مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، سال ۱۳۸۰ (۷۵۵-۷۴۷)

بررسی اثر آنتاگونیستی چند جدایه تریکودرما روی عوامل قارچی پوسیدگی ریشه پیاز در آذربایجانشرقی

ابراهیم پیغامی
دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۴/۱۲

خلاصه

جهت جداسازی میکوفلورآنتاگونیست و بیماری‌زای ریشه و طبق پیاز در مزارع پیاز استان آذربایجانشرقی از محیط کشت انتخابی داوه (Davet)، نیمه انتخابی مالت آگار رزبنگال و NM استفاده شد.ازریشه‌وطبق‌پیاز آلوده به عوامل پوسیدگی ریشه (*Fusarium spp*) و پوسیدگی سفید ریشه (*Sclerotium cepivorum* Berk) مزارع پیاز آلوده و سالم نمونه‌برداری شد و در داخل آب سترون به مقدار صد میلی‌لیتر در هر فلاسک توسط دستگاه تکان دهنده الکتریکی با دور متوسط (۷۵ دور در دقیقه) و به مدت نیم ساعت تکان داده شد. از سوسپانسیون پروپاگول میکروارگانیسم‌هایی که بدین ترتیب حاصل گردید با غلظت ده درصد به مقدار دو قطره در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت چگانده و بعد از مخطط کردن در حرارت ۲۴°C و نور متناوب (۱۰ ساعت در طول ۲۴ ساعت) کشت گردید. قارچ‌هایی که از کشت سوسپانسیون جدا گردید عبارت بودند:

Fusarium oxysporum Schlecht., *Fusarium acuminatum* Fell et Ev.,
Fusarium solani (Mart.) Sacc., *Fusarium equiseti* (Cord) Sacc. *Sclerotium cepivorum* Berk.
Trichoderma harzianum Rifai. *Trichoderma* viride Pers.

در بررسی حالت تضاد قارچ‌های آنتاگونیست (*T. harzianum* و *T. viride*) با عوامل بیماری‌زایی قارچی مشاهده گردید که قارچ‌های آنتاگونیست دارای هر سه حالت تضاد می‌باشند. ترشحات خارج سلولی (Culture filtrate) جدایه‌های آنتاگونیست‌ها از نظر جلوگیری از رشد پرگنه عوامل بیماری‌زایی فوزاریومی ریزوسفر و تندش اسکلروت *S. cepivorum* در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. متابولیت‌های فرار کلیه جدایه‌های تریکودرما در کاهش رشد میسلیومی قارچ‌های بیماریزا تنها در حالی که تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از عوامل بیماری‌زا کشت شده بود در سطح ۱٪ معنی‌دار بود ولی در مقایسه با شاهد در تندش اسکلروت‌های عامل پوسیدگی سفید پیاز اثر چندانی نداشتند.

واژه‌های کلیدی: پیاز، پژمردگی فوزاریومی، پوسیدگی سفید پیاز، آنتاگونیست، تریکودرما.

مقدمه

خاک ریزوسفر عبارت است از خاک مجاور ریشه گیاه که غنی از مواد غذایی است و متاثر از ریشه و کانون فعالیت‌ها و اثر تقابل‌های بین گیاه – پاتوژن و محیط می‌باشد. رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در ریزوسفر، تابع اثرات نوع گیاه (ترشحات ریشه)، نوع خاک و پارامترهای محیط می‌باشد. هر گیاه زراعی به دلیل طبیعت بیوشیمیایی اختصاصی ریزوسفر خود دارای تعداد و انواع به خصوصی از قارچ‌ها در ریزوسفر خود می‌باشد که

بیشتر تحت تاثیر ترشحات ریشه آن گیاه قرار دارند. شناسایی و مطالعه این میکروارگانیسم‌ها از دید محققین معتبر گیاهپزشکی به دلیل ارزش و اهمیت آنها در ارتباط با کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزی یکی از فاکتورهای مهم و پراهمیت می‌باشد (۸).

گونه‌های قارچ تریکودرما که جزو میکروفلور خاک‌های زراعی می‌باشند عامل کنترل کننده بیولوژیکی بعضی از عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزی از آن جمله *Fusarium solani* عامل پوسیدگی سیاه ریشه نخود (۱)، *Phytophthora erythroseptica* عامل بیماری پوسیدگی صورتی غده سیب‌زمینی (۲) و *Sclerotinia sclerotiorum* عامل بیماری اسکلروتینیای گیاه بادنجان (۵) هستند.

با توجه به اینکه عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزی پیاز در آذربایجانشرقی که توسط اسدی و همکاران شناسایی شده‌اند (۳ و ۴)، موجبات زیان اقتصادی مهم در مزارع پیاز می‌گردند و تقلیل جمعیت آنها در خاک به صورت مطلوب با کنترل شیمیایی مشکل است، به همین دلیل استفاده از قارچ‌های ساپروفیت میکوفلور خاک‌های زراعی پیاز برای کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزی آن مفید تشخیص داده شده است. برای نیل به این هدف و پیاده نمودن مبارزه بیولوژیک یا کنترل تلفیقی پاتوژنهای خاکزی پیاز، مقدمتاً شناخت میکوفلور خاک‌های ریزوسفر پیاز و اثرات متقابل آنها به همدیگر ضروری به نظر می‌رسد. در این طرح ابتدا در مزارع مورد نظر، میکوفلور ریزوسفر گیاهان پیاز مشخص شد و سپس حالات تضاد قارچ‌های ساپروفیت و بیماری‌زای میکوفلور بررسی و در شرایط آزمایشگاهی از نظر فعالیت هیپرپارازیتی و قدرت بازدارندگی ترشحات خارجی سلولی قارچ‌های ساپروفیت روی قارچ‌های بیماریزای خاکزاد پیاز آزمایشاتی انجام گرفت.

مواد و روشها

۱- منابع عوامل بیماری‌زای قارچی و آنتاگونیستی ریشه و طبق پیاز

در این بررسی از قارچ‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* *F. solani* *F. acuminatum* *F. equiseti* *Sclerotium cepivorum* جدا شده از ریشه و طبق گیاهان پیاز بیمار در مزارع چهار منطقه بناب، ایلخچی، گوگان و باسمنج استفاده شد.

هفت جدایه از *T. viride* و دو جدایه از *T. harzianum* از خاک مزارع پیاز و خاک ریزوسفر پیازهای آلوده به عوامل بیماری‌زای قارچی فوق‌الذکر مورد استفاده قرار گرفت.

۲- طریقه کشت میکوفلور ریزوسفر پیاز

جهت جداسازی میکوفلور عوامل بیماری‌زای ریزوسفر پیاز با توجه به عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزاد پیاز که توسط اسدی و همکاران (۴) شناسایی شده، از طریقه کشت سوسپانسیون آنها در روی محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) برای جداسازی عامل پوسیدگی سفید ریشه (*S. cepivorum*) و از محیط کشت انتخابی نش مدیوم (NM) برای جداسازی انواع گونه‌های فوزاریوم (۱۶) یا عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز استفاده شد. از غده و ریشه پیازهای آلوده به فوزاریوم مزارع منطقه بناب، ایلخچی، گوگان و باسمنج بطور جداگانه در قالب یک طرح ترتیبی هر ماه و به مدت شش ماه از ابتدای دوره رشد و نمو بوته‌های پیاز (۷۷/۲/۱۵) نمونه‌برداری به عمل آمد و در داخل آب سترون (۱۰۰ میلی‌متر آب برای هر شش غده پیاز آلوده) در فلاسک نیم لیتری توسط دستگاه تکان دهنده الکتریکی با دور متوسط (حدود ۷۵ دور در دقیقه) و به مدت نیم ساعت تکان داده شد. از سوسپانسیون پاتوژن‌های غده و ریشه که بدین ترتیب حاصل گردید با غلظت ده درصد به مقدار دو قطره (۰/۱ میلی‌لیتر) در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت چکانده و بعد از مخطط کردن در حرارت ۲۴ درجه سانتی‌گراد و نور متناوب (۱۰ ساعت در طول ۲۴ ساعت) نگهداری شد. همچنین از پوسته غده‌های پیاز که اسکلروتهای عامل پوسیدگی سفید پیاز بر روی آنها نمایان بود پس از شستشو با آب و ضد عفونی سطحی با محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت دو دقیقه و خشک کردن آنها با کاغذ صافی استریل در روی محیط کشت PDA کشت داده شد. بعد از ۱۰ روز پرگنه هر یک از قارچهایی که بر روی محیط کشت رشد کرده بودند ضمن خلوص به روش نوک هیفی و تشخیص به لوله آزمایش منتقل شد.

تشخیص گونه جدایه‌های فوزاریوم با روش نلسون و همکاران (۱۶) بر اساس خصوصیات اندام‌های رویشی و زایشی از

قبیل نوع فیالید، شکل ماکروکنیدی و میکروکنیدی، وجود یا فقدان کلامیدوسپور و شکل و نوع آنها تا سطح گونه تشخیص داده شد. بعضی از جدایه‌های فوزاریوم که روی محیط کشت PDA ماکروکنیدی تیپک تولید نمی‌کردند، برای تولید ماکروکنیدی تیپک از محیط کشت آگاردار برگ میخک (CLA) استفاده شد (۱۶).

جهت مشاهده میکروکنیدیهای زنجیری شکل در جدایه‌های فوزاریوم، از محیط کشت آب آگار + کلرید پتاسیم (KCl) استفاده شد. برای هر لیتر محیط کشت حدود شش گرم کلرید پتاسیم افزوده شد. اثبات بیماری‌زایی میکوفلور بیماری‌زای ریشه و طبق پیاز با رعایت اصول کخ انجام شد.

برای جداسازی قارچ‌های آنتاگونیست، از غده و ریشه پیازهای سالم و آلوده پس از عاری کردن آنها از خاک اطراف پیاز، از قسمت‌های سطحی هر غده پنج قطعه کوچک نمونه‌برداری و در محیط کشت انتخابی تریکودرما کشت داده شد. برای جدا کردن تریکودرما از خاک اطراف غده پیاز از محیط کشت پپتون – گلوکز آگار حاوی ppm ۱۷ روز بنگال، mg ۳۰ سولفات استرپتومایسین و ppm ۲۰۰ فرم آلدئید و همچنین محیط کشت داوه (۱۱) با روش روحانی و همکاران استفاده شد (۷).

تشخیص گونه‌های تریکودرما با استفاده از روش رفائی (۱۸) و سبی (۱۹) با توجه به اندازه فیالیدو فیالسپور، وجود هیف‌های عقیم، طرز قرار گرفتن فیالوسپورها روی فیالید، زوایای انشعابات فرعی کنیدیوفورها، شکل پرگنه آنها، شکل فیالیدها و همچنین میزان رشد قطر پرگنه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت ۲ درصد مالت آگار در طول چهار روز تا سطح گونه شناسایی شد.

۳- بررسی فعالیت پارازیتی تریکودرما روی عوامل بیماری‌زای قارچی ریشه و طبق پیاز

برای بررسی ماکروسکپی حالت آنتاگونیستی از کشت پنج روزه تریکودرما که در PDA کشت داده شده بود به قطر ۳ میلی‌متر در حاشیه ظرف پتری حاوی PDA کشت گردید. در حاشیه مقابل ظروف پتری بر روی محیط کشت به همان قطر ازکشت ۵ روزه عوامل بیماری‌زای خاکزاد پیاز قرار داده شد.

برای بررسی میکروسکپی حالت آنتاگونیستی از کشت دو قارچ تریکودرما و بیماری‌زا که در فوق اشاره شدند قطعه‌ای از محیط کشت به شکل مستطیل از وسط ظروف پتری با اسکالپل استریل برداشته شد. بعد از تماس هیف‌های دو قارچ بیماری‌زا و تریکودرما تا مدت ۵ روز نمونه‌های میکروسکپی هر روز تهیه، و بررسی گردید.

۴- بررسی اثر ترشحات مایع گونه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه عوامل بیماری‌زای فوزاریومی ریزوسفر پیاز

این بررسی با استفاده از روش دنیس (۱۳) طراحی گردید: محیط کشت مایع کزاپک (۸) جهت این بررسی استفاده شد. بدین ترتیب که جدایه‌های تریکودرما *(T. harzianum* و *T. viride)* در ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع که قبلاً سترون شده بود به اندازه یک پلاک به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه هر یک از ۹ جدایه تریکودرما در PDA، ریخته شد. ارلن‌ها به مدت ده روز در دستگاه تکان دهنده با ۷۵ تکان در دقیقه در شرایط آزمایشگاه با دمای حد متوسط ۲۴ °C نگهداری شد. ترشحات تریکودرما ابتداء با استفاده از کاغذ صافی استریل از قارچ تریکودرما که به صورت گلوله‌هایی رشد کرده بود جدا و سپس توسط سانتریفوژ با ۷۵ دور در دقیقه خالص و با فیلتر میکروبیولوژیکی استریل به قطر ۰/۲۵ میکرون عاری از پروپاگول تریکودرما گردید.

جهت بررسی اثر ترشحات حاصل از هر یک جدایه‌های فوق‌الذکر در جلوگیری از رشد پرگنه عوامل بیماری‌زای ریزوسفر، در داخل لوله‌های آزمایش به ترتیب به حجم‌های ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶ و ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA (محیط کشت PDA با دو برابر غلظت آگار تهیه شد تا در اثر اضافه کردن عصاره آنتاگونیست و افزایش حجم، عمل انعقاد محیط کشت در ظرف پتری امکان‌پذیر باشد) ریخته شد. پس از استریل کردن محیط کشت PDA در داخل لوله‌های آزمایش در حالی که هنوز مایع بود (در حرارت حدود ۷۰ °C) با استفاده از پیپت استریل به ترتیب به مقدار ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌لیتر از ترشحات حاصل از هر یک جدایه اضافه و سپس محیط‌های کشت به ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متر ریخته شد و بدین ترتیب نسبت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد از ترشحات هر جدایه

تریکودرما در داخل ظروف پتری حاوی محیط کشت به دست آمد. برای هر نسبت از ترشحات چهار تکرار در نظر گرفته شد (شاهد بدون افزایش ترشحات به محیط کشت بود).

پس از انعقاد محیط کشت در داخل ظروف پتری در وسط هر ظرف پتری یک پلاک از کشت چهار روزه عوامل بیماری‌زا به قطر ۵ میلی‌متر کشت داده شد. رشد پرگنه عوامل بیماری‌زا بعد از یک هفته در دمای ۲۴ °C اندازه‌گیری شد. درصد بازداری از رشد پرگنه عوامل بیماری‌زا توسط ترشحات تریکودرما با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$\frac{\text{قطر پرگنه در غلظت معین از ترشحات} - \text{قطر پرگنه عوامل بیماری‌زا در ظرف پتری شاهد}}{\text{قطر پرگنه عوامل بیماری‌زا در ظرف پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

این بررسی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و ۴ تکرار انجام و میانگین‌ها با روش دانکن مقایسه شدند.

۵-بررسی‌اثرترشحات مایع جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد اسکلروت‌های قارچ عامل پوسیدگی سفید پیاز

ترشحات مایع هر یک از ۹ جدایه تریکودرما عیناً مطابق روش ذکر شده در بند ۴ در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری تهیه گردید. سپس در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل ده اسکلروت قارچ *S. cepivorum* در ترشحات داخل هر ارلن ریخته شد. در ارلن شاهد بجای عصاره قارچ تریکودرما از محیط کشت مایع استفاده شد. دهانه ارلن‌ها را با پنبه مسدود و در شرایط آزمایشگاه در حرارت ۲۲°C به مدت سه روز روی تکان دهنده با ۷۵ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس محتوی هر ارلن در کنار شعله چراغ الکلی تخلیه و اسکلروت‌های موجود در هر رالن را توسط یک پنس استریل خارج و با تهیه آموده (Preparation) از اسکلروت‌ها، رشد و تولید میسیلیوم توسط آنها بررسی گردید. این بررسی در ۱۰ تیمار و سه تکرار به صورت طرح کامل تصادفی انجام شد.

۶- بررسی‌اثرمتابولیت‌های‌فرار (گازی) تریکودرما در جلوگیری از رشد میسیلیوم عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزی پیاز

این بررسی با توجه به روش دنیس و همکاران (۱۲) در دو مرحله طراحی گردید.

در مرحله اول جدایه‌های تریکودرما و قارچ‌های بیماری‌زا همزمان کشت شدند. در مرحله دوم جدایه‌های تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از عوامل بیماری‌زا کشت گردید.

روش آزمایش هر دو مرحله یکسان بود، بدین ترتیب که ابتدا محیط کشت PDA به روش معمول، در ظرف پتری ریخته شد. ظروف پتری به دو دسته تقسیم شدند. در یک دسته از آنها پلاکی از کشت پنج روزه عوامل بیماری‌زا به قطر ۵ میلی‌متر در وسط ظروف پتری کشت داده شد. در دسته دیگر، ظروف پتری به گروه‌های سه تایی تقسیم شدند و هر سه ظرف پتری به یک جدایه از قارچ‌های تریکودرما اختصاص یافت و پلاکی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت چهار روزه آنها در وسط ظرف پتری قرار داده شد. تریکودرما همزمان و ۲۴ ساعت قبل از قارچ‌های پاتوژن در وسط ظروف پتری کشت شد. سپس در شرایط استریل در کنار شعله، درب ظروف پتری حاوی قارچ عوامل بیماری‌زا برداشته و بصورت وارونه روی ظرف پتری حاوی قارچ تریکودرما قرار داده شد و بانوار چسب پوشانده شد تا بدین ترتیب فقط متابولیت‌های فرار تریکودرما بر عوامل بیماری‌زا موثر واقع شود.

ظروف پتری در انکوباتور با حرارت ۲۴ °C نگهداری شدند. در هر دو مرحله اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ عوامل بیماری‌زا در سه نوبت به فاصله سه روز انجام شد. در ظروف پتری شاهد فقط از پلاکی به اندازه ۵ میلی‌متر محیط کشت فاقد تریکودرما استفاده شد.

درصد بازداری از رشد پرگنه قارچ‌های عوامل بیماری‌زا در اثر متابولیت‌های فرار تریکودرما در هر دو روش آزمایش با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

$$\frac{\text{اندازه قطر پرگنه در جوار متابولیت فرار} - \text{اندازه قطر پرگنه عامل بیماری‌زا در ظرف پتری شاهد}}{\text{اندازه قطر پرگنه عامل بیماری‌زا در ظرف پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

این بررسی در هر دو روش، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۰تیمارو ۳ تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده از این آزمایش در هر دو روش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ۵ ٪=α انجام گرفت.

نتایج

در گیاهان پیازه بهاره آلوده به پژمردگی فوزاریومی یا بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیازه ده جدایه F. oxysporum، شش جدایه F. Solani، سه جدایه

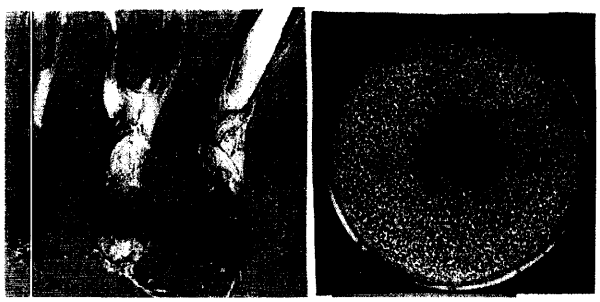
جدول ۱- منبع تهیه تریکودرما، نام جدایه و اسامی اختصاری آنها

ردیف	منبع تهیه نام جدایه	نام اختصاری	توضیحات
۱	مزرعه شماره (۱) *Trichoderma viride*	*Tr 1*	مزرعه پیاز از خاک ریزوسفر با محیط کشت Davet
۲	مزرعه شماره (۲) *Trichoderma viride*	*Tr 2*	مزرعه پیاز از خاک ریزوسفر با محیط کشت Davet
۳	مزرعه شماره (۳) *Trichoderma viride*	*Tr 3*	مزرعه پیاز از خاک ریزوسفر با محیط کشت پپتون گلوکز
۴	مزرعه شماره (۴) *Trichoderma viride*	*Tr 4*	خاک مزرعه پیاز با محیط کشت Davet
۵	مزرعه شماره (۵) *Trichoderma harzianum*	*Tr 5*	خاک مزرعه با محیط کشت Davet
۶	مزرعه شماره (۶) *Trichoderma viride*	*Tr 6*	مزرعه پیاز از خاک ریزوسفر با محیط کشت پپتون گلوکز
۷	مزرعه شماره (۷) *Trichoderma viride*	*Tr 7*	خاک مزرعه پیاز با محیط کشت Davet
۸	مزرعه شماره (۸) *Trichoderma viride*	*Tr 8*	خاک مزرعه پیاز با محیط کشت پپتون گلوکز
۹	مزرعه شماره (۹) *Trichoderma harzianum*	*Tr 9*	خاک مزرعه پیاز با محیط کشت پپتون گلوکز

F. acuminatum و دو جدایه F. equiseti تشخیص داده شدند. در گیاهان پیاز پاییزه آلوده به عامل پوسیدگی سفید ریشه عموماص S. cepivorum جدا سازی شد.

علائم بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز اغلب بعد از چهل روز کاشت، به فرم زردی و خشک شدن نوک برگ‌ها و پژمردگی تک بوته‌ها دیده شد. این علائم به تدریج به طرف پایین برگ‌ها پیشروی کرد. در بوته‌های پیاز بیمار که توسط F. oxysporum آلوده شده بودند ریشه‌ها به رنگ صورتی و ظاهر سالم داشتند در صورتی که در گونه‌های دیگر فوزاریوم ریشه‌ها پوسیده و قهوه‌ای رنگ بودند. گونه F. oxysporum نسبت به سه گونه دیگر موجب آلودگی بیشتر در مزارع پیاز بود.

در پوسیدگی سفید ریشه پیاز علائم بیماری بصورت زرد شدن نوک برگ‌ها و پژمردگی بوته‌ها بعد از چهل روز کاشت بروز کرد. بوته‌های بیمار از خاک به راحتی کنده می‌شد و میسلیوم سفید و پنبه‌ای قارچ به فرم توده متراکم و کرک مانند روی طبق پیاز و حتی ریشه مشاهده گردید. به مرور اسکلروت‌های قارچ به فراوانی روی طبق پیاز تشکیل و نهایتاً بوته‌های پیاز پلاسیده و در سطح خاک افتادند (شکل ۱).



شکل ۱- علائم بیماری پوسیدگی سفید پیاز در گلدان‌های حاوی خاک زراعی + اسکلروت (A) و اسکلروتهای قارچ *S. cepivorum* (B)

در جداسازی قارچهای آنتاگونیست از غده و ریشه پیازهای آلوده و سالم و همچنین خاک ریزوسفر پیاز ۹ جدایه تریکودرما جداسازی شد. منبع تهیه این جدایه‌ها، نام آنها، اسامی اختصاری که جهت سهولت کار برای هر یک از آنها انتخاب گردیده درجدول شماره ۱ درج گردیده است.

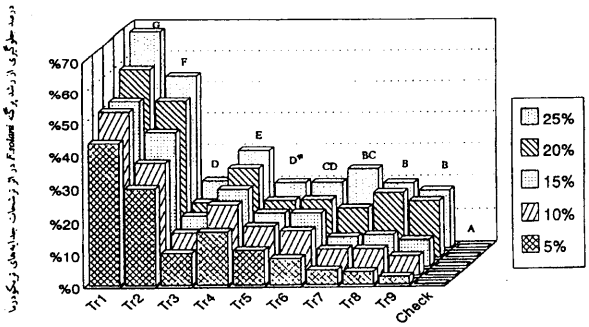
در کشت دو گونه تریکودرما و جدایه‌های گونه‌های فوزاریوم در مقابل یکدیگر، هیف جدایه‌های تریکودرما در برخورد با هیف قارچهای بیماری‌زا به موازات آن رشد کرده و ضمن تولید انشعابات بیشتر، پیچش هیف آنها به دور هیف پاتوژنها مشاهده شد. با افزایش پیچش، هیف عوامل بیماری‌زا منقبض، تغییر شکل و پلاسمولیز شده بود.

کشت‌های *T. harzianum* و *T. viride* در مقابل عامل پوسیدگی سفید پیاز در روی محیط کشت PDA دارای حالات مختلف تضاد از آن جمله هیپرپارازیتیسم، آنتی بیوز (antibiosis)، رقابت تغذیه‌ای یا پیشروی و اسپورزایی بیشتر با تغذیه مطلوب‌تر از عامل بیماری‌زا در محیط کشت و همچنین ممانعت از تشکیل اسکلروت قارچ عامل بیماری‌زا در محیط کشت بود.

تمام جدایه‌های تریکودرما دارای سرعت رشد و تکثیر بیشتر با مقایسه با عامل پوسیدگی سفید پیاز در روی محیط کشت PDA در ظروف پتری داشتند. بطوریکه بعد از پنج روز کشت، تمام سطح محیط کشت از پرگنه قارچ تریکودرما اشغال شده بود و حتی کلنیزاسیون و اسپورزایی روی پرگنه عامل پوسیدگی سفید پیاز مشاهده شد. در بررسی میکروسکپی محل برخورد اولیه هیف‌های هر دو گونه تریکودرما با هیف‌های عامل بیماری پوسیدگی سفید پیاز نفوذ مستقیم هیف‌های تریکودرما به داخل هیف *S. cepivorum* مشاهده شد (شکل ۲).

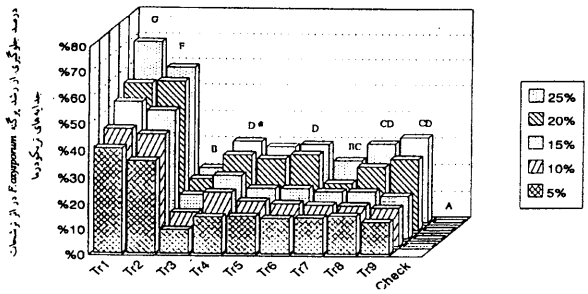
در بررسی اثر ترشحات مایع جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه عوامل بیماری‌زای فوزاریومی ریزوسفر پیاز مشاهده گردید که جدایه‌های تریکودرما از نظر تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی در جلوگیری از رشد پرگنه گونه‌های فوزاریوم در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار با شاهد، تنها در غلظت ۲۵ درصد از ترشحات هر جدایه تریکودرما داشت. مخصوصاً تقلیل رشد پرگنه دو گونه *F. oxysporum* و *F. solani* در اثر ترشحات مایع جدایه‌های تریکودرما محسوس‌تر بود (شکل ۳ و ۴)و اثر متقابل دو عامل جدایه و غلظت در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار نشان داد. همچنین غلظت‌های مورد آزمایش از ترشحات مایع خارج سلولی در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌داری در جلوگیری از رشد پرگنه گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* داشت.

شکل ۲- نفوذ مستقیم هیف تریکودرما در هیف عامل پوسیدگی پیاز



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف ترشحات جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه F. solani

* تیمارهایی با غلظت ۲۵ درصد ترشحات تریکودرما و با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ با همدیگر دارند.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف ترشحات جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه F. oxysporum

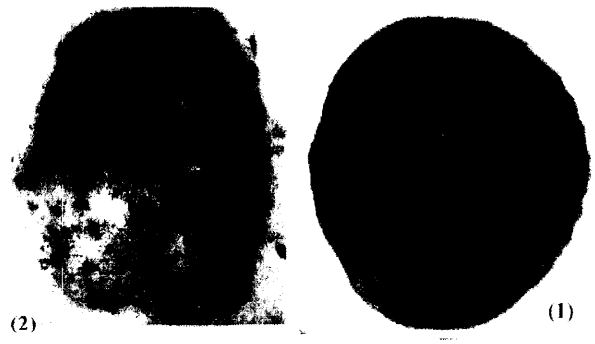
* تیمارهایی با غلظت ۲۵ درصد ترشحات تریکودرما و با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ با همدیگر دارند.

در بررسی اثر ترشحات مایع جدایه‌های تریکودرما در رشد اسکلروتهای *S. cepivorum* مشخص شد که در محیط کشت مایع، ترشحات تریکودرما مانع از رشد اسکلروت‌های عامل بیماری‌زا می‌شوند، در صورتی که در شاهد (محیط کشت مایع + اسکلروت عوامل بیماری‌زا) ترکیدگی اسکلروت‌ها (شکل ۵) و سپس خروج میسیلیوم از اسکلروت محسوس بود.

بررسی مربوط به اثر متابولیتهای فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه عوامل بیماری‌زای فوزاریومی تنها در حالی که تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از گونه‌های فوزاریوم در ظروف پتری کشت شده بود در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (شکل۶). ولی توانایی ترشحات فرار جدایه‌های مختلف تریکودرما از نظر جلوگیری از تندش اسکلروت‌های عامل پوسیدگی سفید پیاز معنی‌دار نبود.

بحث

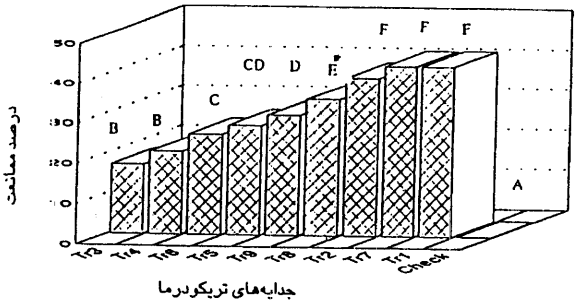
بررسی‌های انجام شده در مورد ۹ جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. viride* روی قارچ‌های عامل پوسیدگی



شکل ۵- ترکیدگی و رشد اسکلروت در محیط کشت مایع (۱) و عدم رشد آن در محیط کشت مایع + ترشحات تریکودرما (۲)

ریشه پیاز *(Fusarium spp.)* و قارچ *S. cepivorum* عامل پوسیدگی سفید ریشه پیاز نشان می‌دهد که گونه‌های تریکودرما از عوامل کنترل کننده این عوامل بیماری‌زا است و مکانیزم اثر هر یک از گونه‌های تریکودرما به صور هیپرپارازیتیسم، رقابت تغذیه‌ای، آنتی بیوز می‌باشد. مشابه این نتایج در بررسی‌های انجام گرفته توسط روحانی و همکاران (۷)، اخوت و همکاران (۱ و ۲)، بازگیر (۶) و امیر صادقی (۵) نیز قابل مشاهده است. همچنین الاد و همکاران (۱۴) اثر *T. harzianum* در کنترل بیولوژیکی *Sclerotium rolfsii* و *R. solani* را مورد تایید قرار داده است.

جدایه‌های قارچهایی از جنس *Trichoderma* و *Gliocladium* از ریزوسفر نخود آلوده به قارچ عامل بیماری پوسیدگی سیاه ریشه نخود *(F. solani)* توسط اخوت (۱) دلیلی بر وجود فعال قارچهای آنتاگونیست در خاک‌های ریزوسفر گیاهان زراعی است. کاربرد این قارچها در مزرعه مستلزم تقویت غذایی و سازگاری آنها در خاک مزرعه است. در



شکل ۶- درصد ممانعت از رشد پرگنه F. Oxysporum در اثر ترشحات گازی تریکودرما هنگامی که تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از عامل بیماری‌زا کشت شده است.

* تیمارهایی با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار در سطح۱٪ با همدیگر دارند.

موفقیت کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای خاکزاد با گونه‌های مختلف تریکودرما، نوع مایه (inoculum)، خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک از قبیل اسیدیته، میزان عناصر معدنی به ویژه آهن، مواد آلی، تهویه خاک و همچنین فصل کاربرد آنتاگونیستها و عوامل بیماری‌زا موثر بوده و تهیه مایه تریکودرما روی سبوس گندم جهت کنترل پاتوژن‌های خاکزی موثرتر از اضافه کردن اسپورترکودرما به خاک است. اسپورهای تریکودرما در مقابل خاصیت جلوگیری کنندگی خاک حساستر از میسیلیوم این قارچ می‌باشد (۱۷). به همین دلیل استفاده از مایه میسیلیومی گونه‌های تریکودرما در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزاد توصیه می‌گردد. همچنین اضافه کردن مایه تریکودرما به خاک قبل از کاشت بذر یا نشاء در خاک آلوده موجب فعال شدن تریکودرما در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی خاکزاد شده و فرصت‌بیشتری جهت تاثیر بر علیه عوامل بیماریزا خواهد داشت.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. اخوت، م. کرمپور، ف. ۱۳۷۵. تاثیر چند جدا شده از قارچهای آنتاگونیست علیه پوسیدگی سیاه ریشه نخود (*Fusarium solani*) در شرایط گلخانه. مجله علوم کشاورزی. جلد ۲۷، شماره ۲، دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۴۵-۳۷.

۲. اخوت، م. حجارود، ق. روحانی، ح. ظفری، د. ۱۳۷۲. بررسی اثر آنتاگونیست چند جدا شده *Trichoderma* روی *Phytophthora* erythroseptica عامل بیماری پوسیدگی‌صورتی‌غده‌سیب‌زمینی. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۵، شماره ۲.

۳. ارشاد، ج. ۱۳۷۴. قارچهای ایران. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، صفحه ۲۶-۲۵.

۴. اسدی، پ. بهروزین، م. ۱۳۶۶. تاثیر عصاره غده‌های پیاز و سیر روی رشد میسلیوم سه گونه *Fusarium* و *Sclerotium* cepivorum ، نشریه بیماری‌های گیاهی، شماره ۱-۴، جلد بیست و سوم. صفحه ۶-۱.

۵. امیرصادقی، س. ۱۳۷۱. بررسی اثر چند قارچکش و قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* روی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل بیماری اسکلروتینیای گیاه بادنجان. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران ۲۱۱ص.

۶. بازگیر، ع. ۱۳۷۰. بررسی اثر قارچ *Trichoderma* علیه *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی بذر لوبیا. پایان نامه فوق لیسانس گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران. ۱۸۰ ص.

۷. روحانی، ع. کریمی، ع. نوعپرست، ف. ۱۳۶۹. نقش ایزوله‌های تریکودرمای ایران در مبارزه بیولوژیکی علیه *Rhizoctonia solani* نشریه موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی. جلد ۵۸. شماره ۱ و ۲. صفحه ۲۸-۱۷.

8. Baker, R. and Synder, W. C. 1989. Rhizosphere mycoflora of potato, prelude to biological control. Plant Dis. 75: 419-425.
9. Cook, K. J. & K. F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogen. APS Press. 539pp.
10. Coley – Smith, J. 1987. Alternative methods of control with rot disease of *Allium*. In: Innovative Approaches to Plant Disease Control (ed. I. chet) pp. 161-77. Wiley, New York.
11. Davet, P. 1979. Technique pour l"nanalyse des population de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. Ann. Phytopathol. 11: 529-533.
12. Dennis, C. J. Webster. 1961. Antogonistics properties of species groups of *Trichoderma*, 11- production of volatile antibiotics. Trans. B. Mycol. Soc. 57: 41-48.
13. Dennis, C. Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species – groups of Trichoderma, I – Production of nonvolatile antibiotic. Trans. Br. Mycol., 64, 27, 26-39.
14. Elad, Y. I. Chet, and J. Katan. 1983. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathol. 70: 119-121.
15. Esler, G. and Coley – Smith J. R. 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology 32: 13-22.
16. Nelson, P. E., T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species. The Pennsylvania State University, University Park and London, 192 pp.
17. Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathology, 23: 23-45.
18. Rifai, M. a. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*, Mycological papers. (116). 56 pp. CMV. Kew. England.
19. Seaby, D. A. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. Plant Pathology, 45: 905-912.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol.32, No.3, 2001

Antagonistic Effects of Several Isolates of *Trichoderma* on Fungi Causing Onion Root Rot, East Azarbaidjan Province

E. PEYGHAMI
Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
Accepted July.3,2001

SUMMARY

In order to isolate the antagonistic and pathogenic mycoflora of onion rhizosphere in the fields of onion in East Azarbaidjan province, Rose Bengal Malt – Agar, Nash – Snyder Medium (NM) and selective medium Davet were used. Root and bulb samplings were made from onion fields affected with root rot (*Fusarium spp.,)* and white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) as well as from unaffected ones. The cultures were made by using the suspension obtained from washing the infected tissues of root and bulb with sterile water, using a flask to shake for half an hour in an electric shaker that ran at 75 revolutions per minute. Two droplets of the obtained suspensions of microorganism's propagules (as 10% concentrates) were placed in the center of petri – dishes containing the medium culture. After scraping the medium surface, samples were incubated at 24°c temp. and 10:14 (L: D) light regime. The species isolated from mycoflora were identified as follows: *Fusarium oxysporum* Schletcht., *Fusarium acuminatum* Ell. Et Ev., *Fusarium solani* (Mard). *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. *Sclerotium cepivorum* Berk. *Trichoderma viride* Pres, *Trichoderma harzianum* Raifi. The mechanism by which the antagonists. (*T. viride* and *T. harzianum*) affected the pathogens were hyphal contact, coiling, deformation and lysis. Non – volatile metabolites of *Trichoderma* spp. Were more effective in prohibition of mycelial growth of *Fusarium* spp. and sclerotial germination of *S. cepirovum* (P=1%). Volatile metabolites of the *Trichoderma* spp. inhibited mycelial growth only when *Trichoderma* was cultured 24 hours before Pathogenic fungi (P =1%) but exhibited no fungicidal effects on sclerotia of S. *cepirovum*, as compared with control.

Key words: Onion, Fusarium wilt, White rot, Antagonist, Trichoderma.