23- Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R. S., Wijesundera, R. L. C., Marikar, F. M. T., Abeyessekere, M. 2000. Antagonistic Effect of *Trichoderma harzianum* on Posharvest Pathogen of Rambutan(*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica *28(3):* 1-7.

www.SID.ir

Archive of SID

24- Smith, V. L., Wilcox, W. F., Harman, G. E. 1990. Potential of Biological Control of Phytophthora Root and Crown Rots of Apple by *Trichoderma* and *Gliocladium spp.* Phytopathology *80:* 880-885.

25- Sneh, B., Ichielevich-Auster, M. (1998). Induced Resistance of cucumber Seedling Caused by Some non-pathogenic Rhizoctonia (np-R) Isolates. Phytoparasitica *26(1)*, 27-38.

26- Sreenivasaprasad S., Manibushanrao K. 1993. Efficacy of *Gliocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. International journal of Pest Management *39:* 167-171.

27- Tronsmo A., Hjeljord L. G. 1995. *Trichoderma harzianum* used in biological control of diseases on apples in Norway. In Fifth international *Trichoderma* and *Gliocladium* workshop (Beltsville).

28- Vanacci G., Pecchia S., Mallegni C., Cortellini W., Faccini F. 1991. Biocontrol of Sclerotinia lettuce drop. Petria *1:* 140-141.

Study of biocontrol activity of *Trichoderma atroviride* PTCC5220 against *Rhizoctonia* solani AG2-2, the causal agent of root rot in sugar beet

Jalali A.[1], ., Motallebi M.[2], and Zamani M.R.[2]

[1] Nour Danesh Institute of Higher Education, Meymeh, Isfahan, I.R. of Iran

[2] National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Filamentous fungi such as *Trichoderma* spp. Produce a variety of chitinases that degrade chitin and play an important role in biological control of fungal diseases. In this research *Trichoderma atroviride* an over producer of chitinase enzyme among 30 *Trichoderma* spp. isolates used for study of antagonistic effects on phytopathogenic fungus, *Rhizoctonia solani* (causal agent of root rot disease in sugar beet). Results of dual culture, slide culture, *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated the ability of *T. atroviride* inhibitory effect on *R. solani* mycelial growth.

Keywords: *Trichoderma atroviride*, *Rhizoctonia solani*, Antagonistic effect, Bioassay, AG2-2

www.SID.ir