بررسی امکان کنترل بیولوژیکی *Phytophthora drechsleri* عامل بوته‌میری خیار توسط جدایه‌های *Trichoderma* spp. در شرایط گلخانه

Study of the possibility of biological control of *Phytophthora drechsleri* damping factor in cucumbers by the isolates of *Trichoderma spp*. in greenhouse

احسان خانی[۱]، مژده ملکی[۲*] و داریوش شهریاری[۳]

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲

چکیده

خیار (*Cucumis sativus*) یکی از محصولات تجاری مهم در ایران و جهان بوده که سرشار از منابع غنی از فیبر و ویتامین با ارزش غذایی زیاد است. این محصول همواره مورد حمله عوامل بیماریزای خاکزاد قرار دارد که نه تنها خسارت اقتصادی قابل توجهی برعملکرد محصول وارد می‌کنند، بلکه کیفیت و بازارپسندی محصول را نیز کاهش می‌دهند. یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های خاکزاد خیار، بوته‌میری و پوسیدگی ریشه و طوقه با عامل *Phytophthora drechsleri* Tuker می‌باشد. در این مطالعه توان بیوکنترلی جدایه‌های سه گونه قارچ *Trichoderma* بر روی قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شد. جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی شامل گونه *Trichoderma harzianum* (جدایه‌های Th_3، Th_5، Th_6، Th_7 و Th_9)، گونه *T. longibrachiatum* (جدایه Tl_2) و گونه *T. atroviride* (جدایه‌های Ta_1، Ta_4، Ta_8 و Ta_{10}) بودند. آزمون‌های کشت متقابل، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار در سه تکرار اجرا شد. جدایه Th_6 با ۸۹/۳ درصد بیش‌ترین خاصیت بازدارندگی از رشد را در کشت متقابل نشان داد. پیچش هیفی در تماس جدایه‌های تریکودرما با فیتوفترا مشاهده نشد ولی هیف‌های تریکودرما به موازات هیف‌های فیتوفترا رشد کردند و آپرسوریوم و هاستوریوم را تشکیل دادند. براساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی، موفق‌ترین جدایه‌ها از نظر فعالیت آنتاگونیستی در مقابل *P. drechsleri*، جدایه‌های Th_6، Th_5، Th_3 و Ta_1 بودند. چهار جدایه مذکور جهت انجام مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند. در گلخانه، آزمون‌های تیمار خاک و آغشته‌سازی بذر با سوسپانسیون اسپور جدایه‌های تریکودرما به منظور بررسی توان کنترلی این جدایه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار در سه تکرار اجرا شد. نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی با سطوح مختلفی قادر به کنترل بیماری بودند. جدایه‌های Th_6 و Ta_1 به ترتیب با ۹۱/۷۵ درصد و ۸۳/۵ درصد بیش‌ترین تأثیر کاهنده را بر بیماری به صورت کاهش درصد گیاهچه میری در اولین آماربرداری پس از تیمار خاک داشتند و پس از آن‌ها جدایه‌های Th_3 و Th_5 قرار گرفتند. در روش آغشته‌سازی بذر نیز جدایه‌های Th_6 و Ta_1 موفق‌تر از جدایه‌های دیگر عمل کردند و در تیمارهای مایه‌زنی شده با این جدایه‌ها و فیتوفترا، درصد جوانه‌زنی بذر به ترتیب ۱۰۰ و ۸۳/۳۴ درصد بود. به طور کلی در این تحقیق، روش تیمار بذر در مقایسه با تیمار خاک در کاهش بیماری مؤثرتر بود. جدایه‌های مورد بررسی در افزایش رشد گیاه نیز موثر بودند و دو جدایه Ta_1 و Th_6 به طور معنی‌داری وزن تر و ارتفاع گیاهان را افزایش دادند.

واژگان کلیدی: تریکودرما، کنترل بیولوژیک، بوته‌میری خیار، *Phytophthora drechsleri*

۱ و ۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین– پیشوا، ورامین، ایران

۳- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات و آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: dshahriari37@gmail.com

مقدمه

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که بیماری‌های خیار به ویژه بیماری‌های ناشی از عوامل خاکزاد نه تنها خسارت اقتصادی قابل توجهی برعملکرد محصول وارد می‌کنند بلکه کیفیت و بازارپسندی محصول را نیز کاهش می‌دهند. یکی از مهم ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های خاکزاد خیار بیماری بوته‌میری و پوسیدگی ریشه و طوقه با عامل Tuker *Phytophthora drechsleri* می‌باشد. عامل بیماری قارچی خاکزی بوده و گسترش جهانی دارد (Postma *et al*., 2009). دامنه میزبانی این بیمارگر در بین گیاهان مختلف به ویژه کدوئیان بسیار وسیع بوده (Waterhouse, 1967; Vander Plaats-Niterink, 1981) و خیار یکی از میزبان‌های اصلی آن است (Zheng *et al*., 2000). قارچ *P. drechsleri* به عنوان یکی از عوامل اصلی بوته‌میری در ایران گزارش شده است و گونه غالب در بسیاری از مناطق می‌باشد (اعتباریان، ۱۳۵۷; Alavi and Strange, 1979). بوته‌میری جالیز اولین بار توسط شریف در سال ۱۳۲۳ از اصفهان گزارش شد. این بیماری در کلیه نقاط جالیزکاری کشور انتشار دارد (ارشاد و مستوفی‌پور، ۱۳۴۸) از مؤثرترین راهکارهای کنترل بیماری روش کنترل بیولوژیکی و کاربرد میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به عنوان قسمتی از برنامه مدیریت تلفیقی بیماری می‌باشد. پتانسیل گونه‌های تریکودرما به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی در اواسط دهه ۱۹۳۰ تشخیص داده شد و بیش از ۸۰ سال است که مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Woo *et al*., 2006).

کاربرد *T. harzianum* و *T. koningii* باعث کاهش وقوع گیاهچه‌میری ناشی از گونه‌های پیتیوم در نخود فرنگی شده است (Lifshitz *et al*., 1986). کنترل *R. solani* و پیتیوم نخود فرنگی و تربچه توسط *T. harzianum* گزارش شده است (Harman *et al*., 1980). استرین T-22 قارچ *Trichoderma harzianum*، استرین GL-21 قارچ *Trichoderma virens*، استرین 1446J قارچ *Gliocladium catenulatum* و باکتری *Streptomyces griseoviridis* در کنترل بوته‌میری خیار مورد بررسی قرار گرفته‌اند که قارچ *G. catenulatum* بیماری بوته‌میری را به طور معنی‌داری کاهش داد و باعث افزایش ارتفاع گیاه و وزن تر آن شد (Punja and Yip, 2003). هدف از این پژوهش تهیه جدایه‌های تریکودرما و بررسی قدرت رقابت و بازدارندگی از قارچ *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای است.

مواد وروش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ *P. drechsleri*

به منظور دستیابی به قارچ عامل بیماری، نمونه‌برداری از بوته‌های آلوده با علایم پژمردگی و مرگ گیاهچه در گلخانه‌های منطقه ورامین انجام شد. جداسازی عامل بیماری از گیاه و آماده‌سازی نمونه‌ها براساس روش ساتی و تیواری (Sati and Tiwari, 1992) انجام شد. خالص‌سازی، ۲۴ ساعت پس از کشت و رشد قارچ بیمارگر انجام گرفت. به این ترتیب، قطعه‌ای از محیط حاوی قارچ جدا شده و به محیط آب آگار ۲٪ انتقال داده شد. پس از رشد قارچ در محیط‌های مذکور، خالص‌سازی با روش نوک ریسه انجام شد.

اثبات بیماریزایی *P. drechsleri*

آماده‌سازی گیاهچه‌های خیار

ابتدا بذرهای رقم سلطان تهیه و به مدت ۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ ضدعفونی سطحی گردید. پس از ۱۲ ساعت خیساندن، بذرها در سینی کشت حاوی خاک استریل در شرایط گلخانه کاشته شدند و آبیاری به صورت روزانه انجام شد (قادری و همکاران، ۱۳۹۰; Nazavari *et al*., 2016).

تهیه زادمایه بیمارگر

در این مرحله ابتدا مخلوطی از دانه گندم و شاه‌دانه به نسبت حجمی ۲:۱ در فلاسک یک لیتری تهیه و به مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون گردید. دو تا سه روز بعد از پرگنه جدایه قارچ که قبلاً روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP رشد کرده بودند، هشت بلوک میسلیومی به قطر ۶ میلی‌متر به ارلن‌های یک لیتری اضافه شد و به مدت ۴ هفته در دمای ۲۵°C و در تاریکی قرار داده شد. هر هفته فیول‌های حاوی مایه بیمارگر برای چند دقیقه تکان داده شد تا رشد بیمارگر در داخل فیول‌ها به صورت یکنواخت انجام گیرد (نعمتی و بنی‌هاشمی،۱۳۹۴؛ Gilardi *et al.*, 2014).

مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار

ابتدا گیاهچه‌های دو هفته‌ای رقم سلطان در گلدان‌های دو کیلویی نشاء شدند. سپس خاک اطراف هر گیاهچه را تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده و ۱۰ میلی‌لیتر از مایه تلقیح تهیه شده از مرحله قبل (زادمایه قارچ در ورمی کولیت-عصاره شاه‌دانه) در اطراف طوقه و ریشه هر گیاهچه قرار داده شد. گیاهچه‌های شاهد سالم نیز به همین روش با ورمی کولیت دارای عصاره شاه‌دانه سترون مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت به حالت غرقابی آبیاری شدند. گلدان‌ها در گلخانه با حداکثر دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و حداقل دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیده و برای هر تیمار ۴ گلدان (هر گلدان ۳ گیاهچه) در نظر گرفته شد. بعد از ظهور علائم، تعداد گیاهچه‌های از بین رفته ثبت و درصد مرگ گیاهچه محاسبه شد.

برای تایید حضور بیمارگر فیتوفتورا به عنوان عامل بیماری و تکمیل اصول کخ، گیاهچه‌های آلوده از خاک خارج شده و جداسازی مجدد از ریشه و طوقه گیاهان صورت گرفت؛ سپس خصوصیات مرفولوژیکی و تاکسونومیکی آن‌ها با صفات جدایه‌های مایه‌زنی شده مطابقت داده شدند. (بنی‌هاشمی و فاتحی ۱۳۶۸؛ نعمتی و بنی‌هاشمی، ۱۳۹۴؛ Nazavari *et al.*, 2016).

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های آنتاگونیست

به این منظور مقداری خاک از عمق ۲۰ سانتی‌متری مزرعه درون کیسه‌های پلاستیکی جمع‌آوری شده و سپس نمونه‌های خاک را در داخل گلدان ریخته و در دمای اتاق نگهداری شدند. نمونه‌ها به مدت یک هفته آبیاری شد تا قارچ‌های موجود فعال شوند. سپس ۲۰ گرم از خاک را در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل کاملاً حل کرده تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید و پس از چند مرحله رقیق‌سازی سریالی به محلول فوق، یک گرم اسید سیتریک برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و یک قطره مویان برای معلق نمودن اسپورها اضافه گردید (شهریاری، ۱۳۷۳).

پس از تهیه سوسپانسیون خاک، با استفاده از پیپت چند قطره از سوسپانسیون بر روی TSM، محیط کشت اختصاصی تریکودرما چکانده شد. محیط TSM محیط کشت اختصاصی قارچ تریکودرما می‌باشد و در سال ۱۹۹۳ توسط اشیو و لینگ تغییراتی در آن داده شد. ترکیبات محیط TSM شامل: (MgSo4(7H20، K2Hpo4، KCl، NH4No3، D(+)glucose anhydrous و Rose Bengal می‌باشند که ترکیبات محیط پایه را تشکیل می‌دهند و Chloromphenicol، PCNB، Captan و Propamocarb-hydrochlorid به عنوان آنتی بیوتیک‌های این محیط استفاده می‌شوند. در این بخش، ابتدا محیط پایه تولید شده و در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید و بعد از خنک شدن آنتی بیوتیک‌ها به آن‌ها اضافه گردید. پس از ریختن سوسپانسیون خاک روی محیط TSM به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵°C نگهداری شد تا میسلیوم‌ها به خوبی رشد کرده و سپس پتری‌ها در شرایط نور فلورسانس برای تشکیل اسپورها قرار داده شدند (Ashew and Laing, 1993).

بررسی‌های آزمایشگاهی رقابت جدایه‌های تریکودرما با *P. drechsleri*

مطالعات آزمایشگاهی بر روی مکانیسم‌های رقابت تغذیه‌ای تأثیر گونه‌های تریکودرما بر قارچ عامل بیماری انجام شد. در آزمایش کشت متقابل، دیسک‌هایی به قطر پنج میلی متر از قارچ‌های *P. drechsleri* و *Trichoderma spp.* در یک تشتک پتری قرار داده شد. به این ترتیب که در یک طرف تشتک پتری (منتهی‌الیه تشتک پتری) محتوی PDA یک دیسک از قارچ عامل بوته‌میری خیار و در طرف دیگر یک دیسک دیگر از قارچ تریکودرما کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای $^{\circ}$C ۲ ±۲۷ نگهداری شدند و رشد خطی پرگنه‌های بیمارگر و آنتاگونیست ۷۲ ساعت بعد از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. تعداد تیمارهای این آزمایش به تعداد جدایه‌های آنتاگونیست و تیمار شاهد تعیین و در سه تکرار اجرا شد (Muthukumar and Sanjeerkumar, 2008). درصد بازدارندگی از رشد پرگنه عامل بیماری توسط آنتاگونیست از فرمول زیر محاسبه گردید (Khare *et al.*, 2010):

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{C_2 - C_1}{C_2} \times 100$$

C_1: قطر رشد عامل بیماری در تیمار (آنتاگونیست‌ها)

C_2: قطر رشد عامل بیماری (شاهد)

بررسی گلخانه‌ای

به منظور تهیه اینوکلوم *Ph. drechsleri* جهت آلوده‌سازی خاک گلخانه از روش مورد استفاده در تهیه اینوکلوم جهت انجام آزمون بیماری‌زایی استفاده شد. برای تهیه اینوکلوم جدایه‌های موفق *Trichoderma* spp. که در بررسی‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند جدایه‌ها به تفکیک روی محیط دانه گندم استریل تکثیر شدند. پس از ۱۴ روز اینوکلوم تریکودرما به میزان ۱٪ وزنی به خاک گلدان بستر کشت خیار که قبلاً با قارچ عامل بیماری آلوده‌سازی شده، افزوده و به مدت سه هفته در شرایط گلخانه برای گسترش فعالیت قارچ‌های آنتاگونیست نگهداری شدند. سپس بذور سالم خیار حساس (سلطان) در این گلدان‌ها کشت گردیدند. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در دمای $^{\circ}$C ۱۰ ±۲۵ در گلخانه به شرح تیمارهای ذیل اجرا شد:

۱- خاک آلوده به قارچ عامل بیماری (شاهد آلوده)

۲- خاک استریل بدون آلودگی به قارچ عامل بیماری (شاهد سالم)

۳- خاک استریل مایه‌زنی شده توسط هر یک ازجدایه‌های آنتاگونیست (شاهد، جهت بررسی اثر منفی احتمالی خود آنتاگونیست برگیاه و ارزیابی اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر رشد گیاه)

۴- خاک آلوده شده به قارچ عامل بیماری و قارچ آنتاگونیست به نسبت ۱٪ وزنی

تیمارهای ۳ و ۴ ذکر شده در بالا به تعداد جدایه‌های آنتاگونیست خواهد بود. درصد کنترل بیماری توسط آنتاگونیست در گیاه از فرمول زیر محاسبه می‌شود (Khare *et al.*, 2010):

$$\text{درصد کنترل بیماری} = \frac{\text{درصد گیاهان بیمار در تیمار} - \text{درصد گیاهان بیمار در شاهد}}{\text{درصد گیاهان بیمار در شاهد}} \times 100$$

تمامی آزمون‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی درقالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) انجام شد (نصیری، ۱۳۸۸). آنالیز داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن (در سطح احتمال ۵ درصد) استفاده شد.

نتایج

جمع‌آوری، اثبات بیماریزایی وتعیین جدایه پرآزار

در این بررسی پس از کشت نمونه‌های جمع‌آوری شده بوته‌های خیار آلوده با علائم لهیدگی ساقه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های قارچ با میسلیوم‌های بی‌رنگ ظاهر شدند. سپس میسلیوم‌های هوایی پنبه‌ای، بی‌رنگ در سطح تشتک پتری مشاهده شد. در این بررسی از گلخانه‌های خیار منطقه ورامین، پیشوا و پاکدشت جمعاً پنج جدایه از گیاه به‌دست آمد و در جدول (۱) ثبت گردید.

جدول ۱- جدایه‌های قارچ *P. drechsleri* از گیاه خیار

Table 1. Isolates of *P. drechsleri* from cucumber

جدایه Isolates	Sample type	نوع نمونه	سال جمع‌آوری Collecting year	City	شهرستان	Village	روستا
Ph.p1	Root	ریشه	1393	Varamin	ورامین	Ahmad abad	احمد آباد
Ph.p2	Crown	طوقه	1394	Pishva	پیشوا	Habib abad	حبیب آباد
Ph.p3	Crown	طوقه	1394	Pishva	پیشوا	Ghasem abad	قاسم آباد
Ph.p4	Crown	طوقه	1394	Javad abad	جواد آباد	Rostam abad	رستم آباد
Ph.p5	Root	ریشه	1393	Javad abad	جواد آباد	Ghaleh khajeh	قلعه خواجه

اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۵٪ مشاهده شد.

Treatments are significantly different at 5% probability level

پس از مایه‌زنی پنج جدایه به دست آمده از مناطق مختلف روی بوته‌های خیار با علایم اولیه شامل ضعف، پژمردگی و سپس لهیدگی و مرگ بوته‌ها که طی هفت روز اتفاق افتاد و نهایتاً با جداسازی قارچ و مطابقت با قارچ اولیه در گلخانه اثبات بیماریزایی شدند. در ادامه، ۱۴روز بعد از کاشت خیار با تعیین درصد وقوع بیماری در پنج جدایه مختلف و آنالیز داده‌ها، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۵٪ مشاهده شد و براساس مقایسه میانگین‌ها جدایه Ph.p4 به عنوان جدایه برتر با ۹۱ درصد وقوع بیماری برای آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد وقوع بیماری جدایه‌های مختلف *Ph. dreschleri*

Table 2. The mean comparisons of disease incidence percentage of different isolates of *P. dreschleri*

جدایه Isolate	Sample type	نوع نمونه	درصد وقوع بیماری Disease incidence percentage
Ph.p4	Crown	طوقه	91a
Ph.p5	Root	ریشه	87ab
Ph.p1	Root	ریشه	83bc
Ph.p2	Crown	طوقه	73c
Ph.p3	Crown	طوقه	73c

بررسی و انتخاب جدایه‌های موثر تریکودرما در رقابت تغذیه‌ای

پس از جداسازی و خالص‌سازی تریکودرما جمعاً ۱۶ جدایه به‌دست آمد و به همراه چهار جدایه تهیه شده از منابع دیگر برای تعیین قدرت بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های فیتوفتورا در آزمون کشت متقابل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر بازدارندگی از رشد پرگنه فیتوفتورا در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در بررسی مقایسه میانگین، چهار جدایه با بیش از ۷۰٪ بادارندگی از رشد *P. drechsleri* و با توجه به پراکنش شامل Th_5,Th_6, Th_3 و Ta_1 برای انجام مراحل بعدی تحقیق انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (جداول ۳ و ۴).

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های ۲۰ جدایه تریکودرما جداسازی شده از خاک از نظر تأثیر بر قطر پرگنه فیتوفتورا و بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های آن در آزمون کشت متقابل

Table 3. Mean comparison of 20 isolates of *Trichoderma* from soil considered their effects on colony diameter and the inhibition of mycelial growth of *Phytophthora* in the dual culture test

جدایه‌های تریکودرما Isolates of *Trichoderma* sp	بازدارندگی از رشد کلنی بیمارگر Inhibition of the colony growth of pathogen
Th_6	89.3a
Th_3	81.2b
Th_5	76.9bc
Th_7	72.4cd
Ta_1	70.8de
Ta_4	6.66ef
Th_9	64.8f
Ta_8	63 f
Tl_2	53.9 g
Ta_{10}	51.2g
Th_4	36.9H
Th_2	36.3Hi
Ta_3	35.9Hi
Tl_4	33.3Hij
Ta_6	31.5jiji
Th_{11}	29Jk
Th_8	26K
Th_{14}	21.2L
Ta_9	19.4L
Tl_{12}	18.7L

*: میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند (آزمون چند دامنه دانکن)

*: Mean with similar letters in each column is not significantly different at 5% probability level (Duncan test)

جدول ۴- اسامی اختصاری جدایه‌های شناسایی شده

Table 4. Abbreviations for the collected isolates

Collected locations	محل تهیه	اسامی اختصاری Abbreviated names	جدایه تریکودرما Isolates of *Trichoderma*
Varamin	ورامین	Th_3	*Trichoderma harzianum*
Varamin	ورامین	Th_6	*Trichoderma harzianum*
Varamin	ورامین	Th_5	*Trichoderma harzianum*
Robat karim	رباط کریم	Ta_1	*Trichoderma atroviride*

ارزیابی تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر عامل بیماری در شرایط گلخانه‌ای

نتایج حاصله از تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد بین تیمارها در سطح ۱درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در بررسی میانگین‌ها، در اولین آماربرداری از درصد کنترل بیماری در تیمار خاک با تریکودرما جدایه‌های Th_6، Ta_1، Th_3 و Th_5 به ترتیب ۹۱/۷۵، ۸۳/۵۰، ۴۱/۷۵ و ۲۵ درصد کاهش بیماری را نشان داده و در تیمار بذر به ترتیب ۱۰۰، ۸۳/۳۴،

۷۵ و ۶۶/۶۷ جوانه‌زنی بذر و کاهش بیماری مشاهده شد. در جدایه Th_6، افزایش درصد کنترل بیماری در تیمار بذر مشاهده شد. در جدایه Ta_1 میزان کنترل بیماری در دو روش تقریباً مشابه یکدیگر بود؛ در حالی که در جدایه های *T. harzianum* (جدایه‌های Th_3 و Th_5) افزایش درصد کنترل بیماری در تیمار بذر در مقایسه با تیمار خاک قابل توجه بود. براساس نتایج این تحقیق جدایه‌های Th_6 و Ta_1 باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع و وزن تر گیاه شدند به طوری که به ترتیب ۱۶ و ۲۸ روز پس از جوانه‌زنی بین ارتفاع گیاه در این تیمارها و تیمارهای شاهد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین در روز ۲۸ به ترتیب تیمارهای Ta_1 و Th_6 بیش‌ترین تأثیر را بر افزایش وزن تر گیاه داشتند و با تمامی تیمارهای شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. این نتایج مشاهدات آزمایشگاهی را نیز تائید می‌کند. به طوری که در آزمایش کشت متقابل جدایه Th_6 قدرت رقابت تغذیه‌ای بالاتری نسبت به سایر جدایه‌ها در مقابل فیتوفتورا بر روی محیط کشت داشت و در گلخانه نیز موفق‌ترین جدایه در رقابت برای کسب ریزوسفر بود (جداول ۵ و۶).

جدول ۵- نتایج تأثیر جدایه‌های تریکودرما (مایه‌زنی شده در خاک) بر کنترل بیماری در سه مرحله آماربرداری

Table 5. Effect of *Trichoderma* isolates (inoculated in soil) on controlling disease in three records

Disease incidence percentage			درصد وقوع بیماری
تیمارها Treatments	۴ روز پس از کاشت گیاهچه‌ها 4 days after seedlings plantation	۸ روز پس از کاشت گیاهچه‌ها 8 days after seedlings plantation	۱۲ روز پس از کاشت گیاهچه‌ها 12 days after seedlings plantation
Th_3+ Ph	41.75bac*	58.50 ba	100 a
Th_5+ Ph	25.00 bc	41.75 bc	75.00 b
Ta_1 + Ph	83.50 ba	100 a	100 a
Th_6 + Ph	91.75 a	100 a	100 a
chek (*phytophthora*)	00.00 c	00.00 c	00.00 c

* اعداد با حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند (آزمون چند دامنه دانکن)

*: The numbers with similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level (Duncan test)

جدول ۶- مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده با اسپورهای جدایه‌های تریکودرما در خاک مایه‌زنی شده با اینوکلوم فیتوفتورا و تاثیر آن‌ها بر ارتفاع گیاه و وزن تر آن ۸، ۱۶ و ۲۸ روز پس از جوانه‌زنی

Table 6. Mean comparison of germinating percentage of treated seeds with *Thricoderma* isolates in inoculated soil by *Phythophthora* inoculum and their effects on plants height and fresh weights, 8, 16 and 24 days after germination

تیمارها Treatments	درصد جوانه‌زنی بذر The percentage of seed germination	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر) Plant height(cm)			وزن تر در روز ۲۸ (گرم) Fresh weights on 28th day(gram)
		روز ۸ 8th day	روز ۱۶ 16th day	روز ۲۸ 28th day	
Th_3 + Ph	75.00 ba	5.0 b	12.6 f	28.2 e	50.62 f
Th_5+ Ph	66.67 bc	4.3 c	12.5 f	24.5 g	48.71 h
Ta_1 + Ph	83.34 ba	5.6 a	13.5 c	30.1 cb	53.20 b
Th_6 + Ph	100.00 a	5.6 a	13.4 c	30.0 c	53.03 d
شاهد آلوده	00.00 c	-	-	-	-
Th_3	100.00 a	5.6 a	13.1 d	28.5 d	50.84 e
Th_5	100.00 a	5.5 a	12.8 e	25.3 f	48.92 g
Ta_1	100.00 a	5.7 a	13.9 a	30.4 a	53.24 a
Th_6	100.00 a	5.7 a	13.7 b	30.2 b	53.15 c
شاهد سالم	100.00 a	5.7 a	12.8 e	24.1 h	48.37 i

بحث

گونه‌های تریکودرما به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مناسب بیماری‌های گیاهی ناشی از قارچ‌های خاکزاد شناخته شده‌اند و کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی خاکزاد توسط تیمار بذر و یا کاربرد آنتاگونیست‌ها در خاک امکان‌پذیر است (Khare *et al*., 2010). در این تحقیق بازدارندگی از رشد *P. drechsleri* در آزمایشگاه و کنترل آن در گلخانه توسط تعدادی از جدایه‌های *Trichoderma* به دست آمده از مزارع ورامین و نیز جدایه‌های تهیه شده از منابع دیگر به اثبات رسید. براساس نتایج به دست آمده تمامی جدایه‌ها سطوح مختلفی از بازداری از رشد بیمارگر را در آزمون‌های مختلف در آزمایشگاه نشان دادند و چهار جدایه انتخاب شده دارای توان کنترل عامل بیماری با درصدهای مختلف در گلخانه بودند.

در این تحقیق تمامی جدایه‌ها در وسط لام‌ها به ریسه‌های فیتوفتورا رسیدند و تقابل بین آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. براساس مشاهدات میکروسکوپی تقابل مرفولوژیکی *Trichoderma* spp. با *P. drechsleri* مشخص گردید که در هیچ یک از جدایه‌های مورد آزمون، پیچش هیف قارچ آنتاگونیست به دور ریسه‌های *P. drechsleri* رخ نداد و با وجود نزدیکی ریسه‌ها به یکدیگر، ریسه‌های *Trichoderma* spp. همچنان قادر به پیچش به دور هیف‌های فیتوفتورا نبودند. بنابراین هیف‌های قارچ‌های آنتاگونیست به موازات هیف‌های فیتوفتورا رشد کرده و با تولید آپرسوریوم و هوستاریوم‌هایی به صورت انشعابات کوچک به هیف فیتوفتورا متصل شده و حفره‌هایی در آن ایجاد کردند و ضمن تغذیه از مواد درون سلولی سبب لیز شدن هیف‌ها و نهایتاً متلاشی شدن میسلیوم مورد حمله شدند. این مکانیسم در واقع بیانگر برقراری نوعی ارتباط تغذیه‌ای بین آنتاگونیست‌ها با میزبانشان است. تقابل بین آنتاگونیست و عامل بیماری و وقوع بازدارندگی در محیط آگار به عنوان نتیجه معمول رقابت برای کسب مواد غذایی مطرح شده است (Upadhyay and Rais, 1987). نتایج تحقیقات انجام شده نشان داد که تفاوت در نحوه و میزان پارازیتیسم و حساسیت بیمارگر به ترکیب دیواره سلولی عامل بیماری باز می‌گردد (Elad and Misaghi, 1985). نتایج تحقیقات شهریاری (۱۳۷۳) نیز بیانگر عدم وقوع پیچش هیفی جدایه‌های تریکودرما به دور هیف‌های *P. ultimum* (عامل پوسیدگی بذر و ریشه نخود) بود. در هیچ یک از جدایه‌های قارچ‌های *T. longibrachiatum* ، *T. atroviride* و*T. harzianum* تقابل مستقیم هیف‌های تریکودرما و *P. drechsleri*به صورت پیچش مشاهده نشد. سیوان و چت (Sivan and Chet, 1989) نیز جدایه‌هایی از *T. harzianum* را با توانایی کنترل رشد پرگنه فیتوفتورا یافتند. مطالعات آن‌ها بر روی دو جدایه T-35 و T-203 از *T. harzianum* نشان‌دهنده تفاوت در میزان تولید ۱و۳-بتا- گلوکاناز و کیتیناز در این دو جدایه بود و بر این اساس به این نتیجه رسیدند که بین جدایه‌های هر عامل بیوکنترل از نظر تولید آنزیم، آنتی‌بیوتیک و ترکیبات سمی تفاوت وجود دارد که منجر به تفاوت توان آن‌ها در انجام فعالیت‌های آنتاگونیستی و کنترل بیولوژیک می‌شود. بنابراین پتانسیل آنتی‌بیوتیکی *Trichoderma* spp. صفتی وابسته به گونه نبوده بلکه بیش‌تر صفت وابسته به جدایه می‌باشد و تفاوت بین آنتی‌بیوزیس جدایه‌های مختلف هرگونه به اثبات رسیده است (Sreenvasaprasad and Manibhushanrao, 1990).

نتایج به دست آمده از بررسی‌های گلخانه‌ای مقاله حاضر در آزمون‌های تیمار خاک و بذر با سوسپانسیون اسپور سطوح مختلفی از کنترل بیماری توسط جدایه‌های تریکودرما را نشان داد که نتایج مطالعات فوق را تائید کرد. بر اساس نتایج یک تحقیق پوشش بذر با آنتاگونیست‌های بیولوژیکی نظیر *T. harzianum* نسبت به سایر روش‌ها نتایج بهتری را در کاهش بیماری حاصل می‌کند (Das *et al*., 2002).

در این تحقیق برای اولین بار قابلیت گونه *T. atroviride* در کنترل عامل بیماری گیاهچه‌میری خیار مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی می‌توان گفت جدایه‌های Th_3، Th_6، Ta_1 و Th_5 نسبت به سایر جدایه‌ها پتانسیل بالاتری در بازداری از رشد پرگنه *P. drechsleri* داشتند. بنابراین در مطالعات گلخانه‌ای از این جدایه‌ها استفاده شد و سطوح مختلف کنترل بیماری در تیمار خاک و بذر در جدایه‌ها مشاهده شد. در روش تیمار بذر با جدایه‌های تریکودرما در

مقایسه با تیمار خاک نتایج بهتری در کنترل بیماری حاصل شد و در مجموع جدایه‌های Th_6 و Ta_1 در کاهش بیماری موفق‌تر عمل کردند. همچنین کاربرد تریکودرما باعث افزایش ارتفاع و وزن تر گیاه شد.

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق که نشان داد جدایه‌های تریکودرما به ویژه جدایه‌های Th_6 و Ta_1 دارای توانایی قابل توجه در کنترل عامل بیماری در آزمایشگاه و گلخانه هستند. کاربرد آن‌ها در کنترل بیماری پیشنهاد می‌شود و نظر به این که توان آنتاگونیستی جدایه‌های گونه *Trichiderma atrovirude* در کنترل بیولوژیک *P. drechsleri* عامل گیاهچه‌میری خیار قبلاً بررسی نشده بود و در این مطالعه نتایج خوبی از کاربرد آن به دست آمد، بررسی بیش‌تر در زمینه مکانیسم‌های مورد استفاده این قارچ در آزمایشگاه و گلخانه و تاثیر آن ها بر کنترل بیماری و تهیه فرمولاسیونی مناسب برای دوام یا ماندگاری طولانی مدت تریکودرما پیشنهاد می‌شود.

منابع Refrences

ارشاد، ج. و مستوفی‌پور، پ. ۱۳۴۸. بوته‌میری جالیز در ایران. بیماری‌های گیاهی ۵: ۴۵- ۳۸.

بنی‌هاشمی، ض. و فاتحی، ج. ۱۳۶۸. واکنش ارقام کدوئیان به *Phytophthora drechsleri* و *Phytophthora capsici* در گلخانه. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، مشهد. صفحه ۸۹.

شهریاری، د. ۱۳۷۳. کنترل بیولوژیکی *Pythium ultimum* Trow. عامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه نخود توسط قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma* spp. پایان نامه کارشناسی ارشد. گروه بیماری‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۲۶ صفحه.

نصیری، ر. ۱۳۸۸. آموزش SAS. انتشارات نشر گستر. چاپ دوم. ۲۹۴ صفحه.

نعمتی، ز. و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۹۴. واکنش ارقام مختلف کدوییان به *P. drechsleri* و *P. melonis* در شرایط گلخانه. بیماری‌های گیاهی ۵۱: ۳۸۴-۳۷۵.

Alavi, A. and Strange, R. N. 1979. A baiting technique for isolating *Phytophthora drechsleri*, causal agent of crown rot of *Cucumis* spp. in Iran. Plant Disease Reporter 63: 1084-1086.

Ashew, D. J. and Laing, M. D. 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* spp. Plant Pathology 42: 686-690.

Das, S., Biswapati, M., Maity, D. and Raj, S. K. 2002. Different techniques of seed treatment in the management of seedling disease of sugarbeet**.** Journal of Mycopathological Research 40 (2): 175- 178.

Elad, Y. and Misaghi, Z. J. 1985. Biochemical aspects of plant-microb and microb-microb interaction in soil. Pp. 21-46. In: Cooper Driver, G. A. and Swain, T. (eds.) Chemically Mediated Interactions Between Plants and Other Organisms. Plenum Press. New York, USA.

Gilardi, G., Demarchi, S., Gullino, M. L. and Garibaldi, A. 2014. Managing *Phytophthora* crown and root rot on tomato by pre-plant treatments with biocontrol agents, resistance inducers, organic and mineral fertilizers under nursery conditions. Phytopathologia Mediterranea 53(2): 205-215.

Harman, G. E., Chet, I. and Baker, R. 1980. *Trichoderma hamatum* effects on seed and seedling diseases induced in radish and pea by *Pythium* spp. Phytopathology 70: 1167-1172.

Khare, A., Singh, B. K. and Upadhyay, R. S. 2010. Biological control of *Pythium aphanidermatum* causing damping-off of mustard by mutants of *Trichoderma viride* 1433. Journal of Agricultural Technology 6(2): 231-243.

Lifshitz, R., Windham, M. T. and Baker, R. 1986. Mechanisms of biological control of pre-emergence damping-off of pea by seed treatment with *Trichiderma* spp. Phytopathology 76: 720-725.

Muthukumar, A. and Sanjeerkumar, A. 2008. Biological control of *Pythium aphanidermatum*. Mysore Journal of Agriculture Science 42: 20-25.

Nazavari, K. H., Jamali, F., Bayat, F. and Modarresi, M. 2016. Evaluation of resistance to seedling damping-off caused by *Phytophthora drechsleri* in cucumber cultivars under greenhouse Conditions. Biological Forum 8: 54-60.

Postma, J., Steven, L. H., Wiegers, G., Davelaar, E. and Nijhuis, E. H. 2009. Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3.1t8 and chitosan. Biological Control 48: 301-309.

Punja, Z. and Yip, R. 2003. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumber. Canadian Journal of Plant Pathology 25: 411-417.

Sati, S. C. and Tiwari, N. 1992. Studies on five species of pythium parasitic on mustard and cabbage in India. Mycopathologia 119: 97-100.

Sivan, A. and Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Tricoderma harzianum*. Journal of General Microbiology 135: 675-682.

Sreenvasaprasad, S. and Manibhushanrao, K. 1990. Antagonistic potential of *Trichoderma virens* and *Trichoderma longibrachiatum* to phytopathogenic fungi. Mycopathologia 109: 19-26.

Upadhyay, R. S. and Rais, B. 1987. Studies on antagonism between *F. udum* Butler and root region microflora of pigeon pea. Plant and Soil 101: 79-93.

Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981. Monograph of the genus pythium. Studies in Mycology. Centraalburea voor schimmelcultures, buarn, Netherlands. Journal of Mycology 21: 1-244.

Waterhouse, G. M. 1967. Key to *Pythium pringsheim*. Mycological Papers 109:1-15.

Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interaction between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phythopathology 96: 181-185.

Zheng, J., Sutton, J. C. and Yu, H. 2000. Interaction between *Pythium aphanidermatum* roots, root mucilage and microbial agents in hydroponic cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology 22: 368-379.