نشریه پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران، شماره ویژه: پژوهش‌های فیزیولوژی گیاهی، سال نهم، شماره ویژه بهار ۱۳۹۳ / صفحات: ۶۹-۵۹

مطالعه بیوکنترل *Trichoderma harzianum* در افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و β-1, 3-گلوکاناز در گیاه گندم آلوده به قارچ بیمارگر پوسیدگی طوقه (*Fuzarium pseudograminearum*)

ندا ابراهیم‌پور*[۱]، غلامرضا حدادچی[۲]

[۱]کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان

[۲]استاد، گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/٤ تاریخ پذیرش : ۹۳/۲/۲۲

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه در گندم در حال گسترش بوده که عامل آن قارچ خاکزی *Fuzarium Pseudograminearum* است و استفاده از قارچ‌کش‌ها برای کنترل این بیماری منجر به آسیب‌های محیطی می‌گردد. امروزه مصرف بی‌رویه این ترکیبات علاوه بر آثار سوء زیست‌محیطی، منجر به ایجاد مقاومت در بیمارگرهای گیاهی نیز شده است. نیاز جهانی بر آنست که ضمن تامین کشاورزی پایدار، سازگاری با محیط هم تامین شده و آسیب‌های کمتری به منابع آب و خاک وارد شود. یکی از روش‌ها کاربرد عوامل بیوکنترل می‌باشد. گونه‌های تریکودرما قارچ‌های خاکزی بوده و به‌عنوان عامل بیوکنترل برای طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی خاکزی و هوازی مهم بومی عمل می‌کنند. در بررسی انجام شده فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و β-۱و۳-گلوکاناز در گندم رقم فلات بررسی شد. در زمان کشت گندم از چهار تیمار استفاده شد: ۱-کشت بذرهای پیش تیمار شده با *Trichodermaharzianum*،۲-کشت بذرهای پیش‌تیمار شده با *Trichodermaharzianum* که به بیمارگر *Fuzarium pseudograminearum* نیز آلوده شدند، ۳-گیاهان آلوده شده به بیمارگر *Fuzarium pseudograminearum* و ٤-گیاهان کنترل که به هیچ قارچی آلوده نشدند، سنجش آنزیم ۳۵ روز پس از آلودگی انجام شد. فعالیت آنزیم‌ها در نمونه‌های آلوده به هر دو قارچ افزایش نشان داد ضمن اینکه تیمار با *Trichoderma* منجر به تقویت رشد ریشه و افزایش وزن تر نمونه‌ها گردید. این مطالعه نقش بیوکنترل *Trichoderma* علیه *Fuzarium* را نشان می‌دهد زیرا فعالیت هر دو آنزیم در نمونه‌های آلوده به هر دو قارچ، به ویژه در ریشه سبب افزایش مقاومت در برابر نفوذ و گسترش بیمارگر می‌گردد.

واژگان کلیدی: بیوکنترل، تریکو درماهارزیانوم، فوزاریوم سودوگرامینه‌آروم، کیتیناز، β-۱،۳-گلوکاناز.

مقدمه

بیماری‌های گیاهی نقش مهمی درتخریب منابع طبیعی و از بین بردن محصولات کشاورزی دارند. پاتوژن‌های خاکزی منجر به کاهش منابع و محتویات مفید خاک شده و از این میان قارچ‌ها بیشترین گروه مهاجم را شامل می‌شوند (Benitez et al., 2004). از ترکیبات شیمیایی مانند قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده می‌گردد که استعمال نادرست از این ترکیبات منجر به مقاومت پاتوژن‌ها به این قارچ‌کش‌ها می‌گردد. یکی از روش‌هایی که برای محصولات کشاورزی مناسب است کاربرد عوامل

*نویسنده مسئول: nedaebrahimpour@yahoo.com

بیوکنترل (BCAs)[1] می‌باشد. استفاده از عوامل بیوکنترل ضمن کنترل بیماری‌های گیاهی و کاهش میزان خسارت ناشی از آنها، کاهش دفعات و مقدار مصرف ترکیبات شیمیایی قارچ کش را نیز به همراه خواهد داشت (Monte, 2001). عوامل بیو کنترل قارچی و باکتریایی به لحاظ کنترل طیفی گسترده از بیمارگرهای گیاهی و نداشتن آثار سوء و مخرب زیست‌محیطی بسیار مورد توجه کشاورزی ارگانیک و پایدار هستند (Copping andmenn, 2000). از همزیستی قارچ‌های مفید با گیاهان برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده می‌گردد که در بیشتر بیماری‌ها جنس‌های مختلف قارچ تریکودرما مورد استفاده قرار می‌گیرد (Monte, 2001).

Trichoderma از قارچ‌های خاکزی می‌باشد که در خاک و اکوسیستم ریشه زیست می‌کند. این قارچ به علت توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، انگل شدن بر روی دیگر قارچ‌ها و رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های مضر برای گیاهان به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌است (Harman et al., 2004). این قارچ رشد گیاهان را در خاک افزایش می‌دهد (Adams et al., 2007). *Trichoderma* یک عامل بیوکنترل برای قارچ‌های خاکزی مانند آسکومایست، دئوترومایست و بازیدیومایست و قارچ‌های هوازی می‌باشد (Monte, 2001). *Trichoderma* بوسیله مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم روی بیمارگرها اثر می‌گذارد. فعالیت هر مکانیسم منجر به تولید ترکیبات و متابولیت‌های خاص مانند فاکتورهای رشد، آنزیم‌های هیدرولیتیک، سیدروفورها، آنتی‌بیوتیک‌ها و کربن و نیتروژن می‌گردد. عوامل بیوکنترلی که با ارگانیسم‌ها زندگی می‌کنند نحوه فعالیتشان به شرایط فیزیکوشیمیایی محیط بستگی دارد و به این دلیل پیش‌بینی نحوه عمل بیوکنترل آن‌ها مشکل می‌باشد. بیوکنترل منجر به رقابت بین قارچ بیمارگر و *Trichoderma* برای جذب مواد غذایی و فضا می‌گردد و یا منجر به تولید و آزادسازی متابولیت‌های مقاوم در *Trichoderma* می‌گردد. این عمل به کاهش یا توقف جوانه‌زنی اسپورها و تغییر ریزوسفر از طریق اسیدی کردن خاک می‌شود در نتیجه از رشد بیمارگر ممانعت می‌گردد (Benitez et al., 2004). کنترل زیستی *Trichoderma* از طریق افزایش رشد و فعال کردن مکانیسم تدافعی گیاهان تاثیر مثبتی روی گیاهان دارد. نفوذ قارچ به داخل گیاه منجر به تولید متابولیت‌های سمی به‌وسیله گیاه میزبان در پاسخ به تهاجم ارگانیسم‌ها بیمارگر و غیر بیمارگر خارجی می‌گردد (Harman et al., 2004). گونه‌های *Trichoderma* در خاک، گیاهان را در مقابل باکتری‌ها و بیمارگرهای قارچی که آلودگی هوایی ایجاد می‌کنند حمایت می‌کند و این عوامل مکانیسم‌های مقاومت مانند پاسخ‌های فراحساسیتی، مقاومت اکتسابی سیستمیک و مقاومت سیستمیک را در گیاهان القا می‌کند (Harman et al., 2004). در سطح مولکولی مقاومت با افزایش تجمع متابولیت‌ها، آنزیم‌های مرتبط با مکانیسم تدافعی مانند آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) و کالکون‌سنتاز (CHS)، کیتیناز، گلوکاناز به پاتوژن و برانگیزاننده‌ها پاسخ می‌دهد (Elad et al., 2000; dana et al., 2001).

جنس *Fusarium* از خانواده توبرکولار یا سه راست همونیالس، زیررده ایفومیست و رده دئوترومیست یا قارچ‌های ناقص قرار دارد (پیغامی، ۱۳۸۱). آلودگی‌های فوزاریومی نه تنها باعث کاهش محصول می‌شوند بلکه کیفیت بذر را از طریق تولید مایکوتوکسین‌ها کاهش می‌دهند که سبب آسیب وسیعی به دانه‌ها می شود (Semaskiene et al., 2006). آلودگی به *Fusarium pseudograminearum* توزیع جهانی داشته و تولید محصولات کشاورزی مهمی نظیر گندم را کاهش می‌دهد. یکی دیگر از

1.Biological control agants

بیماری‌هایی که توسط گونه‌های *Fusarium* ایجاد می شود پوسیدگی طوقه است، این بیماری توسط قارچ *Fusarium pseudograminearum* که به‌عنوان *F. pseudograminearum* Group 1 شناخته شده است ایجاد می‌شود و در بسیاری از قسمت‌های استرالیا، انگلستان، آرژانتین و آفریقای‌جنوبی منجر به تخریب و آسیب محصولات گندم شده است (Matthias et al., 2003). در کشور ما ایران بیماری ناشی از قارچ *Fusarium* سالانه خسارات هنگفتی به کشاورزان وارد می‌کند.

کیتین پلیمر خطی با پیوندهای β-۱،٤، N استیل گلوکزآمین است که در دیواره‌سلولی بسیاری از قارچ‌ها و اسکلت خارجی آرتروپودا متداول است (Gooday, 1997). کیتیناز بوسیله حضور در دیواره سلولی قارچ و کلوئید کیتین در محیط آزاد می‌شود. کیتیناز به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم باز دارنده رشد قارچ‌ها می‌باشد. کیتیناز به‌طور مستقیم دیواره سلولی قارچ که محتوی کیتین است را هیدرولیز می‌کند و از رشد قارچ ممانعت می‌کند (Walden and Claude,1998) و بطور غیرمستقیم برانگیزاننده‌هایی را از دیواره سلولی قارچ بوسیله فعالیت آنزیمی خود آزاد می‌کند. این برانگیزاننده‌ها القاء کننده پاسخ‌های تدافعی مختلف در گیاه می‌باشد.

گلوکاناز در مکانیسم تدافعی گیاهان علیه بیمارگرها درگیر است (Simmons, 1994). این آنزیم پلیمرهای گلوکان موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها را تجزیه می‌کند (Van Loon and Vanstrien, 1999). گلوکاناز در توسعه برگ، دانه گرده، پاسخ به استرس، گل‌دهی و جوانه‌زنی و... نقش دارد (Simmons,1994). در گندم در طی توسعه برگ آنزیم گلوکاناز افزایش می‌یابد و پیری برگ را به تاخیر می‌اندازد (Roulin and Feller, 2001). استعمال نادرست از قارچ‌کش‌های شیمیایی (کنترل شیمیایی) منجر به مقاومت بیمارگرها به این قارچ‌کش‌ها می‌گردد. این احتمال وجود دارد که ترکیبات شیمیایی بر روی ارگانیسم‌های غیر هدف نیز تاثیر نامطلوبی گذاشته و منجر به جهش‌های ژنتیکی و ایجاد گونه‌های غیر معمول گردند. در عوض استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که مخالف بیمارگرهای گیاه می‌باشند (کنترل زیستی) خطر کمتری به همراه دارد. هدف از انجام این تحقیق یافتن روشی است که منجر به ایجاد مقاومت در گیاهان در برابر عوامل بیماریزا گردد و همچنین با محیط سازگار باشد و آسیب کمتری به محصولات کشاورزی و منابع آب و خاک وارد کند. همچنین ترکیب استفاده از عامل بیو کنترل (BCAs) و کاهش سطح استفاده از قارچ‌کش‌ها (کنترل دوگانه) منجر به کاهش سطح بیماری‌های ایجاد شده توسط قارچ‌کش‌ها می‌گردد.

مواد و روش‌ها

روش کشت قارچ *Trichoderma harzianum* و *Fusarium pseudograminearum*: ابتدا دستگاه لامینار با اتانول ۷۰ درصد نیمه استریل شد و به مدت نیم ساعت لامپ UV برای استریل شدن کامل فضای داخل دستگاه روشن گذاشته شد. سپس در زیر هود و کنار شعله چراغ الکلی پتری‌دیش‌ها تلقیح شدند. پلیت‌های تلقیح شده برای اسپورزایی بیشتر به‌مدت ٤٨ ساعت زیر نور فلورسنت قرار داده شدند و بعد از آن به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. بعد از ٦ الی ۷ روز کل سطح پتری دیش‌ها از پرگنه‌های قارچ پر گردید.

تهیه محیط کشت مالت آگار: ۲٦ گرم از پودر آماده‌ی مالت آگار وزن شد و حجم آن به یک لیتر رسید. سپس جهت حل شدن روی لرزاننده قرار گرفت، pH این محیط کشت برابر ۵ تنظیم گردید. بعد از استریل نمودن در اتوکلاو، در زیر هود لومینار و در کنار شعله

در پلیت‌های استریل پلاستیکی یکبار مصرف ریخته شد. دور پلیت‌ها با ورقه‌های پارافیلم پیچیده شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد.

شمارش اسپورهای قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *Fusarium pseudograminearum*: برای تهیه سوسپانسیون یک پلیت محتوی قارچ که بر روی محیط کشت مالت آگار رشد کرد به‌طور کامل یعنی به همراه محیط کشت، خرد شد و درون یک بشر محتوی ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد، پس از هم‌زدن، درون یک پارچه تنزیب چند لایه‌ای صاف گردید. برای شمارش اسپورها در سوسپانسیون‌های تهیه شده از آن‌ها، از لام مدرج نئوبار یا توما استفاده شد که در این روش یک قطره از سوسپانسیون قارچ بر روی لام ریخته شد و چون پراکنش اسپورها یکنواخت نیست از چهارمربعی که در چهار سمت لام قرار دارند و معروف به منطقه مخصوص شمارش گلبول‌های سفید هستند برای شمارش استفاده شد،از آنجایی‌که حجم کل این چهار مربع ۰/٤ میلی‌متر مکعب است می‌توان حجمی از سوسپانسیون که دارای تعداد مورد نظر از اسپورهای قارچ باشد را محاسبه کرد.

تهیه بذر پیش تیمار شده با *Trichoderma harzianum*: بذرها توسط الکل ۷۰ درصد استریل شده و به بشر حاوی اسپورهای شمارش شده *Trichoderma* بوسیله لام نئوبار اضافه شد و روی لرزاننده قرار گرفت. پس از ۳۰ دقیقه بذرهای آغشته به این سوسپانسیون در زیر هود لامینار به مدت٢٤ ساعت قرار گرفتند (١٠٦اسپور به ازای هر بذر) (Abd-El-kareem, 2007).

تهیه خاک: سه نوع خاک متشکل از ماسه، خاک رس و خاک برگ تهیه شد. این خاک‌ها پس از غربال‌شدن به نسبت‌های مساوی با هم مخلوط و در داخل نایلون‌های پلاستیکی اتوکلاو و آماده استفاده شد.

کشت گندم در گلدان‌های حاوی خاک: در این روش از بذرهای پیش تیمار شده با قارچ *Trichoderma harzianum* استفاده شد. سوسپانسیونی از قارچ *Fusarium pseudograminearum* نیز تهیه گردید. هر میلی‌لیتر از این سوسپانسیون دارای ۲۰۰۰ اسپور است در این آزمایش، ۸۰۰۰۰ اسپور برای هر گلدان بکار برده شد.

کشت گندم در ۳۲ گلدان از جنس پلاستیک و در چهار تیمار انجام گرفت به‌طوری‌که در ۸ گلدان، بذرهای پیش‌تیمار شده با *Trichoderma* در خاک استریل کاشته شد و در ۸ گلدان دیگر، بذرهای پیش‌تیمار شده با *Trichoderma* در خاک آلوده به قارچ *Fusarium* کشت شد، بذرهای استریل نیز در ١٦ گلدان که ۸ عدد از میان آنها دارای خاک آلوده به *Fusarium* و ۸ عدد هم محتوی خاک استریل بود، کاشته شد. بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و نمونه برداری، ۳۵ روز پس از کشت گندم انجام گرفت.

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک گیاهچه‌های گندم: در تمام کشت‌های گندم، طول گیاه از منطقه یقه تا نوک بلندترین برگ، همچنین طول ریشه، وزن ریشه و وزن بخش هوایی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت‌آنزیم‌ها: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتری (Shimadzu UV-160A) استفاده گردید. مقدار فعالیت آنزیم‌ها ابتدا با توجه به ضریب خاموشی به کمک فرمول زیر محاسبه شد.

$A= \varepsilon LC$

A=میزان جذب ماده

ε =ضریب خاموشی بر حسب لیتر بر میلی‌مول در سانتی‌متر

L=عرض کووت

C=غلظت ماده

با استفاده از این فرمول مقدار فعالیت آنزیم‌ها بر اساس میکرومول فعالیت آنزیم در لیتر محاسبه و در نهایت براساس میکرومول در دقیقه به ازای گرم وزن‌تر بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کیتیناز: در این روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کیتیناز براساس روش روبرتی و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد. در این روش از پارانیتر و فنیل‌بتادی استیل‌کیتوبیوز (PNP) به‌عنوان سوبسترای آلی استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت کیتیناز در این روش در مد فتومتریک و در طول موج ٤١٠ نانومتر انجام شد.

روش کاراندازه‌گیری فعالیت آنزیم کیتیناز: ابتدا عمل استخراج عصاره پروتئینی از برگ‌ها و ریشه‌ها به‌طور جداگانه صورت گرفت به این ترتیب که مقدار۰/۲ گرم از بافت فریز شده‌ی گیاه با ۲ میلی‌لیتر بافراستات‌سدیم۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/٤، در یک‌هاون چینی سرد و در حمام یخ هموژن شد. هموژنات حاصل داخل لوله‌ی سانتریفوژ ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در ١٦٠٠٠g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سوپرناتانت به عنوان عصاره‌ی پروتئینی به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌کیتیناز، مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از محلول (PNP) به ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده اضافه شد. سپس این محلول به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه در انکوباتور قرار گرفت. پس از ۱۲۰ دقیقه بلافاصله بعد از خروج نمونه‌ها از انکوباتور محلول کربنات‌سدیم به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به نمونه‌ها اضافه شد تا واکنش متوقف شود. فعالیت آنزیم در طول موج ٤١٠ نانومتر و براساس مقدار (میلی‌مولار) تولید پارانیتروفنیل در دقیقه بر گرم وزن‌تر بافت محاسبه شد. ضریب خاموشی آنزیم برابر با $7000 Mm^{-1}cm^{-1}$ می‌باشد (Roberti et al., 2008).

محاسبه مدت زمان لازم برای واکنش آنزیم با سوبسترا: در این آزمایش به عصاره‌های استخراج شده مطابق روش قبل محلول (PNP) افزوده شده و در انکوباتور قرار داده شد. سپس تغییرات جذب در طول موج ٤١٠ نانومتر و در زمان‌های ۲۰، ٤٠، ٦٠، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ دقیقه انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت‌آنزیم β-۱،۳-گلوکاناز: این آزمایش براساس روشGanapathi و همکاران (۲۰۰۸) با کمی تغییر انجام شد. در این روش از لامینارین به عنوان سوبسترای آلی استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم β-۱،۳-گلوکاناز در مد فتومتریک و طول موج ۵۷۵ نانومتر انجام شد.

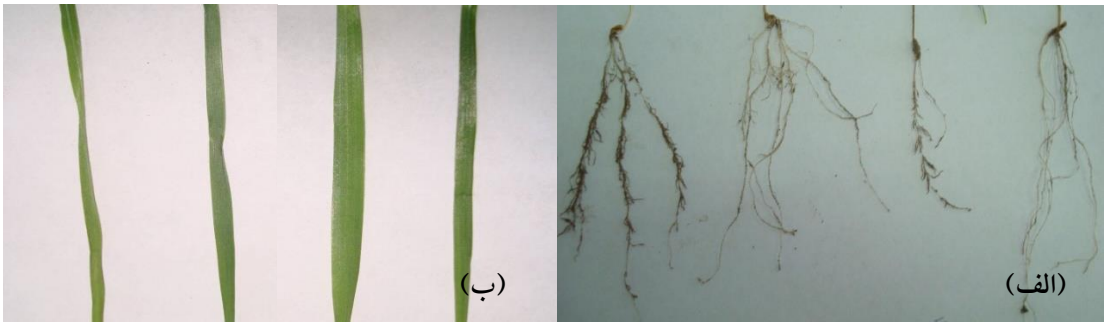
روش کاراندازه‌گیری فعالیت‌آنزیم β-۱،۳-گلوکاناز: ابتدا عمل استخراج عصاره‌ی پروتئینی از برگ‌ها و ریشه‌ها به‌طور جداگانه صورت گرفت. مقدار۰/۲ گرم از بافت فریز شده‌ی گیاه با ۲ میلی‌لیتر بافراستات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر۵/۲ به همراه بتامرکاپتواتانول ۱۵ میلی‌مولار و فنیل‌متیل سولفونیل‌فلورید ۰/۵ میلی‌مولار، در یک‌هاون چینی سرد و در حمام یخ هموژن شد. هموژنات حاصل داخل لوله سانتریفوژ ریخته و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سوپرناتانت به‌عنوان عصاره پروتئینی به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌گلوکاناز، مورد استفاده قرار گرفت.

جهت دکلریزه کردن عصاره‌های برگ، به ازاء هر ۲ میلی‌لیتر از عصاره ۰/۲ گرم پودر ذغال به آن اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، سپس سوپرناتانت جدا شد و مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ۱ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده در آب ۱۰۰ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت که از این نمونه به‌عنوان شاهد استفاده شد. سپس ۲ میلی گرم لامینارین در ۱ میلی‌لیتر بافر استات‌سدیم ۱۰ میلی‌مولار حل شد که ۵۰۰ میکرولیتر از این محلول به همراه ۱۰۰ میکرولیتر

از عصاره استخراج شده به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه در بن ماری شیکر دار قرار گرفت. پس از ۲ ساعت بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم‌سدیم تارتارات ٤٠ درصد به آن افزوده شد. سپس به ازاء هر ۱ میلی‌لیتر از نمونه فوق ۱/۵ میلی‌لیتر معرف دی نیتروسالیسیلیک‌اسید به هر نمونه اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن بلافاصله ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم پتاسیم تارتارات ٤٠ درصد به آن افزوده و پس از سرد شدن لوله‌ها جذب نور آن‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد (Ganapathi et al., 2008). داده‌ها تحت تست آماری دانکن و در سطح ۵ درصد آنالیز شد. وجود حروف مشترک در هر اندازه‌گیری عدم معنی دار بودن تفاوت‌ها می‌باشد.

کشت بذر گندم تیمار شده با *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium pseudograminearum* آلوده شده است: در این آزمایش بذرهای گندم تیمار شده با سوسپانسیونی محتوی 10^6 اسپور *Trichoderma*، در خاک آلوده شده با 8×10^4 اسپور *Fusarium pseudograminearum* کشت شد و برگ‌ها (شکل۳-۱-الف) و ریشه‌های (شکل۳-۱ب) گیاهان ۳۵ روزه، پس از بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک، عصاره‌گیری شده و سنجش آنزیم صورت گرفت. همان‌طوری که در اشکال ۱-الف و ۱-ب قابل رویت است تعداد تارهای کشنده، ضخامت ریشه و ضخامت برگ در نمونه‌های آلوده شده به قارچ *Trichoderma* نسبت به سایر نمونه‌ها افزایش یافته است.

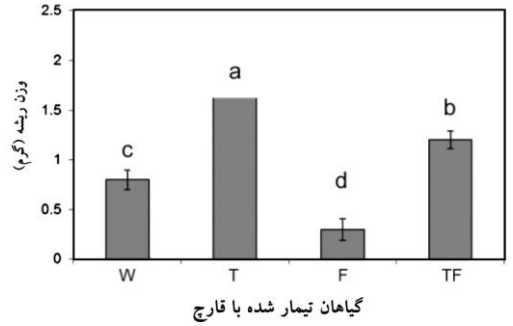
نتایج



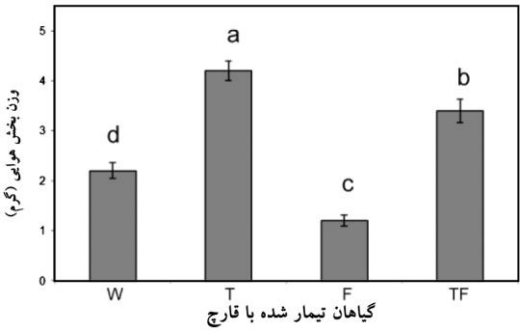
شکل۱: اولین برگ (الف) و ریشه‌های (ب) گندم، به‌ترتیب از سمت راست، نمونه شاهد، نمونه آلوده به *Fusarium*، بذر گندم تیمار شده با 10^6 اسپور *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است و نمونه تیمار شده با 10^6 اسپور *Trichoderma*.

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی

تأثیر *Fusarium* و *Trichoderma* بر وزن تر ریشه و بخش هوایی: در این کشت وزن ریشه در بذرهای تیمار شده با *Trichoderma* که در خاک آلوده به *Fusarium* کشت شد بیشتر از نمونه‌ی کنترل است (شکل ۲)، این الگو در بخش هوایی هم دیده می‌شود (شکل ۳).

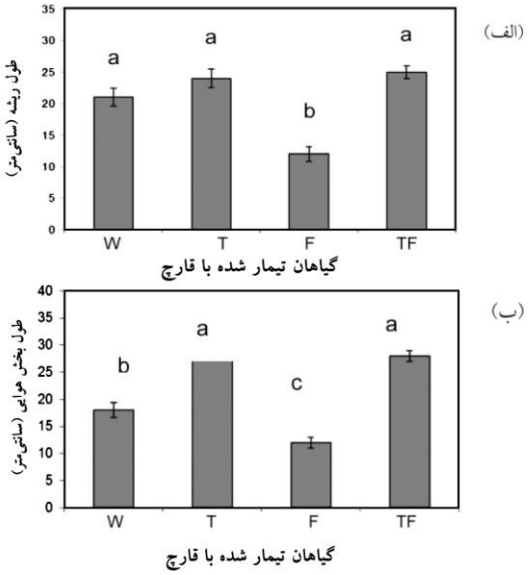


شکل ۲: تأثیر فوزاریوم و *Trichoderma* بر وزن تر ریشه. نمونه شاهد (W)، نمونه آلوده به *Fusarium*(F)، بذر گندم تیمار شده با ۱۰^۶ اسپور *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است (TF) و نمونه تیمار شده با ۱۰^۶اسپور *Trichoderma*(T).



شکل ۳: تأثیر *Fusarium* و تریکودرما بر وزن تر بخش هوایی. نمونه شاهد (W)، نمونه‌ی آلوده به *Fusarium*(F)، بذر گندم تیمار شده با ۱۰^۶اسپور *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است(TF) و نمونه‌ی تیمار شده با ۱۰^۶ اسپور *Trichoderma*(T).

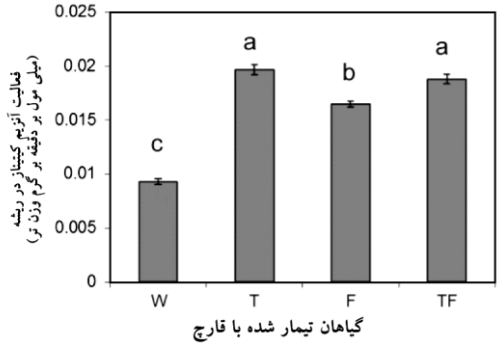
تأثیر *Fusarium* و *Trichoderma* بر طول ریشه و بخش‌هوایی: در این کشت طول ریشه و بخش هوایی در گیاهان آلوده به *Fusarium* کاهش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد در حالی که تفاوت معنی‌داری در طول ریشه‌ی سایر تیمارها دیده نشد (شکل ٤-الف)، اما طول بخش هوایی در بذرهای تیمار شده با *Trichoderma* و همچنین بذرهای تیمار شده با *Trichoderma* که در خاک آلوده به *Fusarium* کشت شد بیشتر از نمونه‌ی کنترل بود (شکل ٤-ب).



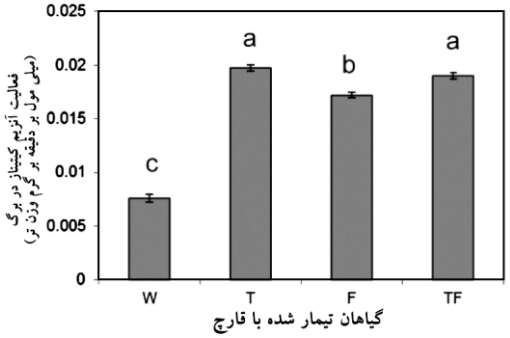
شکل٤: تأثیر *Fusarium* و *Trichoderma* بر طول ریشه (الف) و بخش هوایی (ب). نمونه شاهد(W)، نمونه آلوده به *Fusarium*(F)، بذر گندم تیمار شده با ۱۰^۶اسپور *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است (TF) و نمونه تیمار شده با ۱۰^۶ اسپور *Trichoderma*(T).

بررسی فعالیت آنزیم‌ها

فعالیت آنزیم کیتیناز با سوبسترای پارا نیتروفنیل‌دی-استیل‌کتوبیوز (PNP) در ریشه و برگ گندم در مواجهه با *Fusarium* و *Trichoderma*: فعالیت آنزیم کیتیناز در برگ و ریشه گیاهانی که بذرهای آن‌ها توسط اسپورهای *Trichoderma* تیمار شده بود و در خاک استریل و خاک آلوده به قارچ *Fusarium* کشت شده بود بیشتر از سایر نمونه‌ها بود (شکل۵و ٦). در ریشه در نمونه‌هایی که بذرهای آن‌ها توسط اسپورهای *Trichoderma* تیمار شده بودند و در خاک استریل و خاک آلوده به قارچ *Fusarium* کشت شده بودند اختلاف معناداری وجود نداشت (شکل ۵).



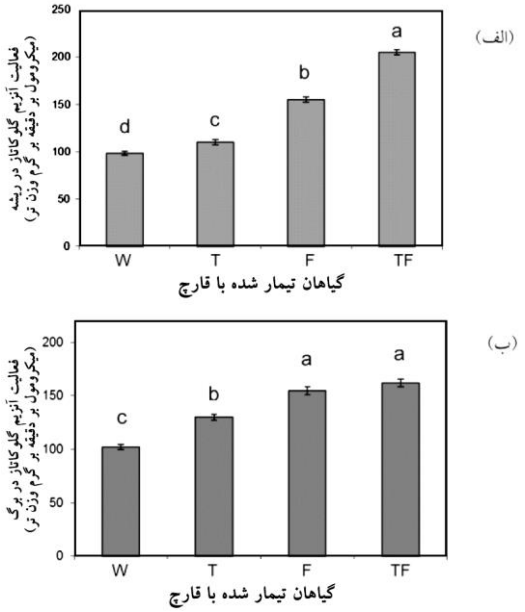
شکل۵: مقایسه فعالیت آنزیم کیتیناز با سوبسترای پارانیتروفنیل بتادی‌استیل‌کیتوبیوز (PNP) در ریشه. نمونه شاهد (W)، نمونه آلوده به *Fusarium* (F)، بذر گندم تیمار شده با ۱۰۶ اسپور *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است (TF) و نمونه تیمار شده با ۱۰۶ اسپور *Trichoderma*(T).



شکل۶: مقایسه فعالیت آنزیم کیتیناز با سوبسترای پارانیتروفنیل بتادی‌استیل‌کیتوبیوز (PNP) در برگ. نمونه شاهد (W)، نمونه آلوده به *Fusarium* (F)، بذر گندم تیمار شده با ۱۰۶ اسپور *Trichoderma* درخاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است (TF) و نمونه تیمار شده با ۱۰۶ اسپور *Trichoderma*(T).

فعالیت آنزیم β-۱،۳-گلوکاناز در ریشه و برگ گندم در مواجهه با *Fusarium pseudograminearum* و *Trichoderma harzianum*

فعالیت آنزیم گلوکاناز در ریشه و برگ گیاهانی که به قارچ فوزاریوم آلوده شده بودند بیشتر از نمونه‌های آلوده شده به قارچ *Trichoderma* بود (شکل۷- الف و ب). در فعالیت آنزیم در نمونه‌های آلوده به هر دو قارچ و نمونه‌های آلوده به قارچ *Fusarium* در ریشه تفاوت معناداری مشاهده شد ولی در برگ دراین نمونه‌ها تفاوت معناداری در فعالیت آنزیم دیده نشد (شکل۷- ب).



شکل ۷: مقایسه فعالیت آنزیم β-۱،۳-گلوکاناز در ریشه (الف) و برگ (ب). نمونه شاهد (W)، نمونه آلوده به *Fusarium*(F)، بذر گندم تیمار شده با ۱۰۶ اسپور *Trichoderma* در خاکی که با سوسپانسیون *Fusarium* آلوده شده است (TF) و نمونه تیمار شده با ۱۰۶ اسپور *Trichoderma* (T).

بحث

اکثر محققین اخیر درباره مکانیسم‌های احتمالی که گونه‌های *Trichoderma* برای کنترل بیولوژیکی بکار می‌برند، چندین تعریف و تعبیر جایگزین برای بیوکنترل موفق ارائه کرده‌اند. یکی از ایده‌های مطرح شده این است که آنزیم‌هایی از قبیل کیتینازها و یا گلوکانازها که توسط عامل بیوکنترل تولید می‌شوند، مسئول ممانعت و خنثی نمودن عامل بیماری‌زای گیاه هستند. تجزیه پلی ساکاریدها، کیتین و گلوکان‌ها که دلیل سختی و استحکام دیواره‌های سلولی قارچ هستند، عملکرد این‌گونه آنزیم‌هاست که در نتیجه

یکپارچگی دیواره سلول را از بین می‌برند (Howel, 2003).

Ganapathi و همکاران (۲۰۰۸) آزمایشاتی بر روی گیاه ذرت تیمار شده با *Trichoderma* انجام دادند و نشان دادند که این قارچ منجر به افزایش محصول همچنین افزایش رشد ریشه و توسعه تارهای‌کشنده می‌گردد. در تحقیقات ما نیز در کشت‌های مختلفی که انجام شد نتایج مشابهی به‌دست آمد. در این کشت‌ها افزایش در تعداد تارهای کشنده و رشد ریشه دیده شد. Contreras-cornejo و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گیاه Arabidopsis ٤ روزه‌ای که در محیط کشت Murashige and Skoog کشت شده و پس از ٤ روز به قارچ *Trichiderma viride* و *Trichoderma atroviride* آلوده شده بود آزمایشاتی انجام دادند و ثابت کردند که پس از ۵ روز، وزن خشک ریشه و وزن بخش‌هوایی افزایش می‌یابد. ریشه‌های جانبی زیادی در جوانه‌های تیمار شده مشاهده گردید. در نتایج ما نیز وزن ریشه، وزن بخش‌هوایی و رشد ریشه‌های جانبی در بذرهای تیمارشده با *Trichoderma* در همه کشت‌ها افزایش یافت. آنچه از آزمایشات انجام شده در این تحقیق برمی‌آید این است که رشد گیاه در خاک تیمار شده با عامل بیوکنترل منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای حمله کننده به بخش هوایی می‌گردد که در این فرآیند آنزیم‌های مرتبط با دفاع القا می‌شوند، که از جمله‌ی این آنزیم‌ها، β-۱،۳-گلوکاناز است که در برگ‌های گندم‌های کشت شده‌ای که بذرهای آن‌ها با *Trichoderma* تیمار شده بود و در خاک تیمار شده با *Fusarium pseudograminearum* کشت شده بودند، به بیشترین مقدار خود در مقایسه با سایر تیمارها رسید و در سایر تیمارها به میزان کمتری افزایش یافت (شکل۷-ب). همچنین میزان این آنزیم در ریشه، در این تیمارها افزایش داشت (شکل۷-الف). میزان فعالیت آنزیم β-۱،۳-گلوکاناز در گیاهان آلوده به هر دو قارچ بیمارگر و بیوکنترل نسبت به نمونه‌های آلوده به پاتوژن به تنهایی و نمونه‌های آلوده به قارچ بیوکنترل به تنهایی، افزایش نشان داد. Ganapathi و همکاران (۲۰۰۸) بیان ژن کیتیناز و β-۱و۳-گلوکاناز را در گیاه برنج آلوده به ریزوکتونیا-سولانی بررسی کردند و مشاهده کردند که بیان این دو ژن در هنگام آلودگی افزایش یافت و مقاومت علیه ریزوکتونیاسولانی افزایش می‌یابد. Melcher و Stuiver (۲۰۰۰) گیاه هویج را به آلترناریا داوکی، آلترناریا رادیسیناو اریسیف هراکلیا آلوده کردند و ثابت کردند که بیان ژن کیتیناز و β-۱و۳-گلوکاناز در این گیاه منجر به مقاومت علیه بیماری‌های ایجاد شده توسط این قارچ‌ها می‌گردد. قارچ بیوکنترل *Trichoderma* باعث افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاه آلوده شده به قارچ بیمارگر می‌گردد. آنزیم کیتیناز باعث سست شدن دیواره سلولی قارچ بیمارگر می‌گردد، در نتیجه باعث کاهش اثرات منفی این قارچ می‌گردد.

در آزمایشات مطرح شده در این تحقیق و نتایج بدست آمده از فعالیت آنزیم کیتیناز ثابت می‌کند که تولیدات سمی در نمونه‌های آلوده به *Fusarium* باعث کاهش فعالیت آنزیم نسبت به سایر تیمارها می‌گردد. این در حالی است که میزان آنزیم کیتیناز در نمونه‌های آلوده به هر دو قارچ نسبت به نمونه‌های آلوده به *Fusarium* افزایش معنی‌داری را نمایان می‌سازد زیرا *Trichoderma* با کاهش *Fusarium* از طریق رابطه همزیست انگلی باعث کاهش تولیدات سمی در گیاه می‌شود. کیتیناز در مواجهه با بیمارگرها در ریشه بیشتر تولید شده و در سطح کمتر در برگ‌ها و بخش هوایی تولید می‌گردد، (Deborah et al., 1990) و همان‌طوری که در شکل ۵ و ٦ نشان داده شده‌است فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه در مواجهه با

بیمارگرها نسبت به بخش‌هوایی افزایش بیشتری یافته است.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد عامل بیوکنترل *Trichoderma* منجر به افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز و β-۱و۳-گلوکاناز در گیاه گندم گردید و مقاومت به بیماری پوسیدگی طوقه که توسط قارچ *Fusarium* ایجاد می‌گردد افزایش یافت.

منابع

ایران نژاد، ح. و شهبازیان، ن. (۱۳۸٤). زراعت غلات. جلد۱. گندم. انتشارات کار نو . صفحات ۲۹-۳.

پیغامی، ا. (۱۳۸۱). قارچ شناسی تکمیلی. انتشارات احرار تبریز. صفحات ۳۷۸-۳٦۰.

Abd-El-Kareem, F. (2007). Induced resistance in bean plants against root and Alternaria leaf spot diseases using biotic and abiotic inducer under field conditions. Agriculture and Biological Sciences. 3(6): 767-774.

Adams, P., De-Leij, F.A. and Lynch, J.M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediate growth promotion of Crack willow (salix fragilis) saplings in both clean and metal-contaminated soil. Microbial Ecology. 54: 306-313.

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. and Codon, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7:249-260.

Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L., Cortes-Penagos, C. and Lopez-Bucio, C. (2009). *Trichoderma Virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an Auxin-dependent mechanism in arabidobsis. Plant Physiology. 149:1579-1592.

Copping, L.G. and Menn, J.J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Management Science. 5:651-676.

Dana, M.M., Limón, M.C., Mejías, R., Mach, R.L., Benítez, T., Pintor, Toro JA. and Kubicek, C.P. (2001). Regulation of chitinase 33 (chit33) gene expression in *Trichoderma harzianum*. Current Genetics. 38:335-342.

Deborah, A.S., Cathy M.H., Peter E.Y. and Dilip, M.S. (1990). Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *arabidopsis thaliana*. Plant Physiology. 93: 907-914.

Elad, Y., Freeman, S. and Monte, E. (2000). Biocontrol agents: Mode of action and interaction with other means of control. IOBC wprs Bulletin, 24. Sevilla, Espana.

Ganapathi, S., Parameswari, C., Sabapathi, N., Raghupathy, V. and Veluthambi, P. (2008). Combined expression of chitinase and β-1, 3-glucanase gene in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against Rhizictoniasolani. Plant Science. 175:283-290.

Gooday, G.W. (1977). Biosynthesis of the fungal wall-mechanisms and implication. General Microbiology. 99:1-11.

Harman, G.E., Charles, R., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic. Nature Reviews. 2:43-56.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology. 2:43-56.

Howell CR., (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant disease. 87:4-1.

Matthias, P., Lutz, G.F., Genevie`ve D., and Brion, D. (2003). Mycotoxigenic Fusarium and Deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. Applied and Environmental Microbiology. 69(6): 3077-3084.

Melcher, L.S. and Stuiver, M.H. (2000). Novel genes for disease-resistance breeding. Current Opinion in Plant Biology. 3: 147-152.

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

Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone,A., Berardino, I.D., Bertini, L., and Caruso, C. (2008). Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent Clonostachys rosea in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. Plant science. 175:339-347.

Roulin, F. and Feller, U. (2001). Reversible accumulation of (1→3, 1→4)-β-

Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-ralated proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 55:85-97.

Walden, K. and Claude, P. (1988). Plant and bacterial chitinase differ in antifungal activity. General Microbiology. 134:169-176.

glucanendohydrolase in wheat leaves under sugar depletion. Exprimental Botany. 52(356): 2323-2332.

Semaskiene, R., Mankeviciene, A., Dabkevicius, Z. and Supronienе, S. (2006). Effect of fungicide on Fusarium infection and production of deoxynivalenol in spring cereals. Agronomy Research. 4:363-366.

Simmons, C.R. (1994). The physiology and molecular biology of plant β-1, 3-glucanases and β-1, 3;1,4-glucanases. Critical Reviews in Plant Sciences. 13:325-387.