نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 4، زمستان 1394، ص. 480-471

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 4, Winter 2016, P. 471-480

ارزیابی کارآیی جدایه‌های تریکودرما برای کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه لوبیا در زنجان

مریم خدایی[1]- رقیه همتی[2*]

تاریخ دریافت:1392/4/1
تاریخ پذیرش:1394/5/14

چکیده

پوسیدگی ریشه و بوته‌میری لوبیا ناشی از قارچ *Rhizoctonia* در سطح وسیعی از مزارع لوبیای استان زنجان گسترش دارد. در تحقیق حاضر، توانایی آنتاگونیستی 11جدایه تریکودرما بر روی قارچ *R. solani* جداشده از ریزوسفر ریشه لوبیا در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مایکوپارازیتیسم، مکانیسم اصلی جدایه‌های تریکودرما در فعالیت آنتاگونیستی روی قارچ *R. solani* است. در بررسی قدرت رقابتی ساپروفیتی در محیط کشت پی دی ای، جدایه‌های Trichoderma شامل T_{25} و T_{12-N} (*T.harzianum*) و T_{93} و T_{12-0} (*T.virens*) مؤثرتر از بقیه بودند، به‌طوری‌که جدایه T_{25} بعد از پنج روز به طور کامل سطح پرگنه *R.solani* را پوشانده و روی ریسه‌های بیمارگر رشد و اسپورزایی نمود. متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما نیز اثر بازدارندگی قابل توجهی بر رشد میسلیومی قارچ *R.solani* داشته و بیشترین کاهش رشد در کشت هم-زمان و کشت 72 ساعت زودتر تریکودرما به ترتیب مربوط به جدایه T_{12-N} با 32/73 درصد و جدایه (T.sp.) T_6 با 56/08 درصد بازدارندگی بود. موفق‌ترین جدایه‌ها در کنترل بیماری و کاهش شدت بیماری در گلخانه جدایه‌های T_{12-0}، T_{131}(*T.viride*)، T_{95}(*T.harzianum*) ، T_{12-N}و T_{93} بودند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیوکنترل، تیمار بذری، قدرت رقابت ساپروفیتی

مقدمه

لوبیا یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانواده لگومینه واصلی‌ترین محصول حبوبات در دنیا می‌باشد. استان زنجان مقام چهارم سطح زیر کشت لوبیای آبی را دارد (30). پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه (*Rhizoctonia solani* kühn Donk) از مهم‌ترین بیماری‌های ریشه و هیپوکوتیل لوبیا است (1). بیمارگرهای غالب ایجادکننده پوسیدگی ریشه در مزارع زنجان به ترتیب قارچهای *Fusarium solani*، *R.solani*، *F. oxysporum* و *Macrophomina phaseolina* می‌باشند (23). پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه لوبیا از سال 1998 در استان زنجان به یکی از مشکلات جدی در تولید این محصول تبدیل شده است. خسارت وارده به محصول در مزارع لوبیای استان به میزان 51/9 درصد کاهش در تعداد غلاف و 59/7 درصد کاهش در تعداد بذر در هر گیاه گزارش شده است (24). در سال 2013 علایم پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه در مرحله سفت شدن بذر و رسیدگی فیزیولوژیکی در 74درصد از کل122 مزرعه لوبیای مورد بررسی در استان زنجان مشاهده شدند (25). میزان خسارت وارده به محصول لوبیا در اثر قارچ *R. solani* بین مزارع یک منطقه و نیز در یک مزرعه از سالی به سال دیگر متغیر است که دلیل آن تاثیر شرایط آب‌وهوایی و خاک بر پاتوسیستم لوبیا-رایزوکتونیا از زمان کشت تا برداشت می‌باشد (25). همتی در سال 2012 گروه‌های آناستموزی جدایه‌های رایزوکتونیای جدا شده از لوبیاکاری‌های اصلی استان زنجان را مطالعه نمود و AG-4 را به عنوان گروه غالب در منطقه شناسایی نمود. باتوجه‌به‌این‌که *R. solani* AG-4 گیاهان دیگری را از قبیل یونجه، کلزا، ذرت، آفتابگردان، سیب‌زمینی، کاهو، چغندرقند، جو و گوجه‌فرنگی ،که در تناوب با لوبیا در منطقه کشت می‌شوند، نیز مورد حمله قرار می‌دهد، بنابراین تناوب زراعی به عنوان یک روش زراعی، کارآیی مطلوبی جهت کنترل این بیماری نخواهد داشت. از سویی‌دیگر در ایران تاکنون رقم مقاومی علیه این بیماری معرفی نشده است (26). اکثر ارقام مقاوم در دنیا نیز دارای صفات منفی مانند دوره رشد طولانی و بذرهای ریز می باشند (20). درحال حاضر روش

1 و 2- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: (Email: rhemati@znu.ac.ir

شیمیایی تنها روش کنترل این بیماری در منطقه می‌باشد و عمده‌ترین سم مورد استفاده در منطقه علیه این بیماری قارچ‌کش بنومیل می‌باشد. با در نظر گرفتن مخاطرات زیست‌محیطی کاربرد سموم شیمیایی در خاک، مدیریت تلفیقی این بیماری و جایگزین نمودن یا در اولویت قراردادن روش‌های سالم و بی‌مخاطره همچون استفاده از عوامل بیوکنترل اهمیت بالایی پیدا می‌کند. امروزه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های غیر بیماریزا توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است. از جمله عوامل بیوکنترل برای کنترل بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه لوبیا، گونه‌های تریکودرما می‌باشند. پتانسیل بیوکنترلی گونه‌های تریکودرما اولین‌بار در سال 1930 توسط ویندلینگ مشخص شد. او کشف کرد که *T.lingnorum* می‌تواند تعدادی از بیمارگرهای خاکزاد از جمله *R.solani* را توسط مکانیسم پارازیتیسم کنترل کند (34). چهار سال بعد ویندلینگ گزارش کرد که جدایه‌ای از *T.lingnorum* موادی مرگ‌آور در داخل محیط کشت *R.solani* ترشح کرده است که برای این بیمارگر سمی می‌باشند (35). گونه‌های تریکودرما از مکانیسم‌های مختلفی برای مقابله با بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌کنند مانند کاهش مقاومت و واکنش‌های دفاعی گیاه، مقابله مستقیم از طریق مایکوپارازیتیسم، آنتی بیوز، رقابت و تحریک رشد گیاه (29). هادار و همکاران (16) دریافتند که *T. harzianum* بطور مستقیم ریسه‌های قارچ *R. solani* را مورد حمله قرار می‌دهد. الاد و همکاران (14) جدایه‌ای از قارچ *T. harzianum* را علیه دو عامل بیماری‌زای لوبیا *R. solani* و *Sclerotium rolfsii* به‌کاربردند. این جدایه نه تنها در شرایط آزمایشگاه موجب لایز شدن میسلیوم هر دو قارچ بیماری‌زا گردید، بلکه موجب کاهش چشمگیر شدت بیماری در شرایط گلخانه شد (14). ناشوا و همکاران توانایی آنتاگونیستی 15 جدایه تریکودرما را در شرایط آزمایشگاه برروی عوامل پژمردگی و پوسیدگی لوبیا مورد بررسی قراردادند که از بین این جدایه‌ها *T.harzianum* و *T. viride* بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را در مقابل *R. solani* و *F. oxysporum* f.sp.*phaseoli* نشان دادند (22). محمدی و همکاران مکانیسم‌های آنتاگونیستی سه جدایه *T. Harzianum*، یک جدایه *T. virens* و یک جدایه *T. viride* را علیه *R.solani* عامل بیماری پوسیدگی مرطوب ریشه نخود ایرانی مورد مطالعه قرار دادند. جدایه‌های *T. harzianum* اثر بیوکنترلی بالایی را علیه این بیمارگر نشان دادند و موجب بیش از 90 درصد بازدارندگی از رشد این قارچ در محیط کشت گردیدند (21). روحانی و همکاران به بررسی نقش جدایه‌های تریکودرما در مبارزه بیولوژیک علیه *R.solani* روی سیب‌زمینی پرداخته و نتایج رضایت‌بخشی به‌دست آوردند (31). بازگیر و اخوت نیز با بررسی اثر چند جدایه از *T. harzianum* بر روی *R. solani*، عامل مرگ گیاهچه لوبیا اثرات مثبتی را در مقایسه با کاربرد برخی قارچ‌کش‌ها از جمله بنومیل به دست آوردند (8). با بررسی تأثیر جدایه‌هایی از قارچ‌های آنتاگونیست و اثر چند قارچ‌کش بر عامل بیماری سوختگی غلاف برنج (*R.solani*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه توسط نیک‌نژاد کاظم‌پور و همکاران، مشخص شد که قارچ‌های آنتاگونیست و قارچ‌کش بنومیل به ترتیب 27/5 و 32/5 درصد بیماری را کنترل می‌نمایند (28). کاربرد جدایه‌هایی از تریکودرما در خیار و کاهو نیز موجب کاهش بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه گردید (32). گزارش‌های متعدد مشابه دیگری از کنترل قارچ *R. solani* توسط گونه‌های تریکودرما در لوبیا و سایر گیاهان وجود دارند (2، 4، 17 و 19). همچنین گزارشات متعددی از جدایه‌هایی که سبب ارتقای فاکتورهای رشدی گیاه می‌شوند، وجود دارد. به عنوان مثال الاد و همکاران با اضافه کردن قارچ *T. harzianum* به خاک گلدان افزایش معنی‌داری را در رشد گیاه لوبیا در مقایسه با تیمار فاقد تریکودرما مشاهده نمودند (14). چت و بیکر در آزمایشاتی که در گلخانه انجام دادند مشاهده کردند زمانی که بذور قبل از کشت با اسپورهای تریکودرما آغشته شوند، تولید محصول افزایش می‌یابد (12). برکت و همکاران نیز علاوه بر کاهش شدت بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه لوبیا، افزایش چشم‌گیری در وزن خشک و تر و ارتفاع گیاهان لوبیای تیمارشده با برخی گونه‌های بومی تریکودرما مشاهده نمودند (7). اسمولینسکا و همکاران نیز با کاربرد جدایه‌هایی از تریکودرما افزایش قابل ملاحظه‌ای در فاکتورهای رشدی خیار و کاهو مشاهده کردند (32). در تحقیق حاضر با توجه به جداسازی تعداد زیادی ازجدایه‌های بومی تریکودرما از مزارع لوبیای استان زنجان و با در دست داشتن تعدادی جدایه غیر بومی این قارچ، تأثیر این جدایه‌ها برکاهش شدت بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه لوبیا و افزایش فاکتورهای رویشی در شرایط آزمایشگاه وگلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی بیمارگر: برای جداسازی عوامل پوسیدگی ریشه، در تابستان 1389 بوته‌هایی با علایم آلودگی ریشه و طوقه از مزارع لوبیای شهرستان‌های زنجان و خرمدره جمع‌آوری گردیدند. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، جداسازی به روش اسنه و همکاران (33) با استفاده از محیط کشت پی‌دی‌ای[1] صورت گرفت که پس از خالص‌سازی 25 جدایه رایزوکتونیا به دست آمدند. شناسایی و تعیین گونه بر اساس کلید شناسایی اسنه و همکاران (33) انجام شد.

اثبات بیماری‌زایی قارچ *R.solani* روی لوبیا: بیماری‌زایی به روش نلسون و همکاران (27) و با مایه‌زنی مایه تلقیح دانه گندم حاوی قارچ بیماری‌زا در خاک گلدان‌ها اثبات شد. شدت بیماری‌زایی

1- PDA (Potato Dextrose Agar)

جدایه‌ها نیز چهار هفته بعد از کاشت مورد سنجش قرار گرفت و از بین جدایه‌های بیمارگر، جدایه‌ای که بیش‌ترین شدت بیماری‌زایی (جدایه Rh7) را داشت، انتخاب گردید تا در آزمون های بعدی این تحقیق مورداستفاده قرارگیرد. تعیین گروه آناستموزی، با تلاقی این جدایه و چهار جدایه استاندارد (AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5) روی لام میکروسکوپی تمیز دارای یک لایه آب‌آگار دو درصد صورت گرفت (33) و گروه آناستموزی آن AG-4 تشخیص داده‌شد.

تهیه جدایه‌های قارچ تریکودرما و انتخاب جدایه‌های برتر: بدین‌منظور اقدام به نمونه‌برداری از خاک مزارع لوبیای دارای علائم پوسیدگی ریشه در شهرستان‌های زنجان و خرمدره گردیده و تعدادی نمونه خاک از محیط اطراف ریشه بوته‌های سالم و آلوده تهیه و بطور جداگانه در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی جدایه‌ها از خاک از محیط کشت اصلاح شده الاد و چت (15) و روش دیسک‌آگار استفاده شد. در این بررسی 132 جدایه بومی جداسازی و خالص گردید. همچنین 12 جدایه تریکودرما از گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد (دکتر روحانی) دریافت شد. به منظور غربال جدایه‌های برتر، بررسی مقدماتی این جدایه‌ها با استفاده از روش کشت متقابل با قارچ *R.solani*، انجام گرفت (13) و از بین آن‌ها 11 جدایه مؤثر علیه قارچ *R.solani* برای آزمون‌های بعدی انتخاب شدند. از این 11 جدایه، 6 جدایه بومی مزارع لوبیای زنجان و 5 جدایه از جدایه های دریافتی بودند (جدول 1). معیار انتخاب این جدایه ها، سرعت رشد، قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی روی پرگنه *R.solani* بود. جدایه‌هایی که در مدت زمان کمتر تشتک پتری را پر می‌کردند و توانایی پوشاندن پرگنه *R.solani* را داشتند و به طور کامل روی *R.solani* اسپورزایی کردند و زمان کلونیزاسیون کمتری داشتند برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. شناسایی گونه جدایه‌های بومی با مطالعه ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها و با استفاده از کلید بیست (9) انجام گرفته و توسط دکتر روحانی تایید شد.

بررسی اثر بازدارندگی از رشد و قدرت رقابت ساپروفیتی جدایه‌های تریکودرما در شرایط آزمایشگاه: بررسی قدرت بازدارندگی از رشد به روش کشت متقابل (4) روی محیط کشت پی-دی‌ای در سه حالت مختلف شامل کشت هم‌زمان تریکودرما و بیمارگر، کشت 48 ساعت زودتر بیمارگر و کشت 96 ساعت زودتر بیمارگر انجام شد. پس از انتقال تشتک پتری به انکوباتور با دمای 25±1 درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری رشد شعاعی بیمارگر 72 ساعت پس از کشت، انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر 72 ساعت پس از کشت با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{(قطر کلنی قارچ در هر تیمار)- (قطر کلنی در پتری شاهد)}}{\text{(قطر کلنی در پتری شاهد)}} \times 100 \quad (1)$$

جدول 1- جدایه‌های تریکودرمای بومی و غیر بومی (دریافتی از گروه گیاه پزشکی دانشگاه فردوسی مشهد)

Table 1- Indigenous and non-indigenous isolates of *Trichoderma* (received from Ferdousi University of Mashhad)

نام جدایه name of isolate	گونه species	محل جداسازی sampling location
T_{36}	*T.viride*	داستاران
T_{125}	*T.viride*	صائین قلعه
T_{131}	*T.viride*	دیزج
T_{93}	*T.virens*	صائین قلعه
T_{89}	*T.parseomosum*	قلعه حسینیه
T_{25}	*T.harzianum*	عمیدآباد
$T_{12\text{-}0}$	*T.virens*	جدایه دریافتی
$T_{12\text{-}N}$	*T.harzianum*	جدایه دریافتی
T_{19}	*T.sp.*	جدایه دریافتی
T_{6}	*T.sp.*	جدایه دریافتی
T_{95}	*T.harzianum* Bi	جدایه دریافتی

آزمون در هر سه حالت، در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل 11 تیمار در 3 تکرار برای هر جدایه انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS ver.18 مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند.

بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *R.solani*: بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما به روش دنیس و وبستر به دو صورت کشت هم‌زمان و کشت 72 ساعت زودتر جدایه‌های تریکودرما در قالب طرح کاملا تصادفی در 11 تیمار و 3 تکرار برای هر جدایه مجزا انجام گرفت (13). داده‌های بدست آمده از این آزمایش نیز با استفاده از نرم افزار SPSS ver.18 مورد تجزیه وتحلیل آماری قرار گرفتند.

بررسی میکروسکوپی نحوه تأثیر جدایه‌های تریکودرما برروی *R.solani*: نحوه ارتباط بین هیف جدایه‌های تریکودرما و بیمارگر، با کشت متقابل بیمارگر و تریکودرما، روی لام میکروسکوپی حاوی محیط کشت پی‌دی‌ای در داخل تشتک‌های پتری سترون انجام شد (10) و بااستفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 40 مورد بررسی قرار گرفت. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی توانایی تثبیت جدایه‌های تریکودرما روی ریشه گیاه لوبیا: برای انجام این آزمون ابتدا بذور لوبیا قرمز رقم ناز (رقم رایج مورد کشت در منطقه) با سوسپانسیون اسپوری تریکودرما با غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر تلقیح شدند. جهت ایجاد چسبندگی لازم در سطح بذرها، بذرها به مدت 15 دقیقه در محلول 2 درصد کربوکسی متیل سلولز[1] (صمغ عربی) قرار داده شدند. بذور چسبناک

1- CMC (Carboxy Methyl Cellulose)

در زیر هود به مدت 10 دقیقه قرار گرفتند و سپس به مدت 2 ساعت در سوسپانسیون‌های به دست آمده از جدایه‌های تریکودرما قرار داده شدند. بذور تلقیح شده در گلدان‌های حاوی خاک استریل کاشته شده و به مدت یک هفته در دمای معمولی آزمایشگاه قرار داده شدند. بعد از یک هفته گلدان‌ها به آرامی برگردانده شده و ریشه‌ها از خاک خارج شدند و به آرامی با آب شستو شو داده شدند، سپس ریشه‌ها به سه قسمت فوقانی (A)، میانی (B) و تحتانی (C) تقسیم شدند و هر قسمت به قطعات کوچکی تقسیم شد و در روی محیط کشت اختصاصی تریکودرما کشت شد. با بررسی‌های روزانه میزان رشد جدایه‌های تریکودرما در هرکدام از سه قسمت ریشه ثبت شد (3). برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی اثر تیمار بذر با تریکودرما بر بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی لوبیا در شرایط گلخانه: این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با 13 تیمار و سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. تیمارها عبارت بودند از گلدان‌های شاهد آلوده، شاهد غیر آلوده و هر یک از 11جدایه تریکودرما به همراه *R.solani*. خاک گلدان‌ها با مایه تلقیح جدایه Rh7 قارچ *R. solani* تلقیح گردید (27). سپس بذور لوبیای تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور تریکودرما (10) به تعداد دو عدد در هر گلدان کاشته شدند. گلدان‌ها در شرایط کاملاً تصادفی روی سکوهای گلخانه تحت تناوب نوری 16 ساعت روشنایی و دمای 25 درجه سانتی گراد قرار گرفته و یک روز در میان آبیاری شدند. سی روز بعد از کاشت، گیاهان از خاک خارج شدند و پس از شست و شوی ریشه‌ها شدت بیماریزایی *R.solani* با استفاده از نمره‌دهی پنج شماره ای نلسون و همکاران (15) ثبت گردید. همچنین شاخص‌های رشدی شامل طول ریشه، ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک ریشه، وزن تر و خشک بوته تعیین‌گردید.

نتایج

اثر بازدارندگی از رشد و قدرت رقابت ساپروفیتی جدایه‌های تریکودرما در برابر *R.solani*: در بررسی بازدارندگی از رشد هیف عامل بیماری در مقابل هیف تریکودرما، و ثبت اندازه رشد شعاعی عامل بیماری 72 ساعت پس از مجاورت، مشاهده شد که بازدارندگی از رشد عامل بیماری در تیمارهای مختلف به دلیل تفاوت در سرعت رشد و حرکت جدایه های مختلف تریکودرما در روی محیط کشت و برخورد سریع‌تر با هیف‌های بیمارگر است. به طوریکه جدایه T_{36} بدون حضور بیمارگر در مدت چهار روز سطح تشتک پتری حاوی محیط کشت پی‌دی‌ای را پوشاند به همین علت در حضور بیمارگر نیز، به علت سرعت رشد بالا و برخورد با هیف بیمارگر از رشد آن ممانعت نمود. در کشت هم‌زمان و 48 ساعت زودتر *R.solani*، جدایه T_{36} به ترتیب با 50/29 و 32/44 درصد بازدارندگی، بیشترین میزان ممانعت از رشد بیمارگر را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که بین جدایه‌های مختلف تریکودرمای مورد آزمون، از نظر میزان بازدارندگی از رشد عامل بیماری اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود دارد (جدول 2 و شکل 1). در بررسی قدرت رقابتی ساپروفیتی جدایه‌ها در هر سه حالت (کشت هم‌زمان، کشت 48 ساعته رایزوکتونیا و کشت 96 ساعته رایزوکتونیا) مشاهده شد که تمامی جدایه‌های تریکودرما پس از برخورد با میسلیوم‌های *R.solani* مانع از رشد و توسعه آن‌ها شدند، جدایه‌های رایزوکتونیا نیز برای مقابله با حمله تریکودرما بلافاصله بعد از برخورد با هیف آنتاگونیست (از روز سوم کشت) دیواره ضخیمی از اسکلرت ایجاد کردند تا از پیشروی میسلیوم‌های تریکودرما جلوگیری کنند (به استثنای جدایه‌های T_{12-0}، T_{93} و T_{25} که یا دیواره اسکلرتی در برابرآن‌ها ایجاد نشد و یا بسیار ضعیف بود). مدت زمانی که هر کدام از جدایه‌ها توانستند بر این دیواره اسکلرتی غلبه کرده و سطح پرگنه رایزوکتونیا را به طور کامل بپوشانند بسته به توانایی آنتاگونیستی جدایه‌ها متفاوت بود. سرعت پیشروی، کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه‌های T_{25}، T_{93}، T_{12-N} و T_{12-0} بیش از سایر جدایه‌ها بود، بطوریکه T_{25} در کشت هم‌زمان تریکودرما و بیمارگر، پنج روز پس از کشت توانست سطح پرگنه رایزوکتونیا را بپوشاند.

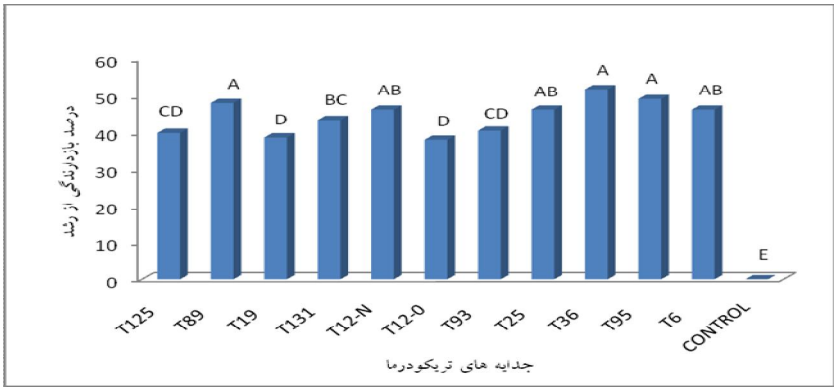
جدول 2- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی جدایه‌های تریکودرما بر رشد هیف *Rhizoctonia solani* در آزمون متقابل (کشت هم‌زمان)

Table 2- The analysis of variance for inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on hyphal growth of *Rhizoctonia solani* in dual culture (the same time culturing)

منبع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار treatment	11	18.523	1.684	2568.229**
خطا error	24	0.016	0.001	
کل total	35	18.539		

** اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار است. ضریب تغییرات در این آزمون 1/07 درصد است.

**Significant difference (P value = 0.01). CV=1.07



شکل 1- درصد بازدارندگی از رشد هیف *Rhizoctonia solani* توسط جدایه‌های تریکودرما در آزمون متقابل (کشت هم‌زمان) در شرایط آزمایشگاهی

Figure 1 - Percentage inhibition against *Rhizoctonia solani* hyphal growth by *Trichoderma* isolates in dual culture (the same time culture) under in vitro conditions

اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *R.solani*: بین جدایه‌های مورد آزمون، در میزان بازدارندگی از رشد عامل بیماری اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود داشت. بیشترین کاهش رشد (بیشترین اثر بازدارندگی) در کشت هم‌زمان و کشت 72 ساعت زودتر تریکودرما به ترتیب مربوط به جدایه T_{12-N} با 32/73 درصد و جدایه T_6 با 56/08 درصد بازدارندگی بود (جدول‌های 3 و 4، شکل‌های 2 و 3).

مکانیسم کنترل *R.solani* توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما: جدایه‌های مختلف تریکودرما از طریق مکانیزم‌های مختلف باعث لیز و متلاشی شدن هیف‌های عامل بیمارگر می‌شوند. هیف‌های تریکودرما در مراحل اولیه برخورد با هیف‌های *R.solani* در قسمتی از طول آن با تماس هیفی به موازات هیف‌های بیمارگر رشد کرده و با تولید انشعابات کوچک نفوذ کننده یا به طور مستقیم (بدون تولید انشعاب)، خودشان را به میسلیوم میزبان چسباندند. به دنبال این تعامل، تریکودرما در داخل هیف بیمارگر نفوذ نموده، رشد و گسترش یافت و تولید فیالید و اسپور نمود. باگذشت زمان شدت پیچش آن‌ها افزایش‌یافته و با مسن‌تر شدن کشت، تراکم و شدت پیچش به حدی افزایش یافت که باعث انقباض، تغییرشکل و رنگ و لیزشدن و تکه‌تکه و متلاشی شدن هیف‌های *R.solani* گردید. علاوه بر پارازیتیسم، هیف‌های تریکودرما از طریق آنتی‌بیوز باعث لیز و تیره شدن هیف بیمارگر گردید که این‌حالت به وضوح در جدایه T_{93} و T_{12-0} دیده شد (شکل 4).

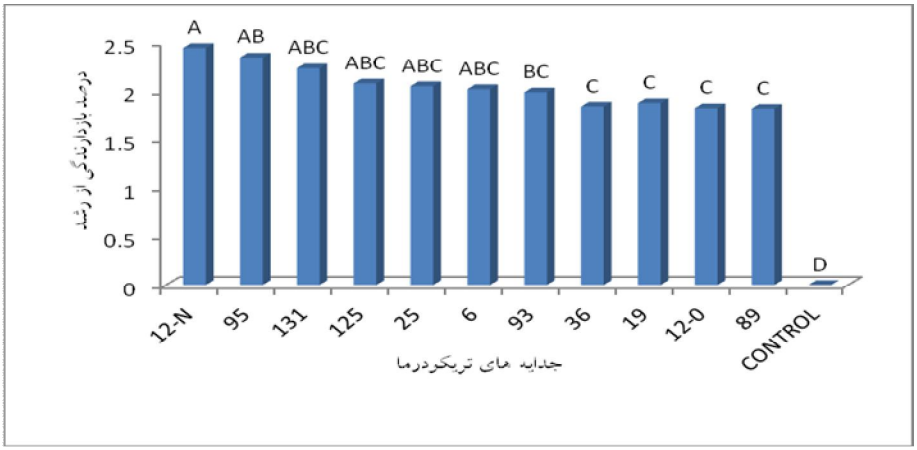
جدول 3- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی جدایه‌های تریکودرما بر رشد هیف *Rhizoctonia solani* در آزمون ترکیبات فرار (کشت هم‌زمان تریکودرما و بیمارگر)

Table 3- The analysis of variance for inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on hyphal growth of *Rhizoctonia solani* in volatile compounds test (the same time culturing of *Trichoderma* and pathogen)

منبع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار treatment	11	12.857	1.169	21.26**
خطا error	24	1.320	0.055	
کل total	35	14.176		

** اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار است. ضریب تغییرات در این آزمون 12/52 درصد می‌باشد.

**Significant difference (P value = 0.01). CV=12.52



شکل 2- درصد بازدارندگی از رشد هیف *Rhizoctonia solani* توسط جدایه‌های تریکودرما در آزمون ترکیبات فرار (کشت هم‌زمان تریکودرما و بیمارگر)

Figure 2 - Percentage inhibition against *Rhizoctonia solani* hyphal growth by *Trichoderma* isolates in volatile compounds experiment (the same time culture)

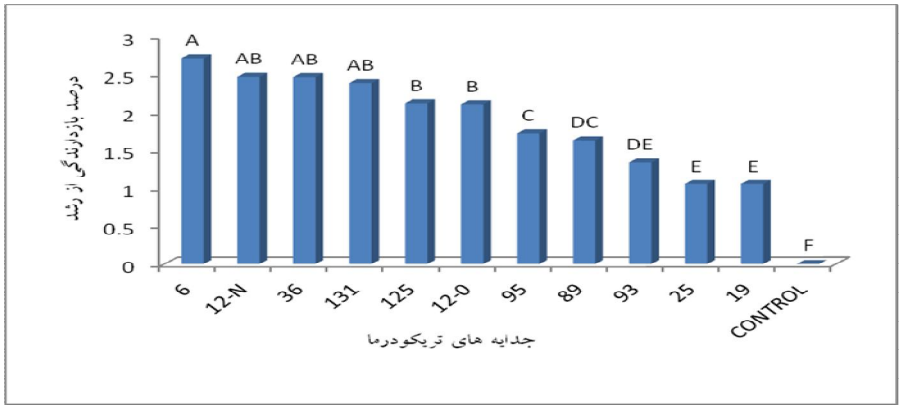
جدول 4- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی جدایه‌های تریکودرما بر رشد هیف *Rhizoctonia solani* در آزمون ترکیبات فرار (کشت72 زودتر تریکودرما)

Table 4 - The analysis of variance for inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on hyphal growth of *Rhizoctonia solani* in volatile compounds test (72 h early growing of *Trichoderma*)

منبع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار treatment	11	17.902	1.627	55.74**
خطا error	18	0.525	0.029	
کل total	29	18.427		

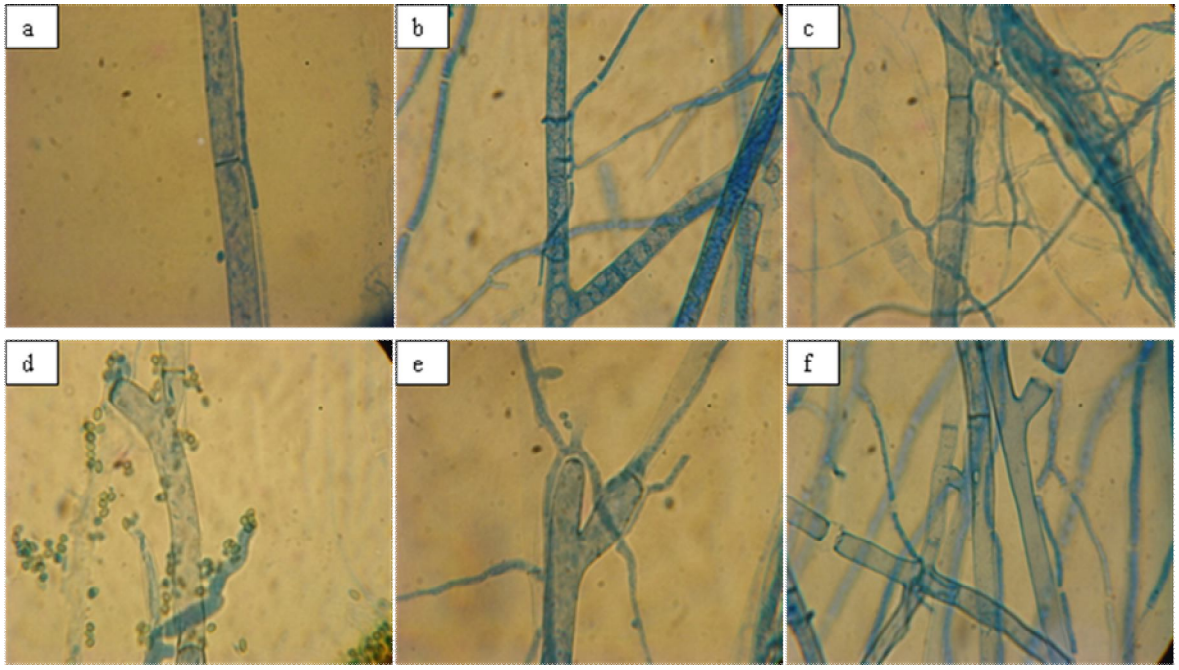
** اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار است. ضریب تغییرات در این آزمون 9/19 درصد می‌باشد.

**Significant difference (P value = 0.01). CV=9.19



شکل 3- درصد بازدارندگی از رشد هیف *Rhizoctonia solani* توسط جدایه‌های تریکودرما در آزمون ترکیبات فرار (کشت 72 ساعت زودتر تریکودرما)

Figure 3 - Percentage inhibition against *Rhizoctonia solani* hyphal growth by *Trichoderma* isolates in in volatile compounds test (72 h early growing of *Trichoderma*)



شکل 4- بررسی میکروسکوپی مکانیسم کنترل *Rhizoctonia solani* توسط قارچ تریکودرما: a- حرکت هیف تریکودرما در موازات هیف بیمارگر، b- نفوذ از طریق ایجاد انشعاب، c–پیچش هیف تریکودرما دور هیف بیمارگر، d- تولید اسپور توسط تریکودرما، e- تیره شدن انتهای هیف بیمارگر در اثر آنتی‌بیوز، f- قطعه قطعه شدن هیف و خروج محتویات هیف بیمارگر

Figure 4 - Microscopic evaluation of the control mechanisms of *Rhizoctonia solani* by various *Trichoderma* isolates: a- ***Trichoderma* hypha moving in parallelism to hypha of pathogen**, b-**penetration through the branch,** c- ***Trichoderma* torsion around hypha of the pathogen,** d- ***Trichoderma spp*. sporulation around the hypha of *R. solani*** , e- **Darkening of the pathogen's hyphal tip as a result of antibiosis,** f-**fragmentation of the pathogen's hypha and exudation of its content.**

نتایج بررسی توانایی تثبیت جدایه‌های تریکودرما روی ریشه گیاه لوبیا: در بررسی تثبیت جدایه‌های تریکودرما روی ریشه مشخص شد که جدایه $T_{12\text{-}N}$ سریع‌تر از بقیه جدایه‌ها توانست تشتک پتری مربوط به سه ناحیه A، B و C ریشه را پر کند، جدایه‌های T_{36}، T_6، T_{125}، T_{131}، T_{25}، T_{19} و T_{95} نیز به‌ترتیب در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند.

نتایج اثر بیوکنترلی گونه‌های تریکودرما به روش تیمار بذر در گلخانه: در شاخص شدت بیماری، بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار در سطح یک‌درصد مشاهده شد.

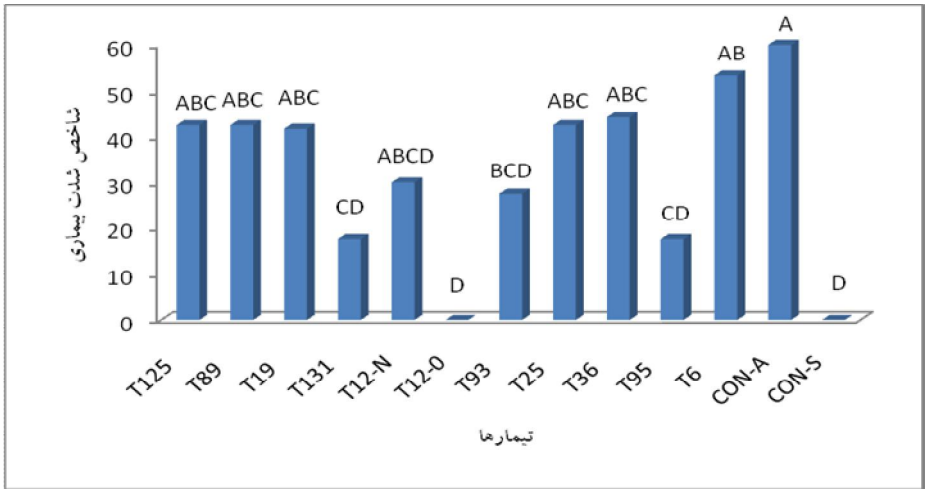
جدول 5- تجزیه واریانس مربوط به اثر جدایه‌های تریکودرما روی شدت بیماری حاصل از *Rhizoctonia solani* در شرایط گلخانه‌ای

Table 5- The analysis of variance for the effect of *Trichoderma* isolates on disease severity caused by *Rhizoctonia solani* under green house conditions

منبع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F
تیمار treatment	12	32.084	2.674	62.78**
خطا error	24	1.022	0.0425	
کل total	36	33.11		

** آزمون دانکن در سطح یک درصد معنی‌دار است. ضریب تغییرات در این آزمون 9/84 درصد است.

**Significant difference (P value = 0.01). CV=9.84



شکل 5- اثر جدایه‌های تریکودرما بر شاخص شدت بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی طوقه و ریشه لوبیا در شرایط گلخانه‌ای. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، درسطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. CON-A: گیاه آلوده بدون تیمار تریکودرما (شاهد بیمار)، CON-S: گیاه بدون آنتاگونیست و بیمارگر (شاهد سالم)

Figure 5- Effect of *Trichoderma* isolates on disease severity of *Rhizoctonia* root and crown rot of bean under greenhouse conditions. Numbers used in the chart are the average of three replicates (percentage).; Treatments with different letters are significantly different (P = 0.01). CON-A: infected plant with no *Trichoderma* treatment (diseased control), CON-S: non infected plant with no *Trichoderma* treatment (non diseased control).

جدایه‌های T_{12-0}، T_{131}، T_{95} ، T_{12-N} و T_{93} با شاهد سالم در یک سطح آماری قرار داشتند و با شاهد آلوده اختلاف معنی‌دار داشتند، جدایه T_{12-0} در مقایسه با شاهد آلوده به طور معنی‌داری شدت بیماری را کاهش داده و در مقایسه با دیگر تیمارها بهتر عمل کرد و به عنوان موفق‌ترین گونه در کاهش شدت بیماری شناخته شد (جدول 5، شکل 5). در بررسی فاکتورهای رویشی طول ریشه، وزن تر بوته و ارتفاع بوته نسبت به شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری در سطح یک‌درصد داشته و تیمار بذر با جدایه‌های T_6، T_{36} ، T_{93} T_{12-N} و T_{12-0} باعث افزایش این فاکتورها گردید.

بحث

در این تحقیق در بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما در برابر *R.solani* جدایه T_{36} در کشت هم‌زمان و در کشت 48 ساعته بیمارگر بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را نشان داد. چت وبیکر (12) نشان دادند که *T.harzianum* در برابر *R.solani* و *S. rolfsii* آنزیم‌های گلوکاناز و کیتیناز تولید نمود که سبب لیز شدن ریسه و سختینه قارچ گردید. طبق مطالعات هوانگ و همکاران(18) جدایه *T.harzianum* SQR-T37 در کشت متقابل توانست *R.solani* را در مدت پنج روز به طور کامل کلونیزه کرده و شروع به اسپورزایی کند. حاجی‌اقراری و همکاران (17) تأثیر متابولیت‌های فرار شش گونه تریکودرما را روی بیمارگرهای خاکزاد ازجمله *R.solani* (AG4 و Ag5) و *F.graminearum* مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که با افزایش مدت تأخیر کشت بیمارگر نسبت به جدایه‌های تریکودرما درصد بازدارندگی در اکثر جدایه‌ها افزایش می‌یافت و این بیانگر افزایش تولید متابولیت‌های فرار بازدارنده بوسیله جدایه‌های آنتاگونیست با مسن شدن پرگنه آن‌ها بود. در بررسی‌های میکروسکوپی تقابل جدایه‌های تریکودرما با *R.solani* ناحیه برخورد دو ریسه، رشد ریسه‌های جدایه‌های تریکودرما به موازات ریسه‌های رایزوکتونیا، پیچش هیفی، قطعه قطعه شدن ریسه‌ها و نفوذ ریسه‌ای مشاهده شد. پارازیتیسم فرایندی پیچیده و حاوی مراحل متعددی شامل شیمی‌گرایی، اتصال یافتن، پیچش، ترشح آنزیم‌های هیدرولیز کننده و نهایتاً تخریب و تجزیه سلول می‌باشد (14). در آزمون‌های گلخانه‌ای چون مایه زنی عامل بیماری در خاک زودتر از کاشت لوبیاهای تیمار شده با تریکودرما صورت گرفت، بنابراین بیمارگر فرصت کافی جهت استقرار در خاک را داشت. جدایه‌های T_{12-0}، T_{131}، T_{95} ، T_{12-N}، T_{93} به ترتیب بیشترین کاهش شدت بیماری را نشان دادند. بازگیر و اخوت (8) نشان دادند که *T.harzianum* و *T.viride* به ترتیب 53، 50، و 25 درصد مرگ گیاهچه لوبیا را در مقایسه با تیمار شاهد آلوده به *R.solani* در مزرعه کاهش دادند. اکثریت جدایه‌های استفاده شده در این تحقیق باعث تحریک رشد و افزایش شاخص‌های رشدی گیاه در مقایسه با شاهد آلوده شدند، بیشترین افزایش در شاخص‌های رشدی توسط جدایه‌های T_6، T_{36}، T_{93}، T_{12-N} و T_{12-0} ملاحظه شد. افزایش شاخص‌های رشدی گیاه در اثر کاربرد تریکودرما توسط بسیاری از محققین دیگر نیز

گزارش شده است (7، 11، 14، 32). به نظر می‌رسد که افزایش قابل توجه ریشه‌های ثانویه و ریشه‌های موئین منجر به افزایش شاخص‌های رشد و بیوماس گیاهچه‌های تیمار شده با تریکودرما می‌شود. آرورا و همکاران (5) اعتقاد دارند کلونیزاسیون ریشه گیاه بوسیله جدایه‌های تریکودرما غالباً رشد و توسعه ریشه، تولید محصول، مقاومت به استرس‌های غیر زنده، جذب و استفاده از مواد غذایی را تحریک می‌کند. بهجت و پن (6) دوازده جدایه جداسازی شده از ریزوسفر ریشه لوبیا را برای کنترل پوسیدگی ریشه وطوقه لوبیا (*R.solani*) در گلخانه به کاربردند و نتایج مشابهی را به دست آوردند. در نتایج گلخانه‌ای بیشترین کاهش شدت بیماری *R.solani* به ترتیب مربوط به جدایه‌های T_{12-0}، T_{95}، T_{131}، T_{12-N} و T_{93} بود، در آزمایشگاه جدایه‌های T_{12-0}، T_{12-N} و T_{93} از نظر قدرت رقابتی ساپروفیتی جدایه‌های برتری بودند و به نظر می‌رسد که جدایه‌های T_{12-0} و T_{93} با تولید متابولیت‌های خارج سلولی مانع از تشکیل دیواره اسکلرتی رایزوکتونیا در روی محیط کشت شدند، همچنین سه جدایه T_{95}، T_{131} و T_{12-N} از لحاظ تولید متابولیت‌های فرار نیز جدایه‌های برتری بودند. همچنین نتایج تحقیق حاکی از آن است که جدایه‌های غیربومی دریافتی از دانشگاه فردوسی مشهد در مقایسه با برخی جدایه‌های بومی در مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از نظر کاهش شدت بیماری و افزایش فاکتورهای رویشی تأثیر بیشتری داشتند. بنابراین این احتمال وجود دارد که این جدایه‌ها هر سه مکانیسم هیپرپارازیتیسم، رقابت بر سر مواد غذایی و نشت متابولیت ها را در کاهش شدت بیماری *R.solani* در گلخانه به کار برده باشند.

سپاسگزاری

نگارندگان از کمک‌های بی‌دریغ استاد محترم دانشگاه فردوسی مشهد، آقای دکتر حمید روحانی به دلیل ارسال جدایه‌های غیربومی تریکودرما و نیز شناسایی جدایه‌های بومی زنجان و در اختیار قراردادن تجربیات بسیار مفید خود کمال سپاسگزاری را دارند.

منابع

1- Abawi G.S. and Pastor-Corrales M.A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia. 114p.
2- Abd-el-khair H.R., Khalifa K.M. and Karima H.E.H. 2011. Effect of *Trichoderma* species on damping off diseases incidence, some plant enzymes activity and nutritional status of bean plants. Journal of American Science, 7:156 – 167.
3- Ahmad J.S. and Baker R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum.* Journal of Phytopathology, 77: 182-189.
4- Anees M., Tronsmo A., Edel-hermann V., Hjeljord L.G., Heraud C. and Steinberg C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biology, 114: 691-701.
5- Arora D.K., Elander R.P. and Mukerii K.G. 1992. Handbook of applied mycology. Fungal Biotechnology. Vol 4. Marcel Dekker. New York. 1114 p.
6- Bahgat S. and Pan S. 2011. Biological management of root and collar rot *(Rhizoctonia solani)* of Frenchbean *(Phaseolus vulgaris).* Indian Journal of Agricultural Science, 80:42-50.
7- Barakat R.M., Al –Mahareeq F., Ali –Shtayeh M.S. and AL- Masri M.I. 2007. Biological Control of *Rhizoctonia solani* by Indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. Hebron University Research Journal, 3: 1-15.
8- Bazgir A. and Okhovat M. 1996. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the casual agent of damping-off and seed rot of bean by certain isolates of antagonistic fungi. Iranian Journal of Agricultural Science, 27: 89-98. (in Persian with English abstract)
9- Bissett J. 1991. A revision of the genus Trichoderma .II. intragenic classification. Canadian Journal of Botany, 69: 2357-2372.
10- Burgess D.R. and Hepworth, G. 1996. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia minor*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virense*. Plant Pathology, 45: 58.
11- Chet I., Inbar J. and Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, D.T. and Soderstrom, B. (eds.) The Mycota IV. Environmental and microbial relationships**.** Springer. Berlin Heidelberg. New York. 165-185pp.
12- Chet I. and Baker R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology, 70:994-998.
13- Dennis C. and Webester J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* (I.production of non-volatile antibiotics). Transactions of the British Mycological Society, 57:25-39.
14- Elad Y., Chet I. and Katan J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizocionia solani*. Phytopathology, 70:119-121.
15- Elad Y. and Chet I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica, 11**:**55–58.
16- Hadar Y., Chet I. and Henis Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture

of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 69:64-68.
17- Hajiegharari B., Torabi-giglou M., Mohammadi M.R. and Davari M. 2008. Biological potantial of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology, 7: 967-972.
18- Huang X., Chen L., Ran W., Shen Q. and Yang X. 2011. *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism**.** Applied Microbiology and Biotechnology, 91: 741-755.
19- Matloob A.A.H. and Juber K.S. 2013. Biological control of bean root rot disease caused by *Rhizoctonia solani* under green house and field conditions. Agriculture and Biology Journal of North America, 4: 512-519.
20- Mes J.J., Wit R., Testerink C.S., Degroot F., Haring M.A. and Cornelissen B.J.C. 1999. Loss of avirulence and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* Phytopathology, 89: 1131-1137.
21- Mohammadi S., Mansoori B., Zamanizadeh H.R. and Heydari A. 2009. Antagonistic mechanisms of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of chickpea wet root rot disease. Plant Protection Journal 1: 71-85. (In Persian)
22- Nashwa M.A., Sallam K.A., Abo-Elyousr M. and Hassan M.A.E. 2008. Evaluation of *Trichoderma* Species as Biocontrol Agents for Damping-Off and wilt diseases of *Phaseolus vulgaris* L. and efficacy of suggested formula. Phytopathology, 36: 81-93.
23- Naseri B. 2008. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. Australasian Plant Pathology, 37: 546-551.
24- Naseri B. 2012. The effect of *Rhizoctonia* root rot on bean yield. In: Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran.
25- Naseri B. 2013a. Epidemics of *Rhizoctonia* root rot in association with biological and physicochemical properties of field soil in bean crops. 161: 397-404.
26- Naseri B. 2013b. Linkages of Farmers' operations with *Rhizoctonia* root rot spread in bean crops on a regional basis. Journal of Phytopathology, 161: 814-822.
27- Nelson B., Helms T., Christiianson T. and Kural I. 1996. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from soybean. Plant Disease, 80:74-80.
28- Niknejade Kazempour M., Pedramfar H. and Elahinia S.A. 2002. Study on the effect of several fungicides and antagonistic fungi against the causal agent of rice sheath blight, *Rhizoctonia solani*. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 6: 151-157.
29- Papavizas G.C. 1985. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol**.** Annual Review of Phytopathology, 23: 23-54.
30- Parsa M. and Bagheri A. 2008. Legumes. Jihad Daneshgahi Publications, Mashad, 522 p. (in Persian)
31- Rouhani H., Karimi A. and Noparast F. 1991. Effect of several *Trichoderma* isolates in biological control of *Rhizoctonia solani*. Applied Entomology and Phytopathology, 58: 17 – 25. (in Persian)
32- Smolińska U., Kowalska B. and Oskiera M. 2007. The effectivity of *Trichoderma* strains in the protection of cucumber and lettuce against *Rhizoctonia solani.* Vegetable Crops Research Bulletin, 67: 81-93.
33- Sneh B., Burpee L. and Ogoshi A. 1991**.** Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, Minnesota, USA. 133p.
34- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 32:837–845.
35- Weindling R. and Emerson O.H. 1936. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. Phytopathology, 26:1068-1072.