اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی بتا 1و3 گلوکاناز برون یاخته‌ای در جدایه‌های *Trichoderma virens* و انتخاب جدایه‌های برتر در کنترل بوته‌میری خیار

فاطمه زواری[1*]، نوازالله صاحبانی[2] و حسن رضا اعتباریان[2]

تاریخ دریافت: 90/6/8 تاریخ پذیرش : 91/3/6

1- فارغ تحصیل کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

2- عضو هیأت علمی گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران

*مسئول مکاتبه E-mail: zzz.fatemeh@gmail.com

چکیده

در این پژوهش چهار جدایه *Trichoderma virens* از نظر میزان فعالیت آنزیمی بتا 1و3 گلوکانازی و همچنین کنترل کنندگی بیماری بوته میری خیار (*Phytophthora drechsleri*) در شرایط گلخانه و آزمایشگاه بررسی شدند. . برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های فوق، آزمایش‌های گوناگونی به کمک روش متقابل و آزمون اثر مواد فرار انجام گرفت. همچنین اثر pH (3، 5، 7، 8 و 9) و دما (5، 15، 20، 25، 30 و 40 درجه سانتی‌گراد) روی رشد جدایه‌های تریکودرما بررسی شد. میزان رشد پرگنه‌ای جدایه‌های فوق در محیط کشت آب آگار دارای کربوکسی متیل سلولز (CMC) نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و دیده شد که میان میزان رشد پرگنه‌ای جدایه‌ها و میزان فعالیت بتا1و3 گلوکانازی مترشحه از آن‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد. بطور کلی نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که گونه *T. virens* 304 و *T. virens* 414.8 در کنترل بیولوژیک *P. drechsleri* تواناتر از دیگر جدایه‌ها بوده. همچنین نتایج همبستگی میان درصد کنترل کنندگی و میزان فعالیت بتا 1و3 گلوکانازی مثبت ارزیابی شد، در نتیجه میان این دو شاخص رابطه مستقیمی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز، بوته میری خیار، کنترل بیولوژیک، همبستگی، *Phytophthora drechsleri*

Measuring of b-1,3 Glucanase Activity in *Trichoderma Virens* Isolates and Selection of the Best Isolates for Biological Control of Cucumber Root Rot

F Zavvari[1*], NA Sahebani[1] and HR Etebarian[1]

Received: August 30, 2011 Accepted: May 26, 2012
Department of Plant Protection, College of Aburaihan, University of Tehran, Iran
*Corresponding Author: E-mail zzz.fatemeh@gmail.com

Abstract

In this study four isolates of *Trichoderma virens* (*T.virens* 414, *T.vir*ens 414.8, *T.virens* 304 and *T.virens* 404.4) were compared based on extra cellular β-1,3 glucanase production and biological control of root rot cucumber (*Phytophthora drerchsleri*) in laboratory and green house experiments.The *in vitro* potential of those isolates were evaluated against *P.drechsleri* through production of volatile and dual culture. The pH (3, 5, 7, 8, 9) and temperature effects(5, 15, 20, 25, 30, 40˚C) on *Trichoderma* mycelial growth were also evaluated. Colony growth rate of thease isolates were also studied in water agar culture medium containing carboxy methyle cellulose (CMC) and showed direct correlation with β-1,3 glucanase secretion. According to results *T. virens* 304 and *T. virens* 414.8 were the best isolates in biocontrol of . *drechsleri*. Result also showed direct correlation between β-1,3 glucanase secretion and inhibition growth of *phytophthora* mycelium and reduction of *phytophthora* infection.

Keywords: of β-1,3 glucanase, correlation, biocontrol, cucumber root rot, *Phytophthor a drechsleri*

مقدمه

مهمترین و اصلی ترین مکانیسم بیوکنترلی که باعث شده تریکودرما به عنوان یک آنتاگونیست بکار رود صفت، میکوپارازیتیسم (هاول 2003) و تولید آنتی-بیوتیک آن است (سیواسیسی تام پارام و قیس‌آلبرتی 1998). ترکیبات ضد قارچی *Trichoderma* spp. شامل آنزیم های لیتیک متنوعی است(لوریتو 1998) که اغلب آنها نقش زیادی در بیوکنترل دارند (کوبیکک و همکاران 2001). تعداد زیادی از آنزیم های تجزیه کننده دیواره یاخته ای از استرین های گوناگون تریکودرما خالص سازی و شناسایی شده‌اند (لوریتو 1998).

کیتیناز، گلوکاناز و پروتئاز و . . . از جمله مهمترین آنزیم‌های برون یاخته ای این آنتاگونیست می‌باشند که در مکانیسم هیپرپارازیتیسم قادر به تجزیه دیواره یاخته ای بسیاری از قارچ‌ها هستند. بنابراین در مکانیسم کنترلی گونه‌های تریکودرما، استفاده از آنزیم‌های هیدرولازی نظیر کیتیناز و گلوکاناز است که باعث نابودی و فروپاشیدن ساختار یاخته ای عوامل بیماری-زای گیاهی می‌گردد. از آن‌جا که دیواره سلولی، نخستین و مهم‌ترین سد در برابر آنزیم‌های هیدرولازی است، از میان بردن اجزای تشکیل‌دهنده دیواره قارچی از

جمله کیتین و گلوکان وظیفه اختصاصی بسیاری از این آنزیم‌ها می‌باشد (هاران 1996).

Phytophthora drechsleri یکی از بیمارگرهای مهم در اغلب مناطق کشور است. دیواره یاخته ای آن دارای سلولز (زنجیره‌های بتا 1و4 گلوکان) و بتا 1و3 و بتا 1و6 گلوکان است (بارت نیکی و لیپمان 1973). بنابراین حساسیت بالایی نسبت به آنزیم‌های سلولازی دارد. مطالعات ژنتیکی روی محتوای پروتوپلاست فیتوفتورا نشان می‌دهد که سلولاز و لامیناریناز بطور کامل دیواره یاخته ای را حل می‌کند (اروین و ریبریو 1996).

بتا 1و3 گلوکان در دیواره یاخته ای اغلب قارچ‌ها به جز در زیگومیست‌ها وجود دارد (بارتو- برگتر و گورین 1983) بتا 1و3 گلوکان به خاطر غالبیتی که نسبت به دیگر پلی‌ساکاریدها در دیواره یاخته ای قارچ‌ها دارد، بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته. با توجه به این موضوع و این‌که بیشترین ترکیبات دیواره یاخته ای *P. drechsleri* سلولزی هستند بر آن شدیم که تحقیقات خود را روی آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز متمرکز کنیم. در این تحقیق، میزان کنترل کنندگی جدایه‌های *Trichoderma virens* علیه *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه و ارتباط آن با با میزان فعالیت آنزیمی بتا 1و3 گلوکانازی این جدایه‌ها بررسی شده است.

مواد و روش ها

جدایه بیمارگر و آنتاگونیست‌ها

قارچ عامل بیماری (*Phytophthora drechsleri*) Tucker. که از گیاهچه‌های خیار آلوده جداسازی شده بود از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شد و پس از تک ریسه کردن این جدایه روی محیط CMA تکثیر و نگهداری شد. 4 جدایه *T. virens* که قابلیت آنتاگونیستی آن‌ها در پردیس ابوریحان بررسی گردیده بود (تابع بردبار، 1386) از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما روی *P.drechsleri* به روش آزمون ساخت مواد فرار

این آزمون، بر اساس روش فیدامن و رزال (1994) انجام شد. درصد بازداری از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر در روز هفتم نسبت به شاهد محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در 5 تکرار انجام شد.

بررسی ماکروسکوپی تأثیر جدایه‌های تریکودرما روی *P.drechsleri* با روش کشت تقابل

این آزمون بر اساس روش به کار گرفته توسط دنیس و وبستر (1971) انجام گرفت. در تیمار شاهد تنها قارچ بیمارگر کشت شد و به جای پلاک تریکودرما، یک پلاک 5 میلی‌متری PDA قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای 25 ± 1 نگهداری شدند. درصد بازداری از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگردر روز سوم نسبت به شاهد محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در 4 تکرار انجام شد.

تأثیر افزودن CMC بر میزان رشد جدایه‌های تریکودرما

در این آزمایش میزان رشد پرگنه جدایه‌های تریکودرما در دو محیط کشت آب آگار و آب آگار دار ای CMC (کربوکسی متیل سلولز) مقایسه شد. به محیط کشت آب آگار به میزان 0/5 درصد، CMC افزوده شد و اتوکلاو گردید. سپس پلاک‌های 5 میلی‌متری جدایه‌های تریکودرما در ظروف پتری کشت داده شد و در دمای 25 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. مساحت کلونی‌های تریکودرما در 48 ساعت پس از کشت محاسبه گردید. آزمایش با طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با 3 تکرار انجام شد.

مقایسه میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در دماهای گوناگون

قطعه‌ای از حاشیه کلونی 5 روزه‌ی جدایه‌های تریکودرما به قطر 5 میلی‌متر روی محیط کشت PDA منتقل شد و تشتک‌های پتری در دماهای 5، 15، 20، 25، 30، 40 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. رشد شعاعی جدایه‌های 72 ساعت پس از کشت اندازه‌گیری شد. آزمایش با طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با 3 تکرار نجام شد.

مقایسه میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در pH های مختلف

در این آزمون پلاک‌هایی به قطر 5 میلی متر از حاشیه کلونی 5 روزه‌ی جدایه‌های تریکودرما برداشته و در محیط کشت PDA با pH های 3، 5، 7، 8، 9 کشت و در دمای 2 ± 25 نگهداری شدند. pH محیط توسط 0/1 HCl نرمال و 0/1 NaOH نرمال قبل از اتوکلاو کردن تنظیم گردید. رشد شعاعی جدایه‌های تریکودرما 48 ساعت بعد از کشت اندازه‌گیری شد. آزمایش با طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با 3 تکرار صورت گرفت.

بررسی‌های گلخانه‌ای

برای افزودن زاد مایه *P. drechsleri* به خاک ، فیتوفترا روی لوبیا سفید (بورنز و بنسون 2000) و زاد مایه قارچ تریکودرما، روی سبوس گندم کشت و تکثیر شد. در این آزمایش از رقم Beith Alpha بهره گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل 6 تیمار در 3 تکرار انجام شد. تیمارها شامل:

T. virens 414 + *P. drechsleri*
T. virens 414.8 + *P.drechsleri*
T. virens 304 + *P. drechsleri*
T. virens 401.4 + *P. drechsleri*
شاهد بیمار (فقط *P. drechsleri*)
شاهد سالم

زاد مایه *P. drechsleri* به نسبت 5 گرم به ازاء یک کیلوگرم خاک اضافه شد، همچنین زادمایه جدایه‌های تریکودرما (تکثیر شده روی سبوس گندم) به نسبت 15 گرم به ازای یک کیلوگرم خاک، اضافه شد (اعتباریان 2000) و زادمایه *P. drechsleri* یک روز قبل از کاشت و زادمایه جدایه‌های تریکودرما در روز کاشت بذرها، به خاک گلدان‌ها اضافه شد (اعتباریان و همکاران 2000) و 3 هفته پس از کاشت درصد گیاهچه‌های سالم نسبت به شاهد سالم شمارش شد. همچنین ارتفاع ، وزن تر و خشک اندام هوایی بوته‌ها (قطع شده از محل طوقه) نیز در شرایط گلخانه بررسی شد.

مقایسه میزان آنزیم برون یاخته ای بتا 1و3 گلوکاناز در جدایه‌های گوناگون *Trichoderma virens*

کشت جدایه‌های تریکودرما

مقدار 30 میلی‌لیتر از محیط کشت مایع را در لوله فالکن‌های 50 میلی‌لیتری ریخته و پس از اتوکلاو، به هر لوله 10 پلاک به قطر 5 میلی‌متر از حاشیه کشت 2 روزه‌ی هر جدایه قارچ اضافه شد. سپس لوله‌ها در دستگاه انکوباتور شیکر دار در دمای 2 ±25 درجه سانتی‌گراد و دور 100 rpm به مدت 7 روز نگهداری شدند (کار و همکاران 2005). محیط کشت مایع دار ای NH_4NO_3 (2 گرم)، K_2HPO_4 (1گرم)، $MgSO_4$ (0/5 گرم)، KCl (0/5 گرم)، $FeSO_4$ (0/01 گرم)، $CuSO_4$ (0/005 گرم) و 0/5 درصد CMC به عنوان منبع کربنی افزوده شد (Kaur et al., 2005). این آزمایش شامل 4 تیمار اصلی(شامل جدایه‌های تریکودرمای کشت شده در محیط دارای نمک‌ها و منبع کربنی) و یک تیمار شاهد(محیط کشت حاوی منبع کربنی که قارچی در آن کشت نشده) بود که در 6 تکرار انجام شد.

پس از رشد کافی جدایه‌های تریکودرما به مدت 7 روز، محیط مایع توسط کاغذ صافی واتمن شماره 1 صاف شد. از محیط کشت صاف شده به عنوان محلول دار ای پروتئین‌های ترشحی بهره گیری شد و برای تغلیظ میزان

آنزیم آن از استن سرد به نسبت 1:1 بهره گیری شد (بهرامسری و همکاران، 1384).

بررسی فعالیت آنزیم بتا 1و 3 گلوکاناز

بررسی فعالیت آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز به روش ابلز و فورنس (1970) با کمی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش شامل 31/2 میکرولیتر محلول 4 درصد لامینارین (Laminarin from *Laminaria digitata*) ساخت کمپانی Sigma ، تهیه شده در بافر استات سدیم 0/05 مولار (pH 5) و 62/5 میکرولیتر از محلول پروتئینی دار ای آنزیم بود. مخلوط حاصله برای مدت 10 دقیقه در حمام آب 40 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از معرف دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) به عنوان متوقف کننده واکنش بهره گیری شد. به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر، جذب نوری آن در طول موج 500 نانومتر اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز (U)، برابر با مقدار آنزیمی است که می‌تواند در مدت یک دقیقه واکنش، در دما و pH مشخص یک میکرو مول گلوکز را در یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش آزاد نماید. فعالیت ویژه آنزیمی، به‌صورت مقدار فعالیت آنزیم به مقدار کل پروتئین (μg/ml) موجود در محیط تعریف می-شود. جهت تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره، میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد (1976) تعیین شد.

در همه آزمایش‌ها ،کلیه آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SAS ver 9.0 انجام شد. همچنین همه تیمارها با به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن $P \leq 0/05$ انجام شد.

تعیین میزان همبستگی میزان کنترل کنندگی جدایه‌های تریکودرما در شرایط گلخانه و فعالیت بتا 1و3 گلوکانازی **آن‌ها میزان همبستگی بین شاخص‌های اندازه‌گیری شده در آزمون گلخانه‌ای و فعالیت آنزیمی بتا 1و3 گلوکانازی با استفاده از نرم‌افزار Excel 2003 تعیین شد.**

نتایج

اثر آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما روی *P.drechsleri* به روش آزمون ساخت مواد فرار

در این آزمون جدایه *T. virens* 401.4 با 58/23 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *P. drechsleri* و جدایه *T. virens* 304 با 35/10 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *P. drechsleri* به ترتیب تواناترین و ضعیف‌ترین جدایه‌های تریکودرمای مورد استفاده بودند. جدایه *T. virens* 414.8 با 46/26 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیومی با جدایه *T. virens* 414 در یک گروه قرار گرفتند (جدول 1).

اثرجدایه‌های *Trichoderma* روی *P. drechsleri* با روش کشت متقابل

در این آزمون جدایه *T. virens* 304 با 26/46 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *P. drechsleri* به عنوان بهترین جدایه کار کرد. جدایه *T. virens* 401.4 با 19/94 درصد بازدارندگی و جدایه *T. virens* 414.8 با 13/15 درصد بازدارندگی پس از آن قرار گرفتند. همچنین جدایه‌ی *T. virens* 414 با 8/43 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *P. drechsleri* ضعیف-ترین جدایه‌ی تریکودرمای آزمایش شده بود (جدول 1).

ارزیابی میزان رشد جدایه‌های *Trichoderma* در محیط کشت دار ای CMC

بر اساس جدول تجزیه واریانس میان جدایه-های تریکودرما و همچنین میان دو محیط کشت اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دیده شد. مقایسه میانگین‌های بدست آمده حاصل از رشد جدایه‌های گوناگون، نشان داد که جدایه *T. virens* 414.8 . در دو

محیط کشت آب آگار و آبّ آگار دار ای CMC، بیشترین میزان رشد و جدایه *T. virens* 414 کمترین رشد را داشته است. مقایسه میانگین رشد کلنی جدایه‌های فوق در محیط کشت دار ای CMC در این آزمایش نشان داد که همه‌ی جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین میزان رشد مربوط به جدایه*T. virens* 414.8 و کمترین میزان رشد مربوط به جدایه *T. virens* 414 بود. میان جدایه *T. virens* 401.4 و جدایه *T. virens* 414 اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول 2). در محیط کشت آب آگار، همه‌ی جدایه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. در این محیط کشت بیشترین میزان رشد مربوط به جدایه *T. virens* 414.8 بود. دیگر جدایه‌های مورد آزمایش نیز در میان این جدایه و شاهد قرار گرفتند و در این میان جدایه *T. virens* 304 کمترین میزان رشد را نشان داد (جدول 2).

جدول 1- مقایسه میانگین درصد کاهش رشد میسیلیومی ***P. drechsleri*** توسط جدایه‌های تریکودرما در آزمون متقابل(روز سوم) و آزمون ساخت مواد فرار (روز هفتم) و میزان فعالیت آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز برون یاخته ای جدایه‌های تریکودرما

جدایه	فعالیت بتا 1و3 گلوکانازی(U/µg protein)	تست تقابل	مواد فرار
T. virens 414	1/67 c	8/43 d	42/06 bc
T. virens 414.8	15/41 b	13/15 c	46/26 b
T. virens 304	22/09 a	26/46 a	35/10 c
T. virens 401.4	14/75 b	19/94 b	58/23 a
شاهد	0 c	----	----

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول2- مقایسه میانگین مساحت کلنی جدایه‌های تریکودرما کشت شده در محیط کشت دار ای **CMC** و آب آگار (48 ساعت پس از کشت)

جدایه	محیط کشت آب آگار (mm^2)	محیط کشت آب آگار حاوی CMC (mm^2)
T. virens 414	859/11 ab	2162/00 c
T. virens 414.8	1031/67 a	3229/00 a
T. virens 304	308/53 c	2795/10 b
T. virens 401.4	720/00 b	2360/70 c
شاهد	19/63 d	19/63 d

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

مقایسه میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در دماهای گوناگون

مقایسه میانگین‌های بدست آمده حاصل از رشد جدایه‌های گوناگون در 6 دمای مورد آزمون، نشان داد که جدایه‌ی *T. virens* 414.8 بیشترین میزان رشد داشت. جدایه *T. virens* 401.4 به عنوان کند رشدترین جدایه در کل دماهای مورد آزمون معرفی شد. جدایه-های *T. virens* 414 و *T. virens* 304 بین این دوجدایه قرار گرفتند. از میان 6 دمای آزمایش شده،

دمای 25 درجه سانتی‌گراد، به عنوان مناسب‌ترین دما برای رشد جدایه‌های تریکودرما و پس از آن دمای 30 درجه قرار داشت. میان دمای 15 و 20 درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در آخر نیز دماهای 5 و 40 درجه سانتی‌گراد بودند که از لحاظ رشد جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری نداشتند.

جدول3- مقایسه میانگین میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در دماهای آزمایش شده (72 ساعت پس از کشت)

جدایه	5°C	15°C	20°C	25°C	30°C	40°C
T. virens 414	36/33 c	608/62 ab	831/34 ab	3895/80 a	2636/70 a	0
T. virens 414.8	58/33 b	655/89 ab	658/33 bc	3228/ 30 b	3364/ 10a	0
T. virens 304	96/66 a	534/77 b	926/56 a	2848/40 b	3458/90a	0
T. virens 401.4	18/00 d	741/00 a	c 571/36	2846/ 40b	2605/ 30a	0

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

مقایسه میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت با pH های گوناگون

با توجه به جدول تجزیه واریانس در این آزمون میان جدایه‌های تریکودرمای کشت شده در محیط‌هایی با pH های گوناگون، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت.

مقایسه میانگین‌های بدست آمده از رشد جدایه-های گوناگون تریکودرما درتمامی محیط‌های مورد آزمایش نشان داد که جدایه *T. virens* 414.8 با بیشترین میزان رشد در گروه اول و جدایه *T. virens* 401.4 با کمترین میزان رشد در گروه آخر قرار گرفت. جدایه های *T. virens* 414 و *T. virens* 304 بین این دو جدایه هر کدام در گروه مجزایی قرار گرفتند.

با توجه به جدول تجزیه واریانس میان محیط‌های گوناگونی که در این آزمایش بررسی شدند اختلاف معنی داری در سطح یک درصد دیده شد.. دراین آزمایش محیط کشت با pH 5 و pH 7به عنوان مناسب‌ترین و محیط کشت با pH 9به عنوان نامناسبترین محیط معرفی شد. محیط کشت های با pH 8 و pH 3 نیز به ترتیب بین این دو گروه به صورت مجزا قرار گرفتند. در pH 3 جدایه *T. virens* 414.8 و بعد از آن جدایه *T. virens* 401.4 بیشترین میزان رشد را از خود نشان دادند و هر دو در یک گروه قرار گرفتند. کمترین میزان رشد مربوط به جدایه *T. virens* 304 بود(جدول 4). در pH 5 بیشترین رشد را جدایه *T. virens* 414.8و کمترین میزان رشد را جدایه *T. virens* 401.4 داشت. بین جدایه *T. virens* 414 و *T. virens* 401.4 اختلاف معنی داری وجود نداشت و هر دو در یک گروه قرار گرفتند(جدول 4). در pH 7 و هم‌چنین pH 8 هر کدام از جدایه‌ها در یک گروه مجزا قرار گرفتند. بیشترین میزان رشد مربوط به جدایه *T. virens* 414.8 و کمترین میزان رشد مربوط به جدایه *T. virens* 401.4 بود. در pH 9 جدایه *T. virens* 414 بیشترین میزان رشد و جدایه *T. virens* 304 کمترین میزان رشد را داشت دو جدایه دیگر بدون اختلاف معنی‌داری بین این دو جدایه قرار گرفتند (جدول 4).

جدول4- مقایسه میانگین میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت با pH های گوناگون 48 ساعت پس از کشت

جدایه	pH3	pH 5	pH 7	pH 8	pH 9
T. virens 414	2720/ 50b	3028/60c	3007/00 c	3063/70c	2159/90a
T. virens 414.8	a6923/ 60	4805/00a	4899/90 a	4710/30a	2047/90 ab
T. virens 304	2036/10c	4210/10b	4185/40 b	3701/80b	1631/50 b
T. virens 401.4	3502/ 00a	2830/20c	2630/70 d	2340/70d	1657/10ab

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری ندارند.

اعداد جدول مساحت کلنی جدایه‌های تریکودرما هستند (بر حسب میلی‌متر مربع)

بررسی تاثیر جدایه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از مرگ گیاهچه‌های خیار در شرایط گلخانه

با مقایسه میانگین‌ها در جدول5، دیده شد که تمامی تیمارهای آزمایشی با شاهد سالم و آلوده اختلاف معنی-داری داشتند و جدایه *T. virens* 414.8 و *T. virens* 304 به ترتیب با 30 و 29 و درصد کنترل کنندگی بهترین جدایه ها برای کنترل بیماری بودند همچنین جدایه *T. virens* 401.4 با 24/66 درصد کنترل کنندگی با جدایه های ذکر شده در بالا در یک گروه قرار گرفتند. جدایه *T. virens* 414 کمترین درصد کنترل کنندگی را از خود نشان داد(جدول 5). در آزمون ارزیابی ارتفاع قسمت هوایی گیاهچه‌های خیار دیده شد که جدایه *T. virens* 401.4 و *T. virens* 304 به ترتیب بیشترین تأثیر را در افزایش رشد گیاهچه‌ها داشتند و در یک گروه قرار گرفتند. جدایه‌های *T. virens* 414 تأثیر چندانی در افزایش رشد گیاهچه‌ها و با شاهد آلوده اختلاف معنی-داری نداشت(جدول 5).

در آزمون ارزیابی وزن تر و خشک قسمت هوایی گیاهچه‌های خیار، جدایه *T. virens* 401.4 بیشترین تأثیر را در وزن تر و خشک اندام‌های هوایی گیاهچه‌های خیار داشته داشته و پس از آن جدایه‌های *T. virens* 414.8 و *T. virens* 304 قرار داشتند که اختلاف معنی‌داری با هم نداشته و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول 5) .

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز برون یاخته‌ای مترشحه از جدایه‌های تریکودرما

با مقایسه میانگین‌ها جدایه *T. virens* 304 بیشترین فعالیت بتا گلوکانازی را از خود نشان داد. پس از آن به ترتیب جدایه *T. virens* 401.4 و *T. virens* 414.8 بودند که اختلاف معنی‌داری میان آن‌ها مشاهده نشد. جدایه *T. virens* 414 کمترین میزان فعالیت بتا گلوکانازی را از خود نشان داد که با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول 1).

جدول5- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های ***Trichoderma virens*** روی درصد بوته میری ناشی از ***P. drechsleri*** و شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری در شرایط گلخانه‌ای

تیمار	درصد گیاهان سالم	ارتفاع گیاهچه‌ها(cm)	وزن تر(gr)	وزن خشک(gr)
T. virens 414 + *P. drechsleri*	c16/54	c30/167	c3/83	c 0/95
T. virens 414.8 + *P.drechsleri*	b30/00	b48/06	b5/44	b1/29
T. virens 304 + *P. drechsleri*	b29/00	b45/00	b5/32	b1/44
T. virens 401.4 + *P. drechsleri*	b24/66	b51/66	b6/03	b 1/31
شاهد سالم	a96/66	a93/86	a9/60	a1/88
P.drechsleri	d0	d30/66	d0	d0

درصد گیاهچه‌های سالم در هفته سوم پس از کاشت و ارتفاع بوته‌ها، وزن تر و خشک گیاهچه‌ها در هفته پنجم محاسبه شده

تعیین میزان همبستگی میزان کنترل کنندگی جدایه‌های تریکودرما در شرایط گلخانه و فعالیت بتا 1و3 گلوکانازی آن‌ها

در این آزمون بین همه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گلخانه و فعالیت آنزیمی بتا 1و3 گلوکانازی همبستگی مثبت وجود داشت. میزان همبستگی بین این دو شاخص 0/91، به‌دست آمد.

بحث

در آزمون ساخت مواد فرار، جدایه *T. virens* 401.4 با 58/23 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *P. drechsleri* بهترین و جدایه *T. virens* 304 با 35/10 درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم *P. drechsleri* ضعیف‌ترین جدایه‌های تریکودرمای مورد استفاده بودند. درصد بازداری از رشد *P. drechsleri* در اثر ترکیبات با گذشت زمان افزایش یافته و یک روندافزایشی نسبت به زمان داشت که ممکن است به دلیل تجمع بیشتر ترکیبات فرار طی گذشت زمان در محیط بسته داخل تشتک پتری باشد. البته در در این پژوهش قطر کلنی عامل بیماری هر روز اندازه گیری شد ولی درصد بازدارندگی فقط در روز هفتم محاسبه شد. متابولیت‌های فرار می‌توانند در خلل و فرج خاک پخش شده و نیازی به تأثیر مستقیم با عامل بیماری برای تأثیر گذاری آن‌ها نیست. شعاع تأثیر و نفوذ این آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالاً دایره‌ای است که شعاع آن رابطه معکوس با وزن مولکولی ماده شیمیایی ساخته شده، ماهیت جذبی محیط و توانایی سایر اورگانیسم‌ها برای مصرف آنتی‌بیوتیک-ها و رابطه مستقیم با حلالیت و رطوبت خاک دارد (بیکر و کوک 1974).

در بررسی ماکروسکوپی تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* روی *P. drechsleri* در آزمایشگاه به روش کشت متقابل (dual culture)، دیده شد که جدایه‌های تریکودرما به دلیل سرعت رشد بیشتر و اشغال سریع‌تر سوبسترا در رقابت تغذیه‌ای نسبت به *P. drechsleri* موفق بودند. همچنین جدایه *T. virens* 414.8 و *T. virens* 401.4 توانایی رشد روی میسیلیوم‌های *P. drechsleri* را دارا بودند. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد به میزان 26/46 درصد در تقابل جدایه *T. virens* 304 با عامل بیماری دیده شد و مشخص گردید که این قارچ قدرت رقابت تغذیه‌ای بالاتری نسبت به دیگر جدایه‌ها در تقابل با قارچ *P. drechsleri* دارد. رقابت-های موجود در خاک نیز مانند محیط کشت برای دستیابی به موادغذایی است که عامل اصلی محدود کننده در خاک محسوب می‌شود (کلارک 1965). منطقه ریزوسفر نیز از نظر تراکم ماده غذایی غنی است در نتیجه رقابت سخت و فشرده‌ای در آن منطقه حاکم است و سرعت رشد زیاد هیف، تولید اسپور فراوان و جوانه-زنی سریع اسپورها از قابلیت‌های رقابت محسوب می-شود (گارت 1970). بنابراین جدایه‌ی *T. virens* 304، مورد بررسی در این پژوهش که سرعت رشد و اسپوردهی بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌ها داشتند ممکن است در تسخیر منطقه‌ی ریزوسفر و ایجاد حفاظی در برابر عوامل بیماریزا نسبت به دیگر جدایه‌ها مؤثرتر بوده باشند.

در این طرح با توجه به نتایج حاصل از سنجش میزان فعالیت آنزیم بتا 1و3 گلوکانازی در مورد چهار جدایه‌ی مذکور، در آزمایش دیگری با افزودن CMC به محیط کشت آب آگار میزان رشد این جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست‌آمده از مقایسه میزان رشد جدایه‌های فوق در زمان 48 ساعت بر روی دو محیط کشت آب آگار و آب آگار دار ای CMC نشان داد که افزودن CMC به محیط کشت قارچ سبب بروز تغییراتی در میزان رشد جدایه‌ها نسبت به محیط کشت آب آگار شده بود. این تغییر در میزان رشد در تمامی جدایه‌ها مثبت ارزیابی شد. در جدایه 3، افزودن CMC به محیط کشت88 درصد، در جدایه *T. virens* 401.4 69 درصد در جدایه *T. virens* 414.8، 68 درصد و در جدایه

T. virens 414، 60درصد افزایش رشد دیده شد. چنین استنباط می‌شود که CMC به عنوان منبع کربنی که توسط قارچ مصرف شده و در رشد آن تأثیر داشته است.

pH و دما دو فاکتور کلیدی برای رشد، اسپورزایی و توانایی ساپروفیتی هستند که مانند ساخت مواد فرار و غیر فرار در تغذیه، رقابت، میکوپارازیتیسم و آنزیم‌های برون یاخته ای (برای متلاشی کردن دیواره سلولی بیمارگرها) نقش دارند. در آزمون رشد جدایه‌های تریکودرما در pH های گوناگون دیده شد که جدایه های تریکودرما در طیف وسیعی از pH ها رشد کردند و pH 5 و pH 7 به عنوان مناسبترین pH برای رشد جدایه‌ها در نظر گرفته شد (کردیکز و همکاران 2003). پس می‌توان از این گونه‌ها در خاکهای مناطق مختلف که از نظر pH متفاوت هستند استفاده کرد و نتیجه جالب توجهی گرفت.

در آزمون رشد جدایه‌های تریکودرما در دماهای گوناگون، دمای25 درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه برای تمامی جدایه‌های مورد آزمون معرفی شد. این پژوهش نشان داد، دمای بهینه برای رشد گونه‌های تریکودرما متفاوت است، و می‌توان از این گونه‌ها در مناطق با دمای مختلف استفاده کرد. اگرچه اغلب گونه-های تریکودرما مزوفیل هستند (کردیکز و همکاران 2003). بررسی کلی جدایه‌های موجود در این آزمایش از نظر میزان تولید آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز نشان داد که جدایه304 *T. virens* با بیشترین میزان تولید آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز در میان این جدایه‌ها در مقام اول قرار گرفت و پس از آن جدایه‌های *T. virens* 414.8 در مقام دوم جدایه‌ها تولید کننده آنزیم واقع شد. از آن‌جا که جدایه‌های تریکودرمای بهره گیری شده در این پژوهش آنتاگونیست های انتخاب شده در دیگر طرح‌ها بودند (تابع بردبار، 1386) و از روش غربال‌گری انتخاب شدند، هر کدام یک جدایه نسبتاً خوب برای تولید آنزیم برون یاخته‌ای بتا 1و3 گلوکاناز بودند. با توجه به وجود بتا 1و3 گلوکان در ساختار بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و نیز با در نظر گرفتن قابلیت‌های تریکودرما در تولید مقادیر قابل توجه آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز می‌توان دیواره قارچ‌های پارازیت گیاهی را به عنوان بستر مناسبی برای تولید آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز توسط موجوداتی از قبیل تریکودرما در آزمایش‌های کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار داد.

در بخش آزمایش‌های گلخانه‌ای تأثیر کنترل کنندگی چهار جدایه *Trichoderma virens* روی *P. drechsleri* در گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت. اووسپورهای *P. drechsleri* ممکن است در خاکی که در آن جالیز کاشته می‌شود وجود داشته باشد و یا همراه آب آلوده وارد شده، گیاهان را مورد حمله قرار دهد از این‌رو زمان وقوع آلودگی در خاک مزرعه مشخص نیست. با افزودن جدایه‌های تریکودرما در هنگام کاشت یک روز پس از عامل بیماری‌زا، امکان بررسی اثر جدایه‌های آنتاگونیست در شرایطی که خاک از قبل آلوده باشد فراهم شد. در آزمایش‌های گلخانه‌ای جدایه های *T. virens* 414.8 با30 درصد کنترل کنندگی و جدایه *T. virens* 304 با 29 درصد کنترل کنندگی، بیشترین تأثیر را در کنترل *P. drechsleri* نسبت به دو جدایه‌ی دیگر داشتند و به عنوان جدایه‌های برتر برگزیده شدند.

گونه‌های تریکودرما با تولید اسیدهای آلی مثل گلوکونیک - سیتریک و فوماریک اسید، باعث تغییر pH خاک می شوند و قابلیت حل فسفاتها ، عناصر میکرو و کاتیون های معدنی مثل آهن، منگنز و منیزیوم را بالا می برند و آن‌ها را برای متابولیسم های گیاهی قابل استفاده می کنند (بنیتز و همکاران 2000). نتایج حاصل از اندازه-گیری وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهچه‌های خیار نشان می‌دهد که جدایه‌های *T. virens* 414.8 و *T. virens* 304 یعنی همان جدایه‌هایی که نقش بیشتری در افزایش رشد گیاهچه‌ها داشتند، در افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهچه‌ها نیز بیشترین تأثیر را

داشتند. با توجه به اطلاعات موجود در این تحقیق، تریکودرما به عنوان یک عامل بیوکنترلی موفق مورد توجه قرار گرفت و در پایان قابلیت بالای این قارچ در لیز کردن و تخریب دیواره یاخته ای با میزان کنترل کنندگی *P. drechsleri* در گیاهچه‌های خیار از طریق محاسبه همبستگی میان آن‌ها مقایسه شد. چنین استنباط می‌شود که مشاهدات گلخانه‌ای، نتایج حاصل از سنجش میزان فعالیت بتا 1و3 گلوکاناز مترشحه از جدایه‌های تریکودرما را تأئید کرده و میان میزان فعالیت آنزیم و درصد کنترل کنندگی جدایه‌های تریکودرما ارتباط مستقیمی مشاهده می‌شود (یدیدیا و همکاران 2010). بطوری‌که نتایج همبستگی میان این دو شاخص 0/8 بود.

نتیجه‌گیری کلی

در پایان می‌توان گفت جدایه‌های گوناگون تریکودرما همان گونه که در دیگر تحقیقات به عنوان آنتاگونیست بیمارگرهای گیاهی مورد بررسی قرار گرفتند در این طرح نیز قابلیت‌های مؤثر خود را در کنترل بیماری بوته میری خیار به بهترین شکل نشان دادند مخصوصاً جدایه *T. virens* 414.8 . اگرچه در این پژوهش ملاک اصلی در سنجش قدرت بیوکنترلی این جدایه‌ها میزان فعالیت آنزیم بتا 1و3 گلوکاناز بوده، در طرح‌های آینده با تکیه بر دیگر قابلیت‌های این جدایه‌ها و انجام کارهای تکمیلی می‌توان تعدادی از این جدایه‌ها را به عنوان آنتاگونیست مؤثر در کنترل بوته میری خیار به تولید انبوه رساند.

منابع مورد استفاده

Abeles FB and Forrence LE ,1970. Temporal and hormonal control of β-1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* . Plant Physiology 45: 395-400.

Baker KF and Cooke RJ, 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Freeman -London.

Barreto-Bergter E an Gorin PAJ ,1983. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens.Pp. 67-103. In: Tipson RS and Horton D (eds). Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Academic Press- New York.

Bartnicki-Garcia S and Lippman E ,1973. Fungal cell wall composition. Pp. 229-252. In: Laskin AI and Lechevaluer HA (eds). Handbook of Microbiology. CRC Press – Cleveland.

Benı´tez T, Rinco´n AM, Limo´n MC and Codo´n AC, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology7: 249- 260.

Bradford MM, 1976. A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantitise of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical. Biochemistry 72: 248-254.

Burns JR. and Benson DM, 2000. Biocontrol of damping-off of *Catharanthus roseus* caused by *Pythium ultimum* with *Trichoderma virens* and binucleate *Rhizoctonia* fungi. Plant disease 84: 644-648.

Carsolio C, Benhamou N, Haran S, Cortes C, Gutierrez A, Chet I, and Herrera-Estrella A, 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Applied Environmental Microbiology 65: 929-935.

Clark FE ,1965. The concept of competition in microbial ecology. Pp. 339-345. In: Baker KF and Snyder WC (eds). *Ecology* of soilborne Plant Pathogens. University of California. Press - Berkeley.

Dennis C, and Webster J, 1971. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma*.III. Hyphal interactions. *Transaction* British Mycological society 57: 363-369.

Erwin DC and Ribeiro OK, 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Etebarian HR, Scott ES, and Wicks TJ, 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T.virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. European Journal of Plant Pathology 106: 329-337.

Fiddaman PJ, and Rossall S, 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles. Journal of Applied Bacteriology 76: 345-405.

Garrett SD, 1970. *Pathogenic Root-Infecting Fungi*. Cambridge University. Press,. London and New York.

Haran S, Schikler H, and Chet I, 1996. Molecular mechanism of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142: 2321-2331.

Howell CR, 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4–10.

Kaur J, Munshi GD, Singh RS, and Koch E, 2005. Effect of carbon source on production of Lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. Phytopathology 153: 274-279.

Kredics L, Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, and Nagy E, 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology 41(1): 37-42.

Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, and Lorito M, 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. Plant Pathology 83: 11–23.

Lorito M, Woo SL, D'Ambrosio M, Harman GE, Hayes CK, Kubicek CP, and Scala F, 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compound. Molecular Plant-Microbe Interaction 9: 206-213.

Lorito M ,1998. Chitinolytic enzymes and their genes. Vol. 2. Pp. 73-99. In: Harman GE and Kubicek CP (eds). Trichoderma and Gliocladium. Taylor and Francis Ltd - London.

Lorito M, Woo SL, Iaccarino M and Scala F , 2006. Microrganismi antagonisti. Pp. 146-175. In: Iaccarino M (eds). Microrganismi Benefici per le Piante. Idelson-Gnocchi s.r.l., Napoli - Italia.

Mach R., Peterbauer CK, Payer K, Jaksits S, Woo SL, Zeilinger S, Kullnig CM, Lorito M. and Kubicek CP, 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. Applied Environmental Microbiology 65: 1858–1863.

Sivasithamparam K. and Ghisalberti EL ,1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1.Pp. 139-191. In: G. E. Harman GE and Kubicek CP (eds). *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis Ltd - London.

Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, and Valero JR, 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* sp.: Panopy of bioligical control. Biochemical Engineering 37: 1-20.

Yi x, Ding W, and Li y, 2010. Antagonistic mechanisms of *Trichoderma* spp. Against *Phytophthora nicotianae*. Zhongguo Zhongyao Zazhi 35(11): 1386-1390.