

بررسی آزمایشگاهی توانایی گونه‌های تریکودرما موجود در خاک گلخانه‌های خیار استان یزد برای کنترل عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی

سیمین نصرتی

استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، گروه گیاهپزشکی، یزد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵)

چکیده

کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی شاخص مهم تولید محصولات کشاورزی ارگانیک است. جهت یافتن جدایه‌های بومی مناسب تریکودرما برای کنترل بیولوژیک پوسیدگی فوزاریومی خیار، از خاک گلخانه در مناطق عمده کاشت استان یزد نمونه برداری انجام شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی و براساس ویژگی‌های مورفولوژی و مولکولی جدایه‌های بومی تریکودرما از هم تفکیک شدند. بیست جدایه تریکودرما، متعلق به گونه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* شناسایی شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمون‌های کشت متقابل و تولید متابولیت‌های فرار نشان داد که جدایه‌های بومی در سطح احتمال یک درصد از رشد میسلیم قارچ *F. oxysporum* ممانعت کردند. نتایج نشان داد که سرعت رشد این جدایه‌ها بسیار بیشتر از عامل بیماری پوسیدگی فوزاریوم بوده، به طوری که پس از چند روز پرگنه‌های آن را پوشاندند و ضمن اشغال محل رشد و مصرف غذای مورد نیاز، روی میسلیم بیمارگر نیز رشد کردند و با تولید ترکیبات فرار، مانع رشد میسلیم قارچ بیمارگر شدند. نتایج نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی از رشد میسلیم مربوط به گونه *T. atroviride* (Ta8) بود.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، شناسایی مورفولوژی، آزمون کشت متقابل، آزمون تولید متابولیت‌های فرار.

Investigation on The Ability of *Trichoderma* spp. Existent in The Soil of Cucumber Greenhouses of Yazd Province to Control Fusarium Wilt Agent in Vitro Condition

Simin Nosrati

Assistant professor Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

(Received: April 4, 2017 - Accepted: December 16, 2017)

ABSTRACT

Biocontrol of plant diseases is an important indicator for the production of organic agricultural products. In order to find suitable native *Trichoderma* spp., for the purpose of biological control of Fusarium wilt of cucumber, soil samples were taken from the greenhouse of major areas of cucumber cultivation in Yazd province. After the processes of separation and purification, and based on morphological and molecular characteristics, native *Trichoderma* spp. isolates were identified. Twenty *Trichoderma* isolates were identified which belonged to *T. harzianum* and *T. atroviride* species. The analysis of variance of dual-culture experiments for production of volatile compounds assay showed that the fungal isolates inhibited the *F. oxysporum* mycelium growth ($\alpha=1\%$). The results indicated that the growth rate of native isolates was notably higher than that of Fusarium wilt agent, so that after some days they covered its colonies. Besides, while having occupied the place of growth and using the needed nourishment, they grew on pathogen mycelium, and through producing volatile substances they inhibited the formation of pathogen mycelium. The results showed that *T. atroviride* (Ta8) isolate had the maximum growth inhibition effect.

Keywords: biocontrol, morphological identification, dual culture test, volatile substances test.

تازه‌های تحقیق

در این تحقیق شناسایی مورفولوژیکی گونه *T. harzianum* در استان یزد برای اولین بار انجام شد. گونه *T. atroviride* برای میکوفلور یزد جدید است و از گونه‌هایی است که از نظر کنترل بیولوژیکی اهمیت زیادی دارد.

مقدمه

تخریب محیط زیست و برهم خوردن تعادل‌های طبیعی اکوسیستم از بحران‌های حاصل از مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی در کشاورزی بوده است (Mukherjee et al. 2014). گونه‌های تریکودرما به دلیل دامنه کاربرد وسیع و رشد سریع از اهمیت زیادی در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی برخوردار هستند (Alizadeh et al. 2013). خوشبختانه در چند سال گذشته در کشور ما توجه زیادی به کاربرد عوامل بیوکنترل بیماری‌گرهای گیاهی معطوف شده است. اکرمی و همکاران تاثیر توام سه گونه از *Trichoderma* در کنترل پوسیدگی فوزاریومی عدس را در گلخانه نشان دادند (Akrami et al. 2011). تاثیر چند جدایه از *Trichoderma* در پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی خربزه (Ashrafizadeh 2005)، سیاهک پنهان گندم (Zafari et al. 2008) و *Sclerotinia minor* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه آفتابگردان (Abdollahzadeh et al. 2003) تحقیق شده است و کارایی مثبت آن‌ها مشخص شد.

بیماری پوسیدگی فوزاریومی خیار گلخانه‌ای از سال ۱۳۸۱ در گلخانه‌های یزد شروع به گسترش کرده و باعث خسارت شدید شده است و به عنوان مهمترین بیماری خیار گلخانه‌ای در سال‌های اخیر می‌باشد (Nosrati 2009). نظر به اینکه تحقیقی در زمینه قابلیت گونه‌های بومی تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریوم خیار گلخانه استان یزد صورت نگرفته بود، در این تحقیق گونه‌های تریکودرمای پراکنده در خاک گلخانه‌های خیار جداسازی و از لحاظ مورفولوژی شناسایی شدند و توانایی ضد قارچی آنها

علیه عامل پوسیدگی فوزاریومی در آزمایشگاه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی *Trichoderma*

در پاییز و زمستان سال‌های زراعی ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از خاک گلخانه خیار تا عمق سی سانتی‌متری تعداد پنجاه نمونه مربوط به مناطق عمده کاشت خیار گلخانه‌ای استان یزد جمع‌آوری شد. جداسازی بر روی محیط TF و داوه و خالص‌سازی به روش تک‌اسپور بر روی آب‌آگار صورت گرفت (Naraghi et al. 2014). براساس کلید موکرجی و همکاران (Mukherjee et al. 2014) گونه‌ها شناسایی شدند. در این بررسی قارچ *F. oxysporum* از بافت‌های آلوده خیار گلخانه‌ای جداسازی شد و براساس ویژگی‌های مورفولوژی شناسایی شد.

بررسی رقابت غذایی و اثر متابولیت‌های فرآر تریکودرما بر فوزاریوم در شرایط آزمایشگاه

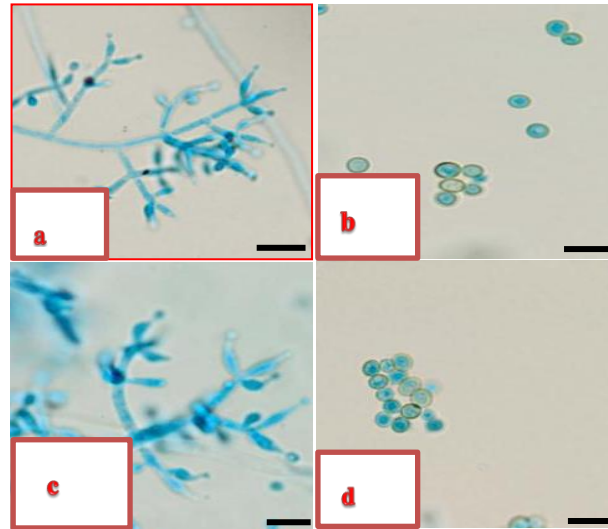
رقابت غذایی جدایه‌ها، به روش کشت متقابل و آزمون اثر متابولیت‌های فرآر مشابه روش Singh و همکاران (۲۰۱۰) بررسی شد. این آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد: درصد بازدارندگی = [(قطر رشد میسلیم در پتری تیمار - قطر رشد میسلیم در پتری شاهد) / قطر رشد میسلیم در پتری شاهد] × ۱۰۰. بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ بیمارگر *F. oxysporum* به روش رسو و همکاران (۲۰۱۲) انجام گرفت.

نتایج و بحث

براساس کلیدهای شناسایی تریکودرماهای جداسازی شده از خاک گلخانه‌های خیار شامل ۱۲ جدایه گونه *T. harzianum* و ۸ جدایه *T. atroviride* بود. گونه

سریع‌الرشد و میسلیوم بی‌رنگ بود. کنیدیوفورها درختچه‌ای با شاخه‌های فرعی غالباً به صورت منفرد روی آنها قرار می‌گیرند. کنیدیوم زایی معمولاً به صورت یکنواخت و پیوسته در سطح محیط پراکنده می‌شوند (شکل ۱- c,d).

Trichoderma harzianum Rifai دارای پرگنه‌های با رشد سریع بود. کنیدیوم‌ها کوچک و به اشکال کروی تا تخم‌مرغی بودند و دیوارهای صاف و بی‌رنگ تا به رنگ سبز روشن داشتند (شکل ۱- a,b). گونه *Trichoderma atroviride* P. Karst. دارای پرگنه‌ها



شکل ۱- مورفولوژی کنیدیوفور و کنیدی گونه‌های *Trichoderma*: a,b: قارچ *T. harzianum*، c,d: *T. atroviride* (شاخص 10µm)

Figure 1: Morphology of conidium and conidiophore of *Trichoderma*: a,b; *T. harzianum*; c,d; *T. atroviride* (scale 10µm)

درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. oxysporum* مربوط به گونه *T. atroviride* (Ta8) بود. در بررسی‌های میکروسکوپی نحوه میکوپارازیتسم، مشخص شد که میسلیوم گونه‌های *Trichoderma* در مراحل اولیه برخورد با میسلیوم *F. oxysporum* ابتدا با آنها تماس برقرار کرده و به موازات آنها رشد می‌کنند. در مراحل بعد میسلیوم انشعابات بیشتری پیدا کرده و دور میسلیوم *F. oxysporum* می‌پیچد و باعث توقف رشد و بدشکلی آنها می‌گردند.

بیماری پوسیدگی فوزاریومی خیار و مدیریت آن یکی از چالش‌های مهم گلخانه‌داران استان یزد بوده است. نتایج نشان داد که در بیشتر مناطق کاشت خیار گلخانه‌ای گونه‌های تریکودرما وجود دارد، هرچند در بعضی از مناطق جداسازی آن به سختی صورت می‌گرفت. این موضوع می‌تواند انعکاس دهنده

شناسایی گونه *T. harzianum* در مزارع استان یزد

برای اولین بار انجام می‌شود. گونه *T. atroviride* برای میکوفلور یزد جدید است. نتایج آزمون کشت متقابل نشان داد که جدایه‌های بومی قارچ‌های آنتاگونیست در برابر رشد قارچ بیمارگر *F. oxysporum* موثر بودند. در کشت متقابل بیشترین میزان بازدارندگی رشد ۸۷/۵۹٪ مربوط به گونه *T. atroviride* (Ta8) بود. میانگین درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم جدایه‌های *F. oxysporum* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمون تولید متابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست انتخابی بومی و قارچ *F. oxysporum* نشان داد که این عوامل بیولوژی در سطح احتمال یک درصد از رشد میسلیوم *F. oxysporum* ممانعت کردند. در آزمون تولید متابولیت‌های فرار بیشترین

می‌دهد که این قارچ‌ها به‌طور طبیعی در خاک‌های مذکور موجود است. هفتاد درصد جدایه‌های *Trichoderma* مربوط به گونه *T. harzianum* بود. امید است نتایج این تحقیق جهت به‌کارگیری در تست‌های گلخانه‌ای و ترویج این گونه‌ها در کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی فوزاریومی در استان یزد موثر باشد.

فاکتورهای اکولوژیکی مؤثر در پراکندگی تریکودرما، بقا و دینامیک جمعیت آن در خاک‌ها باشد که توسط محققان مختلف بررسی شده است. جدایه‌های تریکودرما با سرعت رشد بالاتر و اشغال سریع تر سوبسترا در رقابت تغذیه‌ای موفق تر بودند. جداسدن، جدایه‌های مختلف *Trichoderma* از خاک مناطق مختلف کاشت خیار گلخانه‌ای استان یزد نشان

REFERENCES

- Abdollahzadeh J, Goltapeh EM, Rouhani H** (2003) Evaluation of antagonistic effect of *Trichoderma* species in biological of causal agents of crown and root rot of sunflower (*Sclerotinia minor*) in vitro. Sciences 13:13-23.
- Akrami M, Golzary H, Ahmadzadeh M** (2011) Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. African Journal of Biotechnology 10: 2653-2658.
- Alizadeh H, Behboudi K, Ahmadzadeh, M, Javan-Nikkhah M, Zamioudis C, Pieterse CMJ, Bakker PAHM** (2013) Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. Biological Control 65: 14–23.
- Ashrafizadeh A, Etebarian HR, Zamanizadeh HR** (2005) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. Iranian Journal Phytopathology 41:39-57.
- Mukherjee AK, Sampath Kumar A, Kranthi S, Mukherjee PK** (2014) Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. Biotechnology 275-281
- Nosrati S** (2009) Greenhouse cucumber leaf fungal diseases in Yazd. First National Congress of hydroponics and greenhouse production, Esfahan.
- Rasu T, Nakkeeran S, Raguchander T, Samiyappan R** (2012) *Trichoderma asperellum*, Identified as a Novel Fungal Biocontrol Agent for the Control of Plant Pathogen. International Conference on Bioscience, Biotechnology and Healthcare Sciences (ICBBHS'2012) December 14-15, Singapore.
- Singh A, Islam MN** (2010) In vitro evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. International Journal of Agriculture 1: 20-25.
- Zafari D, Mehrabi Koushki M, Bazgir E** (2008) Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. African Journal of Biot.