

اثر بازدارندگی پنج جدایه *Trichoderma* روی رشد قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* در شرایط آزمایشگاهی

۱. زینب کرماجانی؛ ۲. عبدالحسین جمالی زواره*؛ ۳. علی اکبر فدایی تهرانی
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، استادیار و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۰)

چکیده

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) یکی از چهار گل شاخه بریده عمده صادراتی ایران است. بیماری پژمردگی میخک در اثر *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* از مخرب‌ترین بیماری‌های این گیاه در بیشتر مناطق پرورش آن در دنیا به حساب می‌آید. برای بررسی امکان به‌کارگیری مبارزه بیولوژیک، اثر بازدارندگی از رشد پنج جدایه تریکودرما شامل سه جدایه *Trichoderma harzianum* تهیه شده از کرج (Th1)، شهرکرد (Th2) و همدان (Th3)، یک جدایه *T. virens* (Tv) و یک جدایه *T. atroviride* (Ta) هر دو از همدان، روی قارچ *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* جدا شده از میخک محلات در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش کشت متقابل بیشترین بازدارندگی از رشد پرگنه فوزاریوم تحت اثر جدایه Th3 و کمترین آن توسط Ta مشاهده شد. عصاره کشت جدایه Th1 بیشترین بازدارندگی را از رشد پرگنه بیمارگر داشتند در حالی که عصاره کشت جدایه Th3 کمترین اثر را بر رشد نشان داد. در آزمایش اثر مواد فرار آنتاگونیست، بیشترین ممانعت از رشد پرگنه فوزاریوم مربوط به جدایه Ta و کمترین آن مربوط به جدایه Th3 بوده است.

کلیدواژگان: پژمردگی فوزاریومی، کنترل بیولوژیک، میخک، محلات.

In vitro inhibitory effects of five strains of *Trichoderma* on the growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Zeinab Kermajany¹, Abdhussain Jamali Zavareh^{2*} and Aliakbar Fadaei Tehrani³

1, 2, 3. M.Sc. Student in Plant Pathology, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
(Received: Mar. 13, 2016 - Accepted: Jul. 31, 2016)

ABSTRACT

Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is one of the four major exporting cut flowers from Iran. Carnation wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* is considered the most destructive diseases of plant in most carnation growing regions of the world. To investigate the possibility of using biological control, the growth inhibitory effects of five isolates of *Trichoderma*, including three isolates of *Trichoderma harzianum* obtained from Karaj (Th1), Shahrekord (Th2) and Hamedan (Th3), and two isolates *T. virens* (Tv) and *T. atroviride* (Ta) from Hamedan, studied *in vitro* on the *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* isolated from Mahalat Carnation. The greatest growth inhibition in dual culture test was occurred with the Th3 isolate and the lowest inhibition observed by Ta. Culture extracts of Th1 isolate caused maximum inhibition of pathogen growth, while that of Th3 isolate showed minimal impact on its growth. Bioassay for production of antagonist volatile metabolites showed that the most growth inhibition was observed with the Ta isolate the least effective was recorded with Th3 isolate.

Keywords: Biological control, Carnation, *Fusarium* wilt, Mahalat.

* Corresponding author E-mail: ahjamaliz@yahoo.com

اسپور و کشت نوک ریشه (Nelson 1983) انجام شد. بیماری‌زایی جدایه به‌دست آمده روی قلمه‌های میخک اثبات شد.

تهیه و تکثیر جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های مختلف تریکودرما، شامل سه جدایه *Trichoderma harzianum* تهیه شده از دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی شهرکرد و دانشکده کشاورزی همدان، یک جدایه *T. virens* و یک جدایه *T. atroviride* هر دو از دانشکده کشاورزی همدان، در آزمایشات استفاده شدند. برای بررسی اثرات جدایه‌های آنتاگونیست روی بیمارگر، از سه روش کشت متقابل، تأثیر مواد فرآر و اثر ترشحات سلولی به شرح زیر استفاده شد.

کشت متقابل

جهت مقایسه قدرت رقابت ساپروفیتی جدایه‌های مختلف تریکودرما از روش کشت متقابل استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار (شامل پنج سطح از جدایه‌های تریکودرما و تیمار شاهد) و سه تکرار اجرا گردید. (Dennis and Webster 1971).

اثر ترکیبات فرآر

آزمایش بصورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در تیمارهای مختلف از محیط کشت حاوی جدایه تریکودرما که بمدت صفر، ۲۴ و یا ۴۸ ساعت رشد کرده بود، و محیط کشت تازه تلقیح شده از *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*، استفاده شد. درب تشتک پتری قارچ بیمارگر و تشتک حاوی جدایه تریکودرما موردنظر برداشته و دو تشتک مقابل هم قرار گرفتند. تشتک حاوی قارچ بیمارگر در بالا و تشتک حاوی آنتاگونیست در پایین قرار گیرد. پس از ۷۲ ساعت اقدام به اندازه‌گیری قطر کلونی قارچ بیمارگر در تیمارهای مختلف و مقایسه آن با شاهد شد.

بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) آزمایش بصورت فاکتوریل دو عاملی در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. محیط کشت‌های PDA حاوی

تازه‌های تحقیق

بررسی رابطه بین گونه *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* و گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* برای اولین بار در ایران صورت گرفته است. در این تحقیق سعی کردیم در عمل روش‌های کاربردی را تا حدی بررسی کنیم.

مقدمه

میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) از خانواده کاریوفیلانسه جزء چهار نوع گل اصلی شاخه بریده صادراتی ایران می‌باشد. میخک در شهرستان محلات به صورت گل شاخه بریده تولید می‌شود و معمولاً طول دوره اقتصادی تولید آن دو سال است. بیماری پژمردگی فوزاریومی که عامل آن *Fusarium oxysporum* Schlechtend Fr f.sp. *dianthi* (Prill & Delacr) W.C.Snyder & H.N.Hans می‌باشد، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های میخک در بیشتر مناطق تولید این گل در دنیا به حساب می‌آید (Ben 1997). این بیماری در ایران اولین بار در سال ۱۳۷۵ از منطقه ورامین (Etebarian 1996) و سپس از محلات در سال ۱۳۷۹ گزارش شده است بیشترین خسارت در ماه‌های خرداد تا اواخر مهرماه می‌باشد (Mirabolfathy 2000). قارچ تریکودرما با تولید متابولیت‌های ثانویه فرآر و غیرفرآر رشد ریشه بیمارگر را محدود کرده و با تولید آنزیم‌های متفاوت دیواره میسلیوم قارچ بیماری‌زا را تخریب می‌کند. این آنتاگونیست با رقابت تغذیه‌ای قوی به راحتی ریزوسفر را تسخیر نموده و مانع رسیدن بیمارگر به ریشه می‌شود (Peyghamy 1991). توجه به نقش آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *Trichoderma* روی قارچ‌های مختلف از جمله جنس فوزاریوم، در این تحقیق توانایی پنج جدایه مختلف تریکودرما در بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* در روی محیط کشت PDA به سه روش کشت متقابل، تولید مواد فرآر و اثر ترشحات خارج سلولی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی قارچ عامل بیماری جداسازی بیمارگر از بافت آلوده میزبان به روش (Nash 1962) و خالص‌سازی جدایه به روش‌های کشت تک

اثربخشی تریکودرما در کنترل بیمارگرها و اختلاف اثر جدایه‌های مختلف هماهنگی دارد. چنانکه اشرفی‌زاده و همکاران نشان دادند که *Trichoderma* sp. جدایه ۹۶ مانع از رشد عامل بیمارگر *F. oxysporum* f.sp. *melonis* گردیده ولی بر روی کلونی عامل بیمارگر پیشروی نکرده است (Ashrafizadeh et al. 2005).

اثر ترکیبات فرآر

از نظر تأثیر ترکیبات فرآر همه ایزوله‌های تریکودرما دارای تأثیر یکسانی نبودند و در مقام مقایسه جدایه Ta بیشترین تأثیر را نشان داده است. همچنین با افزایش مدت زمان رشد قارچ آنتاگونیست قبل از آزمایش، میزان تأثیر تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیمی بیمارگر بیشتر شده و ۴۸ ساعت رشد قبل از آزمایش، در مجموع اثر بیشتری در جلوگیری از رشد میسلیمی قارچ بیمارگر داشته است در مقایسه میانگین اثرات متقابل دو عامل نیز تیمار جدایه Ta با ۴۸ ساعت رشد قبل از آزمایش بیشترین بازدارندگی از رشد بیمارگر را ایجاد کرده است (شکل ۲). نتایج تحقیقات سایر محققین نشان می‌دهد که گونه‌های مختلف تریکودرما دامنه‌ای از آنتی بیوتیک‌های فرآر را تولید می‌کنند که تأثیرات متفاوتی روی قارچ‌های مختلف دارد. در بررسی‌های صورت گرفته استالدئید را به‌عنوان عمده‌ترین ترکیب کربنیل‌دار در متابولیت‌های فرآر *T. viride* مشخص نموده‌اند. همچنین مشتقات هیدروژن را از ترشحات فرآر Tv جدا نموده‌اند (Dennis and Webster 1971).

غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد از عصاره کشت هر یک از جدایه‌های تریکودرما تهیه شد (در سه تکرار). سپس قرص‌های پنج میلی‌متری از قارچ بیمارگر در سطح محیط کشت منعقد شده قرار گرفت. با گذشت ۷۲ ساعت اقدام به اندازه‌گیری قطر کلونی قارچ بیماری‌زا شد.

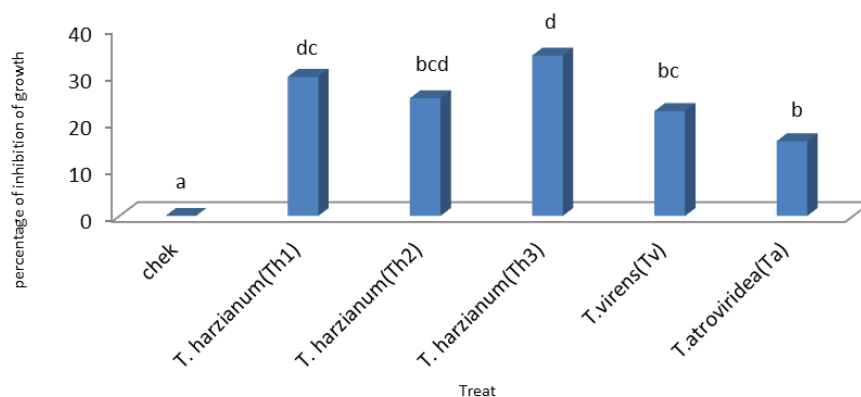
آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS-ANOVA و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت پذیرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD با سطح احتمال آماری ۵ درصد استفاده گردید. همچنین درصد بازداری از رشد قارچ بر حسب فرمول مقابل محاسبه گردید، که در آن X درصد بازداری از رشد قارچ، A قطر کلونی قارچ در تیمار شاهد و B قطر کلونی قارچ در هر یک از سایر تیمارها می‌باشد.

$$X = \frac{A-B}{A} \times 100$$

نتایج و بحث

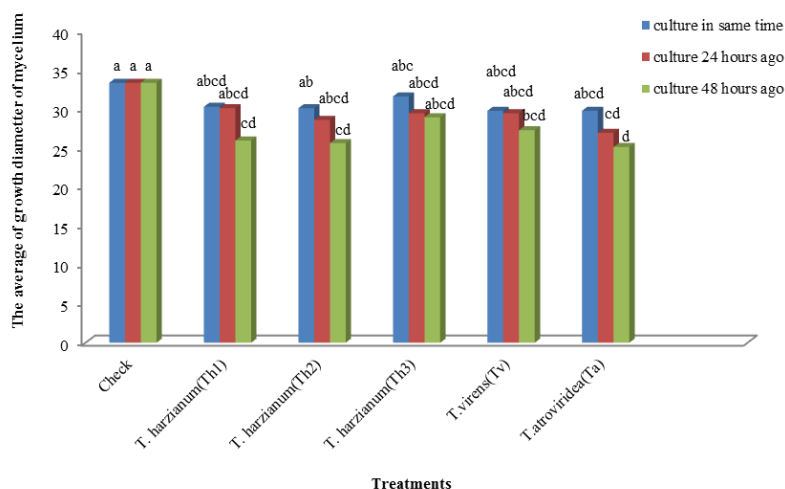
آزمایش کشت متقابل

همه جدایه‌های تریکودرما قادر به ممانعت از رشد رویشی قارچ بیمارگر *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* به درجات متفاوت بودند و در این میان جدایه *T. harzianum* (Th3) بیشترین درصد بازدارندگی و جدایه *T. atroviride* (Ta) کمترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه فوزاریوم را نشان دادند (شکل ۱). این نتایج با گزارشات سایر محققین در مورد



شکل ۱. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه فوزاریوم توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما در آزمایش کشت متقابل

Figure 1. Inhibition (%) of growth of Fusarium colony by Trichoderma isolates in dual culture test

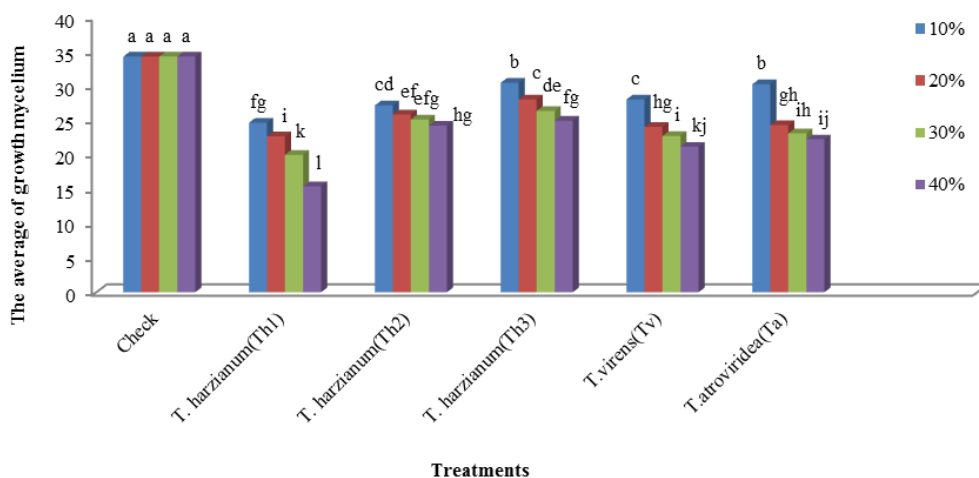


شکل ۲. مقایسه میزان رشد پرگنه فوزاریوم در معرض ترکیبات فرآر جدایه‌های مختلف تریکودرما با مدت زمان رشد متفاوت
Figure 2. Comparison of the growth of Fusarium colony exposed to volatile compounds of different Trichoderma isolates with different growth durations

رشد بیمارگر را ایجاد کرده است (شکل ۳) محققین مختلف درباره نوع ترکیبات موجود در ترشحات مایع خارج سلولی تریکودرما تحقیقات زیادی انجام داده‌اند. گزارش شده است که آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز، بتا-۱ و ۳ گلوکاناز و همچنین آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر Viridin, Paracelsin, Alamethicin, Trichodermin و Gliotoxin توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما تولید می‌شوند (Papavizae 1985) و ممانعت از رشد بیمارگر ممکن است ناشی از تأثیر این آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها بر آن باشد.

بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی

از نظر میزان تأثیر ترشحات خارج سلولی بین همه ایزوله‌های تریکودرما اختلاف وجود داشت و در این بین جدایه *T. harzianum* کرج (Th1) بیشترین تأثیر را نشان داده است. همچنین با افزایش غلظت ترشحات، میزان تأثیر تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیمی بیمارگر بیشتر شده و غلظت ۴۰٪ اثر بیشتری در جلوگیری از رشد میسلیمی قارچ بیمارگر نشان داده است. در مقایسه میانگین اثرات متقابل دو عامل نیز تیمار جدایه Th1 با غلظت ۴۰٪ بیشترین بازدارندگی از



شکل ۳. مقایسه میزان رشد پرگنه فوزاریوم در معرض غلظت‌های مختلف ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های مختلف تریکودرما
Figure 3. Comparison of the growth of Fusarium colony exposed to different concentrations of extracellular exudates of different Trichoderma isolates

REFERENCES

- Ashrafizadeh A, Etebarian HR, Zamanizadeh HR** (2005) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 39-57. (in Persian)
- Ben-Yephet Y, Shtienberg D** (1997) Effect of the host, the pathogen, the environment and their interactions, on *Fusarium* wilt of camation. Phytoparasitica 25: 207-216.
- Dennis C, Webster J** (1971) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* I. production of nonvolatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25-39.
- Elad Y, Chet I, Henis Y** (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28: 719-725.
- Etebarian HR** (1996) Occurrence of *Fusarium* wilt of camation in Varamin area. Iranian Journal of Plant Pathology 32(3-4): 223-232. (in Persian)
- Kudsen GR, Eschen DJ, Danduranad LM, Bin L** (1991) Potential for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 75: 466-470.
- Mirabolfathy M** (2000) Survey on the soilborne fungal diseases of ornamental plants in Iran. In: Proceeding of the 2nd Iranian Congress on Horticulture, Karaj- Iran. p 203. (in Persian)
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO** (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University, Press University Park 193 pp.
- Nash SM, Snyder WC** (1962) Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52: 567-572.
- Peyghamy E** (1991) Evaluation of Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* in biological control of causal agent of cucumber *Fusarium* wilt. Agricultural Knowledge 2(3): 100-123. (in Persian)