فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
جلد ۶، شماره ۳، سال ۱۳۹۳ (۲۷۸-۲۶۵)

تأثیر ترکیبات فرار و غیر فرار جدایه‌های *Trichoderma* spp. در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب‌زمینی

زهرا تقی زاده[1*]، صدیقه محمدی[1]، حسین علایی[2]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، گروه بیماری شناسی گیاهی، شیراز، ایران
۲- دانشگاه ولیعصر(عج) رفسنجان و دانشگاه آزاد سلامی واحد انار ، گروه گیاهپزشکی، رفسنجان، ایران

چکیده

با توجه به قابلیت بالای قارچ *Trichoderma* در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماری زا و با توجه به اینکه قارچ *Fusarium solani*، عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی خسارات زیادی را به محصول وارد می سازد، در این تحقیق اثر هفت گونه از قارچ *Trichoderma* شامل چهار جدایه *T. harzianum* (1, 2, 3, 4) و جدایه‌های *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. virens* علیه بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. آزمون بررسی اثر ترکیبات فرار جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در حالت کشت *Trichoderma* ، ۴۸ ساعت قبل از کشت *F. solani* به روش پتری های روی هم انجام گرفت و مشخص شد که ترکیبات فرار کلیه جدایه های مورد آزمایش، از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر جلوگیری به عمل آوردند و جدایه *T. longibrachiatum* بیشترین و جدایه‌ی*T. harzianum*3 کمترین فعالیت آنتی بیوزی را در بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *F. solani* داشته است. در بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *Trichoderma* مشخص شد که ترشحات مایع جدایه‌های(1, 2) *T. harzianum* به میزان پنج و ده میلی‌لیتر به ترتیب به میزان ۹/۷۶ و ۱۴/۲۸ درصد بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* داشته است.

واژه‌های کلیدی: جدایه های *Trichoderma*، *Fusarium*، مکانیسم‌های آنتاگونیستی

---

[*]مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: taghizadeh_1642@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۰۳

مقدمه

سیب‌زمینی یکی از مهمترین منابع غذایی گیاهی بشر است. با توجه به روند روبه‌رشد جمعیت جهان به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه و توسعه نیافته و مشکل شرایط نامطلوب تغذیه در بسیاری از این کشورها، سیب‌زمینی در تغذیه مردم این مناطق نقش بسیار مهمی یافته است (Khorasani-Aghazadeh*et al*., 2009).

حدود ۳۰۰ عامل بیماری‌زا و آفت در این گیاه شناخته شده است که انتقال آن‌ها از طریق غده‌های آلوده به نسل بعد می‌تواند باعث کاهش محصول حتی تا ۹۰ درصد گردد (Pajohandeh, 2001).

شایع‌ترین نوع پوسیدگی‌های غده و قطعات بذری در انبار و مزرعه، پوسیدگی خشک فوزاریومی است. کشت غده‌های بذری آلوده موجب پوسیدگی غده‌ها و قطعات بذری شده و کاهش تعداد بوته در واحد سطح و در نتیجه کاهش عملکرد را در برخواهد داشت (Theron and Holz, 2010).

قارچ *Fusarium solani* به عنوان عامل اصلی بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومیسیب‌زمینی شناخته شده است (Stevenson *et al*., 2011).

علی‌رغم این‌که یکی از روش‌های متداول کنترل عوامل بیماری‌زا و کاهش خسارت ناشی از آن‌ها در گیاهان استفاده از سموم شیمیایی می‌باشد، در مورد این بیماری مصرف سموم به دلیل عدم کارآیی و عوارض زیست‌محیطی توصیه نمی‌شود. از این‌رو به‌نظر می‌رسد که استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست بومی منطقه به‌منظور کنترل بیماری، گامی مؤثر در جهت کاهش خسارت ناشی از بیمارگر باشد. امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای خاکزاد با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست قریب به ۸۰ سال است که مورد توجه محققین قرار گرفته است (Sliningere*t al*., 2003).

آثار سوء اکثر قارچ‌کش‌ها در کشاورزی موجب شده است که روش‌های تلفیقی و به‌ویژه غیر شیمیایی از جمله بیولوژیک مورد توجه قرار گیرند که در این راستا از قارچ‌های آنتاگونیست از جمله قارچ *Trichoderma* spp. استفاده می‌گردد (Vinal*et al*., 2008).

قارچ تریکودرما بسیار سریع الرشد و ساپروفیت بسیار قوی است با تولید اسپورهای قوی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی مانند سلولاز، کیتیناز، بتاگلوکوناز و تولیدآنتی‌بیوتیک قادر به تجزیه هیدرات‌های‌کربن، ترکیبات کلروفنولیک و پلی‌ساکاریدها هستند و در کشاورزی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند (Harman *et al*., 2004).

فعالیت آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما را می‌توان به تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های دیواره سلولی‌شان نسبت داد (Sharma *et al*., 2009).

اغلب استرین‌های *Trichoderma* spp. مواد خارج سلولی فرار و غیرفرار سمی تولید کرده که رشد عوامل بیماری‌زای قارچی را متوقف می‌کنند و یا به‌طرز چشمگیری کاهش می‌دهند (Chet *et al*., 1997).

بررسی کارایی جدایه‌های *T. viride*، در کنترل بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب‌زمینی نشان داد که این جدایه به میزان ۵۷/۸ درصد از رشد شعاعی *F. solani* درشرایط آزمایشگاه و به میزان ۷۳-۷۰ درصد از رشد *F. solani* در مزرعه جلوگیری کرد (Ebtsam*et al*., 2009).

در این تحقیق تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست مذکور در کنترل قارچ *F. solani* عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی، در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عوامل بیوکنترل

جدایه‌های *T. harzianum* (1,2,3,4)، *T. virens*، *T. koningii* و *T. longibrachiatum* از خاک باغات پسته کرمان توسط نویسنده دوم جداسازی شد و در اختیار قرار گرفت.

تهیه قارچ عامل بیماری

پرگنه قارچ *F. solani* توسط نویسنده سوم از غده‌های سیب‌زمینی مزارع سیب‌زمینی شهرستان جیرفت جداسازی شد و در اختیار قرار گرفت و به منظور خالص‌سازی قارچ از روش تک‌اسپور[1] استفاده شد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

جهت انجام آزمون اثبات بیماریزایی از اصول کخ استفاده گردید. بر این اساس جدایه‌های خالص شده به محیط CLA[2] منتقل شدند و پس از تشکیل کنیدیوم روی برگ میخک (حدود ۱۴ روز) یک لوپ، از اسپورهای روی برگ میخک به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل و سپس با استفاده از لام گلبول‌شمار(هموسایتومتر) تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر به 10^4اسپور تنظیم شد (Fisher *et al*., 1983). برای مایه‌زنی سوسپانسیون اسپور مزبور از غده‌های با ظاهری سالم که به مدت ۳ ماه در سردخانه در دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شده بودند استفاده گردید. غده‌های مزبور دو روز قبل از مایه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند(Boyd, 1972) . غده‌ها در محلول هیپوکلریدسدیم ۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شده و پس از شستشو با آب مقطر استریل، خشک شدند. در دو انتهای غده‌ها با استفاده از یک

[1]Single spore
[2]Carnation leaf agar

میله استریل نوک تیز، حفره‌هایی به عمق تقریبی ۰/۳سانتی‌متر ایجاد و ۰/۲ از سوسپانسیون اسپور که رقت آن قبلاً تنظیم شده بود در حفره‌های موجود در بافت غده تزریق و دهانه منفذ با پارافین جامد ذوب شده مسدود گردید. غده‌ها داخل پاکت کاغذی به مدت سه هفته در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس در اتاقک حرارت ثابت و در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت زمان، علائم بیماری مشاهده شد سپس اقدام به جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مجدد قارچ گردید و مشخص شد که جدایه‌های به‌دست آمده با جدایه‌های تلقیح شده، از نظر خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مطابقت داشتند.

بررسی اثر متابولیت‌های فرار (گازی) جدایه‌های مختلف آناگونیست Trichoderma در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر F. solani

این آزمون به‌منظور بررسی اثر ترشحات فرار جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ عامل بیماری انجام گرفت (Denis & Webester, 1971). در این آزمایش از روش پتری‌های روی هم استفاده گردید به‌طوری که تشتک پتری حاوی قارچ عامل بیماری در بالا و تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های آنتاگونیست در پایین قرار گرفتند. مراحل انجام این آزمون به شرح زیر بود: ابتدا در تشتک‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری، ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA ریخته شد و پس از انعقاد، در وسط هرکدام از آن‌ها یک بلوک پنج میلی‌متری از حاشیه کشت چهار روزه هرکدام از جدایه‌های آنتاگونیست قرار داده شد. در وسط تشتک‌های پتری مربوط به تیمار شاهد به جای بلوک پنج میلی‌متری از جدایه‌های آنتاگونیست، یک بلوک پنج میلی‌متری از محیط کشت PDA قرار گرفت. پس از گذشت ۴۸ ساعت، در وسط تشتک‌های پتری دیگری یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه کشت چهار روزه *F. solani* قرار داده شد. سپس با رعایت شرایط استریل، درب‌های هر دو گروه از پتری‌ها برداشته شد و پتری‌های حاوی *F. solani* به صورت وارونه روی پتری‌های حاوی جدایه‌های آنتاگونیست قرار گرفت تا تماس این دو قارچ فقط از طریق متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما باشد.

سپس تشتک‌های پتری روی هم قرار داده شده، با نوارهای پارافیلم به خوبی مسدود شدند تا ارتباط دو پتری با محیط خارج کامل قطع شده و از خروج ترکیبات فرار به خارج جلوگیری گردد.

تشتک‌های پتری در انکوباتور با حرارت ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اندازه‌گیری قطر حلقه‌های رشدی *F. solani* به فاصله‌های زمانی ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد.

درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *F. solani* در اثر متابولیت‌های فرار با استفاده از رابطه یک بدست آمد:

$$\frac{A - B}{A} \times 100 \qquad \text{رابطه (۱)}$$

A: قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد

B: قطر پرگنه قارچ بیمارگردر اثر ترشحات مایع خارج سلولی هر کدام از جدایه‌های آنتاگونیست

این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با هشت تیمار در سه تکرار انجام گرفت. داده‌های بدست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح $p \leq ۱٪$ و $p \leq ۵٪$ با یکدیگر مقایسه شدند (Little & Hilz, 1978).

بررسی اثر ترشحات مایع[1] جدایه های مختلف آنتاگونیست Trichoderma در جلوگیری از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر F. solani

این آزمون به منظور بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی (ترکیبات غیر فرار) جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسیلیوم *F. solani* انجام شد. جهت انجام این آزمایش نیاز به تهیه ترشحات مایع جدایه‌های آنتاگونیست بود. بدین منظور ابتدا محیط کشت مایع PDB برای جدایه‌های تریکودرما تهیه گردید.

در هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت ریخته و در دستگاه اتوکلاو با فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۵ دقیقه سترون شد. پس از سرد شدن محیط مایع، هر کدام ارلن‌ها با سه بلوک پنج میلی‌متری از حاشیه کشت سه روزه یکی از جدایه‌های آنتاگونیست تلقیح شد. در ارلن مربوط به تیمار شاهد هیچ قارچی اضافه نگردید و تنها سه بلوک پنج میلی‌متری از محیط‌کشت PDA به آن اضافه شد.

مشخصات جدایه‌ها و تاریخ انجام آزمایش بر روی ارلن‌ها درج گردید. ارلن‌ها به مدت یک هفته روی دستگاه تکان دهنده[2] با ۹۰rpm (تکان در دقیقه) قرار داده شد. برای تهیه ترشحات مایع، ابتدا محیط‌کشت‌های مایعی که جدایه‌های قارچ آنتاگونیست در آن رشد نموده بودند از کاغذ صافی استریل عبور داده شدند. دراین مرحله میسلیوم و اسپورهای آن‌ها گرفته شد، سپس با عبور از صافی‌های milipore که قطر روزنه آن ۰/۲۲ میکرون بود عصاره آن‌ها سترون و جداسازی شد.

در این آزمایش برای هر جدایه آنتاگونیست دو تیمار پنج و ده میلی‌لیتری از عصاره در نظر گرفته شد. عصاره‌ها درون تشتک‌های پتری ریخته شدند و سپس محیط کشت PDA با درجه حرارت محیط به آن‌ها اضافه شد و به خوبی مخلوط گردیدند. برای تیمار شاهد، پنج و ده میلی‌لیتر محیط کشت مایع فیلتر شده به محیط کشت PDA اضافه گردید.پس از انعقاد محیط

[1] Non volatile
[2] Shaker

کشت حاوی عصاره جدایه‌های آنتاگونیست، در وسط هر تشتک پتری یک بلوک به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ *F. solani* قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

یادداشت‌برداری در فواصل زمانی ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت عامل بیماری انجام گرفت و در هر مرحله یادداشت‌برداری قطر حلقه رشدی میسیلیوم عامل بیماری بر حسب میلی‌متراندازه‌گیری و ثبت شد. در این آزمایش درصد بازدارندگی از رشد مسیسلیوم قارچ عامل بیماری با استفاده از رابطه یک زیر به دست آمد.

این آزمایش در قالب دو طرح کامل تصادفی (برای غلظت‌هایml ۵ و ۱۰ml) هرکدام با هشت تیمار در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده از این آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح$p \leq \%1$ و $p \leq \%5$ با یکدیگر مقایسه شدند(Little & Hilz, 1978).

نتایج

بررسی تأثیر متابولیت‌های فرار (گازی) جدایه‌های مختلف آنتاگونیست در جلوگیری از رشد میسلیوم F. solani

الف- نوبت اول اندازه‌گیری (۲۴ ساعت پس از کشت)

به احتمال ۹۹ درصد بین جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش رشد میسلیوم *F. solani* در ۲۴ ساعت پس از تلقیح، اختلاف معنی دار وجود داشت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول یک مشاهده می‌شود.

جدول ۱- تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم *Fusarium solani* توسط متابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست در فواصل زمانی مختلف

Table 1. Simple variance analysis of inhibition percent of mycelium of *Fusarium solani* by extera cellular Volatile metabolite of antagonists isolates in different periods of time

Sources of Variance	Degrees of freedom	Mean Squares		
		24 h	48h	72h
Treatments	7	1311.73 **	2058.73**	2688.12 **
Error	16	8.44	23.19	14.98
Coefficient of Variance (%)	-	6.98	7.75	5.30

با مقایسه میزان درصد بازدارندگی ناشی از متابولیت‌های فرارجدایه‌های آنتاگونیست از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شدکه تمام جدایه‌های آنتاگونیست به میزان ۳۶/۱۱ درصد، اثربازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* را داشته‌اند و همگی در یک گروه آماری قرار دارند.

ب- نوبت دوم اندازه‌گیری (۴۸ ساعت پس از کشت)

به احتمال ۹۹ درصد بین جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش رشد میسلیوم *F. solani* در ۴۸ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی دار وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول یک مشاهده می‌شود.

با مقایسه میزان درصد بازدارندگی ناشی ازمتابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که جدایه *T. longibrachiatum* به میزان ۶۱/۳۲ درصد، بیشترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم*F. solani* داشته است و جز گروه آماری a قرار دارد.

ج- نوبت سوم اندازه‌گیری (۷۲ ساعت پس از کشت)

به احتمال ۹۹ درصد بین جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش رشد میسلیوم *F. solani* در ۷۲ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی دار وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول۱ مشاهده می‌شود.

با مقایسه درصد بازدارندگی حاصل از اثرمتابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست از رشد میسلیوم*F. solani* ملاحظه می‌شود که جدایه*T. Longibrachiatum*، *T. harzianum4* و *T. harzianum1* به ترتیب به میزان ۷۲/۸۸، ۶۲/۷۳ و ۶۱/۵۲ درصد، بیشترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم*F. Solani* داشته است و در گروه آماری a قرار دارد و جدایه‌های *T. harzianum*3 و *T. virens* به ترتیب به میزان ۴۹/۷۴ و ۵۶/۱۹ درصدکمترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* داشته است که در گروه آماری c قرار دارند.

بررسی تأثیر ترشحات مایع(Culture filterate) آنتاگونیست‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم Fusarium solani (میزان ۵ میلی‌لیتر)

الف- نوبت اول اندازه‌گیری (۲۴ ساعت پس از کشت)

مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، مشخص نمود که بین جدایه‌های آنتاگونیست از نظر ترشحات مایع خارج سلولی (۵ میلی‌لیتر) در جلوگیری از رشد میسلیوم *F. solani* در ۲۴ ساعت پس از تلقیح، اختلاف معنی داری وجود نداشت. نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد بازدارندگی از رشد در جدول دو مشاهده می‌شود.

جدول ۲- تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم *Fusarium solani* توسط ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست به میزان 5ml درفواصل زمانی مختلف

Table 2. Simple variance analysis of inhibition percent of mycelium of *Fusarium solani* by extera cellular Non Volatile metabolite of antagonists isolates with the amount of 5ml in different periods of time

Sources of Variance	Degrees of freedom	Mean Squares		
		24 h	48h	72h
Treatments	7	0.7 ^{ns}	0.001**	0.004 **
Error	16	0.7	0.0002	0.001
Coefficient of Variance (%)	-	2.12	22.47	14.04

با مقایسه درصد بازدارندگی ناشی از اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌هایآنتاگونیست به میزان ۵ میلی‌لیتر از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که بین شاهد و آنتاگونیست‌ها تفاوت آماری معنی‌دار وجود نداشت و میزان کنترل بیمارگر صفر درصد بوده است.

ب- نوبت دوم اندازه‌گیری (۴۸ ساعت پس از کشت)

به احتمال ۹۹ درصد بین جدایه‌های آنتاگونیست از نظر ترشحات مایع خارج سلولی (۵ میلی‌لیتر) در جلوگیری از رشد میسلیوم *F. solani* در ۴۸ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد بازدارندگی از رشد در جدول2 مشاهده می‌شود.

با مقایسه درصد بازدارندگی حاصل از اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست به میزان ۵ میلی‌لیتر از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که جدایه‌های *T.harzianum*4 و *T. harzianum*2 به ترتیب به میزان ۳/۹۴ و۳/۵ درصد، بیشترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* داشتند و در یک گروه آماری مشترک قرار گرفتند و کمترین میزان بازدارندگی توسط جدایه‌های*T. koningii*، *T. harzianum*2، *T. virens* و *T. harzianum*3 بود که با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند.

ج- نوبت سوم اندازه‌گیری (۷۲ ساعت پس از کشت)

به احتمال ۹۹ درصد بین جدایه‌های آنتاگونیست از نظر ترشحات مایع خارج سلولی (۵ میلی‌لیتر) در جلوگیری از رشد میسلیوم *F. solani* در ۷۲ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول دو مشاهده می‌شود.

با مقایسه درصد بازدارندگی حاصل از اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست به میزان ۵ میلی‌لیتر از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که جدایه‌های *T.*

*harzianum*4 و *T. harzianum*2 به ترتیب به میزان ۹/۷۶ و ۹/۷۶ درصد، بیشترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* داشته است و این جدایه‌ها در گروه آماری مشترک a قرار دارند و سایر جدایه‌ها در گروه آماری b قرار دارند.

بررسی تأثیر ترشحات مایع (Culture filterate) آنتاگونیست‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم Fusarium solani (میزان ۱۰ میلی‌لیتر)

الف- نوبت اول اندازه‌گیری (۲۴ ساعت پس از کشت)

مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد، مشخص می‌کند بین جدایه‌های آنتاگونیست از نظر ترشحات مایع خارج سلولی (۱۰ میلی‌لیتر) در جلوگیری از رشد میسلیوم *F. solani* در ۲۴ ساعت پس از تلقیح، اختلاف معنی داری وجود ندارد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

با مقایسه درصد بازدارندگی حاصل از اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست به میزان ۵ میلی‌لیتر از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که بین شاهد و آنتاگونیست‌ها تفاوت آماری معنی‌دار وجود نداشت و میزان کنترل بیمارگر صفر درصد بوده است.

جدول ۳- تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم *Fusarium solani* توسط ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست به میزان ۱۰ ml درفواصل زمانی مختلف

Table 3. Simple variance analysis of inhibition percent of mycelium of *Fusarium solani* by extera cellular Non Volatile metabolite of antagonists isolates with the amount of 10ml in different periods of time

Sources of Variance	Degrees of freedom	Mean Squares		
		24 h	48h	72h
Treatments	7	0.7 ns	0.054**	0.002 **
Error	16		0.0003	0.0002
Coefficient of Variance (%)	-	2.12	21.61	24.91

ب- نوبت دوم اندازه‌گیری (۴۸ ساعت پس از کشت)

به احتمال۹۹ درصد بین جدایه‌هایآنتاگونیست از نظر تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی (۱۰ میلی‌لیتر) در جلوگیری از رشد میسلیوم *F. solani* در ۴۸ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول سه مشاهده می‌شود.

با مقایسه درصد بازدارندگی ناشی از اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌هایآنتاگونیست به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که جدایه‌های*T. harzianum*2 و *T. harzianum*4 به ترتیب به میزان ۴/۳۸ و ۴/۳۸ درصد، بیشترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* داشتند که در یک گروه آماری مشترک قرار گرفتند و جدایه *T. longibrachiatum* به میزان ۱/۷۵ درصد موجب بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر شده است و میزان کنترل توسط سایر آنتاگونیست‌ها، صفر درصد بوده است که همگی در یک گروه آماری قرار دارند.

ج-نوبت سوم اندازه‌گیری (۷۲ ساعت پس از کشت)

به احتمال ۹۹ درصد بین جدایه‌های آنتاگونیست از نظر تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی (۱۰ میلی‌لیتر) در جلوگیری از رشد میسلیوم *F. solani* در ۷۲ ساعت پس از تلقیح اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس ساده درصد بازدارندگی از رشد در جدول سه مشاهده می‌شود.

با مقایسه درصد بازدارندگی حاصل از اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌هایآنتاگونیست به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از رشد میسلیوم *F. solani* ملاحظه شد که جدایه‌های *T. harzianum*2، *T .harzianum*4 و *T. harzianum*1 به ترتیب به میزان ۱۴/۲۸، ۱۴/۲۸و ۹/۳۶ درصد، بیشترین اثر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. solani* داشتند و در یک گروه آماری مشترک قرار گرفتند.

بحث

یکی از مشکلات بزرگ در انبارداری سیب‌زمینی و مزارع تحت کشت سیب‌زمینی، بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی می‌باشد. در بین عوامل ایجاد این بیماری، *Fusarium solani* در ایران و دنیا شیوع زیادی دارد (Nasr-Esfahani, 1998 ; Cullen *et al*., 2005).

در بررسی‌های مربوط به آنتی‌بیوز، دو آزمون بررسی اثر ترشحات فرار و غیرفرارجدایه‌های مختلف *Trichoderma* spp. علیه *F. solani* عامل پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب‌زمینی انجام گرفت. این آزمون مشخص کرد که جدایه‌های مختلف آنتاگونیست‌ها از نظر توانایی تولید مواد فرارغیرفرار و ممانعت از رشد قارچ میزبان متفاوتند، به همین دلیل بعضی از جدایه‌های*Trichoderma* spp. مانند جدایه *T. longibrachiatum* تأثیر بیشتری در ممانعت از

رشد *F. solani* داشتند. این نتایج با نتایج Mohammadi *et al.* (2004) در کنترل *Rhizoctonia solani* مطابقت دارد.

متابولیت‌های فرار (گازی) *Trichoderma* spp. در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ عامل بیماری هنگامی‌که جدایه‌های آنتاگونیست ۴۸ ساعت قبل از *F. solani* کشت داده شده بودند، مؤثر بوده است. ترکیبات فرار جدایه *T. longibrachiatum* پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان کشت، با ۷۲/۸۸ درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ *F. solani* بیشترین اثر را در جلوگیری از رشد عامل بیماری داشت. درصد بازداری از رشد قارچ *F. solani* در اثر ترکیبات فرار با گذشت زمان افزایش یافته و یک روند صعودی نسبت به زمان کشت داشت که ممکن است به دلیل تجمع بیشتر ترکیبات فرار طی گذشت زمان در محیط بسته داخل تشتک پتری باشد، چنین نتایجی در تحقیقات Chavan *et al.* (2009) نیز مشاهده شد.

در آزمایش متابولیت‌های فرار، سایر جدایه‌های *Trichoderma spp.* به میزان بیش از ۴۵ درصد از رشد میسلیومی *F. solani* جلوگیری کردند. لذا جدایه‌های *Trichoderma* spp. در آزمایشگاه با تأثیر از طریق ترکیبات گازی و همچنین با مکانیسم‌های هیپرپارازیتیسم، رقابت تغذیه‌ای و آنتی‌بیوز توانستند از رشد قارچ بیماری‌زای *F. solani* بکاهند (Otadoh*et al.*, 2011).

Zeppa *et al.* (1991) 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 مؤثرند.متابولیت‌های فرار و غیرفرارمی‌توانند در خلل و فرج خاک انتشار یافته و نیازی به تماس مستقیم به عامل بیماری برای تأثیرگذاری آن‌ها نمی‌باشد. شعاع تأثیر و نفوذ این آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالاً دایره‌ای است که شعاع آن رابطه معکوس با وزن مولکولی ماده شیمیایی تولید شده، ماهیت جذبی محیط و توانایی ارگانیسم‌ها برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و رابطه مستقیم با حلالیت و رطوبت خاک دارد(Baker and cook, 1974).

در آزمایش بررسی ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *Trichoderma* spp. مشخص شد با اضافه کردن ۵ میلی‌لیتر از ترشحات مایع جدایه‌های *T. harzianum*2 و *T. harzianum*3 به محیط کشت PDA، رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری به ترتیب به میزان ۹/۷۶ و ۹/۷۶ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته است و با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر از ترشحات مایع جدایه‌های *T. harzianum*2 و *T. harzianum*4 به محیط کشت PDA، رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری به ترتیب به میزان ۱۴/۲۸ و ۱۴/۲۸ درصد، نسبت به شاهد کاهش یافته است. نتایج این آزمایش و آزمایشات Mohammadi *et al.* (2004) نشان داد

استفاده از ترکیبات غیرفرار مکانیسم آنتاگونیستی مهم *Trichoderma* spp. علیه بیمارگر می‌باشد.

در مورد نوع مواد موجود در متابولیت‌های غیرفرار تریکودرما، تحقیقات زیادی توسط پژوهشگران متعدد انجام و مشخص شده است که آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز، بتا ۱ و ۳-گلوکاناز، اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و همچنین آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند Trichodermin، Alamethicin، Paracelsin، Trichotoxin،Gliotoxin و Virdin توسط استرین‌های مختلف تریکودرما تولید می‌شوند که نقش مؤثری را در چگونگی کنترل بیولوژیکی ایفا می‌کنند (Dennis & Webester. 1971; Elad *et al*., 1982; Papavizas, 1985).

منابع

Baker, R. & Cook,R.J. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. W.H.Freeman, Sanfrancisco, USA

Boyd, A. E. W. 1972. Potato storage diseases. *Review of Plant Pathology*, 51: 297-321

Chavan,S.C.,Hegde,Y.R. & Prashanthi, S. K. 2009. Management of wilt of patchouli caused by *Fusarium solani*. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 39: 32-34

Chet, I. 1997. Trichoderma– application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi. John Wiley and Sons, New York, USA

Cullen, D. W., Toth, I. K., Pitkin, Y., Boonham, N., Walsa, K., Barker, I. & Lees, A. K. 2005. Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil. *Phytopathology Journal*, 95: 1462-1471

Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* (II. Production of volatile antibiotics). *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41-48

Ebtsam, M., Abdel-Kawi, K. A. & Khalil, M. N. A. 2009. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as Biocontrol Agents gainst *Fusarium solani* on Tomato Plants. *Phytopathology*, 37: 47-57

Elad, Y., Chet, I. & Henis, Y. 1982. Degradation of plantpathogenic fungi by *Trichoderma harizianum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 28: 719-725

Fisher, N. L., Burgess, L. W., Toussoun, T. A. & Nelson, P. E. 1983. Carnation leaves assubstrate for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology Journal*, 72: 151-153

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet,I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 45-56

Khorasani-Aghazadeh, M., Alizadeh, A. & Safayi, N. 2009. Biological control of Fusarium wilt of potato using antagonistic strains of bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 44: 1-21

Little, T. M. & Hills, F. J. 1978. *Agricultural experimentation design and analysis*. John willey and Sons, New York, USA

Mohammadi, S., Mansoori, B., Zamani-zade, H. R. & Heydari, A. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani* the casual agent of wet root rot of chickpea in greenhouse condition. *Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, 29 Agu-2 Sept. 2001, Tabriz, Iran*, Tabriz University, p. 251

Nasr-Esfahani, M. 1998. *Fusarium* species associated with dry rot of potato tubers in Esfahan. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 34: 225-232

Otadoh, J. A., Okoth, S. A., Ochanda, J. & Kahindi, J. P. 2011. Assessment of *Trichoderma* isolates for virulence efficacy on *Fusarium oxysporum*f. sp. *phaseoli*. *Ropical and subtropical agroecosystems*, 13: 99-107

Pajohandeh, M. 2001. *Creation of in vitro bank of germplasm virus-free potato*. M.Sc. thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Papavizas. G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and potential for biological control. Ann. Rev. *Phytopathology*, 23: 54-64

Sharma, K., Kumar, M. & Misra, R. M. 2009. Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum*isolates for their efficacy as biocontrol agents. *Journal of Phytopathology*, 157: 51-56

Slininger, P. J., Schisler, D. A., Burkhead, K. D. & Bothast, R. J. 2003. Postharvest Biological control of potato sprouting by Fusarium Dry rot Suppressive Bacteria. *Biocontrol science and Technology*, 5: 471-494

Stevenson, W., Loria, R., Franc, G. & Weingartner, D. P. 2011. *Compendium of Potato Diseases*, 1: 73-80

Theron,D.J. & Holz,G. 2010. Prediction of potato dry rot based on the presence of *Fusarium* in soil adhering to tuber at harvest. *Plant Disease*, 75: 126-130

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, S. L. & Lorito, M. 2008. *Trichoderma*– plant pathogens interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 1-10

Zeppa, G., Allengron, G., Barbeni, M. & Guarda, P. A. 1991. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride. Review of Plant Pathology*, 70: 604-609