

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

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

### چکیده

با توجه به قابلیت بالای قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماریزا، جداسازی و شناسایی گونه های تریکودرمای خزانه های توتون استان مازندران انجام شد. جداسازی قارچ ها با استفاده از محیط کشت انتخابی داوه و محیط های عمومی CMA, PDA, WA به روش کشت سوسپانسیون خاک انجام شد. بعد از خالص سازی نمونه های جدا شده، با استفاده از ویژگی های ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی اندام هایی از قبیل کنیدیوفورها، فیالیدها و فیالوسپورها براساس کلیدهای شناسایی معتبر اقدام به شناسایی گونه ها گردید. از میان ۷۲ نمونه خاک، ۶۰ جدایه به عنوان جنس تریکودرما شناسایی شد. قارچ های آنتاگونیست در کشت متقابل (Dual culture) روی محیط کشت PDA باعث کاهش و جلوگیری از رشد قارچ بیماریزا (*Sclerotinia sclerotiorum*) شدند. میزان بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ بیماریزا با گونه های مختلف تریکودرما یکسان نبود و حداقل ۵۱/۲۵ و حداکثر ۹۴ درصد ثبت گردید. گونه های مختلف تریکودرما که شناسایی شده شامل: *T. harzianum*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum* و *T. ghanense*, *T. koningii*, *T. virens*, *T. atroviride* بودند. بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از بیماری پوسیدگی یقه توتون در گلخانه نشان داد که جدایه های Tr6a, Tr9b, Tr102 و Tr29-1 به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ۵۶/۲۵ و ۶۸/۷۵ درصد بیماری را کنترل کردند. همچنین این جدایه ها موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک اندام های هوایی بوته در حضور قارچ عامل بیماری شدند.

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

\* نویسنده رابط: E-mail:sajjadi\_a@yahoo.com

## مقدمه

بیماری حاصل از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De bary در گیاهچه های توتون (*Nicotiana tabacum*)، پوسیدگی یقه<sup>۱</sup> نامیده می شود، علائم بیماری پوسیدگی یقه در طی دوره رشد گیاه چه ها در خزانه به صورت پوسیدگی نرم قهوه ای رنگی در ساقه ایجاد می شود که تا برگ ها توسعه می یابد و گیاهچه ها به سرعت نابود می شوند (۲۸، ۲۹ و ۳۰). در دوره های بالا بودن رطوبت نسبی، میسلیم کرکی سفیدی روی گیاهان پوسیده و بعد از مدتی اسکروت های سیاه رنگ دیده می شود. اسکروت ها با ایجاد اندام نعلبکی شکلی به نام آپوتسیوم<sup>۲</sup>، آسکوسپوره های هوازی تولید می کنند که در انتشار بیماری نقش مهمی دارد. به خصوص آسکوسپوره های تولید شده از آپوتسیوم های مزارع کاهو، کلزا، آفتابگردان و غیره در آلودگی اولیه خزانه های توتون نقش مهمی دارد (۶ و ۱۲). این بیماری از تمام مناطق توتون کاری دنیا گزارش شده است و بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی خسارت وارد می کند که در خزانه ها بروز نموده و در صورت مساعد بودن شرایط، تعداد زیادی از نشاهای موجود را از بین می برد (۱۳). در اکثر مناطق توتونکاری استان های مازندران و گلستان این بیماری شایع است (۶). قارچ عامل بیماری از خانواده اسکروتیناسه<sup>۳</sup> و راسته لوتیالس<sup>۴</sup> و شاخه آسکومیکوتا<sup>۵</sup> می باشد (۷). آن چه مسلم است به دلیل قدرت بالا سازگاری قارچ عامل بیماری با شرایط مختلف محیطی و دامنه میزبانی بسیار گسترده، انتخاب چندین روش به صورت تلفیقی می تواند کارآمدتر و مثمر ثمر باشد. در میان روش های مختلفی که برای کنترل عامل پوسیدگی یقه توتون می توان نام برد که از جایگاه خاصی برخوردار است استفاده از روش های کنترل بیولوژیکی است. با توجه به قابلیت بالای قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماریزا، جداسازی و شناسایی گونه های تریکودرما ی خزانه های توتون استان مازندران ضروری به نظر می رسد.

افشاری آزاد و همکاران (۱۳۸۵) گزارش نمود که قارچ *S. sclerotiorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا بوده که علاوه بر استان های شمالی کشور از سایر مزارع کلزای استان های فارس و کردستان نیز به صورت محدود مشاهده می گردد. ۲۴ جدایه از این قارچ از کلزا، آفتابگردان، کاهو و شب بو از استان های مختلف جمع آوری و توان بیماریزایی آنها را با هم مقایسه نمود. جونز و همکاران در سال ۱۹۷۴ نشان دادند که *Trichoderma viridae* با فعالیت آنزیم گلوکاناز<sup>۶</sup>، دیواره سلولی قارچ *S. sclerotiorum* تخریب نموده و موجب کنترل بیماری می شوند (۲۳). موسی در سال ۲۰۰۲ در مورد کنترل بیولوژیک مرگ گیاهچه چغندر قند با عامل بیماری *Rhizoctonia solani* بررسی هایی به عمل آورد. در تحقیق مورد نظر با استفاده از باکتریای آنتاگونیست *Bacillus subtilis* و گونه های مختلف قارچ تریکودرما موجب کاهش بیماری شد که مکانیزم کنترل را تولید سیدروفور و مواد آنتی بیوتیک و تولید اسیدسیانیدریک (مواد فرار) معرفی نمودند. هاوول در سال ۲۰۰۳ با جداسازی و شناسایی گونه های

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

مختلف تریکودرما که آنتاگونیست‌های موفق در برابر عوامل بیماریزای خاکزی بودند مکانیزم‌های کنترل را میکوپارازیتسم<sup>۱</sup>، آنتی بیوتیک، رقابت و شایستگی رایزوسفری، آنزیم‌ها، القاء مقاومت در میزبان نام برد (۲۲). دبیبی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در هند جداسازی ۵ جدایه از آنتاگونیست‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* و گونه‌های مختلف تریکودرما از مزارع فلفل سیاه و به کار بردن آنها در مزارع آلوده به پوسیدگی ریشه *Phytophthora capsici* موجب کنترل بیماری شدند که مکانیزم کنترل را تولید آنزیم‌های گروه بتا- ۱ و ۳ گلوکاناز<sup>۲</sup> و ۱ و ۴ گلوکانازها<sup>۳</sup> و لیپازها<sup>۴</sup> نام بردند (۲۰). در این بررسی در راستای استراتژی کاهش مصرف سم و بقایای شیمیایی، اقدام به جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف تریکودرما از خزانه‌های توتون در استان مازندران شد. گونه‌های موثر در سطح آزمایشگاه، برای بررسی‌های گلخانه انتخاب شدند.

## مواد و روش‌ها

### ۱- جداسازی عامل بیماری

نمونه برداری از گیاهچه‌های بیمار خزانه‌های توتون مرکز تحقیقات توتون تیرتاش و نیز خزانه‌های توتون روستاهای اطراف صورت گرفت. به این صورت که از نقاط آلوده خزانه‌ها که گیاهچه‌های واقع در آنها دارای علائم آبسوختگی و نیز میسلیوم پنبه‌ای روی ساقه بودند نمونه‌هایی انتخاب شد. قطعاتی از نواحی حد فاصل بافت سالم و آلوده تهیه و پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت آب آگار<sup>۵</sup> و سیب زمینی دکستروز آگار<sup>۶</sup> کشت شدند (۲). پس از رشد قارچ *S. sclerotiorum* جداسازی و خالص‌سازی جهت آزمایش اثر متقابل با گونه‌های مختلف تریکودرما صورت گرفت.

### ۲- جداسازی قارچ تریکودرما از خاک

از خاک خزانه‌های توتون واقع در استان مازندران، نمونه‌های خاکی، هریک به وزن تقریبی ۵۰۰ گرم تا عمق ۳۰ سانتی متری تهیه و در کیسه پلاستیکی ریخته و به آزمایشگاه منتقل گردید. ۲۰ گرم خاک مرطوب از هر نمونه در ۵۰۰ میلی لیتر محلول اسیدسیتریک دو در هزار استریل حل گردیده و مخلوط حاصل خوب بهم زده شد تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون مذکور به وسیله پیپت به یک تشتک پتری (به قطر ۹ سانتی متر) حاوی ۱۰ سی سی محیط آب آگار یک درصد استریل که بعد از استریزه کردن هنوز حالت مایع داشته و حرارت آن حدود ۴۵ درجه سانتی گراد بوده اضافه گردیده و به طور افقی در سطح میز به آرامی تکان داده تا سوسپانسیون مذکور به طور یکنواخت با محیط آب آگار مخلوط گردد. از هر نمونه خاک ۵ پتری به روش فوق تهیه و تا منعقد شدن کامل روی میز آزمایشگاه نگهداری شدند.

1- Mycoparasitism.

2- B-1,3- glucanases

3- B, 1,4 – glucanases

4- Lipases

5-WA

6- PDA

برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما در این تحقیق از محیط کشت انتخاب داوه<sup>۱</sup> استفاده شد (۵). پس از آماده شدن محیط کشت داوه، در هر پتری استریل (به قطر ۹ سانتی متر)، ۱۵ سی سی از این محیط ریخته شد که بعد از منعقد شدن بوسیله یک چوب پنبه سوراخ کن استریل، حلقه‌هایی به قطر دو سانتی متر از کشت آب آگار حاوی سوسپانسیون خاک با رعایت شرایط استریل در وسط یک تشتک پتری حاوی محیط کشت داوه، کشت داده شد. تشتک های پتری به مدت دو روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از رشد پرگنه ها با مشخصات ماکروسکوپی تریکودرما با جداسازی و به روش تک اسپور خالص سازی شده و برای آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

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

#### ۳-۱- اثر جدایه های *Trichoderma* روی عامل بیماری با روش کشت متقابل<sup>۲</sup>

برای بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر روی عامل بیماریزا از روش کشت متقابل استفاده شد. که ابتدا در یک طرف تشتک پتری حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار، دیسکی به قطر شش میلیمتر از حاشیه کشت سه روزه قارچ عامل بیماری و در طرف مقابل دیسکی از حاشیه کشت جوان تریکودرما به فاصله یک سانتی متر از لبه تشتک قرار داده شد (۱، ۲۶ و ۲۷). برای شاهد از یک قرص محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار خالص به جای تریکودرما استفاده شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. قطر پرگنه قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد نسبت به شاهد مقایسه و محاسبه گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن  $Q = 1\%$  انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ *S. sclerotiorum* با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر رشد میسلیم در پتری تیمار} - \text{قطر رشد میسلیم در پتری شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیم در پتری شاهد}} \times 100$$

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

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

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

1- Davet, 1971

2- Dual culture

جوان سه روزه جدایه تریکودرما قرار داده شد. تشتک ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت دو روز نگهداری شدند. برای هر جدایه از تریکودرما پنج تشتک پتری در نظر گرفته شد. بعد از هر ۲۴ ساعت سه تشتک پتری از هر جدایه از نظر نحوه تاثیر آنتاگونیستی روی عامل بیماریزا در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (۵).

ب) در یک طرف تشتک های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار قارچ عامل بیماری و در طرف دیگر جدایه های تریکودرما کشت داده شد. در هنگام کشت قارچ ها، لام های تمیز و ضد عفونی شده با الکل پس از عبور از چراغ الکی (به منظور ضد عفونی و گرم کردن آن) در وسط تشتک پتری بین ریشه های قارچ عامل بیماری و جدایه های تریکودرما قرار داده شد. بدین ترتیب همزمان با رشد هر دو قارچ بیماریزا و جدایه های آنتاگونیست پس از دو الی سه روز ریشه های آنها روی لام آمده و با هم برخورد کردند سپس با برداشتن لام در زیر میکروسکوپ نحوه تاثیر جدایه های تریکودرما روی قارچ عامل بیماری مورد مطالعه قرار گرفت. در این آزمایش پنج تشتک پتری به ازای هر جدایه آنتاگونیست کشت و لام گذاری شد (۵).

### ۳-۳- بررسی اثر متابولیت های فرار (گازی) تریکودرما در رشد میسلیم قارچ

در این آزمایش از چهار جدایه برتر تریکودرما (Tr9b, Tr6a, Tr102 و Tr29-1) در آزمایش کشت متقابل که از نمونه های خاک نقاط مختلف استان جداسازی شده استفاده شد. برای انجام این آزمایش دیسکی به قطر شش میلی متر از حاشیه کشت جوان سه روزه تریکودرما در وسط تشتک پتری حاوی سیب زمینی دکستروز آگار قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از حاشیه کشت جوان سه روزه قارچ عامل بیماری دیسکی در وسط تشتک پتری حاوی سیب زمینی دکستروز آگار قرار داده شد. با رعایت شرایط سترون درب تشتک پتری حاوی قارچ آنتاگونیست و بیماری برداشته شد و تشتک پتری حاوی آنتاگونیست وارونه بر روی تشتک حاوی قارچ عامل بیماری قرار داده و لبه های تشتک پتری با نوار پارافیلیم مسدود گردید (۲۵). تشتک ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و درصد کاهش رشد محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل چهار تیمار در چهار تکرار انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیم قارچ *S. sclerotiorum* با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{قطر رشد میسلیم در پتری تیمار} - \text{قطر رشد میسلیم در پتری شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیم در پتری شاهد}} \times 100$$

داده های به دست آمده از آزمایش (درصد بازداری در هر تکرار) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن  $Q = 1\%$  انجام شد.

#### ۴- تاثیر جدایه های تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی یقه توتون در سطح گلخانه

در این آزمایش از سه جدایه تریکودرما که در آزمایش قبلی استفاده شده بود به کار گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار انجام شد. در این آزمون خاک گلدانها پاستوریزه شده (در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته) و قطر دهانه گلدانها ده سانتی متر بود. در هر گلدان چهار نشا سالم توتون رقم ویرجینیا کوکر ۳۴۷ نگهداری شد و پس از محلول پاشی با تریکودرما (۱۰<sup>۸</sup> ۲ اسپور در هر میلی لیتر) در محل اتصال پایین ترین برگ به ساقه در نزدیکی طوقه با ایجاد خراش و قرار دادن دیسک قارچی عامل بیماری، دور آن جهت حفظ رطوبت با نوار پارافیلیم پیچیده شد. داده های به دست آمده از آزمایش (تعداد نشاهای سالم، ارتفاع بوته، وزن تر و خشک) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تبدیل داده درصد کنترل (تعداد نشاهای سالم) بر اساس تبدیل رادیکالی صورت گرفت. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن  $Q = 1\%$  انجام شد. درصد تلفات نشاها در تیمار از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد تلفات نشا} = \frac{\text{تعداد نشاهای سالم در تیمار} - \text{تعداد نشاهای سالم در تیمار شاهد غیر آلوده}}{\text{تعداد نشاهای سالم در تیمار شاهد غیر آلوده}} \times 100$$

### نتایج و بحث

#### ۱- جداسازی عامل بیماری

از تمامی نمونه های به دست آمده از خزانه های آلوده به بیماری پوسیدگی یقه توتون، عامل بیماری *S. sclerotiorum* جداسازی شد و خصوصیات آن با مشخصات ذکر شده توسط کوهن (۱۹۷۴) مطابقت داشت و جدایه ای که سریعتر کل تشک پتری را پر می نمود و در واقع رشد سریعتر داشت انتخاب و برای آزمایش های بعدی نگهداری شد.

#### ۲- شناسایی قارچ تریکودرما

بعد از خالص سازی نمونه های جدا شده، ابتدا بر اساس مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی شناسایی جدایه های بدست آمده در حد جنس با استفاده از کلید بی ست<sup>۱</sup> انجام شد (۱۴، ۱۵ و ۱۶). از میان ۷۲ نمونه خاک، ۶۰ جدایه به عنوان جنس تریکودرما شناسایی شد. بررسی دقیق تر جدایه های این جنس در حد گونه با استفاده از ویژگی های ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی اندام هایی از قبیل کیندیوفورها، فیالیدها و فیالوسپورها بر اساس کلیدهای شناسایی ظفیری و همکاران (۱۳۸۱)، گمز و بی ست (۱۹۹۸) و سایر منابع اقدام به شناسایی گونه ها گردید (جدول ۲) (۱۰، ۱۷، ۱۸ و ۲۳).

گونه های مختلف تریکودرما شناسایی شده شامل موارد زیر می باشد:

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

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

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

کنیدیوم زایی روی سیب زمینی دکستروز آگار در تمام یا قسمتی از سطح پرگنه ظاهر می شود. رنگ پرگنه ها روی این محیط سبز متمایل به زرد است. سطح زیرین پرگنه ها زرد است. در محیط کشت مالت آگار کنیدیوم زایی به صورت دسته های سست و غالباً در حاشیه محیط کشت تشکیل می شوند. دسته های کنیدیومی ابتدا سفید بوده و به سرعت شروع به سبز شدن می نمایند و نهایتاً سبز متمایل به زرد می شوند. در کشت های مسن کلامیدوسپور به تعداد کم بصورت میانی روی ریشه های غرق شده تشکیل می گردد. کنیدیوفور از نوع کنیدیوفور بخش *Longibrachiatum* است. کنیدیوفورها بی رنگ، نسبتاً بلند و ایستاده، دارای انشعابات غالباً نامنظم و به ندرت به صورت جفتی و متقابل که با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می دهند. فیالیدها تنگی شکل<sup>۱</sup> تا آمپولی شکل هستند و به صورت دسته های دو تا سه تایی و پیرامونی روی کنیدیوفور تشکیل می شوند. تعدادی از فیالیدها به صورت منفرد به ویژه در

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

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

کنیدیوم زایی روی سیب زمینی دکستروز آگار بعد ۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی گراد شروع می شود ولی در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و کمتر کنیدیوم زایی با تاخیر شروع می شود. کنیدیوم زایی به رنگ سبز تیره و بصورت پراکنده تمام سطح محیط کشت را می پوشاند. در دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتی گراد کنیدیوم زایی گاهی به صورت دواير متحدالمرکز می باشد. غالباً توده های کنیدیومی خال مانند و سفید رنگ در سطح پرگنه ها ظاهر می شوند به طوری که پرگنه ها حالتی شبیه گل‌سنگ به خود می گیرند. سطح زیرین پرگنه ها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد بی رنگ ولی در دماهای پایین تر زرد می شود. در محیط کشت مالت آگار کنیدیوم زایی به صورت پراکنده و یا به طور دسته هایی در حاشیه محیط کشت تشکیل می شوند. کلامیدوسپور روی ریشه هوایی و داخل محیط کشت تشکیل می گردد. کنیدیوفور از نوع تیپیک بخش *Longibrachiatum* است. کنیدیوفورها، نسبتاً بلند و ایستاده، دارای انشعابات کم تراکم و نامنظم که با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می دهند و یا این که نوک آنها به طرف محور اصلی کنیدیوفور خم می شوند. فیالیدها تنگی شکل کشیده هستند و غالباً به صورت منفرد یا گاهی به صورت دسته های دو تا سه تایی و پیرامونی روی کنیدیوفور تشکیل می شوند. در قسمت انتهایی کنیدیوفور فیالیدها همیشه به صورت منفرد قرار گرفته و همچنین نوک شاخه های فرعی به یک فیالید استوانه ای ختم می شود. کنیدیوم ها بیضوی کشیده تا تخم مرغی کشیده هستند و در محل اتصال به فیالید نوک دارند. کنیدیوم ها سبز کم رنگ، دارای دیواره صاف می باشند.

***Trichoderma koningii* Oud., in Oudemans and Koning, Arch. Neerl. Sci. II,7:291. 1902 – ۴**

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



فراوان و معمولا شاخه ها به صورت دسته های دو تا سه تایی با زاویه های به نسبت باز از محور اصلی منشعب می شوند. شاخه های اولیه معمولا تولید شاخه های ثانویه می نمایند که اینها نیز ممکن است مجددا منشعب گردند. معمولا شاخه ها به صورت جفتی و متقابل تولید می شوند. در برخی از جدایه ها کنیدیوفورها دارای نوک های طویل و منتهی به یک فیالید استوانه ای هستند و فیالیدهای کوتاه و متورم در قسمت زیر طویل شدگی به وجود می آیند. فیالیدها تنگی شکل تا آمپولی شکل و پایه آنها باریک تر از قسمت میانی آنها به طرف نوک است. فیالیدها معمولا به صورت جفتی در مقابل یکدیگر تولید می شوند ولی در جدایه های دارای کنیدیوفور ظریف تر تعداد زیادی از فیالیدها به صورت نامنظم روی کنیدیوفور قرار می گیرند. فیالیدها در جدایه های دارای کنیدیوفور قوی تر در دستجات سه تا پنج تایی پیرامونی به وجود می آیند. کنیدیوم ها مستطیلی<sup>۱</sup> تا بیضوی متمایل به استوانه ای با دیواره صاف و به رنگ سبز روشن تا سبز می باشند. این گونه با داشتن کنیدیوفور تپیک بخش *Trichoderma* از گونه های سایر بخش ها و با داشتن کنیدیوم ها مستطیلی از گونه های مربوط به بخش خود قابل تفکیک می باشد.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

درکشت متقابل ۶۰ جدایه تریکودرما با قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون *S. Sclerotiorum* درصد کنترل عامل بیماری بین ۵۱/۲۵ تا ۹۴ درصد بود که جدایه های Tr10b, Tr10a, Tr9b, Tr9a, Tr102, Tr6a و Tr29-1 بیشترین میزان کنترل به ترتیب ۹۴، ۹۰، ۹۰، ۹۰، ۹۰، ۹۰ و ۹۰ درصد که جدایه های Tr6a, Tr9a, Tr10a, Tr9b و Tr10b از مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش و جدایه Tr102 از مرمت ساری و جدایه Tr29-1 از دارابکلا جداسازی شدند. از لحاظ گروه بندی آماری دانکن جدایه T6a در گروه a و بقیه جدایه ها در گروه ab قرار داشتند. همچنین کمترین میزان بازدارندگی رشد میسلیم قارچ عامل بیماری (*S. sclerotiorum*) به ترتیب متعلق به جدایه های Tr103 به میزان ۵۱/۲۵ درصد و

جدایه Tr107 به میزان (uv) ۵۶/۵ درصد از روستای خارکش ساری جدا شده بودند (جدول ۲). در بین گونه‌های مختلف تریکودرما جدا شده، گونه *T. harzianum* بیشترین فراوانی به میزان ۶۵٪ را داشت.

جدول ۱: نتایج تجزیه و منابع تغییرات آزمایش اثر جدایه های *Trichoderma*

روی عامل بیماری با روش کشت متقابل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	۵۹	۱۴۷/۶ **
خطا	۱۸۰	۱۳/۶۹
مجموع	۲۳۹	

ضریب تغییرات = ۴/۶۴ \*\* تفاوت در سطح آماری ۱٪ معنی دار است

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

بررسی‌های میکروسکوپی در این آزمایش نشان داد که در سطح لایه نازک محیط کشت روی لام‌ها ریشه‌های تمام جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی در مراحل برخورد با ریشه‌های قارچ بیمارگر در قسمتی از طول آنها با تماس ریشه به موازات ریشه‌های قارچ بیمارگر رشد کرده و با گذشت زمان این تماس‌های ریشه افزایش یافت. ولی در جدایه های Tr29-1 و Tr102 اثری از پیش ریشه ای و قطعه قطعه شدن میسلیمی مشاهده نگردید ولی نفوذ مستقیم ریشه‌های تریکودرما به داخل ریشه‌های قارچ مشاهده شد. اما همه جدایه‌ها در نهایت باعث تخریب<sup>۱</sup> میسلیمی قارچ بیمارگر شدند.

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

نتایج آزمایش اثر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست روی قارچ بیمارگر نشان می‌دهد که ترشحات فرار Tr6a بیشترین و ترشحات فرار Tr29-1 کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر داشتند که به ترتیب به میزان ۸۳/۲۷ و ۷۰ درصد باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر شدند (جدول ۴).

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

نتایج آزمایش بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از بیماری پوسیدگی یقه توتون در گلخانه نشان می‌دهد که جدایه های Tr29-1, Tr102, Tr9b, Tr6a به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ۵۶/۲۵ و ۶۸/۷۵ درصد بیماری را کنترل کردند. همچنین این جدایه‌ها موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک اندام های هوایی بوته در حضور قارچ عامل بیماری شدند. ارتفاع بوته های تیمار شده با جدایه‌های مختلف تریکودرما از بوته‌های شاهد غیر آلوده هم بیشتر بود (جدول ۶).

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

شماره	نام جدایه	محل نمونه برداری خاک	گونه تریکودرما	درصد بازداری رشد میسلیم	گروه بندی
۱	Tr6a	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۹۴	a
۲	Tr9b	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۹۰	ab
۳	Tr102	مرمت ساری	<i>T. harzianum</i>	۹۰	ab
۴	Tr29-1	دارابکلا ساری	<i>T. harzianum</i>	۹۰	ab
۵	Tr10a	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۹۰	ab
۶	Tr9a	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۹۰	ab
۷	Tr10b	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۹۰	ab
۸	Tr20-1	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۸۸	abc
۹	Tr54	ساری لالیم	<i>T. harzianum</i>	۸۸	abc
۱۰	Tr72-2	وارد محله ساری	<i>T. longibrachiatum</i>	۸۵/۵	bcdef
۱۱	Tr71	پایین کولا ساری	<i>T. longibrachiatum</i>	۸۵/۲۵	bcdef
۱۲	Tr73	وارد محله ساری	<i>T. atroviride</i>	۸۳/۵	bcdef
۱۳	Tr23-1	اسبو کلا ساری	<i>T. harzianum</i>	۸۳	bcdefg
۱۴	Tr32-2	ساری لالیم	<i>T. citrinoviride</i>	۸۳	bcdefg
۱۵	Tr3a	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۸۲/۵	cdefgh
۱۶	Tr55	ساری لالیم	<i>T. koningii</i>	۸۲/۲۵	cdefgh
۱۷	Tr20-2	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۸۲	cdefghi
۱۸	Tr31-3	ساری لالیم	<i>T. harzianum</i>	۸۲	cdefghi
۱۹	Tr63	کوهسار کنده نکا	<i>T. harzianum</i>	۸۲	cdefgh
۲۰	Tr30	انستیتو تیرتاش	<i>T. citrinoviride</i>	۸۱/۵	cdefghi
۲۱	Tr2e	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۸۱/۲۵	cdefghijk
۲۲	Tr32-1	ساری لالیم	<i>T. harzianum</i>	۸۱	cdefghijkl
۲۳	Tr23-2	اسبو کلا ساری	<i>T. harzianum</i>	۸۰/۷۵	cdefghijkl
۲۴	Tr8c	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۸۰/۵	defghijklm
۲۵	Tr31-1	ساری لالیم	<i>T. longibrachiatum</i>	۸۰/۵	defghijklm
۲۶	Tr70	پایین کولا ساری	<i>T. longibrachiatum</i>	۸۰	defghijklm
۲۷	Tr29-2	دارابکلا ساری	<i>T. longibrachiatum</i>	۸۰	defghijklm
۲۸	Tr104	خارکش ساری	<i>T. harzianum</i>	۸۰	defghijklm
۲۹	Tr8b	انستیتو تیرتاش	<i>T. harzianum</i>	۸۰	defghijklm
۳۰	Tr28-2	دارابکلا ساری	<i>T. citrinoviride</i>	۸۰	cdefghijkl
۳۱	Tr62	جا مخانه نکا	<i>T. harzianum</i>	۸۰	defghijklm
۳۲	Tr61	جا مخانه نکا	<i>T. harzianum</i>	۷۸/۷۵	defghijklmn
۳۳	Tr59	دارابکلا ساری	<i>T. harzianum</i>	۷۷	efghijklmno

ادامه جدول ۲:

گروه بندی	درصد بازداری رشد مسیلیوم	گونه تریکودرما	محل نمونه برداری خاک	نام جدایه	شماره
efghijklmno	۷۷	<i>T. harzianum</i>	چلمردی نکا	Tr67	۳۴
efghijklmno	۷۷	<i>T. citrinoviride</i>	دارابکلا ساری	Tr58	۳۵
efghijklmno	۷۶/۷۵	<i>T. harzianum</i>	جامخانه نکا	Tr60	۳۶
efghijklmno	۷۶/۷۵	<i>T. koningii</i>	دارابکلا ساری	Tr57	۳۷
fghijklmnop	۷۶/۲۵	<i>T. koningii</i>	ساری لالیم	Tr56	۳۸
hijklmnop	۷۵	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr2d	۳۹
hijklmnopq	۷۵	<i>T. virens</i>	ساری لالیم	Tr32-3	۴۰
hijklmnopq	۷۵	<i>T. harzianum</i>	وارد محله ساری	Tr74	۴۱
hijklmnop	۷۵	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr2c	۴۲
hijklmnopq	۷۵	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr7a	۴۳
jklmnopq	۷۴	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr7b	۴۴
mnoqr	۷۳	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr7c	۴۵
nopqrs	۷۲/۲۵	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr5c	۴۶
nopqrs	۷۲	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr8a	۴۷
opqrs	۷۱/۷۵	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr4a	۴۸
nopqrs	۷۱/۵	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr2b	۴۹
opqrs	۷۰	<i>T. ghanens</i>	مرمت ساری	Tr98-2	۵۰
opqrs	۷۰	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr2a	۵۱
opqrs	۷۰	<i>T. harzianum</i>	انستیتو تیرتاش	Tr3b	۵۲
qrst	۶۹	<i>T. atroviride</i>	کوهسار کنده نکا	Tr64	۵۳
qrst	۶۷/۷۵	<i>T. atroviride</i>	چلمردی نکا	Tr65	۵۴
qrst	۶۷/۵	<i>T. koningii</i>	خارکش ساری	Tr105	۵۵
st	۶۵	<i>T. citrinoviride</i>	پایین کولا ساری	Tr68	۵۶
st	۶۵	<i>T. ghanens</i>	مرمت ساری	Tr101	۵۷
u	۵۸/۲۵	<i>T. koningii</i>	مرمت ساری	Tr100	۵۸
uv	۵۶/۵	<i>T. harzianum</i>	خارکش ساری	Tr107	۵۹
wv	۵۱/۲۵	<i>T. harzianum</i>	خارکش ساری	Tr103	۶۰

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

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

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	۴	۵۰۵۶/۹۴**
خطا	۱۵	۱۲/۸۹
مجموع	۱۹	

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

جدول ۴: تاثیر ترکیبات فرار جدایه های مختلف *Trichoderma harzianum* روی عامل بیماری و گروه بندی تیمارها

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

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

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		درصد کنترل بیماری	ارتفاع بوته	وزن تر و وزن خشک
جدایه	۵	۵۴/۸۱**	۱۴۲/۱۶**	۱۲/۶۶**
خطا	۱۸	۰/۳۸	۱/۸	۰/۵۵
مجموع	۲۳			
ضریب تغییرات(٪)		۸/۴	۹/۴۸	۲۰/۳۲

\*\*تفاوت در سطح آماری ۱٪ معنی دار است

جدول ۶: گروه بندی آماری اثر جدایه های *Trichoderma harzianum* در کاهش آلودگی در سطح گلخانه

نام تیمار	درصد کنترل بیماری	ارتفاع بوته	وزن تر	وزن خشک
شاهد غیر آلوده	۱۰۰a	۱۴/۵b	۵d	۳c
Tr6a	۸۷/۵ab	۱۸/۲۵a	۸/۲۵a	۵/۲۵a
Tr9b	۸۱/۲۵bc	۱۷a	۷/۷۵ab	۵/۲۵a
Tr102	۶۸/۷cd	۱۶/۵a	۶/۵cb	۴/۲۵b
Tr29-1	۵۶/۲۵d	۱۶/۵a	۵/۷۵cd	۳/۷۵bc
شاهد آلوده	۰e	۲/۲۵c	۱/۲۵e	۰/۵d

تریکودرما از قارچ های ناقص و از راسته هیپوکریالس<sup>۱</sup> است و تلئومورف آن گونه های جنس هیپوکریا<sup>۲</sup> می باشد (۷). با توجه به قابلیت بالای قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماریزا، جداسازی و شناسایی گونه های تریکودرما خزانه های توتون استان مازندران انجام شد. از میان ۷۲ نمونه خاک، ۶۰ جدایه به عنوان جنس تریکودرما شناسایی شد. ظفری و همکاران در سال ۲۰۰۲ سه گونه جدید برای فلور قارچ های ایران با نام های *T. asperellum*، *T. inhamatum* و *T. tomentosum* معرفی کردند (۹). همچنین ظفری و همکاران در سال ۲۰۰۵ سه گونه دیگر با نام های *T. spirale*، *T. ghanense* و *T. atroviride* که به ترتیب مربوط به بخش های *Pachybasium*، *Longibrachiatum* و *Trichoderma* می باشند را معرفی کردند که در این بین *T. atroviride* در کنترل بیولوژیک بیماری های گیاهی با اهمیت است (۱۰). جدا شدن قارچ های آنتاگونیست از خاک مناطق مختلف نشانه ای از وجود آن ها در بسیاری از خاک های زیر کشت گیاهان است. بنابراین برای مدیریت صحیح بیماری ها می توان ضمن جلوگیری از مصرف بی رویه سموم شیمیایی، از این عوامل بیولوژیک به طور مصنوعی تکثیر و استفاده کرد. قارچ های آنتاگونیست در کشت متقابل روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار باعث کاهش و جلوگیری از رشد قارچ بیماریزا (*S. sclerotiorum*) شدند. میزان بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ بیماریزا توسط گونه های مختلف تریکودرما یکسان نبود. حداقل ۵۱/۲۵ و حداکثر ۹۴ درصد ثبت گردید. این نتایج مشابه تحقیقات رادوان و همکاران (۲۰۰۶) و کوکوک و کایوانس (۲۰۰۴) می باشد. در بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه های آنتاگونیست با قارچ *S. sclerotiorum* مشاهده گردید که ریشه های جدایه های آنتاگونیست به سمت ریشه قارچ بیمارگر دارای کشش و تروپسم مثبت هستند که این کشش را می توان به وجود مواد شیمیایی در دیواره ریشه قارچ بیمارگر نسبت داد. مکانیسم پارازیتیسم تریکودرما پیچیده است که شامل تروپسم شیمیایی، تشخیص لکتین موجود در دیواره سلولی بیمارگر و تشکیل آپرسوریوم، اندام های نفوذی و حلقه های به دام اندازنده بیمارگر می باشد. همان طوری که چنین نتایجی در تحقیقات بهبودی و همکاران، امیر صادقی و همکاران و رادوان و همکاران گزارش شده است (۴، ۵ و ۳۲). در بررسی های آزمایشگاهی در این تحقیق مشخص شده است که گونه های تریکودرما با تولید ترکیبات فرار باعث جلوگیری از رشد میسلیم قارچ بیمارگر می شوند. مرآت و همکاران در سال ۱۳۷۹، در سطح آزمایشگاه در مورد مکانیسم کنترل قارچ *S. sclerotiorum* عامل خشکیدگی سرشاخه ها و جوانه های توت، مطالعاتی انجام دادند که مشخص گردید در آزمایش اثر کشت متقابل گونه های *T. harzianum*، *T. Longibrachiatum* و *T. pseudokoningii* کارایی بهتری در کنترل قارچ عامل بیماری و مکانیسم اثر آن، تولید بیشتر متابولیت های فرار در جلوگیری از رشد پرگنه عامل بیماری و تاثیر لیزکنندگی اسکروت ها نسبت به سایر گونه های تریکودرما بودند (۱۱). دنیس و وبستر (۱۹۷۱) استالدئید را به عنوان مهمترین متابولیت فرار *T. viride* معرفی نمودند (۱۹). زیبا و همکاران (۱۹۹۱)

1- Hypocreales

2- Hypocrea

متابولیت‌های فرار متعددی شامل لاکتون‌ها، الکل‌ها، مشتقات ترپن و مشتقات آلفاپیرون را در شرایط کشت متفاوت از *T. viride* به دست آوردند و نشان دادند که جدایه‌های قارچ، مواد و روش کشت در کمیت و کیفیت تولید متابولیت‌های فرار موثرند. متابولیت‌های فرار و غیر فرار می‌توانند در خلل و فرج خاک انتشار یافته و نیازی به تماس مستقیم با عامل بیماری برای تاثیرگذاری آنها نمی‌باشد (۳۶). نتایج آزمایش بررسی تاثیر قارچ تریکودرما در جلوگیری از بیماری پوسیدگی یقه توتون در گلخانه نشان می‌دهد که جدایه‌های Tr102، Tr9b، Tr6a و Tr29-1 به ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ۵۶/۲۵ و ۶۸/۷۵ درصد بیماری را کنترل کردند. رادوان و همکاران گزارش کردند که توانایی تریکودرما در کاهش بیماری به خاطر خاصیت آنتاگونیستی تریکودرما و تخریب میسلیم قارچ‌های بیماریزا در خاک و یا رقابت برای منابع کربنی و آهن در رایزوسفر(فرا ریشه) می‌باشد (۳۲). مکانیزم های دیگری که به وسیله هاول و یدیدیا و همکاران پیشنهاد شده، القا مقاومت در گیاهان تیمار شده با تریکودرما می‌باشد (۲۲ و ۳۵). همچنین در بررسی‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های تریکودرما موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی بوته در حضور قارچ عامل بیماری شدند. ارتفاع بوته‌های تیمار شده با جدایه‌های مختلف تریکودرما از بوته‌های شاهد غیر آلوده هم بیشتر بود که نشان دهنده تحریک جدایه‌های تریکودرما در رشد اندام‌های هوایی بوته‌های توتون می‌باشد. همانطوریکه در تحقیقات مهتابی و همکاران در سال ۱۳۸۰ نشان دادند که ماده تجاری تریکودرمین بی که حاوی *T. harzianum* و *T. viride* می‌باشد موجب افزایش ارتفاع بوته و وزن سبز گیاهچه های توتون در سطح گلخانه شده است (۱۲). در زیمباوه هم با استفاده از ایزوله T77 قارچ تریکودرما (*T. harzianum*) موجب کنترل قارچ های رایزوکتنیا و فوزاریوم در سطح خزانه و مزارع توتون شده و همچنین این قارچ آنتاگونیست موجب تحریک رشد توتون شده است (۸). همچنین توسط رادوان و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده که جدایه‌های مختلف تریکودرما موجب تحریک رشد بوته‌های لوبیا با افزایش ارتفاع بوته، افزایش وزن خشک و تر بوته‌ها و افزایش درصد جوانه زنی بذور لوبیا در حضور قارچ *S. rolfisii* می‌شوند (۳۲). همچنین یدیدیا و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش نمودند که کاشتن نشاهای خیار در مزارعی که خاک آنها با *T. harzianum*(T-203) تیمار شده است موجب افزایش منطقه و طول ریشه و وزن خشک بوته می‌شود (۳۵). تحقیقات مختلف از جمله ویندهام و همکاران نشان می‌دهد که ترشحات تریکودرما حاوی فاکتور تنظیم کننده رشد می‌باشد که موجب افزایش رشد گیاه و جوانه زنی بذور گیاه می‌گردد. از طرفی افزایش رشد به علت کنترل بیمارگرهای ثانوی نیز می‌باشد و در نتیجه موجب افزایش رشد ریشه و جذب بیشتر مواد غذایی می‌گردد (۳۴). وجود آنزیم های مختلف تجزیه کننده دیواره سلولی بیمارگر و بافت گیاهی مانند سلولاز، لامیناریناز، بتا-۱ و ۳ گلوکاناز، کیتیناز و کیتوبیاز در ترشحات تریکودرما باعث می‌شود که بافت های گیاهی و دیواره ریشه سریع تر تجزیه گردد. با تجزیه ترکیبات،



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

## منابع

- ۱- اشرفی زاده، آ.، اعتباریان، ح. و زمانی زاده، ح. ۱۳۸۴. ارزیابی جدایه های *Trichoderma* برای کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های ۱. جلد ۴۱. صفحه ۵۸-۳۹.
- ۲- اکبری کیارودی، س. ل.، نیک نژاد کاظم پور، م.، الهی نیا، س. ع. و خداپرست، س. الف. ۱۳۸۴. تاثیر باکتریهای آنتاگونیست روی *Sclerotinia sclerotium* عامل کپک سفید کلزا. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های ۳. جلد ۴۱. صفحه ۳۲۸-۳۰۷.
- ۳- افشاری آزاد، ه.، چگینی، م. و باغبانی مهماندار، ف. ۱۳۸۵. مطالعه توان بیماریزایی جدایه های قارچ *S.sclerotiorum* عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ۵۰۹ صفحه.
- ۴- امیرصادقی، س.، شریفی تهرانی، ع. و حجارود، ق. ۱۳۷۱. اثرات چندین قارچکش و قارچ آنتاگونیست (*Trichoderma spp*) بر روی بیماری اسکروتینیای بادمجان (*S.sclerotiorum*). پایان نامه کارشناسی ارشد ارائه شده به دانشکده کشاورزی کرج. دانشگاه تهران. ۲۰۱ صفحه.
- ۵- بهبودی، ک.، شریفی تهرانی، ع.، حجارود، ق. و زاد، ج. ۱۳۸۴. اثرات آنتاگونیستی گونه های *Trichoderma spp*. روی قارچ *Phytophthora capsici* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های ۳. جلد ۴۱. صفحه ۳۶۲-۳۴۵.
- ۶- سجادی، س. الف.، بهبودی، ک.، عاصمی، ه. و نجفی، م. ۱۳۸۵. جداسازی و شناسایی گونه های مختلف تریکودرما از سطح خزانه های توتون استان مازندران و گلستان. کارنامه پژوهشی دخانیات تیرتاش. ۳۷۴ صفحه.
- ۷- صارمی، ح.، پیغامی، الف. و پژوهنده، م. ۱۳۸۱. اصول قارچ شناسی. ترجمه کتاب سی. جی. آلکسوپولوس، سی. دبلیو. میمس و ام. بلک ول. جهاد دانشگاهی مشهد. ۶۹۶ صفحه.
- ۸- ضیایی مهرجویی، ج. ۱۳۷۷. توصیه هایی در مورد کشت توتون بارلی. شرکت دخانیات ایران. ۲۵۲ صفحه.
- ۹- ظفری، د.، ارشاد، ج.، زارع، ر. و علیزاده، ع. ۱۳۸۱. تحقیقی در زمینه شناسایی گونه های *Trichoderma* در ایران. فصلنامه علمی- پژوهشی بیماریهای گیاهی. شماره های ۲ او ۳۸. جلد ۴۵-۲۱.
- ۱۰- ظفری، د. ۱۳۸۲. مطالعه تاکسونومی جنس تریکودرما در ایران در ایران. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی. ۱۹۳ صفحه.

۱۱- مرآت، الف.، میر حسینی مقدم، س.ع. و روحانی، ح. ۱۳۷۹. بررسی اثر آنتاگونیستی گونه هایی از تریکودرمای توتستان های استان گیلان بر روی فارچ *Sclerotium*، عامل خشکیدگی سر شاخه ها و جوانه های درختان توت. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ۴۰۲ صفحه.

۱۲- مهتابی، ر.، رستمکلاهی مطلق، س.، گودرزیان، ن.، روحانی، ح. و براری، ح. ۱۳۸۰. بررسی امکان کنترل عوامل بیماریزایی اسکروتینیا، رایزوکنتیا و پیتیموم با استفاده از ماده بیولوژیک تریکودرمین بی در شرایط گلخانه. کارنامه پژوهشی دخانیات تیرتاش. ۲۳۱ صفحه.

- 13-Abawi, G. S. and Grogan, R. G. 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69(8). 899-904
- 14-Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. section *Longibrachiatum*. Sect. nov. *Canadian journal of Botany* 62: 224-931.
- 15-Bissett, J. (1991-a). A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69:2357-2372.
- 16-Bissett, J. (1991-b). A revision of the genus *Trichoderma*. T11. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69:2373-2417.
- 17-Bissett, J. (1991-c). A revision of the genus *Trichoderma*. 17. Additional notes on Section *longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69:2418-1420.
- 18-Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany*. 70: 639-641.
- 19-Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* (II. Production of volatile antibiotics). *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48.
- 20-Diby, P., Saju, K. A., Jisha, P. J., Sarma, G. R., Kumar, A. and Anandaraj, M. 2005. Mycolytic enzymes produced by *pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma* spp. Against *pseudomonas capsici*, the foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum l.*). *Indian phytopath.*, 54(4). 11pp.
- 21-Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma and Gliocladium* (eds C. P. Kubick and G.E. Harman). Vol 1. 3-34 pp. Taylor & Francis, London, UK.
- 22-Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species the Biological control of plant Diseases: The History and Evolution of current concepts. *Plant Disease*. 86-104-10. pp.
- 23- Jones, D., Gordon, AH. and Bacon, J. S. D. 1974. Cooperative action by endo and exo-o-(1-3) glucanase from parasitic. *Fungi in the degradation of cell wall glucans of*. *Biochem. J.* 140: 47-55pp.
- 24-Kohn, L. M. 1979. De limitation of economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. *Phytopathology*. 69: 881-886.
- 25-Kucuk, C. and Kivanc, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. And determination of Their antifungal, biochemical and physiological features. *Turk J Biol.* 27. 247- 253pp.
- 26-Kucuk, C. and Kivanc, M. 2004. In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turk J Biol.* 28:111-115pp.
- 27-Kucuk, C. and Kivanc, M. 2005. Effect of formulation on the viability of biocontrol agen, *Trichoderma harzianum* conidia. *Africa Journal of Biotechnology*. 4(5). 483-486pp.
- 28-Lucas, G. B. 1975. *Disease of Tobacco*, 3<sup>rd</sup> edition, Biological Associates consulting, Releigh, North carolina. 621pp.
- 29-Luo, K., Ren, X. J., Zhou, O. Y., Vhen. and Yang, Y. 1990. Study of parasitic fungi on sclerotia of *Sclerotinia sclerotium*. *Rev. Plant Pathology*. 68: 14
- 30-Purdy, L. H. 1979. *Sclerotinia sclerotium*: History, Diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology*. 69(8). 875-880.
- 31-Moussa, T. A. A. 2002. Studies *Sclerotinia sclerotium* on Biological of sugarbeet pathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Journal of Biological Sciences*. 2(12): 800-804. pp.
- 32-Radwan, M. B., Fadel, A. M. and Mohammad, I. A. M. 2006. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestine. *Hebron University Research Journal*. 2(2) 27-47pp.
- 33-Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological paper*. 116:1-56.
- 34-Windham, M. T., Elad, Y. and Baker, K. 1986. A mechanism for increased plant growth included by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 6: 518-521.
- 35-Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, y. and Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil*. 235-242.
- 36-Zeppa, G., Allengron, G., Barbeni, M. and Guarda, P. A. 1991. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. *Rev. Plant Pathology*. 70(8): 604.

