فصلنامه گیاه پزشکی
۸۵- ۷۱ : (۱) ۱- ۱۳۸۸

مکانیسم های آنتاگونیستی گونه های قارچ *Trichoderma* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری پوسیدگی مرطوب ریشه نخود ایرانی

صدیقه محمدی *

گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز

بهرام منصوری

بخش تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، زرقان

حمید رضا زمانی زاده

گروه بیماری شناسی گیاهی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

اصغر حیدری

بخش تحقیقات بیماری های گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

چکیده

مکانیسم های آنتاگونیستی سه جدایه (THJ1, THJ2 & THB) *Trichoderma harzianum* ، یک جدایه *T. virens* و یک جدایه *T. viride* بر علیه *Rhizoctonia solani* عامل بیماری پوسیدگی مرطوب ریشه نخود ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. در بررسی ماکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه های *Trichoderma* و *R. solani* مشخص شد که جدایه THJ2 در هر سه نوبت یادداشت برداری به ترتیب به میزان ۷۲/۷۷، ۹۴/۷۲ و ۹۴/۰۵ درصد بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* داشته است. همچنین تمام جدایه های به کاررفته *Trichoderma* قادر به پیشروی روی میسیلیوم *R. solani* بودند. در بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه های *Trichoderma* و *R. solani* ، تماس، نفوذ و پیچش ریسه‌ای جدایه های *Trichoderma* و قطعه قطعه شدن ریسه های قارچ بیمارگر مشاهده شد. در بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *Trichoderma* مشخص شد که ترشحات مایع THJ2 به میزان پنج و ده میلی لیتر به ترتیب در سه نوبت یادداشت برداری به میزان ۶۲/۳۴ ، ۷۳/۸۳، ۷۰/۹۷ و ۶۸/۰۴ ، ۷۲/۵۹ ، ۸۰/۵۲ درصد بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* داشته است. در بررسی تاثیر ترشحات فرار جدایه های *Trichoderma* مشخص شد که جدایه THB در هر سه نوبت یادداشت برداری به ترتیب به میزان ۶۸/۰۲، ۷۳/۳۲ و ۷۳/۵۴ درصد بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* داشته است. به نظر می آید

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : seddiqe.mohammadi@yahoo.com

دریافت: ۸۷/۶/۷، پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۵

استفاده از ترکیبات غیر فرار بهترین مکانیسم آنتاگونیستی *Trichoderma harzianum* بر علیه بیمارگر محسوب می گردد.

واژه های کلیدی: مکانیسم های آنتاگونیستی، جدایه های *Trichoderma* و *Rhizoctonia solani*

مقدمه

قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* نخستین بار توسط پرسون در سال ۱۹۷۴ معرفی گردید. این قارچ بر اساس طبقه بندی آلکسوپولوس در راسته Moniliales از رده Hyphomycetes قرار دارد (Alexopoulos, 1996). قارچ خاکزی *Trichoderma* از اجزای اصلی میکوفلور خاک می‌باشد و در مقابل محدوده گسترده‌ای از عوامل بیماریزا با تولید آنزیم های خارج سلولی نظیر آنزیم های آمیلولیتیک، پکتولیتیک، پروتئولیتیک، لیپولیتیک، کتینولیتیک و سلولیتیک قدرت رقابتی زیادی دارد (Emma *et al*., 2008; Lorito *et al*., 1996; Papavizaz, 1995).

گونه های *Trichoderma* به خصوص گونه *T. harziaum* به دلیل نرخ تولید مثلی بالا، توانایی زیاد در استفاده از منابع غذایی مختلف، قدرت تهاجم بالا علیه عوامل بیماریزا، بهره‌گیری از مکانیسم های آنتاگونیستی مختلف چون رقابت، پارازیتیسم و آنتی بیوز ، توانایی در ایجاد تغییر در ریزوسفر، کارایی در تحریک رشد و القای مقاومت در گیاهان از جمله مهم‌ترین عوامل بیوکنترل شناخته شده محسوب می‌شوند (Benitetz *et al*., 2004; Burmeister, 2008; El- Katatny *et al*., 2001).

مکانیسم های آنتاگونیستی این گونه شامل فرایند های پیچیده‌ای نظیر شیمی گرایی، اتصال ریسه ای و ایجاد ساختارهایی نظیر پیچش و نفوذ ریسه ای می‌باشد. این مراحل با ترشح آنزیم های خارج سلولی نظیر کیتیناز، بتاگلوکاناز و پروتئاز به عنوان متابولیت های ثانویه همراه است. گر چه به نظر می‌آید موفقیت این گونه بیشتر به واسطه خاصیت هم افزایی فعالیت آنتی بیوزی و آنزیم های هیدرولیزکننده باشد، اما مکانیسم های قارچ کشی این گونه هنوز به طور کامل مشخص نشده است (Burmeister, 2008; De Marco *et al*., 2003; Lorito *et al*., 1996).

قارچ *Rhizoctonia solani* براساس طبقه بندی آلکسوپولوس در راسته Agonomycetales از رده Hyphomycetes قرار دارد (Alexopoulos, 1996) . دیواره سلولی ریسه های این قارچ عمدتاً از گلوکان تشکیل شده و فقط ۸-۶ درصد کیتین دارد، بنابراین به نظر می رسد فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۳ گلوکاناز مترشحه از *Trichoderma* بیشتر از آنزیم کیتیناز در کنترل این عامل بیماری زا مؤثر باشد (Ogoshi, 1997) . کاهش ۷۷/۲ درصدی بیماری پوسیدگی مرطوب ریشه نخود ایرانی در شرایط گلخانه توسط *T. harzianum* دلیل مشخصی بر کارایی بالای این قارچ در کنترل بیماری فوق می‌باشد (Mohammadi *et al*.,

2004). بنابراین شناخت مکانیسم های آنتاگونیستی و بهره گیری از بهترین شیوه استفاده از عوامل بیوکنترل می تواندکمک شایانی در کنترل این گونه بیماری ها داشته باشد.

مواد و روش ها

به منظور بررسی توانایی جدایه های *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسیلیومی، استقرار و پیشروی روی میسیلیوم *R. solani* ، عامل بیماری پوسیدگی مرطوب ریشه نخود ایرانی و همچنین بررسی نحوه تأثیر آن روی این قارچ از نظر شیوه های مختلف پارازیتیسم و آنتی بیوز در محیط کشت بررسی های زیر صورت گرفت:

۱- بررسی ماکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه های مختلف Trichoderma و R. solani

این آزمایش به منظور مقایسه توانایی جدایه های مختلف *Trichoderma* در بازدارندگی از رشد *R. solani* و نیز استقرار و پیشروی *Trichoderma* روی میسیلیوم عامل بیماری در محیط کشت انجام گرفت. بدین منظور در یک طرف تشتک های پتری حاوی محیط کشت PDA یک بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه *R. solani* که از گیاهان آلوده منطقه زرقان در استان فارس جدا شده بود به فاصله یک سانتیمتری از لبه تشتک پتری و در طرف مقابل یک بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه هر کدام از جدایه های *Trichoderma*[۱] کشت گردید. تشتک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اندازه گیری رشد شعاعی *R. solani* در سه نوبت به فاصله های زمانی ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت، انجام شد. در روز چهارم در تیمار شاهد که تنها حاوی بیمارگر بود کل تشتک پتری پوشیده شده بود. درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* ۷۲ ساعت پس از کشت با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\frac{[\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تقابل با هر کدام از جدایه های } Trichoderma] - [\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تشتک پتری شاهد}]}{[\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تشتک پتری شاهد}]} \times ۱۰۰$$

در این آزمایش علاوه بر تعیین درصد بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ عامل بیماری در مقابل جدایه های مختلف *Trichoderma*، پیشروی روی میسیلیوم *R. solani* پس از متوقف نمودن رشد آن نیز بررسی شد. این آزمون در قالب طرح کامل تصادفی شامل ۶ تیمار در ۴ تکرار انجام شد. داده های بدست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تیمار ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن با یکدیگر مقایسه شدند (Little & Hills, 1978).

[۱] جدایه های *Trichoderma* توسط دکتر منصوری و دکتر اعتباریان در اختیار قرار گرفت.

۲- بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه های مختلف Trichoderma و R. solani

هدف از انجام این آزمایش مشاهده نحوه ارتباط بین ریسه های جدایه های مختلف *Trichoderma* با ریسه های *R. solani* و چگونگی پارازیته شدن و تماس ریسه ای بین آن ها بود. این آزمایش به دو روش استفاده از لام و ایجاد شیار انجام گرفت.

۲-۱- روش استفاده از لام

به منظور انجام این آزمایش، ابتدا در وسط تشتک های پتری ۹ سانتیمتری حاوی محیط کشت PDA لام های سترون میکروسکوپی قرار داده شد. در یک طرف تشتک های یک بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه *R. solani* به فاصله یک سانتیمتری از لبه تشتک پتری و در طرف مقابل یک بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه هر کدام از جدایه های *Trichoderma* کشت گردید. برای هر جدایه قارچ آنتاگونیست ۴ تکرار در نظر گرفته شد. تشتک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به این ترتیب با رشد قارچ ها ریسه های آن ها روی لام میکروسکوپی به هم برخورد نمودند. با برداشتن لام و تمیز کردن زیر آن، با بزرگنمایی × ۴۰۰ میکروسکوپ چگونگی تأثیر جدایه های مختلف *Trichoderma* روی *R. solani* مشاهده و بررسی قرار گرفت.

۲-۲- روش ایجاد شیار

در این روش در وسط تشتک های پتری ۹ سانتیمتری حاوی محیط کشت PDA نواری به عرض یک سانتیمتر در طول قطر تشتک پتری به وسیله اسکالپل سترون برداشته شد. دریک طرف این شیار یک بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه *R. solani* به فاصله یک سانتیمتری از لبه تشتک پتری و در طرف دیگر یک بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت چهار روزه هر کدام از جدایه های *Trichoderma* کشت گردید. هر دو قارچ با گذشت زمان رشد نموده و در قسمت فاقد محیط کشت به هم برخورد نمودند. نحوه تأثیر جدایه های *Trichoderma* و *R. solani* در قسمت شیار به وسیله میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت.

۳- بررسی تاثیر ترشحات مایع Trichoderma در جلوگیری از رشد میسیلیومی R. solani

این آزمون به منظور بررسی تاثیر ترشحات مایع *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسیلیومی *R. solani* انجام شد. جهت انجام این آزمایش نیاز به تهیه ترشحات مایع قارچ *Trichoderma* بود. برای این منظور ابتدا محیط کشت مایعی با تغییر اندکی در محیط کشت انتخابی Davet *et al.* (1981) تهیه گردید. بدین منظور در هر ارلن ۲۵۰ میلی لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط فوق ریخته شد و در دستگاه اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر، و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ دقیق سترون شد. پس از سرد شدن محیط مایع هر ارلن با دو بلوک ۵ میلی متری از حاشیه کشت سه روزه جدایه های *Trichoderma* مایه زنی شد. در ارلن مربوط به تیمار شاهد هیچ قارچی اضافه نشد. ارلن ها به مدت یک هفته روی دستگاه تکان

دهنده با ۹۰ دور در دقیقه قرار داده شد. برای تهیه ترشحات مایع ابتدا محلول‌های غذایی که جدایه‌های *Trichoderma* در آن رشد کرده بودند از کاغذ صافی سترون عبور داده شدند و محلول های حاصل مجدداً از کاغذهای صافی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (Millipore) عبور داده شدند. به این شیوه در مرحله اول میسیلیوم و اسپورها گرفته و در مرحله دوم محلول کاملاً صاف گردید. از محلول بدست آمده برای بررسی تاثیر ترشحات حاصل از جدایه‌های *Trichoderma* روی رشد میسیلیومی *R. solani* استفاده شد. در این آزمایش برای هر جدایه *Trichoderma* دو تیمار ۵ و ۱۰ میلی لیتری از عصاره در نظر گرفته شد و به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت PDA با دمای حدود ۴۵ درجه سلسیوس اضافه و به خوبی مخلوط گردید و در داخل تشتک پتری ریخته شد. برای تیمار شاهد ۵ و ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع صاف شده به ۲۰ میلی لیتر PDA اضافه گردید. پس از انعقاد و خنک شدن محیط های کشت، در وسط تشتک های پتری یک بلوک به قطر ۵ میلی متر از حاشیه کشت ۴ روزه *R. solani* قرار داده شد. تشتک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. یادداشت برداری به فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت عامل بیماری انجام گرفت و در هر مرحله قطر پرگنه میسیلیوم عامل بیماری بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت شد. پس از گذشت۷۲ ساعت سطح تشتک پتری شاهد کلاً بوسیله قارچ عامل بیماری اشغال شد. به همین دلیل یادداشت برداری در این مرحله متوقف شد. در این آزمایش درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\frac{[\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در شرایط وجود ترشحات مایع خارج سلولی}] - [\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تشتک پتری شاهد}]\text{هر کدام از جدایه های } Trichoderma}{[\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تشتک پتری شاهد }]} \times ۱۰۰$$

این آزمایش در قالب دو طرح کاملاً تصادفی هر کدام با ۶ تیمار در ۴ تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تیمار ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن با یکدیگر مقایسه شدند (Little & Hills, 1978).

۴- بررسی تاثیر ترشحات فرار قارچ Trichoderma در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ R. solani

این آزمون به منظور بررسی تاثیر ترشحات فرار *Trichoderma* در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ *R. solani* انجام شد. جهت انجام این آزمایش ابتدا در تشتک های پتری ۹ سانتیمتری، ۲۰ میلی لیتر محیط کشت PDA ریخته شد. در وسط تشتک های پتری یک بلوک به قطر ۵ میلی متر از حاشیه کشت ۴ روزه هر کدام از جدایه های *Trichoderma* قرار داده شد. در وسط تشتک پتری مربوط به تیمار شاهد به جای قرص ۵ میلی متری از

جدایه‌های *Trichoderma*، یک قرص ۵ میلی متری از محیط کشت PDA قرار گرفت. پس از گذشت ۴۸ ساعت در وسط تشتک های پتری دیگری، یک قرص ۵ میلی متری از حاشیه کشت ۴ روزه *R. solani* قرار داده شد. سپس با رعایت شرایط سترون درب های هر دو گروه از پتری ها برداشته شد و پتری های حاوی *R. solani* به صورت وارونه روی پتری های حاوی جدایه‌های *Trichoderma* قرار گرفت تا تماس این دو قارچ فقط از طریق متابولیت‌های فرار *Trichoderma* باشد. سپس تشتک‌های پتری با نوارهای پارافیلم به خوبی بسته شدند تا ارتباط داخل دو تشتک با محیط خارج کاملاً قطع شود. تشتک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. اندازه گیری قطر حلقه‌های رشدی *R. solani* به فاصله‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد.

سطح تشتک پتری شاهد پس از ۷۲ ساعت توسط *R. solani* اشغال شد و به همین دلیل یادداشت برداری در این مرحله متوقف گردید. درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ *R. solani* در اثر متابولیت‌های فرار با استفاده از رابطه زیر بدست آمد:

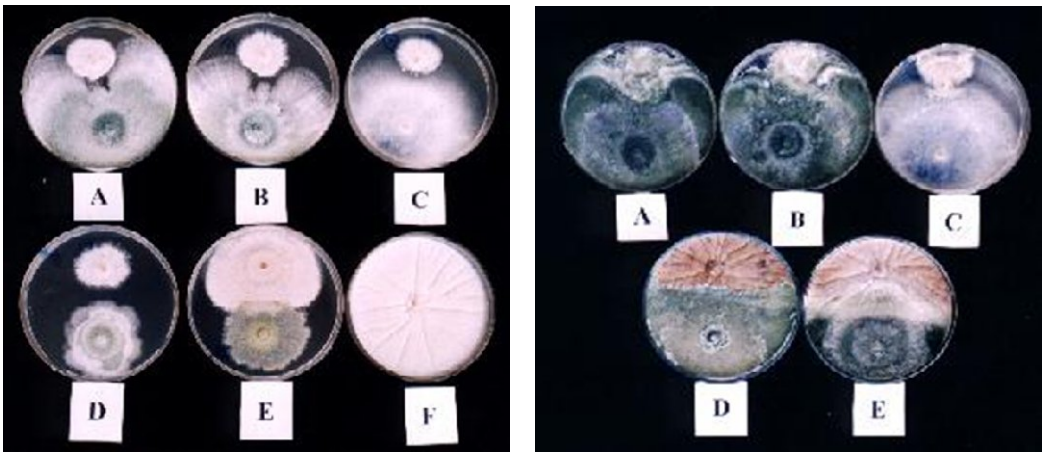
$$\frac{[\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در شرایط وجود ترکیبات فرار }] - [\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تشتک پتری شاهد}]\text{هر کدام از جدایه های } Trichoderma}{[\text{قطر کلنی } R.\ solani \text{ در تشتک پتری شاهد }]} \times ۱۰۰$$

این آزمایش در قالب دو طرح کاملاً تصادفی هر کدام با ۶ تیمار در ۴ تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تیمار ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن با یکدیگر مقایسه شدند (Little & Hills, 1978).

نتایج

۱- بررسی ماکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه های مختلف *Trichoderma* و *R. solani*

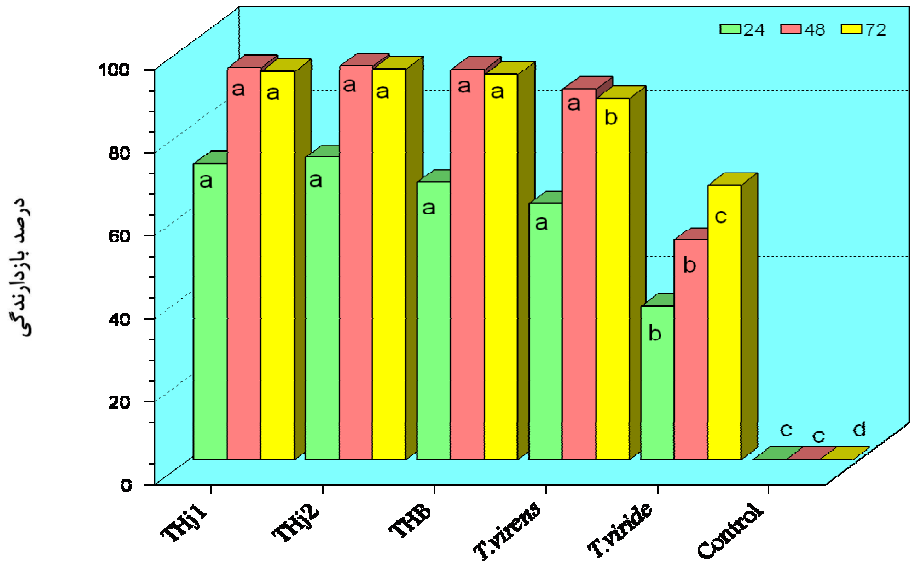
یادداشت برداری از نتایج در فواصل زمانی ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از کشت انجام گرفت. در سطح احتمال ۹۹ درصد در هر سه فاصله زمانی، جدایه های *Trichoderma* از نظر بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* با یکدیگر تفاوت معنی دار، داشتند. با مقایسه درصدهای بازدارندگی جدایه های مختلف *Trichoderma* علیه *R. solani* ملاحظه می‌شود که جدایه THJ2 در هر سه نوبت یادداشت برداری به ترتیب به میزان ۷۲/۷۷، ۹۴/۷۲ و ۹۴/۰۵ درصد بیشترین بازدارندگی از رشد میسیلیومی عامل بیماری را داشته است (شکل ۱- الف و نمودار ۱). هم چنین نتایج نشان داد که تمامی جدایه های به کار رفته *Trichoderma* قدرت پیشروی روی میسیلیوم *R. solani* را دارند (شکل ۱- ب).



الف ب

شکل۱- بررسی ماکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه هـای *Trichoderma* و جدایـه عامـل بیمـاری (الـف) و پیشروی جدایه های *Trichoderma* روی جدایه عامل بیماری (ب)

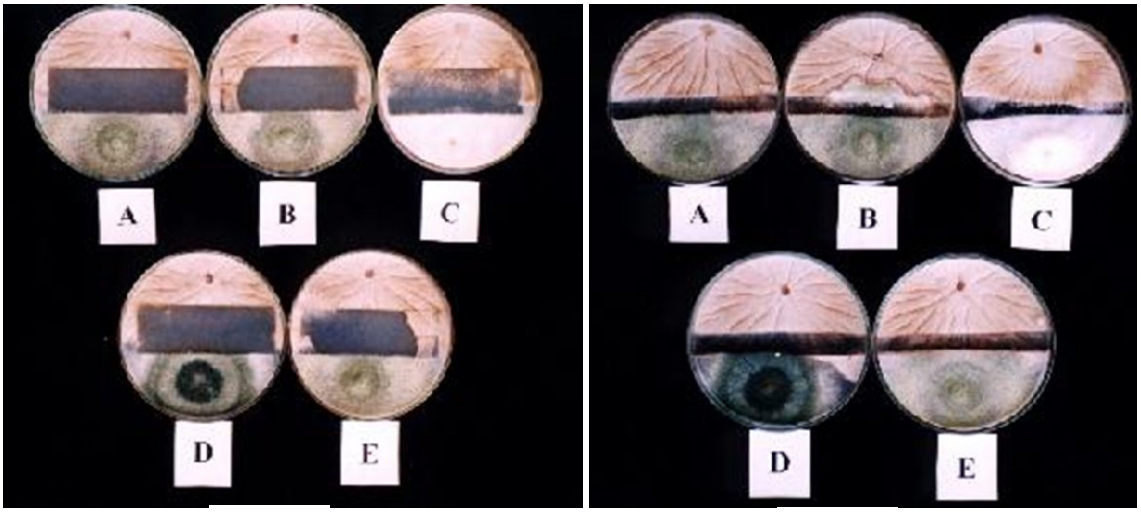
A: *R. solani* & THJ1 .B: *R. solani* & THJ2, C: *R. solani* & THB, D: *R.solani* & *T. virens* , E: *R. solani* & *T. viride* & F: Control (*R. solani*)



نمودار ۱- مقایسه میانگین های تأثیر جدایه های *Trichoderma* در ممانعـت از رشـد *R. solani* در روش کشت مقابل در سه فاصـله زمـانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ سـاعت پـس از کشت

۲- بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه های مختلف Trichoderma و R. solani

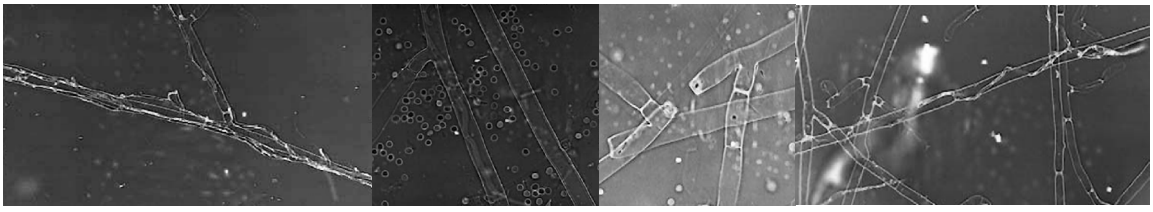
این آزمایش به دو روش لام و ایجاد شیار انجام شد. در روش لام مشاهده شد که ریسه‌های تمام جدایه های *Trichoderma* در مراحل اولیه برخورد با ریسه های *R. solani* به موازات آن رشد کرده و تماس ریسه ای می‌یابند. سپس با گذشت زمان به درون ریسه های *R. solani* نفوذ می کنند. قطعه قطعه شدن ریسه های *R. solani* نیز مشاهده گردید. در روش ایجاد شیار علاوه بر موارد فوق، پیچش ریسه های *Trichoderma* نیز به دور ریسه های عامل بیماری مشاهده شد (شکل ۲و۳).



الف ب

شکل ۲- بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه های *Trichoderma* و جدایه عامل بیماری بـه روش اسـتفاده از لام (الف) و به روش ایجاد شیار (ب)

A: *R. solani* & THJ1 .B: *R. solani* & THJ2, C: *R. solani* & THB, D: *R. solani* & *T. virens* , E: *R. solani* & *T. viride* & F: Control (*R. solani*)

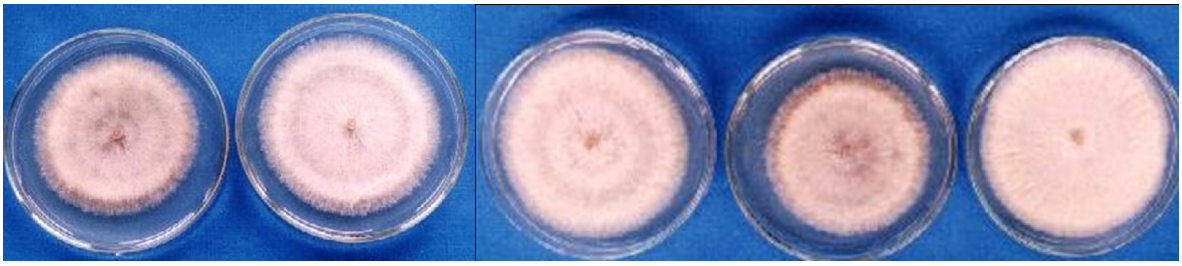


A B C D

شکل ۳- بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایـه هـای *Trichoderma* و جدایـه قـارچ عامـل بیمـاری A : تمـاس ریسه‌ای، B : نفوذ ریسه ای، C : قطعه قطعه شدن ریسه و D : پیچش ریسه ای (ریسه نازک مربوط به *Trichoderma* و ریسه ضخیم مربوط به *Rhizoctonia solani* می باشد.)

۳- بررسی تاثیر ترشحات مایع Trichoderma در جلوگیری از رشد میسیلیومی R. solani

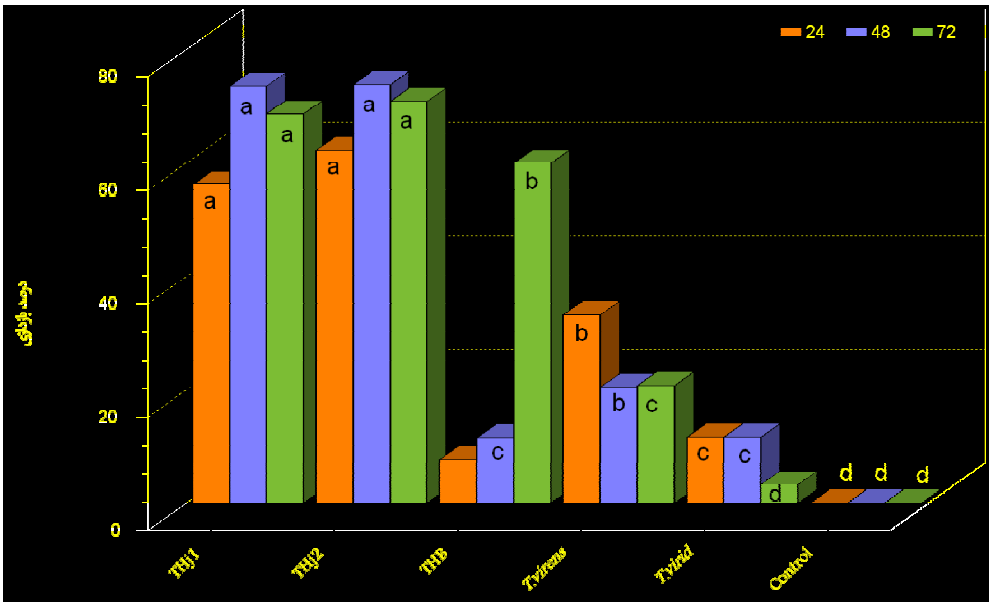
در سطح احتمال ۹۹ درصد در هر سه فاصله زمانی، بین جدایه های *Trichoderma* از نظر ترشحات خارج سلولی در بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* اختلاف معنی دار وجود دارد. با مقایسه درصد های بازدارندگی ترشحات مایع خارج سلولی جدایه های مختلف قارچ *Trichoderma* به میزان ۵ میلی لیتر، ملاحظه می‌شود که جدایه THJ2 در هر سه نوبت یادداشت برداری به ترتیب به میزان ۶۲/۳۴، ۷۳/۸۳ و ۷۰/۹۷ درصد بیشترین بازدارندگی از رشد میسیلیومی *R. solani* را داشته است. همچنین با مقایسه درصد های بازدارندگی ترشحات مایع خارج سلولی جدایه های مختلف *Trichoderma* به میزان ۱۰ میلی لیتر ملاحظه می‌شود که جدایه THJ2 در این آزمایش نیز در هر سه نوبت یادداشت برداری به ترتیب به میزان ۶۸/۰۴، ۷۲/۵۹ و ۸۰/۵۲ درصد بیشترین بازدارندگی از رشد میسیلیومی قارچ عامل بیماری را داشته است (شکل ۴ و نمودارهای ۲و ۳).



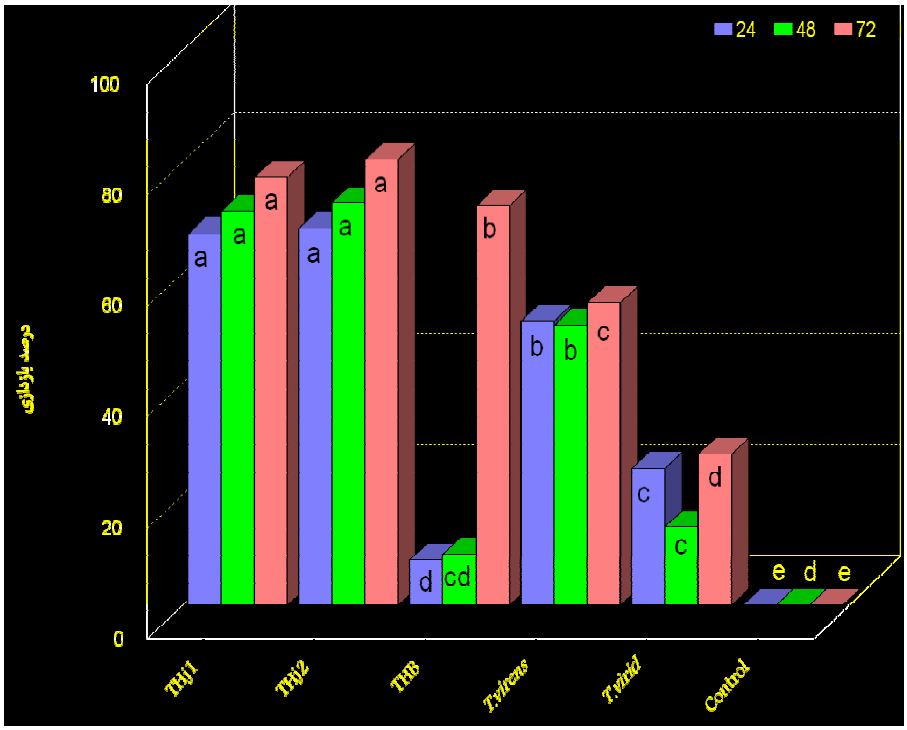
A B C D E

شکل ۴- تأثیر وجود ۱۰ میلی لیتر از ترشحات مایع جدایه های *Trichoderma* در ممانعت از رشد *R. solani*

A-E به ترتیب حاوی ترکیبات غیر فرار جدایه های THJ1، THJ2، THB، *T. virens* و *T. viride*

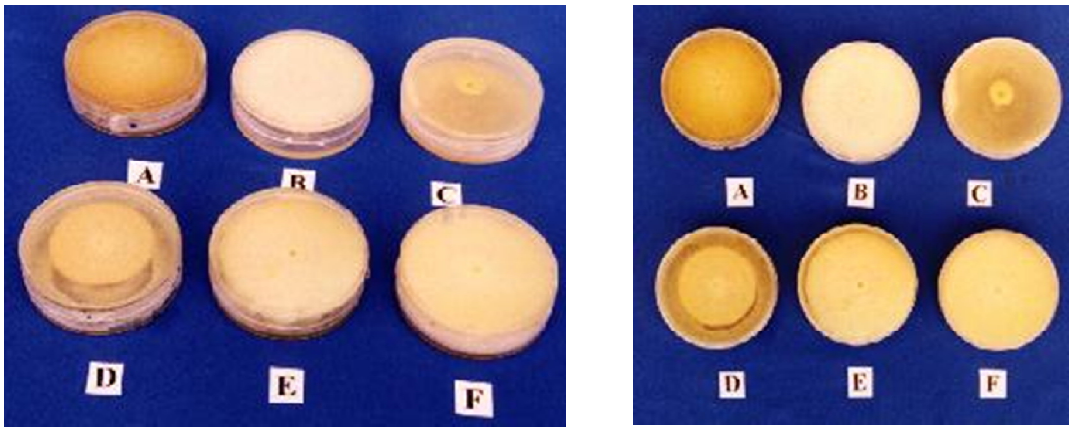


نمودار ۲- مقایسه میانگین های تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه های *Trichoderma* به میـزان ۵ میلی لیتر در ممانعت از رشد *R. solani* در سه فاصله زمانی۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت



نمودار ۳- مقایسه میانگین های تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه هـای *Trichoderma* به میزان ۱۰ میلی‌لیتـر در ممانعـت از رشـد *R. solani* در سـه فاصـله زمـانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت

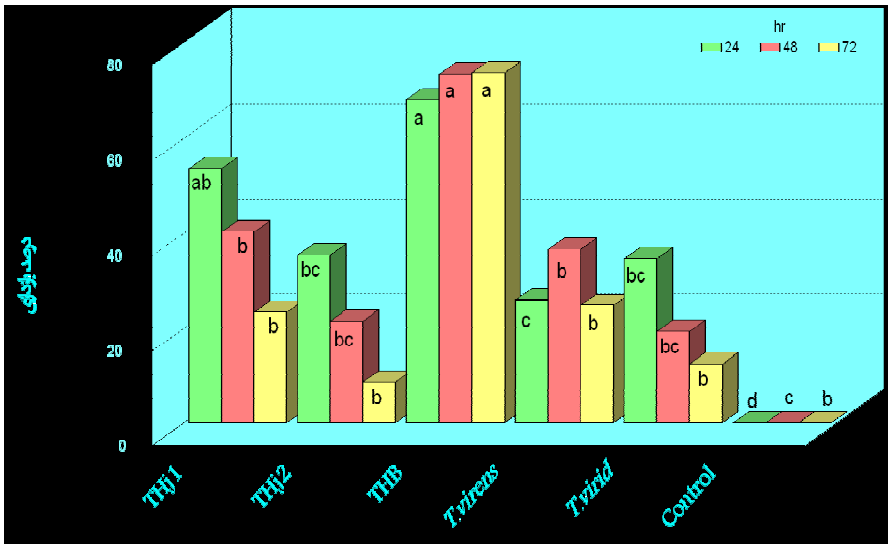
در سطح احتمال ۹۹ درصد بین ترکیبات فرار جدایه های *Trichoderma* از نظر بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی دار وجود دارد. با مقایسه متابولیت های فرار جدایه های *Trichoderma* از نظر درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *R. solani* ملاحظه می‌شود که جدایه THB در هر سه نوبت یادداشت برداری به ترتیب به میزان ۶۸/۰۲، ۷۳/۳۲ و ۷۳/۵۴ درصد، بیشترین بازدارندگی از رشد میسیلیومی قارچ عامل بیماری را داشته است (شکل ۵ و نمودار ۴).



الف ب

شکل۵- نحوه قرار گرفتن پتری دیش های حاوی قارچ *R. solani* روی پتری دیش های حاوی جدایه های قارچ *Trichoderm* (الف) و بررسی تأثیر ترکیبات فرار جدایه های *Trichoderma* لیتر در ممانعت از رشد میسیلیوم *R. solani* (ب)

A-E به ترتیب حاوی ترکیبات غیر فرار جدایه های THJ1، THJ2، THB، *T. virens* و *T. viride* وF کنترل (*R. solani*)



نمودار ۴- مقایسه میانگین های تأثیر ترکیبات فرار جدایه های *Trichoderma* در ممانعت از رشد *R. solani* در سه فاصله زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت

بحث

در روش کشت متقابل جدایه های *Trichoderma* به‌دلیل مکانیسم‌های مختلف بازدارندگی باعث محدود شدن رشد *R. solani* بر روی محیط کشت شدند. هم‌چنین تمام جدایه های قارچ آنتاگونیست قادر به رشد و پیشروی روی میسیلیوم قارچ عامل بیماری بودند. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری مربوط به جدایه THJ2 به میزان ۹۴/۷۲ درصد بوده است. این نتایج با نتایج تحقیقات Burmeister (2008) انطباق دارد. مکانیسم تأثیر جدایه های مختلف *Trichoderma* علیه عوامل بیماری‌زای گوناگون توسط محققین متعددی بررسی شده است (De Marco *et al*., 2003; Lorito *et al*., 1996). این افراد وجود پدیده هایی چون پارازیتیسم، آنتی بیوز، مضمحل نمودن و رقابت را به عنوان مکانیسم‌های آنتاگونیستی مهم *Trichoderma* متذکر شده اند. در تحقیق حاضر در بررسی‌های میکروسکوپی تقابل جدایه های *Trichoderma* و *R. solani* در ناحیه برخورد دو ریسه، رشد ریسه‌های جدایه های *Trichoderma* به موازات ریسه های *R. solani* ، پیچش ریسه ای، قطعه قطعه شدن ریسه ها و نفوذ ریسه ای مشاهده شد. پارازیتیسم فرایندی پیچیده و حاوی مراحل متعددی شامل شیمی گرایی، اتصال یافتن، پیچش، ترشح آنزیم های هیدرولیز کننده و نهایتاً تخریب و تجزیه سلول می‌باشد. در مورد نحوه تشخیص ریسه های *R. solani* بوسیله جدایه‌های *Trichoderma* دخیل بودن ترشح لکتین بوسیله ریسه میزبان و باند شدن آن با قند گالاکتوز در دیواره *Trichoderma* اثبات شده است. پیچش به دور ریسه میزبان و رشد به موازات آن را می توان به این موضوع نسبت داد (Lorito *et al*., 1996). در بررسی‌های مربوط به آنتی بیوز، دو آزمون بررسی اثر ترشحات فرار و غیر فرار جدایه های *Trichoderma* علیه *R. solani* انجام گرفت. این آزمون مشخص کرد که جدایه های مختلف *Trichoderma* از نظر تولید مواد فرار و غیر فرار و ممانعت از رشد قارچ میزبان متفاوتند. به همین دلیل بعضی از جدایه های *Trichoderma* تأثیر بیشتری در ممانعت از رشد *R. solani* داشتند. این نتایج با داده‌های Decon (1991) مطابقت دارد. در آزمایش بررسی ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *Trichoderma* مشخص شد که با اضافه شدن به محیط کشت Davet *et al.* (1981) به میزان ۵ و ۱۰ میلی لیتر از ترشحات مایع جدایه THJ2 ، رشد میسیلیومی قارچ عامل بیماری به ترتیب به میزان ۷۳/۸۳ و ۸۰/۵۲ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته است. این آزمایشات نشان داد استفاده از ترکیبات غیر فرار مکانیسم آنتاگونیستی مهم *Trichoderma harzianum* بر علیه بیمارگر می باشد. تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه های *Trichoderma* روی خاصیت تراوایی دیواره سلولی *R. solani* باعث خروج محتویات درون سلولی چون پروتئین ها، اسیدهای آمینه و قند ها از سلول‌های ریسه می گردد. گونه *T. virens* توانایی تولید گلیوتوکسین و گلیوویرین را داراست که آنتی بیوتیک های مهم بازدارنده

رشد *R. solani* می باشد (Harman, 2000; Lumsden *et al*., 1992). تریکودرمین آنتی بیوتیک محلول در کلروفرم می‌باشد که توسط *T. viride* به‌وجود می‌آید. این ترکیب که ساختاری ساده دارد، اولین بار توسط Godtfredsen & Vangdal (1965) گزارش شده است. گونه *T. harzianum* نیز دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک ها و آنزیم‌ها را علیه قارچ های مختلف تولید می‌کند. این گونه در برابر *R. solani* بتاگلوکاناز و کیتیناز تولید می‌کند که سبب لیز شدن ریسه میزبان می‌شود (Lorito *et al*., 1996). در آزمون تأثیر متابولیت های فرار در جلوگیری از رشد *R. solani* مشخص شد که بیشترین درصد بازدارندگی از رشد مربوط به جدایه THB به میزان ۷۳/۵۴ بوده است. نتایج تحقیقات در این زمینه مؤید تأثیر مهم ترکیبات این قارچ در کنترل عوامل بیماریزا است (Demarco *et al*., 2000; Lorito *et al*., 1996). با توجه به اینکه جدایه THB در بقیه آزمایش ها نسبت به جدایه های دیگر *T. harzianum* درصد بازدارندگی کمتری در رشد قارچ عامل بیماری نشان داده می توان چنین استنباط کرد که جدایه های مختلف هر کدام ممکن است در یک یا چند مکانیسم از مکانیسم های آنتاگونیستی به صورت قوی عمل می‌کنند در حالی‌که در مکانیسم های دیگر ضعیف می باشند. استالدئید، الکل ها، لاکتون ها، مشتقات ترپن، آلفاپیرون، لیپید ها و آمینو اسید ها از جمله ترکیبات فرار *Trichoderma* می‌باشد (Zeppa *et al*., 1991).

منابع

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*, 4th edition, John Wiley and sons Incorporated, New York.

Benitez, T., Rincon, A.M., Timon, M.C. & Cordon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4): 249-260.

Burmeister, L. 2008. *The antagonistic mechanisms employded by* Trichoderma harzianum *and their impact on the control of the bean rust fungus* Uromyces appendiculatus. Ph.D. Thesis. University of Hannover, Germany.

Davet, P., Artgues, M. & Martin, C. 1981. Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. *Agronomie*, 1(10):933-935 (In French with English abstract).

Deacon, J.W. 1991. Significance ecology in the development of biological agent against soilborn plant pathogens. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 5-20.

De Marco, J.L., Valadares-Inglis, M.C. & Felix, C.R. 2003. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* sp. isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches broom of cocoa. *Brasilian Journal of Microbiology*, 34(1): 33-38.

El- Katany, M.H., Gudelj, M., Robra, K.H., Elnaghy, M.A. & Gubitez, G.M. 2001. Characterization of Chitinase and endo ß-1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T21 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 562: 137-143.

Emma, W.G. & Simeon, O.K. 2008. The use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* as potential biocontrol agent against peanut microflora and their

effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. Biothecnology, *Asian Network for Scientific Information*, 1-9.

Godtfredsen, W.O. & Vangedal, S. 1965. Trichodermin, a new sesquiterpen antibiotic. *Acta Chimica Scandinavia*, 19: 1088-1102.

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

Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B. & Kubicek. C. 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 187:6382-6385.

Lumsden, R.D., Ridout, C.J., Vendemia, M.E. Harrison, D.J., Waters, R.M., & Walter, L.F. 1992. Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix by a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 1274-1280.

Mohammadi, S., Mansoori, B., Zamani Zade, H.R. & Heydari, A. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani* the casual agent of wet root rot of chickpea in greenhouse condition. *Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Vol. 2, Plant Disease and Weeds*, *Tabriz University, Tabriz, Iran*

Ogoshi, A. 1997. Ecology and pathogenecity of anastomosis and intera specific groups of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*, 25:125-143.

Papavizaz, G.O. 1995. *Trichoderma* biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23: 28-54.

Zeppa, G., Allegron, G., Barbeni, M. & Guarda, P.A. 1991. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. *Review of Plant Pathology,* 70: 4735.

Antagonistic Mechanisms of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of chickpea wet root rot disease

Sediqqe MOHAMMADI
Department of Plant Protection, College of Agriculture, Islamic Azad University, Shiraz branch, Shiraz, Iran (Corresponding author, Email: sediqqe.mohammadi@yahoo.com)
Bahram MANSOORI
Plant Pests and Diseases Reasearch Department, Fars Agricultural and Natural Resources Center, Zarghan, Fars, Iran
Hamid Reza ZAMANI ZADEH
Department of Plant Pathology, Islamic Azad University, Science and Reasearch Branch, Tehran, Iran
Asghar HEYDARI
Plant Diseases Reasearch Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

Antagonistic mechanisms of three isolates of *Trichoderma harzianum* (THJ1, THJ2 & THB), one isolates of *T. virens* and one isolates of *T. viride* were studied against wet root rot agent of Iranian chickpea, *Rhizoctonia solani*. In dual culture, all isolates of *Trichoderma* were able to affect the mycelial growth of *R. solani*. The isolate THJ2 had the highest percent of growth inhibition (72.77, 94.72 and 94.05 %) at three times interval. On the base of microscopic study *R. solani* was affected by *Trichoderma* through hyphal contact, hyphal penetration, hyphal coiling and hyphal fragmentation. The effect of Non Volatile Metabolites (NVM) of *Trichoderma* isolates on mycelial growth of *R. solani* indicated that the NVM of THJ2 inhibited the growth of pathogen more than other isolates at three times of measurement, using 5ml (62.34, 73.83 and 70.97 %) and 10 ml (68.04, 72.59 and 80.52 %). Volatile Metabolites (VM) of all *Trichoderma* isolates inhibited mycelial growth wherease *T. harzianum* (THB) had the highest effect at three times of measurement (68.02, 73.32 and 73.54 %).

Key words: Antagonistic mechanisms *Trichoderma* isolates, *Rhizoctonia solani*