ارزیـابی جـدایه‌های *Trichoderma* spp. برای کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک در گلخانه

Evaluation of *Trichoderma* spp. isolates for biological control of fusarium wilt of carnation in greenhouse

اسما معینی[۱]، محمد ترابی[۲] و داریوش شهریاری[۳]

دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۵

چکیده

یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های خاکزاد میخک بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک با عامل *Fusarium . dianthi* f.sp *oxysporum* می‌باشد. در این مطالعه توان بیوکنترلی جدایه‌های مختلف سه گونه قارچ Trichoderma روی قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی شد. جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی شامل Ta1، Ta2، Ta3 متعلق به گونه *Trichoderma atroviride*، شانزده جدایه (Th1-Th16) متعلق به گونه *T. harzianum* و یک جدایه Tl1 متعلق به گونه *T. longibrachiatum* بودند. آزمون‌های کشت متقابل و بررسی میزان کلونیزاسون در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲۱ تیمار در سه تکرار اجرا شد. جدایه‌های Ta1 و Ta2 و Ta3 پنج روز پس از کشت متقابل کاملا پرگنه بیمارگر را پوشش دادند و موفق‌ترین کلونیزه‌کننده‌های عامل بیماری بودند. بازدارندگی ترکیبات فرار (در کشت ۷۲ ساعته و ۹۶ ساعته) جدایه Ta3 (به ترتیب با ۶۰٪ و ۷۲٪) نیز موثرتر از سایر جدایه‌ها بود. در گلخانه آزمون‌های تیمار خاک با زادمایه جدایه‌های انتخابی تریکودرما به منظور بررسی توان بیوکنترلی این جدایه‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۲ تیمار در سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی با سطوح مختلفی قادر به کنترل بیماری بودند. جدایه Ta3 بیش‌ترین تأثیر کنترلی را بر بیماری و کاهش درصد قلمه میری داشت و پس از آن جدایه‌های Ta1 و Ta2 در یک گروه و جدایه‌های Th2 و Tl1 نیز در یک گروه قرار گرفتند. به‌طور کلی جدایه‌های مورد بررسی در افزایش رشد گیاه تأثیر چندانی نداشتند ولی در روند کاهش بیماری موثر بودند.

واژگان کلیدی: میخک، *Trichoderma atroviride*، T. *harzianum*، *T .longibrachiatum*، کنترل بیولوژیک.

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۳- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، ورامین

نویسنده مسئول مکاتبات: m_torabi28@yahoo.com

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده Cariophyllaceae می‌باشد. جنس Dianthus دارای حدود ۳۰۰ گونه است که درآن میان تعداد زیادی از گیاهان یکساله، دو ساله وپایا دیده می‌شود. انواع یک ساله و دو ساله آن که شبیه گل قرنفل و معمولاً دارای گل‌های ریز هستند بیش‌تر در هوای آزاد پرورش می‌یابند اما انواع پایا وبه خصوص بلند آن را در گلدان یا در حاشیه گلخانه می‌کارند و از آن‌ها برای تهیه گل شاخه بریده استفاده می‌نمایند (قنادی، ۱۳۷۱). اگر چه تولید شاخه گل بریده میخک از جمله مهم‌ترین اهداف پرورش این گیاه محسوب می‌شود، اما میخک مصارف تغذیه‌ای و دارویی نیز دارد و بخشی از تولیدات آن بدین منظور مصرف می‌شود (رشیدی ،۱۳۹۱). سابقه پرورش این گل به ۲۰۰۰ سال قبل می‌رسد و یونانیان و رومیان قدیم آن را به خاطر زیبائی و عطر گل‌ها و نیز مصارف پزشکی پرورش می‌دادند. این گل در زبان یونانی Dianthus به معنی گل الهی نامیده می‌شود. درحال حاضر هر ساله میلیون‌ها شاخه گل میخک توسط باغبان‌ها و گل‌پروران پرورش داده می‌شود به اقصی نقاط عالم صادر می‌گردد (قنادی، ۱۳۷۱). میخک از جمله گل‌های مهمی است که در کنار مریم ،شب بو و رز جزء چهار نوع گل اصلی شاخه بریده صادراتی ایران است. سطح کشت میخک در ایران ۵۰/۵ هکتار است (بی‌نام، ۱۳۸۲) که در شهرستان‌های محلات و ورامین به‌عنـوان مهم‌ترین مر کز تولید در کشور کاشته می‌شود. بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک که عامل آن *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* می‌باشد یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های میخک در بیش‌ترمناطق تولید این گل در دنیا به حساب می‌آید (Ben and Shteinberg, 1997). این بیماری برای اولین بار از ایران درسال ۱۳۷۵ از منطقه ورامین در حدود ۲۳٪ گزارش شده است (اعتباریان، ۱۳۷۵). فوزاریوم‌ها در تمام مزارع دنیا که حاوی کمی رطوبت و مواد آلی باشند فعالیت می‌نمایند. این میکروارگانیزم های زنده با اکوسیستم موجود در طبیعت به گونه‌ای همبستگی دارند که در همه مناطق دنیا از قبیل اقیانوس‌ها وهمه اراضی حتی مناطق کویری قادر به زیست می‌باشند. در هر منطقه که خاک باشد و گیاهی در آنجا زندگی کند معمولاً گونه‌ای از قارچ فوزاریوم به صورت بیمارگر (Pathogen) و یا پوده رست (Saprophyte) در اطراف اتمسفر ریشه گیاه زندگی خواهد نمود (صارمی، ۱۳۸۴). اصولاً فوزاریوم‌ها مانند سایر قارچ‌ها موجودات نا خود پرور (Heterotophie) بوده و فاقد کلروفیل می‌باشند. در حقیقت سیستم آوندی آن‌ها توسعه نیافته و به جای هیدارات کربن اولیه و نشاسته، دارای گیلکوژن بوده وقسمت رویشی آن‌ها به وسیله ریسه‌ها (Hyphe) وتغذیه در آن‌ها به صورت جذب صورت می‌گیرد. ریسه‌ها حاوی دیواره عرضی یا جداره (Septum) بوده که قادرند یک یا چند سلول منفرد و با دیواره ضخیم به نام کلامیدوسپور (Clamydospore) تشکیل دهند. کلامیدوسپورها می‌توانند چندین سال در خاک باقی مانده و بقا و داوم قارچ را برای مدت طولانی مثلاً تا ۲۰ سال ممکن سازند (صارمی، ۱۳۸۴). در ایران گیاهان زیادی به این بیماری مبتلا می‌شوند. پژمردگی فوزاریومی ازجمله جدی‌ترین بیماری‌هایی است که به خصوص در آب و هوای گرم می‌تواند مانعی مهم در راه پرورش گیاه میخک باشد و تلفات بی‌شماری را به بار می‌آورد. این قارچ در برابر ضدعفونی محیط مقاومت بالایی دارد و ماده شیمیایی خاص و یا عمومی که بتواند آن را کاملاً از محیط ریشه‌کن نماید هنوز معرفی نشده (رشیدی، ۱۳۹۱). در اثر فعالیت این قارچ بافت گیاه در نزدیکی سطح خاک می‌پوسد و پوسیدگی به ریشه‌ها نیز سرایت می‌کند بعد از مدتی قسمت هوایی نیز پژمرده می‌شود و از بین می‌رود. قارچ عامل بیماری باعث از بین رفتن شاخه‌های یک طرفه بوته می‌شود. برگ‌های آلوده به رنگ سبز روشن و در نهایت زرد شده و می‌خشکند (رشیدی، ۱۳۹۱). ساقه نیز تغییر رنگ داده و روی آن خطوط زرد کاهی قابل مشاهده است. قارچ عامل بیماری از ریشه و نقاط زخمی وارد گیاه شده و توانایی بقای طولانی در شرایط خاک را دارد (ناظریان و میر ابوالفتحی، ۱۳۸۳؛ رشیدی، ۱۳۹۱). در یک بررسی میزان خسارت فوزاریومی میخک در گلخانه‌های ورامین روی ارقام مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشخص گردید که از ۲۴۷ مزرعه یا گلخانه نمونه‌برداری شـده در این شهـر آلودگـی بوته‌ها در ارقام Scania،Viole White Sim و Yellow Polk به‌ترتیب ۷۱/۴۴، ۶۳/۲۳، ۹۲/۱۸، ۱۴/۱۱، ۱/۹۵ درصـد بـود

(اعتباریان، ۱۳۷۵). تاکنون آمار دقیقی از در صد خسارت بیماری در جهان گزارش نشده است اما در سال‌های اخیر خسارت این بیماری ۴۰-۳۰ درصد تخمین زده شده است (بنی‌جمالی و بیات، ۱۳۸۷). از آن جایی که بیماری پژمردگی آوندی به گیاهان زیادی از جمله میخک خسارت زیادی وارد می‌کند به این جهت کنترل وپیشگیری این بیماری بسیار ضروری است. تا کنون برای کنترل قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* عا مل پژمردگی فوزاریومی میخک کارهای زیادی در جهت مبارزه زراعی مثل کنترل آبیاری، از بین بردن بقایا و آفتاب‌دهی، مبارزه شیمیائی و تهیه ارقام مقاوم انجام شده است ولی به دلیل عدم کارائی روش‌های معمول کنترل، این بیماری همچنان هر ساله خسارت قابل توجهی به تولید میخک وارد می‌کند. با توجه به اهمیت میخک به‌عنوان یک گل شاخه بریده و سطح زیاد زیر کشت آن و ضرورت دستیابی به روش مناسب‌تر و موثرتر جهت کنترل بیماری و به دلیل سازگاری روش کنترل با محیط زیست، در این تحقیق امکان کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی آوندی میخک بررسی شد. ار آن جایی که گونه‌های مختلف جنس تریکودرما در برقراری کامل به صورت پارازیتی و همزیستی، در سوبستراهای مختلف و ارگانیسم‌های زنده شامل گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به خصوص قارچ‌های خاکزی بسیار موفق عمل کرده‌اند و تمام مکانیسم‌ها و مشخصات مفروض برای یک بیوکنترل موفق را دارا می‌باشند، به‌علاوه قادر به تکثیر سریع در خاک بوده و آنتی بیوتیک‌های قوی تولید می‌کنند و جز مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد شیمیایی مصنوعی یا طبیعی و توکسین‌ها هستند (Papviazas, 1985). در این بررسی گونه‌های مختلف این جنس به‌عنوان عوامل کنترل‌کننده بیولوژیک قارچ عامل پژمردگی آوندی میخک مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ عامل بیماری

نمونه‌برداری ازگلخانه‌های میخک پاکدشت از تاریخ ۹۱/۵/۲۰ تا ۹۱/۶/۳۰ انجام شد. بیست گلخانه میخک مورد نمونه‌بردای قرار گرفتند و از هر گلخانه، ده بوته آلوده میخک برداشته شد. بوته آلوده در درجه اول از نظر بی‌رنگ شدن رگبرگ‌های جوان، پژمردگی اندام‌های هوایی وپس از آن تیره رنگ بودن طوقه و ریشه و در حالات شدید وپیشرفته بیماری پوسیدگی طوقه و مرگ گیاهچه موردبررسی قرار گرفتند. نمونه‌های بیمار به‌طور جداگانه جمع‌آوری و در کیسه-های پلاستیکی به آزمایشگاه بیماری‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران در ورامین منتقل شدند. پس از شستن ریشه بوته‌های آلوده، قطعاتی از ناحیه طوقه (مرزبین بافت بیمار وسالم) تهیه وبه وسیله محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و در شرایط استریل، پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل به وسیله کاغذ صافی استریل خشک شده و به ظروف پتری حاوی محیط کشت عمومی PDA (سیب زمینی-دکستروز-آگار) به تعداد چهار قطعه داخل هر ظرف پتری منتقل شد. سپس محیط کشت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا ظهور کلنی‌های قارچ عامل بیماری نگهداری شدند. قارچ‌های فوزاریوم رشد کرده روی محیط کشت با روش تک ریسه خالص‌سازی شدند.

شناسایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری

به منظور شناسایی جدایه‌ها از دو محیط کشت PDA تجاری و CLA (برگ میخک-آگار) استفاده شد. برای تعیین ویژگی‌های کلنی (مشخصات ماکروسکوپی) از محیط کشت PDA و برای تعیین خصوصیات میکروسکوپی از محیط کشت CLA استفاده شد. شناسایی گونه جدایه‌های فوزاریوم بر اساس منابع معتبر شناسایی، از جمله کلیدهای شناسایی فوزاریوم نلسون و همکاران (Nelson *et al*., 1983) و لزلی و سامرل (Leslie and Summerell, 2006) استفاده شد. پس

از تشخیص اولیه، تأیید گونه‌های شناسایی شده توسط آقایان دکتر مجید هاشمی و دکتر رسول زارع انجام شد. تمام جدایه‌های فوزاریوم برای اثبات بیماریزا بودن آن‌ها روی رقم حساس میخک به نام Piaff در گلخانه مایه‌زنی شدند.

تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری برای اثبات بیماری‌زائی

سوسپانسیونی از اسپورهای پانزده جدایه *F. oxysporum* با غلظت 5×10^{3} اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل به وسیله لام گلبول شمار تهیه شد و ۵۰ میلی‌لیتر از آن به آب مقطر استریل اضافه و به مدت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ارلن روی شیکر با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. از این سوسپانسیون اسپور برای تزریق به گیاه در آزمون اثبات بیماری‌زائی استفاده شد.

اثبات بیماری‌زایی عامل بیماری روی قلمه میخک

در این آزمایش از رقم حساس میخک Piaff و از زادمایه تهیه شده جدایه‌های قارچ عامل بیماری استفاده شد. به وسیله سرنگ ضدعفونی شده در شرایط استریل در چندین نقطه به میزان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق‌الذکر در قلمه‌های میخک تزریق شد. به جای گلدان از سینی کشت استفاده شد هر قلمه در یک خانه از این سینی کشت قرار داده شد اما هر سه قلمه یا هر سه خانه به‌عنوان یک گلدان در نظر گرفته شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد برای این کار خاک سینی کشت حاوی پرلایت و کوکوپیت، شن و ماسه به نسبت ۱:۱:۱:۱ کاملاً مخلوط گردید و بعد از مرطوب کردن آن درون کیسه‌های پلاستیکی دو جداره قرار داده شد و داخل اتوکلاو در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در نوبت هر بار به مدت ۲ ساعت کاملاً استریل گردید و سینی‌های کشت در اتاق کشت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته قرار داده شدند و هر روز آبیاری گردیدند. از قلمه‌ها هرسه روزیک بار یادداشت‌برداری و درصد قلمه‌های آلوده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (اعتباریان، ۱۳۷۵):

$$\text{درصد قلمه‌های آلوده} = \frac{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار} - \text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد}}{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد}}$$

برای حصـول اطمیـنان، قارچ عامل بیماری از گیاهانی که علائم آلودگی را نشان داده بودند، جداسازی شد. بعد از جداسازی قارچ عامل بیماری مشخصات این نمونه با نمونه‌های جدا شده قبلی مقایسه گردید و تشابه تاکسنومیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام آزمون بیماری‌زائی، یک جدایه از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* بر اساس شدت بیماری‌زائی به‌عنوان جدایه برتر انتخاب (جدایه F5) و آزمایش‌های مربوط به اثر آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما و همچنین در آزمایش گلخانه‌ای از آن استفاده شد.

تهیه قارچ آنتاگونیست

در این تحقیق بیست جدایه تریکودرما مورد بررسی قرار گرفتند. ده جدایه شامل Th1، Th2، Th3، Th4، Th5، Th6، Ta1، Ta2، Ta3 و Tl1 (مربوط به مزارع سبزی وجالیز و گیاهان زینتی ورامین) از آقای مهندس شهریاری (آزمایشگاه بیماری‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ورامین) و ده جدایه Th7، Th8، Th9، Th10، Th11، Th12، Th13، Th14، Th15، Th16 (مربوط به مزارع کرج) از آقای دکتر روحانی (دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد) دریـافـت شـد. سـه جدایه Ta1، Ta2 و Ta3 متعـلـق به گـونه *Trichoderma. atroviride* یک جـدایه Tl1 مربـوطـ بـه *T. Longibrachiatum* و شانزده جدایه Th1-Th16 متعلق به*T. harzianum* بود.

ارزیابی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما روی قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی میخک در آزمون کشت متقابل

به‌منظور اندازه‌گیری میزان بازدارندگی از رشد جدایه برتر قارچ عامل بیماری توسط جدایه‌های قارچ آنتاگونیست، از آزمون کشت متقابل هم زمان و غیر هم‌زمان استفاده شد.

آزمون کشت متقابل هم‌زمان

در این روش ابتدا دیسکی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت سه روزه جدایه‌های تریکودرما برداشته و در یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA با فاصله یک سانتی‌متر از لبه تشتک قرار داده شد (هر جدایه در یک تشتک پتری جداگانه و در سه تکرار). هم‌زمان با این کار، به‌همان اندازه از کشت سه روزه جدایه برتر قارچ فوزاریوم روی محیط کشت PDA برداشته و در طرف مقابل قارچ تریکودرما در همان تشتک گذاشته شد. در تیمارهای شاهد فقط کشت سه روزه فوزاریوم و در مقابل آن دیسکی به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت PDA گذاشته شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و رشد خطی کلونی‌های *Fusarium oxysporum* و جدایه‌های تریکودرما (۲۰ تیمار جدایه تریکودرما و یک شاهد) در کشت‌های ۷۲ و ۹۶ ساعته اندازه‌گیری شد اما درصد بازدارندگی فاصله زمانی ۹۶ ساعته مورد محاسبه قرار گرفت. در صد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول زیر (Denis and Webster, 1971) محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر رشد فوزاریوم در تشتک های حاوی جدایه های تریکودرما} - \text{قطر رشد فوزاریوم در تشتک پتری شاهد}}{\text{قطر رشد فوزاریوم در تشتک پتری شاهد}} \times 100$$

آزمون کشت متقابل غیر هم‌زمان

نظر به این که عامل بیماری کندتر از گونه‌های تریکودرما رشد می‌کند جدایه انتخاب شده قارچ *Fusarium oxysporum* دو روز زودتر کشت داده شد. سایر مراحل شبیه آزمایش قبلی انجام شد درصد بازدارندگی از رشد پرگنه *Fusarium oxysporum* در فاصله زمانی ۹۶ ساعت پس از کشت تعیین گردید. تیمارها و تعداد تکرار در این آزمایش شبیه آزمایش قبلی بود. درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول بالا (Denis and Webster, 1971) محاسبه شد.

ارزیابی قدرت هایپرپارازیتیسم (کلونیزاسیون) جدایه‌های تریکودرما

منظور بررسی توان کلونیزاسیون و هایپرپارازیتیسم جدایه‌های تریکودرما اندازه‌گیری قطر رشد پرگنه *Fusarium oxysporum*، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت بعد از کشت متقابل ادامه پیدا کرد. درصد کلونیزاسیون فوزاریوم توسط جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Denis and Webster, 1971).

$$\text{درصد کلونیزاسیون} = \frac{\text{میزان رشد پرگنه تریکودرما در تیمارها}}{\text{قطر تشتک}} \times 100$$

بررسی تولید ترکیبات فرار ضدقارچی توسط جدایه‌های قارچ آنتاگونیست تریکودرما

در این آزمایش که روش تشتک‌های متقابل (Supreposal petri-dishes) نام دارد از کشت هم‌زمان جدایه‌های تریکودرما و فوزاریوم و همچنین کشت‌ها ۷۲ ساعته و ۹۶ ساعته تریکودرما با فوزاریوم استفاده شد. ابتدا جدایه‌های قارچ تریکودرما در تشتک حاوی محیط کشت PDA کشت داده شدند و همچنین به تشتک دیگری حاوی محیط کشت PDA،

کشت سه روزه فوزاریوم انتقال داده شد سپس درهای تشتک‌های پتری حاوی تریکودرما و فوزاریوم در کنار شعله و در شرایط کاملا استرایل برداشته شده و تشتک پتری‌دیش حاوی قارچ فوزاریوم روی تشتک پتری حاوی تریکودرما قرار داده شد و لبه آن‌ها با نوار پارافیلم بسته شد. تشتک‌های حاوی قارچ فوزاریوم که در مقابل تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA حاوی قطعه‌ای از محیط کشت PDA بدون آنتاگونیست قرار داشتند، به‌عنوان شاهد این آزمایش در نظر گرفته شدند. یادداشت‌برداری از میزان قطـر رشد فوزاریوم به مدت چهـار روز با استفاده از خط‌کش میلی‌متری و از پشت تشتک‌ها انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول دنیس و وبستر (Denis and Webster, 1971) محاسبه شد.

اثر آنتی‌بیوتیکی خارج سلولی (غیرفرار) آنتاگونیست‌ها بر رشد میسلیوم فوزاریوم

به منظور بررسی آنتی‌بیوتیکی ترشحات غیرفرار خارج سلولی، دیسک‌هایی به قطر میلی‌متر از کناره‌های کشت تازه آنتاگونیست برداشته شد و در مرکز یک تشتک پتری (۹ سانتی‌متری) قرار داده شد. این تشتک پتری محتوی PDA بود که روی آن سلوفان استریل شده به قطر نه سانتی‌متری طوری قرار داده شد که کاملاً با سطح محیط منطبق باشد. استرین‌ها به مدت چهار روز روی آن‌ها رشد داده شدند، سپس سلوفان محتوی آنتاگونیست برداشته شد و در همان محیط یک حلقه به قطر پنج میلی‌متر از کشت چهار روزه فوزاریوم در وسط تشتک قرار داده شد. تشتک شاهد محتوی قارچ فوزاریومی که روی محیط PDA رشد کرده است که قبلاً در آن دیسک سلوفانی بدون قارچ آنتاگونیست قرار داده شده بود. در صد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول دینس و وبستر (Denis and Webster, 1971)محاسبه شد.

آزمون مایکوپارازیتیسم توسط جدایه‌های تریکودرما

به منظور مشاهده مایکوپارازیتیسم در وسط یک تشتک پتری نه سانتی‌متری محتوی PDA یک لام استریل که قبلاً گرم شده است قرار داده شد به‌طوری که لبه بالایی لام با سطح محیط مماس شد. در یک طرف تشتک پتری یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت چهار روزه قارچ فوزاریوم و در طرف مقابل حلقه پنج میلی‌متری از کشت چهار روزه قارچ تریکودرما کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از این که ریسه‌ها شروع به رشد کردند و در وسط تشتک بر روی لام به یک دیگر رسیدند، لام با دقت از وسط تشتک برداشته شد. این یک ارزیابی آماری نبود و فقط پس از حدود چهار روز که میسلیوم دو قارچ به یکدیگر رسیدند، نحوه پارازیتیسم و تغییرات ایجاد شده در میسلیوم‌ها زیر میکروسکوپ مشاهد شد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری برای انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای

برای تهیه قارچ عامل بیماری از سبوس گندم تخمیر شده استفاده گردید. به این ترتیب که سبوس را در دمای ۱۲۰ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو کرده و سپس به مدت ۱۰ روز در شـرایط گلخـانه در دمای ۳۰درجـه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪ به طور رو باز قرار داده شد که به وسیله میکروارگانیزم‌های موجود در محیط گلخانه تخمیر گردد. بعد از تخمیر، سبوس‌ها مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شدند و سپس از کشت چهار روزه عامل بیماری روی محیط PDA برای تکثیر استفاده گردید و آن‌ها درون ارلن‌های محتوی ۱۵۰ گرم سبوس تخمیر شده و استریل ریخته شد و ارلن‌ها در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ روز قرار داده شدند. به تعدادی از ارلن‌ها حاوی ۱۵۰ گرم سبوس گندم استریل فقط ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به جای قارچ عامل بیماری افزوده و به‌عنوان شاهد در

انکوباتور نگهداری شدند. در این مدت قارچ عامل بیماری قادر بود که در تمام قسمت‌های سبوس رشد کرده و اسپورزایی کند (نیک‌نژاد و شریفی‌تهرانی، ۱۳۷۱).

تکثیر جدایه‌های آنتاگونیست جهت بررسی‌های گلخانه‌ای

برای تکثیر آنتاگونیست‌ها از سبوس گندم تخمیر شده استفاده شد. قارچ‌های آنتاگونیست نیز به مدت چهار روز زیر نور فلورسنت روی محیط PDA رشد داده شدند، سپس درون ارلن‌های حاوی ۱۵۰ گرم سبوس تخمیر شده و استریل که قبلا تهیه شده بود، ریخته و به مدت ۲۵ روز در انکوبارتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت ۷۰ درصد نگهداری شدند. در این مدت قارچ تریکودرما در تمام قسمت‌های سبوس اسپورزایی کرد (نیک‌نژاد و شریفی‌تهرانی، ۱۳۷۱).

بررسی تاثیر جدایه‌های قارچ تریکودرما درکنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی و رشد گیاه میخک

در این بخش ازتحقیق پنج جدایه تریکودرما که در آزمایشات قبلی به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش با ۱۲ تیمار در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی بخش تحقیات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران در ورامین انجام شد. برای این آزمایش گلدان‌های به قطر ۱۷ و ارتفاع ۲۳ سانتی‌متر در نظر گرفته شد و در هر گلدان سه قلمه رقم piaff که بسیار حساس به این بیماری است کاشته شد و هر گلدان به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. برای آماده‌سازی تیمارهای ۱ تا ۵ که به‌منظور بررسی تاثیر جدایه‌های قارچ تریکودرما بر بروز بیماری و درصد کاهش بوته‌های آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی در نظر گرفته شده بودند ابتدا دو سوم حجم پایینی گلدان‌ها خاک پاستوریزه شده پر شد و پس از آن زادمایه جدایه قارچ عامل بیماری (*F. oxysporum*) به نسبت وزنی ۱۰٪ با خاک پاستوریزه گلدانی مخلوط (۱۰۰ گرم زادمایه +۹۰۰ گرم خاک) شد و به ۱/۳ حجم فوقانی گلدان‌ها به مدت ۲۵ روز در گلخانه نگهداری و هر سه روز یک بار آبیاری صورت گرفت تا قارچ فوزاریوم به خوبی در خاک مستقر گردد. در ادامه هر ارلن محتوی ۱۰ گرم سبوس از زادمایه آنتاگونیست‌ها به ازای هر قلمه با خاک قسمت بالای گلدان‌ها که آلوده به قارچ بیماری‌زا بود، مخلوط گردید. برای آماده‌سازی تیمارهای ۶ تا ۱۰ که به‌منظور بررسی احتمال بیماری‌زا بودن جدایه‌های تریکودرما روی میخک و همچنین بررسی تاثیر این جدایه‌ها بر رشد بوته‌های میخک بدون حضور قارچ عامل بیماری در نظر گرفته شده بودند، ابتدا در گلدان‌ها خاک پاستوریزه ریخته شد و سپس ۲۰۰ گرم از سبوسی که جدایه‌های آنتاگونیست به تنهایی روی آن تکثیر شده بود اضافه شد (Kaiser *et al*., 197; Kiraly *et al*., 1974) در تیمار شاهد آلوده که به منظور تعیین مناسب بودن شرایط آزمایش و گلخانه برای بروز بیماری پژمردگی فوزاریومی در نظر گرفته شده بود، به خاک پاستوریزه داخل گلدان‌ها مقدار ۳۰ گرم زادمایه جدایه قارچ *F.oxysporum* اضافه شد. در تیمار شاهد سالم که به منظور اطمینان از عدم آلودگی خاک پاستوریزه مورد استفاده و همچنین تعیین درصد بوته‌های آلوده به بیماری در تیمارهای ۱تا ۱۰ در نظر گرفته شده بود فقط خاک پاستوریزه گلدان‌ها ریخته شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت شش هفته نگه‌داری شدند و هر روز یک بار آبیاری شدند. برای بررسی تاثیر جدایه‌های قارچ تریکودرما بر بیماری درصد کنترل بیماری محاسبه شد. برای محاسبه این شاخص از رابطه زیر استفاده شد (Denis and Webster, 1971):

$$\text{درصد کنترل بیماری} = \frac{\text{تعداد قلمه آلوده در هر تیمار} - \text{تعداد قلمه آلوده شاهد به فوزاریوم}}{\text{تعداد قلمه آلوده شاهد فوزاریوم}} \times 100$$

تیمارهای آزمایش به شرح زیر بودند:

۱- خاک پاستوریزه+جدایه فوزاریوم+جدایه T1 قارچ آنتاگونیست
۲- خاک پاستوریزه+جدایه فوزاریوم+جدایه T2 قارچ آنتاگونیست
۳- خاک پاستوریزه+جدایه فوزاریوم+جدایه T3 قارچ آنتاگونیست
۴- خاک پاستوریزه+جدایه فوزاریوم+جدایه T4 قارچ آنتاگونیست
۵- خاک پاستوریزه+جدایه فوزاریوم+جدایه T5 قارچ آنتاگونیست
۶- خاک پاستوریزه+ جدایه T1 قارچ آنتاگونیست
۷- خاک پاستوریزه+ جدایه T2 قارچ آنتاگونیست
۸- خاک پاستوریزه+ جدایه T3 قارچ آنتاگونیست
۹- خاک پاستوریزه + جدایه T4 قارچ آنتاگونیست
۱۰- خاک پاستوریزه + جدایه T5 قارچ آنتاگونیست
۱۱- شاهد آلوده (خاک پاستوریزه + جدایه فوزاریوم)
۱۲- شاهد سالم (خاک پاستوریزه بدون جدایه فوزاریوم و بدون آنتاگونیست)

برای بررسی اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر رشد گیاه میخک در پایان آزمایش ارتفاع بوته‌ها در هر تیمار با خط‌کش و وزن تر آن (قسمت‌های هوای + ریشه) در تمامی تیمارها اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و بر اساس طرح کاملا تصادفی انجام و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

شناسایی گونه‌ها و تعیین درصد جدایه‌های آن

نمونه‌برداری از گیاهان میخک با علائم پژمردگی یا مرگ گیاهچه از بیست گلخانه آلوده به قارچ از مناطق فیلستان و گلزار انجام شد و از صد گیاه، بیست گیاه که علائم آن‌ها شدیدتر بود انتخاب شد و با استفاده از روش تک اسپور (Nelson *et al*., 1983) شصت و سه جدایه خالص فوزاریوم به دست آمد.

پس از شناسایی اولیه جدایه‌های عامل بیماری بر اساس مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی و تأیید آقایان دکتر زارع و دکتر هاشمی مشخص شد که حدود ۴۰ در صـد جدایه‌ها را گونـه *Fusarium oxysporum* و ۳۲ درصـد جـدایه‌ها را گـونه *Fusarium solani* تشکیل می‌دادند که همگی روی قلمه‌های میخک خاصیت بیمـاری‌زائی داشتند. ما بقی جدایه‌ها (حدود ۲۸ درصد) که به‌عنوان گونه *F. proliferatum* یا شبیه *F. proliferatum* شناسائی شدند قادر به ایجاد بیماری روی میخک نبودند.

آزمون بیماری‌زایی و انتخاب جدایه برتر *F. oxysporum* برای آزمایش‌های آنتاگونیستی

بر اساس این آزمون جدایه F5 که شدت بیماری‌زایی آن روی میخک بیش‌تر بود به‌عنوان جدایه برتر بیماری‌زا روی میخک انتخاب شد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین درصد قلمه‌های آلوده شده روی میخک رقم Piaff توسط جدایه‌های مختلف *Fusarium oxysporum* در آزمون بیماری‌زای

Table 1. Mean percentage of infected cuttings of carnation cv. Piaff by different isolates of *Fusarium oxysporum* in pathogenicity test

جدایه Isolate	گونه قارچ Species	درصد قلمه‌های آلوده Infected cuttings(%)
F8	*F. oxysporum*	33.33
F11	*F. oxysporum*	44.44
F15	*F. oxysporum*	55.56
F1	*F. oxysporum*	33.33
F4	*F. oxysporum*	33.33
F6	*F. oxysporum*	66.67
F9	*F. oxysporum*	22.22
F14	*F. oxysporum*	33.33
F2	*F. oxysporum*	44.44
F10	*F. oxysporum*	22.22
F3	*F. oxysporum*	77.78
F7	*F. oxysporum*	66.67
F13	*F. oxysporum*	33.33
F12	*F. oxysporum*	22.22
F5	*F. oxysporum*	77.78
	F. oxysporum	44.44
	F. oxysporum	22.22
	F. oxysporum	88.89

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی

آزمون کشت متقابل (هم‌زمان و غیر هم‌زمان)

مقایسه میانگین رشد پرگنه بیمارگر و درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های تریکودرما پس از ۹۶ ساعت (کشت هم‌زمان) نشان داد که کم‌ترین میانگین رشد پرگنه فوزاریوم ده میلی‌متر در مقابل Ta3 بود و این جدایه به‌طور معنی‌داری موفق‌ترین جدایه در رقابت با *F.oxysporum* بود. پس از آن جدایه‌های Ta2 و Ta1 بیش‌ترین درصد بازدارندگی را داشتند. جدایه‌ها Tl1 و Th2 نیز در یک گروه و پس از آن جدایه‌های Th6 و Th9 در یک گروه قرار گرفتند. در کشت غیر هم‌زمان ۹۶ ساعت، درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های Ta3 و Ta1 بیش‌تر از سایر جدایه‌های تریکودرما بود و پس از آن‌ها Ta2 قرار گرفتند. کم‌ترین در صد بازدارندگی مربوط به جدایه‌های Th10,Th7,Th1 و Th14 بوده (جدول ۲).

قدرت کلونیزاسیون جدایه‌های *Trichoderma* spp. در مقابل *F.oxysporum*

اندازه‌گیری قطر رشد پرگنه جدایه‌های تریکودرما ۶، ۵ و ۷ روز پس از کشت متقابل انجام و نتایج آن ثبت شد. در این آزمون در روز پنجم پس از کشت متقابل، جدایه‌ها Ta3، Ta2 و Ta1 بیش‌ترین کلونیزاسیون پرگنه *F. oxysporum* را داشتند در روز ششم جدایه‌های Th16 و Th10 در یک گروه و جدایه‌های Th15، Th3، Th5، Th14، Th11 و Th8 در یک گروه قرار گرفتند. سایر جدایه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند. هفت روز بعد پس از کشت متقابل جدایه‌های T11، Th2، Ta1، Ta2 و Ta3 در یک گروه آماری قرار گرفتند. بین سایر جدایه‌ها اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ داشت. محاسبه درصد کلونیزاسیون جدایه‌های تریکودرما نشان داد که جدایه‌های Th1، Th2، Th3 با بیش‌ترین درصد کلونیزاسیون پرگنه *F.oxysporum* در مدت زمان کوتاه‌تری پس از کشت متقابل (۶ روز بعد)، ۱۰۰٪

تشتک پتری را پوشش دادند و قدرت کلونیزاسیون بالاتری نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند. جدایه Th2 و Tl1 با وجود این که در روز پنجم درصد کلونیزاسیون پایین‌تری نسبت به جدایه Ta3 داشتند ولی مشابه آن در روز هفتم به طور کامل پرگنه فوزاریوم را کلونیزه کردند.

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ (F5)*F. oxysporum* توسط جدایه‌های مختلف Trichoderma پس از ۹۶ ساعت بعد از کشت متقابل هم‌زمان و غیر هم‌زمان

Table 2. Mean comparison of colony growth inhibition percentage of *F. oxysporum* (F5) by different Trichoderma isolates 96 hours after simultaneous and insimultaneus dual culture

جدایه‌های تریکودرما Trichoderma isolates	درصد بازدارندگی از رشد %in hibition growth	
	۹۶ساعت کشت متقابل (همزمان) Simultaneous dual culture	۹۶ ساعت کشت متقابل (غیر همزمان) Insimultaneous dual culture
Ta3	80a	68.00 a*
Ta1	70 b	68.00 a
Ta2	60 c	60.00 b
Th2	50 d	52.00 c
Tl1	50 d	52.00c
Th6	40 e	36.00 d
Th9	40 e	36.00 d
Th11	34 f	32.80 e
Th16	34 f	32.80 e
Th4	34 f	31.20 ef
Th12	30 g	31.20 ef
Th15	28 h	31.20 ef
Th3	28 h	29.60 fg
Th8	28 h	29.60 fg
Th13	24 i	29.60 fg
Th1	24 i	28.00g
Th5	20 j	28.00 g
Th7	20 j	28.00 g
Th10	20 j	28.00 g
Th14	20 j	28.00 g
F	0 k	0.00 h

F: شاهد آلوده به*F. oxysporum*

F: Control (Inoculated with *F.oxysporum)*

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

Means with similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level (Duncan's multiple range test).

تولید ترکیبات فرار ضدقارچی توسط جدایه‌های قارچ آنتاگونیست تریکودرما

در آزمون کشت هم‌زمان، کشت ۴۸ ساعته، ۷۲ ساعته و ۹۶ ساعته نیز بین جدایه‌های انتخاب شده تریکودرما با شاهد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ وجـود داشت. جـدایه Ta3 بیش‌ترین درصد بازدارندگی را داشت و پس از آن جدایه‌های Ta2 و Ta1 قرار گرفتند. جدایه‌هایTh2 و Ta2 که فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ بودند در یک گـروه و جـدایه‌های Th2 و Th1 در گـروه دیگر قرار گرفتند. با توجه به نتایج به دست آمده در هر چهار آزمون کشت هم‌زمان کشت ۴۸ ساعته، کشت ۷۲ ساعته و ۹۶ ساعتـه، جـدایه Ta3 به‌ترتیب با ۴۰٪، ۵۰٪، ۶۰٪ و ۷۲٪ به‌طـور معنی‌داری بازدارندگی بهتری نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد میسلیـوم *F. oxysporum*(F5) توسط متـابولیت‌های فرار جدایه‌های مختلف Trichoderma در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی

Table 3. Mean comparison of mycelial growth inhibition percentage of *F.oxysporum* (F5) by voletile motabolits of different Trichoderma isolates at different times after inoculation

جدایه‌های تریکودرما Trichoderma isolates	درصد بازدارندگی از رشد % inhibition growth	
	۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی 72 hours after inoculation	۹۶ ساعت بعد از مایه‌زنی 96 hours after inoculation
Ta3	60 a	72 a*
Ta1	36 b	66 b
Ta2	34 bc	64 bc
Th2	32 cd	62 cd
Tl1	30 d	60 d
F	0 e	0 e

F: شاهد آلوده به *F.oxysporum*

F: Control (Inoculated With *F.oxysporum)*

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

Means with similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level (Duncan's multiple range test).

بررسی‌های گلخانه‌ای تاثیر جدایه‌های قارچ تریکودرما بر کاهش درصد قلمه‌های آلوده میخک

در این آزمون در هر گلدان قلمه‌هایی که از بین رفته بودند و یا علائم آلودگی به قارچ فوزاریوم مانند پژمردگی و افتادگی برگ‌های گیاه و در موارد شدیدتر خشکیدگی برگ‌ها، زرد شدن برگ‌ها، بی رنگ یا کمرنگ شدن رگبرگ‌های جوان، قهوه‌ای شدن ناحیه طوقه و در موارد شدیدتر پوسیدگی ناحیه طوقه را نشان می دادند شمارش و درصد کنترل بیماری محاسبه شد. بر اساس نتایج جدایه Ta3 به میزان ۷۷/۷۷ درصد بیماری را در قلمه‌های میخک کاهش داد (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های درصد کنترل و درصد مرگ گیاهان میخک در تیمارهای مختلف جدایه‌های تریکودرما پنج هفته پس از آلودگی مصنوعی با *F.oxysporum* در گلخانه

Table 4. Mean comparison of disease control percentage and damping off of carnation plants in different Trichoderma isolates five weeks after inoculation in greenhouse

تیمارها Treatments	درصد کنترل بیماری Disease control percentage	درصد مرگ گیاهان Damping–off of plants percentage
NOnIF	100.00a	0.00a
Ta3+F	77.77b	22.22b
Ta1+F	66.66c	33.33c
Ta2+F	66.66c	33.33c
Th2+F	55.55d	44.44d
TL1+F	44.44e	55.55e
F	0.00f	100.00f

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

Means with similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level (Duncan's multiple range test).

F: شاهد آلوده به *F .oxysporum*

F: Control (inoculated With *F.oxysporum)*

NonIF: شاهد سالم

Non IF: Healthy control

اثر جدایه‌های تریکودرما بر ارتفاع و وزن تر قلمه‌های میخک

جدایه‌های تریکودرما در حضور جدایه قارچ عامل بیماری سبب افزایش معنی‌داری در سطح ۵٪ در ارتفاع و وزن تر قلمه‌های میخک در مقایسه با شاهد آلوده به فوزاریوم شدند (جدول ۵). علاوه بر آن، در تیمارهائی که فقط با جدایه‌های تریکودرما و بدون حضور قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شده بودند نیز ارتفاع و وزن تر قلمه‌ها بیش‌تر از تیمار آلودگی تنها با قارچ عامل بیماری بود (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین ارتفاع و وزن تر گیاهان میخک در تیمارهای مختلف جدایه‌های Trichoderma مایه‌زنی شده و نشده با قارچ *F. oxysporum* پنج هفته بعد از مایه‌زنی در گلخانه

Table 5. Mean comparison of carnation plants height and fresh weight in different Trichoderma isolates inoculated and non- inoculated with *F. oxysporum* in greenhouse five weeks after inoculation

تیمار Treatment	میانگین ارتفاع گیاهان Mean seedlings height(mm)	میانگین وزن تر گیاهان Mean seedlings weight (g)
NOnIF	17.33d	1.51d
TL1+F	14.55b	0.91ab
Th2+F	14.77b	1.01abc
Ta2+F	15.38c	1.04bc
Ta1+F	15.50c	1.07bc
Ta3+F	15.77c	1.12c
Tl1	17.44bc	1.60ab
Th2	17.44bc	1.66ab
Ta2	17.78cd	1.67ab
Ta1	17.78cd	1.81ab
Ta 3	18.17d	2.42b
F	12.61a	0.82a

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

Means with similar letters in each column are not significantly different at 5% probability level (Duncan's multiple range test)

F: شاهد آلوده به*F.oxysporum*

Non IF: Control (inoculated with *F.oxysporum)*

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که جدایه‌های مختلف تریکودرما قادرند با مکانیزم‌های متفاوتی از رشد میسلیوم‌ها و پرگنه‌های قارچ *F. oxysporum* جلوگیری کنند. جدایه‌های تریکودرما با استفاده از مکانیسم آزمون کشت متقابل نسبت به سایر مکانیسم‌های آنتاگونیستی مثل تولید ترکیبات فرار ضدقارچی در آزمون تولید ترشحات برون سلولی به میزان بیش‌تری از رشد و توسعه هیف قارچی بیمارگر *F. oxysporum* جلوگیری می‌کنند. نتایج حاصل از آزمون کشت متقابل با نتایج آل‌آقایی (۱۳۹۰) مطابقت داشت.

نتایج این بررسی نشان داد در آزمون تولید ترکیبات فرار ضدقارچی اگر سن پرگنه قارچ تریکودرما بیش‌تر باشد میزان جلوگیری از رشد هیف قارچ بیمارگر نیز افزایش می‌یابد. علت بروز چنین نتایجی را می‌توان به وجود یک رابطه مستقیم بین میزان رشد جدایه قارچ تریکودرما و میزان تولید ترکیبات فرار نسبت داد. کشت‌های ۷۲ ساعتـه و ۹۶ ساعتـه جـدایه‌های قـارچ آنتـاگـونیست خاصیت بازدارندگی از رشـد بیش‌تر نسبت به کشت‌های هم‌زمان و۴۸ ساعتـه نشان دادند. به‌عنوان مثال در کشت ۹۶ ساعته جدایه‌ها، میزان کنتـرل‌کنندگی جدایه Ta3، ۷۲ درصد بود ولی در کشت ۷۲ ساعته، ۴۸ ساعته و کشت هم‌زمان به ترتیب ۶۰٪، ۵۰٪ و ۴۰٪ بود. که نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج آل‌آقایی (۱۳۹۰)، خامنه‌پور (۱۳۹۱) و چت و همکاران (Chet *et al*., 1981) مطابقت داشت. در مورد ارتباط نتـایج بررسی‌های

آزمایشگاهی عوامل آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زا و نتایج گلخانه‌ای این عوامل در کنترل بیمار گزارش‌های متناقضی وجود دارد (Sivan and Chet, 1993; Houssien *et al*., 2010). اگرچه در آزمایش‌های ولر و همکاران (weller *et al*., 1987) مشاهد شد که هیچ رابطه عمومی دال بر این که باکتری آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) بتواند بیماری ناشی از آن عامل بیماری را در شرایط گلخانه (*In vivo*) نیز کنترل کند، وجود ندارد ولی در این بررسی از انطباق نسبی نتایج حاصل از آزمون‌های انجام شده در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که جدایه‌های به کاربرده شده علاوه بر آزمایشگاه در گلخانه نیز قادرند باعث کنترل نسبی بیماری شوند که با نتایج حاصل از تحقیقات خامنه‌پور (۱۳۹۱) مطابقت داشت. معنی‌دار بودن نتایج آزمایش تاثیر تیمار خاک آلوده به قارچ فوزاریوم با قارچ تریکودرما روی ارتفاع و وزن تر قلمه‌های میخک نشان‌دهنده چیره شدن جدایه آنتاگونیست بر جدایه بیمارگر است. تحقیقات سیوان و چت (Sivan and Chet, 1987) نشان داد که کاهش بیماری مرگ گیاهچه فلفل (*Capsicum annum*) توسط چندین گونه ار قارچ تریکودرما و باکتری سودوموناس فلوروسنت با افزایش این محصول همراه بوده است. در ایران نیز نیک‌نژاد وشریفی‌تهرانی (۱۳۷۱) بررسی تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma* spp. علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici را در شرایط گلخانه بررسی و گزارش دادند که تریکودرما وقوع بیماری را کاهش داده و باعث رشد بیش‌تر گیاه می‌شود. نظری (۱۳۷۰) اثر *Trichoderma harzianum* را روی قارچ *Phytophthora drechsleri* (عامل بوته میری خیار در ایران) بررسی و گزارش نمود که تریکودرما وقوع بیماری را کاهش داده و باعث رشد بیش‌تر گیاه می‌شود. یکی از مکانیسم‌های آنتگونیستی جدایه‌های تریکودرما در محیط خاک رقابت برای اشغال نیچ اکولوژیکی در ریزوسفر یا در ریشه به منظور کسب منابع غذایی است و از این‌رو در برخی تحقیقات مشخص شده که توانایی کلنیزه کردن (Colonization) شدید ریشه توسط برخی جدایه‌های قارچ تریکودرما مانند *T. koningii* مهم‌ترین مکانیسم این قارچ در فرآیند بیوکنترل می‌باشد (Howell *et al*., 2000). جدایه‌های تریکودرما از گونه‌های مختلف به دلیل رشد سریعشان می‌توانند به سرعت در سیستم ریشه‌ای گیاهان گسترش پیدا کنند اما از آن‌جا که در همه گونه‌های تریکودرما این پدیده به یک اندازه نیست و نیز چون در محیط خاک مکانیسم‌های آنتاگونیسم تحت تاثیر عوامل فیزیک و شیمیایی مختلف قرار می‌گیرند (Howell *et al*., 2000; Harman, 2000; Zhang *et al*., 1996)، لازم است که جدایه‌ها ی این قارچ آنتاگونیست در آزمایش‌های مختلف در تقابل با بیمارگرهای مختلف وابسته به شرایط کشت محصول مورد نظر (گیاه میزبان) در مطالعات جدا گانه مورد بررسی قرار گیرند. در مجموع این بررسی نشان داد که جدایه‌های تریکودرما مورد بررسی دارای توان بیوکنترلی هستند.

منابع References

آل‌آقایی. ش.۱۳۹۰. بررسی امکان کنترل بیولوژیکی *Pythium aphanidermatum* عامل گیاهچه میری و پوسیدگی بذر و ریشه خیار توسط جدایه‌های.spp *Trichoderma*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان.

اعتباریان، ح. ر. ۱۳۷۵. بیماری پژمردگی فوزاریومی میخک در منطقه ورامین. بیماری‌های گیاهی ۲۳۲:۳۲ - ۲۲۳.

بنی‌جمالی ،م. و .بیات ،ح.۱۳۸۷. کنترل پژمردگی فوزاریومی میخک با آفتاب‌دهی خاک در ترکیب با کود دامی یا متام سدیم .پژوهش وسازندگی در زراعت و باغبانی۸۱:۵۶-۴۶.

بی‌نام. ۱۳۸۲. دفتر گل و گیاهان زینتی، دارویی و قارچ‌های خوراکی. آمار نامه، وزارت جهاد کشاورزی، تهران.

خامنه‌پور، ع. ۱۳۹۱. بررسی اثر آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرمای منطقه ورامین در برابر گونه غالب فوزاریوم عامل پژمردگی گوجه فرنگی. پایان نامه کارشناسی رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین – پیشوا، رامین.

رشیدی، ا. ۱۳۹۱. پرورش میخک. انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران.

صارمی، ح. ۱۳۸۴. فوزاریوم، بیولوژی، اکولوژی و تاکسنومی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

قنادی، ف.۱۳۷۱. باغبانی و گلکاری در خانه و آپارتمان. انتشارات گل‌ها، تهران.

ناظریان، ع. و میرابوالفتحی، م. ۱۳۸۳. تشخیص و کنترل بیماری‌های گیاهان زینتی (چاپ اول). انتشارات دارالعلم، قم.

نظری، س.۱۳۷۰. بررسی اثر چند قارچ‌کش و قارچ *Trichoderma harzianum* روی عامل بوته میری فیتوفتورایی خیار *Phytophthora drechsleri*. پایان نامه فوق لیسانس، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران،کرج.

نیک‌نژاد، م. و شریفی‌تهرانی، ع. ۱۳۷۱. بررسی تاثیر قارچ آنتاگونیست تریکودرما روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersisici*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه گیلان، رشت.

Anonymus, 2006. The Biology and Ecology of *Dianthus caryophyllus* L.(carnation). Australian Goverment, Department of Health and Ageing, office of the Gene Technology Regulator, Australia.

Ben, Y. and Shtienberg, D. 1997. Effects of the host, the pathogen, the environment and their interactions, on fusarium wilt. Phytoparasitica 25: 207 - 216.

Chet, I., Harman, G.E. and Baker, R. 1981. *Trichoderma harzianum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbiol. Ecol. 7: 29 – 38.,

Denis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of Trichoderma. III. Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society 57: 363-369.

Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84: 377-393.

Houssien, A. A. Ahmed, S. M. and Ismail, A. A. 2010. Activation of tomato plant defense respons against fusarium wilt disease using *Trichoderma harzianum* and salicylic acid under greenhouse conditions. Research Journal of Agricultural and Biological Sciences 6(3): 328 - 338 .

Howell, C. R. 2000. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathology 92:177-180.

Kaiser, W. J., Mossahebi, G. H. and Okhovat, M. 1970. Occurrence, pathogenicity and distribution in soil of *Rhizoctonia solani* inciting a stem canker disease of mungbean (*Phaseolus aurens*) in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 6(10): 16 - 25.

Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F. and Voros, J. 1974. Methods in Plant Pathology with Special Reference to Breeding for Disease Resistance. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, New York, USA. 380pp.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W.F.O. 1983. Fusarium Species: An Illustrated Manual For Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 193pp.

Papavizas, G. C. 1985. Trichoderma and Gliocladium biology, ecology and potential for biological control. Annual Review of Phytopathology 23: 23 - 54 .g

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

Weller, J. L., Harrison. M. A. and Koehler. P. E. 1987. Presence of patulin in pasteurized apple cider. Journal of Food Science 52: 479 - 80.

Zhang, J., Howell, C. R., and Starr, J. L. 1996. Suppression of Fusarium colonization of cotton roots and fusarium wilt by seed treatment with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. Biocontrol Science Technology 6: 175 - 187.