

ارزیابی اثر آنتاگونیستی گونه‌های *Trichoderma* روی *Phytophthora citrophthora* عامل

پوسیدگی ریشه و طوقه مرکبات

نسیبه براهویی^۱، حسین علایی*^۲، روح الله صابری ریشه^۳ و ابراهیم صداقتی^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

۳. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۶)

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه از جمله بیماری‌های مهم درختان مرکبات در ایران است. روش‌های مختلفی از جمله مهار زیستی برای مدیریت این بیماری پیشنهاد شده است. گونه‌های *Trichoderma* به‌طور گسترده در همه خاک‌ها و مواد گیاهی وجود دارد. در این بررسی از ۲۷ جدایه *Trichoderma* برای مهار زیستی *Phytophthora citrophthora* استفاده شد. سنجش کمی آنزیم سلولاز و بتا ۱-۳ گلوکاناز جدایه‌های *Trichoderma* به روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید انجام شد. نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار مربوط به جدایه *T. harzianum* CT-763 و *T. virens* CT-9715 با ۲ $\mu\text{mol/ml}$ فعالیت آنزیمی می‌باشد. بررسی‌های میکروسکوپی و میکروسکوپی تقابل مستقیم جدایه‌های مختلف *Trichoderma* با بیمارگر، تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های فرار و غیرفرار جدایه‌ها روی رشد میکروبی بیمارگر انجام شد. تمامی جدایه‌های *Trichoderma* و همچنین ترکیبات فرار و غیرفرار آنها سبب بازدارندگی رشد میکروبی بیمارگر فیتوتورا شدند. بیشترین درصد بازدارندگی در آزمون کشت متقابل همزمان و غیرهمزمان ناشی از جدایه *T. virens* CT-9715 بود. بیشترین تأثیر بازدارندگی در آزمون ترکیبات غیرفرار جدایه‌های *T. afroharzianum* CT-891، *T. aureoviridis* CT-936 و *T. atroviride* CT-865 با ۱۰۰ درصد و در آزمون ترکیبات فرار جدایه *T. afroharzianum* CT-55 با ۵۰ درصد تعیین شدند. در بررسی میکروسکوپی اثر قارچ‌انگلی جدایه‌های *Trichoderma* و فیتوتورا مشخص شد که جدایه‌های *T. harzianum* (CT-566, CT-862, CT-634, CT-873)، *T. afroharzianum* CT-55 و *T. aureoviridis* CT-936 با فرآیندهایی مثل پیچش و فروپاشی باعث تخریب میکروبیوم‌های بیمارگر شدند. برای کاربردی شدن این جدایه‌های موفق بومی به صورت آفت‌کش زیستی، انجام مطالعات تکمیلی اثر زیست مهار آنها بر بیمارگر فیتوتورا در شرایط طبیعی ضروری است.

واژه‌های کلیدی: انگومک، زیست‌مهار، دی‌نیتروسالیسیلیک اسید، سلولاز.

Evaluation of the antagonistic effect of *Trichoderma* species on *Phytophthora citrophthora*, the causal agent of citrus root and crown rot

Nassibeh Brahoei¹, Hossein Alaei^{2*}, Roohallah Saberi-Riseh³ and Ebrahim Sedaghati²

1. M. Sc. Student, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

3. Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

(Received: Dec, 20, 2022 - Accepted: Feb, 25, 2023)

Crown and root rot is one of the important diseases of citrus trees in Iran. Various methods, including biological control, have been proposed to control this disease. *Trichoderma* species are widely present in all soils and plant materials. In this study, 27 *Trichoderma* strains were used for biological control of *Phytophthora citrophthora*. Measurement of cellulase enzyme and beta 1-3 glucanase produced by *Trichoderma* spp. was done using the dinitrosalicylic acid method. The results showed that the highest values are related to *T. harzianum* CT-763 and *T. virens* CT-9715 strains with 2 $\mu\text{mol/ml}$ enzyme activity. Macroscopic and microscopic examinations of the dualculture of different *Trichoderma* strains with the pathogen, the inhibitory effect of volatile and non-volatile metabolites on mycelial growth of the pathogen were done. All *Trichoderma* strains and their volatile and non-volatile compounds inhibited on pathogen mycelia growth. The highest percentage of inhibition dualculture tests was caused by *T. virens* CT-9715. The highest inhibitory effect was determined for *T. afroharzianum* CT-891, *T. aureoviridis* CT-936, *T. atroviride* CT-865 with 100% and *T. afroharzianum* CT-55 with 50% in the non-volatile and volatile compounds assay, respectively. In microscopic examination of mycoparasitism effect of *Trichoderma* spp. and *P. citrophthora*, it was found that *T. harzianum* (CT-566, CT-862, CT-634, CT-873), *T. afroharzianum* CT-55 and *T. aureoviridis* CT-936, destroyed the mycelium of pathogen by a process such as twisting and lysis. For application of these successful local strains as biopesticide, it is necessary to perform additional studies on their biocontrol effects on *Phytophthora* in natural conditions.

Keywords: Biocontrol, Cellulase, Dinitrosalicylic acid, Gummosis

* Corresponding author E-mail: hossein.alaei@vru.ac.ir

مقدمه

مرکبات یکی از مهم‌ترین میوه‌های نیمه‌گرمسیری است و ایران با سطح زیر کشت بیش از ۹۳ هزار هکتار و تولید سه و نیم میلیون تن مرکبات در سال، مقام نهم جهان را دارد (FAO, 2021). بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه مرکبات ناشی از بیمارگرهای *P. citrophthora* (R.E. Smith & H.E. Smith) و *Phytophthora nicotiana Breda de Leonian Haan var. parasitica Dastur* به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاک برد به شمار می‌رود که باعث کاهش عملکرد ۱۰ تا ۳۰ درصدی تولید می‌شود. علائم بیماری به صورت زوال و ریزش برگ، تغییر رنگ بافت گیاه از طوقه تا ارتفاع یک متر از سطح خاک و ترشح شیرابه سیاه رنگ از این ناحیه است. در این بیماری درختان جوان اغلب سبز خشک می‌شوند و درختان مسن‌تر علائم ضعف و زوال تدریجی، خشکیدگی سرشاخه‌ها و در نهایت مرگ را نشان می‌دهد (Choudhary et al., 2021). در استان کرمان هر دو گونه‌ی *P. citrophthora* و *Phytophthora parasitica* غالبیت دارد (Sadeghy et al., 2014). از روش‌های مدیریت بیماری ناشی از گونه‌های فیتوفتورا در مرکبات، استفاده از نهال‌های عاری از بیمارگر، کاشت پایه‌های مقاوم یا متحمل، استفاده از ترکیبات شیمیایی و یا عوامل مهار زیستی می‌باشد (Sawake et al., 2022). اگرچه روش‌های شیمیایی به‌طور وسیع استفاده می‌شوند و در برخی از موارد، مهار مطلوبی را نیز ایجاد می‌کنند ولی ایجاد جدایه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها، منسوخ شدن بعضی از آفت‌کش‌ها، ایجاد سمیت در انسان و وجود نگرانی‌های عمومی در مورد سلامت و خطرات زیست‌محیطی، کاربرد آن‌ها را محدود می‌کند و این امر استفاده از راهبردهای جایگزین را برای حفاظت گیاه، از قبیل مهار زیستی، افزایش می‌دهد (Gade & Lad, 2018). در این بین، گونه‌های تریکودرما به‌عنوان آنتاگونیستی موفق و مؤثر برای مهار اکثر بیمارگرهای قارچی گیاهان شناخته شده‌اند. گونه‌های تریکودرما جزء فراوان‌ترین قارچ‌های جدا شده از خاک هستند که به صورت فرصت‌طلب و هم‌زیست با گیاه در زیست‌بوم ریشه‌ی گیاهان وجود

دارند (Mannai & Hamdi, 2022). آنها به دلیل ظرفیت رقابت برای مواد مغذی و فضا، تولید متابولیت‌های ضد قارچی، القای پاسخ دفاعی و افزایش رشد گیاه، آنتاگونیست‌های قوی هستند. مطالعات نشان داده است گونه‌های *Trichoderma viride Pers.* و *Trichoderma harzianum Rifai* بیشترین کاربرد را در مهار زیستی عوامل بیماریزا دارند. گونه *T. harzianum* به دلیل میزان تولید مثل زیاد، توانایی زیاد در استفاده از مواد غذایی مختلف، قدرت تهاجم بالا علیه عوامل بیماریزا از طریق پادزیستی و انگلی، کارایی در تحریک رشد و از همه مهمتر القاء مقاومت در گیاه به عنوان عامل زیست‌مهار مناسب شناخته شده است (Mustafa et al., 2020). از این رو گونه‌های تریکودرما جزء عوامل مهار زیستی موفق بوده که به‌طور تجاری در قالب قارچ‌کش، کود زیستی علیه طیف وسیعی از قارچ‌های بیماریزای گیاهی مانند *Fusarium oxysporum* (Schlecht. emend. Snyder) ، *Rhizoctonia solani Kuhn* & Hansen و *Sclerotium rolfsii Sacc* استفاده شده است (Frascella et al., 2022). نتایج بررسی تأثیر تیمارهای تریکودرما (شش جدایه *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg و یک جدایه *T. harzianum*) به همراه تیمارهای متالاکسیل و مانکوزب برای مهار پوسیدگی ریشه و طوقه مرکبات در شرایط مزرعه نشان داد که گونه موتانت *T. asperellum* T20 باعث کاهش اندازه زخم انگومک مرکبات (۹۵/۶۷ درصد) در مقایسه با تیمار متالاکسیل و مانکوزب (۷۲/۸۰ درصد) همراه با بهبود تراکم ریشه، موجب افزایش عملکرد میوه می‌شود (Choudhary et al., 2021). یکی از سازوکارهای زیست‌مهار که باعث شده تریکودرما به عنوان یک آنتاگونیست موفق به کار رود ویژگی قارچ‌انگلی و تولید آنتی‌بیوتیک آن است (Taherzadeh-Ghahfarokhi et al., 2021). تعداد زیادی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی از جدایه‌های گوناگون تریکودرما خالص‌سازی و شناسایی شده‌اند (Mustafa et al., 2020). کیتیناز، گلوکاناز و پروتئاز از جمله مهمترین آنزیم‌های برون سلولی این آنتاگونیست می‌باشند که

روی عامل بیماری انگومک مرکبات در منطقه به روشهای رایج آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روشها

تهیه جدایه بیمارگر و جدایه‌های تریکودرما

بیمارگر *P. citrophthora* و جدایه‌های تریکودرما استفاده شده در این پژوهش، از کلکسیون کشت قارچ گروه گیاهپزشکی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه شد. بیمارگر فیتوفتورا در سال ۱۳۹۴ از باغ‌های مرکبات آلوده با علائم خشکیدگی سرشاخه و پوسیدگی ریشه در شهداد کرمان با روش‌های معمول بیماری‌شناسی گیاهی (Banihashemi & Moradi, 2004) جداسازی، خالص سازی و با روش تعیین توالی ناحیه rDNA ITS (Alaei & Rostami, 2012) شناسایی گونه شده بود. جدایه‌های تریکودرما شامل گونه‌های *T. harzianum*، *Trichoderma atroviride*، *Trichoderma virens* Pers. Karsten، *Trichoderma guizhouense*، *Trichoderma afroharzianum aureoviridis* و *Trichoderma pseudoharzianum* از خاک و فراریشه مرکبات مناطق مختلف استان کرمان جداسازی و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شده بودند (Barahoei, 2016; Barahoei et al., 2015). در این پژوهش ۲۷ جدایه مورد بررسی قرار گرفت که در جدول شماره یک آورده شده است.

در سازوکار فراانگلی قادر به تجزیه دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها هستند. بنابراین در سازوکار مهارتی گونه‌های تریکودرما، این استفاده از آنزیم‌های هیدرولازی نظیر کیتیناز و گلوکاناز است که باعث نابودی و فرو پاشیدن ساختار سلولی عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌گردد. از آنجا که دیواره سلولی، نخستین و مهم‌ترین سد در برابر آنزیم‌های هیدرولازی است از بین بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره قارچی از جمله کیتین و گلوکان وظیفه اختصاصی بسیاری از این آنزیم‌ها می‌باشد (Win et al., 2021). با توجه به اینکه اجزای اصلی دیواره سلولی فیتوفتورا شامل بتا ۱ و ۳ گلوکان و سلولز می‌باشد، از طرفی جدایه‌های مختلف تریکودرما یکی از مفیدترین منابع تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز هستند، توجه خاصی به شناسایی جدایه‌های برتر در تولید آنزیم سلولز شده است. به همین دلیل برای مهار عامل انگومک مرکبات و دستیابی به جدایه‌هایی که توانایی تولید آنزیم سلولز بالا دارند بسیار حائز اهمیت است. در همین راستا در این تحقیق از یک روش مناسب و ساده، دی-نیترو سالیسیلیک اسید (Xiang et al., 2020; Kim et al., 2014) برای غربالگری تعدادی از جدایه‌های بومی تریکودرما از نظر تولید آنزیم سلولز و بتا ۱-۳ گلوکاناز استفاده شد. ضمن اینکه به منظور دستیابی به جدایه یا جدایه‌های برتر برای ادامه بررسی‌ها در شرایط طبیعی در مزرعه، تأثیر همه جدایه‌های مورد آزمایش

جدول ۱. فهرست سویه‌های تریکودرما مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. List of strains of *Trichoderma* spp. used in this research

Species	Strains code
<i>T. harzianum</i>	CT-731; CT-566; CT-722; CT-655; CT-634; CT-862; CT-489; CT-763; CT-203; CT-873
<i>T. atroviride</i>	CT-865; CT-482; CT-473; CT-31
<i>T. virens</i>	CT-612; CT-9715; CT-62
<i>T. guizhouense</i>	CT-937; CT-792
<i>T. aureoviridis</i>	CT-936
<i>T. afroharzianum</i>	CT-447; CT-55; CT-773; CT-4817; CT-977; CT-891
<i>T. pseudoharzianum</i>	CT-734

الکل، بوسیله اسکالپل سترون، پوست شاخه از سطح کامبیوم برداشته و یک قرص میسلیمی پنج میلی-متری از کشت جوان بیمارگر در زیر پوست قرار داده شد. محل مایه‌زنی بوسیله پارافیلیم پوشانده شد. برای تیمار شاهد فقط محیط آگار بدون بیمارگر استفاده

اثبات بیماری‌زایی *Phytophthora citrophthora*

استفاده از شاخه بریده مرکبات:

از شاخه‌های سال جاری نارنج (*Citrus aurantium* L.) استفاده شد. پس از ضدعفونی سطحی شاخه با

شد (Afek *et al.*, 1990). شاخه‌های مایه‌زنی شده به صورت جداگانه درون کیسه‌های پلاستیکی سترون قرار داده شد و در انکوباتور با ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. بعد از گذشت یک هفته شاخه‌های مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت و سپس از این شاخه‌ها، بیمارگر مایه‌زنی شده مجدداً جداسازی شد.

استفاده از نهال مرکبات در شرایط گلخانه

بدین‌منظور از نهال‌های دو ساله نارنج (*C. aurantium*) استفاده شد. برای حذف آلودگی‌های سطحی دورتا دور طوقه با الکل ضدعفونی شد و دو طرف طوقه، با اسکالپل سترون خراش داده شد به گونه‌ای که قطعه‌ای از پوست برداشته و در زیر پوست یک قطعه میسلیومی پنج میلی‌متری از کشت جوان بیمارگر قرار داده شد و محل مایه‌زنی بوسیله پارافیلیم پوشانده شد. اطراف طوقه با خاک پوشانده و سپس آبیاری شد (Erwin & Ribeiro, 1996). برای تیمار شاهد فقط قطعه محیط کشت عصاره ذرت آگار CMA (Corn Meal Agar) (عصاره ۴۰ گرم ذرت پاپکورن خرد شده، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) (Jeffers & Martin, 1968) بدون بیمارگر در زیر پوست قرار داده شد. گلدانهای تیمار شده در گلخانه با ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس با ۱۶ ساعت نور نگهداری شدند. در پایان آزمایش و پس از ظهور علائم در نهال‌های آلوده و برای اطمینان از آلودگی، جداسازی مجدد فیتوفتورا از بافت آلوده انجام شد.

تقابل جدایه‌های مختلف تریکودرما و بیمارگر

Phytophthora citrophthora

بازداری از رشد رویشی

هر جدایه تریکودرما و فیتوفتورا، مقابل هم در یک تشتک پتری حاوی CMA در دو تیمار همزمان و غیر-همزمان (عامل بیمارگر ۴۸ ساعت قبل از عامل احتمالی زیست‌مهار کشت داده شد) قرار گرفت. در این آزمایش پس از انعقاد محیط کشت در تشتک پتری، یک قرص میسلیومی پنج میلی‌متری از حاشیه کشت جوان *P. citrophthora* در وسط تشتک پتری قرار داده شد و در دو طرف محیط کشت به فاصله یک

سانتی‌متر از لبه تشتک پتری یک قرص میسلیومی پنج میلی‌متری از حاشیه کشت جوان هر کدام از جدایه‌های تریکودرما قرار داده شد (Dennis & Webster, 1971a). تشتک‌های پتری در ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. رشد شعاعی بیمارگر در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر با استفاده از رابطه $IG = [(C - T) / C] \times 100$ محاسبه گردید که IG درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر، C قطر پرگنه بیمارگر در شاهد و T قطر پرگنه بیمارگر در تیمار شده می‌باشد (Sing & Islam, 2010).

اثرات مورفولوژیک

بدین‌منظور یک لام حاوی لایه نازکی از محیط کشت ذرت آگار CMA روی یک کاغذ صافی سترون و مرطوب درون تشتک پتری سترون قرار داده شد. در یک طرف لام یک قرص حاوی میسلیوم از کشت جوان *P. citrophthora* گذاشته شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت در طرف دیگر لام، یک قرص میسلیومی از کشت جوان فارچ تریکودرما قرار داده شد و برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری به مدت دو روز در ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند و از نظر نحوه تأثیر آنتاگونیستی روی بیمارگر در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مورد مشاهده و بررسی قرار گرفتند (Behboudi *et al.*, 2005).

اثر متابولیت‌های فرار تریکودرما

جهت اجرای آزمایش، یک قرص حاوی میسلیوم از کشت جوان هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست در وسط هر تشتک پتری PDA قرار داده شد. در تیمار شاهد از محیط کشت PDA فاقد آنتاگونیست استفاده شد. سپس در شرایط سترون، تشتک پتری CMA حاوی قرص میسلیومی از کشت جوان فیتوفتورا در بالای هر تشتک پتری قرار داده شد و با پارافیلیم چسپ کاملاً مسدود گردید (Dennis & Webster, 1971b). تشتک‌های پتری در ۲۷ درجه سلسیوس

محیط کشت مورد نظر به مدت هفت روز درون انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۵۰ در ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس سوسپانسیون حاصل را با دور rpm ۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ کرده و محلول رویی به عنوان آنزیم خام استفاده شد (Neethu *et al.*, 2012). مخلوط واکنش برای سنجش آنزیم سلولاز شامل ۵۰۰ میکرولیتر از محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز و ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس واکنش با اضافه کردن سه میلی لیتر معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید DNS (Kim *et al.*, 2014) متوقف شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب با دمای جوش قرار داده شد تا در اثر معرف DNS قند احیاء شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد و سرانجام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. معرف خالی با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای نمونه آنزیمی به همان روش گفته شده بررسی شد (Zhang *et al.*, 2009). از غلظت‌های مختلف گلوکز به عنوان استاندارد استفاده گردید. برای سنجش کمی آنزیم بتا ۱-۳ گلوکاناز از محیط کشت مایع حاوی ۰/۲ درصد NaNO_3 ، ۰/۱ درصد K_2HPO_4 ، ۰/۰۵ درصد KCL، ۰/۰۵ درصد MgSO_4 ، ۰/۲ درصد پروتئوز پپتون و ۰/۵ درصد CMC (به عنوان منبع کربن) با تنظیم pH=5 استفاده شد. بعد از آماده سازی محیط کشت، تعداد چهار قرص پنج میلی متری از کشت چهار روزه جدایه تریکودرما در شرایط سترون به فلاسک‌های ارلن به مدت محیط کشت اضافه گردید. فلاسک‌های ارلن به مدت هفت روز درون انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۵۰ در ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس سوسپانسیون حاصل را با دور rpm ۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ کرده و محلول رویی به عنوان آنزیم خام استفاده شد (Neethu *et al.*, 2012). مخلوط واکنش برای سنجش آنزیم بتا ۱-۳ گلوکاناز شامل ۱۰۰ میکرولیتر از محلول

نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قطر رشد میسلیم *P. citrophthora* در تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد.

اثر ترشحات مایع خارج سلولی

بدین منظور در محیط کشت مایع عصاره سیب زمینی دکستروز PDB (Potato Dextrose Broth) (عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی خرد شده، ۲۰ گرم دکستروز و آب مقطر تا حجم یک لیتر) (Jeffers & Martin 1968) چهار قرص پنج میلی متری حاوی میسلیم از حاشیه کشت جوان قارچ تریکودرما استفاده شد. محیط کشت مایع مورد نظر روی شیکر با دور rpm ۷۰ به مدت ۱۰ روز در ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس محتویات هر فلاسک ارلن را با استفاده از قیف بوختر و پمپ مکش از دو لایه کاغذ صافی سترون عبور داده شد و در مرحله بعد برای فیلتر کردن سوسپانسیون حاصل، از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری استفاده شد (Dennis & Webster, 1971c). عصاره‌های حاصل در درون شیشه‌های سترون نگهداری شدند. محیط کشت CMA با غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ درصد عصاره تریکودرما تهیه شد. برای تیمار شاهد محیط کشت CMA با اب مقطر سترون تهیه شد. در نهایت در وسط هر تشتک پتری یک قرص پنج میلی متری حاوی میسلیم از کشت جوان فیتوفتورا قرار داده شد و در ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. درصد بازدارندگی رشد رویشی فیتوفتورا ناشی از عصاره تریکودرما طبق رابطه درصد بازدارندگی محاسبه گردید (Sing & Islam, 2010).

سنجش کمی آنزیم سلولاز و بتا ۱-۳ گلوکاناز

برای سنجش کمی آنزیم سلولاز از محیط کشت مایع حاوی ۰/۲ درصد NaNO_3 ، ۰/۱ درصد K_2HPO_4 ، ۰/۰۵ درصد KCL، ۰/۰۵ درصد MgSO_4 ، ۰/۲ درصد پروتئوز پپتون و ۰/۵ درصد CMC (به عنوان منبع کربن) با تنظیم pH=4 استفاده شد. بعد از آماده سازی محیط کشت، تعداد چهار قرص پنج میلی متری از کشت چهار روزه استرین تریکودرما در شرایط سترون به فلاسک ارلن حاوی محیط کشت اضافه گردید.

MSTATC و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ صورت گرفت.

نتایج

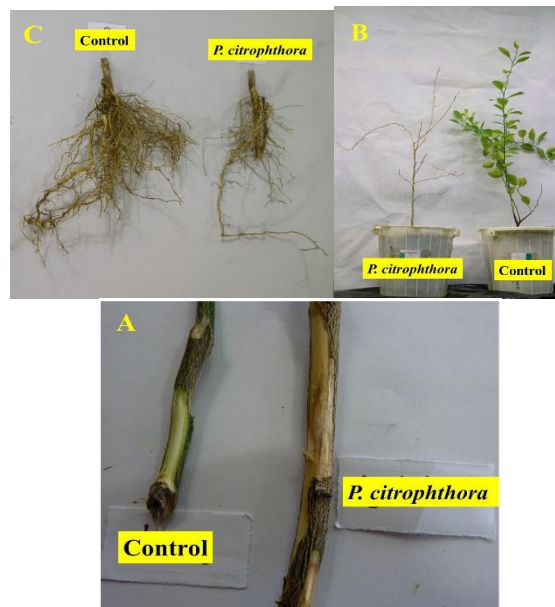
بیماری‌زایی

در آزمون بیماری‌زایی فیتوفتورا روی شاخه‌ی بریده نارنج، علائم قهوه‌ای شدن و تغییر رنگ سطح کامبیوم شاخه بریده نارنج پس از یک هفته از مایه‌زنی با بیمارگر در شرایط آزمایشگاه مشاهده شد. پیشرفت آلودگی در طول شاخه بریده بسیار سریع و در دو طرف محل مایه‌زنی بود (شکل ۱-۱A). از حد فاصل بافت سالم و آلوده نمونه‌های مایه‌زنی شده مجدداً بیمارگر بازیابی شد. در آزمون بیماری‌زایی فیتوفتورا روی نهال نارنج در شرایط گلخانه، اولین علائم یک هفته پس از مایه‌زنی به صورت زردی، پژمردگی و سبز خشک شدن برگها مشاهده شد و پس از یک ماه ریزش برگ و خشکیدگی سرشاخه مشاهده شد. مجدداً از حد فاصل بافت سالم و آلوده محل مایه‌زنی نهال‌های نارنج، بیمارگر جداسازی شد (شکل ۱-۱B).

یک درصد لامینارین و ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی است. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در ۴۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس واکنش با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) (Noronha *et al.*, 2000) متوقف شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب در دمای جوشیدن قرار داده شدند تا در اثر معرف DNS قند احیاء شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد و سرانجام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. معرف خالی با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای نمونه آنزیمی به همان روش گفته شده بررسی شد. از غلظت‌های مختلف گلوکز به عنوان استاندارد استفاده گردید.

واکاوی آماری

همه‌ی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه و واکاوی با نرم افزار



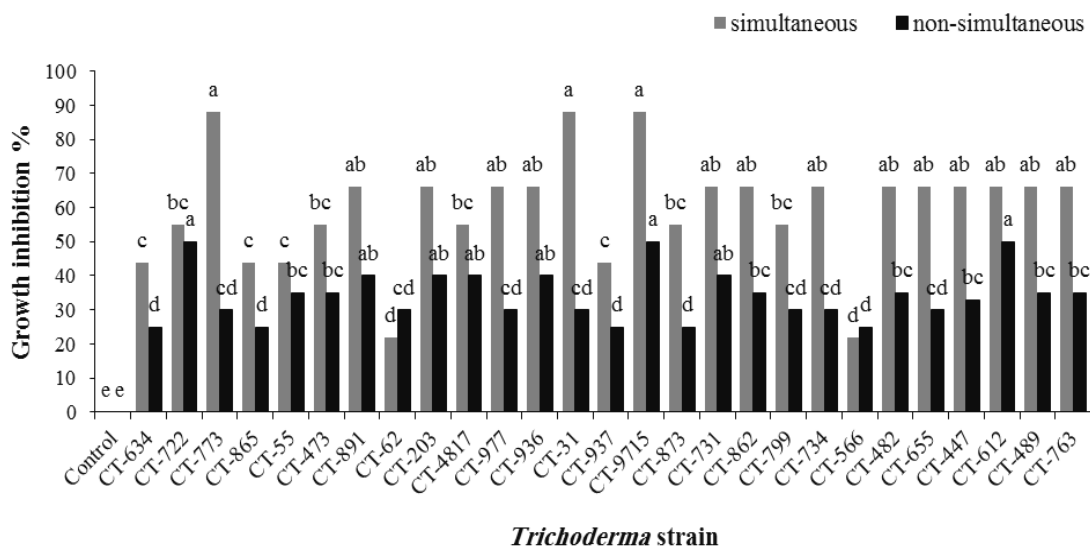
شکل ۱. نتیجه آزمون بیماری‌زایی *Phytophthora citrophthora* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. (A) تغییر رنگ سطح کامبیوم شاخه بریده نارنج یک هفته پس از مایه‌زنی (B) زردی، ریزش برگ و خشکیدگی سرشاخه روی نهال نارنج یک ماه پس از مایه‌زنی (D) کاهش حجم ریشه در نهال مایه‌زنی شده در مقایسه با نهال سالم

Figure 1. *in vitro* and *in situ* pathogenicity test of *Phytophthora citrophthora*. (A) discoloration on cambium of detached branch of orange one week after inoculation (B) chlorosis, defoliation and die-back on orange seedlings one month after inoculation (C) Reduction of root volume in inoculated seedlings compared to healthy seedlings.

جدایه‌ها بین ۴۵ تا ۶۵ درصد بود. بازدارندگی از رشد در آزمون غیرهمزمان، بین ۲۵ تا ۵۰ درصد متغیر بود. جدایه‌های *T. harzianum* CT-722 و *T. virens* (CT-9715، CT-612) با ۵۰ درصد بیشترین بازدارندگی را داشتند و جدایه‌های *T. harzianum* (CT-873، CT-566، CT-634) و *T. atroviride* CT-865، *T. guizhouense* CT-937 با ۲۵ درصد کمترین اثر بازدارندگی را داشتند (شکل ۳) و جدایه‌های *T. afroharzianu* (CT-447، CT-977، CT-773) ، *T. harzianum* (CT-862، CT-722، CT-634) ، *T. atroviride* CT- و *virens* (CT-9715، CT-612) 31 پس از متوقف کردن رشد میسلیمی فیتوفتورا، شروع به پیشروی کلونیزاسیون و اسپورزایی روی میسلیوم بیمارگر کردند.

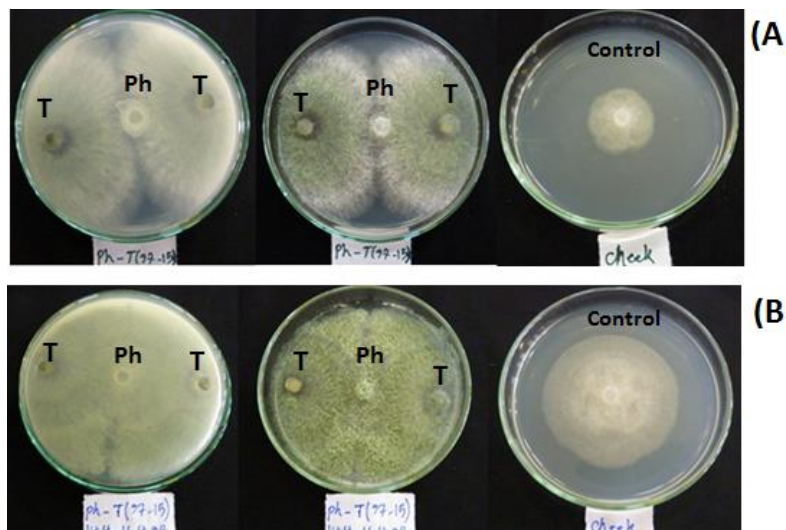
تقابل جدایه‌های مختلف تریکودرما و بیمارگر *P. citrophthora*

نتایج ارزیابی میزان بازدارندگی ۲۷ جدایه تریکودرما در کشت متقابل با بیمارگر *P. citrophthora* در محیط کشت عصاره ذرت آگار نسبت به شاهد نشان داد که تمامی جدایه‌های تریکودرما به طور معنی‌داری دارای اثر بازدارندگی بر رشد میسلیمی فیتوفتورا هستند (شکل ۲). به طوری که بازدارندگی از رشد، بین ۲۲ تا ۸۸ درصد در آزمون همزمان متغیر بود. جدایه‌های *T. afroharzianum* CT-773 ، *T. virens* CT-9715 و *T. atroviride* CT-31 با ۸۸/۸۸ درصد بیشترین قدرت بازدارندگی را داشتند و همچنین کمترین میزان بازدارندگی رشد میسلیمی بیمارگر با *T. harzianum* CT-۲۲/۲۲ درصد متعلق به جدایه *T. harzianum* CT-۲۲/۲۲ بود. درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر در بیشتر



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر بازدارندگی جدایه‌های *Trichoderma* در رشد *Phytophthora citrophthora* در روش کشت متقابل (همزمان و غیرهمزمان) پس از ۷۲ ساعت (دانکن $P < 0.05$)

Figure 2. Comparison means of inhibitory effect of *Trichoderma* strains on *Phytophthora citrophthora* growth in dual culture method (simultaneous and non-simultaneous) after 72 hours (Duncan $P < 0.05$)

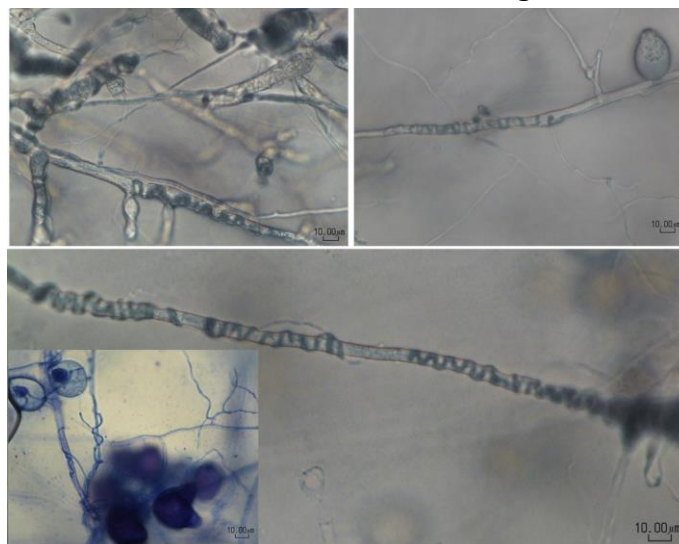


شکل ۳. تصویر تقابل مستقیم جدایه *Trichoderma virens* CT-9715 و *Phytophthora citrophthora*: (A) کشت همزمان (B) کشت غیر همزمان T: قطعه تریکودرما Ph: قطعه فیتوفتورا

Figure 3. Image of the direct comparison of the *Trichoderma virens* CT-9715 strain and *Phytophthora citrophthora* (A) simultaneous culture (B) non-simultaneous culture T: *Trichoderma* plug Ph: *P. citrophthora* plug

تریکودرما شروع به پیچش به دور ریشه‌های فیتوفتورا نمود و با گذشت زمان تراکم و شدت پیچش به حدی افزایش یافت که رشد آنها را متوقف کرد. پیچش ریشه‌های تریکودرما روی میسلیم‌های مسن بیشتر بود و این فرآیند روی اندام‌های بارده تولیدمثلی اسپورانژیوم نیز مشاهده شد (شکل ۴).

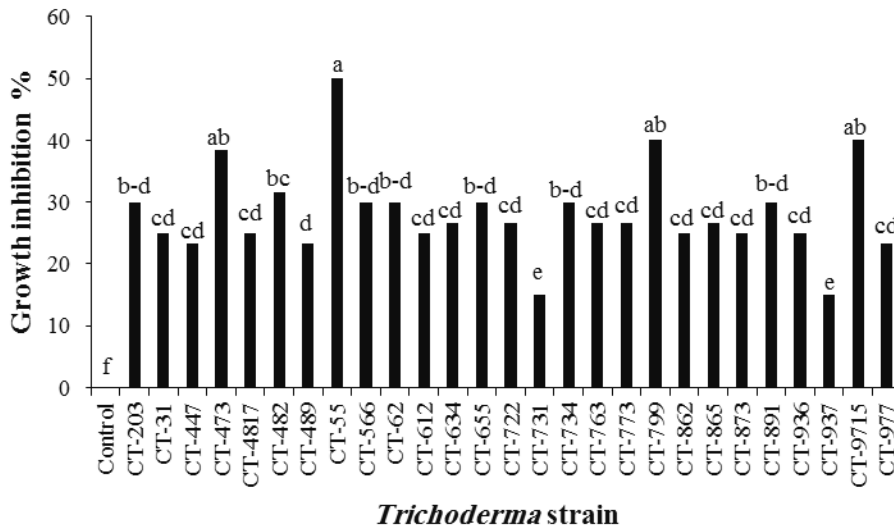
نتایج بررسی میکروسکوپی نشان داد جدایه‌های *T. harzianum* (CT-566, CT-862, CT-634, CT-873) ، *T. aureoviridis* CT- و *T. afroharzianum* CT-55 ، 936 توانایی انجام فعالیت قارچ‌نگلی را دارند به گونه‌ایی که در مراحل اولیه برخورد با ریشه‌های *P. citrophthora* در قسمتی از طول آنها با تماس ریشه-ای، به موازات ریشه‌ها رشد کرده و به تدریج ریشه‌های



شکل ۴. پیچش ریشه‌های *Trichoderma harzianum* CT-566 به دور ریشه‌ها و اسپورانژیوم *Phytophthora citrophthora* روی محیط کشت CMA در ۲۷ درجه سلسیوس پس از ۷۲ ساعت: خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر
Figure 4. The coiling of *Trichoderma harzianum* CT-566 mycelium around *Phytophthora citrophthora* mycelium and sporangium on CMA culture at 27 °C after 72 hours; scale line = 10µm

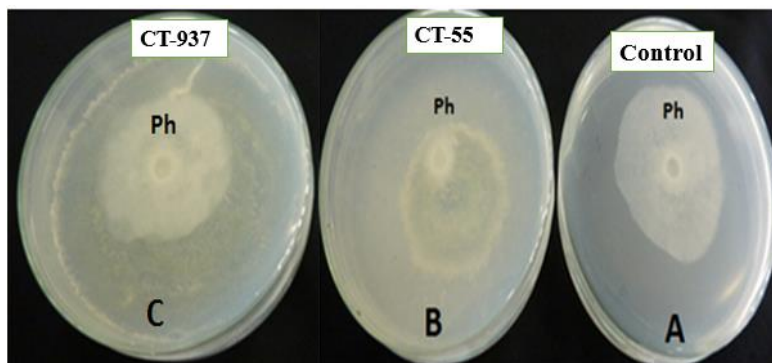
CT-55 با ۵۰ درصد بیشترین اثر بازدارندگی و جدایه‌های *T. guizhouense* CT-937 و *T. harzianum* CT-731 با ۱۵ درصد کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسلیموم بیمارگر داشتند. درصد بازدارندگی بیشتر جدایه‌ها بین ۳۵ تا ۴۵ درصد بود (شکل ۵ و ۶).

نتایج آزمایش اثر ترکیبات فرار جدایه‌های آنتاگونیست روی رشد میسلیمومی بیمارگر نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌های تریکودرما به طور معنی‌داری دارای اثر بازدارندگی بر رشد میسلیمومی فیتوفتورا هستند. به طوری که بازدارندگی از رشد، بین ۱۵ تا ۵۰ درصد متغیر بود. ترکیبات فرار جدایه *T. afroharzianum*



شکل ۵. اثر بازدارندگی متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیمومی *Phytophthora citrophthora* پس از ۷۲ ساعت

Figure 5. Inhibitory effect of volatile compounds of *Trichoderma* spp. strains against *Phytophthora citrophthora* growth after 72 hours



شکل ۶. اثر ترکیبات فرار تریکودرما بر بیمارگر *Phytophthora citrophthora* شاهد (A) جدایه *Trichoderma afroharzianum* CT-55 (B) و جدایه *Trichoderma guizhouense* CT-937 (C)

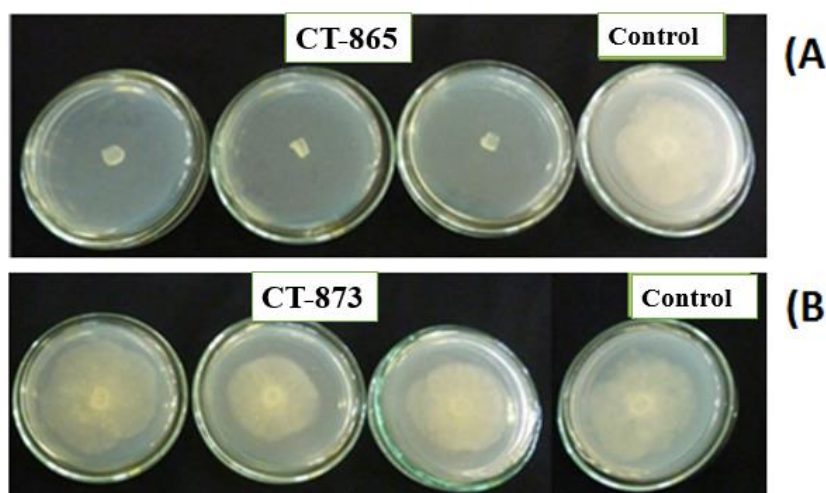
Figure 6. Effect of volatile compounds on *Phytophthora citrophthora* growth. (A) control (B) *Trichoderma afroharzianum* CT-55 strain (C) *Trichoderma guizhouense* CT-937 strain

بیمارگر شدند. در سطح ۳۰ درصد از ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *T. afroharzianum* CT-891 و *T. atroviride* CT-865 و *T. aureoviridis* CT-936

نتایج حاصل از تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های آنتاگونیست نشان داد که هر دو غلظت استفاده شده باعث جلوگیری از رشد میسلیمومی

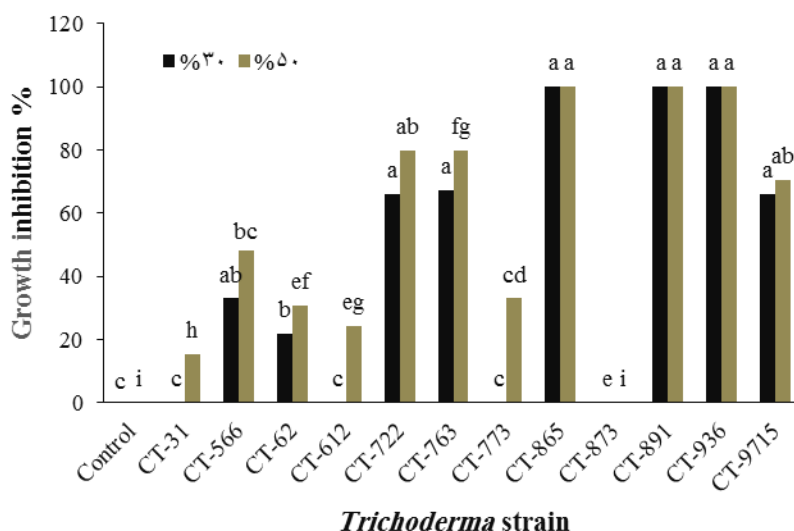
بازدارندگی آنها افزایش یافت به طوری که در سطح ۵۰ درصد از ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های *T. afroharzianum* CT-891، *aureoviridis* CT-936 و *T. atroviride* CT-865 با ۱۰۰ درصد بیش‌ترین اثر بازدارندگی و جدایه *T. harzianum* CT-873 با صفر درصد کمترین اثر بازدارندگی از رشد بیمارگر را داشتند (شکل ۸).

با ۱۰۰ درصد بازدارندگی، بیش‌ترین تاثیر و جدایه‌های *T. T. virens* CT-612، *T. atroviride* CT-31، *T. harzianum* CT-873 و *afroharzianum* CT-773 با صفر درصد کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم‌های بیمارگر داشتند (شکل ۷). همچنین نتایج نشان داد با افزایش میزان غلظت متابولیت‌های غیر فرار جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت، میزان



شکل ۷. اثر ترکیبات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما بر رشد رویشی *Phytophthora citrophthora* جدایه (A) *T. atroviride* CT-865، (B) جدایه *T. harzianum* CT-873

Figure 7. Effect of extracellular fluid compounds of *Trichoderma* spp. on *Phytophthora citrophthora* growth. (A) *T. atroviride* CT-865, (B) *T. harzianum* CT-873

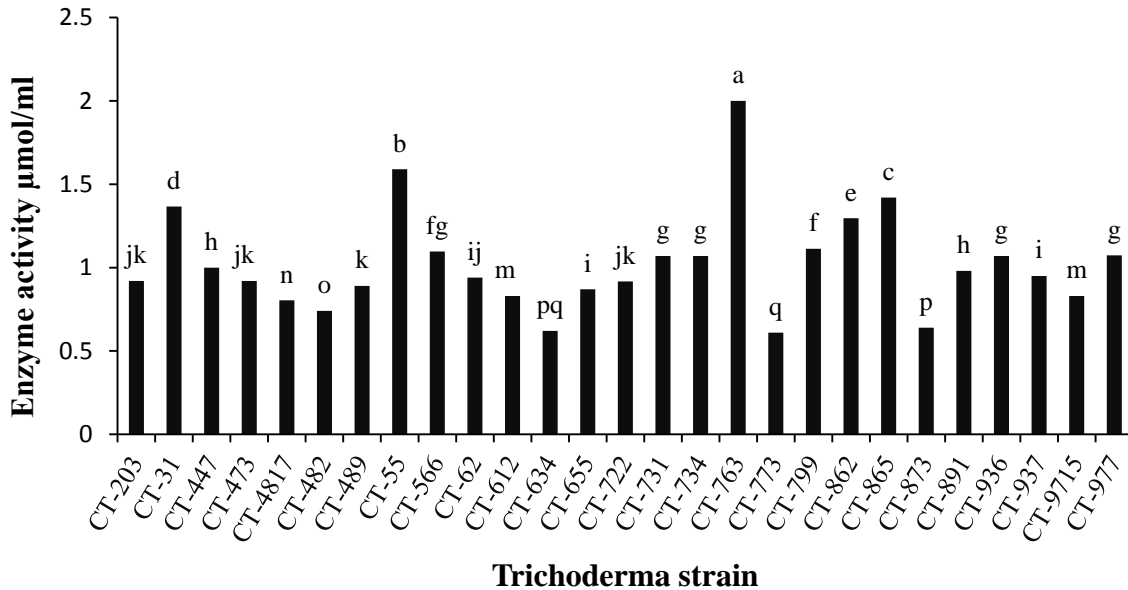


شکل ۸. اثر بازدارندگی ترکیبات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در رشد *Phytophthora citrophthora* پس از ۷۲ ساعت
Figure 8. Effect of extra cellular compounds of *Trichoderma* spp. strains on *Phytophthora citrophthor* growth after 72 hours

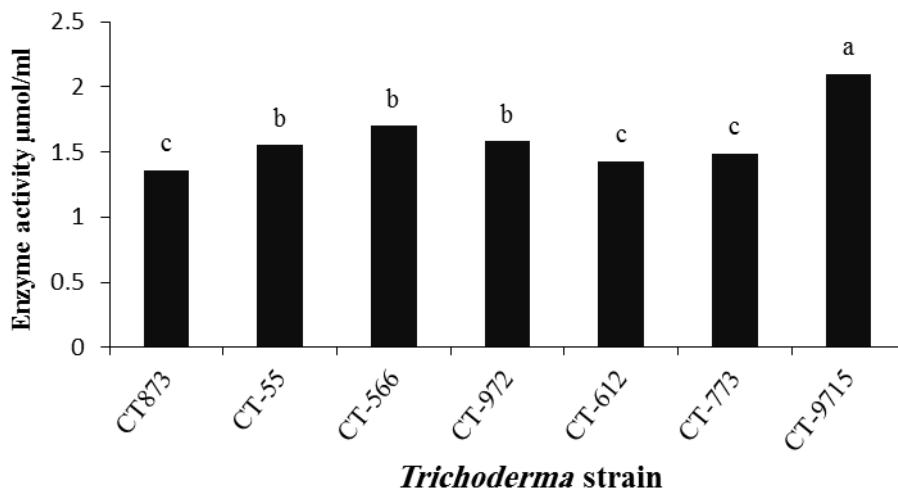
جدایه *T. afroharzianum* CT-773 می‌باشد (شکل ۹). میزان فعالیت آنزیم بتا-۱-۳ گلوکاناز در بین جدایه‌های مختلف تریکودرما بین ۰.۶-۲ μmol/ml متغیر بود. بطوریکه بیشترین میزان فعالیت آنزیمی متعلق به جدایه *T. virens* CT-9715 و کمترین میزان آن متعلق به جدایه *T. harzianum* CT-873 می‌باشد (شکل ۱۰).

فعالیت آنزیم سلولاز کل و بتا ۱-۳ گلوکاناز

نتایج این بررسی نشان داد تمامی جدایه‌های تریکودرما توانایی تولید آنزیم سلولاز را دارند و میزان فعالیت آنزیم سلولاز در بین جدایه‌های مختلف تریکودرما بین ۰.۶-۲ μmol/ml متغیر است. بطوریکه بیشترین میزان فعالیت آنزیمی متعلق به جدایه *T. harzianum* CT-763 و کمترین میزان آن متعلق به



شکل ۹. فعالیت آنزیم سلولاز جدایه‌های تریکودرما پس از هفت روز رشد روی محیط کشت PDB در ۲۸ درجه سلسیوس
Figure 9. Cellulase enzyme activities of *Trichoderma* spp. strains after 7 days growth on PDB at 28 °C



شکل ۱۰. فعالیت آنزیم بتا ۱-۳ گلوکانازی جدایه‌های مختلف تریکودرما پس از هفت روز رشد روی محیط کشت PDB در ۲۸ درجه سلسیوس
Figure 10. Beta 1-3 glucanase enzyme activities of different *Trichoderma* spp. strains after 7 days growth on PDB at 28 °C

بحث

T. aureoviridis CT-936 *harzianum* CT-634 و *T. harzianum* CT-873 با فرآیندهایی مثل پیچش و فروپاشی باعث تخریب میسلیوم‌های بیمارگر شدند. جالب توجه است که تعدادی از این جدایه‌ها فعالیت آنزیمی بسیار بالایی دارند که درسازوکار قارچ انگلی آنها بدون تاثیر نبوده است. فعالیت مستقیم قارچ- انگلی جدایه‌های مختلف تریکودرما به عنوان یکی از مهمترین سازوکارهای آنها برای فعالیت آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی است. گزارش بسیاری از محققین نشان می‌دهد که تریکودرما به وسیله ساختارهای قلاب مانند، آپرسوریوم و پیچیدن به ریشه میزبان متصل میشود و به وسیله ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده مانند گلوکاناز، کیتیناز و پروتئاز به دیواره سلولی میزبان نفوذ می‌کند. بیشتر گونه‌های مطالعه شده در این پژوهش، سبب پیچش اطراف ریشه‌های بیمارگر *P. citrophthora* شدند که نشان دهنده فعالیت مستقیم قارچ انگلی توسط این جدایه‌ها است. این پیچش‌ها بیشتر روی ریشه‌های مسن و همچنین اندام‌های تولیدمثلی آگونیوم و اسپورانژیوم فیتوفتورا مشاهده شد. در یک مطالعه در تعامل بین *T. virens* و *R. solani* توصیف سازوکار قارچ انگلی را شامل چرخش ماریچ در اطراف ریشه- های بیمارگر، نفوذ و متعاقب آن متلاشی شدن سیتوپلاسم میزبان معرفی کرد (Iqbal et al., 2022). علاوه بر فعالیت زیست‌مهار پیچش به دور ریشه‌ها، گونه‌های مطالعه شده در این پژوهش بدلیل ویژگی کلونیزاسیون و تولید اسپور زیاد و رشد سریع با عمل سازوکار رقابتی نیز در مهار زیستی فیتوفتورا نقش داشتند به طوری که به طور کامل پراگنه قارچ را پوشش دادند. در یک مطالعه آزمایشگاهی نشان داده شد که *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 سریع‌تر از *Colletotrichum* Penz. & Sacc. *gloeosporioides* رشد می‌کند و به طور مؤثری از رشد *C. gloeosporioides* در PDA جلوگیری می‌کند و در نتیجه سازوکار رقابتی را اعمال می‌کند که در فعالیت مهار زیستی دخالت دارند (Ruangwong et al., 2021).

در بررسی تقابل مستقیم تریکودرما و بیمارگر در این پژوهش، جدایه‌های CT-773، CT-9715 و CT-31 بیشترین قدرت بازدارندگی از رشد میسلیومی *P. citrophthora* را داشتند که به ترتیب مربوط به گونه‌های *T. atroviride* و *T. virens* *T. afroharzianum* بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که این گونه‌ها با تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار به صورت کمی یا کیفی و تقابل مستقیم با بیمارگر، توانستند پس از متوقف کردن رشد میسلیومی فیتوفتورا، با پیشروی، کلونیزاسیون و اسپورزایی روی میسلیوم بیمارگر سبب مهار بالای ۸۰ درصد بیمارگر شوند. در بررسی توانایی مهار رشد بیمارگر *P. citrophthora* توسط جدایه‌های تریکودرما در کشت متقابل نشان داده شد که هر جدایه با سطوح مختلف بازدارندگی باعث مهار بیمارگر می‌شود و این نشان دهنده این است که عملکرد هر جدایه تریکودرما به گونه و نوع ترکیبات تولید شده مانند آنتی بیوتیک‌ها یا ترکیبات فرار بستگی دارد که می‌توانند از طریق محیط پخش شوند و رشد طبیعی را محدود کنند. در این خصوص، محققان مختلف نیز نتایج مشابه را در کشت متقابل گونه‌های مختلف تریکودرما با گونه‌های متفاوت فیتوفتورا به دست آورده‌اند (Behboudi et al., 2005 ; Fani et al., 2013 ; La Spada et al., 2020 ; Tomah et al., 2020 ; Ruiz-Gomez & Miguel-Rojas, 2021). سازوکار دفاعی گونه‌های تریکودرما شامل سلاح- های شیمیایی و آنزیمی می‌باشد که آن را به عاملی قوی در زیست‌مهار عوامل بیماریزای گیاهی مبدل ساخته است (Vinale et al., 2009). بنابراین، تعیین ظرفیت یک عامل زیست‌مهار برای تولید کیتینازها و سلولازها نیز بسیار مهم است زیرا آنها کلید فروپاشی دیواره سلولی هستند و ارتباط نزدیکی با سازوکار انگلی دارند. سازوکار انگلی، شامل حمله مستقیم یک قارچ به قارچ دیگر با فرآیندهای متوالی تشخیص، حمله، نفوذ و مرگ میزبان است (Benitez et al., 2004). در این پژوهش در بررسی میکروسکوپی اثر قارچ انگلی جدایه‌های *T. harzianum* CT-566 و *T. afroharzianum* CT-55 *harzianum* CT-862

جدایه‌های CT-763 و CT-9715 بیشترین میزان فعالیت آنزیمی ($2 \mu\text{mol/ml}$) را در این پژوهش نشان دادند که به ترتیب مربوط به گونه‌های *T. harzianum* و *T. virens* بودند. جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش علاوه بر تولید آنزیم‌های سلولاز و بتا-۱-۳ گلوکاناز در تولید آنزیم‌های لیتیکی کیتیناز نیز موثر بودند (داده‌ها منتشر نشده). آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی یعنی گلوکانازها و کیتینازها در پدیده قارچ‌انگلی نقش بسیار مهمی دارند. از آنجا که دیواره سلولی نخستین و مهمترین سد در برابر آنزیم‌های هیدرولازی است از بین بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره قارچی از جمله کیتین و گلوکان وظیفه اختصاصی بسیاری از این عوامل زیست‌مهار می‌باشد. تخریب دیواره سلولی بیمارگر به ریشه‌های تریکودرما اجازه نفوذ به سلول میزبان را می‌دهد. آنزیم‌های سلولاز، گلوکانازها، کیتیناز و سایر آنزیم‌های هیدرولیتیک حاصل از تریکودرما، در کنترل بیمارگرهای قارچی مؤثرتر از آنزیم‌های جدا شده از گیاهان مثل سلولازهای گیاهی، باکتری‌ها یا سایر قارچ‌ها هستند. در یک مطالعه گزارش شده که در محیط‌کشت‌های حاوی دیواره سلولی *Phytophthora drechsleri* Tucker به عنوان منبع اصلی کربن، فعالیت ویژه آنزیم گلوکاناز و سلولاز در مقایسه با گلیسرول افزایش نشان می‌دهد (Jamali et al., 2016). در تریکودرما یکی از کاراترین سازوکارها، تولید آنزیم‌های هیدرولازی نظیر کیتیناز، و بتا-۱-۳ گلوکاناز است که از طریق شکستن پلی‌ساکاریدهای کیتین و بتاگلوکان باعث نابودی و فروپاشی ساختار سلولی بیمارگرهای قارچی می‌شوند. نتایج Zavvari et al. (2014) نشان داد که بین درصد بازدارندگی *P. drechsleri* و میزان فعالیت بتا ۱-۳ گلوکانازی چهار جدایه *T. virens* ارتباط مستقیمی وجود دارد. در یک مطالعه با شواهد میکروسکوپ الکترونی نشان داده شده که آسیب‌پذیری *P. parasitica* به بتا ۱-۳ گلوکاناز خالص است که نقش مستقیم آن در تخریب ساختاری بیمارگر را تأیید می‌کند در حالی که به دلیل عدم وجود پلیمر کیتین در ریشه‌های *P.*

parasitica آنزیم کیتیناز در مهار آن مؤثر نبوده است (Kaur et al., 2020). با توجه به اینکه دیواره سلولی بیمارگر *P. citrophthora* از بتاگلوکان می‌باشد، لذا آنزیم‌های گلوکاناز تولید شده توسط جدایه‌های تریکودرما مطالعه شده در این پژوهش باعث فروپاشی دیواره سلولی بیمارگر *P. citrophthora* در طی فرایند آنتاگونیست شد. بنابراین می‌توان گفت توانایی تولید آنزیم‌هایی که قادر به فروپاشی میسلیم هستند، بیشتر منجر به نفوذ در قارچ میزبان می‌شود که نشان دهنده فعالیت قارچ‌انگلی است و در نتیجه فعالیت بالای گلوکاناز باعث تغییرات غیر طبیعی در میسلیم های میزبان می‌شود. در این پژوهش تاثیر متابولیت‌های غیرفرار نشان داد، جدایه‌های CT-891، CT-936 و CT-865 با مهار کامل (۱۰۰ درصد) بیشترین تاثیر بازدارندگی از رشد میسلیمی *P. citrophthora* را داشتند که به ترتیب مربوط به گونه‌های *T. T. afroharzianum*، *T. T. atroviride* و *T. aureoviridis* می‌باشند. هر دو غلظت ۳۰ و ۵۰ درصد از ترکیبات مایع خارج سلولی آزمایش شده در این پژوهش تاثیر خوبی در مهار زیستی فیتوفتورا داشتند ولی بسته به نوع جدایه و گونه در غلظت ۳۰ درصد هیچ گونه بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر مشاهده نشد. ولی در غلظت ۵۰ درصد بیشتر جدایه‌ها بازدارندگی بالای ۶۰ درصد داشتند. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد بکارگیری متابولیت‌های غیرفرار در مقایسه با سایر سازوکارهای آنتاگونیستی برای مهار بیمارگر در شرایط آزمایشگاه به طور موثرتری باعث جلوگیری از رشد پرگنه بیمارگر می‌شوند. در مورد نوع ترکیبات موجود در ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما تحقیقات زیادی انجام گرفته و مشخص شده که آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز، لامیناریناز و همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضد قارچی مانند تریکودرمین، تریکوتوکسین، ویریدین، گلیوتوکسین، پاراسلین و آلامتیسین توسط جدایه‌های مختلف تولید می‌شوند و نقش عمده‌ای در خاصیت آنتاگونیستی این قارچ‌ها دارند. گلیوتوکسین از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌بیوتیکی

بتوان از ترکیبات تولید شده آنها به صورت خالص و یا حتی عصاره خام آنها در مهار بیمارگرها استفاده کرد. به همین دلیل شناسایی ترکیبات تولید شده از جدایه‌های مختلف تریکودرما و خالص‌سازی آنها امری بسیار مهم و ضروری می‌باشد که می‌تواند در پژوهش‌های آتی مورد توجه قرار گیرد.

گونه‌های تریکودرما ممکن است مجموعه‌ای از متابولیت‌های فرار در مقادیر مختلف تولید کنند که عملکردهای متعددی از جمله خواص ضد قارچی، القا واکنش دفاعی و یا تقویت رشد گیاه را دارند. این ترکیبات گروه بزرگی از مواد شیمیایی مبتنی بر کربن با وزن مولکولی کم، قطبیت کم، نقطه جوش کم و فشار بخار بالا هستند (Elsherbiny et al., 2020). در این پژوهش، متابولیت‌های فرار این جدایه‌های بومی نتوانستند به خوبی از رشد میسلیمیومی *P. citrophthora* جلوگیری نمایند به طوری که بیشتر جدایه‌ها بازدارندگی آنها کمتر از ۳۰ درصد بود و تنها جدایه CT-55 با ۵۰ درصد بازدارندگی از رشد میسلیمیومی *P. citrophthora* موثرترین جدایه از نظر تولید ترکیبات فرار بود که مربوط به گونه *T. afroharzianum* بود. نتایج این پژوهش با کارهای مشابه روی فیتوفتورا یا سایر قارچها (Naeimi & Zare, 2013) در آزمون‌های آزمایشگاهی کم و بیش مشابه بود اگر چه نوع گونه تریکودرما مورد استفاده در آزمایش‌ها متفاوت بود. در یک مطالعه، در آزمایش ترکیبات فرار گونه‌های *T. virens* و *T. viride* به ترتیب بیشترین و کمترین اثر بازدارندگی را بر رشد میسلیمیومی *P. capsici* داشتند (Behboudi et al., 2005). در مطالعه ترکیبات آلی فرار تولید شده از گونه *T. atroviride*، ترکیبات ۳-متیل-۱-پوتانول، ۶-پنتیل-۲-پایرون، ۲-متیل-۱-پروپانول و استوئین بیشترین اثر بازدارندگی از رشد میسلیمیومی *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary روی غده‌های سیب‌زمینی نشان دادند (Elsherbiny et al., 2020). نتایج گزارش بسیاری از محققین روی تریکودرما نشان می‌دهد که تأثیر ضد قارچی متابولیت‌های فرار به شدت تحت تأثیر گونه و

محسوب می‌شوند که این ترکیبات به همراه آنزیم کیتیناز به طور عمده بر روی غشاء بیمارگر اثر گذاشته و سبب اختلال در دیواره میسلیموم و در نهایت اختلال در رشد و بد شکلی آن می‌شوند. اثر مهار کامل (۱۰۰ درصد) *T. viride* و بازدارندگی ۶۰/۷۴ درصد از رشد میسلیمیومی *Phytophthora capsici* Leonian با غلظت ۲۵ درصد ترشحات مایع خارج سلولی *Trichoderma koningii* Oud. (Behboudi et al., 2005). همچنین پژوهش ایوبی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که ترکیبات فیلتر شده خارج سلولی ۱۲ گونه تریکودرما سبب کاهش تولید زئوسپور *Phytophthora sojae* Kauf. & Gerd. بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه سویا شدند به طوری که غلظت‌های مختلف اثر بازدارندگی متفاوتی داشته و بیشترین بازدارندگی مربوط به *T. virens* و *Trichoderma brevicampactum* بود (Ayobi et al., 2010). نتایج Asadi et al. (2019) نشان داد جدایه‌های تریکودرما از طریق تولید متابولیت‌های ثانویه باعث کاهش شدت بیماری ناشی از *Fusarium solani* (Mart.) Sacc و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه خیار شدند به طوری که جدایه *T. harzianum* T127-12 و *T. aureoviride* T189-4 با ۹۱/۶۷ درصد بیش‌ترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری نسبت به گیاه شاهد داشتند و همچنین این جدایه‌ها تأثیر مثبتی در افزایش فاکتورهای رشدی گیاه در حضور بیمارگر داشتند. در یک مطالعه، گونه *T. asperellum* از بین جدایه‌های مختلف تریکودرما با سنجش متابولیت‌های غیرفرار و فرار به ترتیب ۴۶/۸۸ درصد و ۳۵/۰۲ درصد به عنوان موثرترین گونه در جلوگیری از رشد میسلیمیومی *P. drechsleri* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه خربزه معرفی شده است (Anjum et al., 2019). همچنین گزارش شده است کشت مایع بدون سلول *T. koningiopsis* PSU3 حاوی آنزیم‌هایی است که باعث فروپاشی و تخریب ریشه *C. gloeosporioides* می‌شود (Ruangwong et al., 2021). مطابق با نتایج پژوهش‌های صورت گرفته و نتایج این پژوهش می‌توان گفت متابولیت‌های غیر فرار تریکودرما دارای اثرات ضد قارچی موثر برای مهار بیمارگرهای مختلف می‌باشند. در نتیجه ممکن است

و *T. atroviride* CT-865، *afroharzianum* CT-891 با *P. citrophthora* در مه‌پاره‌های *T. aureoviridis* CT-936 ۱۰۰ درصد بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر، انجام مطالعات تکمیلی اثر عصاره خام این جدایه‌ها در مه‌پاره‌های زیستی بیمارگر بصورت خاک‌کاربرد در شرایط طبیعی پیشنهاد می‌گردد. یکی از بزرگترین مشکلات معرفی عوامل زیست‌مه‌پاره برای بیمارگرهای گیاهی این است که غالباً نتایج آزمایشگاهی با نتایجی که در گلخانه و شرایط طبیعی حاصل می‌شود الزاماً همبستگی مثبت ندارند. به هر حال بررسی اثر جدایه‌های موفق این پژوهش به عنوان عوامل زیست‌مه‌پاره انگومک مرکبات در شرایط باغ ضروری می‌باشد. بنابراین در طرح‌های آینده با تکیه بر دیگر قابلیت‌های این جدایه‌ها و انجام کارهای تکمیلی می‌توان تعدادی از این جدایه‌های برتر بومی را بصورت مخلوط، در راستای یک فرمول‌بندی مناسب، به عنوان آنتاگونیست مؤثر در مه‌پاره‌پوسیدگی ریشه و طوقه مرکبات معرفی کرد و به تولید انبوه رساند.

سپاسگزاری

نویسندگان هیچگونه تعارض منافع ندارند.

نوع جدایه، مواد مغذی، رطوبت، دما، pH، وضعیت تاریکی و روشنایی است.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج بررسی کشت متقابل، ترکیبات فرار و غیرفرار و اثر قارچ انگلی حاکی از وجود برهم‌کنش زیست‌مه‌پاره بین جدایه‌های بومی تریکودرما و *P. citrophthora* است که با سازوکارهای متفاوتی همچون رقابت تغذیه‌ای، قارچ‌انگلی، کلونیزاسیون، تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار بازدارنده، سرعت رشد و اسپوردهی زیاد انجام می‌شود و باعث کاهش رشد پرگنه بیمارگر فیتوفتورا در شرایط آزمایشگاه می‌شوند. اثر معنی‌دار بازدارندگی جدایه‌ها در آزمون‌های انجام شده نشان داد که می‌توان جدایه‌های *T. afroharzianum* CT-55 (از نظر متابولیت فرار، فعالیت آنزیمی و قارچ‌انگلی)، *T. virens* CT-9715، (فعالیت آنزیمی و ترکیبات غیرفرار، فعالیت آنزیمی و کشت متقابل) و *T. harzianum* CT-763 (فعالیت آنزیمی، ترکیبات غیرفرار و کشت متقابل) به عنوان جدایه‌های برتر در مه‌پاره‌های *P. citrophthora* برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای و باغی پیشنهاد داد. با توجه به نقش مؤثر متابولیت‌های غیرفرار جدایه‌های *T.*

REFERENCES

1. Afek, U., Szejnberg, A., & Solel, Z. (1990). A rapid method for evaluating citrus seedlings for resistance to foot rot caused by *Phytophthora citrophthora*. *Plant Disease*, 74(1), 66-68.
2. Alaei, H., & Rostami, F. (2012). Identification of cucumber damping-off based on morphological and molecular characterizations in Rafsanjan. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48(4), 177-182.
3. Anjum, M. Z., Ghazanfar, M. U., & Hussain, I. (2019). Bio-efficacy of *Trichoderma* isolates and *Bacillus subtilis* against root rot of muskmelon *Cucumis melo* L. caused by *Phytophthora drechsleri* under controlled and field conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 51(5), 1877-1882.
4. Asadi, F., Alaei, H., Saberi Riseh, R., & Zeynadini Riseh, A. (2019). The effect of beneficial *Trichoderma* species isolated from sodic and saline soils to control *Fusarium* root rot of cucumber (*Fusarium solani*). *Journal of Biocontrol in Plant Protection*, 6(2), 43-55 (In Farsi).
5. Ayobi, N., Zafari, D., & Mirabolfathi, M. (2010). Effect of *Trichoderma* species on zoospore production of *Phytophthora sojae*, disease severity, and glucanase enzymes activity assay. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46(3), 203-215 (In Farsi).
6. Banihashemi, Z. & Moradi, M. 2004. The frequency of isolation of *Phytophthora* spp. from crown and root of pistachio nut tree and reaction of the crown and root to the causal agent. *Iranian Journal of Plant Pathology* 40(2), 57-75 (In Farsi)
7. Barahoei, N (2016). Identification of *Trichoderma* isolates from the soil of citrus orchards in Kerman province and investigation of the enzyme activity of isolates effective in controlling citrus gummosis disease., M. Sc. Dissertation, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran. (In Farsi).
8. Barahoei, N., Alaei, H., Saberi, R. & Sedaghati, E. (2015). Identification of the predominant species of *Trichoderma* from the soil and root of citrus trees in Kerman province, 2nd Iranian Mycological Congress, College of Agriculture and Natural Resources, 23-25 August, University of Tehran-Karaj. (In Farsi).

9. Behboudi, K., Sharifi, T. A., Hejaroud, G. A., & Zad, S. J. (2005). Antagonistic effects of *Trichoderma* species on *Phytophthora capsici*, the causal agent of pepper root and crown rot. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41(3), 345-362 (In Farsi).
10. Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.
11. Burmeister, L. (2008). The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. University of Hannover, Germany.
12. Choudhary, A. K., Singh, N., & Singh, D. (2021). Evaluation of the bioformulation of potent native strains of *Trichoderma* spp. against the foot rot/gummosis of *Kinnow mandarin*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-11.
13. Dennis, C., & Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(3), 363-IN362.
14. Dennis, C. & Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-48.
15. Dennis, C., & Webster, J. (1971c). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-IN23.
16. Elsherbiny, E. A., Amin, B. H., Aleem, B., Kingsley, K. L., & Bennett, J. W. (2020). *Trichoderma* volatile organic compounds as a biofumigation tool against late blight pathogen *Phytophthora infestans* in postharvest potato tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(31), 8163-8171.
17. Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
18. Fani, S. R., Moradi Ghahderijani, M., Moghaddam, M., Sherafati, A., Moghaddam, M., Sedaghati, E., & Khodaygan, P. (2013). Efficacy of native strains of *Trichoderma harzianum* in biocontrol of pistachio gummosis. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 44(2). 243-252. (In Farsi)
19. FAO. 2021. Citrus Fruit Statistical Compendium 2020. Rome.
20. Frascella, A., Sarrocco, S., Mello, A., Venice, F., Salvatici, C., Danti, R., Emiliani, G., Barberini, S & Della Rocca, G. (2022). Biocontrol of *Phytophthora xcambivora* on *Castanea sativa*: selection of local *Trichoderma* spp. isolates for the management of Ink disease. *Forests*, 13(7), 1065.
21. Gade, R., & Lad, R. (2018). Biological management of major citrus diseases in central India-a review. *International Jourbal of Current Microbiological Applied Science*, 6, 296-308.
22. Iqbal, S., Ashfaq, M., Malik, A. H., & Haq, M. I. (2022). Antagonistic screening and confronting potential of *Trichoderma viride* against Pakistani and American soil borne-pathogens (*Pythium aphenidermatum*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsica*) in controlled conditions. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 34(1), 81-91.
23. Jamali, S., Panjehkeh, N., & Mohammadi, A. H. (2016). Inhibition of *Trichoderma* species from growth and zoospore production of *Phytophthora drechsleri* and their effects on hydrolytic enzymes. *Journal of Nuts*, 07(02), 137-148.
24. Jeffers, S. & Martin, S. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70(11), 1038-1043.
25. Kaur, R., Kalia, A., Lore, J. S., & Sandhu, J. S. (2020). Antifungal effect of *Trichoderma* spp. β -1, 3-glucanase on *Phytophthora parasitica*: Hyphal morphological distortions. *Journal of Phytopathology*, 168(11-12), 700-706.
26. Kim, J. J., Kwon, Y. K., Kim, J. H., Heo, S. J., Lee, Y., Lee, S. J., Shim, W. S., Jung, W. K., Hynm, J. H., Kwon, K. K., Kang, D. H. & Oh, C. (2014). Effective microwell plate-based screening method for microbes producing cellulase and xylanase and its application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 1559-1565.
27. La Spada, F., Stracquadanio, C., Riolo, M., Pane, A., & Cacciola, S. O. (2020). *Trichoderma* counteracts the challenge of *Phytophthora nicotianae* infections on tomato by modulating plant defense mechanisms and the expression of crinkler, necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1, and cellulose-binding elicitor lectin pathogenic effectors. *Frontiers in Plant Science*, 11, 583539.
28. Mannai, S., & Boughalleb-M'Hamdi, N. (2022). *In vitro* and in planta potential effect of some indigenous antagonists against *Fusarium* and pythiaceus species associated with peach seedlings decline. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 1-10.
29. Mustafa, G., Anwar, S., Joyia, F., Hayat, M., Zia, M., & Khan, M. (2020). Molecular characterization and mycoparasitic aptitude of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *JAPS: Journal of*

- Animal and Plant Sciences*, 30(6). 1508-1515
30. Naeimi, S., & Zare, R. (2013). Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. isolates in biological control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold disease. *Biocontrol in Plant Protection*, 1(2), 55-74. (In Farsi)
 31. Neethu, K., Rubeena, M., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K. N., Sarath Josh, M. K., Jisha, V. N., Pradeep, S. & Benjamin, S. (2012). A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 1160-1166.
 32. Ruangwong, O.-U., Pornsuriya, C., Pitija, K., & Sunpapao, A. (2021). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against postharvest anthracnose of chili pepper. *Journal of Fungi*, 7(4), 276.
 33. Ruiz-Gómez, F. J., & Miguel-Rojas, C. (2021). Antagonistic potential of native *Trichoderma* spp. against *Phytophthora cinnamomi* in the control of holm oak decline in Dehesas ecosystems. *Forests*, 12(7), 945.
 34. Sadeghy, B., Rohani, M., & Aghasi, N. (2014). Distribution of *Phytophthora citrophthora* RE Sm. and EH Sm. and *P. parasitica* Dastur within citrus orchards in Kerman province, Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(2), 254-258.
 35. Sawake, M. M., Moharil, M. P., Ingle, Y. V., Jadhav, P. V., Ingle, A. P., Khelurkar, V. C., Paithankar, D., Bathe, G. & Gade, A. K. (2022). Management of *Phytophthora parasitica* causing gummosis in citrus using biogenic copper oxide nanoparticles. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 3142-3154.
 36. Singh, A., & Islam, M. (2010). In vitro evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. *Int. J. Expt. Agric*, 1(1), 20-25.
 37. Taherzadeh-Ghahfarokhi, M., Panahi, R., & Mokhtarani, B. (2022). Medium supplementation and thorough optimization to induce carboxymethyl cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation of nettle biomass. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(4), 375-382.
 38. Tomah, A. A., Abd Alamer, I. S., Li, B., & Zhang, J.-Z. (2020). A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. *Biological Control*, 145, 104261.
 39. Vinale, F., Ghisalberti, E., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S. & Lorito, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48(6), 705-711.
 40. Win, T. T., Bo, B., Malec, P., Khan, S., & Fu, P. (2021). Newly isolated strain of *Trichoderma asperellum* from disease suppressive soil is a potential bio-control agent to suppress *Fusarium* soil borne fungal phytopathogens. *Journal of Plant Pathology*, 103, 549-561.
 41. Xiang, L., Lin, Y., Tian, Y., Liu, Q., Chen, L., & Tan, Z. (2021). Ammonium ions induce cellulase synthesis in *Trichoderma koningii*. *Current Microbiology*, 78(8), 3201-3211.
 42. Zavvari, F., Sahebani, N., & Etebarian, H. R. (2013). Measuring of 1, 3 glucanase activity in *Trichoderma virens* isolates and selection of the best isolates for biological control of cucumber root rot. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production* 22(4), 149-161. (In Farsi)
 43. Zhang, Y. P., Hong, J., & Ye, X. (2009). Cellulase assays. *Biofuels: Methods and Protocols*, 213-231.