نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ص. ۱۰-۱

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 1, Spring 2013, P. 1-10

پاسخ‌های دفاعی پنبه به گونه‌های قارچ تریکودرما و اثر آن در کنترل بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *Rhizoctonia solani*

فاطمه آزاددیسفانی[۱*]- حمید روحانی[۲]- ماهرخ فلاحتی رستگار[۳]- عصمت مهدیخانی مقدم[۴]

تاریخ دریافت:۱۳۸۹/۱۱/۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۲/۱۴

چکیده

بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماریهای مهم پنبه در مناطق مختلف کشور می باشد که همه ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه کاری وارد می نماید. بدلیل خاکزاد بودن عوامل مرگ گیاهچه، استفاده از روش‌های شیمیایی مثل پوشش دادن بذر با سموم شیمیایی و یا سم پاشی مزارع نتیجه رضایت بخشی ببار نمی‌آورد، بهمین جهت در سالهای اخیر توجه زیادی به مبارزه بیولوژیک بخصوص استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست و بخصوص قارچ تریکودرما شده است. مهم ترین مکانیسم بیوکنترلی تریکودرما تحریک سیستم دفاعی گیاه است. بدین منظور از این قارچ جهت القاء مقاومت گیاه پنبه بر علیه بیماری مرگ گیاهچه استفاده گردید. در این بررسی ابتدا با استفاده از روش کشت متقابل (Dual culture)، توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما علیه قارچ عامل بیماری *Rhizoctonia solani* بررسی گردید. ۹ جدایه برتر، جهت آزمایشات بیوکنترلی در شرایط گلخانه انتخاب گردید. در مطالعات گلخانه ای مشخص گردید جدایه‌های *Trichoderma virens* A224 و *T.harzianum* A291 دارای بیشترین اثر بیوکنترلی می باشند. این دوجدایه در بررسی‌های آنزیمی در شرایط ژرمیناتور مورد استفاده قرار گرفت. بررسی‌های آنزیمی در قالب طرح کاملاً تصادفی و بصورت فاکتوریل در ۴ تکرار انجام شد. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز، بتا -۱و۳ گلوکاناز و میزان فنل کل عصاره ریشه چه پنبه با استفاده از روش‌های کالریمتری و دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت. ارزیابی فعالیت پراکسیداز و بتا- ۱و۳ گلوکاناز نشان داد که هر دو جدایه قارچ تریکودرما و رایزوکتونیا به تنهایی هر کدام باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها و در نتیجه القاء مقاومت در گیاهچه پنبه می‌باشند. اما میزان فعالیت این آنزیم از نظر آماری در تیمار هر دو قارچ به صورت توأم از میزان بالاتری برخوردار است. میزان آنزیم پراکسید در روز دوازدهم نمونه برداری و میزان آنزیم بتا- ۱و۳ گلوکاناز در روز دهم نمونه برداری به حداکثر میزان خود رسید. در بررسی ترکیبات فنلی کل، حداکثر میزان این ترکیبات در عصاره ریشه چه گیاهان تیمار شده با جدایه‌های تریکودرما به همراه قارچ رایزوکتونیا مشاهده گردد. نتایج این آزمایش نشان می دهد قارچ تریکودرما در القاء مقاومت گیاه پنبه نسبتاً مؤثر بوده است.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، پاسخ دفاعی، مبارزه بیولوژیک، مرگ گیاهچه پنبه، *Rhizoctonia solani*

مقدمه

بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماریهای مهم پنبه در مناطق مختلف کشور می باشد که همه ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه کاری وارد می نماید (۱). این بیماری دارای گسترش جهانی است که بوسیله مجموعه ای از عوامل بیماریزا، خصوصاً عوامل قارچی بوجود می‌آید. گزارش‌های موجود نشان می‌دهند که در بین آنها قارچ *Rhizoctonia solani* از اهمیت بیشتری برخوردار است (۱۷). بدلیل خاکزاد بودن عوامل مرگ گیاهچه، استفاده از روش‌های شیمیایی مثل پوشش دادن بذر با سموم شیمیایی و یا سم پاشی مزارع نتیجه رضایت بخشی ببار نمی‌آورد، بهمین جهت در سالهای اخیر توجه زیادی به مبارزه بیولوژیک بخصوص استفاده از قارچ‌ها و باکتریهای آنتاگونیست شده است. در بین این عوامل، قارچ تریکودرما مدل مناسبی برای کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزا بشمار می‌رود. تا کنون گزارشهای متعددی در زمینه اثر بیوکنترلی این قارچ در بیماریهای پنبه ارائه شده است. هاول (۱۸) در تحقیقی اثر بیوکنترلی قارچ *Trichoderma virens* بر روی عوامل قارچی مرگ گیاهچه پنبه *Rhizoctonia solani* و *Pythium ultimum* را بررسی نمود. هاول و همکاران (۱۹) نیز در آزمایشی نشان دادند، کاربرد تلفیقی *T.virens* و قارچکش متالاکسیل در کنترل مرگ گیاهچه پنبه در شرایط مزرعه موثرتر از کاربرد قارچکش به تنهایی بوده است. از جمله مهم ترین

۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان
(* نویسنده مسئول: Email:F_Azaddisfani@yahoo.com)
۲، ۳ و۴- به ترتیب استادان و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

مکانیسم بیوکنترلی تریکودرما تحریک سیستم دفاعی گیاه است که طی پروسه پیچیده ای منجر به نوعی مقاومت سیستمیک میزبان در مقابل عامل بیماریزا شود. تحریک سیستم دفاعی میزبان تحت تاثیر ترکیباتی است که بطور عمومی الیسیتور (یا القاء کننده) نامیده می‌شوند (۳۷). تاکنون مکانیزم‌های دفاعی متعددی در گیاهان شناخته شده است. از جمله سنتز و ترشح مواد فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سنتز گلیکوپروتئین‌غنی از اسید آمینه غیر معمول مانند هیدروکسی پرولین (HPRG) یا هیدروکسی گلیستین (HGRG) و غیره (۱۳و ۲۷). بوجود آمدن پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی یا PRPs ، پروتئین‌های هستند که توسط گیاه در مقابل عامل بیماریزا تولید میشود و در فعال شدن سیستم دفاعی گیاه فعال نقش تعین کننده ای دارند و می توانند باعث محدود کردن توسعه و گسترش پاتوژن در داخل گیاه شوند (۷ و ۲۴). در بین این پروتئین‌ها می توان به پراکسیدازها (خانواده PR-9) اشاره کرد. اولین بار مکو (۱۹۶۸) دخالت آنزیم پراکسیداز را در واکنش‌های دفاعی و لهرر (۱۹۶۹) اثر بازدارندگی پراکسیداز از رشد عوامل بیماریزا را اثبات کردند (۱۱). پراکسیدازها اثر مستقیم در مقاومت داشته و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسیدهیدروژن، که برای بعضی بیماریگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می شوند (۱۴، ۲۴، ۲۹ و ۳۹). تحقیقات ویدهیاسکارن (۳۵) نشان داده است که افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ‌های پنبه در طی واکنش ناسازگار به باکتری عامل بلایت *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacerrm*، با کاهش تعداد باکتری‌ها و تجمع مواد قهوه‌ای رنگ در محل مایه‌کوبی شده همراه است. این تحقیقات همچنین نشان می دهد، اکسیداسیون ترکیبات فنلی از قبیل Catechin به وسیله آنزیم پراکسیداز ممکن است فاکتور محدودکننده رشد بیمارگرهای باکتریایی در گیاهان پنبه مقاوم به بلایت باکتریایی باشد. هنسون و هاول (۱۵) در مطالعه ای نشان دادند که جدایه‌های تریکودرمای(*T.viride*) موثر در بیوکنترل قارچ *R.solani* ، باعث تولید ترکیبات مرتبط با دفاع از جمله فیتوالکسین‌ها (ترپنوئیدها) و آنزیم پراکسیداز در گیاه پنبه می‌شوند. در این بررسی الیسیتورهای پروتئینی با وزن مولکولی ۱۸ کیلو دالتون را از ترشحات خارج سلولی تریکودرما جداسازی و شناسایی کردند که باعث القاء مقاومت در گیاه شد. دژنویک و همکاران (۹) پروتئین sm1 را بعنوان الیسیتوری از *T.virens* شناسایی و معرفی نمودند که در القاء بیان ژنهای مرتبط با دفاع بصورت موضعی و سیستمیک در گیاه پنبه نقش دارد. تسینگ و همکاران (۳۴) پروتئین‌های ترشح شده از قارچ *T.harzianum* را در مدل شبیه سازی شده، از تداخل گیاه – تریکودرما- رایزوکتونیا بدست آوردند. این ترکیبات شامل آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز، زایلناز، بتا -۱ و ۳ گلوکاناز، بتا- ۱و ۶ گلوکاناز، مانناز و پروتئاز بودند.

هاول و همکاران (۲۱) در تحقیقی نشان دادند که *T.virens* متعلق به گروه P بعنوان عامل بیوکنترل غیر موثر در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه بوده و گروه Q این قارچ موثر در کنترل بیماری می‌باشد. این استرین باعث القاء فیتوالکسین‌های ترپنوئیدی در ریشه گیاه پنبه شده است. این استرین به اپیدرم و پوست ریشه نفوذ و ریشه را کلونیزه می کند و در نهایت پروتئین‌های الیسیتوری را تولید می کند که منجر به القاء فعالیت آنزیم پراکسیداز و تولید ترپنوئید می شود (۲۱). تحقیقات بر روی مکانیسم‌های بیوکنترلی قارچ *T.virens* در جلوگیری از بیماری مرگ گیاهچه با عامل *R.solani* نشان داده است که مایکوپارازیتیسم و تولید آنتی بیوتیک در این کنترل مهم نمی باشد (۲۰). هاول و همکاران (۲۰) در بررسی هایی نشان دادند که تیمار بذر پنبه با قارچ *T.virens* باعث القاء آنزیم پراکسیداز و ترکیبات ترپنوئیدی می شود. تولید دزکسی همی گوسیپول (dHG) و همی گوسیپول(HG) از پیشروی قارچ بیماریزای *R.solani* جلوگیری می کند.

از جمله ترکیباتی که در واکنش دفاعی گیاه در مقابل بیمارگرها دخیل بوده و دارای اهمیت می باشند، ترکیبات فنلی هستند که اولین بار نیوتن و اندرسون در ۱۹۲۹ فرضیه سنتز ترکیبات فنلی را برای توجیه مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌ها پیشنهاد کردند. سپس محققان مختلف تغییر ترکیبات فنلی و نقش آنها در ایجاد مقاومت در گیاهان بیمار را مورد مطالعه قرار داده اند و گزارشهای این محققان نشان می دهد که تجمع مواد فنلی اغلب در ارتباط با واکنش مقاومت است. برخی از ترکیبات فنلی مثل اسید کلروژنیک و اسید کافئیک در تعداد زیادی از انواع گیاهان وجود دارند و از جمله موادی هستند که در واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر عوامل آسیب رسان دخالت می کنند. در ارتباط میزبان و عامل بیماریزا و مقایسه ارقام مقاوم و حساس، در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقامت گیاه وجود دارد (۱۲). در این تحقیق برخی مکانیسم‌های بیوشیمیایی مقاومت (تغییرات فعالیت‌های آنزیم‌های پراکسیداز، بتا- ۱ و۳ گلوکاناز و میزان ترکیبات فنلی)، درگیاهچه‌های پنبه تیمار شده با دو گونه تریکودرما بر علیه بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *R.solani* مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه جدایه عامل بیماری

در بهار ۱۳۸۸گیاهچه‌های پنبه دارای علائم بیماری تا مرحله ۶ برگی از مزارع گرگان جمع آوری گردید. نسوج ریشه آلوده بر روی تشتکهای پتری حاوی محیط PDA کشت شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار گرفت .این قارچ با استفاده از روش نوک

هیف خالص سازی گردید (۳۱). پس از خالص سازی تعداد ۱۵ جدایه *Rhizoctonia solani* حاصل شد. آزمون بیماریزایی مشابه روش اسنه و همکاران (۳۲) و با استفاده از مایه بذر گندم انجام شد. در نهایت یک جدایه *Rhizoctonia solani* با گروه آناستموزی AG4 که بیشترین آلودگی را در شرایط گلخانه داشت، جهت مطالعات بیوکنترلی انتخاب شد.

تهیه جدایه‌های تریکودرما

در این تحقیق از جدایه‌های تریکودرما کلکسیون آقای دکتر روحانی و نیز جدایه‌های بدست آمده از مزارع پنبه استفاده شد. به منظور جداسازی قارچ آنتاگونیست تریکودرما، از خاک مزارع پنبه گرگان و اطراف ریشه پنبه نمونه هایی از عمق ۲۰-۱۵ سانتی متری خاک جمع آوری گردید. سپس با استفاده از روش تغییر یافته الید و همکاران (۱۰) نمونه‌های حاصل بر روی تشتک‌های پتری کشت گردید. تشتک‌های پتری بمدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۳ روز و رشد هیف قارچ تریکودرما و اسپوردهی، با مطالعه ماکروسکوپی و میکروسکوپی و استفاده از کلید بیست (۳) مبادرت به شناسایی گونه‌های تریکودرما گردید.

جهت تهیه مایه اینوکلوم قارچ تریکودرما، یک بلوکه از پرگنه قارچ فعال تریکودرما در محیط مایع حاوی سبوس گندم (۵ درصد)، پیت موس (۱ درصد) (W/W) با پی اچ ۵ (اسید کلریدریک) کشت گردید. این کشت‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز و بر روی شیکر با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. بعد این محیط در (g×) ۱۶۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در هوای آزاد خشک گردید و سپس به اندازه کوچکتر یا مساوی ۵۰۰ میکرومتر خرد شد. به منظور آغشته شدن بذرپنبه رقم دلتا پاین ۵۰ به تریکودرما ابتدا بذرها توسط هیپو کلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۴ دقیقه ضد عفونی و سه بار توسط آب مقطرسترون شسته شد و در اتاقک کشت، خشک گردید. سپس بذرها به مدت ۵ دقیقه در محلول کربوکسی متیل سلولز ۱٪ قرار گرفت. این بذرها با اینوکلوم آماده شده تریکودرما پوشش داده شد. میزان اینوکلوم در هرگرم بذر ۰/۰۱ گرم بود (۲۲).

بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما روی قارچ *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه

در یک طرف تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA دیسکی به قطر ۸ میلی متر از حاشیه کشت ۴ روزه قارچ بیماریزا قرار داده شد. سپس تشتک پتری در انکوباتور برای مدت ۳ روز با دمای ۲۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد تا قارچ رشد کند. پس از آن در طرف مقابل دیسکی به قطر ۸ میلی متر از حاشیه کشت ۳ روزه جدایه تریکودرما قرار گرفت. بعد از آن ظروف تشتک پتری در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. با بازدید روزانه پتری‌ها توانایی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ بیماریزا، سرعت پیشروی جدایه‌های تریکودرما روی میسیلیوم قارچ بیماریزا پس از متوقف نمودن رشد آن و اسپورزایی قارچ آنتاگونیست روی پرگنه بیمارگر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت (۸).

مقایسه بیوکنترل ۹ جدایه قارچ تریکودرما بر علیه مرگ گیاهچه پنبه در شرایط گلخانه

در این مرحله ۹ جدایه برتر قارچ تریکودرما از روش کشت متقابل (Dual culture) با اثر بیوکنترلی بر روی قارچ *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه انتخاب گردید. برای تهیه اینوکلوم قارچ رایزوکتونیا، مطابق روش اسنه و همکاران (۳۴) و استفاده از مایه بذر گندم عمل شد. ۸ گرم از این اینوکلوم با ۲۰۰ گرم خاک سترون (۲ حجم خاک مزرعه، ۱ حجم ماسه و ۱ حجم خاک برگ) گلدان مخلوط شد (۱۸). در تیمارهای حاوی تریکودرما، بذر پنبه کرکدار رقم حساس دلتا پاین۵۰ و پلت شده با جدایه تریکودرما کشت شد. این آزمایش بصورت طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار در ۴ تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. تیمارها عبارت بودند از: تیمار شاهد (بدون دو قارچ)، تیمار خاک آلوده با قارچ رایزوکتونیا و ۸ تیمار جدایه‌های تریکودرما T10 ، T12، T13، T14، A224، A225، A291، A556 و A791 به همراه خاک آلوده با قارچ رایزوکتونیا. پس ۲۸ روز از کاشت بذرها در گلدان، وزن تر ریشه چه و درصد شاخص بیماری محاسبه گردید. گیاهچه‌ها از نظر مرگ گیاهچه درجه بندی گردیدند (۰- مصونیت، ۱- زخم‌های سطحی روی ساقه چه، ۲- زخم‌های فررفته روی ساقه چه و پژمردگی، ۳- مرگ کامل گیاهچه)(۸). آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS 8.0 و MSTATC و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز القاء شده توسط جدایه‌های تریکودرما و *Rhizoctonia solani* و مخلوط این دو در گیاهچه‌های پنبه

دو جدایه برتر قارچ تریکودرما (A224، A291) از آزمایش بیوکنترل در شرایط گلخانه جهت این بررسی انتخاب شدند. جدایه A224 گونه *T. virense* وجدایه A291 گونه *T.harzianum* تشخیص داده شد. این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل ۶ سطح در فاکتور اول و ۵ سطح در فاکتور دوم با ۴ تکرار در شرایط ژرمیناتور انجام شد. فاکتور اول عبارت بودند از: شاهد (بذر پنبه پلت شده بدون جدایه تریکودرما) ، بذر پنبه پلت شده بدون

جدایه تریکودرما و خاک آلوده با قارچ رایزوکتونیا، ۲ تیماربذر پنبه پلت شده با جدایه A224 تریکودرما در خاک آلوده با قارچ رایزوکتونیا و خاک بدون رایزوکتونیا و ۲ تیمار بذر پنبه پلت شده با جدایهA291 تریکودرما درخاک آلوده با قارچ رایزوکتونیا و خاک بدون رایزوکتونیا. فاکتور دوم عبارت بودند از: ۵ زمان نمونه برداری در روزهای۶ ، ۸، ۱۰ ، ۱۲ و ۱۴ بعد از تیمار با تریکودرما یا کاشت بذر پنبه. بستر گیاه شامل پیت موس (BIOLAND فنلاندی)، خاک معمولی، ماسه، پرلیت بصورت سترون بود. گلدانها در این تحقیق در رطوبت ۸۰ درصد، دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد ، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در شرایط ژرمیناتور قرار گرفتند. در روزهای آزمایش گیاهچه‌ها از گلدانها خارج وپس از شستشوی ریشه با آب شهری، تا قبل از ارزیابی میزان آنزیم‌ها و ترکیبات فنل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج آنزیم پراکسیداز از ریشه چه پنبه

برای تهیه بافرهای مورد نیاز در مراحل مختلف تحقیق از روش استول و بلانچارد (۳۳) استفاده شد. ریشه‌های نمونه برداری شده، آب گیری سطحی شدند. مقدار۰/۵ گرم از ریشه در هاون چینی سرد با استفاده از ازت مایع بصورت پودر نرمی ساییده شد. سپس یک میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (پی اچ برابر ۶) به آن اضافه و بخوبی یکنواخت گردید. عصاره حاصل بمدت ۲۰ دقیقه در (g×) ۱۵۰۰۰ به وسیله سانتریفوژ یخچالدار در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و رونشست آن به عنوان عصاره پروتئینی جدا شد (۶).

ارزیابی فعالیت پراکسیداز(POX) عصاره ریشه چه پنبه

ارزیابی فعالیت پراکسیداز بر اساس اکسیداسیون گوایکول و تغییر رنگ محلول به رنگ نارنجی متمایل به قرمز به روش چنس و مالی (۵) انجام شد. محلول واکنش شامل ۵۷۸ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (پی اچ برابر ۵)، ۱۲۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (پی اچ برابر ۵) حاوی گوایکول ۵۰ میلی مول و ۵ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاهچه بود. این محلول پس از اختلاط کامل در کیووت ریخته و برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر برای یک برنامه کنیتیک تنظیم گردید که به مدت یک دقیقه و در فواصل ۱۰ ثانیه، تغییر در میزان جذب نور محلول را ثبت کند. سپس ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (پی اچ برابر ۵) حاوی پراکسید هیدروژن (۳۰ درصد) ۱۰میلی مول به محلول درون کیووت اضافه شد، پس از اختلاط مختصر بلافاصله در دستگاه اسپکتروفتومتر به مدت یک دقیقه و در فواصل ۱۰ ثانیه، تغییر میزان جذب نور در طول موج حداکثر ۴۷۰ نانومتر ثبت شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز بصورت تغییر میزان جذب نور در دقیقه در میلی گرم پروتئین تام محاسبه گردید (۵).

استخراج بتا -۱ و ۳گلوکاناز از نمونه ریشه چه پنبه

استخراج گلوکاناز به روش میلر (۲۶) با کمی تغییرات صورت گرفت. ریشه‌های نمونه برداری شده با استفاده از دستمال کاغذی به خوبی آب گیری سطحی شده و مقدار ۰/۵ گرم از آن در هاون چینی سرد، با استفاده از ازت مایع بصورت پودر نرمی ساییده شد. سپس یک میلی لیتر بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار (پی اچ برابر ۵) به آن اضافه و بخوبی یکنواخت گردید. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در(g×) ۱۵۰۰۰ به وسیله سانتریفوژ یخچالدار در دمای ۴ درجه سانتریفوژ گردید و رونشست آن به عنوان عصاره پروتئینی جدا شد (۲۶).

بررسی فعالیت آنزیم بتا -۱ و ۳ گلوکاناز

بررسی فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز به روش میلر (۲۶) با کمی تغییرات و بر اساس هیدرولیز پلیمر گلیکوزیلی لامینارین به مونومرهای گلوکز توسط آنزیم و تغییر رنگ محلول به نارنجی متمایل به شرح زیر صورت گرفت:

عصاره حاصل از واکنش به استخراج گلوکاناز از فریزر خارج و در یخچال قرار داده شد تا به آرامی ذوب شود. مخلوط واکنش شامل ۳۱/۲۵ میکرولیتر محلول پایه لامینارین، تهیه شده در بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار(پی اچ برابر ۵) و ۶۲/۵ میکرولیتر از عصاره گیاه بود. مخلوط حاصل برای مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۴۰ درجه سانتی گراد (داخل بن ماری) نگهداری شد. سپس واکنش با اضافه کردن ۱۸۷/۵ میکرولیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید متوقف شد و برای مدت ۵ دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار گرفت. سپس حجم نهایی توسط آب مقطر استریل به ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نور آن در طول موج حداکثر ۵۰۰ نانو متر اندازه گیری شد. منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گلوکز رسم شد. در نهایت فعالیت آنزیم به صورت میلی گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه (واحد آنزیم) وتبدیل واحد به نانو کاتال(nKa) به ازای میلی گرم پروتئین تام موجود در عصاره تعیین شد (۲۶).

ارزیابی مقدار کل پروتئین محلول عصاره ریشه چه

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به واحد میلی گرم پروتئین موجود در بافت گیاه، میزان پروتئین کل موجود در عصاره ریشه چه نمونه‌ها از روش برادفورد (۴) استفاده گردید. میزان جذب در λ_{max} = nm ۵۹۵ (محدوده نور آبی) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Biowave II اندازه گیری شد. این روش نیاز به معرف برادفورد و محلول

پروتئین(BSA) استاندارد دارد. با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار کل پروتئین محلول در هر نمونه گیاهی بصورت میلی گرم پروتئین در هر گرم بافت تازه ریشه گیاه محاسبه گردید.

استخراج ترکیبات فنل کل از نمونه ریشه چه

استخراج ترکیبات فنلی طبق روش تغییر یافته مالیک و سینگ (Malick & Sing, 1980) با استفاده از متانول ۸۰٪ (پی اچ برابر ۲) انجام شد. ریشه چه‌های نمونه برداری شده آبگیری شد و ۰/۳ گرم از آن توزین شده و درون هاون چینی و با استفاده از ازت مایع بصورت پودر نرمی ساییده شد. سپس ۳ میلی لیتر متانول ۸۰٪ اسیدی به آن اضافه و بخوبی یکنواخت گردید. مخلوط حاصل صاف گردید و نهایتا عصاره حاصل به مدت پنج دقیقه در (g×) ۴۰۰۰ سانتریفوژ و رو نشست به عنوان عصاره فنلی در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲۵).

ارزیابی مقدار ترکیبات فنلی در عصاره ریشه چه

ارزیابی مقدار ترکیبات فنلی در یک گرم بافت ریشه چه به روش اوزگیت (۲۸) و سینگلتون و همکاران (۳۱) با کمی تغییرات و بر اساس تغییر رنگ عصاره فنلی توسط معرف فولین و کربنات سدیم (۲۰ درصد) انجام شد. در یک لوله آزمایش مقدار ۷۰۰ میکرولیتر آب مقطر ریخته و ۵۰ میکرولیتر عصاره فنلی گیاه و ۵۰ میکرولیتر معرف فولین به آن اضافه و بخوبی مخلوط گردید. دقیقاً پنج دقیقه بعد از افزودن فولین، ۱۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و بخوبی مخلوط شد. پس از یک ساعت و در تاریکی میزان جذب نور هر لوله در طول موج حداکثر ۷۲۵ نانومتر اندازه گیری گردید. برای تهیه منحنی استاندارد از اسید گالیک استفاده شد. در نهایت میزان فنل کل نمونه‌ها بصورت میکرو گرم اسید گالیک در هر گرم وزن تر ریشه چه نشان داده شد.

نتایج و بحث

مقایسه بیوکنترل ده جدایه مختلف تریکودرما بر علیه عامل مرگ گیاهچه پنبه

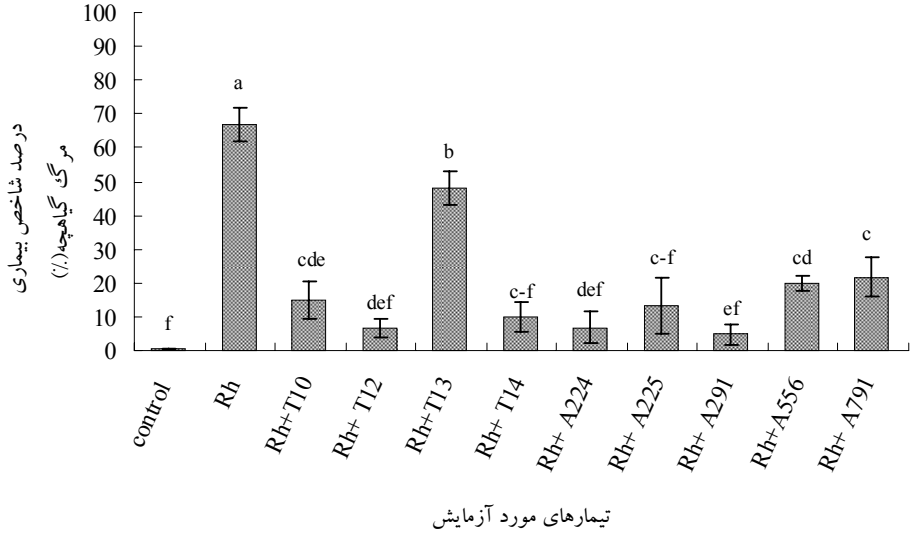
نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که وزن تر گیاهچه‌ها و شاخص بیماری مرگ گیاهچه از نظر آماری ($P\leq0.01$) دارای تفاوت معنی دار بودند. نتایج حاصل از این آزمایش در جدول ۱ آمده است.

بررسی‌ها نشان دادند که وزن تر ریشه چه در ۴ تیمار جدایه A291 تریکودرما به همراه *R.solani*، A291 و رایزوکتونیا، A224 و رایزوکتونیا، T14 و رایزوکتونیا و تیمار T12 و رایزوکتونیا از نظر آماری در سطح یک درصد با شاهد سالم (بدون دو قارچ) اختلاف معنی دارند.

جدول۱- مقایسه میانگین تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر روی صفات رشدی و بیماری مرگ گیاهچه پنبه

جدایه تریکودرما		وزن تر ریشه چه (گرم)		شاخص بیماری مرگ گیاهچه
شاهد	c	۰/۲۶۴	f	۰
Rh	e	۰/۰۹۳	a	۶۶/۷
Rh +T10	c	۰/۲۶۷	cde	۱۵
Rh +T12	b	۰/۲۹۵	def	۶/۷
Rh +T13	d	۰/۱۸۴	b	۴۸/۳
Rh +T14	b	۰/۳۰۱	cdef	۱۰
Rh +A224	b	۰/۳۰۴	def	۶/۷
Rh +A225	d	۰/۱۷۷	cdef	۱۳/۳
Rh +A291	a	۰/۳۲۱	ef	۴/۹
Rh +A556	c	۰/۲۵۶	cd	۲۰
Rh +A791	d	۰/۱۹۲	c	۲۱/۷
خطا MS		۰/۰۰۰۱۲		۰/۰۰۳

هر عدد، میانگین چهار تکرار می باشد. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن($P\leq0.01$) دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. Rh: قارچ رایزوکتونیا ؛ A791, A556, A291, A225, A224, T10, T12, T13, T14: کد جدایه‌های تریکودرما



شکل۱- مقایسه میانگین تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر روی درصد شاخص مرگ و میر گیاهچه پنبه. هر عدد، میانگین چهار تکرار می باشد. و خطوط روی ستونها خطای استاندارد(SE ±) می باشد .تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن ($P\leq0.01$) دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. Rh: قارچ رایزوکتونیا ؛ A791, A556, A291, A225, A224, T10, T12, T13, T14: کد جدایه‌های تریکودرما می باشد.

بیشترین وزن تر ریشه متعلق به جدایه A291 بود که نشان از کنترل خسارت ناشی از *R.solani* توسط جدایه‌های مذکور داشت و نیز اثرات رشدی این جدایه‌ها بر روی ریشه گیاه بود. گرچه وزن تر در تیمار A556 نیز از نظر آماری با شاهد سالم اختلاف معنی نداشتند. جدایه‌های A791 ، T13، A225 بیشترین کاهش وزن تر را دارا بودند.

مقایسه میانگین شاخص بیماری مرگ و میر گیاهچه نشان داد همه تیمارهای به کار رفته باعث کاهش میزان شاخص بیماری شدند و از نظر آماری اختلاف معنی داری در سطح یک درصد بین این تیمارها و تیمار قارچ رایزوکتونیا به تنهایی وجود داشت. تیمار T13 و رایزوکتونیا دارای کمترین میزان کاهش و تیمار A291 و رایزوکتونیا دارای بیشترین میزان کاهش شاخص بیماری بودند. بنابراین با توجه به بررسی‌های آماری به نظر می رسد سه تیمار A291 و رایزوکتونیا، T14 و رایزوکتونیا، A224 و رایزوکتونیا بهترین اثر بیوکنترل را روی گیاهچه پنبه آلوده به *R.solani* دارد. در نتیجه دو جدایه A291 و A224 بدست آمده از مزارع پنبه جهت آزمایشات بعدی انتخاب گردیدند.

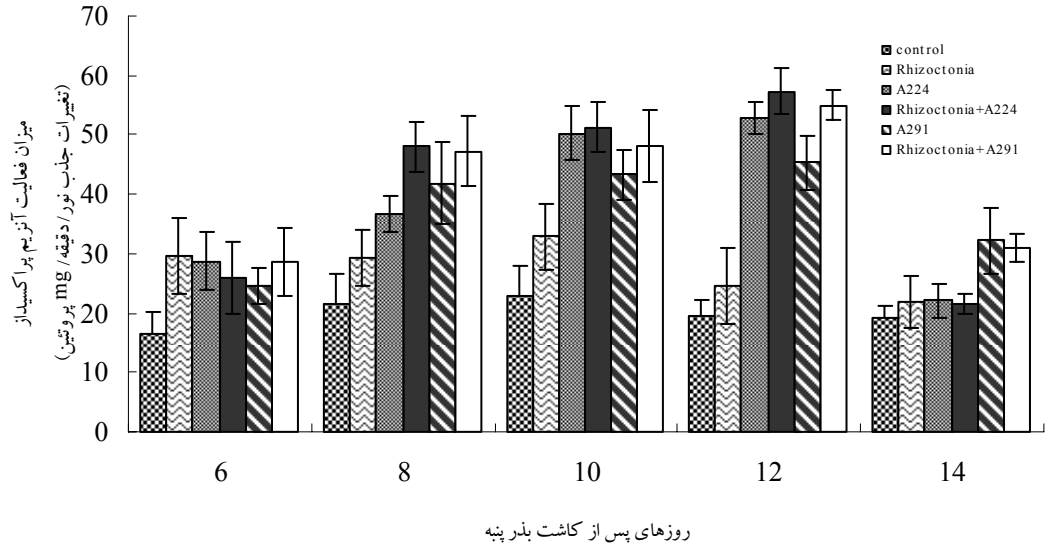
بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز القاء شده توسط قارچ تریکودرما در گیاهچه پنبه

نتایج آماری نشان داد که در آزمون F، بین تیمارها، بین روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها بر فعالیت پراکسیدازهای محلول اختلاف معنی داری ($P\leq0.05$) وجود دارد. در مقایسه میانگین اثرات متقابل داده‌ها مشخص گردید، تیمار A224 و رایزوکتونیا در روز دوازدهم بعد از کاشت بذر پنبه دارای بیشترین میزان پراکسیداز و تیمار شاهد (بدون دو قارچ) در روز ششم دارای کمترین میزان پراکسیداز می‌باشد. نتایج بیانگر این است که پراکسیداز در تمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد (بدون دو قارچ) افزایش یافته است (جدول ۲و شکل۲). نتایج تحقیقات نیز نشان داده است به دنبال مایه کوبی بیمارگر در گیاهان میزبان فعالیت پراکسیداز افزایش می‌یابد (۳۰) و افزایش فعالیت این آنزیم نیز با مقاومت گیاهان در برابر بیماری در ارتباط می‌باشد (۱۴). ویچ نیز گزارش کرده است که با نفوذ قارچ رایزوکتونیا به گیاه پنبه موادی ترشح می شود که منجر به افزایش فعالیت پراکسیداز می شود (۳۶).

افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تا روز دوازدهم ادامه یافت و در این روز به حداکثر میزان خود رسید. بطور کلی نتایج این بررسی نشان داد که گیاهچه هادر تیمارهای جدایه‌های تریکودرما (A291 و A224) با *R.solani* دارای میزان پراکسیداز بالاتر و پایدارتری نسبت به گیاهچه هایی بودند که تنها با *R.solani* آلوده شده بودند.

این گیاهان از نظر ظاهری نیز از سلامت بیشتری برخوردار بودند (جدول۲ و شکل۲). هاول و همکاران (۲۰) نیز طی تحقیقاتی بیان داشتند، القاء مقاومت در گیاهچه‌های پنبه توسط *T.virens* یکی از عوامل مهم کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه در اثر *R.solani* می‌باشد که این القاء در اثر افزایش فعالیت پراکسیداز و سنتز ترپنوئیدها در ریشه گیاهچه پنبه و در مواجه با عامل بیماریزا می‌باشد.

مرتضی نیا و همکاران (۲) نیز در تحقیقاتی نشان دادند که القاء مقاومت گیاهچه‌های خیار تیمار شده با *Trichoderma harzianum* Bi ، قبل و بعد از مایه زنی با *Pythium aphanidermatum* در ارتباط با حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز است.



شکل۲- مقایسه میانگین تاثیر جدایه‌های تریکودرما و رایزوکتونیا و مخلوط آنها برروی فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول در ریشه چه پنبه. هر عدد، میانگین چهار تکرار می باشد و خطوط روی ستونها خطای استاندارد(SE ±) می باشد. A291, A224 : کد جدایه‌های تریکودرما حاصل از خاک مزارع پنبه می باشد.

در بررسی‌های چن و همکاران (۶) نیز مشخص گردید مقاومت القاء شده توسط باکتری آنتاگونیست و قارچ پیتیوم طولانی مدت تر می‌باشد.

بطور کلی گیاهان مایه کوبی شده توسط دو قارچ روند پایدارتری را در بالا نگه داشتن میزان پراکسیداز داشتند. نفوذ هیف قارچ عامل بیماری به گیاه باعث افزایش ترکیبات بیوکنترلی می‌گردد که به دنبال آن از پیشروی قارچ عامل بیماریزا در گیاه جلوگیری می‌شود. در تیمار *R.solani* به تنهایی کاهش قابل ملاحظه ای در میزان فعالیت آنزیم در روز دوازدهم مشاهده گردید که این کاهش به نظر می‌رسد در اثر خسارت ریشه‌ها و از بین رفتن بافت گیاهی باشد. در تیمار شاهد (بدون دو قارچ) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز روند یکنواختی را داشت و میزان آنزیم پراکسیداز در روزهای مختلف نمونه برداری، اختلاف معنی داری از نظر آماری در این تیمار را نشان نداد.

بررسی فعالیت آنزیم بتا- ۱و۳ گلوکاناز در گیاهچه پنبه

نتایج آماری نشان می‌دهد که بین تیمارها، روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها در فعالیت آنزیم بتا-۱و ۳ گلوکاناز اختلاف معنی دار ($P\leq0.05$) وجود دارد. نتایج نشان داد که در تیمار شاهد سالم میزان فعالیت آنزیم روند یکنواختی دارد.

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب نور/دقیقه/میلی گرم پروتئین) در ریشه تیمار شده با دو جدایه تریکودرما به تنهایی و بصورت مخلوط با *Rhizoctonia solani*

تیمارهای	روزهای پس از کاشت پنبه				
آزمایش	٦	٨	١٠	١٢	١٤
شاهد	١٦/٥i	٢١/٦g-i	٢٢/٩g-i	١٩/٢hi	١٩/٢hi
Rh	٢٩/٣f-i	٢٩/٥f-i	٣٢/٩d-h	٢٤/٦g-i	٢١/٩g-i
A224	٢٨/٨f-i	٣٦/٧G	٥٠/٣a-c	٥٢/٩ab	٢٢/١g-i
Rh +A224	٢٦/٠g-i	٤٨/١a-c	٥١/٢a-c	٥٧/٤A	٢١/٥g-i
A291	٢٤/٦g-i	٤١/٩b-f	٤٣/٣a-c	٤٥/٣a-e	٣٢/٢e-i
Rh +A291	٢٨/٥f-i	٤٧/٣a-d	٤٨/١a-f	٥٥/٠ab	٣٠/٩e-i

هر عدد، میانگین چهار تکرار می باشد . تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن ($P\leq0.05$) دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. A291, A224: کد جدایه‌های تریکودرما حاصل از خاک مزارع پنبه می باشد.

در گیاهان تیمار شده با هر دو جدایه تریکودرما به تنهایی میزان فعالیت آنزیم تا روز هشتم نمونه برداری سیر صعودی داشته، اما این افزایش دارای اختلاف معنی داری حتی نسبت به تیمار شاهد سالم نبود. در روز دهم پس از کاشت این آنزیم به حداکثر خود رسیده و از آن به بعد کاهش داشت. نتایج تیمار شاهد آلوده (*R.solani*) نیز مانند نتایج تیمار جدایه تریکودرما به تنهایی تا روز دهم بعد از کاشت افزایش داشت و سپس کاهش فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز دیده شد. فعالیت این آنزیم در تیمار دو تریکودرما به تنهایی بیشتر از تیمار با *R.solani* به تنهایی بود. در بررسی تیمار هر دو جدایه جدایه تریکودرما به همراه *R.solani* مشخص گردید تیمار تریکودرما با قارچ عامل بیماری نسبت به تیمار جدایه تریکودرما به تنهایی موجب افزایش بیشتر فعالیت این آنزیم شد، هرچند از روز دوازدهم آزمایش روند کاهش فعالیت آنزیم در تیمارها مشاهده گردید (جدول ۳). می‌توان چنین استنباط نمود که نفوذ قارچ تریکودرما و رایزوکتونیا به اپیدرم ریشه چه پنبه در هر کدام از تیمارهای مورد بررسی، باعث القاء این آنزیم شده است. مطابق با نظرات هیل و پلاس آنزیم بتا- ۱و۳ گلوکاناز پس از زخمی شدن گیاه و یا آلودگی بیولوژیک تشکیل و فعالیتهای آن القاء می‌شود (۱۶). زو و همکاران (۳۸) در تحقیقاتی نشان دادند که فعالیت پراکسیدازها، بتا -۱و ۳ گلوکانازها و کیتیازها در اثر استفاده از یک نوع رایزوکتونیا دو هسته در گیاهچه‌های لوبیا افزایش یافت و این افزایش ارتباط نزدیکی با افزایش مقاومت به پوسیدگی ریشه ناشی از *R.solani* داشت.

بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی کل در گیاهچه پنبه

در این بررسی نتایج نشان داد که بین تیمارها، بین روزهای نمونه برداری و اثر متقابل آنها در محتوای ترکیبات فنلی کل ریشه چه اختلاف معنی دار($P\leq 0.05$) وجود دارد (جدول۴). در بررسی‌ها مشخص گردید که میزان ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده با دو جدایه A291 و A224 در روزهای ششم، هشتم و دهم پس از کاشت نسبت به شاهد سالم (بدون دو قارچ) دارای اختلاف معنی دار بود. در روزهای دهم و دوازدهم میزان این ترکیب به حداکثر میزان خود رسید و در روز آخر نمونه برداری این میزان کاهش یافت. در این روز میزان ترکیبات فنلی در تیمار A291 نسبت به شاهد سالم از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد بود. در تیمار شاهد آلوده به *R.solani* از روز ششم، افزایش معنی دار میزان کل ترکیب فنل نسبت به شاهد سالم تریکودرما مشاهده شد. این روند افزایش تا روز دوازدهم ادامه یافت. اما در روز چهاردهم نمونه برداری کاهش معنی داری در سطح پنج درصد در میزان این ترکیب نسبت به دوره قبلی نمونه برداری روی داد. نتایج نشان داد که در گیاهان تیمار شده با قارچ آنتاگونیست و قارچ عامل مرگ گیاهچه، روند افزایش میزان ترکیبات فنلی بسیار مشابه با تیمار قارچ آنتاگونیست به تنهایی بود. گیاهان تیمار شده با جدایه A291 و رایزوکتونیا میزان ترکیبات فنل بیشتری نسبت به جدایه A224 را داشت، بطوریکه در روز دوازدهم بعد از کاشت بالاترین سطح ترکیبات فنل کل در این تیمار A291 و رایزوکتونیا دیده شد. روند افزایش ترکیبات فنلی در تیمارهای فقط قارچ تریکودرما در روزهای نمونه برداری دارای شیب نسبتاً کمی می‌باشد که به نظر می‌رسد قارچ تریکودرما به تنهایی در مورد این ترکیبات در گیاه پنبه القاگر خوبی نمی باشد. اما زمانی که خاک گلدانها به قارچ *R.solani* هم آلوده شد، میزان ترکیبات فنلی در ریشه چه شروع به افزایش کرده و در نهایت در روز دوازدهم در هر صورت تیمار شده و بدون تیمار با جدایه‌های تریکودرما به اوج خود می‌رسد.

هانتر (۲۳) نیز در مطالعاتی نشان داد غلظت ترکیبات فنلی بعد از ۱۲ روز آلودگی به *R.solani* به حداکثر میزان خود رسید. به نظر می‌رسد در این آزمون رایزوکتونیا نسبت به قارچ تریکودرما جدایه A224 در افزایش میزان کل ترکیبات فنل نقش مهمتری را ایفاء می‌کند.

جدول۳ – مقایسه میانگین فعالیت آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز (nKat/mg protein) در ریشه تیمار شده با دو جدایه تریکودرما به تنهایی و بصورت مخلوط با *Rhizoctonia solani*

تیمارهای	روزهای				پس از کاشت	پنبه				
آزمایش	٦		٨			١٠		١٢		١٤
شاهد	ij	۰/۵۵	i-j	۰/۵۷	i-j	۰/۵۹	i-j	۰/۵۸	i-j	۰/۵۸
Rh	j	۰/۴۶	h-j	۰/۶۹	c-g	۱/۲۲	d-i	۱/۰۱	d-i	۱/۰۱
A224	f-j	۰/۷۶	e-j	۰/۸۷	a-c	۱/۷۴	b-f	۱/۳۵	c-h	۱/۱۸
Rh +A224	e-j	۰/۸۴	c-i	۱/۰۶	a	۲/۸۱	ab	۲/۰۸	a-d	۱/۶۵
A291	i-j	۰/۵۶	g-j	۰/۷۲	a-d	۱/۶۶	a-d	۱/۶۵	c-i	۱/۰۴
Rh +A291	i-j	۰/۵۹	d-i	۰/۹۷	a-d	۱/۶۶	a-e	۱/۴۳	c-i	۱/۰۸

هر عدد، میانگین چهار تکرار می باشد . تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن($P\leq 0.05$) دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. A291, A224: کد جدایه‌های تریکودرما حاصل از خاک مزارع پنبه می باشد.

جدول ٤– مقایسه میانگین فنل کل(µg/g root) در ریشه تیمار شده با دو جدایه تریکودرما به تنهایی و بصورت مخلوط با *Rhizoctonia solani*

تیمارهای	روزهای		پس از کاشت	پنبه		
آزمایش	٦	٨		١٠	١٢	١٤
شاهد	٧٠/٢m	١٠٦/١L	١٢٥/٢kl		١٤٣/٥j-l	١٦٦/٥g-j
Rh	١٥٨/٥h-k	٢٠٨/٣c-f	٢١٢/٧c-e		٢٣٩/٨cd	١٥١/٢h-k
A224	١٣٦/٨j-l	١٣٧/٠j-l	١٥٩/٦h-k		١٨٠/٣e-i	١٥٥/١h-k
Rh +A224	١٥١/٨h-k	١٥٢/٢h-k	١٨٦/٩e-h		٢٠٤/٥d-g	١٨٠/٣e-i
A291	١٧٠/٧f-j	٢٢٥/٢cd	٢٣١/٦cd		٢٣٧/٤cd	١٢٥/١kl
Rh +A291	١٧٦/٢e-j	٢٤٦/٩bc	٢٧٩/٢ab		٢٩٢/٦a	٢١٥/٣c-e

هر عدد، میانگین چهار تکرار می باشد . تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون دانکن($P\leq0.05$) دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. A291, A224: کد جدایه‌های تریکودرما حاصل از خاک مزارع پنبه می باشد.

منابع

١– حمداله زاده ا. ١٣٦٨ . گزارش نهایی طرح بررسی بیماریهای پنبه در منطقه گرگان ، انتشارات مرکز . تحقیقات کشاورزی استان گلستان.۴۲ صفحه.

۲– مرتضی نیا ح.، روحانی ح. و صاحبانی ن. ۱۳۸۹. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز القاءشده توسط *Trichoderma harzianum* Bi در گیاهچه خیار و اثر آن در کنترل پوسیدگی ریشه و طوقه در اثر *Pythium aphanidermatum*. نشریه حفاظت گیاهان، جلد ۲۴، شماره ۳.صفحه ۲۵۸–۲۶۸.

3- Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* .II. intragenic classification. Canadian Journal of Botany, 69: 2357-2372.

4-Bradford M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

5- Chance B., and Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology , 2: 764-775.

6- Chen C., Belanger R.R., Benhamou N., and Paulitz T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with palnt growth promoting rhizobacteria(PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56:13-23.

7- Datta S.K., and Muthukrishnan S. 1999. Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press.225 Pp.

8- Dennis C., and Webester J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* (I.production of non-volatile antibiotics). Transactions of the British Mycological Society, 57:25-39.

9- Djonovic S., and Kenerly C.M. 2005. Role of two secreted proteins from *Trichoderma virens* in mycoparasitism and induction of plant resistance.Ph.D thesis submitted to the office of graduated studies of Texa A& M university.217 Pp.

10- Elade Y., Chet I., and Henis Y. 1981. A selective medium for improving quantite isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica, 9(1): 59-67.

11- Fric F. 1976. Oxidative enzymes.In: Heitefuss, R. & P.H.Williams (Eds), Encyclopedia of plant physiology, Vol. 4, Springer-verlag Berlin Heidelberg New York. Pp: 617-631.

12- Goodman R.N., Kiraly Z., and Wood K.R. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press. 433 Pp.

13- Hammand-Kosack E., and Jones D.G.I.J. 1996. Resistance gene-dependent plant.The Plant Cell, 8: 1773-1791.

14- Hammerschmidt R., Nuckles E., and Kuc J. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiological Plant Pathology, 20: 73-82.

15- Hanson L.E., and Howell C.R. 2004. Elicitors of plant responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. Phytopathology, 94: 171-174.

16- Heil M., and Ploss K. 2006. Induced resistance enzymes in wild plants- do `early birds` escape from pathogen attack ? Naturewissenschaften.

17- Hillocks R.J. 1992. Cotton Diseases. C. A. B. International Wallingford. UF.415 pp.

18- Howell C.R. 1982. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. Phytopathology, 72:496-498.
19- Howell C.R., Devay J.E., and Batson W.E. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatment. J.Cotton. Science, 1: 15-20.
20- Howell C.R., Hanson L.E., Stipanovic R.D., and Puckhaber L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology, 90: 284-252.
21- Howell C.R., and Puckhabar L.S. 2005. A study of the characteristics of "P" and "Q" STRAINS OF *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. Biological Control, 33: 217-222.
22- Howell C.R., and Stipanovic R.D. 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-Induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: Antibiosis. Phytopathology, 85: 469-472.
23- Hunter R.E. 1974. Inactivation of pectic enzymes by polyphenols in cotton seedlings of different ages infected with *Rhizoctonia solani*.Physiological of Plant Pathology, 4: 151-159.
24- Liu J., and Ekramoddoullah A.K.M. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology, 68 (3–13).
25- Malick C.P., and Sing M.B. 1980. Plant enzymology and histo-enzymology. Kalyani publisher, New Delhi. 280 Pp.
26- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing suger. Annual of Biochemistry, 31: 426-428.
27- Oka Y., Chet I., and Spiegel Y. 1997. Are pathogen-related protein induced by *Meloidogyne javanica* or *Hetoroder avenae* invasion? J. Nematology, 29: 501-508.
28- Ozyigit I.I. 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. African Journal of Biotechnology, 7 (8): 1145-1150.
29- Peng M., and Kuc J.A. 1992. Peroxidase- generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. Phytopathology, 82: 696-699.
30- Scott-Craig J.S., Kerby K.B., Stein B.D., and Somerville S.C. 1995. Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei)*. Physilogical and Molucular of Plant Pathology, 47:407-418.
31- Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R.M. 1999. Methods in enzymology. vol.299.Academic Press.152-158 p.
32- Sneh B., Burpp L., and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, 133 Pp.
33- Stoll V.S., and Blanchard J.S. 1990. Buffers: Principles and practice.Pp. 24-38 in M. P. Deutscher(Edi). Methods in Enzymology, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, San Diego.
34- Tseng S.C., Liu S.Y., Yang H.H., Lo C.T., and Peng K.C. 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* T323 in response to *Rhizoctonia solani*. J.Agricultural and Food Chemistry, 56: 6914-6922.
35- Vidhyasekaran D. 2002. Bacterial disease resistance in plants CRC Press.446 Pp.
36- Veech J.A. 1976. Localization of peroxidase in *Rhizoctonia solani*-Infected cotton seedlinsG. Phytopathology, 66: 1072-1076.
37- Woo S.L., Scala F., Ruocco M., and Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology, 96: 181-185.
38-Xue L., Charest P.M., and Jabaji-Hare S.H. 1988. Systemic Industion of Peroxidaaes, 1,3-β-Glucanses, Chitinases, and Resistance in Bean Plants by Binucleate *Rhizoctonia* Species. Phytopathology, 88:359-365
39- Yedidia I., Behamou N., and Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1061-1070.