یافته های نوین کشاورزی
سال دوم- شماره۳- بهار ۱۳۸۷

ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیک گونه های *Trichoderma* بر علیه بیماری پوسیدگی یقه توتون در استان مازندران

سید افشین سجادی*، کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش بهشهر
هدی عاصمی، دانشجوی دکتری رشته حشره شناسی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

چکیده

با توجه به قابلیت بالای قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماریزا، جداسازی و شناسایی گونه‌های تریکودرمای خزانه‌های توتون استان مازندران انجام شد. جداسازی قارچ‌ها با استفاده از محیط کشت انتخابی داوه و محیط های عمومی WA, PDA , CMA به روش کشت سوسپانسیون خاک انجام شد. بعد از خالص سازی نمونه‌های جدا شده، با استفاده از ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی اندام‌هایی از قبیل کنیدیوفورها، فیالیدها و فیالوسپورها براساس کلیدهای شناسایی معتبر اقدام به شناسایی گونه‌ها گردید. از میان ۷۲ نمونه خاک، ٦۰ جدایه به عنوان جنس تریکودرما شناسایی شد. قارچ‌های آنتاگونیست در کشت متقابل (Dual culture) روی محیط کشت PDA باعث کاهش و جلوگیری از رشد قارچ بیماریزا (*Sclerotinia sclerotiorum*) شدند. میزان بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیماریزا با گونه‌های مختلف تریکودرما یکسان نبود و حداقل ۵۱/۲۵ و حداکثر ۹٤ درصد ثبت گردید.گونه‌های مختلف تریکودرما که شناسایی شده شامل: *T . harzianum , T. citrinoviride , T. longibrachiatum , T. koningii , T. virens, T. atroviride* و *T. ghanense* بودند. بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از بیماری پوسیدگی یقه توتون در گلخانه نشان داد که جدایه های Tr6a، Tr9b، Tr102 و Tr29-1 به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ٥٦/۲۵ و٦۸/۷۵ درصد بیماری را کنترل کردند. همچنین این جدایه‌ها موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی بوته در حضور قارچ عامل بیماری شدند.

واژه های کلیدی: توتون، کنترل بیولوژیکی، گونه‌های تریکودرما، *Sclerotinia sclerotiorum*

---

* نویسنده رابط: E-mail:sajjadi_a @yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۸۷/۳/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۲۵

مقدمه

بیماری حاصل از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De bary درگیاهچه‌های توتون (*Nicotiana tabacum*)، پوسیدگی یقه[1] نامیده می‌شود، علائم بیماری پوسیدگی یقه در طی دوره رشد گیاه چه ها در خزانه به صورت پوسیدگی نرم قهوه ای رنگی در ساقه ایجاد می شود که تا برگ ها توسعه می یابد و گیاهچه ها به سرعت نابود می شوند (۲۸، ۲۹ و ۳۰). در دوره های بالا بودن رطوبت نسبی، میسلیوم کرکی سفیدی روی گیاهان پوسیده و بعد از مدتی اسکلروت های سیاه رنگ دیده می شود. اسکلروت ها با ایجاد اندام نعلبکی شکلی به نام آپوتسیوم[2]، آسکوسپورهای هوازی تولید می کنند که در انتشار بیماری نقش مهمی دارد. به خصوص آسکوسپورهای تولید شده از آپوتسیوم های مزارع کاهو، کلزا، آفتابگردان و غیره در آلودگی اولیه خزانه های توتون نقش مهمی دارد (٦ و ۱۲). این بیماری از تمام مناطق توتون کاری دنیا گزارش شده است و بیش از ٤۰۰ گونه گیاهی خسارت وارد می کند که در خزانه‌ها بروز نموده و در صورت مساعد بودن شرایط، تعداد زیادی از نشاهای موجود را از بین می‌برد (۱۳). در اکثر مناطق توتونکاری استان‌های مازندران و گلستان این بیماری شایع است (٦). قارچ عامل بیماری از خانواده اسکلروتیناسه[3] و راسته لوتیالس[4]و شاخه آسکومیکوتا[5] می باشد (۷). آن چه مسلم است به دلیل قدرت بالا سازگاری قارچ عامل بیماری با شرایط مختلف محیطی و دامنه میزبانی بسیار گسترده، انتخاب چندین روش به صورت تلفیقی می‌تواند کارآمدتر و مثمر ثمر باشد. در میان روش‌های مختلفی که برای کنترل عامل پوسیدگی یقه توتون می‌توان نام برد که از جایگاه خاصی برخوردار است استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیکی است. با توجه به قابلیت بالای قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماریزا، جداسازی و شناسایی گونه‌های تریکودرمای خزانه‌های توتون استان مازندران ضروری به نظر می‌رسد.

افشاری آزاد و همکاران (۱۳۸۵) گزارش نمود که قارچ *S. sclerotiorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا بوده که علاوه بر استان های شمالی کشور از سایر مزارع کلزای استان های فارس و کردستان نیز به صورت محدود مشاهده می گردد. ۲٤ جدایه از این قارچ از کلزا، آفتابگردان، کاهو و شب بو از استان های مختلف جمع آوری و توان بیماریزایی آنها را با هم مقایسه نمود.جونز و همکاران در سال ۱۹۷٤ نشان دادند که *Trichoderma viridae* با فعالیت آنزیم گلوکاناز[6]، دیواره سلولی قارچ *S. sclerotiorum* تخریب نموده و موجب کنترل بیماری می‌شوند (۲۳). موسی در سال ۲۰۰۲ در مورد کنترل بیولوژیک مرگ گیاهچه چغندر قند با عامل بیماری *Rhizoctonia solani* بررسی‌هایی به عمل آورد. در تحقیق مورد نظر با استفاده از باکتریای آنتاگونیست *Bacillus subtilis* و گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما موجب کاهش بیماری شد که مکانیزم کنترل را تولید سیدروفور و مواد آنتی بیوتیک و تولید اسیدسیانیدریک (مواد فرار) معرفی نمودند. هاول در سال ۲۰۰۳ با جداسازی و شناسایی گونه‌های

1- Collar rot
2- Apothecia
3- Sclerotiniaceae
4- Leotiales
5-Ascomycota
6- Glucanase

مختلف تریکودرما که آنتاگونیست‌های موفق در برابر عوامل بیماریزای خاکزی بودند مکانیزم‌های کنترل را میکوپارازیتیسم[1]، آنتی بیوتیک، رقابت و شایستگی رایزوسفری، آنزیم‌ها، القاء مقاومت در میزبان نام برد (۲۲). دیبی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در هند جداسازی ۵ جدایه از آنتاگونیست‌های باکتریی *Pseudomonas fluorescens* وگونه‌های مختلف تریکودرما از مزارع فلفل سیاه و به کار بردن آنها در مزارع آلوده به پوسیدگی ریشه *Phytophthora capsici* موجب کنترل بیماری شدند که مکانیزم کنترل را تولید آنزیم‌های گروه بتا– ۱و۳ گلوکاناز [2] و ۱و٤ گلوکانازها[3] و لیپازها[4] نام بردند (۲۰). در این بررسی در راستای استراتژی کاهش مصرف سم و بقایای شیمیایی، اقدام به جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف تریکودرما از خزانه‌های توتون در استان مازندران شد. گونه‌های موثر در سطح آزمایشگاه، برای بررسی‌های گلخانه انتخاب شدند.

مواد و روش ها

۱- جداسازی عامل بیماری

نمونه‌برداری از گیاهچه‌های بیمار خزانه‌های توتون مرکز تحقیقات توتون تیرتاش و نیز خزانه‌های توتون روستاهای اطراف صورت گرفت. به این صورت که از نقاط آلوده خزانه‌ها که گیاهچه‌های واقع در آنها دارای علائم آبسوختگی و نیز میسلیوم پنبه‌ای روی ساقه بودند نمونه‌هایی انتخاب شد. قطعاتی از نواحی حد فاصل بافت سالم و آلوده تهیه و پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت آب آگار[5]و سیب زمینی دکستروز آگار[6] کشت شدند (۲). پس از رشد قارچ *S. sclerotiorum* جداسازی و خالص‌سازی جهت آزمایش اثر متقابل با گونه‌های مختلف تریکودرما صورت گرفت.

۲- جداسازی قارچ تریکودرما از خاک

از خاک خزانه‌های توتون واقع در استان مازندران، نمونه‌های خاکی، هریک به وزن تقریبی ۵۰۰ گرم تا عمق ۳۰ سانتی متری تهیه و در کیسه پلاستیکی ریخته و به آزمایشگاه منتقل گردید. ۲۰ گرم خاک مرطوب از هر نمونه در ۵۰۰ میلی لیتر محلول اسیدسیتریک دو در هزار استریل حل گردیده و مخلوط حاصل خوب بهم زده شد تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون مذکور به وسیله پیپت به یک تشتک پتری (به قطر ۹ سانتی متر) حاوی۱۰ سی سی محیط آب آگار یک درصد استریل که بعد از استرلیزه کردن هنوز حالت مایع داشته و حرارت آن حدود ٤٥ درجه سانتی گراد بوده اضافه گردیده و به طور افقی در سطح میز به آرامی تکان داده تا سوسپانسیون مذکور به طور یکنواخت با محیط آب آگار مخلوط گردد. از هر نمونه خاک ۵ پتری به روش فوق تهیه و تا منعقد شدن کامل روی میز آزمایشگاه نگهداری شدند.

1- Mycoparasitism.
2- B-1,3- glucanases
3- B, 1,4 – glucanases
4- Lipases
5-WA
6- PDA

برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما در این تحقیق از محیط کشت انتخاب داوه [1] استفاده شد(۵). پس از آماده شدن محیط کشت داوه، در هر پتری استریل(به قطر ۹ سانتی متر)، ۱۵ سی‌سی از این محیط ریخته شد که بعد از منعقد شدن بوسیله یک چوب پنبه سوراخ کن استریل، حلقه‌هایی به قطر دو سانتی متر از کشت آب آگار حاوی سوسپانسیون خاک با رعایت شرایط استریل در وسط یک تشتک پتری حاوی محیط کشت داوه، کشت داده شد. تشتک های پتری به مدت دو روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از رشد پرگنه ها با مشخصات ماکروسکوپی تریکودرما با جداسازی و به روش تک اسپور خالص سازی شده و برای آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

۳- اثر جدایه های *Trichoderma* روی قارچ *S. sclerotiorum* در آزمایشگاه

۳-۱- اثر جدایه های *Trichoderma* روی عامل بیماری با روش کشت متقابل [2]

برای بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر روی عامل بیماریزا از روش کشت متقابل استفاده شد. که ابتدا در یک طرف تشتک پتری حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار، دیسکی به قطر شش میلیمتر از حاشیه کشت سه روزه قارچ عامل بیماری و در طرف مقابل دیسکی از حاشیه کشت جوان تریکودرما به فاصله یک سانتی متر از لبه تشتک قرار داده شد (۱، ۲٦ و ۲۷). برای شاهد از یک قرص محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار خالص به جای تریکودرما استفاده شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. قطر پرگنه قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد نسبت به شاهد مقایسه و محاسبه گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ۱٪ = Q انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum* با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد} - \text{قطر رشد میسلیوم در پتری تیمار}}{\text{قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

۳-۲- بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی عامل بیماری

به منظور مشاهده نحوه ارتباط ریسه‌های جدایه‌های مختلف تریکودرما (Tr6a، Tr9b، Tr102 و Tr29-1) با ریسه‌های قارچ *S. sclerotiorum* از نظر پارازیته کردن و لیز کردن به شرح زیر عمل شد:

الف) یک لام حاوی لایه نازکی از محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار روی یک کاغذ صافی استریل و مرطوب در یک تشتک پتری استریل قرار داده شد. در یک طرف لام حلقه‌ای به قطر سه میلی متر از کشت جوان سه روزه قارچ عامل بیماری و در طرف دیگر لام حلقه‌ای به قطر سه میلی متر از کشت

1- Davet, 1971
2- Dual culture

جوان سه روزه جدایه تریکودرما قرار داده شد. تشتک ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گـراد بـه مدت دو روز نگهداری شدند. برای هر جدایه از تریکودرما پنج تشتک پتری در نظر گرفتـه شـد. بعـد از هر ٢٤ ساعت سه تشتک پتری از هر جدایه از نظر نحوه تاثیر آنتاگونیـستی روی عامـل بیمـاریزا در زیـر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (۵).

ب) در یک طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار قارچ عامل بیمـاری و در طرف دیگر جدایه‌های تریکودرما کشت داده شد. در هنگام کشت قارچ‌ها، لام‌های تمیز و ضد عفونی شده با الکل پس از عبور از چراغ الکلی(به منظور ضدعفونی و گرم کردن آن) در وسط تشتک پتری بـین ریسه‌های قارچ عامل بیماری و جدایه‌های تریکودرما قرار داده شد. بدین ترتیب همزمان با رشـد هـر دو قارچ بیماریزا و جدایه‌های آنتاگونیست پس از دو الی سه روز ریسه‌هـای آنهـا روی لام آمـده و بـا هـم بر خوردکردند سپس با برداشتن لام در زیر میکروسکوپ نحوه تاثیر جدایه‌هـای تریکودرمـا روی قـارچ عامل بیماری مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش پنج تشتک پتری به ازای هر جدایـه آنتاگونیـست کشت و لام گذاری شد(۵).

۳-۳- بررسی اثر متابولیت‌های فرار(گازی) تریکودرما در رشد میسلیوم قارچ

در این آزمایش از چهار جدایه برتر تریکودرما (Tr6a، Tr9b، Tr102 و Tr29-1) در آزمایش کشت متقابل که از نمونه‌های خاک نقاط مختلف استان جداسازی شده استفاده شد. برای انجام این آزمایش دیسکی به قطر شش میلی متر از حاشیه کشت جوان سه روزه تریکودرما در وسط تشتک پتری حاوی سیب زمینـی دکستروز آگار قرار داده شد. بعد از گذشت ٢٤ ساعت از حاشیه کشت جوان سه روزه قارچ عامل بیماری دیسکی در وسط تشتک پتری حاوی سیب زمینی دکستروز آگار قرار داده شد. با رعایت شـرایط سـترون درب تشتک پتری حاوی قارچ آنتاگونیست و بیماری برداشته شـد و تـشتک پتـری حـاوی آنتاگونیـست وارونه بر روی تشتک حاوی قارچ عامل بیماری قرار داده و لبه‌های تشتک پتری با نوار پارافیلم مـسدود گردید (۲۵). تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و درصد کـاهش رشـد محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل چهار تیمار در چهار تکرار انجام شد.

درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum* با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{قطر رشد میسلیوم در پتری تیمار} - \text{قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیوم در پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

داده‌های به دست آمده از آزمایش (درصد بازداری در هـر تکـرار) مـورد تجزیـه و تحلیـل آمـاری قـرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ۱٪ = Q انجام شد.

٤- تاثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی یقه توتون در سطح گلخانه

در این آزمایش از سه جدایه تریکودرما که در آزمایش قبلی استفاده شده بود بـه کـار گرفتـه شـد. ایـن آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار انجام شد. در این آزمون خاک گلدان‌ها پاستوریزه شده (در دمای ٦٥ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته) و قطر دهانه گلدانها ده سانتی متر بود. در هر گلدان چهار نشا سالم توتون رقم ویرجینیا کوکر ۳٤۷ نگهداری شـد و پـس از محلـول پاشـی بـا تریکودرما (۲×۱۰^{۸} اسپور در هر میلی لیتر)در محل اتصال پایین‌ترین برگ به ساقه در نزدیکـی طوقـه بـا ایجاد خراش و قرار دادن دیسک قارچی عامل بیماری، دور آن جهـت حفـظ رطوبـت بـا نـوار پـارافیلم پیچیده شد. داده‌های به دست آمده از آزمایش (تعداد نشاهای سالم، ارتفاع بوته، وزن تر و خشک) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تبدیل داده درصد کنتـرل(تعـداد نـشاهای سـالم) بـر اسـاس تبـدیل رادیکالی صورت گرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنـه دانکـن ۱٪ = Q انجـام شـد. درصد تلفات نشاها در تیمار از رابطه زیر محاسبه گردید:

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

نتایج و بحث

۱ - جداسازی عامل بیماری

از تمامی نمونه‌های به دست آمده از خزانه‌های آلوده به بیمـاری پوسـیدگی یقـه توتـون، عامـل بیمـاری *S. sclerotiorum* جداسازی شد و خصوصیات آن با مشخصات ذکر شده توسط کوهن (۱۹۷٤) مطابقت داشت و جدایه‌ای که سریعتر کل تشتک پتری را پر می‌نمود و در واقع رشـد سـریعتر داشـت انتخـاب و برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شد.

۲- شناسایی قارچ تریکودرما

بعد از خالص سازی نمونه های جدا شده، ابتدا بـر اسـاس مشخـصات ماکروسـکوپی و میکروسـکوپی شناسایی جدایه‌های بدست آمده در حد جنس با استفاده از کلید بی‌ست[1] انجام شـد (١٤، ١٥ و ١٦). از میان ۷۲ نمونه خاک، ٦۰ جدایه به عنوان جنس تریکودرما شناسایی شد. بررسی دقیق‌تر جدایه‌هـای ایـن جنس در حد گونه با استفاده از ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی اندام‌هایی از قبیل کنیدیوفورها، فیالیدها و فیالوسپورها بر اساس کلیـدهای شناسـایی ظفـری و همکـاران (۱۳۸۱)، گمـز و بی ست (۱۹۹۸) و سایر منابع اقدام به شناسایی گونه‌ها گردید (جدول۲)(۱۰، ۱۷، ۱۸ و ۲۳).

1- Bissett, 1991

گونه‌های مختلف تریکودرما شناسایی شده شامل موارد زیر می‌باشد:

۱- *Trichoderma harzianum* Rifai, Mycol. Pap. 116: 38. 1969

پرگنه ها دارای رشد سریع و بعد از سه روز قطر آنها روی محیط کشت مالت آگار دو درصد به هفت تا نه سانتی متر می رسد. ریسه های هوایی کرکی، سفید تا متمایل به خاکستری و به ندرت متمایل به زرد هستند. کنیدیوم زایی غالبا بصورت پراکنده تمام سطح محیط کشت را می پوشاند. کنیدیوم زایی گاهی به صورت دوایر متحدالمرکز یا متراکم در نزدیک حاشیه تشتک ها غالبا به صورت توده های بزرگ نامنظم به هم پیوسته تشکیل می شود. سطح جوش ها به صورت دانه دانه یا پودری به نظر می رسد و حاشیه آنها اغلب به وسیله ریسه های عقیم احاطه شده است. جوش ها ابتدا به رنگ سبز متمایل به زرد ظاهر شده ولی بلافاصله به سبز تیره متمایل می شوند. پرگنه ها کمی بوی خاک می دهند یا بویی از آنها متصاعد نمی شود. کلامیدوسپورها به صورت انتهایی و میانی تولید می شوند و تقریبا کروی یا بیضوی یا گلابی شکل هستند. کنیدیوفورها بی رنگ، دارای دیواره صاف، راست یا قابل انعطاف هستند. کنیدیوفورهای خیلی منشعب و شاخه های اولیه با زاویه راست منشعب شده یا به طرف نوک متمایل می شوند. انشعابات معمولا بصورت دسته های دو تا سه تایی و پیرامونی روی کنیدیوفور تشکیل می شوند. شاخه های اولیه به طرف پایه بلندتر شده و مجددا منشعب می شوند و شاخه های ثانویه روی آنها بصورت دو تا چهار تایی پیرامونی تشکیل می شوند. فیالید ها آمپولی شکل تا تقریبا کروی یا تنگی شکل هستند. فیالیدها غالبا روی شاخه های انتهایی در دسته های دو تا شش تایی بطور پیرامونی به وجود می آیند. کنیدیوم ها تقریبا کروی تا واژ تخم مرغی یا بیضوی کوتاه هستند. کنیدیوم ها در انتهای فوقانی گرد و در پایه باریک و قدری نوک دار هستند. سطح کنیدیوم ها صاف و به رنگ سبز روشن تا بی رنگ است.

۲- *Trichoderma citriniviride* Bissett, Can. J. Bot. 62: 926. 1984

کنیدیوم زایی روی سیب زمینی دکستروز آگار در تمام یا قسمتی از سطح پرگنه ظاهر می شود. رنگ پرگنه ها روی این محیط سبز متمایل به زرد است. سطح زیرین پرگنه ها زرد است. در محیط کشت مالت آگار کنیدیوم زایی به صورت دسته های سست و غالبا در حاشیه محیط کشت تشکیل می شوند. دسته های کنیدیومی ابتدا سفید بوده و به سرعت شروع به سبز شدن می نمایند و نهایتا سبز متمایل به زرد می شوند. در کشت های مسن کلامیدوسپور به تعداد کم بصورت میانی روی ریسه های غرق شده تشکیل می گردد. کنیدیوفور از نوع کنیدیوفور بخش *Longibrachiatum* است. کنیدیوفورها بی رنگ، نسبتا بلند و ایستاده، دارای انشعابات غالبا نامنظم و به ندرت به صورت جفتی و متقابل که با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می دهند. فیالید ها تنگی شکل[1] تا آمپولی شکل هستند و به صورت دسته های دو تا سه تایی و پیرامونی روی کنیدیوفور تشکیل می شوند. تعدادی از فیالیدها به صورت منفرد به ویژه در

1- Lageniform

قسمت انتهایی محور اصلی کنیدیوفور و شاخه های فرعی تولید می گردند. فیالیدها در قسمت پایه جمع شده و در وسط تا حدودی متورم و در محل تشکیل کنیدیوم کاملا باریک می گردند. کنیدیوم ها مستطیلی تا بیضوی نسبتا منظم و اندازه آنها کوچکتر از سایر گونه های بخش *Longibrachiatum* می باشد. دیواره کنیدیوم ها صاف و به رنگ سبز روشن است.

۳- *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, Mycol. Pap. 116: 45. 1969

کنیدیوم زایی روی سیب زمینی دکستروز آگار بعد ٢٤ ساعت در دمای ۳۰-٤۰ درجه سانتی گراد شروع می شود ولی در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و کمتر کنیدیوم زایی با تاخیر شروع می شود. کنیدیوم زایی به رنگ سبز تیره و بصورت پراکنده تمام سطح محیط کشت را می پوشاند. در دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتی گراد کنیدیوم زایی گاهی به صورت دوایر متحدالمرکز می باشد. غالبا توده های کنیدیومی خال مانند و سفید رنگ در سطح پرگنه ها ظاهر می شوند به طوری که پرگنه ها حالتی شبیه گلسنگ به خود می گیرند. سطح زیرین پرگنه ها در دمای٤۰ درجه سانتی گراد بی رنگ ولی در دماهای پایین تر زرد می شود. در محیط کشت مالت آگار کنیدیوم زایی به صورت پراکنده و یا به طور دسته هایی در حاشیه محیط کشت تشکیل می شوند. کلامیدوسپور روی ریسه هوایی و داخل محیط کشت تشکیل می گردد. کنیدیوفور از نوع تیپیک بخش *Longibrachiatum* است. کنیدیوفورها، نسبتا بلند و ایستاده، دارای انشعابات کم تراکم و نامنظم که با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می دهند و یا این که نوک آنها به طرف محور اصلی کنیدیوفور خم می شوند. فیالید ها تنگی شکل کشیده هستند و غالبا به صورت منفرد یا گاهی به صورت دسته های دو تا سه تایی و پیرامونی روی کنیدیوفور تشکیل می شوند. در قسمت انتهایی کنیدیوفور فیالیدها همیشه به صورت منفرد قرار گرفته و همچنین نوک شاخه های فرعی به یک فیالید استوانه ای ختم می شود. کنیدیوم ها بیضوی کشیده تا تخم مرغی کشیده هستند و در محل اتصال به فیالید نوک دارند. کنیدیوم ها سبز کم رنگ، دارای دیواره صاف می باشند.

٤- *Trichoderma koningii* Oud., in Oudemans and Koning, Arch. Neerl. Sci. II,7:291. 1902

پرگنه ها دارای رشد سریع و بعد از چهار روز قطر آنها روی محیط کشت مالت آگار دو درصد در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به هفت تا نه سانتی متر می رسد. پرگنه ها ابتدا بی رنگ هستند ولی بعد از اسپورزایی سفید و به تدریج سبز متمایل به خاکستری و در نهایت سبز تیره می شوند. کنیدیوم زایی به صورت پراکنده در تمام سطح محیط کشت و یا در حاشیه تشتک ها، ریسه های هوایی کرک مانندی تولید کرده و شروع به اسپورزایی می نمایند. در این حالت کنیدیوم زایی به صورت توده پنبه ای سست در حاشیه تشتک ها انجام می شود. سطح زیرین پرگنه معمولا بی رنگ است و به ندرت زرد روشن می شود. کلامیدوسپور در برخی از جدایه ها بندرت تشکیل می شود و اغلب به صورت میانی و به ندرت انتهایی روی ریسه های داخل محیط کشت ایجاد می شوند. کنیدیوفور در برخی دارای انشعابات

فراوان و معمولا شاخه ها به صورت دسته های دو تا سه تایی با زاویه های به نسبت باز از محور اصلی منشعب می شوند. شاخه های اولیه معمولا تولید شاخه های ثانویه می نمایند که اینها نیز ممکن است مجددا منشعب گردند. معمولا شاخه ها به صورت جفتی و متقابل تولید می شوند. در برخی از جدایه ها کنیدیوفورها دارای نوک های طویل و منتهی به یک فیالید استوانه ای هستند و فیالیدهای کوتاه و متورم در قسمت زیر طویل شدگی به وجود می آیند. فیالید ها تنگی شکل تا آمپولی شکل و پایه آنها باریک تر از قسمت میانی آنها به طرف نوک است. فیالیدها معمولا به صورت جفتی در مقابل یکدیگر تولید می شوند ولی در جدایه های دارای کنیدیوفور ظریف تر تعداد زیادی از فیالیدها به صورت نا منظم روی کنیدیوفور قرار می گیرند. فیالیدها در جدایه های دارای کنیدیوفور قوی تر در دستجات سه تا پنج تایی پیرامونی به وجود می آیند. کنیدیوم ها مستطیلی[1] تا بیضوی متمایل به استوانه ای با دیواره صاف و به رنگ سبز روشن تا سبز می باشند. این گونه با داشتن کنیدیوفور تیپیک بخش *Trichoderma* از گونه های سایر بخش ها و با داشتن کنیدیوم ها مستطیلی از گونه های مربوط به بخش خود قابل تفکیک می باشد.

۵- *Trichoderma atroviride* Bissett, Can. J. Bot. 62: 930. 1984

پرگنه ها دارای رشد به نسبت سریع می باشند و بعد از سه روز قطر آنها روی محیط کشت مالت آگار دو درصد در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به ۸۰-۵۵ میلی متر می رسد. کنیدیوم زایی به صورت یکنواخت و پراکنده در تمام سطح محیط کشت پراکنده است. ریسه ها بی رنگ و دارای دیواره صاف می باشند. کنیدیوفورها درختچه ای و قابل انعطاف می باشند. شاخه های فرعی غالبا به صورت منفرد روی کنیدیوفور قرار می گیرند ولی تعدادی نیز ممکن است به صورت جفتی و حتی دسته های سه تایی پیرامونی منشعب گردند. زاویه انشعاب شاخه فرعی نسبت به محور اصلی حدود نود درجه و در قسمت انتهایی کمتر از نود درجه می باشد. فیالیدها راست یا خمیده اند و غالبا در قسمت نوک قلاب مانند می شوند. فیالیدها غالبا منفرد یا در دسته های دو تا چهار تایی به وجود می آیند. کنیدیوم ها نیم کروی تا تخم مرغی و دارای دیواره صاف و فاقد اثر محل افتادن می باشند. در انتهای فوقانی گرد و در پایه باریک و قدری نوک دار هستند. سطح کنیدیوم ها صاف و به رنگ سبز روشن تا بی رنگ است. کنیدیوفور این گونه نسبت به سایر گونه های بخش *Trichoderma* متفاوت و خیلی شبیه کنیدیوفور *T. viride* است.

۶- *Trichoderma ghanense* Doi. Y. Abe & J. Sugiy., Bull. Natle. Sci. Mus. Ser. B (Bot.).13: 1984

کنیدیوم زایی روی سیب زمینی دکستروز آگار به صورت یکنواخت و پراکنده در تمام سطح محیط کشت است و به رنگ سبز تیره است. سطح زیرین پرگنه ها بی رنگ است. کنیدیوفورها از نوع بخش *Longibrachiatum* است. نوک محور اصلی کنیدیوفورها در حدود ۶۰ میکرومتر بدون انشعاب است و فقط فیالیدهای منفرد روی آن تشکیل می شوند. فیالیدها روی شاخه های فرعی غالبا به صورت منفرد و

1- Oblong

به ندرت به صورت دسته های سه تایی به وجود می آیند. فیالیدها اغلب استوانه ای شکل ولی بعضی از آنها قسمت میانی تا حدودی عریض تر است، تعدادی در انتها پیچیده و قلاب مانند می باشد. کنیدیوم ها بیضوی دارای سطح صاف و به رنگ سبز تیره است.

۷- *Trichoderma virens* (J. Miller, Giddens & Foster) von Arx, Beih, Nova Hedwigia 87:288.

پرگنه ها دارای رشد سریع و بعد از چهار روز قطر آنها روی محیط کشت مالت آگار دو درصد در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به هفت تا نه سانتی متر می رسد. کنیدیوم زایی بصورت پراکنده در تمام سطح محیط کشت و یا به صورت جوش های پراکنده نزدیک حاشیه محیط کشت و گاهی به صورت دوایر متحدالمرکز در سطح محیط کشت صورت می گیرد. رنگ پرگنه بعد از اسپورزایی سبز شده و به تدریج سبز متمایل به آبی تیره در می آید و در نهایت سبز تیره می شوند. سطح زیرین پرگنه معمولا بی رنگ است. ریسه های هوایی کرکی، سفید تا متمایل به خاکستری هستند. ریسه های خوابیده بی رنگ با دیواره صاف می باشند. تعداد زیادی کلامیدوسپورهای بی رنگ تا سبز روشن به خصوص روی ریسه های خوابیده به صورت انتهایی یا میانی به شکل کروی تا بیضوی تولید می نمایند. کنیدیوفورها بی رنگ، دارای دیواره صاف و غالبا در حدود نصف طول پایه کنیدیوفور نازا و غیر منشعب است یا دارای یک تا دو شاخه زایاست اما به طرف نوک کنیدیوفور، شاخه ها به طور نامنظم منشعب شده و هر یک به یک دسته سه تا شش تایی از فیالیدها منتهی می شوند. انشعابات دارای زاویه راست یا به طرف محور اصلی متمایل و نوک کنیدیوفور غالبا حامل فیالیدهای متراکم و پیرامونی است و فاقد قسمت نازا می باشد. فیالید ها تنگی شکل تا آمپولی شکل هستند. اغلب فیالیدها به صورت فراهم در دستجات دو تا پنج تایی روی شاخه های انتهایی به وجود می آیند. کنیدیوم ها بیضوی تا واژ تخم مرغی هستند. سطح کنیدیوم ها صاف به نظر می رسد و به رنگ سبز روشن است.

۳- اثر جدایه‌های *Trichoderma* روی قارچ *S. sclerotiorum* در آزمایشگاه

۳-۱- اثر جدایه‌های *Trichoderma* روی عامل بیماری با روش کشت متقابل

درکشت متقابل ٦۰ جدایه تریکودرما با قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون *S. Sclerotiorum* درصد کنترل عامل بیماری بین ۵۱/۲۵ تا ۹٤ درصد بود که جدایه‌های Tr6a، Tr102، Tr9a، Tr9b، Tr10a، Tr10b و Tr29-1 بیشترین میزان کنترل به ترتیب ۹٤، ۹۰، ۹۰، ۹۰، ۹۰، ۹۰ و ۹۰ درصد که جدایه‌های Tr6a، Tr9a، Tr9b، Tr10a و Tr10b از مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش و جدایه Tr102 از مرمت ساری و جدایه Tr29-1 از دارابکلا جداسازی شدند. از لحاظ گروه‌بندی آماری دانکن جدایه T6a درگروه a و بقیه جدایه‌ها در گروه ab قرار داشتند. همچنین کمترین میزان بازدارندگی رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری (*S. sclerotiorum*) به ترتیب متعلق به جدایه‌های Tr103 به میزان(w) ۵۱/۲۵ درصد و

جدایه Tr107 به میزان (uv) ٥٦/٥ درصد از روستای خارکش ساری جدا شده بودند (جدول ۲). در بین گونه‌های مختلف تریکودرما جدا شده، گونه *T. harzianum* بیشترین فراوانی به میزان ٦٥٪ را داشت.

جدول ۱: نتایج تجزیه و منابع تغییرات آزمایش اثر جدایه های *Trichoderma* روی عامل بیماری با روش کشت متقابل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	٥٩	١٤٧/٦ **
خطا	١٨٠	١٣/٦٩
مجموع	٢٣٩	

ضریب تغییرات= ٤/٦٤ ** تفاوت در سطح آماری ۱٪ معنی دار است

۳-۲- بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی عامل بیماری

بررسی‌های میکروسکوپی در این آزمایش نشان داد که در سطح لایه نازک محیط کشت روی لام‌ها ریسه‌های تمام جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی در مراحل 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 در جدایه های Tr29-1 و Tr102 اثری از پیچش ریسه ای و قطعه قطعه شدن میسلیومی مشاهده نگردید ولی نفوذ مستقیم ریسه‌های تریکودرما به داخل ریسه‌های قارچ مشاهده شد. اما همه جدایه‌ها در نهایت باعث تخریب[1] میسلیومی قارچ بیمارگر شدند.

۳ -۳- بررسی اثر متابولیت‌های فرار(گازی) تریکودرما در رشد میسلیوم قارچ

نتایج آزمایش اثر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست روی قارچ بیمارگر نشان می‌دهد که ترشحات فرار Tr6a بیشترین و ترشحات فرار Tr29-1 کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر داشتند که به ترتیب به میزان ۸۳/۲۷ و ۷۰ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر شدند(جدول٤).

٤- تاثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی یقه توتون در سطح گلخانه

نتایج آزمایش بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از بیماری پوسیدگی یقه توتون در گلخانه نشان می‌دهد که جدایه های Tr6a، Tr9b، Tr102، Tr29-1 به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ٥٦/٢٥ و ٦٨/٧٥ درصد بیماری را کنترل کردند. همچنین این جدایه‌ها موجب افزایش ارتفاع، وزن‌تر و خشک اندام های هوایی بوته در حضور قارچ عامل بیماری شدند. ارتفاع بوته های تیمار شده با جدایه‌های مختلف تریکودرما از بوته‌های شاهد غیر آلوده هم بیشتر بود (جدول٦).

1- Lyses

جدول ۲: گونه ها و جدایه‌های تریکودرما جدا شده از نمونه‌های خاک استان مازندران و گروه بندی آنها از نظر درصد بازداری رشد میسلیومی قارچ *S. sclerotiorum* پس از پنج روز بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار

شماره	نام جدایه	محل نمونه برداری خاک	گونه تریکودرما	درصد بازداری رشد میسلیوم	گروه بندی
۱	Tr6a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۹٤	a
۲	Tr9b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۹۰	ab
۳	Tr102	مرمت ساری	*T. harzianum*	۹۰	ab
٤	Tr29-1	دارابکلا ساری	*T. harzianum*	۹۰	ab
٥	Tr10a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۹۰	ab
٦	Tr9a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۹۰	ab
۷	Tr10b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۹۰	ab
۸	Tr20-1	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۸	abc
۹	Tr54	ساری لالیم	*T. harzianum*	۸۸	abc
۱۰	Tr72-2	وارد محله ساری	*T. longibrachiatum*	۸٥/٥	bcdef
۱۱	Tr71	پایین کولا ساری	*T. longibrachiatum*	۸٥/۲٥	bcdef
۱۲	Tr73	وارد محله ساری	*T. atroviride*	۸۳/٥	bcdef
۱۳	Tr23-1	اسبو کلا ساری	*T. harzianum*	۸۳	bcdefg
۱٤	Tr32-2	ساری لالیم	*T. citrinoviride*	۸۳	bcdefg
۱٥	Tr3a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۲/٥	cdefgh
۱٦	Tr55	ساری لالیم	*T. koningii*	۸۲/۲٥	cdefgh
۱۷	Tr20-2	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۲	cdefghi
۱۸	Tr31-3	ساری لالیم	*T. harzianum*	۸۲	cdefghi
۱۹	Tr63	کوهسار کنده نکا	*T. harzianum*	۸۲	cdefgh
۲۰	Tr30	انستیتو تیرتاش	*T. citrinoviride*	۸۱/٥	cdefghi
۲۱	Tr2e	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۱/۲٥	cdefghijk
۲۲	Tr32-1	ساری لالیم	*T. harzianum*	۸۱	cdefghijkl
۲۳	Tr23-2	اسبو کلا ساری	*T. harzianum*	۸۰/۷٥	cdefghijkl
۲٤	Tr8c	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۰/٥	defghijklm
۲٥	Tr31-1	ساری لالیم	*T. longibrachiatum*	۸۰/٥	defghijklm
۲٦	Tr70	پایین کو لا ساری	*T. longibrachiatum*	۸۰	defghijklm
۲۷	Tr29-2	دارابکلا ساری	*T. longibrachiatum*	۸۰	defghijklm
۲۸	Tr104	خارکش ساری	*T. harzianum*	۸۰	defghijklm
۲۹	Tr8b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۰	defghijklm
۳۰	Tr28-2	دارابکلا ساری	*T. citrinoviride*	۸۰	cdefghijkl
۳۱	Tr62	جا مخانه نکا	*T. harzianum*	۸۰	defghijklm
۳۲	Tr61	جا مخانه نکا	*T. harzianum*	۷۸/۷٥	defghijklmn
۳۳	Tr59	دارابکلا ساری	*T. harzianum*	۷۷	efghijklmno

ادامه جدول ۲:

شماره	نام جدایه	محل نمونه برداری خاک	گونه تریکودرما	درصد بازداری رشد میسلیوم	گروهبندی
۳٤	Tr67	چلمردی نکا	*T. harzianum*	۷۷	efghijklmno
۳٥	Tr58	دارابکلا ساری	*T. citrinoviride*	۷۷	efghijklmno
۳٦	Tr60	جامخانه نکا	*T. harzianum*	۷٦/۷٥	efghijklmno
۳۷	Tr57	دارابکلا ساری	*T. koningii*	۷٦/۷٥	efghijklmno
۳۸	Tr56	ساری لالیم	*T. koningii*	۷٦/۲٥	fghijklmnop
۳۹	Tr2d	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷٥	hijklmnop
٤۰	Tr32-3	ساری لالیم	*T. virens*	۷٥	hijklmnopq
٤۱	Tr74	وارد محله ساری	*T. harzianum*	۷٥	hijklmnopq
٤۲	Tr2c	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷٥	hijklmnop
٤۳	Tr7a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷٥	hijklmnopq
٤٤	Tr7b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷٤	jklmnopq
٤٥	Tr7c	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۳	mnopqr
٤٦	Tr5c	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۲/۲٥	nopqrs
٤۷	Tr8a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۲	nopqrs
٤۸	Tr4a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۱/۷٥	opqrs
٤۹	Tr2b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۱/٥	nopqrs
٥۰	Tr98-2	مرمت ساری	*T. ghanens*	۷۰	opqrs
٥۱	Tr2a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۰	opqrs
٥۲	Tr3b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۷۰	opqrs
٥۳	Tr64	کوهسار کنده نکا	*T. atroviride*	٦۹	qrst
٥٤	Tr65	چلمردی نکا	*T. atroviride*	٦۷/۷٥	qrst
٥٥	Tr105	خارکش ساری	*T. koningii*	٦۷/٥	qrst
٥٦	Tr68	پایین کولا ساری	*T. citrinoviride*	٦٥	st
٥۷	Tr101	مرمت ساری	*T. ghanens*	٦٥	st
٥۸	Tr100	مرمت ساری	*T. koningii*	٥۸/۲٥	u
٥۹	Tr107	خارکش ساری	*T. harzianum*	٥٦/٥	uv
٦۰	Tr103	خارکش ساری	*T. harzianum*	٥۱/۲٥	wv

یکی از روش‌های کنترل بیماری های گیاهی، کنترل بیولوژیک است. یکی از موفق ترین و پرمصرف ترین میکروارگانیسم ها که باعث جلوگیری از خسارت قارچ ها در گیاهان می شود گونه های مختلف جنس تریکودرما است (۵ و ۲۲).

جدول ۳: نتایج تجزیه و تحلیل آماری اثر ترکیبات فرار جدایه های *Trichoderma* روی عامل بیماری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	٤	٥٠٥٦/٩٤**
خطا	۱۵	۱۲/۸۹
مجموع	۱۹	

ضریب تغییرات= ۵/۷ ** تفاوت در سطح آماری ۱٪ معنی دار است

جدول ٤: تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* روی عامل بیماری و گروهبندی تیمارها

شماره	نام جدایه	محل نمونه برداری خاک	گونه تریکودرما	درصد بازداری رشد میسلیوم
۱	Tr6a	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۳/۲۷a
۲	Tr9b	انستیتو تیرتاش	*T. harzianum*	۸۱/۹a
۳	Tr102	مرمت ساری	*T. harzianum*	۷۹/۱a
٤	Tr29-1	دارابکلا ساری	*T. harzianum*	۷۰b
۵	شاهد	–	–	۰c

جدول ۵ : تجزیه و منابع تغییرات آزمایش اثر جدایه های*Trichoderma harzianum* روی عامل بیماری در سطح گلخانه

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		درصد کنترل بیماری	ارتفاع بوته	وزن تر	وزن خشک
جدایه	۵	٥٤/٨١**	١٤٢/١٦**	۲۵/۳**	۱۲/٦٦**
خطا	۱۸	۰/۳۸	۱/۸	۱/۲۲	۰/۵۵
مجموع	۲۳				
ضریب تغییرات(٪)		۸/٤	۹/٤۸	۱۹/۲۲	۲۰/۳۲

**تفاوت در سطح آماری ۱٪ معنی دار است

جدول ٦: گروه بندی آماری اثر جدایه‌های*Trichoderma harzianum* در کاهش آلودگی در سطح گلخانه

نام تیمار	درصد کنترل بیماری	ارتفاع بوته	وزن تر	وزن خشک
شاهد غیر آلوده	۱۰۰a	١٤/۵b	۵d	۳c
Tr6a	۸۷/۵ab	۱۸/۲۵a	۸/۲۵a	۵/۲۵a
Tr9b	۸۱/۲۵bc	۱۷a	۷/۷۵ab	۵/۲۵a
Tr102	٦۸/۷۵cd	١٦/۵a	٦/۵cb	٤/۲۵b
Tr29-1	۵٦/۲۵d	١٦/۵a	۵/۷۵cd	۳/۷۵bc
شاهد آلوده	۰ e	۲/۲۵c	۱/۲۵e	۰/۵d

تریکودرما از قارچ های ناقص و از راسته هیپوکریالس[1] است و تلئومورف آن گونه های جنس هیپوکریا[2] می باشد (۷). با توجه به قابلیت بالای قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماریزا، جداسازی و شناسایی گونه‌های تریکودرمای خزانه‌های توتون استان مازندران انجام شد. از میان ۷۲ نمونه خاک،٦۰ جدایه به عنوان جنس تریکودرما شناسایی شد. ظفری و همکاران در سال ۲۰۰۲ سه گونه جدید برای فلور قارچ‌های ایران با نام‌های *T. asperellum*، *T. inhamatum* و *T. tomentosum* معرفی کردند (۹). همچنین ظفری و همکاران در سال۲۰۰۵ سه گونه دیگر با نام‌های *T. ghanense*، *T. spirale* و*T. atroviride* که به ترتیب مربوط به بخش‌های *Longibrachiatum*، *Pachybasium* و *Trichoderma* می باشند را معرفی کردند که در این بین *T. atroviride* در کنترل بیولوژیک بیماری های گیاهی با اهمیت است (۱۰). جدا شدن قارچ‌های آنتاگونیست از خاک مناطق مختلف نشانه‌ای از وجود آن ها در بسیاری از خاک‌های زیر کشت گیاهان است. بنابراین برای مدیریت صحیح بیماری‌ها می‌توان ضمن جلوگیری از مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی، از این عوامل بیولوژیک به طور مصنوعی تکثیر و استفاده کرد. قارچ‌های آنتاگونیست در کشت متقابل روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار باعث کاهش و جلوگیری از رشد قارچ بیماریزا (*S. sclerotiorum*) شدند. میزان بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیماریزا توسط گونه‌های مختلف تریکودرما یکسان نبود. حداقل ۵۱/۲۵ و حداکثر ۹٤ درصد ثبت گردید. این نتایج مشابه تحقیقات رادوان و همکاران (۲۰۰٦) و کوکوک و کایوانس (۲۰۰٤) می‌باشد. در بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه‌های آنتاگونیست با قارچ *S. sclerotiorum* 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، تشخیص لکتین موجود در دیواره سلولی بیمارگر و تشکیل آپرسوریوم، اندام‌های نفوذی و حلقه‌های به دام اندازنده بیمارگر می‌باشد. همان طوری که چنین نتایجی در تحقیقات بهبودی و همکاران، امیر صادقی و همکاران و رادوان و همکاران گزارش شده است (٤، ۵ و ۳۲). در بررسی‌های آزمایشگاهی در این تحقیق مشخص شده است که گونه‌های تریکودرما با تولید ترکیبات فرار باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر می‌شوند. مرآت و همکاران در سال ۱۳۷۹، در سطح آزمایشگاه در مورد مکانیزم کنترل قارچ *S. sclerotiorum* عامل خشکیدگی سر شاخه ها و جوانه های توت، مطالعاتی انجام دادند که مشخص گردید در آزمایش اثر کشت متقابل گونه های *T. harzianum* ، *T. Longibrachiatum* و *T. pseudokoningii* کارایی بهتری در کنترل قارچ عامل بیماری و مکانیزم اثر آن، تولید بیشتر متابولیت های فرار در جلوگیری از رشد پرگنه عامل بیماری و تاثیر لیز کنندگی اسکلروت ها نسبت به سایر گونه های تریکودرما بودند (۱۱). دنیس و وبستر (۱۹۷۱) استالدئید را به عنوان مهمترین متابولیت فرار *T. viride* معرفی نمودند(۱۹). زپا و همکاران (۱۹۹۱)

1- Hypocreales
2- Hypocrea

متابولیت‌های فرار متعددی شامل لاکتون‌ها، الکل‌ها، مشتقات ترپن و مشتقات آلفاپیرون را در شرایط کشت متفاوت از *T. viride* به دست آوردند و نشان دادند که جدایه‌های قارچ، مواد و روش کشت در کمیت و کیفیت تولید متابولیت‌های فرار موثرند. متابولیت‌های فرار و غیر فرار می‌توانند در خلل و فرج خاک انتشار یافته و نیازی به تماس مستقیم با عامل بیماری برای تاثیرگذاری آنها نمی‌باشد (۳٦). نتایج آزمایش بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از بیماری پوسیدگی یقه توتون در گلخانه نشان می‌دهد که جدایه‌های Tr6a، Tr9b، Tr102 و Tr29-1 به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ۵٦/۲۵ و ٦۸/۷۵ درصد بیماری را کنترل کردند. رادوان و همکاران گزارش کردند که توانایی تریکودرما در کاهش بیماری به خاطر خاصیت آنتاگونیستی تریکودرما و تخریب میسلیوم قارچ‌های بیماریزا در خاک و یا رقابت برای منابع کربنی و آهن در رایزوسفر(فرا ریشه) می‌باشد (۳۲). مکانیزم های دیگری که به وسیله هاول و یدیدیا و همکاران پیشنهاد شده، القا مقاومت در گیاهان تیمار شده با تریکودرما می‌باشد (۲۲ و ۳۵). همچنین در بررسی‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های تریکودرما موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی بوته در حضور قارچ عامل بیماری شدند. ارتفاع بوته‌های تیمار شده با جدایه‌های مختلف تریکودرما از بوته‌های شاهد غیر آلوده هم بیشتر بود که نشان دهنده تحریک جدایه‌های تریکودرما در رشد اندام‌های هوایی بوته‌های توتون می‌باشد. همانطوریکه در تحقیقات مهتابی و همکاران در سال ۱۳۸۰ نشان دادند که ماده تجاری تریکودرمین بی که حاوی *T. harzianum* و *T. viride* می باشد موجب افزایش ارتفاع بوته و وزن سبز گیاهچه های توتون در سطح گلخانه شده است (۱۲). در زیمباوه هم با استفاده از ایزوله T77 قارچ تریکودرما (*T. harzianum*) موجب کنترل قارچ های رایزوکتنیا و فوزاریوم در سطح خزانه و مزارع توتون شده و همچنین این قارچ آنتاگونیست موجب تحریک رشد توتون شده است (۸). همچنین توسط رادوان و همکاران در سال ۲۰۰٦ گزارش شده که جدایه‌های مختلف تریکودرما موجب تحریک رشد بوته‌های لوبیا با افزایش ارتفاع بوته، افزایش وزن خشک و تر بوته‌ها و افزایش درصد جوانه زنی بذور لوبیا در حضور قارچ *S. rolfsii* می شوند (۳۲). همچنین یدیدیا و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش نمودند که کاشتن نشاهای خیار در مزارعی که خاک آنها با *T. harzianum*(T-203) تیمار شده است موجب افزایش منطقه و طول ریشه و وزن خشک بوته می‌شود (۳۵). تحقیقات مختلف از جمله ویندهام و همکاران نشان می دهد که ترشحات تریکودرما حاوی فاکتور تنظیم کننده رشد می باشد که موجب افزایش رشد گیاه و جوانه زنی بذور گیاه می گردد. از طرفی افزایش رشد به علت کنترل بیمارگرهای ثانوی نیز می باشد و در نتیجه موجب افزایش رشد ریشه و جذب بیشتر مواد غذایی می گردد (۳٤). وجود آنزیم های مختلف تجزیه کننده دیواره سلولی بیمارگر و بافت گیاهی مانند سلولاز، لامیناریناز، بتا-۱ و۳ گلوکاناز، کیتیناز و کیتوبیاز در ترشحات تریکودرما باعث می شود که بافت های گیاهی و دیواره ریسه سریع تر تجزیه گردد. با تجزیه ترکیبات،

مواد غذایی لازم برای باکتری های خاک آماده شده و جمعیت آنها افزایش یافته و به این ترتیب فعالیت بیولوژیک خاک افزایش می یابد و باعث محدود شدن فعالیت عوامل بیماریزا می گردد (۵). با توجه به جدا شدن قارچ‌های آنتاگونیست از خاک مناطق مختلف و یافتن زمان و مقدار مناسب آنتاگونیست به خاک، بذر و یا محلول پاشی اندام‌های هوایی برای مدیریت صحیح بیماری‌ها می‌تواند قابل توجه باشد و برای دستیابی به مدیریت صحیح بیماری‌ها باید به شناخت کافی از عامل بیماری، مکانیزم عمل آن و فرمولاسیون مناسب آنتاگونیست دست یافت.

منابع

۱- اشرفی زاده، آ.، اعتباریان، ح. و زمانی زاده، ح. ۱۳۸٤. ازیابی جدایه های *Trichoderma* برای کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه. . فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های۱. جلد ٤۱. صفحه ۵۸-۳۹.

۲- اکبری کیارودی، س. ل.، نیک نژاد کاظم پور، م.، الهی نیا، س. ع. و خداپرست، س. الف. ۱۳۸٤. تاثیر باکتریهای آنتاگونیست روی *Sclerotinia sclerotium* عامل کپک سفید کلزا. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های۳. جلد ٤۱. صفحه ۳۲۸-۳۰۷.

۳- افشاری آزاد، ه.، چگینی، م. و باغبانی مهماندار، ف. ۱۳۸۵. مطالعه توان بیماریزایی جدایه های قارچ *S.sclerotiorum* عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ۵۰۹ صفحه.

٤- امیرصادقی، س.، شریفی تهرانی، ع. و حجارود، ق. ۱۳۷۱. اثرات چندین قارچکش و قارچ آنتاگونیست(*Trichoderma* spp) بر روی بیماری اسکلروتینیای بادمجان(*S.sclerotiorum*). پایان نامه کارشناسی ارشد ارائه شده به دانشکده کشاورزی کرج.دانشگاه تهران. ۲۰۱ صفحه.

۵- بهبودی، ک.، شریفی تهرانی، ع.، حجارود، ق. و زاد، ج. ۱۳۸٤. اثرات آنتاگونیستی گونه های *Trichoderma* spp. روی قارچ *Phytophthora capsici*، عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های۳. جلد ٤۱. صفحه ۳٦۲.-۳٤۵.

٦- سجادی، س. الف.، بهبودی، ک.، عاصمی، ه. و نجفی، م. ۱۳۸۵. جداسازی و شناسایی گونه های مختلف تریکودرما از سطح خزانه های توتون استان مازندران و گلستان. کارنامه پژوهشی دخانیات تیرتاش. ۳۷٤ صفحه.

۷- صارمی، ح.، پیغامی، الف. و پژوهنده، م. ۱۳۸۱. اصول قارچ شناسی. ترجمه کتاب سی. جی. آلکسوپولوس، سی. دبلیو. میمس و ام. بلک ول. جهاد دانشگاهی مشهد. ٦۹٦ صفحه.

۸- ضیایی مهرجویی، ج. ۱۳۷۷. توصیه هایی در مورد کشت توتون بارلی. شرکت دخانیات ایران. ۲۵۲ صفحه.

۹- ظفری، د.، ارشاد، ج.، زارع، ر. و علیزاده، ع. ۱۳۸۱. تحقیقی در زمینه شناسایی گونه های *Trichoderma* در ایران. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های ۱و۲ جلد ۳۸. صفحه ٤۵-۲۱.

۱۰- ظفری، د. ۱۳۸۲. مطالعه تاکسونومی جنس تریکودرما در ایران در ایران. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی.۱۹۳ صفحه.

۱۱- مرآت، الف.، میر حسینی مقدم، س. ع. و روحانی، ح. ۱۳۷۹. بررسی اثر آنتاگونیستی گونه هـایی از تریکودرمـای توتستان های استان گیلان بر روی قارچ *S.sclerotiorum*، عامل خشکیدگی سر شاخه ها و جوانـه هـای درختـان تـوت. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ٤٠٢ صفحه.

۱۲- مهتابی، ر.، رستمکلایی مطلق، س.، گودرزیان، ن.، روحانی، ح. و براری، ح. ۱۳۸۰. بررسی امکان کنترل عوامـل بیماریزایی اسکلروتینیا، رایزوکتنیا و پیتیوم با استفاده از ماده بیولوژیک تریکودرمین بی در شرایط گلخانه. کارنامه پژوهشی دخانیات تیرتاش. ۲۳۱ صفحه.

13-Abawi, G. S. and Grogan, R. G. 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathology. 69(8). 899-904

14-Bissett, J. 1984. Arevision of the genus *Trichoderma* . I. section *Longibrachiatum*.Sect. nov. Canadian journal of Botany62: 224-931.

15-Bissett, J. (1991-a). Arevision of the genus *Trichoderma* . II . Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany 69:2357-2372.

16-Bissett, J. (1991-b). Arevision of the genus *Trichoderma* . T11. Section *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany 69:2373-2417.

17-Bissett, J. (1991-c). Arevision of the genus *Trichoderma* . 17. Additional notes on Section *longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany 69:2418-1420.

18-Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany. 70: 639-641.

19-Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*(II. Production of volatile antibiotics). Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 41-48.

20-Diby, P., Saju, K. A., Jisha, P. J., Sarma, G. R., Kumar, A. and Anandaraj, M. 2005. Mycolytic enzymes produced by *pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma* spp. Against *pseudomonas capsici*, the foot rot phathogen of black pepper (*Piper nigrum l.)*. Indian phytopath., 54(4). 11pp.

21-Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma* and *Gliocladium* (eds C. P. Kubick and G.E. Harman). Vol 1. 3-34 pp. Tayler & Francis, London, UK.

22-Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species the Biological control of plant Diseases: The History and Evolution of current concepts. Plant Disease. 86-104-10. pp.

23- Jones, D., Gordon, AH. and Bacon, J. S. D. 1974. Cooperative action by endo and exo-o-(1-3) glucanase from parasitic. Fungi in the degradation of cell wall glucans of. Biochem. J. 140: 47-55pp.

24-Kohn, L. M. 1979. De limitation of economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology. 69: 881-886.

25-Kucuk, C. and Kivanc, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. And determination of Their antifungal, biochemical and physiological features. Turk J Biol.27. 247- 253pp.

26-Kucuk, C. and Kivanc, M. 2004. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turk J Biol.28:111-115pp.

27-Kucuk , C. and Kivanc, M. 2005. Effect of formulation on the viability of biocontrol agen, *Trichoderma harzianum* conidia. Africa Journal of Biotechnology.4(5).483-486pp.

28-Lucas, G. B. 1975. Disease of Tobacco,3rd edition,Biological Associates consulting,Releight,North carolina.621pp.

29-Luo, K., Ren, X. J., Zhou, O, Y., Vhen. and Yang, Y. 1990. Study of parasitic fungi on sclerotia of *Sclerotinia sclerotium*. Rev. Plant Pathology. 68: 14

30-Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotium*: History, Diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathology. 69(8). 875-880.

31-Moussa, T. A. A. 2002. Studies *Sclerotinia sclerotium* on Biological of sugarbeet pathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. Journal of Biological Sciences. 2(12): 800-804. pp.

32**-Radwan, M. B., Fadel, A. M. and Mohammad, I. A. M. 2006.** Biological control of *Sclerotiorum rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestine.Hebron University Research Journal. 2(2)27-47pp.

33-Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus T*richoderma*. Mycological paper. 116:1-56.

34-Windham, M. T., Elad, Y. and Baker, K. 1986. A mechanism for increased plant growth incluced by *Trichoderma* spp. Phytopathology. 6: 518-521.

35-Yedidia, I., Srivastva, A. K,, Kapulnik, y. and Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil. 235-242.

36-Zeppa, G., Allengron, G., Barbeni, M. and Guarda, P. A. 1991. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride.* Rev. Plant Pathology. 70(8): 604.