Archive of SID

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳ (۱۰۴-۹۷)

تولید و کاربرد *Trichoderma harzianum* Tr6 در کنترل مرگ گیاهچه ناشی از *Phytophthora drechsleri* و افزایش رشد در خیار

۱. ژیلا دلخواه؛ ۲. کیوان بهبودی*

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۳ - تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۲۰)

چکیده

جنس تریکودرما یکی از عوامل مهم بیوکنترلی در برخی بیماری‌های گیاهی است که با مکانیسم‌های مختلفی بیماری را کنترل می‌کند. این قارچ‌ها همانند دیگر عوامل کنترل بیولوژیک تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرد که محیط کشت از جملهٔ این فاکتورها است. این تحقیق با هدف ارزیابی تأثیر ترکیب ملاس چغندر قند، شربت ذرت، مخمر نان و عصارهٔ مالت (Mol.C.B.M.) به‌عنوان محیط کشت مایع، دانهٔ گندم (W.s.) و سبوس گندم (W.b.) به‌عنوان محیط‌های کشت جامد بر توان اسپوردهی، کنترل مرگ گیاهچه ناشی از *Phytophthora drechsleri* و توسعهٔ رشد گیاهچهٔ خیار توسط *Trichoderma harzianum* Tr6 انجام شد. محیط‌های کشت با ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست با غلظت 10^8 اسپور تلقیح و سپس، در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس و شدت نور فلورسنت ۲۰۶ لوکس به‌مدت ۱۰روز نگه‌داری شدند. تیمار مربوط به محیط کشت Mol.C.B.M. بیشترین توان اسپورزایی با میزان $1/83\times10^{10}$ اسپور در هر گرم وزن خشک زیست‌تودهٔ آنتاگونیست و نیز بیشترین درصد کنترل بیماری (۶۲/۵ درصد)، افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشهٔ گیاهچه را نشان داد؛ اما درصد بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به محیط‌های کشت جامد کمتر بود. بنابراین، می‌توان گفت که محیط کشت مایع برای دستیابی به اهداف تحقیق، موفق عمل کرده است.

کلیدواژگان: اسپورزایی، آنتاگونیست، تریکودرما، سبوس گندم، محیط کشت.

مقدمه

شبه‌قارچ *Phytophthora drechsleri* یکی از بیمارگرهای مخرب خیار است که باعث پوسیدگی ریشه و طوقه در مرحلهٔ گیاهچه‌ای، پژمردگی، خشکی و در نهایت، مرگ می‌شود (Hwang and Benson 2005). استفاده از سموم شیمیایی، با وجود کاهش مؤثر بیماری، باعث آلودگی‌های زیست‌محیطی و ایجاد مقاومت در بیمارگر می‌شود و از نظر اقتصادی نیز مقرون به‌صرفه نیست (Chaudhari *et al*. 2011) با توجه به این محدودیت‌ها، روش‌های کنترل بیولوژیک جایگزین مناسبی در این زمینه‌اند. از میان انواع عوامل بیوکنترل، قارچ تریکودرما به‌دلیل تأثیر مثبت در کنترل طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه بیمارگرهای خاکزاد و توسعهٔ رشد برخی محصولات گیاهی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. توانایی آن‌ها برای تولید انواع ترکیبات آنتاگونیستی و تنظیم‌کننده‌های رشدی گیاه به افزایش کارایی بیوکنترلی آن‌ها منجر می‌شود. فعالیت قارچ تریکودرما به‌عنوان عامل بیوکنترل، تحت تأثیر فاکتورهای

* تلفن: ۰۹۱۲۳۰۷۸۳۷۸
E-mail: behbodi@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

فیزیکی و شیمیایی محیط زیست قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است محیط کشت یکی از فاکتورهای مؤثر بر میزان رشد، تولید ترکیبات آنتاگونیستی، ترکیبات افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه و کارایی قدرت بیوکنترلی عامل کنترل بیولوژیک است. *T. harzianum* یکی از عوامل موفق بیوکنترل است که به‌صورت تجاری برای جلوگیری از توسعهٔ برخی بیمارگرهای قارچی تولید می‌شود (Subash *et al*. 2014). هزینه‌های بالای اقتصادی یکی از محدودیت‌های اساسی تولید است که برای غلبه بر این محدودیت و افزایش کمیت و کیفیت بیوکنترلی عامل بیولوژیک، می‌توان از محیط‌های کشت مناسب و ارزان‌قیمت به‌عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در تولید انبوه استفاده کرد (Verma *et al*. 2007). به‌عبارتی، نوع و میزان کربن و نیتروژن را می‌توان یکی از فاکتورهای محیطی مؤثر بر رشد غیرجنسی تریکودرما عنوان کرد (Steyaert *et al*. 2010). پاپاویزاس و لویس نیز ترکیب محیط کشت را جزء مؤثر در کارایی بیوکنترلی تریکودرما معرفی کردند و ارتباط بین ترکیب محیط رشد و کارآمدی عوامل کنترل بیولوژیک در کاهش بیماری مرگ گیاهچه تربچه ناشی از *Rhizoctonia solani* را نشان دادند (Papavizas and Lewis 1981). بنابراین، توجه به محیط رشد و منبع غذایی تریکودرما برای بهبود کارایی بیوکنترلی آن و تولید زیست‌تودهٔ آنتاگونیست با کیفیت و کمیت مطلوب ضروری به نظر می‌رسد. به‌طور کلی، فرمنتاسیون جامد و فرمنتاسیون مایع دو روش عمدهٔ تولید اینوکلوم گونه‌های تریکودرما هستند. در فرمنتاسیون جامد، قارچ روی انواع دانه‌های غلات، حبوبات و ضایعات جامد کشاورزی رشد می‌کند. محصول نهایی این سیستم بیشتر به‌صورت مستقیم در خاک خزانه یا مزرعهٔ اصلی برای کاهش و جلوگیری از رشد اینوکلوم بیمارگرهای خاکزاد به‌کار می‌رود. در فرمنتاسیون مایع نیز تریکودرما روی مواد ارزان‌قیمت مانند ملاس و در مقیاس تجاری تولید می‌شود. زیست‌تودهٔ حاصل از فرمنتاسیون مایع می‌تواند به‌صورت گرد، گرانول و پودر وتابل و غیره فرموله شود و به‌صورت تیمار خشک بذر یا بیوپرایم (تیمار بذور با عوامل بیولوژیک و نگه‌داری در شرایط مساعد دمایی و رطوبتی) برای کنترل برخی بیماری‌های خاکزاد به‌کار برود (Ramanujam *et al*. 2010). با توجه به موارد ذکرشده، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر محیط کشت روی پتانسیل *T. harzianum* Tr6 برای تولید اسپور، کنترل *P. drechsleri* و افزایش رشد روی گیاهچهٔ خیار اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

جدایهٔ عامل بیمارگر و عامل آنتاگونیست

P. drechsleri به‌عنوان عامل بیمارگر از مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه و پس از تک هیف‌کردن روی محیط کشت PDA نگه‌داری شد. این جدایه از گیاه خیار جداسازی شده بود.

جدایهٔ آنتاگونیست *T. harzianum* Tr6 نیز از کلکسیون کنترل بیولوژیک بخش بیماری‌شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. این جدایه که آن را دکتر حمیدرضا علیزاده از ریشه‌های خیار مزارع پاکدشت جداسازی کرده بود، توانست در گیاه خیار علیه *Fusarium oxysporum* f.sp. *radiciscucmerinum* مقاومت القایی مؤثری نشان دهد (Alizadeh *et al*. 2013).

تهیه و تلقیح محیط‌های کشت مورد استفاده

در این تحقیق از دو محیط کشت جامد (W.b.)[1] و (W.s.)[2] و یک محیط کشت مایع (Mol.C.B.M.)[3] استفاده شد. برای تهیهٔ محیط کشت مایع،۵۰ میلی‌لیتر ملاس چغندر قند، ۵ میلی‌لیتر شربت ذرت، ۱۰ گرم مخمر نان و ۱۰ گرم عصارهٔ مالت مخلوط و با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس، اسیدیتهٔ (pH) آن با اسید کلریدریک ($HCl_{(aq)}$) و هیدروکسید سدیم ($NaOH_{(aq)}$) استاندارد روی ۵/۵±۰/۱ تنظیم و ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع به هر ارلن اضافه شد. در مورد محیط‌های کشت جامد نیز به‌ترتیب زیر عمل شد:

برای محیط کشت جامد .W.b، ۴۰ گرم سبوس گندم و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و برای محیط کشت .W.s نیز ۴۰ گرم دانهٔ گندم و ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر

1. Wheat bran
2. Wheat seed
3. 50 mll-1 Sugar beet molasses, 5 mll-1 Corn steep liquor, 10 gl-1 Baker ‘s yeast and 10 gl-1 Malt extract

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط شدند. برای هریک از محیط‌های کشت سه ارلن در نظر گرفته شد. پس از اتوکلاو محیط‌های کشت، به هر ارلن ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون آنتاگونیست حاوی $۲/۱۲ \times ۱۰^{۸}$ اسپور اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس، شدت نور فلورسنت ۲۰۶ لوکس و سرعت ۱۳۰ دور دقیقه در شیکر ـ انکوباتور (محیط کشت مایع) و انکوباتور (محیط‌های کشت جامد) به‌مدت ۱۰ روز نگه‌داری شدند.

برداشت زیست‌توده و تعیین جمعیت

برداشت و تعیین وزن خشک زیست‌تودهٔ حاصل از هر محیط کشت با کمی تغییر بر اساس روش Sargin *et al.* (2013) و نیز Papavizas and Lewis (1983) انجام شد. بعد از طی دورهٔ انکوباسیون، محیط کشت مایع حاوی زیست‌تودهٔ آنتاگونیست سانتریفیوژ شد. سپس، فاز ته‌نشین (زیست‌توده‌ها) از لوله‌های سانتریفیوژ برداشته و به پتری دیش‌های استریل منتقل شد. بدین ترتیب زیست‌تودهٔ آنتاگونیست به‌دست آمد. برای محیط‌های کشت جامد نیز کل محتویات ارلن‌ها به پتری دیش‌های استریل انتقال داده شد. در مرحلهٔ بعد، محتویات پتری‌ها برای همهٔ تیمارها در آون با دمای ۴۰ـ۳۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۷۲ ساعت خشک، سپس، پودر شدند. برای محیط کشت مایع، با یک دهم گرم از زیست‌تودهٔ خشک و پودرشده در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و برای محیط‌های کشت جامد نیز، با ۱ گرم از زیست‌تودهٔ خشک همراه با محیط کشت جامد در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، سوسپانسیون تهیه و در فالکون‌های استریل ریخته شد. سوسپانسون حاصل از هر زیست‌توده به‌مدت سه دقیقه روی ورتکس با دور بالا به‌هم خوردند تا اسپورها از شبکهٔ میسلیومی جدا و مواد زائد ته‌نشین شوند. سپس، تعداد اسپورها با لام هماسیتومتر شمارش شدند. بدین ترتیب، تعداد اسپورها در ۱ گرم زیست‌تودهٔ خشک برای هریک از تیمارها محاسبه شد.

اثبات بیماریزایی بیمارگر بر گیاه خیار

این آزمایش با کمی تغییر به روش Shirzad *et al.* (2012) با اینوکلوم تهیه‌شدهٔ بیمارگر بر ارزن دوبار استریل، انجام شد. در هریک از گلدان‌های پلاستیکی ضدعفونی‌شده با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد حاوی ۱ کیلوگرم خاک استریل (۱ خاک‌برگ: ۱ ماسه: ۲ خاک مزرعه)، دو عدد بذر سالم و جوانه‌زدهٔ هم‌سن کاشته شد.

گلدان‌ها در شرایط مناسب دمایی و روشنایی در گلخانه نگه‌داری و با آب شهری به فاصلهٔ سه روز یک‌بار آبیاری شدند. بعد از دو هفته که گیاه به مرحلهٔ دو تا سه برگی رسید، به ازای هر گلدان، ۲ گرم مایهٔ تلقیح آماده *P. drechsleri* با یک سوم خاک رویی هریک از گلدان‌ها مخلوط شد. در تیمار شاهد از ارزن استریل استفاده شد. بعد از دو هفته، ارزیابی میزان بیماریزایی بیمارگر در تیمارهای شاهد و آلوده انجام گرفت و درصد کاهش بیماری براساس تعداد گیاهچه‌های سالم محاسبه شد.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی زیست‌توده‌های آنتاگونیست علیه *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل (Dual culture): این آزمایش بر اساس روش Dennis and Webster (1971b) در یک طرف تشتک پتری دیسکی ۱ سانتی‌متری از کلونی پنج روزهٔ قارچ بیمارگر قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سلسیوس، دیسکی میسلیومی به اندازهٔ ۱ سانتی‌متر از کشت ۲۴ ساعته زیست‌توده‌های آنتاگونیست در طرف مقابل بیمارگر قرار داده شد. پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۱±۲۶ درجهٔ سلسیوس منتقل شدند. شعاع کلونی قارچ بیمارگر بعد از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی نسبت به شاهد برای هریک از پتری‌ها مقایسه و با رابطهٔ ۱ محاسبه شد:

$$\text{٪ ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر} = \frac{\text{شعاع کلونی بیمارگر در شاهد (mm)} - \text{شعاع کلونی بیمارگر در هر تیمار (mm)}}{\text{میانگین شعاع کلونی بیمارگر در شاهد (mm)}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

آزمون متابولیت‌های فرّار (Volatile metabolites): برای این منظور از روش Dennis and Webster (1971b) استفاده شد. کشت پنج روزهٔ *P. drechsleri* در معرض کشت ۲۴ ساعته هریک از زیست‌توده‌های آنتاگونیست به‌صورت هم‌زمان قرار داده شد؛ به‌صورتی که پتری‌های حاوی آنتاگونیست در زیر قرار گرفتند. دور پتری‌های روی‌هم قرارگرفته، با پارافیلم مسدود شد تا از خروج متابولیت‌های فرّار جلوگیری شود. سپس، به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

قطر کلونی بیمارگر در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی با رابطهٔ ۲ محاسبه شد.

(۲) ٪ ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر = (قطر کلونی بیمارگر در هر تیمار (mm) − قطر کلونی بیمارگر در شاهد (mm)) / میانگین قطر کلونی بیمارگر در شاهد (mm) ×۱۰۰

آزمون ترشحات غیرفرّار (Non-volatile metabolites): این آزمایش به روش Dennis and Webster (1971a) و با محیط کشت مایع داوه (Davet 1979) برای هریک از زیست‌توده‌ها انجام شد. قطر کلونی بیمارگر در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی با رابطهٔ ۲ محاسبه شد.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی زیست‌توده‌های آنتاگونیست علیه بیماری مرگ گیاهچهٔ خیار ناشی از *P. drechsleri* در شرایط گلخانه

آماده‌کردن اینوکلوم بیمارگر، با تلقیح کشت پنج روزهٔ بیمارگر با ارزن دوبار استریل، انجام شد. آماده‌کردن بذور خیار نیز با روش Shirzad *et al.* (2012) انجام شد. بذور سالم و جوانه‌زده به‌مدت نیم ساعت در سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۷}$ اسپور از زیست‌توده‌های آنتاگونیست و نیز حاوی ۲ گرم صمغ عربی در هر لیتر از سوسپانسیون، غوطه‌ور شدند. سپس، در گلدان‌های حاوی ۱ کیلوگرم خاک استریل (۱ خاک‌برگ: ۱ ماسه: ۲ خاک مزرعه) و ۲ گرم اینوکلوم آمادهٔ بیمارگر که با یک سوم خاک رویی گلدان‌ها مخلوط شده بود، به تعداد چهار بذر در هر گلدان کشت و در شرایط مناسب نگه‌داری شدند. ارزیابی درصد کاهش بیماری مرگ گیاهچه در هر گلدان بعد از دو هفته براساس تعداد گیاهچه‌های سالم به روش زیر اجرا شد:

درصد مرگ گیاهچه در هر تیمار برابر است با اختلاف تعداد گیاهچه‌های سالم در هر تیمار با تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم، تقسیم بر تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم که به‌صورت درصد بیان می‌شود. همچنین، درصد کاهش بیماری در هر تیمار برابر است با اختلاف بین درصد مرگ گیاهچه در شاهد آلوده و درصد مرگ گیاهچه در هر تیمار.

تجزیه و تحلیل آماری

همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و مقایسهٔ میانگین آن‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

برداشت زیست‌توده و تعیین جمعیت

محاسبهٔ میزان اسپور نشان داد که در هر سه محیط کشت میزان اسپور در مقایسه با میزان اولیهٔ اسپور افزایش قابل توجهی داشته است که نشانگر اهمیت منبع غذایی در رشد و اسپورزایی تریکودرما است (Steyaert *et al.* 2010).

جدول ۱. میزان اسپور تولیدشده توسط *T. harzianum* Tr6 در محیط‌های کشت مختلف

تعداد اسپور (در گرم وزن خشک) $\times ۱۰^{۱۰}$	*محیط‌های کشت
۱/۸۳±۰/۰۲a	Mol.C.B.M.
۱/۱۹±۰/۰۱b	W.b.
۱/۱۴±۰/۰۲c	W.s.

* ملاس چغندر قند (Mol)، شربت ذرت (C)، مخمر نان (B)، عصارهٔ مالت (M)، سبوس گندم (W.b.) و دانهٔ گندم (W.s.).

بیشترین میزان اسپور توسط جدایهٔ آنتاگونیست با میزان $۱/۸۳\times۱۰^{۱۰}$ اسپور در محیط کشت Mol.C.B.M تولید شد (جدول ۱). ملاس چغندر قند حاوی ۴۷ تا۵۰ درصد ساکاروز و سایر قندهای کتوز، رافینوز، گالاکتینول، فروکتوز و مقدار کمی گلوکز و نیز پروتئین، عناصر معدنی و ویتامین است. این ماده به‌عنوان منبع کربن در سطح جهان برای تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (Lagzian *et al.* 2013). شربت ذرت نیز منبعی غنی از کربوهیدرات و حاوی پروتئین و مواد معدنی است (Lawford and Rousseau 1997). مخمر نان و عصارهٔ مالت نیز مقادیر مختلفی از انواع کربن و نیتروژن را دارند. در محیط کشت Mol.C.B.M. میزان کربوهیدرات بیشتر از نیتروژن است و نسبت کم نیتروژن می‌تواند یکی از دلایل اسپورزایی بیشتر باشد؛ زیرا اغلب با وجود در دسترس‌بودن منبع کربن، بر اثر کاهش یا مصرف نیتروژن قابل جذب، اسپورزایی تحریک می‌شود که نشانگر اهمیت میزان نیتروژن در تولید اسپور است (Morton 1961). در تحقیقات Sargin *et al.* (2013) سبوس گندم از نظر اسپورزایی توسط *T. harzianum* EGE-K38 در سیستم فرمنتاسیون جامد (SSF) مؤثر

www.SID.ir

Archive of SID

عمل کرده بود. همچنین، این محیط کشت برای گونه‌های *T. harzianum*، *T. viride*، *T. koningii* و *T. polysporum* از نظر اسپورزایی مناسب تشخیص داده شده است (Rosane *et al*. 2008). سبوس گندم، علاوه بر غنی‌بودن از نظر کربوهیدرات، ظرفیت جذب رطوبت بالایی دارد و رطوبت بهینه نیز یکی از فاکتورهای مهم در اسپورزایی است. احتمال دارد این ویژگی‌ها باعث تفاوت جزئی در میزان اسپوردهی بین دانهٔ گندم و سبوس گندم شده باشد. به‌طور کلی، محیط کشت مایع برای تولید اسپور *T. harzianum* Tr6 موفق‌تر از کشت جامد عمل کرد که با نتایج تحقیقات لویس و پاپاویزاس (Lewis and Papavizas 1991) مطابقت داشت.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی زیست‌توده‌های آنتاگونیست علیه *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه

مطابق جدول ۲، با وجود اینکه تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد، اما تیمار مربوط به محیط کشت حاوی سبوس گندم بیشترین میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر را بعد از ۷۲ ساعت در آزمون‌های کشت متقابل (۶۹/۰۶±۱/۸۲ درصد) متابولیت‌های فرّار (۴۵/۱۵±۸/۳ درصد) و غیرفرّار (۵۵/۹۳±۱/۷ درصد) نشان داد. دنیس و وبستر بیان کردند که تریکودرما با تولید متابولیت‌های فرّار و غیرفرّار از رشد برخی عوامل بیمارگر جلوگیری می‌کند (Dennis and Webster 1971b). این قارچ علاوه بر تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک، آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های محلول در آب مانند پپتایبول‌ها را نیز تولید می‌کند که به نوعی در فعالیت بیوکنترلی آن نقش دارند. به بیان دیگر، قارچ تریکودرما در مواجهه با بیمارگرهای مختلف با توجه به نوع ترکیبات موجود در دیوارهٔ سلولی میزبان، آنزیم‌های مختلفی را تولید می‌کند. بنابراین، تولید این ترکیبات ارتباط مستقیمی با نوع منبع غذایی مورد استفادهٔ تریکودرما دارد. با وجود تحقیقات زیاد دربارهٔ منابع غذایی معمول تریکودرما، اطلاعات علمی از مواد غذایی ویژه برای تولید متابولیت‌های ضد قارچی، در دسترس نیست (Monga *et al*. 2001).

جدول ۲. میزان فعالیت آنتاگونیستی زیست‌توده‌های *T. harzianum* Tr6 در برابر *P. drechsleri* در آزمایشگاه

تیمارها	درصد بازدارندگی (%Inhibition)		
	کشت متقابل	متابولیت‌های فرّار	متابولیت‌های غیرفرّار
Mol.C.B.M	۵۱/۶۷±۰/۵۸ ab	۳۹/۲۴±۲/۹ a	۴۹/۹۲±۵/۴ a
W.b.	۶۹/۰۶±۱/۸۲ a	۴۵/۱۵±۸/۳ a	۵۵/۹۳±۱/۷ a
W.s.	۵۳/۹۴±۴/۶ ab	۳۵/۴۶±۴ a	۵۵/۵±۱/۴ a

بررسی خاصیت آنتاگونیستی زیست‌توده‌های آنتاگونیست علیه بیماری مرگ گیاهچهٔ خیار ناشی از *P. drechsleri* در شرایط گلخانه

در این بررسی، تیمار مربوط به زیست‌توده حاصل از محیط کشت Mol.C.B.M با ۶۲/۵ درصد بیشترین میزان کاهش بیماری را نشان داد، اما تفاوت معنی‌داری با محیط‌های کشت جامد نداشت (شکل ۱).

قارچ تریکودرما با مکانیسم‌های مختلفی بیماری‌های گیاهی به‌ویژه بیماری خاکزاد را کنترل می‌کند. القای مقاومت و مایکوپارازیتیسم از مهم‌ترین آن‌ها هستند. سرعت رشد و اسپورزایی زیاد و همچنین، تحمل ترکیبات سمی در رقابت با میکروارگانیسم‌های مضر ریزوسفر باعث موفقیت این قارچ در جلوگیری از توسعهٔ عوامل بیمارگر می‌شود (Benitez *et al*. 2004). علاوه بر این، به‌واسطهٔ فعالیت آنتاگونیستی و تخریب میسلیوم قارچ‌های بیماریزا در خاک و رقابت برای منابع کربن و آهن در ریزوسفر می‌تواند بیماری را کاهش دهد (Radwan *et al*. 2006). در مورد تأثیر محیط کشت در کارایی کاهش بیماری‌های گیاهی تحقیقاتی نیز انجام شده است. برای مثال، Subash *et al*. (2014)، *T. harzianum* را روی باگاس نیشکر، کمپوست و کاه شلتوک برنج کشت دادند و تأثیر این محیط‌های کشت بر کارایی تریکودرما در کنترل بیماری مرگ گیاهچهٔ فلفل ناشی از *R. solani*، *F. oxysporum* و *A.alternate* را ارزیابی کردند. بیماری به‌طور چشمگیری کاهش یافته بود که علت آن توانایی تریکودرما در حفاظت گیاه در برابر بیمارگر بود. با توجه به یافته‌هایی از این قبیل،

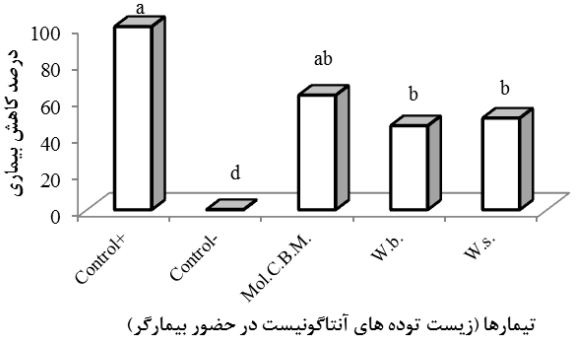
www.SID.ir

Archive of SID

توجه به محیط غذایی مناسب و شرایط مناسب برای عملکرد بهینهٔ این عامل بیوکنترل به‌منظور کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی اهمیت زیادی دارد.

بررسی پتانسیل زیست‌توده‌های آنتاگونیست در توسعهٔ فاکتورهای رشدی گیاه در شرایط گلخانه

مطابق جدول ۳، تیمار مربوط به محیط کشت Mol.C.B.M. بیشترین تأثیر را در توسعهٔ فاکتورهای رشدی گیاهچهٔ خیار داشته است. آنتاگونیست رشدکرده روی سبوس گندم نیز از نظر توسعهٔ وزن تر گیاهچه همانند تیمار مربوط به محیط کشت مایع عمل کرده است. پتانسیل بیشتر گونه‌ها و استرین‌های تریکودرما برای توسعهٔ رشد در گیاهان مختلفی مانند گوجه‌فرنگی (Chang *et al.* 1986)، خیار (Altomare *et al.* 1999) و فلفل (Chang *et al.* 1986, Subash *et al.* 2014) ثابت شده است. این قارچ باعث توسعهٔ ریشه‌های ثانوی، توسعهٔ سیستم ریشه، افزایش وزن ترگیاهچه، منطقهٔ برگی و عملکرد می‌شود (Harman 2000). تریکودرما همانند قارچ‌های میکوریزی، ریشه‌های گیاه را برای حفاظت و افزایش رشد کلونیزه می‌کند و طی این فرایند، نیازمند اتصال، شناسایی و نفوذ به ریشه‌های گیاه و همچنین، تحمل متابولیت‌های سمی حاصل از گیاه به‌واسطهٔ سیستم ABC- ترانسپورتر در پاسخ به نفوذ است (Bae 2011).



شکل ۱. میزان کاهش بیماری مرگ گیاهچهٔ خیار ناشی از ۲ گرم اینوکلوم *P. drechsleri* توسط زیست‌توده‌های *T. harzianum* Tr6 حاصل از هر محیط کشت بعد از دو هفته در شرایط گلخانه

جدول ۳. تأثیر زیست‌توده‌های آنتاگونیست در افزایش فاکتورهای رشدی گیاه بعد از چهار هفته.

تیمارها (زیست‌توده‌های حاصل از هر محیط)	ارتفاع کل گیاه (cm)	ارتفاع قسمت‌های هوایی (cm)	ارتفاع ریشه (cm)	وزن تر قسمت‌های هوایی (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک قسمت‌های هوایی (g)	وزن خشک ریشه (g)
شاهد	۱۴/۴۵d	۱۲/۲۵ d	۲/۲c	۱/۱۶c	۰/۴۱ b	۰/۲ a	۰/۰۳ a
Mol.C.B.M.	۳۵/۲۷a	۳۲/۱۲a	۳/۱۵a	۴/۴۱a	۰/۶۲a	۰/۲۶ a	۰/۰۶ a
W.b.	۳۲/۶۷b	۲۹/۶۷b	۳ab	۴/۴۳a	۰/۶۲a	۰/۲۳ a	۰/۰۶a
W.s.	۲۲/۳۳c	۱۹/۵۳c	۲/۶۳b	۲/۳۴b	۰/۶۱b	۰/۲۳ a	۰/۰۵ a

گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما از مکانیسم‌های متنوعی مانند حلالیت برخی مواد غذایی (Altomare *et al.* 1999)، کاهش تولید اتیلن از طریق کاهش پیش‌مادهٔ ۱ـ آمینوسیکلوپروپان ـ۱ـ کربوکسیل اسید (ACC) (Gravel *et al.* 2007)، تولید اکسین (Contreras-Cornejo *et al.* 2009) و رقابت موفق (Harman 2006) برای افزایش فاکتورهای رشدی گیاه بهره می‌برند. توانایی تریکودرما در افزایش رشد گیاه با پارامترهایی مانند نوع گیاه، جدایهٔ تریکودرما، روش تهیه و به‌کارگیری اینوکولوم، غلظت اینوکولوم و نوع خاک در ارتباط است (Kleifeld and Chet 1992, Qusley *et al.* 1994). منبع غذایی (محیط کشت) از فاکتورهای اساسی مرتبط با فرایند تهیه و آماده‌کردن اینوکلوم عوامل کنترل بیولوژیک به‌ویژه تریکودرما است. بنابراین، انتخاب مناسب نوع مواد غذایی می‌تواند تأثیر مثبتی در بهبود ویژگی‌های مفید تریکودرما داشته باشد. برای مثال، اخیراً، افزایش رشد گیاه فلفل تیمارشده با

www.SID.ir

Archive of SID

Trichoderma harzianum رشدیافته روی محیط کشت باگاس نیشکر توسط Subash *et al.* (2014) اثبات شده است. انواع ضایعات کشاورزی را می‌توان برای تولید اسپور تریکودرما در دو سیستم فرمنتاسیون جامد و مایع استفاده کرد. هر یک از این سیستم‌ها ویژگی‌هایی دارند. در فرمنتاسیون جامد، تریکودرما روی انواع ضایعات و محصولات کشاورزی جامد (انواع دانه‌های غلات، حبوبات، کاه و ضایعات کشاورزی و حتی خانگی) رشد می‌کند. محصول نهایی را بدون فرموله‌کردن می‌توان پس از طی مراحل خشکاندن به‌طور مستقیم در مزرعه، گلخانه و بسترهای کشت به‌کار برد (Ramanujam *et al*. 2010). اما احتمال آلودگی در آن بالا است. در فرمنتاسیون مایع از ضایعات و بسترهای مایع مانند ملاس تنها یا ملاس به همراه موادی مانند عصارهٔ سیب‌زمینی، عصارهٔ سویا، عصارهٔ مالت، مخمر و غیره استفاده می‌شود. زیست‌تودهٔ حاصل را نیز بعد از فرمولاسیون، به‌صورت غیرمستقیم برای اهداف بیوکنترلی استفاده می‌کنند. در این سیستم بیشترین میزان محصول آنتاگونیست در کوتاه‌ترین زمان تولید می‌شود (Ramanujam *et al*. 2010). نمونه‌های موفقی از هر دو نوع سیستم برای تولید تریکودرما شناسایی شده است؛ اما اطلاعات جامعی در زمینه تأثیر اجزای محیط کشت بر نحوهٔ تعامل تریکودرما و گیاه در دسترس نیست. با توجه به نتایج، می‌توان گفت که نوع مواد غذایی کارایی *T. harzianum* Tr6 را در توسعهٔ فاکتورهای رشدی گیاه تحت تأثیر قرار داده و در نهایت، افزایش رشد را در ارتفاع و وزن گیاهچهٔ خیار سبب شده است. به‌طور کلی، قارچ‌های جنس تریکودرما می‌توانند روی محیط‌های کشت مایع و جامد رشد کنند، همچنین، می‌توانند در کنترل برخی بیماری‌های گیاهی مفید باشند. پیشنهاد می‌شود که با بهینه‌کردن محیط مایع، کارایی بیوکنترلی محصول نهایی این جدایه در برابر بیمارگرهای دیگر به‌ویژه *P. drechsleri* بهبود داده شود.

REFERENCES

Alizadeh H (2013) Comparative evaluation of induced resistance by *Trichoderma*, fluorescent pseudomonads and their combination against fusarium stem and root rot of cucumber and expression of some defense genes. Ph.D., University of Tehran, Iran. (In Persian).

Altomare C, Norvell WA, Bjorkman T, Harman GE (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. Applied and Environmental Microbiology 65: 2926-2933.

Bae H (2011) *Trichoderma* Species as abiotic and biotic stress quenchers in plants. Research Journal of Biotechnology 6.

Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 4: 249-260.

Chaudhari PJ, Shrivastava P, Khadse AC (2011) Substrate evaluation for mass cultivation of *Trichoderma viride*. Asiatic Journal of Biotechnology Resources 4: 441-446.

Chang YC, Baker R, Kleifeld O, Chet I (1986) Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *T. harzianum*. Plant Disease 70: 145-148.

Contreras-Cornejo HA, Macı´as-Rodrı´guez L, Corte´s-Penagos C, Lo´pez-Bucio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiology 149: 1579-1592.

Dennis C, Webster J (1971a) Antagonism properties of species groups of *Trichoderma*, III. Hyphal interaction. Transactions British Mycological Society 57:363-369.

Dennis C, Webster J (1971b) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* production of volatile antibiotics. Transactions British Mycological 57: 41-48.

Gravel V, Antoun V, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indoleacetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry 39: 1968-1977.

Harman GE (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194.

Hwang J, Benson DM (2005) Identification, mefenoxam sensitivity, and compatibility type of *Phytophthora* spp. attacking floriculture crops in North Carolina. Plant Disease 89: 185-190.

Kleifeld O, Chet I (1992) *Trichoderma harzianum* interaction with plants and effects on growth response. Plant Soil 144: 267-272.

Lagzian A (2013) Optimization of growth conditious of *Pseudomonas fluorescens* VUPF5 for increasing its biocontrol ability. M.Sc., Vali-E-Asr University of Rafsanjan. Iran. (In Persian).

Lawford HG, Rousseau JD (1997) Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance zymomonas ethanol fermentations. Applied Biochemistry and Biotechnology 63-65: 287-304.

www.SID.ir

Archive of SID

Lewis JA, Papavizas GC (1983) Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. Soil Biology and Biochemistry 3: 351-357.

Lewis JA, Papavizas GC (1991) Biocontrol of plant diseases: The approach for tomorrow. Crop Protection 10: 95-102.

Monga D (2001) Effect of carbon and nitrogen sources on spore germination, biomass production and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium.* Indian Phytopathology 4: 435-437.

Monte E (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology 4: 1-4.

Morton AG (1961) The induction of sporulation in mold fungi, Proceeding of the Royal Microscopical Society 2: 548-569.

Papavizas GC, Lewis JA (1981) Introduction and augmentation of microbial antagonists for the control of soilborne plant pathogens, In: Papavizas GC (ed.), In Biological Control in Crop Production. Allanheld Osmun & Co., Totowa, New Jersey., pp. 305-322.

Qusley MA, Lynch JM, Whipps JM (1994) The effects of addition of *Trichoderma* inocula on flowering and shoot growth of bedding plants. Scientia Horticulture 59: 147-155.

Radwan MB, Fadel AM, Mohammad IAM (2006) Biological control of *Sclerotiorum rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. Hebron University Research Journal 2: 27-47.

Ramanujam B, Prasad RD, Sriram S, Rangeswaran R (2010) Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. Journal of Plant Protection Sciences 2: 1-8.

Rosane SC, Helder LSL, Gustavo ASP, Carlos ATG, Sueli R (2008) Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. Food Bioprocess Technology 1: 100-104.

Sargin S, Gezgin Y, Eltem R, Vardar F (2013) Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. Turkish Journal of Biology 37: 139-146.

Shirzad A, Fallahzadeh-Mamaghani V, Pazhouhandeh M (2012) Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of crown and root rot of cucumber caused by *Phythophtora drechsleri*. Plant Pathology Journal 28: 1-9.

Steyaert JM, Weld RJ, Mendoza-Mendoza A, Stewart A (2010) Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. Microbiology 156: 2887-2900.

Subash N, Meenakshisundaram M, Sasikumar C, Unnamalia N (2014) Mass cultivation of *Trichoderma harzianum* using agricultural waste as a substrate for the management of damping off disease and growth promoting in chili plants (*Capsicum annuum* L.). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5.

Verma M, Satinder KB, Tyagi RD, Surampalli RY, Valeró JR (2007) Starch industry wastewater as substrate for antagonist, *Trichoderma viride* production. Bioresource Technology 98: 2154-2162.

www.SID.ir