Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۲۳ ، شماره ۳، سال ۱۳۸٦

ارزیابی جدایه‌هائی از جنس Trichoderma برای کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در اثر *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram

Evaluation of some Trichoderma Isolates for Biological Control of Crown and Root Rot of Wheat Caused by *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram

حسن‌رضا اعتباریان و مهرنوش محمدی‌فر

پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۱/۱۶

چکیده

اعتباریان، ح. ر.، و محمدی فر، م. ۱۳۸۶. ارزیابی جدایه‌هائی از جنس Trichoderma برای کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در اثر *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram **. نهال و بذر** ۲۳: ۳۵۶-۳۴۳.

چهار جدایه *Trichoderma harzianum* M T39، *T. harzianum* و *T. viride* (MO) ، *T. virens* DAR74290 برای کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم که عامل آن قارچ *Bipolaris spicifera* است مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایش‌های مربوط به کشت متقابل، درصد کاهش رشد قارچ عامل بیماری با جدایه‌های تریکودرمای فوق به ترتیب ۵۳/۳۹، ۳۷/۳۷، ۳۳/۱۱ و ٤۰/٤۰ درصد بود. مواد فرار قارچ‌های فوق توانست به ترتیب ۷۱/۵، ۵۲، ٦٦/۵ و ۵/٦٤ درصد از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری کند. در آزمایش‌های گلخانه‌ای در تیماری که قارچ *T. viride* (MO) به کار رفته بود میانگین درصد آلودگی بوته‌ها و شدت آلودگی ریشه به ترتیب صفر و ۱/۲۱ بود که از سایر گونه‌های تریکودرما مورد آزمایش بهتر توانست بیماری را کنترل کند ($P<0.01$) . در شرایط مزرعه (میکروپلات) شدت آلودگی در تیمارهائی که تریکودرمین، *T. viride* و *T. harzianum* به کار رفته بود بین ۰/۷۴ تا ۱/۶۳ متغیر بود، در صورتی که در تیمار شاهد آلوده شدت آلودگی ۳/۰۷ تعیین شد. جدایه‌های مورد آزمایش توانستند شدت آلودگی ریشه و درصدآلودگی طوقه را کاهش دهند و اثر آن‌ها با سم بنومیل تفاوت معنی‌دار نداشت.

واژه‌های کلیدی: گندم، جدایه‌های Trichoderma، قارچ‌های خاکری، کنترل بیولوزیکی.

این مقاله بر اساس نتایج به دست آمده از اجرای طرح ویژه توسعه کشور به شماره ۲۰۶۲۷ تهیه شده است .

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه‌های مختلف جنس‌های Drechslera ، Bipolaris و Helminthosporium سبب بیماری‌های سوختگی برگ و پوسیدگی ریشه و طوقه غلات می‌شوند که در مناطق مختلف اروپا، آمریکای شمالی، آسیا و استرالیا خسارت می‌زنند (Sivanesan, 1987 ؛ Zilinisky, 1983). در ایران گونه‌های *Bipolaris spicifera* و *B. australiensis* توسط محمدی‌پور و ارشاد (Mohammadipour and Ershad, 2002) از استان آذربایجان شرقی و گونه‌های *B. sorokiniana* و *B. spicifera* و *D. spicifera* نیز از استان آذربایجان غربی توسط ایرانی و ارشاد (Irani and Ershad, 2000) گزارش و فراوانی قارچ *Drechslera spicifera* در شهرستان‌های خوی، ماکو و نقده را به ترتیب ۱٤/٦ ، ۱۸/۲۸ و ۱٦/۲ برآورد کردند. عامل این بیماری روی ارقام گندم هیرمند، هارلوگ و جونز در منطقه جیرفت توسط رضوی و امینی (Razavi *et al*., 1996) گزارش شد. این قارچ به سنبله‌های گندم نیز حمله کرده و باعث سیاه شدن گلوم و گلومل می‌شود. در بوته‌های آلوده بندهای پائینی ساقه به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آیند. در سنبله‌هایی که آلودگی شدید داشته باشند دانه تشکیل نشده و یا چروکیده و لاغر می‌شوند. لکه‌های روی برگ کوچک، طویل، لکه‌ها مایل به قرمز با حاشیه قرمز تیره و بالاخره برگ‌ها می‌میرند و خشک می‌شوند. در مرحله گیاهچه گیاه کوتاه مانده، توسعه ریشه کم و بالاخره گیاه پژمرده و می‌میرد (Nyvall, 1989). گونه مذکور از ریشه و برگ بوته‌های جو در منطقه گرگان و گنبد نیز جداسازی شده است (Golzar, 1993). در بررسی بیماری‌های ذرت از این قارچ به عنوان عامل پوسیدگی ساقه نام برده شده است (Mehrian, 1994). با توجه به اهمیت بیماری و نظر به این که سموم شیمیایی آلودگی زیست محیطی را به همراه دارند، امروزه مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های غیر بیماریزا توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است.کوجوک وکیوانس (Kucuk and Kivance, 2003) جدایه‌هایی از جنس Trichoderma را از ۳۱ نمونه خاک جداسازی وخالص کردند و اثر مفید برخی از آن‌ها را روی تعدادی ازعوامل بیماری‌های گیاهی منجمله *Bipolaris sorokiniana* گزارش کردند. پریلو و همکاران (Perello *et al*., 2003) اثر مفید پنج جدایه از گونه *T. harzianum* و دو جدایه از *T. konnigi* را برای کنترل قارچ *Drechslera tritici-repentis* گزارش کردند. صالح پور و همکاران (Salehpour *et al*., 2005) نشان دادند که تیمار بذر با (MO) *T. viride* و *T. viride* T112 به نحو قابل ملاحظه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری پوسیدگی ریشه (*Bipolaris sorokiniana*) را کاهش دادند. نظر به این که اطلاعات بسیار کمی در مورد اثر قارچ‌های جنس تریکودرما در کنترل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم وجود دارد، در این بررسی اثر چند گونه Trichoderma در کنترل بیولوژیکی این بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های Trichoderma و عامل بیماری

در این بررسی از جدایه‌های *Trichoderma harzianum* T39 که از محصول تجاری Trichodex جدا شده بود (Etebarian *et al*., 2000)، *T. virens* DAR74290 با نام قبلی (*Gliocladium virens* DAR74290) که از دکتر آیلین اسکات دپارتمان بیولوژی مولکولی کاربردی دانشگاه آدلاید استرالیا و همچنین از جدایه‌های M *T. harzianum* و *T. viride* (MO) که از دکتر حمید روحانی، دانشگاه بوعلی سینا همدان دریافت شده بود استفاده شد.

جدایه‌های *Bipolaris spicifera* از دکتر منصوره میرابوالفتحی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی دریافت و در این بررسی استفاده شد. برای اطمینان از بیماریزائی قارچ عامل بیماری، قارچ روی دانه‌های گندم اتوکلا شده تکثیر و سپس به نسبت ۱۵ گرم به هر کیلوگرم خاک استریل شده اضافه شد. بیست بذر رقم آزادی که در هیپوکلریت سدیم به مدت سه دقیقه سترون شده بودند در گلدان کاشته شدند و گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ماه‌های اردیبهشت و خرداد نگهداری شدند. برای آزمایش بیماریزائی چهار گلدان به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و چهار گلدان نیز با جدایه قارچ مایه‌زنی گردید.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های Trichoderma روی قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه

الف- کشت متقابل

در این آزمایش از چهار جدایه *Trichoderma harzianum* M، *T. harzianum* T39، *T. viride* (MO) و *T. virens* DAR74290 استفاده شد. در یک تشتک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA قرصی به قطر ٦ میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه Trichoderma در محیط کشت PDA به فاصله یک سانتی‌متر از لبه تشتک و قرصی از قارچ عامل بیماری به قطر ٦ میلی‌متر در طرف دیگر تشتک پتری قرار داده شد (Dennis and Webster, 1971b). نظر به این که عامل بیماری کندتر از قارچ تریکودرما رشد می‌کند، قارچ عامل بیماری دو روز قبل از آنتاگونیست کشت داده شد. در تشتک پتری شاهد به جای تریکودرما یک قرص از محیط کشت PDA قرار گرفت. این آزمایش با استفاده از طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

قطـر پرگنـه عامـل بیمـاری هـر روز تـا ۱۵ روز انـدازه‌گیـری و مـساحت پرگنـه محاسـبه و درصد کاهش رشد با مقایسه با شاهد تعیین شد.

ب - اثر متابولیت‌های فرار Trichoderma در جلوگیری از رشد قارچ *B. spicifera*

در این آزمایش از جدایه‌های تریکودرما که در قسمت کشت متقابل ذکر شد استفاده گردید. جدایه‌های تریکودرما ٤٨ ساعت قبل از قارچ عامل بیماری در تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA کشت داده شدند و سپس در وسط تشتک دیگر حاوی PDA یک قرص به قطر ۹ میلی‌متر که از حاشیه جوان کشت دو روزه قارچ *B. spicifera* برداشت شده بود کشت شد. در شرایط سترون، درب تشتک پتری را برداشته و تشتک‌های حاوی تریکودرما و قارچ عامل بیماری بر روی هم قرار داده شدند و اطراف آن با نوار پارافیلم بسته شد تا ارتباط داخل تشتک‌های پتری با محیط خارج کاملاً قطع شود. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. در تشتک‌های شاهد به جای تریکودرما فقط یک قرص از محیط کشت PDA قرار داده شد. مساحت پرگنه قارچ عامل بیماری هر ٢٤ ساعت یک بار اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد با شاهد مقایسه شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار انجام شد.

بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با قارچ *B. spicifera* در گلخانه

برای تهیه مایه تریکودرما مقداری گندم مورد نیاز پخته، آب اضافی آن کاملاً گرفته شد و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در دو روز متوالی در اتوکلاو سترون شدند. محتویات ارلن‌ها با جدایه‌های تریکودرما مایه‌زنی شدند. در مورد مایه قارچ *Bipolaris spicifera* نیز به صورت فوق عمل شد. ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت نگهداری و سپس در شرایط آزمایشگاه در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه هفته نگهداری شدند. خاک مورد نیاز که از مزرعه تهیه شده بود به نسبت ۳ به ۱ با کود دامی مخلوط و سپس سترون شد. گلدان‌هائی به قطر ۱۵ سانتی‌متر انتخاب و به میزان یک کیلوگرم خاک به آن‌ها اضافه شد. مایه قارچ عامل بیماری به ازاء هر کیلوگرم خاک ۱۵ گرم کاملاً مخلوط شد و از مایه تریکودرما نیز به نسبت ۲۰ گرم به خاک اضافه گردید. در هر تکرار ۱۵ عدد بذر از رقم گندم آزادی کاشته شد و روی بذرها با ماسه سترون به قطر یک سانتی‌متر پوشیده شد. قبل از کاشت بذرها به مدت چهار دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه در ماه‌های دی، بهمن در درجه حرارت حدود ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شدند. تیمارهای مورد آزمایش عبارت بودند از:

شاهد سالم

شاهد آلوده به *B. spicifera*

T. harzianum M+ *B. spicifera*

T. harzianum T39+*B. spicifera*

T. viride (MO) +*B. spicifera*

T. virens DAR74290+ *B. spicifera*

T. harzianum T39

T. harzianum M

T. viride (MO)

T. virens DAR 74290

تعداد بوته‌های آلوده هر ده روز یک بار شمارش و درصد بوته آلوده نسبت به شاهد سالم تعیین شد. در ٦٠ روز بعد از کاشت ریشه‌های هر گلدان با آب شستشو داده شد و از روش ارزیابی اشر و شیپتون (Asher and Shipton, 1981) با تغییراتی استفاده شد. بدین ترتیب که برای عدم وجود زخم و لکه روی ریشه‌ها عدد صفر، یک یا دو زخم روی ریشه عدد یک، وجود لکه در کمتر از ٥ درصد ریشه عدد ٢، وجود لکه در بیش از ٥٠ درصد ریشه‌ها عدد ٣، سیاه‌شدگی طوقه عدد ٤ و برای مرگ کامل گیاه یا نزدیک به مرگ عدد ٥ در نظر گرفته شد.

تعیین جمعیت تریکودرما در مایه تلقیح در آزمایش گلخانه‌ای

یک گرم از مایه تریکودرما در ٩ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و با شیکر به مدت یک دقیقه بهم زده شد و رقت‌های 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه شد. برای هر رقت، سه تشتک پتری حاوی محیط کشت اختصاصی پیتون رزبنگال (Elad *et al*., 1981) در نظر گرفته شد و از هر رقت یک میلی‌لیتر به هرتشتک پتری اضافه شد و کاملاً در سطح تشتک پخش گردید. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بعد از ٤٨ ساعت تعداد پرگنه‌های ایجاد شده شمارش شد.

بررسی اثر Trichoderma روی بیمارگر در شرایط مزرعه (میکروپلات)

بیماریزایی قارچ *Bipolaris spicifera* روی گیاهچه‌های گندم رقم پیشتاز در میکروپلات انجام شد. مقدار ٥٠٠ گرم بذر گندم به مدت ١٦ ساعت داخل آب خیسانده، سپس آب اضافی را گرفته و بذرهای خیس خورده دوبار به فاصله ٢٤ ساعت و هر بار ٢٠ دقیقه در دمای ١٢٠ درجه سانتی‌گراد سترون شدند. پس از سرد شدن چند قطعه از کشت سه روزه قارچ *B. spicifera* به هر ارلن اضافه شد و در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای رشد یکنواخت قارچ در روی سطح گندم، ارلن‌ها هر چند روز یک بار تکان داده شد (Wildermuth and McNamara, 1987).

برای اثبات بیماریزایی، مایه قارچ که به روش بالا تهیه شده بود به نسبت وزنی ١/٥ درصد با مخلوطی از خاک، ماسه و کود حیوانی (١:١:١) سترون مخلوط و داخل گلدان‌ها ریخته شد. تعداد ده بذر گندم که با محلول سفیدکننده

www.SID.ir

Archive of SID

تجارتی ۱۰ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سپس سه نوبت با آب مقطر شستشو داده شده بود در گلدان‌ها کاشته شد. گلدان‌ها به گلخانه با دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و هر ۳-۲ روز یک بار آبیاری شدند. برای تیمار مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری تعداد چهار گلدان و برای شاهد هم همین تعداد در نظر گرفته شد. پس از گذشت ٦-۵ هفته گیاهچه‌ها از خاک خارج و علایم بیماری روی ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

برای ارزیابی تأثیر آنتاگونیست‌ها در شرایط میکروپلات (مزرعه) از روش تیمار خاک و از بذر گندم رقم پیشتاز استفاده شد. مایه قارچ *B. spicifera* با روش فوق تهیه و به نسبت ۱/۵ درصد وزنی با خاک مزرعه (مخلوطی از خاک مزرعه، کود حیوانی به نسبت ۲ به ۱) مخلوط شد.

برای تکثیر جدایه‌های تریکودرما نیز از روش فوق استفاده شد. جدایه‌های تریکودرما به نسبت ۲ درصد وزنی با خاک مزرعه مخلوط شد و برای هر میکروپلات سه گلدان به قطر ۲۳ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. سی عدد بذر گندم که قبلاً با محلول سفیدکننده تجارتی ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شده بود در هر گلدان کاشته و آبیاری مرتب انجام شد. تاریخ کاشت اواخر اسفند ماه و برداشت در خرداد ماه بود.

قارچ‌کش بیولوژیکی تریکودرمین بی (Trichodermin B) با ماده مؤثر *T. harzianum* (CFU=10^7) که از شرکت تلفیق دانه تهیه شده بود به صورت مایه‌زنی به خاک و به نسبت ۵۰ گرم برای هر مترمربع با خاک مخلوط و به عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد. قارچکش بنومیل ۵۰ درصد به نسبت ۲ گرم در هزار گرم بذر نیز به عنوان یک تیمار برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش در طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ١٤ تیمار و سه تکرار انجام شد. برای ارزیابی از روش اشر و شیپتون (Asher and Shipton, 1981) استفاده شد.

تعیین جمعیت قارچ عامل بیماری وتریکودرما مایه‌زنی شده به خاک و در پایان آزمایش‌ها

جهت تعیین جمعیت قارچ عامل بیماری و جدایه‌های تریکودرما از هر کدام از ارلن‌های حاوی مایه عامل بیماری و تریکودرما ده گرم مایه برداشته و تمام آن‌ها با هم مخلوط شدند. یک گرم مایه آلوده‌کننده به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و بر روی شیکر قرار داده شد. از رقت 10^6 تهیه شده ۰/۵ میلی‌لیتر روی محیط کشت PDA پخش و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، پس از تشکیل پرگنه اقدام به شمارش آن‌ها شد. در پایان آزمایش‌ها نیز پس از جداسازی گونه‌های تریکودرما از خاک با استفاده از روش Elad *et al.* (1981)، جمعیت گونه‌های تریکودرما (CFU) در خاک شمارش شد.

تجزیه آماری

در آزمایش‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی از طرح کامل تصادفی در آزمایش مزرعه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

(میکروپلات) ازطرح بلوک‌های کامل تصادفی استفاده شد. درصد کاهش رشد با توجه به مساحت پرگنه با مقایسه با شاهد تعیین و درصدهای به دست آمده با استفاده از فرمول $\text{ArcSin}\sqrt{\%}$ تبدیل شدند و میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن مقایسه شدند (Little and Hills, 1978).

نتایج و بحث

اثر جدایه‌های تریکودرما روی قارچ *B. Spicifera* در شرایط آزمایشگاه

در کشت متقابل جدایه‌های تریکودرما، به احتمال ۹۹/۹ درصد جدایه‌های تریکودرما از نظر بازداری از رشد قارچ عامل بیماری *(B. spicifera)* با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. با مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) ملاحظه شد که M *T. harzianum* بیشتر از سایر گونه‌ها رشد قارچ عامل بیماری را کاهش داد. درصد کاهش رشد توسط جدایه‌های تریکودرما در این آزمایش بین ۳۳ تا ۵۳ درصد متغیر بود. نتایج آزمایش‌های کشت متقابل با نتایج حاصل از بررسی اثر دو جدایه *T. virens* DAR74290 و *T. harzianum* T39 روی *P. erythroseptica* مطابقت داشت (Etebarian *et al*., 2000). کاهش رشد قارچ عامل بیماری ممکن است در اثر ترشح مواد بازدارنده باشد به عنوان مثال در تحقیقات انجام شده توسط نالمپنگ (Nalampang, 1994) مشخص شد که جدایه *T. virens* DAR74290 توانائی تولید Gliotoxin را دارا است. به نظر می‌رسد Gliotoxin مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک بازدارنده رشد *Pythium ultimum* و *Rhizoctonia solani* باشد که توسط جدایه‌ای از *T. virens* در کشت‌های بدون خاک تولید می‌شود (Lumsden *et al.,*1992). آنتی‌بیوتیک دیگری که *T. virens* تولید می‌کند Diktopiperazine یا Gliovirin است (Lumsden *et al.,* 1992؛ Howell and Stipanovic, 1983). همچنین قارچ *T. virens* آنزیم Endochitinase تولید می‌کند که با Gliotoxin در ممانعت از جوانه‌زنی کنیدی‌های قارچ *Botrytis cinerea* اثر تشدیدکنندگی دارد (Dipietro *et al.,* 1993).

از نظر مواد فرار گونه‌های *T. harzianum* و *T.viride* به ترتیب با ۷۱/۵ و ۶۶/۵ درصد کاهش رشد از سایر قارچ‌های مورد آزمایش مؤثرتر بودند.تأثیرمتابولیت‌های فرار (Volatile) جدایه‌های تریکودرما روی رشد میسلیوم *B. spicifera* بین ۵۲ تا ۷۱ درصد متغیر بود. نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج سایر پژوهشگران (Denis and Webster, 1971a؛ Zeppa *et al.,* 1991) مطابقت داشت. دنیس و وبستر (۱۹۷۱) استالدئید را به عنوان عمده‌ترین ترکیب در متابولیت‌های فرار *T. viride* مشخص کرده‌اند و همچنین مشتقات غیرمحتمل را در ترشحات فرار جدایه‌های *T. viride* جدا نمودند ولی وجود دی‌اکسیدکربن یا آمونیاک را در متابولیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

فرار تریکودرما غیرمتحمل دانستند. متابولیت‌های فرار متعددی شامل لاکتون‌ها، الکل‌ها، و فسفات آلفاپیرون در شرایط کشت متفاوت از *T. viride* به دست آمده‌اند(Zeppa *et al.*, 1991). همچنین مواد فراری مانند لیپیدها و امینواسیدها از *T. hahrzianum* و *T. hamatum* جدا شده است (Zeid *et al.*, 1998).

جدول ۱- درصد کاهش رشد قارچ *B. spicifera* توسط ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های تریکودرما در روش کشت متقابل و مواد فرار

Table 1. Percentage of growth inhibition of *B. spicifera* by Volatile and non volatile compounds of Trichoderma isolates

تیمار Treatment	مواد غیرفرار Non votatile compounds	مواد فرار Volatile compounds
T.harzianum M	53.39 a	71.50 a
T. harzianum T39	37.37 c	52.00 d
T. viride (MO)	33.11 c	66.50 b
T. virens DAR74290	40.40 bc	64.54 ab

اختلاف معنی‌دار بین میانگین ها در هر ستون (P < ۰/۰۵) با حروف غیرمشابه نشان داده شده اند (آزمون چنددامنه ای دانکن).

Significant differences are denoted by different letters within each column according to Duncan's Multiple Range Test($p<0.05$).

تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری در گلخانه و مزرعه

نتایج اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری در گلخانه درجدول ۲ ملاحظه می‌شود. شدت آلودگی در ریشه در تیمارهای شاهد سالم صفر و در تیمارهای *T. harzianum* T39+*B. spicifera* و *T. viride* (MO)+*B. spicifera* به ترتیب ۱/۹۲ و ۱/۲۱ بودکه با شاهد آلوده تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۲).

در تیمار شاهد آلوده به *B. spicifera*، درصد بوته‌های آلوده ۳۳/٤ درصد بود در صورتی که درصد آلودگی بوته در تیمار *B. spicifera*+*T. viride*(MO) صفر بود.

بیماریزایی جدایه *B. spicifera* روی گیاهچه‌های گندم رقم پیشتازکه در آزمایش میکروپلات انجام شد به اثبات رسید. علایم بیماری ۶-۵ هفته بعد از مایه‌زنی به صورت سیاه شدن ریشه و طوقه ظاهر شد. قارچ عامل بیماری از ریشه‌های تغییر رنگ یافته جدا شد. همان طوری که از جدول ۳ استنباط می‌شود. در شرایط میکروپلات شدت آلودگی ریشه و درصد آلودگی در تیمار شاهد آلوده به ترتیب ۳ و ۷۹/۹۵ درصد بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. ضمناً در بیشتر حالات جدایه‌های تریکودرما توانستند همانند بنومیل بیماری را کنترل کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در شرایط گلخانه

Table 2. Effect of Trichoderma isolates on Control of crown and root rot of wheat in greenhouse condition

تیمارها Tratments	درصد بوته‌های آلوده % Infected plants	شدت آلودگی ریشه Root infection severity
Healthy control	0.00 b	0.00 e
T. harzianum M	0.00 b	0.00 e
T. harzianum T39	0.00 b	0.00 e
T. viride (MO)	0.00 b	0.00 e
T. virens DAR 74290	0.00 b	1.00 de
B. spicifera (Pathogen control)	33.24 a	2.83 a
T. harzianum M+*B. spicifera*	31.10 a	1.77 ab
T. harzianum T39+*B. spicifera*	31.70 a	1.92 bc
B. spicifera+*T. viride* (MO)	0.00 b	1.21 cd
B. spicifera+*T. virens* DAR74290	29.58 a	1.89 ab

اختلاف معنی‌دار بین میانگین ها در هر ستون ($P < ۰/۰۵$) با حروف غیرمشابه نشان داده شده اند (آزمون چنددامنه ای دانکن).

Significant differences are denoted by different letters within each column according to Duncan's Multiple Range Test($p<0.05$).

جدول ۳- اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در شرایط مزرعه (میکروپلات)

Table 3. Effect of Trichoderma isolates on control of crown and root rot of wheat under field condition (microplot)

تیمارها Tratments	شدت آلودگی ریشه Root infection severity	درصد طوقه آلوده % Infected crown
Pathogen control	3.07 a	79.95 a
Trichodermin B + *B. spicifera*	1.63 ab	53.12 b
B. spicifera + *T. virens* DAR74290	0.93 bc	29.12 cd
B. spicifera + *T. harzianum T39*	0.79 bc	28.64 cd
B. spicifera + *T. harzianum M*	0.79 bc	39.24 bc
B. spicifera + *T. virens*	0.74 bc	27.38 cd
B. spicifera + Benomyle	0.571 c	18.99 de
Trichodermin B	0.39 c	18.25 de
T. harzianum T39	0.371 c	9.18 ef
Benomyle (0.02% seed treatment)	0.34 c	12.70 de
T. virens DAR74290	0.24 c	12.48 de
T. harzianum M	0.19 c	2.85 f
T. viride	0.170 c	12.68 de
Healthy control	0.10 c	5.18 de

اختلاف معنی‌دار بین میانگین ها در هر ستون ($P < ۰/۰۵$) با حروف غیرمشابه نشان داده شده اند (آزمون چنددامنه ای دانکن).

Significant differences are denoted by different letters within each column according to Duncan's Multiple Range Test($p<0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

در ایـن بررسـی هنگـامی کـه گونـه‌هـای تریکودرما در شرایط گلخانـه بـه خـاک گلـدان اضافه شـد قـارچ (MO) *T. viride* توانـست بـه طور کامل بیماری را کنتـرل کندبـه طـوری کـه درصد آلودگی بوته صفر و شـدت آلـودگی در ریشه ۱/۲۱ بود.

در مـورد اثـر آنتاگونیـستی گونـه‌هـای Trichoderma درکنترل *Bipolaris spicifera* در گلخانه و در مزرعه اطلاعات بسیار کمـی در دنیا وجود دارد. در یک بررسی، شـدت بیمـاری پوسیدگی معمولی ریشه گندم که توسـط قـارچ *Bipolaris sorokiniana* ایجاد می‌شود توسـط *Gliocladium roseum* ۶۰ درصـد کـاهش یافـت (Knudsen *et al.,* 1995). بررسـی‌هـای پرلو و همکاران (Perello *et al.*, 2001) نـشان دادنـد کـه *T. harzianum* و *T. viride* باعـث کاهش شدت بیماری پوسـیدگی معمـولی ریـشه در شرایط مزرعه شـده و افـزایش محـصول بـین ۶۲-۱۰ درصد شد.

جدایه‌های Trichoderma مـورد اسـتفاده در ایـــن بررســـی در آزمـــایش دیگـــری در کنتـــرل پوســـیدگی معمـــولی ریـــشه گنـــدم (*Bipolaris sorokiniana*) نیـز مـؤثر بـود و باعث افزایش وزن خشک اندام هـوایی و ریـشه گیاه گندم شده‌اند (Salehpour *et al*., 2005). گونه‌هـای *T. harzianum* و *T. viride* بـه کـار برده شده در این بررسـی روی بیمـاری سیاهک معمولی پنهان گندم نیـز مـؤثر گـزارش شـده‌انـد (Etebarian *et al.*, 2002). از آن جـائی کـه برخـی از اسـترین‌هـای *Streptomyces* sp.، *Bacillus subtilis*، *P.fluorescens* و *B. pumillus* در کـاهش شـدت بیمـاری پوســـیدگی معمـــولی ریـــشه گنـــدم (*B. sorokiniana*) و کـاهش بیمـاری پـاخوره گنـــدم و در افـــزایش ارتفـــاع گیـــاه، وزن خـــشک انـــدام هـــوائی و ریـــشه مـــؤثر بـوده‌انـد (Mohammadi *et al.*, 2005؛ Salehpour, 2004؛ Sari *et al*, 2006) بنابراین با تحقیقات بیشتر و در صورت امکـان و با تلفیق آن‌هـا مـی‌تـوان بـه کنتـرل بیمـاری‌هـای مختلف ریشه دست یافت.

جمعیت قارچ عامل بیماری (CFU) و تریکودرما در مایـه آلوده‌کننده در آزمایش گلخانه و مزرعه (میکروپلات)

جمعیت عامـل بیمـاری و آنتاگونیـست‌هـا در مایه آلوده کننده و در زمان برداشـت در جـدول ۴ نشان داده شده است.

جمعیـت تریکودرمـا در خـاک (CFU/g) در آزمـــایش گلخانـــه‌ای در هنگـــام کاشـت در جدایـه‌هـای M *T. harzianum*، T39 *T. harzianum*، *T. viride* و *T. virens* بین $3x10^7$ تا $1x10^9$ متغیر بود که برای دسـتیابی بـه کنتـرل کـافی بـود. آدمـز (Adams, 1990) معتقـد اسـت کـه حـداقل جمعیـت 10^5 CFU/g تریکودرمـا بـرای دسـتیابی بـه کنتـرل در خـاک است. پژوهشگران دیگـری مقـادیر ۵ و ۱۰ گـرم مایه تریکودرمـا را بـه همـراه سـبوس بـه خـاک اضـــافه کردنـــد و پـــس از ۲٤ روز جمعیـــت تریکودرما را تعیین و نتیجه گرفتند کـه جمعیـت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- جمعیت آنتاگونیست‌ها و عامل بیماری(CFU) در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای (میکروپلات)

Table 4. Population (CFU) of Trichoderma and pathogen in greenhouse and field experiments (Microplot)

جدایه ها Isolates	مایه قارچ در آزمایش گلخانه Inoculum in greenhouse test	مایه قارچ در آزمایش میکروپلات Inoculum in microplot test	CFU/g بعد از برداشت در خاک میکروپلات CFU at harvesting time in microplot
Bipolaris spicifera	–	7.89×10^7	–
T. viride (MO)	1×10^9	7.53×10^7	1.5×10^7
T. harzianum T39	3×10^7	7.53×10^7	4.5×10^5
T. harzianum M	9×10^7	7.77×10^7	1.35×10^6
T. virens DAR74290	9×10^8	7.55×10^7	1.35×10^7

تریکودرما در دو تیمار فوق از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و افزودن مقدار اولیه بیشتر، تأثیر چندانی در جمعیت تریکودرما در طول رشد گیاه ندارد (Sivan and Chet, 1986).

در این بررسی جمعیت جدایه‌های تریکودرما در آزمایش میکروپلات کاهش جزئی یافت (جدول ۴). اشرفی‌زاده و همکاران (Ashrafizadeh *et al*., 2005) در بررسی اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پژمردگی خربزه نیز کاهش نسبی آنتاگونیست را در خاک مشاهده نمودند.

برای استفاده بهتر از عوامل آنتاگونیست شناخت کافی بیولوژی این عوامل، بستر مناسب و همچنین اثر متقابل آن‌ها ضروری است (Clark, 1965؛ Garrett, 1970). عوامل بیوکنترل استفاده شده نباید اثر سوئی روی گیاه، انسان، دام و محیط زیست داشته باشند. فرموله کردن، ثبت و تولید تجارتی این عوامل از اهمیت خاصی برخوردار است و در نهایت کنترل عوامل بیماریزای خاکزاد با مواد بیولوژیک می‌تواند راه مناسبی برای کاهش مصرف سموم، حفظ محیط زیست و سلامت غذای انسان باشد.

References

Adams, P. B. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology 28: 59-72.

Asher, M. J. C., and Shipton, P. J. 1981. Biology and Control of Take-all. Academic Press, New York. 538 pp.

www.SID.ir

Archive of SID

Ashrafizadeh, A., Etebarian, H. R., and Zamanizadeh, H. R. 2005. Evaluation of Trichoderma isolates for biocontrol of fusarium wilt of melon. Iranian Journal of Plant Pathology 41:39-57.

Clark, F. E. 1965. The concept of competition in microbial ecology pp. 339-345. In: Baker, K. F., and Synder, W. C. (eds.). Ecology of Soilborne Plant Pathogen. University of California Press. Brekely.

Dennis, C., and Webester, S. 1971a. Antagonistic properties of species group of Trichoderma. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-48.

Dennis, C., and Webester, J. 1971b. Antagonistic propertics of species groups of Trichoderma. III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological. Society 57: 363-369.

Dipierto, A., Lorito, M., Hayes, C. K., Broadways, R. M., and Harman, G. E. 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with Gliotoxin. Phytopathology 83: 308-313.

Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica 9: 59-67.

Etebarian, H. R., Khodayegan, P., Rouhani, H., and Torabi, M. 2002. Evaluation of Trichoderma isolates for biological control of common bunt. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah. p. 24.

Eetebarian, H. R., Scott, E. S., and Wicks, T. J. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agente of *Phytophthora erythroseptica.* European Journal of Plant Pathology 106: 329-337.

Garrett, S. D. 1970. Pathogenic Root-infecting Fungi. Cambridge University Press, London and New York.

Golzar, H. 1993. Barley brown spot. Study on importance, distribution of species and its transmission in the Gorgan area. Iranian Journal of Plant Pathology 29(1-2): 91-102.

Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum.* Canadian Journal of Microbiology 29: 321-24.

www.SID.ir

Archive of SID

Irani, H., and Ershad, D. 2000. Identification and prevalence of *Bipolaris* species the causal agents of foot and root rot of winter wheat in west Azarbaijan. Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan. p. 221.

Little, T. M., and Hills, F. J. 1978. Agricultiral Experimentation, Design and Analysis. John Wiley and Sons, New York, USA. 350 pp.

Knudsen, J. M., Hockenhull, J., and Jensen, D. F. 1995. Biocontrol of seedling disease of barley and wheat caused by *Fusarium culmurum* and *Bipolaris sorokiniana.* Effect of selected fungal antagonists on growth and yield component. Plant Pathology 44: 467- 477.

Kucuk, C., and Kivanc, M. 2003. Isolation of *Tichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. Turkish Journal of Biology 27: 247-253.

Lumsden, R. D., Ridout, C. J., Vendemia, M. E., Harrison, D. I., Waters, R. M., and Walter, J. F. 1992. Characterisation of major secondary metabolites produced in soilless by a fermulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Canadian Journal of Microbioogy 38: 1274-1280.

Mehrian, F. 1994. Leaf spot disease of corn in Mazandaran and Gillan provinces of Iran. MSc. Thesis. University of Tehran.

Mohammadi, K. 2004. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by antagonistic bacteria isolates from wheat rhizosphere .MSc. Thesis Abourayhan Campus ,The University of Tehran.

Mohammadipour, M., and Ershad, D. D. 2002. Identification of *Bipolaris* species the causal agent of root and foot rot of wheat in East Azarbaijan. Proceedings of the15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah. p. 23.

Nalampang, A. 1994. Study on interaction between *Sclerotium rolfsii* Sac. and selected antagonists. PhD Thesis. The University of Adelaide, South Australia.

Nyvall, R. F. 1989. Field Crop Disease Handbook, Second edition. Published by Van Nostrand Reinhold, New York. 817 pp.

Perello, A., Simon, M. R., Arambarri, A. M., and Cardo, C. A. 2001. Greenhouse screening of the saprophytic resident microflora for control of leaf spot of wheat (*Triticum aestivum*). Phytoparasitica 29: 341-351.

www.SID.ir

Archive of SID

Razavi, M., Amini, J., and Jalayani, N. 1999. Pathogenicity of *Drechslera spicifera* on wheat cultivars in Jiroft area. Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress Karaj. p. 30.

Salehpour, M. 2004. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris*, *sorokiniana*) by Trichderma and streptomyces isolates. MSc Thesis Abourayhan Campus, University of Tehran.

Salehpour, M., Etebarian, H. R., Roustaei, A., Khodakaramian, G., and Aminian, H. 2005. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by Trichoderma isolates. Plant Pathology Journal 4: 85-90.

Sari, E., Etebarian, H. R., Roustaei, A., and Aminian, H. 2006. Biological control of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* on wheat with some isolates of *Pseudomonas fluorescens*. Pakistan Journal of Biological Sciences (in press).

Sivan, A., and Chet, I. 1986. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon on by *Trichoderma harzianum.* Phytopathology 116: 39-47.

Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera Exserohilium and their telemorph, C. A. B. International Mycological Institute. UK. 261pp.

Wildermuth, G. B., and McNarama, R. B. 1987. Susceptibility of winter and summer crop to root and crown infection by *Bipolaris sorokiniana* .Plant Pathology 36: 481-491.

Zeid, A. H. S. A., Saleh, M. M., Haggag, M. Y. S., and Mohamed, R. S. 1998. Study of the volatile lipids and aminoacids content of *Trichoderma harzianum* Rifai and *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain and their antifungal activity. Review of Plant Pathology 80(3): 2216.

Zeppa, G., Allergon, G., Barbeni, M., and Guarda, P. A. 1991. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. Review of Plant Pathology 70(8): 4735.

Zilinisky, F. J. 1983. Common Disease of Small Grain Cereals. CIMMTY. Mexico. 141pp.

آدرس نگارندگان:

حسن رضا اعتباریان و مهرنوش محمدی فر- گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، صندوق پستی ۴۱۱۷-۱۱۳۶۵، پاکدشت.

www.SID.ir