Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤١، ١٣٨٤

اثرات آنتاگونیستی گونه‌های *Trichoderma* روی قارچ *Phytophthora capsici*، عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل*

Antagonistic effects of *Trichoderma* species on *Phytophthora capsici,* the causal agent of pepper root and crown rot

کیوان بهبودی**، عباس شریفی‌تهرانی، قربانعلی حجارود و جواد زاد**
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

دریافت ١٣٧٨/٢/٩ پذیرش ١٣٨٤/٤/٢٩

چکیده

در این بررسی اثر ٢٤ جدایه از جنس *Trichoderma* روی قارچ *Phytophthora capsici* عامل بوته‌میری فیتوفتورایی فلفل آزمایش شد. از این تعداد ١٢ جدایه از مزارع فلفل کرج و ورامین جداسازی گردید و ١٢ جدایه دیگر از موسسات تحقیقاتی دریافت شد. با استفاده از روش کشت متقابل (Dual culture) پنج جدایه موثر بر علیه قارچ *P. capsici* انتخاب شد. در مشاهدات ماکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه‌های تریکودرما علیه قارچ *P. capsici* مشخص شد که کلیه جدایه‌های آنتاگونیست بعد از متوقف نمودن رشد بیمارگر شروع به پیشروی، استقرار و اسپورزایی روی میسلیوم آن نمودند. زمان کلنیزاسیون جدایه‌ها متفاوت بود و سه جدایه T.v12، T.v5 و T.v3 سرعت کلنیزاسیون بیشتری نسبت به دو جدایه دیگر داشتند. جدایه T.k19

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تهران

** مسئول مکاتبه

در درجه دوم و جدایه T.h2 سرعت پیشروی، کلنیزاسیون و اسپورزایی کمتری نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

سایرین داشت. بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه‌های آنتاگونیست و قارچ بیمارگر نشان داد که، ریسه‌های جدایه‌های آنتاگونیست با تماس به موازات ریسه‌های قارچ بیمارگر رشد کرده، با گذشت زمان این تماس‌های ریسه افزایش می‌یافت و در نهایت باعث تخریب میسلیوم‌های قارچ شدند. ترکیبات فرار کلیه جدایه‌های مورد آزمایش از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر جلوگیری به‌عمل آوردند و تاثیر جدایه T.v5 بیشتر از سایر جدایه‌ها بوده که از رشد بیمارگر به میزان ۱۰۰ درصد ممانعت کرد. ترشحات مایع خارج سلولی T.v3، T.h2، T.v5، T.v12 و T.k19 در غلظت ۲۵ درصد به ترتیب دارای ۱۰۰، ۸۳/۳، ۷۲، ۶۵/۴ و ۶۰/۷ درصد اثرات بازدارندگی بودند. در شرایط گلخانه کاربرد مایه تلقیح (سبوس گندم) جدایه‌های T.v3، T.h2، T.v5، T.v12 و T.k19 به ترتیب ۱۵ ، ۳۰، ۴۰، ۳۰ و ۲۰ درصد باعث کاهش بوته‌میری فلفل گردید.

واژه‌های کلیدی: فلفل، کنترل بیولوژیکی، گونه‌های تریکودرما، *Phytophthora capsici*

مقدمه

استفاده از میکروارگانیسمهای آنتاگونیست برای مبارزه با عوامل بیماریزای قارچی گیاهان یکی از روش‌های موثر جهت کاهش مصرف سموم و در نتیجه جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست است. یکی از موفق‌ترین و پرمصرف‌ترین میکروارگانیسم‌ها که باعث جلوگیری از خسارت قارچ‌ها در گیاهان می‌شود گونه‌های مختلف جنس تریکودرما (*Trichoderma* Presoon: Fr.) است (Harman and Hadar 1983; Papavizas 1985; Chet 1987; Harman *et al.* 1989; Lynch 1990; Grondona *et al.* 1997; Chet *et al.* 1998; Hermosa *et al.* 2001; Paulitz *et al.* 2001). تریکودرما از قارچ‌های ناقص و از راسته *Hyphales* است و تلئومورف آن گونه‌های جنس *Hypocrea* می‌باشد. بطور کلی تخریب بیولوژیکی اندام‌های تکثیری، بقاء و تولید مثل، تضعیف و بیرون راندن عوامل بیماریزا از بقایای گیاهی و جلوگیری از تشکیل مایه آلودگی سه روش اساسی هستند که مبارزه بیولوژیکی به موجب آن محقق می‌شود (Cook & Baker 1983). قارچ تریکودرما ازجمله عوامل زنده‌ای است که می‌تواند سه مکانیسم فوق را تواماً انجام دهد و در نتیجه از آن به عنوان یک قارچکش بیولوژیک، افزایش دهنده رشد گیاه و فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید استفاده می‌شود. *بنهامو* و چت

www.SID.ir

Archive of SID

(Benhamou & Chet 1993) در بررسی میکروسکوپی تعامل بین *Trichoderma harzianum* Rifai و *Rhizoctonia solani* Kuehn تماس ریسه دو قارچ را مشاهده کردند، سپس قارچ آنتاگونیست ضمن پیچش (Coiling) در طول ریسه قارچ بیمارگر، مکینه‌هایی بداخل سلول‌های قارچ میزبان فرستاد و سبب قطعه قطعه شدن میسلیوم گردید. کلنیزه‌شدن میسلیوم و اسکلروت قارچ *R.solani* عامل پوسیدگی بذر، ریشه و مرگ گیاهچه لوبیا توسط قارچ تریکودرما بوسیله *بازگیر* و همکاران (۱۹۹۱) در آزمایشگاه مطالعه شد و مشخص گردید که برخی از جدایه‌ها ضمن آنکه میکوپارازیت‌های قوی می‌باشند، با تولید ترکیبات مایع و فرار در ریسه‌های قارچ عامل بیماری نفوذ کرده و با قطعه قطعه کردن میسلیوم‌ها، مانع رشد آن‌ها می‌شوند. *امیرصادقی* و همکاران (۱۹۹۲) ابتدا تماس ریسه، سپس پیچش (حالتCoiling) بین ریسه تریکودرما و قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.)deBary را مشاهده کردند و میکوپارازیتیسم و انهدام اسکلروت را متذکرشده‌اند. *لو* و همکاران (Luo *et al.* 1990) نشان دادند که *Trichoderma viride* Pers. ex. Gray هنگامی که به میزان ۱۰۰ اسپور به هر گرم خاک اضافه شود، باعث تخریب بیش از ۹۰ درصد اسکلروت‌های قارچ *S. sclerotiorum* می‌شود. کیم (Kim 1989) و کیم و همکاران (Kim *et al.* 1990) گونه *T. harzianum* را به صورت دو نوع فرمولاسیون (گرانول و تکثیر شده روی سبوس گندم و برنج) بر علیه پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل که در اثر قارچ *Phytophthora capsici* Leonian ایجاد می‌شود، در مزرعه آزمایش کردند. نتایج نشان داد که هر دو فرمولاسیون در جلوگیری از خسارت عامل بیماری مؤثر بودند. موضوع دیگر در مکانیسم قارچکشی این ارگانیسم رقابت است. اغلب عوامل بیماریزا مرحله ساپروفیتی خود را روی بقایای گیاهی و مواد آلی در حال فساد خاک طی می‌کنند. با توجه به اینکه تریکودرما از میزان رشد و قدرت رقابت ساپروفیتی بالایی برخوردار است وقتی همراه سایر میکروارگانیسم‌ها از جمله عوامل بیماریزا در محیط معینی قرار گیرد خیلی سریع بقایای گیاهی را اشغال کرده و ضمن استقرار و افزایش جمعیت خود مانع از استقرار و افزایش جمعیت سایر میکروارگانیسم‌ها منجمله قارچ‌های بیماریزا می‌گردد و در صورتیکه عوامل بیماریزا به حیطه فعالیت آن نزدیک شوند بوسیله دو مکانیسم اول یعنی میکوپارازیتیسم و آنتی‌بیوزیس آنها را از بین خواهد برد (Ousley *et al.* 1994). تحقیقات مختلف از جمله تحقیق *وینده‌ام* و همکاران

www.SID.ir

Archive of SID

(Windham *et al.* 1986) نشان میدهد که ترشحات تریکودرما حاوی فاکتور تنظیم کننده رشد هستند که باعث افزایش جوانه‌زدن بذور و افزایش رشد گیاه می‌گردد. از طرفی افزایش رشد بعلت کنترل بیمارگرهای ثانوی (Minor pathogens) نیز می‌باشد و در نتیجه سبب افزایش رشد ریشه و جذب بیشتر مواد غذایی می‌شود (Ousley *et al.* 1993). وجود آنزیم‌های مختلف تجزیه کننده دیواره سلولی بیمارگر و بافت گیاهی مانند سلولاز، لامیناریناز، بتا – ۱و ۳ گلوکاناز، کیتیناز و کیتوبیاز در ترشحات تریکودرما باعث می‌شود که بافت‌های گیاهی و دیواره ریسه سریعتر تجزیه شوند (Dipietro *et al.* 1993, Lorito *et al.* 1993, Papavizas 1985, Dickinson *et al.* 1995, Carsolio *et al*. 1999, Kullnig *et al*. 2000, Bolar *et al*. 2000, Kubicek *et al*. 2001). با تجزیه ترکیبات، مواد غذایی لازم برای باکتری‌های خاک آماده می‌شود و جمعیت آن‌ها افزایش یافته و به این ترتیب فعالیت بیولوژیک خاک افزایش می‌یابد و مالاً باعث محدود شدن فعالیت عوامل بیماریزا می‌گردد (Ousely *et al.* 1994).

روش بررسی

۱- تهیه جدایه‌های تریکودرما

در این بررسی ۱۲ جدایه تریکودرما از خاک مزارع فلفل کرج، ورامین و پیشوا جداسازی و خالص گردید. همچنین ۱۲ جدایه تریکودرما از سایر منابع شامل: دو جدایه تریکودرما از روحانی (دانشگاه بوعلی همدان)، چهار جدایه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، چهار جدایه تریکودرما از علیزاده (دانشگاه کرمان، دانشکده کشاورزی جیرفت)، یک جدایه تریکودرما از امیرصادقی (موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران) و یک جدایه تریکودرما از شهریاری (موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین) دریافت شد. بعد از بررسی مقدماتی این جدایه‌ها که با استفاده از روش کشت متقابل (dual-culture) با قارچ *P. capsici* انجام شد، از بین آنها ۵ جدایه موثر بر علیه قارچ *P. capsici* انتخاب شد. معیار انتخاب سرعت رشد، قدرت کلنیزاسیون و اسپورزایی روی کلنی *P. capsici* در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد بود. آنتاگونیستهایی که در مدت زمان کمتر تشتک پتری را پر می‌کردند و توانایی پوشاندن *P.capsici* را داشتند و بطور کامل روی *P. capsici* اسپورزایی

www.SID.ir

Archive of SID

کردند و زمان کلنیزاسیون کمتری داشتند برای آزمایشهای بعدی انتخاب شدند. برای هر تیمار سه تشتک (سه تکرار) استفاده شد و حاوی محیط کشت BA (مخفف bean agar است) بود. محیط BA حاوی عصاره ۶۰ گرم لوبیا و ۱۵ گرم آگار است. مشخصات ۵ جدایه مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱– خصوصیات گونه‌های آنتاگونیست مورد استفاده

Table 1. Characteristic of antagonistic species used

گونه قارچ (Fungal species)	جدایه* Isolate	منبع تهیه(Source)
Trichoderma viride	T.v12	مزرعه فلفل کرج محله اصفهانی‌ها
T. koningii Oud.	T.k19	سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
T. harzianum	T.h2	روحانی، دانشگاه بوعلی سینا
T. viride	T.v3	امیرصادقی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی
T. virens (M., G. & F.)Von Arx.	T.v5	مزرعه فلفل کرج

*در سایر قسمت‌ها از نام های اختصاری این جدول استفاده خواهد شد.

* The abbreviation in this table would be used in other parts.

همچنین برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما از روش داوه (Davet 1977) استفاده گردید.

۲- تهیه جدایه بیمارگر

۲-۱- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از مناطق پیشوا، عسکرآباد ورامین، مزرعه دانشکده کشاورزی کرج، مزرعه موسسه اصلاح نهال و بذر، کمال‌آباد ورامین و محله اصفهانی‌های کرج جمع‌آوری شد. فلفل‌های آلوده ابتدا توسط بیلچه از خاک بیرون آورده شد و سپس قسمت‌های هوایی حدود ۳۰ سانتی‌متر بالاتر از طوقه قطع گردید و قسمت باقیمانده همراه با ریشه داخل کیسه نایلون گذاشته و به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله نسبت به جداسازی عامل بیماری اقدام گردید.

۲-۲- جداسازی عامل بیماری

قسمت‌های بریده شده در زیر آب شیر شسته شد تا عاری از خاک شود. سپس ۲ الی ۳

www.SID.ir

Archive of SID

سانتی‌متر بالا و پایین حد فاصل قسمت سالم و بیمار جدا شد و در نتیجه ۴ الی ۶ سانتی‌متر قسمت میانی باقی ماند، سپس آن را با پنبه اشباع شده با الکل ۹۶ درصد ضدعفونی کرده و ساقه‌ها به اتاق کشت منتقل و در شرایط استریل پوست ساقه به وسیله تیغ برداشته شد و از حد فاصل قسمت سالم و آلوده قطعاتی به قطر ۲ الی ۴ میلی‌متر برداشته و آن‌ها را بوسیله پنس استریل درون محیط کشت CMA و درون محیط کشت نیمه انتخابی PARPH (Mitchell and Kannwischer-Mitchell 1992) فرو کرده (برای هر گیاه ۳ تشتک پتری و هر تشتک ۵ قطعه) و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و پس از رشد با استفاده از روش تک ریسه کشت خالص تهیه گردید. سپس قطعاتی به قطر ۵ میلی‌متر به تشتک پتری حاوی آب مقطر سترون منتقل شدند و جهت تولید اسپورانژیوم در زیر نور سه عدد لامپ مهتابی ۴۰ وات به ارتفاع ۳۰ سانتی متر به مدت ۲ الی ۳ روز در دمای ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نسبت به تشخیص آن‌ها تا حد گونه اقدام شد و نمونه‌هایی از این قارچ جهت کارهای بعدی در لوله حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار و در آب مقطر استریل در دمای اطاق نگهداری شدند.

۳- بررسی مکانیسم تأثیر جدایه‌های تریکودرما روی *P. capsici* در شرایط آزمایشگاه

۱-۳- بررسی ماکروسکوپی تاثیر جدایه‌های تریکودرما روی *P. capsici*

در یک طرف تشتک حاوی محیط کشت BA دیسکی به قطر ۸ میلی‌متر از حاشیه کشت ٤ روزه *P. capsici* قرار داده شد. سپس تشتک پتری در انکوباتور برای مدت ۳ روز با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا فیتوفتورا رشد نماید. پس از آن در طرف مقابل دیسکی به قطر ۸ میلی‌متر از حاشیه کشت ۳ روزه یک جدایه آنتاگونیست قرار گرفت. بعد از آن ظروف تشتک در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. با بازدید روزانه تشتک‌ها توانایی جدایه‌های مختلف تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیومی *P. capsici*، سرعت پیشروی جدایه‌های آنتاگونیست روی میسلیوم *P. capsici* پس از متوقف نمودن رشد آن و اسپورزایی آنتاگونیستها روی کلنی بیمارگر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند.

۲-۳- بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر جدایه‌های مختلف *تریکودرما* روی *P. capsici*

به منظور مشاهده نحوه ارتباط ریسه‌های جدایه‌های مختلف تریکودرما با ریسه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

P. capsici از نظر پارازیته کردن، لیز کردن به شرح زیر عمل شد:

الف- یک لام حاوی لایه نازکی از محیط کشت BA روی یک کاغذ صافی استریل و مرطوب در یک تشتک پتری استریل قرار داده شد. در یک طرف لام حلقه‌ای به قطر ۳ میلی‌متر از کشت جوان و ٤ روزه *P. capsici* گذاشته شد. سپس تشتک پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز قرار گرفت. بعد از این مدت در طرف دیگر لام حلقه‌ای به قطر ۳ میلی‌متر از کشت جوان و ۳ روزه جدایه آنتاگونیست گذاشته و دوباره تشتک پتری‌ها به همان انکوباتور انتقال داده شد (برای هر جدایه از قارچ آنتاگونیست ۵ تشتک پتری در نظر گرفته شد). بعد از هر ٢٤ ساعت سه تشتک پتری از هر جدایه از نظر نحوه تاثیر آنتاگونیست روی عامل بیماریزا در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. این عمل تا ۵ روز ادامه یافت (*امیرصادقی* و همکاران ۱۹۹۲).

ب- محیط کشت BA را درون تشتک پتری ریخته و پس از منعقد شدن، در یک طرف تشتک پتری قارچ فیتوفتورا کشت داده شد. تشتک پتری‌ها به مدت ۳ روز در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در گوشه دیگر تشتک پتری جدایه‌های تریکودرما کشت داده شد. در هنگام گذاشتن اینوکولوم قارچ آنتاگونیست، لام‌های تمیز و ضدعفونی شده با الکل پس از عبور از روی چراغ الکلی (به منظور ضدعفونی و گرم کردن آن) در وسط تشتک پتری بین ریسه‌های قارچ فیتوفتورا و جدایه‌های قارچ‌های تریکودرما قرار داده شد. بدین‌ترتیب همزمان با رشد هر دو قارچ بیماریزا و جدایه‌های آنتاگونیست پس از ۲ الی ۳ روز ریسه‌های آن‌ها روی لام آمده و با هم برخورد کردند سپس با برداشتن لام و با قرار دادن آبی پنبه (cotton blue) روی آن‌ها در زیر میکروسکوپ نحوه تاثیر جدایه‌های تریکودرما روی فیتوفتورا مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش ۵ تشتک پتری به ازای هر جدایه آنتاگونیست کشت و لام گذاری گردید (*امیرصادقی* و همکاران ۱۹۹۲).

۳-۳- بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) *تریکودرما* در جلوگیری از رشد مسیلیوم *P. capsici* در شرایط آزمایشگاه

این آزمایش طبق روش *دنیس و وبستر* (Dennis & Webster 1971a) انجام شد. برای تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

ترشحات مایع خارج سلولی (ترشحات غیرفرار) از جدایه‌های آنتاگونیست، جدایه‌ها بطور جداگانه در محیط کشت داوه (Davet 1979) فاقد ترکیبات سمی کشت داده شدند. برای این منظور ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت درون ارلن‌مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ارلن‌ها توسط جدایه‌ها مایه کوبی شدند (به هر ارلن‌مایر ۱ میلی‌لیتر حاوی۲۰۰ میلیون اسپور از هر یک از جدایه‌ها اضافه شد). در ارلن‌مایر شاهد به جای اسپور قارچ آنتاگونیست ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. ارلن‌ها روی دستگاه شیکر (shaker) با ۷۰ تکان در دقیقه در محیط آزمایشگاه و به مدت ۸ روز نگهداری شدند. سپس محتویات ارلن‌ها بطور جداگانه و توسط دستگاه پمپ خلاء و صافی‌های میکروبیولوژیک با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (ساخت کارخانه میلی پور Millipore) عصاره‌گیری گردید. پس از آن اثر عصاره حاصل از هر یک از جدایه‌های مذکور در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ فیتوفتورا مطالعه شد. برای این کار در داخل لوله‌های آزمایش مقدار ۱۸، ۱۷، ۱٦و ۱۵ میلی‌لیتر محیط BA ریخته شد. لوله‌ها پس از استریل شدن در حمام ماری با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ثابت شدن دمای محیط کشت، با استفاده از پیپت استریل به ترتیب ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌لیتر از عصاره هر یک از آنتاگونیست‌ها به محیط کشت داخل لوله‌ها اضافه گردید. پس از آن محتویات لوله‌ها در تشتک پتری‌های استریل به قطر ۹ سانتی‌متر ریخته شد. به این ترتیب نسبت‌های ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد از عصاره هر جدایه آنتاگونیست در محیط کشت BA در داخل تشت پتری‌ها تهیه شد. برای هر غلظت از عصاره هر جدایه قارچ آنتاگونیست (تیمار) ۳ تکرار (تشت پتری) به روش فوق تهیه گردید. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع بدون قارچ که استریل شده و از صافی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شده بود استفاده شد. بعد از انعقاد محیط کشت در وسط هر تشتک پتری یک حلقه به قطر ۸ میلی‌متر از حاشیه کشت جوان ٤ روزه قارچ فیتوفتورا کشت داده شد و تشتک‌ها در انکوباتور با حرارت ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درصد جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P. capsici* با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\frac{\text{قطر رشد میسلیوم در غلظت معین عصاره} - \text{قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

www.SID.ir

Archive of SID

این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. داده‌های بدست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم در هر غلظت) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq 0.01$) انجام شد.

٤-٣- بررسی اثر متابولیت‌های فرار (گازی) جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. capsici* در شرایط آزمایشگاه

این آزمایش طبق روش *دنیس و وبستر* (Dennis & Webster 1971b) انجام شد.در مرحله اول جدایه‌های تریکودرما ٢٤ ساعت قبل از قارچ فیتوفتورا کشت داده شدند و در مرحله دوم جدایه‌های تریکودرما ٧٢ ساعت قبل از قارچ فیتوفتورا کشت گردیدند. روش کار در هر دو مرحله آزمایش کاملا یکسان و بدین‌ترتیب بود که ابتدا محیط‌کشت BA تهیه شد. بعد از منعقد شدن آن، تشتک‌ها به دو دسته تقسیم شدند. در یک دسته از تشتک پتری‌ها حلقه‌ای به قطر ٨ میلی‌لیتر از حاشیه کشت جوان ٤ روزه قارچ *P. capsici* در وسط هر تشتک پتری کشت داده شد. دسته دوم تشتک‌ها به گروه‌های ٣ تایی تقسیم شدند و هر ٣ تشتک پتری به یک جدایه از آنتاگونیستهای مذکور اختصاص یافت و حلقه‌ای به قطر ٨ میلی‌متر از حاشیه کشت جوان ٣ روزه آن جدایه وسط هر تشتک پتری کشت داده شد. سپس در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل درهای تشتک‌های حاوی قارچ *P. capsici* و قارچ آنتاگونیست را برداشته و تشتک پتری حاوی فیتوفتورا بطور وارونه روی تشتک پتری حاوی قارچ آنتاگونیست قرار گرفت تا بدین‌ترتیب فقط متابولیت‌های فرار قارچ آنتاگونیست بتوانند روی قارچ فیتوفتورا موثر واقع شوند. دور تشتک‌ها با نوار چسب بخوبی مسدود گردید. در تشتک پتری‌های شاهد فقط حلقه‌ای به قطر ٨ میلی‌لیتر از محیط‌کشت BA فاقد قارچ آنتاگونیست استفاده شد. درصد جلوگیری از رشد میسلیوم فیتوفتورا در اثر متابولیت‌های فرار تریکودرما در هر مرحله از آزمایش با استفاده از رابطه زیر بدست آمد.

قطر رشد میسلیوم قارچ فیتوفتورا در اثر متابولیتهای فرار هر جدایه آنتاگونیست – قطر رشد میسلیوم فیتوفتورا در تشتک پتری شاهد

www.SID.ir

Archive of SID

قطر رشد میسلیوم فیتوفتورا در تشتک پتری شاهد

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ٦ تیمار و ۳ تکرار انجام شد و داده‌های بدست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم قارچ در هر تکرار) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq 0.01$) گروه بندی شد.

۴- بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از مرگ بوته‌های فلفل در شرایط گلخانه

در این آزمایش از فلفل دلمه‌ای واریته Verdel که حساس به قارچ *P. capsici* است استفاده شد. از جدایه‌های T.v3، T.h2، T.k19،T.v12 و T.v5 با روش اختلاط اینوکولوم تریکودرما (تکثیر شده روی سبوس گندم) با خاک گلدان استفاده شد. این آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با ۷ تیمار و ۵ تکرار انجام شد.

تیمارهای آزمایش عبارت بودند از گلدانهای شاهد آلوده، شاهد غیرآلوده و ۵ جدایه قارچهای آنتاگونیست که اینوکولوم آنها به نسبت ۵ درصد حجمی با خاک گلدان‌ها مخلوط شده بود.

قطر گلدان‌ها ۱۳ سانتی‌متر و در هر گلدان ٤ نشاء فلفل ۲۰ روزه کاشته شد. خاک گلدان‌های آزمایشی غیر از تیمار شاهد غیرآلوده با ۵ گرم اینوکولوم قارچ *P. capsici* (تکثیر شده روی لوبیا سفید) در سطح گلدان و اطراف طوقه و ریشه آلوده شدند. در تیمار شاهد غیرآلوده از ۵ گرم لوبیا سفید استریل شده استفاده شد.

در گلدان‌هایی که خاک آنها حاوی اینوکولوم تریکودرما آلوده به فیتوفتورا بود، دو سوم فوقانی خاک گلدان به نسبت ۵ درصد حجمی با اینوکولوم تریکودرما مخلوط شد. در تیمار شاهد آلوده دو سوم فوقانی خاک گلدان‌ها به نسبت ۵ درصد حجمی با سبوس گندم استریل شده مخلوط گردید.

داده‌های بدست آمده از آزمایش (تعداد نشاهای سالم فلفل در هر تیمار ۲۰ روز پس از کاشت) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\leq 0.05$) انجام شد.

درصد تلفات نشاها در تیمار از رابطه زیر محاسبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

$$\text{درصد تلفات نشا در تیمار} = \frac{\text{تعداد نشاهای سالم در تیمار} - \text{تعداد نشاهای سالم در تیمار شاهد غیرآلوده}}{\text{تعداد نشاهای سالم در تیمار شاهد غیرآلوده}} \times ۱۰۰$$

نتیجه

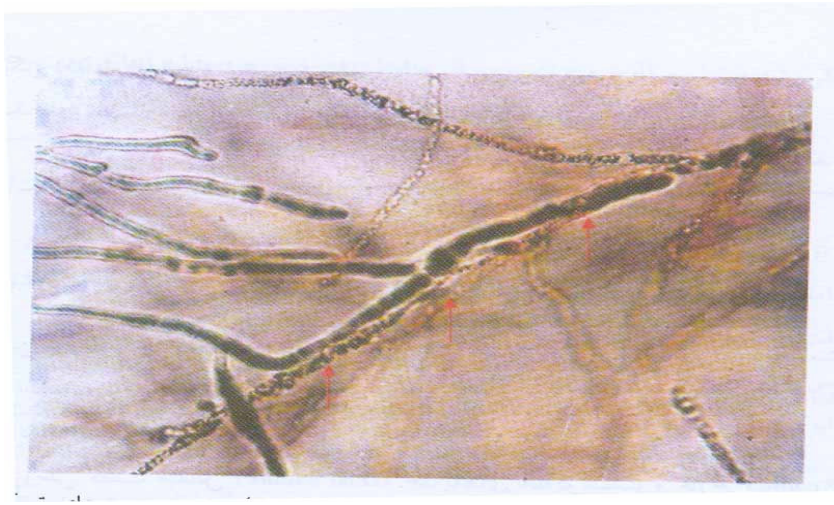
در این بررسی جدایه‌های خالص شده با مشخصات قارچ *Phytophthora* با استفاده از کلیدهای *استمپ* و همکاران (Stamp *et al*. 1990) و *ارشاد* (۱۹۹۲)، گونه *P.capsici* Leonian تشخیص داده شدند.

در بررسی کشت متقابل (Dual culture) جدایه‌های آنتاگونیست و قارچ *P.capsici*، تمام جدایه‌های قارچهای آنتاگونیست مورد بررسی ضمن رشد و تماس با میسلیوم قارچ بیمارگر مانع رشد و توسعه شده و سپس شروع به پیشروی، کلنیزاسیون و اسپورزایی روی ریسه‌های قارچ بیمارگر نمودند. سرعت پیشروی، کلنیزاسیون و اسپورزایی جدایه‌های T.v5، T.v12 و T.v3 روی میسلیوم‌های قارچ بیمارگر زیاد و بیشتر از سایر جدایه‌ها بود. جدایه T.k19 در درجه دوم و جدایه T.h2 سرعت پیشروی و کلنیزاسیون و اسپورزایی کمتری داشت و ظرف مدت ۱۰ روز قارچ بیمارگر را کلنیزه کرد.

بررسی‌های میکروسکوپی در این آزمایش نشان داد که در سطح لایه نازک محیط‌کشت روی لام‌ها، ریسه‌های تمام جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی، در مراحل اولیه برخورد با ریسه‌های قارچ بیمارگر در قسمتی از طول آنها با تماس ریسه به موازات ریسه‌های قارچ بیمارگر رشد کرده و با گذشت زمان این تماس‌های ریسه افزایش یافت ولی اثری از نفوذ مستقیم ریسه‌های تریکودرما به داخل ریسه‌های قارچ مشاهده نشد (شکل ۱). در جدایه T.v12 زوائدی در سطح ریسه‌های قارچ بیمارگر نمایان بود ولی در هیچکدام از جدایه‌های آنتاگونیست پیچش ریسه‌ای (Coiling)و قطعه قطعه شدن میسلیومی مشاهده نشد ولی در نهایت باعث تخریب (lyses) میسلیومی قارچ بیمارگر شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تماس ریسه *Phytophthora capsici* و تریکودرما (ریسه تیره) و هجوم ریسه‌های تریکودرما به سمت ریسه‌های *P.capsici* (۳۵۰X). فلش‌ها مکان تماس را نشان می‌دهد.

Fig 1. Contacts between *Phytophthora capsici* and *Trichoderma* (dark hyphae) hyphae in which *Trichoderma* hyphae attacking toward *P.capsici* (350 X). Arrows show location of contacts.

نتایج حاصل از تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست روی قارچ بیمارگر نشان داد که ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست از نظر تأثیر در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر در سطح ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار هستند (جدول ۲). جدایه T.v3 بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر داشت بطوریکه در غلظت ۵، ٤ و ۳ میلی‌لیتر (به ترتیب ۲۵، ۲۰ و ۱۵ درصد در محیط‌کشت) ۱۰۰ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر شد و جدایه T.k19 کمترین تاثیر را داشته بطوریکه در غلظت ۲۵ درصد ٦۰/۷٤ درصد و در غلظت ۲۰ و ۱۵ درصد به ترتیب ۵۱/٦۷ و ۳۹/۸۱ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر شده است.

نتایج آزمایش اثر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست روی قارچ بیمارگر هنگامیکه جدایه‌های آنتاگونیست ۲٤ ساعت قبل از قارچ بیماریزا کشت شدند نشان داد که ترشحات فرار T.v5 بیشترین تاثیر و ترشحات فرار T.v3 کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ بیماریزا داشتند که به ترتیب به میزان ٦٧/٩٧ و ٣٧/٢٢ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیماریزا شدند (جدول ٣) ولی هنگامیکه آنتاگونیستها ٧٢ ساعت قبل از بیمارگر کشت شدند نتایج نشان داد که جدایه T.v5 بیشترین تاثیر و به میزان ٨٦/٦٧ درصد از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر جلوگیری کرده است. T.h2 در گروه دوم و ٧٨/٨٩ درصد، T.v12 در گروه سوم و ٧٢/٢٢ درصد و T.k19 درگروه چهارم، ٦٥/٥٦ درصد و T.v3 دارای کمترین تاثیر و به میزان ٣٥/٨٣ درصد از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر جلوگیری کردند (جدول ٤).

نتایج ازمایش بررسی تأثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از مرگ بوته‌های فلفل نشان می‌دهد که T.v5،T.v12 ، T.h2، T.k19 و T.v3 به ترتیب ٤٠، ٣٠، ٣٠، ٢٠ و ١٥ درصد باعث کاهش تلفات در بوته‌های فلفل شده‌اند.

جدول ٢- تاثیر ترشحات غیرفرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم *Phytophthora capsici*

Table 2. Effect of nonvolatile extract of antagonists on inhibition of mycelial growth of *Phytophthora capsici*

تیمار / Treatments	درصد عصاره Extract percentage				گروه‌بندی تیمارها / Statistical grouping of treatments
	25a	20b	15c	10d	
T.v3	100	100	100	83.33	A
T.h2	83.33	73.89	69.44	57.22	B
T.v5	72.03	62.50	56.67	51.11	C
T.k19	60.74	51.67	39.81	29.81	E
T.v12	65.37	59.26	52.22	42.78	D
Check	0	0	0	0	F

- اعداد متن جدول درصد جلوگیری از رشد میسلیوم هستند.گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P ≤ ٠/٠١) انجام شد

- Numbers in the table are percent of inhibition of mycelial growth. Grouping is done with Duncan`s multiple test (P≤ 0.01).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۳- تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم *Phytophthora capsici* ، ۲٤ ساعت قبل از کشت *P. capsici*

Table 3. Effect of volatile compounds of the antagonists on growth of *Phytophthora capsici,* 24 hours before exposing to *P. capsici*

تیمار Treatment	درصد بازدارندگی Percent of inhibition
T.v12	58.52c
T.v3	37.22e
T.h2	62.97b
T.v5	67.97a
T.k19	45.74d
Check	0.00f

- گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P ≤ ۰/۰۱) انجام شد.

- Grouping is done with Duncan`s multiple test (P≤ 0.01).

جدول شماره ٤- تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم *Phytophthora capsici* ، ۷۲ ساعت قبل از کشت *P. capsici*

Table 4. Effect of volatile compounds of the antagonists on growth of *Phytophthora capsici,* 72 hours before exposing to *P. capsici*

تیمار Treatment	درصد بازدارندگی Percent of inhibition
T.v12	72.22c
T.v3	57.97e
T.h2	78.89b
T.v5	86.67a
T.k19	65.56d
Check	0.00f

- گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P ≤ ۰/۰۱) انجام شد.

- Grouping is done with Duncan`s multiple test (P≤ 0.01).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۵- تاثیر گونه‌های تریکودرما در جلوگیری از پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه فلفل در آزمایش گلخانه‌ای

Table 5. Effect of *Trichoderma* species on preventing of pepper root rot caused by *Phytophthora capsici* in greenhouse

تیمار Treatment	میانگین بوته‌های سالم Average of healthy plants	درصد تلفات Percent of mortality
T.v12	1.6	60bc
T.v5	2	50b
T.k19	1.2	70bcd
T.h2	1.6	60bc
T.v3	1	75cd
P.capsici	0.4	90d
Check	4	0a

- گروه‌ندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (P ≤ ۰/۰۵) انجام شد.

- Grouping is done with Duncan`s multiple test (P≤ 0.05).

بحث

در بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه‌های آنتاگونیست با قارچ *P. capsici* مشاهده گردید که ریسه‌های جدایه‌های آنتاگونیست به سمت ریسه قارچ بیمارگر دارای کشش و تروپیسم مثبت هستند که این کشش را می‌توان به وجود مواد شیمیایی در دیواره ریسه قارچ بیمارگر نسبت داد. مکانیسم پارازیتیسم تریکودرما پیچیده است که شامل تروپیسم شیمیایی (Chet *et al.* 1981)، تشخیص لکتین موجود در دیواره سلولی بیمارگر (Inbar & Chet 1992, 1994 & 1995) و تشکیل آپرسوریوم ، اندامهای نفوذی و حلقه‌های به دام اندازنده بیمارگر می‌باشد (Elad *et al*. 1983a; Elad *et al*. 1983b).

ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌ها، اثرات مختلفی روی قارچ *P. capsici* دارند. این اختلافات در بین گونه‌های تریکودرما و حتی بین جدایه‌های مختلف یک گونه، از نظر تولید مواد قابل انتشار و ممانعت کننده از رشد قارچ‌ها توسط *دنیس و وبستر* (Dennis & Webster 1971) نیز گزارش شده است و در کارهای *بازگیر* و همکاران(۱۹۹۱) و

www.SID.ir

Archive of SID

امیرصادقی و همکاران (۱۹۹۲) نیز چنین اختلافاتی مشاهده شده است. در مورد نوع ترکیبات موجود در ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما تحقیقات زیادی انجام گرفته و مشخص شده که آنزیمهای سلولاز، کیتیناز، لامیناریناز ، بتا- ۱و۳ گلوکاناز و همچنین آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضدقارچی مانند Paracelsin،Alamethicin،Suzukacilin،Trichodermin ، Trichodermol ، Harziandion، Viridin، Gliotoxin، Dermadin (U-21963)،Trichothecenes ، Harzianolide،Harzianopyridone ، Ferulic acid و Gliovirin توسط جدایه‌های مختلف تولید میشوند و نقش عمده‌ای در خاصیت آنتاگونیستی این قارچ‌ها دارند (Elad *et al.* 1982; Dipietro *et al.* 1993; Lorito *et al.* 1993; Papavizas 1985; Dickinson *et al.* 1995). با افزایش غلظت (نسبت درصد) ترشحات مایع خارج سلولی در محیط کشت، تاثیر آنها در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P.capsici* افزایش می‌یابد.

با افزایش مدت تاخیر کشت *P. capsici* نسبت به جدایه‌های تریکودرما درصد بازدارندگی همه جدایه‌ها افزایش می‌یافت و این بیانگر افزایش تولید متابولیت‌های فرار بازدارنده بوسیله جدایه‌های آنتاگونیست با مسن‌شدن کلنی آنهاست. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی جدایه‌های مختلف یک گونه طیفی از مواد فرار را تولید می‌کنند که تاثیرات متفاوتی روی قارچ‌های مختلف دارند. این جدایه‌ها ممکن است مجموعه‌ای از متابولیت‌های فرار در مقادیر مختلف تولید کنند و یا ممکن است ترکیبات شیمیایی کاملا متفاوتی را تولید کنند. *دنیس و وبستر* (Dennis & Webster 1971b) استالدئید را به عنوان عمده‌ترین ترکیب کربنیل‌دار در متابولیت‌های فرار *T. viride* مشخص کرده‌اند و همچنین مشتقات هیدرازون را از ترشحات فرار جدایه‌های *T. viride* جدا نمودند ولی وجود دی‌اکسیدکربن یا آمونیاک را در متابولیت‌های فرار تریکودرما غیر محتمل دانستند. *زپا* و همکاران (Zeppa *et al.* 1991) متابولیت‌های فرار متعددی شامل لاکتون‌ها، الکل‌ها، مشتقات ترپن و مشتقات آلفاپیرون را در شرایط کشت متفاوت از *T. viride* بدست آوردند. *دیکینسون* و همکاران (Dickinson *et al.* 1995) ماده ۶- پنتیل-۲- پیرون (6-Pentyl-2-Pyrone) را از گونه *T. harzianum* معرفی کردند که در خاک نفوذ می‌کند و به عنوان یک ضدعفونی کننده گازی ضعیف شناخته می‌شود. *لویس* و *پاپاویزاس* (Lewis & Papavizas 1984) نشان دادند که استقرار و تکثیر تریکودرما در خاک بستگی به نحوه کاربرد آن دارد و هنگامی که روی سبوس گندم

www.SID.ir

Archive of SID

استریل تکثیر شود و سپس به خاک اضافه شود تا یک میلیون برابر تکثیر می‌شود و استقرار و پایداری آن از زمان کاربرد در خاک ۹ تا ۳٦ هفته است. بنظر می‌رسد این روش یکی از بهترین روش‌های کاربرد تریکودرما می‌باشد. با توجه به این مطلب جدایه‌های تریکودرما با این روش به گلدان‌های آزمایشی اضافه شدند.

بررسی‌های *روحانی* و *صفری* (۱۹۹۸) نشان میدهد که حداقل ۱۱ گونه تریکودرما در ایران وجود دارد که از بین آن‌ها ۷ گونه برای فلور قارچی ایران جدید می‌باشند. *دانش* و همکاران (۲۰۰۰) تریکودرماهای جدا شده از قارچ خوراکی در ایران را بررسی کردند و سه گونه *T.longibrachiatum*، *T.harzianum* و *T.virens* را گزارش کردند. *ظفری* و همکاران (۲۰۰۲) سه گونه جدید برای فلور قارچهای ایران با نامهای *T.asperellum*، *T.inhamatum* و *T.tomentosum* معرفی کردند. همچنین *ظفری* و همکاران (۲۰۰۵) سه گونه دیگر با نامهای *T.ghanense*، *T.spirale* و *T.atroviride* که به ترتیب مربوط به بخشهای *Longibrachiatum* ، *Pachybasium* و *Trichoderma* می‌باشند را معرفی کردند که در این میان *T.atroviride* در کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی حائز اهمیت است. همچنین *کراس* و همکاران (Krause *et al*. 2004) گونه جدید *T.brevicompactum* sp. nov را برای دنیا از ایران (قزوین و خرم‌آباد)، آمریکای‌شمالی، مرکزی و جنوبی و آسیای جنوب شرقی و جنوب غربی گزارش کردند. جدا شدن قارچ‌های فوق از خاک مناطق مختلف نشانه‌ای از وجود آنها در بسیاری از خاک‌های زیر کشت گیاهان است. لذا بنظر می‌رسد برای مبارزه با بیماری‌ها می‌توان این عوامل را مصنوعاً تکثیر و به خاک اضافه نمود.

سپاسگزاری

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی، آقایان دکتر حمید روحانی (دانشگاه بوعلی همدان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی)، مهندس حمیدرضا علیزاده (دانشگاه کرمان، دانشکده کشاورزی جیرفت)، دکتر ساسان امیرصادقی (موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران) و مهندس داریوش شهریاری (موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی ورامین)

www.SID.ir

Archive of SID

جهت در اختیار قرار دادن جدایه‌های تریکودرما تشکر و قدردانی می نمائیم.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (146-141) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: کیوان بهبودی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، عباس شریفی‌تهرانی، قربانعلی حجارود و جوادزاد، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

www.SID.ir