بررسی توانایی پارازیتیسم گونه‌های *Trichoderma* علیه قارچ *Fusarium oxysporum* جداشده از طوقه و ریشه برنج استان فارس

الناز شهابی[۱]، صدیقه محمدی[۲]، فاطمه عطاللهی، یاسمین حق دل، فاطمه حسینی
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی دانشگاه آزاد اسلامی .واحد شیراز.
۲- استادیار گروه گیاه پزشگی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلاوی واحد شیراز
***shahabielnaz@gmail.com**

چکیده

با توجه به قابلیت بالای قارچ *Trichoderma* در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماری‌زا ، مکانیسم‌های آنتاگونیستی دو جدایه :*Trichoderma harzianum* (THM,THA)، یک جدایه *T. virens* ، یک جدایه *T. longibrachiatum* و *T. koningii* بر علیه قارچ *Fusarium oxysporum* جدا شده از برنج مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی پارازیتیسم با دو شیوه لام و ایجاد شیار انجام شد. در بررسی میکروسکوپی ناحیه‌ی تقابل جدایه‌های *Trichoderma* و*F. oxysporum* ، تماس ، نفوذ و پیچش ریسه‌ای جدایه‌های *Trichoderma* و قطعه قطعه شدن ریسه‌های قارچ بیمارگر مشاهده شد. جدایه‌های آنتاگونیست به کار رفته توانایی متفاوتی در بهره گیری از شیوه‌های پارازیتیسم نشان دادند.

کلمات کلیدی : مکانیسم آنتاگونیستی ، جدایه های ***Trichoderma*** و ***Fusarium oxysporum***

مقدمه

برنج (*Oryza sativa*)یکی از غلات مهم مصرفی انسان است و در بین غلات تنها محصولی است که منحصرا" برای انسان کاشت می شود. غذای اصلی و منبع تامین کربوهیدرات کثیری از جمعیت جهان برنج بوده که سطح وسیعی از زمین‌های زیر کشت در آسیا را به خود اختصاص داده است، به طوری که بیش از 90 درصدبرنج دنیا در آسیا تولید و مصرف می‌گردد. محل پیدایش برنج در آسیای جنوب شرقی و عمدتا" در کشورهای هند و چین است. در ایران نیز برنج غذای اصلی مردم بعد از گندم بوده که با توجه به رشد جمعیت و کمبود تولید داخلی آن، منجر به واردات سالیانه این محصول جهت مصرف داخلی می‌گردد. طبق آمار (FAO) واردات برنج در سال ۲۰۰۰ میلادی در ایران ۱.۲ میلیون تن بوده که این رقم در سال‌های اخیربه جهت اصلاح و معرفی ارقام جدید به 0.98 میلیون تن در سال رسیده است.توجه به روند کلی افزایش جمعیت حاکی از افزایش مصرف کنندگان مواد غذایی بوده که بر همین اساس باید تولید مواد غذایی نیز افزایش یابد تا بتواند جوابگوی جمعیت در حال رشد جهان باشد.

مجموعه اعضای گونه‌های *Fusarium oxysporum* (FOSC) قارچ‌های پاتوژن خاکزاد بوده و انتشار جهانی دارد و در تمام خاک‌های زراعی و غیر زراعی به صورت پاتوژن ، ساپروفیت و یا همراه با گیاه زندگی می‌کند. تعداد زیادی از جدایه‌های این قارچ مسئول ایجاد بیماری‌هایی مهم و خطرناکی نظیر پژمردگی آوندی، پوسیدگی و بوته میری در طیف

گسترده‌ای از محصولات مهم کشاورزی و باغبانی هستند و از این جهت از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردارند (Baayen *et al*., 2000; Michielse and Rep, 2002) . علائم بیماری معمولا" بعد از ظهور گل وتشکیل میوه ظاهر می‌گردد. علائم در گیاهان بالغ به صورت یک طرفه ظاهر شده و ابتدایک قسمت از گیاه علائم زردی یا پژمردگی را از خود نشان می‌دهد و به تدریج به سایر قسمت‌های گیاه گسترش می یابد. ریشه گیهان آلوده دارای پوسیدگی خشک بوده و ریشه‌های فرعی از بین می‌رود (Sherf & MacNab 1986, Banihashemi, 1982) . برای کنترل بیماری کاشت ارقام مقاوم، کاربرد سموم گازی و استفاده از سم بنومیل (Sherf & MacNab, 1986) می‌تواند در کنترل بیماری موءثر باشد. از جمله روش‌های بهینه کنترل که در راستای اهداف زیست محیطی می‌باشد و خطر کمتری برای سلامت انسان و محیط زیست دارد کنترل بیولوژیک می باشد. در این میان قارچهای جنس *Trichoderma* قابلیت مهارکنندگی جالب توجهی علیه بیمارهای ناشی از گونه‌های *Fusarium* نشان داده است. یکی از موفق‌ترین و پرمصرف‌ترین میکروارگانیسم‌ها که باعث جلوگیری از خسارت قارچها در گیاهان می‌شود گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* است(Trichoderma Presoon: Fr.) (Harman and Hader, 1983; Papavizas 1985; Chet Chet *et al*., 1998; Hermosa *et al*., 1987; Harman *et al*., 1989; Lynch 1990; Grondona *et al*., 1997; 2001; Paulitz *et al*., 2001) .

قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* نخستین بار توسط پرسون در سال ۱۹۷۴ معرفی گردید.این قارچ بر اساس طبقه بندی آلکسوپولوس در راسته‌ی Moniliales از رده Hyphomycetes قرار دارد وتلئومورف آن گونه‌های جنس آن Hypocrea متعلق به شاخه‌ی Ascomycota رده Pyrenomycetes راسته‌ی Hypocreales و خانواده Hypocereacae می‌باشد (Alexopolus,1996). قارچ خاکزی *Trichoderma* از اجزای اصلی میکروفلور خاک می‌باشد و به نظر می‌رسد که این میکروارگانیسم با دارا بودن توان رقابت غذایی و مکانی بالا، استقرار و اسپورزایی فراوان در خاک و به ویژه اطراف اغلب ریشه گیاهان زراعی و غیرزراعی و توان القاء مقاومت در گیاه، نه تنها باعث کاهش عوامل بیمارگر در خاک می شود بلکه در مواردی با یک سری مکانیسم‌های بیوشیمیایی باعث تحریک به رشد اندام‌های زیر-زمینی یا هوایی برخی از این گیاهان می‌شوند. (Harman., 2006; Benitez *et al*., 2004; Jabbarzadeh *et al*., 2010; Hoitink *et al*.,2006; Vinale *et al*.,2008; Harman *et al*., 2004) .و همچنین در مقابل محدوده‌ی گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زابا تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر آنزیم‌های آمیلولیتیک، پکتولیتیک، پروتئولیتیک، لیپولیتیک، کتینولیتیک و سلولیتیک قدرت رقابتی زیادی دارد. (Emma *et al.,* 2008; Lorito *et al.,* 1996; Papavizaz, 1995) گونه‌های *Trichoderma* به خصوص گونه *T. harzianum* به دلیل نرخ تولیدمثلی بالا، توانایی زیاد در استفاده از منابع غذایی مختلف ، قدرت تهاجم بالا علیه عوامل بیماری‌زا، بهره‌گیری از مکانیسم‌های آنتاگونیستی مختلف چون رقابت ، پارازیتیسم و آنتی‌بیوز، توانایی در ایجاد تغییر در ریزوسفر، کارایی در تحریک رشد و القای مقاومت در گیاهان از جمله مهمترین عوامل بیوکنترل شناخته شده محسوب می‌شوند (Benitetz *et al.,* 2004; Burmeister, 2008; El-katatny *et al.,* 2001) .مکانیسم‌های آنتاگونیستی این گونه شامل فرایندهای پیچیده‌ای نظیر شیمی‌گرایی، اتصال ریسه‌ای و ایجاد ساختارهایی نظیر پیچش و نفوذ ریسه‌ای می باشد.این مراحل با ترشح آنزیم‌های خارج سلولی نظیر کیتیناز، بتاگلوکاناز و پروتئاز به عنوان متابولیت‌های ثانویه همراه است.اگرچه به نظر می‌آید موفقیت این گونه بیشتر به واسطه‌ی خاصیت هم‌افزایی فعالیت آنتی‌بیوزی و آنزیم‌های هیدرولیزکننده باشد، اما مکانیسم‌های قارچ‌کشی این گونه هنوز به طور کامل مشخص نشده است (Burmeister, 2008; De Marco *et al.,* 2003; Lorito *et al.,* 1996) .

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی توانایی جدایه‌های *Trichoderma* در تماس ، نفوذ و پیچش ریسه‌ای این جدایه‌ها و قطعه قطعه شدن ریسه‌های قارچ *F. oxysporum* ، تقابل مستقیم جدایه‌های *Trichoderma* و *F. oxysporum* به صورت میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از انجام این آزمایش مشاهده‌ی نحوه‌ی ارتباط بین ریسه‌های جدایه‌های مختلف *Trichoderma* با ریسه‌های *F. oxysporum* و چگونگی پارازیته شدن و تماس ریسه‌ای بین آن‌ها بود.این آزمایش به دو روش استفاده از لام و ایجاد شیار انجام گرفت.

۱-۱- روش استفاده از لام

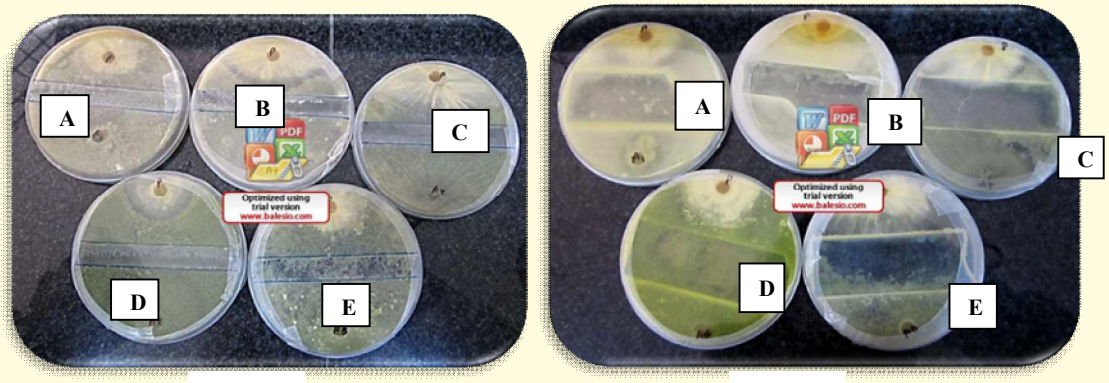
جهت انجام این آزمایش، ابتدا در وسط پتری‌های ۹ سانتیمتری حاوی محیط کشت PDA لام‌های استریل میکروسکوپی قرار داده شد. در یک طرف پتری‌دیش یک بلوک ۵ میلی‌متری از کشت ۷ روزه *F. oxysporum* به فاصله یک سانتیمتری از لبه پتری‌دیش و در طرف مقابل یک بلوک ۵ میلیمتری از کشت ۷روزه هر کدام از جدایه‌های *Trichoderma* کشت گردید. برای هر جدایه قارچ آنتاگونیست ۳ تکراردر نظر گرفته شد.پتری‌دیش‌ها در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. به این ترتیب با رشدریسه‌های قارچها ریسه‌ها به هم برخورد نمودند. با برداشتن لام وتمیز کردن زیر آن، با بزرگنمایی 40x میکروسکوپ چگونگی تاثیر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* روی *F. oxysporum* مشاهده و مورد بررسی قرار گرفت.

۱-۲- روش ایجاد شیار

در این روش با استفاده از یک اسکالپل استریل، نواری به عرض یک سانتیمتر در وسط پتری‌دیش‌های ۹ سانتیمتری حاوی محیط کشت PDA برداشته شد در نتیجه شیاری در وسط پلیت ایجاد شد.در یک طرف این شیار یک بلوک ۵ میلی‌متری از کشت ۷ روزه *F. oxysporum* به فاصله یک سانتیمتری از لبه پتری‌دیش و در طرف مقابل یک بلوک ۵ میلیمتری از کشت ۷روزه هر کدام از جدایه‌های *Trichoderma* کشت گردید. پس از رشد هر دو این قارچها با گذشت زمان ، ریسه‌های این قارچها در قسمت شیار که فاقد محیط کشت PDA بودند، به هم برخورد نمودند. نحوه‌ی تاثیر جدایه‌های *Trichoderma* و *F. oxysporum* در قسمت شیار به وسیله‌ی میکروسکوپ با بزرگنمایی 40x مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

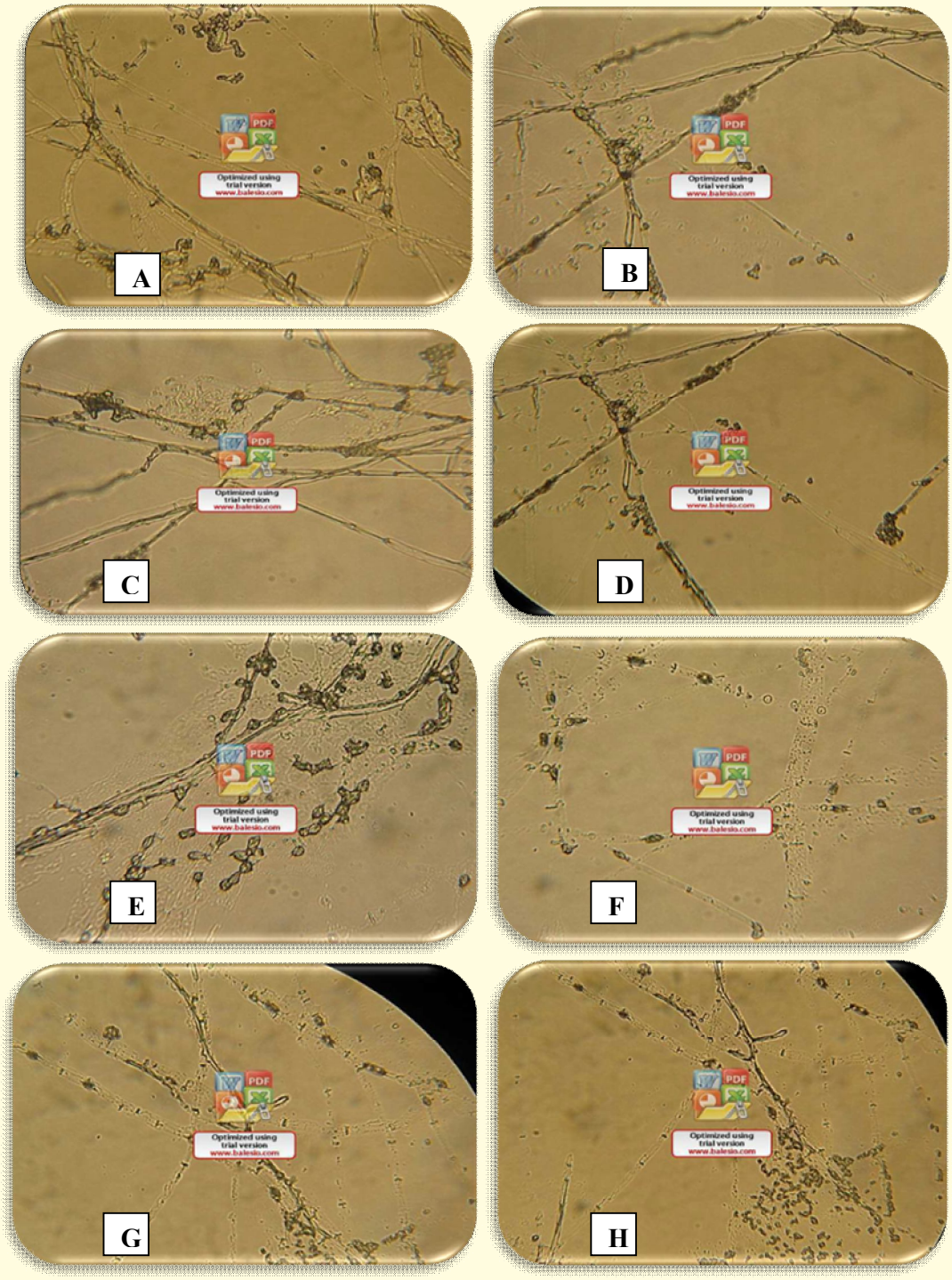
نتایج بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه‌های مختلف *Trichoderma* و *F. oxysporum* در دو روش لام و ایجاد شیار مشاهده شدکه ریسه‌های تمام جدایه‌های *Trichoderma* در مراحل اولیه برخورد با ریسه‌های *F. oxysporum* به موازات آن رشدنموده و تماس ریسه‌ای می-یابند. سپس با گذشت زمان به درون ریسه های *F. oxysporum* نفوذ کرده، پیچش ریسه‌های *Trichoderma* به دور ریسه‌ها و قطعه قطعه شدن ریسه‌های *F. oxysporum* نیز مشاهده گردید (تشخیص گونه‌ها بر اساس کلید Leslie *et al.*,2006 انجام شد).



(الف) (ب)

تصویر۱- بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه‌های *Trichoderma* وجدایه‌ی عامل بیماری با استفاده از **(الف)** روش لام **(ب)** روش ایجاد شیار

A: *F. oxysporum* & *T. longibrachiatum*, **B:** *F. oxysporum & T. koningii* , **C:** *F. oxysporum & T. virens* , **D:** *F. oxysporum* & THM , **E:** *F. oxysporum* & THA



تصویر۲- بررسی میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه‌های *Trichoderma* و جدایه قارچ عامل بیماری

A : تماس ریسه‌ای . **B ,G ,H :** پیچش ریسه‌ای و لایز شدن ریسه . **C** : لایز شدن و قطعه قطعه شدن ریسه .

D : پیچش ریسه‌ای . **E** : لایز شدن ریسه . **F** : قطعه قطعه شدن ریسه

در این تحقیق در بررسی‌های میکروسکوپی تقابل جدایه‌های *Trichoderma* و *F. oxysporum* در ناحیه‌ی برخورد دو ریسه، رشد ریسه‌های جدایه‌های *Trichoderma* به موازات ریسه‌های *F. oxysporum*، پیچش ریسه‌ای ، قطعه قطعه شدن ریسه‌ها و نفوذ ریسه ای مشاهده شد .پارازیتیسم فرایندی پیچیده و حاوی مراحل متعددی شامل شیمی-گرایی، اتصال یافتن، پیچش، ترشح آنزیم‌های هیدرولیزکننده و نهایتا" تخریب و تجزیه سلول می باشد. پیچش به دور ریسه‌ی میزبان و رشد به موازات آن را می‌توان به این موضوع نسبت داد (Lorito *et al*., 1996). نتایج بررسی‌های پیغامی و نیشابوری در سال ۱۹۹۱ نیز نشان داد که سه استرین *Trichoderma harzianum* مورد بررسی در تقابل با *Fusarium oxysporum* که از خیار جدا شده بود فقط از رشد میسلیوم ممانعت می‌نماید. در محل برخورد تریکودرما و عامل بیماری ریسه‌های دو قارچ بسیار تنک و کم تراکم مشاهده شدند. نتایج بررسی‌های بهبودی (۱۹۹۶) ، اعتباریان و همکاران (۲۰۰۰) موید قدرت تغذیه‌ای بالای تریکودرما می‌باشد. اثر جدایه *T. virens* در روی نژاد ۱ قارچ عامل بیماری *F. oxysporum* به صورت Fungicidal مشاهده شد.طبق گزارش نیک‌نژاد اثر جدایه *T. harzianum* (T2) برروی درصد کاهش بیماری ناشی از *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* ، بیشتر از سایر جدایه‌ها بود. جدایه‌های قارچ *Trichoderma* در آزمایشگاه با تاثیر از طریق ترشحات مایع خارج سلولی و ترکیبات گازی و همچنین با مکانیزم‌های هیپر پارازیتیسم، رقابت تغذیه‌ای و آنتی‌بیوز توانستند از رشد قارچ بیماری-زای *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* بکاهند. در مورد قارچ *Trichoderma* جهت استفاده در مبارزه بیولوژیک علیه فوزاریوم معیارهایی مثل رشد جدایه‌ها، قدرت کلونیزاسیون، قدرت رقابت با عوامل بیماری‌زا ، قابلیت کنترل‌کنندگی ترشحات مایع خارج سلولی و ترکیبات فرار، افزایش ترکیبات روی قدرت حیاتی عامل بیماری‌زا و از همه مهم‌تر قدرت کنترل‌کنندگی عمومی جدایه‌ها مد نظر قرار می‌گیرد.پیشنهاد می‌گردد از تعداد گونه‌های بیشتری از *Trichoderma* در جهت کنترل بیولوژیک *F. oxysporum* طوقه وریشه استفاده شود و از بین آن‌ها بهترین و موثرترین به کار گرفته شود. همچنین از *Trichoderma* در مورد گونه‌های دیگر *Fusarium* که از طوقه وریشه‌ی برنج جدا شده‌اند ،استفاده شود. در واقع از یک یا چند گونه‌ی موءثر *Trichoderma* جهت کنترل مجموع گونه‌های فوزاریم طوقه وریشه برنج استفاده شوند.

منابع

Alexoppulos C J, Mims C W, Blackwell M, 1996. Introdustory Mycology , 4 Edition, John wiley and sons Incorporated, New York.

Benitez T, Rincon A M, Timon M C, Cordon A C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7(4): 249-260.

Burmeister L, 2008. The antagonistic mechanisms employded by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* Ph.D. Thesis. University of Hannover, Germany

Davet P, Artgues M, Martin C, 1981. Production en conditions non aseptiques d'inoculum de. *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique Agronomie, 1(10):933-935 (In French with English abstract).

Deacon J W, 1991. Significance ecology in the development of biological agent against soilborn plant pathogens. Biocontrol Science and Technology, 1: 5-20.

De Marco J L, Valadares-Inglis MC, Felix CR. 2003. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma sp*. isolates with antagonistic activity against Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches broom of cocoa. Brasilian Journal of Microbiology, 34(1): 33-38.

El- Katany M H, Gudelj M, Robra K H, Elnaghy M A, Gubitez G M, 2001. Characterization of Chitinase and endo ß-1,3 glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T21 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology, 562: 137-143.

Emma W G, Simeon O K, 2008. The use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* as potential biocontrol agent against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. Biothecnology, Asian Network for Scientific Information, 1-9.

Godtfredsen W O, Vangedal S, 1965. Trichodermin, a new sesquiterpen antibiotic. Acta Chimica Scandinavia, 19: 1088-1102.

Harman G E, 2000. Myths and dogmas of biocontrol, changes in perception drived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, 84: 377-393.

Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek C, 1996. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. Journal of Bacteriology, 187:6382-6385.

Lumsden R D, Ridout C J, Vendemia M E, Harrison D J, Waters R M, Walter L.F. 1992. Characterization of major secondary metabolites produced in soilless mix a formulated strain of the biocontrol fungus *Gliocladium virens*. Canadian Journal by of Microbiology, 38: 1274-1280

Papavizaz G O, 1995. Trichoderma biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23: 28-54.

Hoitink H A J, Modden L V, Dorrance A E, 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma spp*.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent and soil organic matter quality. Phytopathology, 96: 186-189.

Jabbarzadeh J, Kaviani M H, Ghasemi N, Mohandessi A R, SafarianS. 2010. Effect of *Trichoderma harzianum* T22 (TRIANUM-P®) on decreasing of soil-born diseases and improvement of tomato (Lycopersicon infection esculentum) quality factors in greenhouses of Tehran region. In Proceedings of the 19th Iranian Plant Protection Congress, 823p.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E L, Marra R, Wooa S L, Lorito M, 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry, 40: 1-10.