بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاه‌چه چغندرقند به‌وسیله جدایه‌هایی از *Trichoderma harzianum* Rifai

Investigation on biological control of sugar beet damping-off disease by some isolates of *Trichoderma harizanum* Rafai

مائده شهیری طبرستانی[۱]، ماهرخ فلاحتی رستگار[۲]، بهروز جعفرپور[۲] و حمید روحانی [۳]

م. شهیری طبرستانی، م. فلاحتی رستگار، ب. جعفرپور و ح. روحانی . ۱۳۸۴. بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاه‌چه چغندرقند بوسیله جدایه‌هایی از *Trichoderma harzianum* Rifai. **چغندرقند ۲۱(۱): ۷۵-۵۷**

چکیده

با توجه به قدرت بالای آنتاگونیستی قارچ *Trichoderma harzianum*، پنج جدایه *T.h.*K، *T.h.*BI، *T.h.*Mo، *Var*33 و تربت *VI* انتخاب و اثر آن در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بر بیماری مرگ گیاه‌چه چغندرقند ناشی از *Rhizoctonia solani* مطالعه شد. قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* به‌صورت کشت دو طرفه روی PDA در کشت همزمان، کشت ٤٨ ساعته و ٩٦ ساعته *R. solani* بررسی شد و مشخص شد کلیه جدایه‌های *T. harzianum* می‌توانند پس از متوقف کردن رشد میسلیومی *R. solani* کلنی آن را به‌طور کامل کلنیزه و بر روی آن اسپرزایی کنند. در هر سه آزمایش، جدایه *T.h.*K در مقایسه با سایر جدایه‌ها، در زمان کوتاه‌تری کلنی *R. solani* را کلنیزه کرد. بررسی‌های میکروسکپی نحوه تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* روی *R. solani* نشان داد این جدایه‌ها با پیچش هیفی، نفوذ و متلاشی کردن هیف، رشد آن را متوقف کرده و در نهایت باعث از بین رفتن آن می‌شوند. متابولیت‌های فرار جدایه‌های *T. harzianum*، اثر بازدارندگی قابل‌توجهی روی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری داشتند که در این میان جدایه *T.h.*BI با ٨٩/٦٣ درصد، بیشترین اثر بازدارندگی را از خود نشان داد. در بررسی اثر بازدارندگی پنج غلظت(۳۰-۲۵-۲۰-۱۵-۱۰ درصد) متابولیت‌های مایع خارج سلولی جدایه‌های *T.harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیومی *R. solani* مشخص شد، متابولیت‌های مایع خارج سلولی هیچ یک از جدایه‌ها در غلظت‌های به‌کار رفته، تأثیر معنی‌داری در رشد میسلیومی *R. solani* نداشتند. در آزمایش‌های گلخانه‌ای مشخص شد، پوشش دادن بذر چغندرقند با عوامل آنتاگونیست یا اضافه کردن آن‌ها به خاک بر میزان مرگ و میر گیاهچه‌ها در فاصله ۳۰ روز پس از کاشت، تأثیر چشمگیری در مقایسه با شاهد آلوده دارد و از این نظر، بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در مجموع، جدایه‌های *T.h.*K و *Var*33 در روش محلول پاشی خاک، بهترین اثر را در کنترل بیماری داشتند.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، مرگ گیاهچه چغندرقند، *Trichoderma harzianum*، *Rhizoctonia solani*

۱- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی

۲- عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان

مقدمه

گیاهچه‌های چغندرقند معمولاً به وسیله قارچ‌های بیماری‌زای جنس‌های *Phytophthora*، *Phoma*، *Pythium*، *Aphanomyces*، *Rhizoctonia*، *Sclerotium*، *Fusarium* و *Polymyxa* مورد حمله قرار می‌گیرند (Tarek and Moussa 2002). گری (Gray 1995) طی تحقیقی که درسال‌های ۱۹۹۲ تا ۱۹۹۴روی عوامل ایجاد کننده مرگ گیاهچه چغندرقند در ایالت وایومینگ انجام داد، توانست قارچ‌های *Rhizoctonia solani*، *Pythium ultimum* و *Fusarium* sp. را در هر سه سال و قارچ‌های *Phytophthora drechsleri*، *Phoma betae*، *Aphanomyces cochlioides* و *Rhizopus* sp. را فقط در یک سال زمان اجرای تحقیق از گیاهچه‌های آلوده چغندرقند جداسازی کند. از شایع‌ترین عوامل مرگ و میر گیاهچه چغندرقند در ایران *R. solani* و *P. aphanidermatum* است. قارچ *P. aphanidermatum* بیشتر موجب فساد بذر و مرگ گیاهچه قبل از ظهور می‌شود، در حالی‌که اکثر گیاهچه‌های آلوده به قارچ *R. solani* از خاک خارج می‌شوند (احمدی‌نژاد ۱۳۵۲). *R. solani* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای مرگ گیاهچه چغندرقند است. پوسیدگی توسط این قارچ از مرحله گیاهچه‌ای شروع می‌شود و می‌تواند تا مرحله پیشرفته رشد گیاه نیز ادامه یابد و موجب مرگ کامل گیاه شود. در ایران، نخستین بار در سال ۱۳۴۵ بیماری‌زایی این قارچ روی چغندرقند به اثبات رسید و به‌عنوان عامل مرگ گیاهچه چغندرقند معرفی شد (احمدی‌نژاد ۱۳۵۲). قارچ *R. solani* خاکزی است که با تولید توده‌های متراکم و سخت میسلیومی در خاک موجب بقای ساپروفیتی و گسترش خود می‌شود. علی‌رغم تأثیر نسبی پاره‌ای از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، کاربرد ترکیبات شیمیایی جهت مهار بیماری، از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی قابل توجیه نیست. بدین جهت تصور می‌شود کنترل بیولوژیکی یکی از روش‌های مناسب مبارزه با این بیماری باشد (Gray and Gerik 1998).

T. harzianum قارچی است که تقریباً در هر خاکی حضور دارد و نسبت به قارچ‌های دیگر خاصیت آنتاگونیست دارد(Chet 1998). گونه‌های مختلف جنس تریکودرما در طیف وسیعی از آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای به‌عنوان عوامل بیوکنترل مؤثر شناخته شده‌اند. این عوامل آنتاگونیست با کلنیزه کردن سیستم ریشه گیاه، آن را در برابر آلودگی به بیمارگرهای خاکزاد گیاهی محافظت می‌کند. هم‌چنین برخی از این عوامل مانند بعضی از جدایه‌های *T. harzianum* می‌توانند باعث افزایش رشد و عملکرد گیاهان شوند (Harman et al. 1989 وPapavizas 1985). حسن‌زاده (۱۳۷۱) اعلام کرد، *T. harzianum* در خاک تیمار شده با این قارچ، با تولید فاکتورهای محرک رشد موجب افزایش رشد گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی و توتون می‌شود. علاوه بر آن،

تاکنون گزارش‌های متعددی مبنی بر افزایش رشد گیاهان در حضور *T. harzianum* ارائه شده است.

دنیس و وبستر (Dennis and Webster 1971) گزارش کردند، گونه‌های تریکودرما با تولید ترکیبات آنتی بیوتیکی فرار و غیرفرار از رشد قارچ‌های مختلف ممانعت می‌نمایند. به عقیده آبادا و چت (Abada 1994 and Chet 1998)، *T. harzianum* به‌عنوان یک میکوپارازیت، میزبان خود را از دور شناسایی می‌کند و خود را به قارچ بیماری‌زا می‌چسباند و آنزیم‌های لایتیک (Lytic) خارج سلولی نظیر پروتئاز، کیتیناز، بتا ۱و۳- گلوکاناز و یا لیپاز ترشح می‌کند. این آنزیم‌ها باعث درهم شکستن دیواره سلولی و تجزیه ریسه قارچ می‌شوند. *T. harzianum* از جمله آنتاگونیست‌های بسیار مهاجمی است که سرعت رشد، قدرت رقابت و بقای ساپروفیتی بالایی دارد. روحانی و همکاران (۱۳۶۹) اثر جدایه‌های *T. harzianum* را روی قارچ *R. solani* (عامل پوسیدگی جوانه و استولن سیب‌زمینی) بررسی و تأثیر مثبت آن را در کاهش بیماری گزارش کردند. بازگیر و اخوت (۱۳۷۵) اثر چند جدایه *T. harzianum* را بر قارچ *R. solani* (عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی بذر لوبیا) بررسی کردند. آن‌ها گزارش نمودند اضافه کردن اسپور جدایه‌هایی از این قارچ آنتاگونیست به میزان $۱۰^{۷}$ اسپر به هر گرم خاک گلدان آلوده به *R. solani* و کاشت بذر لوبیا در آن (در شرایط گلخانه)، در مقایسه با تیمارهای ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌های بنومیل، تیابندازول و کاربوکسین، در کنترل بیماری مؤثرتر بود. این بررسی در مزرعه نیز انجام شد که در نتیجه آن، جدایه‌هایی از *T. harzianum* در مقایسه با تیمار شاهد آلوده به *R. solani*، ۵۳ درصد مرگ گیاهچه لوبیا را کاهش داد. آبادا (Abada 1994) گزارش کرد، *T. harzianum* به‌میزان قابل ملاحظه‌ای بوته میری، پوسیدگی ریشه و شدت پوسیدگی ریشه چغندرقند را در شرایط گلخانه و مزرعه کاهش می‌دهد و هم چنین باعث افزایش وزن ریشه در مزرعه می‌شود. در آزمایش‌های مزرعه‌ای که توسط تارک و موسی (Tarek and Moussa 2002) به منظور بررسی امکان کنترل بیولوژیکی *R. solani* چغندرقند انجام شد، در بین گونه‌های مختلف قارچی و باکتریایی بکار رفته، گونه *T. harzianum* بهترین اثر را در مقایسه با سایر تیمارها در کنترل این بیماری نشان داد.

طبق اعلام آمبروزینو و همکاران (Ambrosino et al. 2004) گونه‌های تریکودرما به‌عنوان عوامل بیوکنترل و اصلاح‌کننده خاک به صورت تجاری وارد بازار شده‌اند که در نتیجه آن، به‌کارگیری ترکیبات شیمیایی و عواقب ناشی از کاربرد آن‌ها (وجود بقایای آن‌ها در مواد غذایی)، کاهش یافته است. با توجه به اثرات آنتاگونیستی بسیار بالای استرین*T. harzianum* T22 در برابر بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی (*Rhizoctonia solani* و*Botrytis cinerea, Pythium ultimum*) پروتئین‌هایی از این استرین که قابلیت بیوتکنولوژیکی

برای استفاده صنعتی و تجاری داشتند، شناسایی شدند. با به‌کارگیری این ترکیبات می‌توان مقاومت سیستمیک را به گیاه القا کرد. آن‌ها نشان دادند، پاره‌ای از ترکیبات پروتئینی در تعامل این استرین با قارچ‌های بیماری‌زا تولید می‌شوند. سیلینتو و همکاران (Ciliento et al. 2003) اعلام کردند به کارگیری گونه‌های تریکودرما در کشاورزی نه تنها اثر بازدارندگی مستقیمی بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی دارند بلکه با بهبود قدرت گیاه، تحمل آن را نسبت به تنش‌های محیطی افزایش می‌دهند. در حال حاضر، مطالعات وسیعی بر روی استرین‌های *Trichoderma* spp. در حال انجام است تا از آن‌ها در تولید صنعتی آنزیم‌ها، آنتی بیوتیک‌ها و بازیافت بقایای آلی استفاده شود.

با توجه به قدرت بالای آنتاگونیستی *T. harzianum* در کنترل مستقیم (با تولید آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی بیوتیکی فرار و غیر فرار) و غیر مستقیم (با افزایش رشد، قدرت و تحمل گیاه) قارچ عامل بیماری و هم‌چنین قابلیت آن جهت تولید در مقیاس وسیع صنعتی و تجاری، پنج جدایه از آن قارچ انتخاب و اثر آن روی قارچ *R. solani* در مرحله گیاهچه چغندرقند در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

۱- آزمون بیماری‌زایی *R. solani*

جدایه‌ای از *R. solani* جدا شده از گیاهچه‌های بیمار جمع‌آوری شده از مزارع حومه مشهد با گروه آناستموزی AG-4، دریافتی از مهندس احمد عباسی (عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی خراسان) در آزمایش‌های بیماری‌زایی مورداستفاده قرار گرفت. این آزمون با استفاده از روش لایه مایه تلقیح (Inoculum Layer Technique) انجام شد. بدین‌ترتیب که درون هر گلدان پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتی‌متر، حدود ۲۵۰ سانتیمترمکعب خاک استریل ریخته شد. به‌میزان یک ظرف پتری نه سانتی‌متری از کلنی هفت روزه قارچ *R. solani* روی محیط کشت آب آگار دو درصد (پس از خرد کردن) به خاک اضافه شد. سپس ۵۰ سانتی‌مترمکعب دیگر از خاک استریل روی آن افزوده شد. جهت تیمار شاهد از محیط آب آگار دو درصد خالص فاقد کشت قارچ استفاده شد. سپس ۱۲ عدد بذر چغندرقند رقم ۷۲۳۳ که قبلاً توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و دو بار با آب مقطر استریل شستشو شده بود، با فواصل مساوی درون گلدان کشت شدند. برای هر تیمار چهار تکرار (گلدان) در نظر گرفته شد. پس از ۱۸ روز نگه‌داری در شرایط گلخانه با دمای ۷ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد، گیاهچه‌های دارای علائم باریک و سیاه شدن طوقه، به آزمایشگاه منتقل شدند. از محل آلودگی روی محیط غذایی PDA کشت شد. قارچ رشد یافته جداسازی و مشخصات ماکروسکپی و میکروسکپی آن مورد بررسی قرارگرفت.

۲- بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *Trichoderma harzianum* در برابر *R. solani*

از جدایه‌های آنتاگونیستی که در این تحقیق به‌کار برده شده‌اند، جدایه‌های *T.h.*K ، *T.h.*BI و *T.h.*Mo از دکتر حمید روحانی (عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان) و جدایه‌های Var33 و تربت *VI* از مهندس محمودرضا کریمی (عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی خراسان) دریافت و پس از کشت مجدد، خالص‌سازی شدند. سه جدایه اول از خاک مزارع اطراف همدان و دو جدایه آخر از خاک مزارع حومه مشهد جمع‌آوری شدند. قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T.harzianum*در سه آزمایش مجزا بررسی شد.

الف- بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* با *R. solani* در کشت همزمان

این آزمایش به روش کشت متقابل (Dual culture) انجام شد. به این ترتیب که در یک طرف ظرف پتری حاوی PDA، یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت سه روزه *R. solani* و در طرف مقابل آن دیسکی به همین اندازه از کشت سه روزه قارچ آنتاگونیست (جدایه مورد نظر) قرار داده شد. برای هر جدایه آنتاگونیست سه ظرف پتری(تکرار) در نظر گرفته شد. پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۱ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد، میزان رشد و پیش‌روی هر دو قارچ به‌طور روزانه یادداشت‌برداری شد و مدت زمانی که هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست توانستند کلنی ریزوکتونیا را به‌طور کامل کلنیزه کنند، تعیین شد.

ب- بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* با کشت ٤٨ ساعته *R. solani*

این آزمایش نیز به روش کشت متقابل انجام شد. به این ترتیب که در یک طرف ظرف پتری حاوی PDA، یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت سه روزه *R. solani* قرار داده شد. ظروف پتری به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۱ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس در شرایط استریل، دیسکی به همین اندازه از کشت سه روزه قارچ آنتاگونیست (جدایه مورد نظر) در طرف مقابل دیسک *R. solani* قرار داده شد. برای هر جدایه آنتاگونیست سه ظرف پتری (تکرار) در نظر گرفته شد. ظروف پتری دوباره به انکوباتور با دمای ۱ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. میزان رشد و پیش‌روی هر دو قارچ به طور روزانه یادداشت‌برداری شد و مدت زمانی که هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست توانستند کلنی *R. solani* را به‌طور کامل کلنیزه کنند، تعیین شد.

ج- بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* با کشت ٩٦ ساعته *R. solani*

دراین آزمایش، ابتدا یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت سه روزه *R. solani*، در مرکز ظرف پتری حاوی PDA قرار داده شد. ظروف پتری

به مدت ۹۶ ساعت درانکوباتور با دمای۱ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس در شرایط استریل، حلقه‌ای به همین اندازه از کشت سه روزه قارچ آنتاگونیست (جدایه مورد نظر) در مرکز همان ظرف پتری روی دیسک *R. solani* قرار داده شد. برای هر جدایه آنتاگونیست سه ظرف پتری (تکرار) در نظر گرفته شد. ظروف پتری دوباره به انکوباتور با دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. میزان رشد و پیش‌روی هر دو قارچ به طور روزانه یادداشت‌برداری شد و مدت زمانی که هریک از جدایه‌های آنتاگونیست توانستند کلنی *R. solani* را به‌طور کامل کلنیزه کنند، تعیین شد.

۳- بررسی میکروسکپی نحوه تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* بر *R. solani*

به‌منظور مشاهده نحوه ارتباط بین هیف جدایه‌های *T. harzianum* و قارچ عامل بیماری، ابتدا تعدادی ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA تهیه شد، سپس در حالی که هنوز محیط کشت حالت مایع داشت، یک لام استریل به‌وسیله پنس استریل با عبور از روی شعله چراغ الکلی، گرم و به‌صورت عرضی در وسط ظرف پتری گذاشته شد تا کمی در محیط کشت فرو رود و روی سطح لام با لایه نازکی از محیط کشت پوشیده شود. پس از انعقاد محیط کشت، در یک طرف لام یک دیسک ۵ میلی‌متری از کشت سه روزه ریزوکتونیا و در طرف مقابل آن، دیسکی به همین قطر از کشت سه روزه جدایه آنتاگونیست کشت داده شد. برای هریک از جدایه‌های آنتاگونیست، سه ظرف پتری (تکرار) در نظر گرفته شد. ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۱± ۲۶ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از این که دو قارچ رشد و روی لام با یکدیگر تلاقی کردند، لام‌ها ازمحیط کشت خارج شد و نحوه ارتباط هیفی دو قارچ زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X (۴۰۰ برابر) مورد بررسی قرار گرفت.

٤- بررسی تأثیر ترشحات جدایه‌های *T. harzianum*

الف ـ بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *R. solani*

هدف از این آزمایش، بررسی نقش ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *T. harzianum* در ممانعت از رشد میسلیوم *R. solani* و مقایسه توانایی بازدارندگی این جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف بود.

بدین‌منظور ابتدا محیط کشت داوه مایع (Davet's Liquid Medium) (شامل نیترات کلسیم یک گرم، نیترات پتاسیم ۰/۲۵ گرم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۱۲۵ گرم، سولفات کلسیم ۰/۲۵ گرم، اسید سیتریک ۰/۰۵ گرم، کلرید کلسیم یک گرم، ساکارز یک گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس در هر ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری، ۱۵۰ میلی‌لیتر از این محیط که قبلاً استریل شده بود، ریخته شد. پس از

سردشدن محیط، هر ارلن با چهار حلقه میسلیومی یک سانتی‌متری از کشت سه روزه جدایه آنتاگونیست مورد نظر (روی PDA)، مایه‌زنی شد. برای هر جدایه آنتاگونیست یک ارلن در نظر گرفته شد. به ارلن شاهد، چهار حلقه میسلیومی یک سانتی‌متری از محیط PDA فاقد جدایه آنتاگونیست، اضافه شد. بعد از هفت روز که ارلن‌ها در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر دورانی با ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند، محتویات ارلن مربوط به هر جدایه به‌طور جداگانه، ابتدا به وسیله کاغذ صافی وسپس بوسیله صافی‌های میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرومتری (میلی‌پور) صاف شدند. غلظت حاصل از هر جدایه به نسبت‌های ۱۰ ، ۱۵ ، ۲۰ ، ۲۵ و ۳۰ درصد با محیط کشت PDA استریل که هنوز حالت مایع داشت (حرارت حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد) مخلوط شد. برای هر غلظت از هر جدایه آنتاگونیست، سه ظرف پتری(تکرار) در نظر گرفته شد. جهت تیمار شاهد، عصاره ارلن شاهد که از صافی میلی‌پور عبور داده شده بود با نسبت‌های فوق با محیط کشت PDA استریل که هنوز حالت مایع داشت (حرارت حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد) مخلوط شد. پس از به‌هم زدن ظروف پتری و سرد شدن آن‌ها، در مرکز هر ظرف پتری، یک حلقه میسلیومی پنج میلی‌متری از کشت سه روزه *R. solani*، قرار داده شد. ۹۶ ساعت پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۱ ±۲۶ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی *R. solani* درظروف پتری حاوی عصاره و ظروف پتری شاهد فاقد عصاره، اندازه‌گیری شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی، به اجرا درآمد. فاکتور اول جدایه، در پنج سطح (شاهد *Var*33, *T.h.*K, *T.h.*Mo, *T.h.*BI, و تربت*VI*) و فاکتور دوم، غلظت در پنج سطح (۱۰–۱۵–۲۰–۲۵–۳۰ درصد) بود. داده‌های به‌دست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری در هر غلظت) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی دو عامل جدایه و غلظت با استفاده از آزمون دانکن در سطوح یک درصد و پنج درصد انجام شد. برای تعیین درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری از رابطه زیر استفاده شد:

= درصدممانعت از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری

$$\frac{\text{میانگین قطر رشد میسلیوم در هر تیمار} - \text{میانگین قطر رشد میسلیوم در شاهد}}{\text{میانگین قطر رشد میسلیوم در شاهد}} \times ۱۰۰$$

ب ـ بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *R. solani*

هدف از این آزمایش، بررسی نقش متابولیت‌های فرار جدایه‌های *T. harzianum* در ممانعت از رشد میسلیوم *R. solani* بود. جهت اجرای آزمایش، یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت سه روزه هریک از جدایه‌های آنتاگونیست در وسط هر ظرف پتری PDA قرار داده شد، سپس در شرایط استریل، بالای هریک از ظروف پتری حاوی جدایه‌های آنتاگونیست، ظرف پتری PDA حاوی یک حلقه

میسلیومی از کشت سه روزه ریزوکتونیا قرار داده شد و دور تا دور هر ظرف پتری با پارافیلم و چسب بسته شد. برای هر جدایه، سه ظرف پتری(تکرار) در نظر گرفته شد. در تیمار شاهد، دیسک پنج میلی‌متری از محیط PDA فاقد قارچ آنتاگونیست به محیط کشت PDA انتقال یافت و سپس روی آن ظرف پتری حاوی *R. solani* قرار داده شد. چهار روز پس از انتقال ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۱±۲۶ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی *R. solani* اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی، شامل شش تیمار (شاهد, *T.h.*Mo, *T.h.*BI, *T.h.*K, *Var* 33 و تربت *VI*) و سه تکرار (برای هر نوع محیط کشت) انجام شد و داده‌های به‌دست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیوم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح یک و پنج درصد انجام شد. برای تعیین درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری، از رابطه ذکر شده در بند الف-۴ استفاده شد.

۵- بررسی اثر جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه

با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی، سه جدایه *T.h.*K، *T.h.*BI و *Var*33 از قارچ *T. harzianum* که اثرات آنتاگونیستی بهتری روی *R solani* نشان داده بودند، انتخاب و اثرات آن‌ها بر کنترل مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه با دو روش محلول‌پاشی خاک(Soil drenching) و آغشته سازی بذر(Seed coating) موردمطالعه قرار گرفت. خاک گلدان‌ها که قبلاً استریل شده بودند به نسبت ۱۰ درصد حجمی با اینوکلوم *R. solani* که روی مخلوط آرد ذرت و ماسه استریل به نسبت وزنی پنج و ۹۵درصد به‌مدت یک ماه تهیه شده بود، مخلوط شد. برای آلوده‌سازی خاک با جدایه‌های تریکودرما، از سوسپانسیون اسپر جدایه‌ها استفاده شد، بدین ترتیب که با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی یک قطره ماده خیس‌کننده (مایع ظرفشویی) در لیتر به هر ظرف پتری حاوی کشت ۱۰ روزه جدایه‌ها، اسپرهای تولیدشده شسته شدند و به نسبت $۱۰^{۷}$ اسپور در هر گرم خاک مرطوب گلدان‌ها مخلوط شدند. به همین ترتیب نیز برای آغشته‌سازی بذر به اسپور جدایه‌های تریکودرما، سوسپانسیونی با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی دو گرم در لیتر صمغ عربی تهیه شد و بذرهای چغندرقند (رقم ۷۲۳۳) به‌مدت ۳۰ دقیقه در آن غوطه‌ور شدند، پس از خشک کردن بذرها در زیر هود استریل، در هر گلدان، ۱۲ عدد از آن‌ها کاشته شد. به‌منظور حذف هر گونه آلودگی احتمالی بذرهای مورد استفاده، قبل از غوطه‌ور کردن آن‌ها در سوسپانسیون اسپور تریکودرما، به‌مدت سه دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک‌درصد ضدعفونی و دو بار به‌وسیله آب مقطر استریل، شستشو وخشک شدند. در این آزمایش سه شاهد در نظر گرفته

شد: ۱) شاهد فاقد جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست (شاهد غیرآلوده) ۲) شاهد حاوی جدایه بیمارگر و فاقد جدایه آنتاگونیست (شاهد آلوده)، ۳) شاهد حاوی جدایه آنتاگونیست و فاقد جدایه بیمارگر (به‌منظور مشخص‌شدن احتمالی بیماری‌زا بودن جدایه آنتاگونیست). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. گلدان‌ها به‌مدت ۳۰ روز در شرایط گلخانه با حرارت ۷±۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و هر سه روز، یک‌بار آبیاری شدند. تعداد بوته‌های سالم در فاصله‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت شمارش و براساس آن درصد تلفات بوته‌های چغندرقند در اثر قارچ عامل بیماری، از رابطه زیر به‌دست آمد.

$$\frac{\text{تعداد بوته‌های سالم موجود در تیمار} - \text{تعداد بوته‌های سالم موجود در شاهد غیرآلوده}}{\text{تعداد بوته‌های سالم موجود در شاهد غیرآلوده}} \times ۱۰۰$$

داده‌های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح یک و پنج درصد انجام شد.

نتایج

۱ - آزمون بیماری‌زایی *R. solani*

اولین علائم بیماری پس از ۷-۵ روز، به‌صورت باریک و سیاه شدن طوقه ظاهر شد. طی ۱۸ روز از زمان مایه‌زنی قارچ به گیاه میزبان، گیاهچه‌های دارای علائم بیماری از درون گلدان‌ها خارج شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط PDA کشت شدند. کلنی قارچ ابتدا به رنگ سفید مایل به کرم به‌صورت دوایر متحدالمرکز رشد کرده و پس از دو هفته رنگ آن تیره و متمایل به قهوه‌ای شد. پس از تهیه اسلاید میکروسکپی از قارچ رشد یافته روی محیط کشت PDA، زاویه ۹۰ درجه انشعابات هیف با هیف اصلی، تشکیل دیواره عرضی بعد از آن، فشردگی هیف بعد از انشعاب، وجود دیواره عرضی از نوع دولیپور (Dolipore) و رنگ مایل به قهوه‌ای هیف مشاهده شد، لذا قارچ موردنظر *R. solani* تشخیص داده شد. پس از ۱۸ روز گیاهچه‌های سالم و از بین رفته به شرح جدول یک شمارش و درصد آلودگی تعیین شد.

جدول ۱ درصد آلودگی گیاهچه‌های چغندرقند مایه‌زنی شده با *R. solani*

Table 1 Percentage of infected sugar beet seedlings inoculated with *R. solani*

تیمار Treatment	تعداد گیاهچه های آلوده No. of infected seedlings	تعداد گیاهچه‌های غیرآلوده No. of non- infected seedlings	درصد گیاهچه‌های آلوده Percent of infected seedlings
شاهد آلوده (Infected control with *R. solani*)	36	12	75
شاهد غیرآلوده (Non-Infected control with *R. solani*)	0	48	0

۲- نتایج بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T.harzianm* در برابر *R.solani*

در آزمایش اول و دوم مشخص شد که جدایه‌های *T. harzianum* پس از برخورد با هیف‌های *R. solani* رشد آن را متوقف کرده و شروع به رشد و اسپورزایی روی میسلیوم آن می‌کنند. در آزمایش سوم نیز همه جدایه‌های تریکودرما توانستند به‌خوبی ریزوکتونیا را کلنیزه و در سطح آن اسپورزایی کنند. تعداد روزهایی که جدایه‌های تریکودرما، در این سه آزمایش توانستند ریزوکتونیا را به‌طور کامل کلنیزه و بر روی آن اسپورزایی کنند در جدول ۲ آمده است.

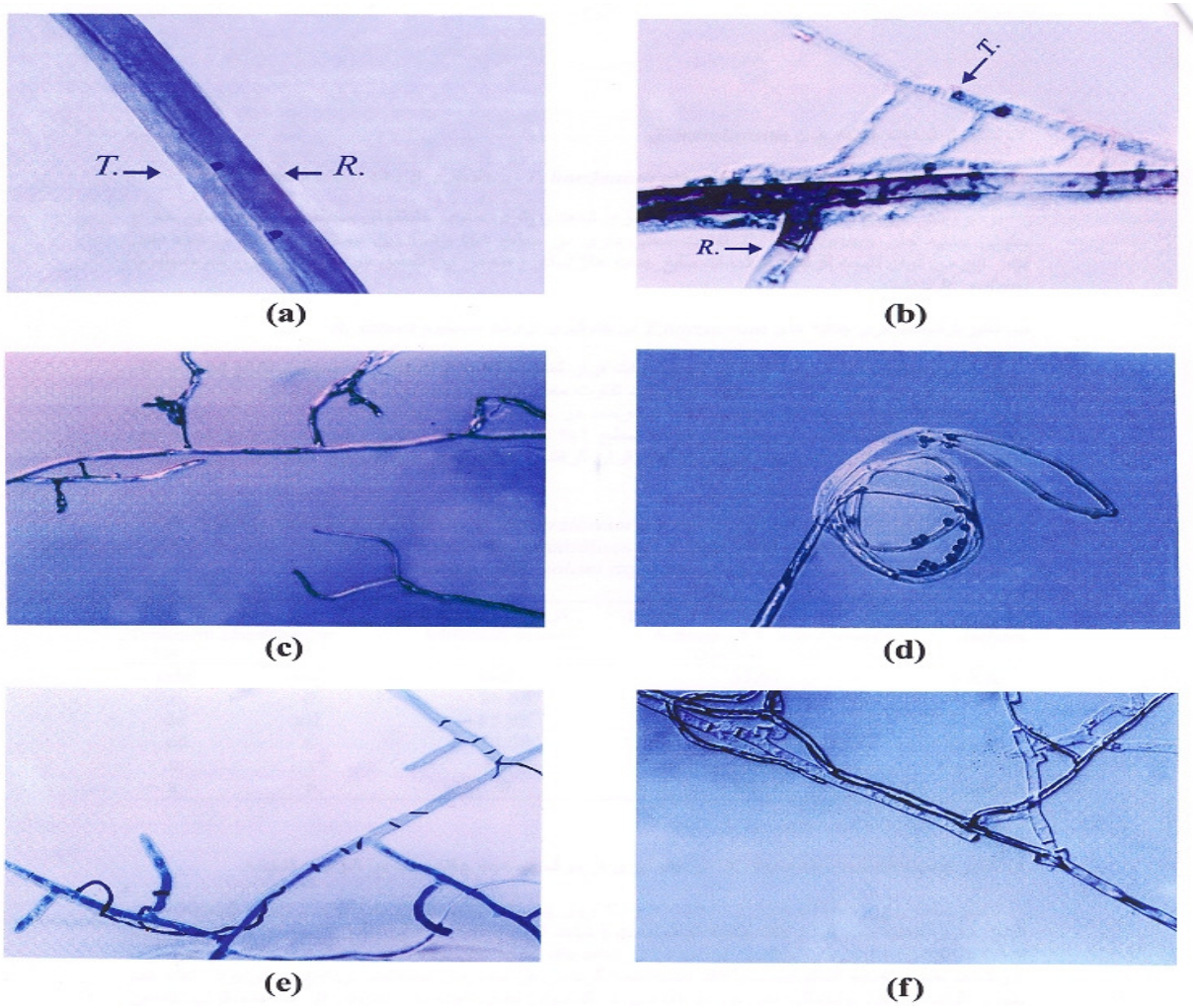
جدول ۲ قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T.harzianum* در برابر *R. solani*

Table 2 Antagonistic ability of *T. harzianum* against *R. solani*

جدایه‌های آنتاگونیست Antagonistic isolates	آزمایش اول(روز) Test 1(day)	آزمایش دوم(روز) Test 2(day)	آزمایش سوم(روز) Test 3(day)
*T.h.*K	5	5	5
*T.h.*BI	6	6	5
*Var*33	8	7	5
*T.h.*Mo	7	6	6
Torbat *VI*	8	6	5

۳- بررسی میکروسکپی نحوه تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* بر *R. solani*

در بررسی‌های میکروسکپی، ارتباطات هیفی بین تریکودرما و ریزوکتونیا مشاهده شد. از آن‌جا که قطر هیف تریکودرما خیلی کمتر از قطر هیف ریزوکتونیا بود، این دو قارچ به‌راحتی زیر میکروسکپ قابل تشخیص بودند. غالباً هیف‌های تریکودرما به‌موازات هیف‌های ریزوکتونیا رشد می‌کردند و با تولید انشعابات کوچک نفوذکننده خودشان را به میسلیوم میزبان می‌چسباندند. به‌دنبال این تعامل، تریکودرما در داخل هیف ریزوکتونیا رشد و گسترش می‌یافت و گاهی اوقات از قسمت دیگر ریزوکتونیا خارج و فیالید و اسپور تولید می‌کرد (شکل۱- b و a). حالت چنگک مانند نوک هیف تریکودرما در نزدیکی هیف ریزوکتونیا نیز دیده شد که بدین وسیله تریکودرما به ریزوکتونیا حمله کرده و به دور آن می‌پیچید (شکل۱- c و d). این پیچش در تمام طول هیف ادامه می‌یافت. کشش وارده از طرف هیف‌های تریکودرما موجب تکه‌تکه شدن هیف میزبان شد (شکل۱ - d و e). در این بررسی متلاشی شدن هیف ریزوکتونیا نیز دیده شد.



شکل۱ تصاویر میکروسکپی (۴۰X) ارتباطات هیفی *T. harzianum* با *R. solani*، تولید انشعابات ریز نفوذکننده (a) و گسترش آن در هیف ریزوکتونیا (b)، حالت چنگک مانند (c) و پیچش نوک هیف تریکودرما در نزدیکی هیف ریزوکتونیا (d)، پیچش هیف تریکودرما در سرتاسر هیف ریزوکتونیا (e) و قطعه قطعه شدن هیف ریزوکتونیا (f)

Fig. 1 Microscopic images (40X) of *T. harzianum* hyphae with *R. solani* hyphae, Production of hooks by *Trichoderma* hyphae (a) and invasion of antagonist into *Rhizoctonia* hyphae (b), Hooked (c) and coiled *Trichoderma* hyphae near to *Rhizoctonia* hyphae (d), coiling of *Trichoderma* all along of *Rhizoctonia* hyphae (e) and segmentation of *Rhizoctonia* hyphae (f)

٤- تأثیر ترشحات جدایه‌های *T.harzianum*

الف- تأثیر ترشحات مایع خارج‌سلولی جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از رشد مسیلیوم *R. solani*

در بررسی میزان رشد ریزوکتونیا درظرف پتری شاهد و پتری حاوی غلظت‌های مختلف ترشحات مایع خارج‌سلولی جدایه‌های *T. harzianum*، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و شاهد مشاهده نشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت، ترشحات مایع جدایه‌های به‌کار رفته در این تحقیق اثر بازدارنده بر رشد مسیلیوم *R. solani* نداشتند.

ب- تأثیر ترشحات فرار جدایه‌های *T.harzianum* در جلوگیری از رشد مسیلیوم *R. solani*

براساس مقایسه میانگین‌ها (جدول۳)، ترشحات فرار تمام جدایه‌ها توانستند رشد مسیلیوم قارچ *R. solani* را کاهش دهند و از این نظر بین جدایه‌ها و شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح یک و پنج درصد وجود داشت. در این میان، ترشحات فرار جدایه *T.h.*BI با ۸۹/۶۳ درصد در مقایسه با شاهد، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد مسیلیوم *R. solani* داشت. بررسی آماری در سطح یک‌درصد نشان داد جدایه *T.h.*BI در یک گروه و جدایه‌های تربت *VI* و*T. h.*Mo نیز درگروه آماری دیگری قرار گرفتند. جدایه‌های *T.h.*K و *Var* 33با سایر جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشتند.

جدول۳ تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از رشد مسیلیوم *R. solani*

Table 3 Effect of volatile metabolites of *T. harzianum* isolates on inhibition of *R. solani* mycelial growth

جدایه‌ها Isolates	میانگین قطر کلنی ۴ روزه (میلی‌متر) Average of 4 days colony's diameter(mm)	درصد بازدارندگی Inhibition (%)	گروه‌بندی تیمارها Treatment classification 1%	5%
*T.h.*K	13.67	84.81	cd	cde
*T.h.*BI	9.33	89.63	d	e
*Var*33	12.67	85.92	cd	de
*T.h.*Mo	15.67	82.58	c	cd
Torbat *VI*	17.33	80.74	c	c
Control	90.00	0.00	a	a

۵- تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از مرگ گیاهچه چغندرقند در شرایط گلخانه

نتایج حاصل نشان داد، درصد تلفات گیاهچه‌ها در شاهد حاوی جدایه بیمارگر و فاقد جدایه آنتاگونیست (شاهد آلوده) ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کاشت به‌ترتیب ۵۲/۰۷، ۷۵ و۱۰۰ درصد بود. این میزان در شاهد فاقد جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست (شاهد غیرآلوده) و شاهد حاوی جدایه آنتاگونیست و فاقد جدایه بیمارگر، در هر سه زمان یادداشت‌برداری صفر بود. البته عدم ظهور گیاهچه به‌دلیل پوسیدگی بذر نیز در تعدادی از

گلدان‌های تیمار آلوده به *R. solani* مشاهده شد که این موارد نیز به‌عنوان گیاه‌چه‌های تلف شده در نظر گرفته شد. بر اساس درصد گیاهچه‌های سالم ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کاشت، مشخص شد بین تیمارها و شاهد حاوی جدایه بیمارگر و فاقد جدایه آنتاگونیست (شاهد آلوده) تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که ۳۰ روز پس از کاشت بذر چغندرقند، درصد گیاه‌چه‌های سالم در این شاهد (آلوده) صفر بود اما این میزان در تیمارهای حاوی جدایه‌های *T.h.*K، *T.h.*BI و *Var* 33 در روش محلول‌پاشی خاک به‌ترتیب ۶۶/۶۷، ۴۵/۸۴ و ۶۴/۵۹ درصد و در روش آغشته‌سازی بذر به‌ترتیب ۵۶/۲۵، ۵۰ و ۴۵/۸۴ درصد بود. این میزان در شاهد فاقد جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست (شاهد غیرآلوده) و شاهد حاوی جدایه آنتاگونیست و فاقد جدایه بیمارگر، ۱۰۰ درصد بود.

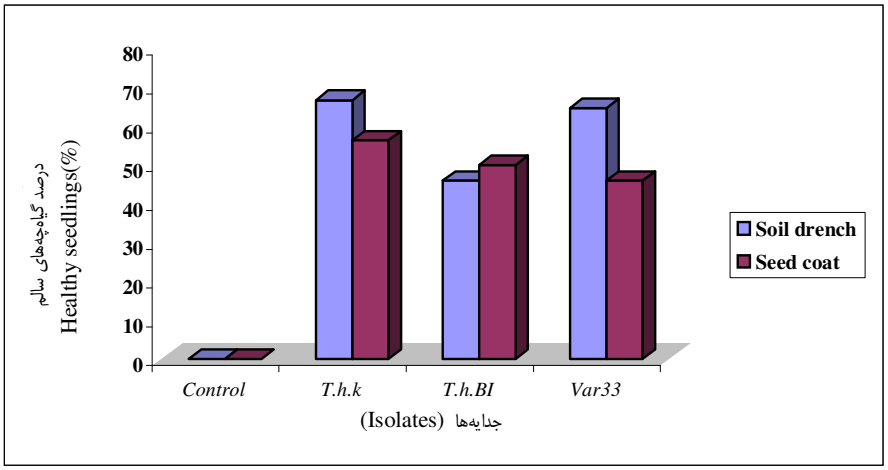
بررسی‌های آماری نتایج حاصل از درصد گیاه‌چه‌های سالم ۳۰ روز پس از کاشت (براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح ۱ و ۵ درصد)، سه گروه آماری مشخص را بین تیمارها نشان می‌دهد که این سه گروه به‌ترتیب قدرت قابلیت کنترل‌کنندگی مرگ و میر گیاه‌چه چغندرقند عبارتند از:

۱- جدایه‌های *T.h.*K و *Var* 33 در روش محلول‌پاشی خاک،

۲- جدایه‌های *T.h.*K در روش آغشته‌سازی بذر.

جدایه *T.h.*BI در روش محلول‌پاشی خاک و جدایه‌های *T.h.*BI و *Var* 33 در روش آغشته سازی بذر.

دراین بررسی‌ها جدایه‌های *T.h.*K و *Var* 33 در روش محلول‌پاشی خاک، بهترین قابلیت کنترل‌کنندگی بیماری مرگ گیاه‌چه چغندرقند را داشتند (شکل ۲).



شکل ۲ قابلیت کنترل‌کنندگی جدایه‌های *T. harzianum* در جلوگیری از مرگ گیاه‌چه چغندرقند طی ۳۰ روز پس از کاشت (در مقایسه با شاهد آلوده)

Fig. 2 Biocontrol potential of *T. harzianum* isolates on inhibition of sugar beet damping-off, 30 days after planting (in comparison with infected control)

بحث

بررسی‌های آزمایشگاهی در مورد نحوه تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* بر *R. solani* نشان داد، پنج جدایه آنتاگونیست به‌کار رفته در این تحقیق، توانستند با مکانیسم‌های مختلف از رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری جلوگیری کنند. بازگیر و اخوت (۱۳۷۵) اعلام داشتند، تریکودرما در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند با استفاده از پدیده پارازیتیسم (Parasitism)، آنتی‌بیوز(Antibiosis)، متلاشی کردن(Lysis) و رقابت غذایی (Competition)، قارچ بیماری‌زا را تحت تأثیر قراردهد. در بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* علیه *R. solani* که درسه آزمایش مجزا(کشت همزمان جدایه آنتاگونیست و عامل بیماری، کشت جدایه آنتاگونیست ۴۸ ساعت پس از کشت عامل بیماری و کشت جدایه آنتاگونیست ۹۶ ساعت پس از کشت عامل بیماری) انجام شد، مشخص شد همه جدایه‌ها پس از برخورد با هیف‌های *R. solani* رشد آن‌را متوقف کرده و شروع به رشد و اسپرزایی برروی میسلیوم آن می‌کنند که در این میان، جدایه *T.h.*K می‌تواند در زمان کوتاه‌تری کلنی *R. solani* را به‌طور کامل کلنیزه کند. نکته مهم آن که، زمان کلنیزاسیون توسط این جدایه در هر سه آزمایش یکسان بود. این نتایج نشان دهنده قدرت بالای آنتاگونیستی جدایه *T.h.*K است. به نظر می‌رسد سرعت کلنیزاسیون قارچ آنتاگونیست، زمانی که *R. solani* زودتر وارد محیط شده (تمام یا قسمتی از محیط کشت توسط آن اشغال می‌شد) نسبت به کشت همزمان، کاهش یابد. اما این فاکتور در آزمایش‌های ۲و۳، دربرخی جدایه‌ها بدون تغییر و در برخی دیگر افزایش داشت. شاید علت این امر ترشح بیشتر آنزیم بتا-۱و۳- گلوکاناز و کیتیناز از جدایه‌های آنتاگونیست در حضور هیف *R. solani* باشد. هادار و همکاران(Hadar et al. 1979)، چت و بیکر(Chet and Baker 1980)، سیوان و چت (Sivan and Chet 1989) و لوییس و همکاران(Lewis et al. 1989)، گزارش کردند زمانی که از دیواره سلولی *R. solani* به‌عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط استفاده شود، میزان ترشح آنزیم بتا-۱و۳- گلوکاناز و کیتیناز از *T. harzianum* افزایش می‌یابد. از آنزیم‌های تولید شده به‌وسیله *T. harzianum*، فعالیت آنزیم بتا-۱و۳- گلوکاناز بیشتر از کیتیناز است. قسمت اعظم دیواره سلولی *R. solani* ازگلوکان تشکیل شده است، بنابر این به نظر می‌رسد آنزیم بتا-۱و۳- گلوکاناز در تجزیه دیواره سلولی *R. solani* مهم‌تر است(Hadar et al. 1979).

بررسی‌های میکروسکپی در مورد نحوه تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* روی *R. solani* نشان داد، این جدایه‌ها با پیچش هیفی، نفوذ و متلاشی کردن هیف، رشد آن را متوقف کرده و در نهایت باعث از بین رفتن آن می‌شوند. این نتایج با مشاهدات سینگ و فال(Singh and Faull 1988) و تارک و موسی (Tarek and Moussa 2002) مطابقت دارد. الاد و

همکاران(Elad et al. 1983) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت نشان دادند که فعالیت آنزیمی *T.harzianum* در نقاط تماس هیفی این قارچ با هیف *R. solani* افزایش می‌یابد. تولید آنزیم‌های متلاشی‌کننده دیواره سلولی، از جمله آنزیم‌های تخریب‌کننده کیتین به‌وسیله گونه‌های *T. harzianum* ، توسط محققان مختلف گزارش شده است. تولید این آنزیم ممکن است نقش مهمی در قابلیت آنتاگونیستی این قارچ داشته باشد (Cherif and Chet 1998, Lewis and Benhamou 1990, Papavizas 1984).

ترشحات مایع خارجی سلول جدایه‌های *T. harzianum* در شرایط آزمایشگاه، نتوانستند از رشد میسلیوم *R. solani* ممانعت کنند. این نتیجه با نتایج کارهای بازگیر و اخوت (۱۳۷۵) و نظری (۱۳۷۰) که به ترتیب *T. harzianum* را برعلیه *R. solani* و *Ph. drechsleri* به‌کار گرفتند، مطابقت دارد. متابولیت‌های فرار جدایه‌های به‌کار رفته در این تحقیق، تأثیر بسیار خوبی در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *R. solani* داشتند. کوک و بیکر (Cook and Baker 1983) نیز گزارش کردند، ترشحات فرار جدایه‌های آنتاگونیست *T. harzianum* در کاهش رشد ریزوکتونیا مؤثر هستند. طبق نظر آن‌ها، این ترکیبات تا شعاع زیاد و در سطح نسبتاً وسیعی پراکنده شده و در خلل و فرج خاک به آسانی نفوذ می‌شوند و گستره تأثیر آنتاگونیست‌ها را افزایش می‌دهند. ایشان دی‌اکسیدکربن و اتانول(که به‌مقدار قابل ملاحظه‌ای در گازهای متصاعد شده از محیط کشت این قارچ وجود دارند) را عامل فعالیت ضدقارچی این آنتاگونیست دانستند. دنیس و وبستر (Dennis and Webster 1971) ، استالدئید را به عنوان مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک فرار تولید شده به وسیله تریکودرما گزارش کردند.

در بررسی‌های گلخانه‌ای نشان دادند که جدایه‌های *T. harzianum* به‌کار رفته، به خوبی مرگ گیاهچه را کنترل می‌کنند. کیم و ره (Kim and Roh 1987) نشان دادند اضافه کردن بعضی جدایه‌های *T. harzianum* ، *Gliocladium* sp. و *T. viride* به خاک باعث می‌شود بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *R. solani* چغندرقند به میزان۷۰ – ۴۰ درصد کاهش یابد. کوهل و اشلوسر (Kohl and Schlosser 1989)، کارآیی تعدادی از گونه‌های تریکودرما را برای کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای خاکزاد چغندرقند در شرایط گلخانه مطالعه کردند و نشان دادند که همه استرین‌های موردمطالعه می‌توانند گیاهچه‌های چغندرقند را در برابر بوته‌میری ریزوکتونیایی محافظت کنند. در این تحقیق، جدایه‌های *T.h.*K و *Var* 33 در روش محلول‌پاشی خاک، بهتر از روش آغشته‌سازی بذر، بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند را کنترل کردند. به‌نظر می‌رسد در روش محلول‌پاشی خاک، جمعیت بالاتری از این جدایه‌ها در تماس با خاک اطراف گیاهچه قرار می‌گیرند، در حالی‌که در روش آغشته‌سازی بذر، اسپورهای کمتری می‌توانند به سطح

بذرهای چغندرقند بچسبند. بازگیر و اخوت (۱۳۷۵) نیز گزارش کردند، مخلوط کردن اسپور آنتاگونیست‌های *Gliocladium virens* ، *T. harzianum* و *T. viride* با خاک، نسبت به آغشته کردن بذر با اسپر آن‌ها، در کنترل *R. solani* (عامل مرگ گیاهچه لوبیا) نتیجه بهتری داشته است.

علی‌رغم آن که جدایه‌های *T.h.*K ، *T.h.*BI و *Var* 33 در بررسی‌های آزمایشگاهی اثرات آنتاگونیستی تقریبا یکسانی بر *R. solani* داشتند، اما در شرایط گلخانه‌ای جدایه‌های *T.h.*K و *Var*33 در روش محلول‌پاشی خاک بهترین اثر را نسبت به سایر تیمارها (در مقایسه با شاهد آلوده) در کنترل بیماری نشان دادند. با توجه به آن که کنترل مؤثر بیمارگرهای خاکزاد گیاهی توسط عوامل آنتاگونیست، مستلزم سازگاری این عوامل با شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژیکی خاک و هم‌چنین توانایی تولید جمعیت بالا و پایدار در ناحیه ریزوسفر خاک است، لذا به‌نظر می‌رسد کنترل بهتر بیماری مرگ گیاهچه چغندرقند توسط جدایه‌های مذکور به دلیل سازگار بودن شرایط فیزیکوشیمیایی و اکولوژیکی خاک به‌کار رفته در این تحقیق، برای فعالیت مؤثر این جدایه‌های آنتاگونیست بر روی قارچ *R. solani* باشد. با این توضیح ممکن است، جدایه *T.h.*BI که در شرایط گلخانه‌ای نسبت به سایر تیمارها کنترل کمتری روی بیماری داشته است، در شرایط مزرعه‌ای (به‌دلیل سازگاری با شرایط خاک مزرعه و هم‌چنین تعامل آن با میکروارگانیسم‌های موجود در آن خاک)، بتواند اثر بهتر و دور از انتظاری نسبت به سایر تیمارها نشان دهد. بنابراین، مطالعه و شناخت شرایط اکولوژیکی مناسب برای جدایه‌های آنتاگونیستی که در شرایط آزمایشگاه و گلخانه اثرات خوبی در کنترل عوامل بیماری‌زا نشان داده‌اند، حائز اهمیت است. با توجه به آنکه گونه‌های تریکودرما با تولید فاکتورهای محرک رشد باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند، به‌نظر می‌رسد این جدایه‌ها در شرایط مزرعه‌ای با درنظر گرفتن وجود مواد آلی و میکروفلور طبیعی خاک، بهتر از شرایط گلخانه‌ای این بیماری را کنترل کنند.

از آنجا که در سال‌های اخیر مطالعه‌های مولکولی گسترش چشمگیری داشته است، پیشنهاد می‌شود با بررسی مولکولی ترکیبات بازدارنده جدایه‌های برتر این تحقیق، ترکیبات مؤثر این جدایه‌ها با کمک علوم مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در مقیاس صنعتی تولید و به منظور بهبود کنترل بیولوژیکی و القای مقاومت سیستمیک در گیاه، به کار گرفته شود.

منابع مورد استفاده: References :

احمدی نژاد، ا. ۱۳۵۲ . مرگ گیاهچه چغندرقند در ایران و کاربرد چند قارچ‌کش علیه عوامل مولد آن. بیماری‌های گیاهی، ۹(۳و۴) : ۱۴۱- ۱۲۹

بازگیر، ع و اخوت، م. ۱۳۷۵. مبارزه بیولوژیک با جدا شده‌هایی از قارچهای آنتاگونیست علیه *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه لوبیا. مجله علوم کشاورزی ایران،۲۷(۱):۷ ۹- ۸۹

حسن‌زاده، ن. ۱۳۷۱. بیوکنترل عوامل بیماریزای خاکزاد گیاهان. انتشارات مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، ۱۷۹ صفحه

روحانی، ح. کریمی، ع و نوع‌پرست، ف. ۱۳۶۹. نقش ایزوله‌های تریکودرمای ایران در مبارزه بیولوژیکی علیه *Rhizoctonia solani* ، آفات و بیماری‌های گیاهی، ۵۸(۱و۲) : ۲۸ -۱۷

نظری، ن. ۱۳۷۰. بررسی اثر چند قارچ‌کش و قارچ *Trichoderma harzianum* روی عامل بوته میری فیتوفترای خیار(*Phytophthora drechsleri*). پایان نامه فوق‌لیسانس، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ۹۰ صفحه

Abada KA (1994) Fungi causing damping – off and root rot on sugar beet and their biological control with *Trichoderma harzianum*. Agriculture Ecosystems and Environment. 51(3):333-357

Ambrosino P,Scala V,Marra R,Vinale F,Soriente I,Ferraioli S,Carbone V (2004) Extracellular proteome of *Trichoderma harzianum* to identify proteins biotechnological value. Journal of Plant Pathology. 86(4, Special issue):295-300

Cherif M,Benhamou N (1990) Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis lycopersici* . Phytopathology. 80(12):1406-1414

Chet I,Baker R (1980) Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology. 70:994-998

Chet I (1998) Potential for use of transgenes to manage *Rhizoctonia* root rot. Phytoparasitica. 26(3):149-155

Ciliento R,Woo S,Ambrosino P,Scala V,RuoccoM,Marra R,Lorito M (2003) Targeted disruption of a new endochitinase-encoding gene in *Trichoderma atroviride*. Journal of Plant Pathology. 85(4,Special issue): 275-280

Cook RJ ,Baker KF (1983) The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. APS Press. 539pp.

Dennis C,Webster J (1971) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma*: II. production of volatile antibiotics. Trans.Br. Mycol. Soc. 57:41-48

Gray FA (1995) Distribution and incidence of sugar beet diseases in the Wind River and Big Horn River Basins of Northwest Wyoming.University of Wyoming, Agricultural Experiment Station Bulletin.B-1031,51pp

Gray FA,Gerik JS (1998) Biology and management of sugar beet diseases in the Big Horn River Basins of Wyoming.University of Wyoming, Cooperative Extension Service Bulletin. B-1063,23pp

Elad Y,Chet I,Boyle P,Henis Y (1983) The parasitism of *Trichoderma* spp. on plant pathogens. Ultrastructural studies and detection by FITC lectins. Phytopatology. 73 :85-88

Hadar Y,Chet I,Jenis Y (1979) Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology. 69:64-68

Harman GE, Taylor AG, Stasz TE (1989) Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatment. Plant Disease. 73 :631-637

Kim HK,Roh MJ (1978) Isolation, identification and evaluation of biocontrol potentials of rhizosphere antagonists to *Rhizoctonia solani*. Korean Journal of Plant Protection. 26(2):89-97

Kohl J,Schlosser E (1989) Effect of *Trichoderma* spp. on seedling of sugar beet during the biological control of pathogens. Mededlingen Van De Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent. 54(2b):707-715

Lewis JA,Papavizas GC (1984) A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. Phytopatology. 74(10):1240-1244

Lewis K,Whipps JM,Cooke RC (1989) Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *P. oligandrum* as an antagonist.In: Whipps JM , Lumsden RD(eds.): Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth.Cambridge University Press. pp.191-217

Papavizas GC (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium* : Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 23-54

Singh J,Faull JL (1988) Antagonism and biological control. In:Mukerji KG, Garg KL(eds.) Biocontrol of Plant Diseases.CRC Press . pp. 167 – 179

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

Tarek A,Moussa A (2002) Studies on biological control of sugar beet pathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. Online Journal of Biological Sciences. 2(12):800-804