اثر گونه‌های تریکودرما بر رهاسازی زئوسپور *Phytophthora sojae*، شدت بیماری در سویا و سنجش فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز*

EFECT OF *Trichoderma* SPECIES ON ZOOSPORE PRODUCTION OF *Phytophthora sojae*, DISEASE SEVERITY, AND GLUCANASE ENZYMES ACTIVITY ASSAY

نجمه ایوبی[۱]، دوستمراد ظفری[۱]** و منصوره میرابوالفتحی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۶/۲۴)

چکیده

در این بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی ۱۲ گونه قارچ تریکودرما شامل *Trichoderma ceramicum* , *T. virens, T. pseudokoningii* , *T. brevicompactum* , *T.koningii, T. koningiosis, T. atroviridae, T. viridescens, T. asperellum, T. harzianum, T .orientalis.* و *T. spirale* بر تولید زئوسپور *Phytophthora sojae* و میزان فعالیت آنزیم‌های بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکاناز (سلولاز) این گونه‌ها در ارتباط با تجزیه دیواره سلولی فیتوفتورا در شرایط آزمایشگاه آزمایش شده و در نهایت اثر این گونه‌ها بر کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه سویا در گلخانه بررسی شد. جهت بررسی اثر ترکیبات فیلتر شده گونه‌های فوق الذکر بر بازداری از تولید زئوسپور *Phytophthora sojae* غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ این ترکیبات در آب مقطر دیونیزه سترون تهیه شد. میزان فعالیت آنزیم‌های بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکاناز جدایه‌های اخیرالذکر در حضور گلسیرین و هیف فیتوفتورا به عنوان منبع کربن، در محیط کشت ویندینگ، ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ترکیبات فیلتر شده خارج سلولی تمامی گونه‌ها سبب کاهش تولید زئوسپور شدند، غلظت‌های مختلف اثر بازدارندگی متفاوتی داشته و بیشترین بازدارندگی مربوط به *T. virens* و *T. brevicampactom* بود. در بررسی اثر دو منبع کربن در تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک توسط تریکودرما، نتایج نشان داد که کاربرد هیف فیتوفتورا در مقایسه با گلسیرین به عنوان منبع کربن در محیط رشد گونه‌های تریکودرما سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکاناز در تمامی گونه‌ها شد و بیشترین میزان فعالیت هر دو آنزیم مربوط به*T. brevicampactom* و *T. virens* بود که میزان فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز به ترتیب معادل ۲/۳۱ U/mg protein و ۱/۷۳ مربوط به تیمار گلیسرین، ۴/۴۷ U/mg protein و ۳/۹۱ مربوط به تیمار هیف *P . sojae* بود و میزان فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکاناز مربوط به این دو گونه به ترتیب ۰/۶۶ U/mg protein و ۰/۸۶در تیمار حاوی گلیسرین و ۱/۷۲ U/mg protein و ۱/۷۲ در تیمار حاوی میسلیوم فیتوفتورا در محیط کشت بود. جهت بررسی اثر گونه‌های تریکودرما بر شدت بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی طوقه و ریشه سویا در شرایط گلخانه در خاک سترون و در مرحله سه برگی (v_1) در قالب دو طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار شامل شاهد سالم، شاهد آلوده، هر کدام از گونه‌های تریکودرما به علاوه عامل بیماری و سبوس گندم به علاوه عامل بیماری در سه تکرار انجام گرفت. در این بررسی موفق‌ترین گونه‌ها در کنترل بیماری، کاهش شدت بیماری و کاهش درصد مرگ گیاهچه در گلخانه *T. orientalis*، *T. brevicompactum* و *T. spirale* بودند.

واژه‌های کلیدی: *Trichoderma* spp.، *Phytophthora sojae*، آنزیم‌های بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکاناز

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zafari_d@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲. دانشیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

مقدمه

سویا (*Glycin max*) در ایران در استان‌های مازندران، اردبیل، آذربایجان‌غربی، لرستان، آذربایجان شرقي، اصفهان، گلستان و گیلان کشت می‌شود (Agriculture Jehad Ministry 2009) علی‌رغم آب و هوای مساعد برای کشت سویا در استان لرستان، به دلیل عوامل متعددی سطح زیر کشت این گیاه کاهش یافته است که یکی از عوامل محدود کننده کشت در استان لرستان بیماری بوته میری سویا بوده که در اکثر مزارع سویا مشاهده شده است (Mohammadi *et al*. 2007). بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه سویا که توسط *Phytophthora sojae* Kauf. & Gerd. ایجاد می‌شود باعث مرگ گیاهچه قبل و بعد از ظهور آن می‌شود، هم‌چنین در تمام مراحل رشدی گیاه مخصوصا زمانی که آب کافی در اختیار این بیمارگر قرار گیرد باعث پوسیدگی ریشه، مرگ و کاهش عملکرد گیاه تا حدود ۵۰ درصد می‌شود (Xiao *et al*. 2002).

کنترل مؤثر این بیماری بسیار مشکل است، کاشت گیاهان مقاوم روش کنترلی متداول و اصولی این بیماری است (Erwin & Ribeiro 1996) ولی ظهور نژادهای جدید بیمارگر باعث شکسته شدن مقاومت کولتیوارهای سویا می‌شوند (Sadeghi Garmaroodi *et al*. 2007;Mohammadi *et al*. 2007 Giesler & Christensen 2002). روش‌های زراعی مانند زه‌کشی، کاهش فشردگی خاک و تناوب زراعی در مدیریت این بیماری مؤثر است (Schmitthenner 1999). از آنجایی که عامل بیماری به شکل ااوسپور می‌تواند در غیاب میزبان برای مدت زیادی در خاک دوام یابد، از این‌رو تناوب زراعی اثر کنترلی کمی دارد (Schmitthenner & Van Doren 1985). در بهار هرگاه دما مناسب باشد ااسپورها جوانه می‌زنند و تشکیل اسپورانژیوم‌ها و در نهایت، زئوسپورها به تعداد فراوان در خاک‌های غرقاب یا اشباع تولید می‌شوند و به وسیله آب موجود در خاک انتشار یافته و اینوکولوم ثانویه را فراهم می‌سازد (Sinclair 1989).

امروزه یکی از کامل‌ترین روش‌های مدیریت تلفیقی برای کنترل بیماری‌ها استفاده از کنترل بیولوژیک با یک ریز جاندار آنتاگونیست است. از میان عوامل بیولوژیک، قارچ تریکودرما دارای قدرت آنتاگونیستی بالایی است و باعث کنترل بیمارگرهای خاکزاد گیاهی مختلف مانند *Sclerotinia sclerotiorum* (Dos Santos *et al*. 1982)، *Pythium*، (Honeycutt 2001) *Rhizoctonia solani* (Howell 2002) و گونه‌های جنس *Phytophthora* (Smith *et al*. 1990; Khan *et al*. 2004; Ezziyyani *et al*. 2007)) شده‌اند. گونه‌های تریکودرما از مکانیزم‌های آنتاگونیستی مؤثر زیادی، برای بقا و ساکن شدن در محیط رقابتی خود استفاده می‌کنند. این مکانیزم‌ها شامل پدیده آنتی بیوز (Antibiosis)، رقابت برای فضا و مواد غذایی، تولید آنزیم‌های لیزکننده و پارازیتیسم، افزایش رشد گیاه و القای مقاومت می‌باشند (Hraman 2003).

ترکیبات و متابولیت‌های بسیاری از ترشحات مایع خارج سلولی جنس تریکودرما که دارای خاصیت آنتاگونیستی هستند تاکنون جداسازی شده و خصوصیات شیمیایی این ترکیبات نیز مشخص شده است. این ترکیبات شامل آنتی بیوتیک‌ها، توکسین‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی هستند.

آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی که توسط جنس تریکودرما تولید می‌شوند و تحت عنوان CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes) شناخته شده‌اند در طول دهه اخیر مورد توجه زیادی واقع شده‌اند. مفیدترین این آنزیم‌ها، آنزیم‌های گلوکانولیتیک و

کیتینولیتیک می‌باشند زیرا قادر به تجزیه مفید دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر گیاهی هستند و امروزه به عنوان ترکیبات فعال در فرمول قارچکش‌های جدید به کار می‌روند. برای مثال اثر قارچ‌کشی ترکیبات آزولی زمانی که در ترکیب با میزان کمی از اندوکیتینازهای استخراج شده از *T. harzianum* استفاده شدند، بالغ بر ۱۰۰ بار افزایش داشته است. (Monte 2001).

در این تحقیق ابتدا به علت اهمیت زئوسپور *P . sojae* در انتشار بیماری در مزرعه اثر ترشحات مایع خارج سلولی ۱۲ گونه تریکودرما بر میزان تولید زئوسپور فیتوفتورا بررسی شد. سپس از آنجایی که دیواره سلولی بیمارگر، نخستین و مهم‌ترین سد در برابر نفوذ آنتاگونیست است و به علت این‌که اجزای اصلی دیواره سلولی فیتوفتورا شامل بتا ۱ و ۳ گلوکان و سلولز می‌باشد میزان فعالیت آنزیم بتا ۱ و۳ گلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکاناز (سلولاز) در گونه‌های تریکودرما بررسی شد و در نهایت جهت معرفی بهترین گونه تریکودما در کنترل موفق و همه‌جانبه بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی سویا اثر تمامی گونه‌ها در شرایط گلخانه بر بیماری بررسی شد و موفق‌ترین گونه در آزمایشگاه و گلخانه به عنوان عامل بیوکنترل بیماری معرفی شد.

روش بررسی

۱- تهیه جدایه‌های عامل بیماری

در بهار و تابستان سال ۱۳۸۶ از مزارع سویا منطقه الیشتر استان لرستان بازدید شد و از بوته‌های دارای علائم پوسیدگی طوقه و ریشه نمونه‌برداری و نسوج آلوده در محیط PARPH + CMA کشت گردید. پس از خالص‌سازی تعداد ۱۰ جدایه *Phytophthora sojae* حاصل شد. شدت بیماری‌زایی جدایه‌های حاصل و جدایه‌هایی که قبلاً به کمک روش‌های مورفولوژیکی و ملکولی شناسایی شده بودند(Mirabolfathy et al., 2000, 2001)، با روش *زایاو و همکاران* (۲۰۰۲) بر علیه رقم ویلیامز گیاه سویا در شرایط گلخانه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و نهایتاً جدایه دارای بیشترین قدرت بیماریزایی جهت مطالعات بیوکنترلی انتخاب شد.

۲- تهیه جدایه‌های *Trichoderma* spp.

جدایه‌هایی از ۱۲ گونه تریکودرما شامل *T. virens, T. pseudokoningii, T. koningii, T. koningiosis, T. atroviridae, T.ceramicum, T. viridescens, T. asperellum, T. harzianum, T .orientalis T. brevicompactum* و *T. spirale* که قبلاً توسط *نظمی و همکاران* (۲۰۰۶، ۲۰۰۷) به کمک روش‌های مورفولوژیکی و ملکولی شناسایی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت.

۳- آزمون اثر ترشحات خارج سلولی تولید شده در محیط مایع بر تولید زئوسپور

این آزمایش با کمی تغییرات طبق روش *دنیس و وبستر* (Dennis & Webster 1971a) انجام شد. برای تهیه ترشحات مایع خارج سلولی از گونه‌های تریکودرما، تعداد پنج دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه کشت پنج روزه تریکودرما را داخل ارلن‌های حاوی محیط کشت PDB انداخته و در ارلن‌مایر شاهد به جای دیسک قارچ آنتاگونیست پنج دیسک از محیط کشت اضافه گردید. ارلن‌ها در دستگاه شیکر (Shaker) با ۱۰۰ تکان در دقیقه با دمای ۲۵±۱ $^{\circ}$C به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. سپس محتویات ارلن‌ها به طور جداگانه از کاغذ صافی سترون عبور داده شدند تا توده‌های میسلیومی آنها جدا شود، مایع

حاصل با کمک پمپ خلأ از صافی‌های میکروبیولوژیک با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد.

به منظور بررسی اثر عصاره خارج سلولی تولید شده در محیط مایع بر تولید زئوسپور غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ درصد از عصاره در آب مقطر دیونیزه سترون تهیه شد. به منظور تهیه زئوسپور به روش *ای و همکاران* (Eye *et al*. 1978) عمل شد. به این صورت که ابتدا دیسک‌های پنج میلی‌متری از حاشیه کشت یک هفته‌ای *P. sojae* در محیط کشت LBA را در مرکز تشتک حاوی ۱۰میلی‌لیتر محیط کشت half-strength LBA قرار داده و در دمای ۲۵ $^{\circ}$C به مدت چهار روز نگهداری شد، پس از این مدت ، ۱۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های فوق الذکر عصاره به آن افزوده شد و در دمای ۲۱ $^{\circ}$C نگهداری شد، پس از ۱۸ ساعت تعداد زئوسپورهای آزاد شده با استفاده از لام مدرج هموسیتومتر شمارش گردید. در تشتک‌های شاهد تنها آب مقطر دیونیزه سترون ریخته شد. در نهایت با توجه به میزان تولید زئوسپور در تیمار شاهد، میزان درصد کاهش تولید زئوسپور فیتوفتورا از طریق فرمول تفاضل میزان تولید زئوسپور فیتوفتورا در هر غلظت از تفاضل میزان تولید زئوسپور تیمار شاهد تقسیم بر میزان تولید زئوسپور تیمار شاهد ضربدر صد محاسبه شد.

۴- سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکاناز

الف) تهیه عصاره آنزیمی و بستر کشت با منابع کربن متفاوت

گونه‌های تریکودرما در ارلن‌های۲۵۰ml حاوی ۳۰ ml محیط کشت مایع و معدنی Wiendling که توسط *جونز و هنکوک* تغییر یافته (Jones & Hancock 1987) (و شامل : ۰/۵٪ منبع کربنی، ۲ گرم $[NH_4]2SO_4$، ۱ گرم $MgSO_4, 7H_2O$ ، ۰/۵ گرم $KH2PO_4$ ، ۳ میلی‌لیتر از Na-Fe EDTA یک میلی‌مولار در یک لیتر آب) به علاوه‌ی ۰/۵٪ glycerol و یا ۰/۵ ٪ دیواره سلولی فیتوفتورا کشت شده و به مدت ۷ روز با دمای ۲۵ C° در حالت تکان خوردن (Shaking) با سرعت ۱۲۰ rpm نگهداری شدند. بعد از این مدت محیط را با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف کرده و عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ $^{\circ}$C سانتریفوژ گردید. جهت تغلیظ بیشتر آنزیم عصاره حاصل را لیوفیلیزه نموده، سپس به پودر حاصل ۵۰۰ میکرولیتر بافر استات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH ۵ اضافه کرده و جهت بررسی‌های آنزیمی استفاده شد. عصاره حاصل تا زمان استفاده در دمای۲۰ $^{\circ}$C- نگهداری شد.

برای تهیه دیواره سلولی *P. sojae* ، پس از ۱۰ روز رشد آن در محیط مایع سیب‌زمینی- گوجه فرنگی توده میسلیومی حاصل سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد، با کاغذ صافی واتمن شماره یک جمع‌آوری و چندین بار با آب مقطر سترون شسته و با استفاده از هموژنایزر و آب مقطر سترون خرد و یک‌نواخت کردید، سوسپانسیون حاصل سه بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ کردید، بعد از هر بار سانتریفوژ میسلیوم با آب مقطر سترون شسته شد. رسوب نهایی لیوفیلیز شده (El-Katanty *et. al*. 2001) و به عنوان منبع کربن به محیط کشت فوق اضافه شد.

ب) بررسی فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز

بررسی فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز به روش میلر (Miller 1959) با تغییراتی به شرح زیر صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ درصد لامینارین، تهیه شده در بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار

(pH۵) و ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی بود. مخلوط حاصله برای مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب C° ۴۰ نگهداری شد. سپس واکنش با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر معرف دی‌نیترو سالیسیلیک‌اسید (DNS) متوقف شد و برای مدت پنج دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار داده شد. سپس حجم نهایی مخلوط واکنش به وسیله آب مقطر به دو میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Varian Cary 100 Conc) میزان جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گلوکز رسم شد. دستگاه اسپکتروفتومتر برای هر نمونه به وسیله مخلوط واکنش که عصاره آن در حمام آب C°۱۰۰ فعالیتش متوقف شده بود، صفر شد. میزان پروتئین کل نیز به روش *برادفورد* (Bradford 1976) تعیین شد. فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی‌گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه (واحد آنزیم) به ازای میلی‌گرم پروتئین تام موجود در عصاره تعیین شد.

ج) بررسی فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکاناز

بررسی فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکاناز به روش *تونداج و همکاران* (Tondje *et al.* 2007) با تغییراتی صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل ۲۵۰ میکرولیتر محلول یک درصد کربوکسی‌متیل‌سلولز که در بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۵) تهیه شده و ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مخلوط واکنش (۵۰۰ میکرولیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب C ° ۵۰ نگهداری شد و سپس با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر معرف DNS و قرار دادن مخلوط واکنش در آب جوش به مدت پنج دقیقه متوقف شد. سپس حجم مخلوط واکنش با آب مقطر به دو میلی لیتر رسانده شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 100 Conc) جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف گلوکز رسم شد. دستگاه اسپکتروفوتومتر برای هر نمونه به وسیله مخلوط واکنش که عصاره آن در حمام آب C° ۱۰۰درجه سانتی‌گراد فعالیتش متوقف شده بود، صفر شد. میزان پروتئین کل نیز به روش برادفورد تعیین شد. فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی‌گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین تام موجود در عصاره تعیین شد.

۵- اثر گونه‌های تریکودرما روی بیماری پوسیدگی فیتوفترایی طوقه و ریشه سویا در شرایط گلخانه

تعیین اثر گونه‌های تریکودرما بر شدت بیماری پوسیدگی فیتوفترایی طوقه و ریشه سویا و فاکتورهای رویشی گیاه در شرایط گلخانه در خاک سترون و در مرحله اولین برگ سه برگچه‌ای بررسی شد. این آزمون در قالب دو طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار شامل شاهد سالم، شاهد آلوده، هر کدام از گونه‌های تریکودرما به علاوه عامل بیماری و سبوس گندم به علاوه عامل بیماری در سه تکرار انجام گرفت. در این بررسی ابتدا بذرهای ضدعفونی شده سویا در سینی‌هایی به ابعاد ۲۰×۲۰×۴ سانتی‌متری حاوی ورمی‌کولیت مرطوب و پرلیت (به نسبت ۱:۱) کاشته شد و در اتاقک رشد با دمای C° ۲۴±۲ و رطوبت ۷۸٪ و نور ۱۲ ساعت نگهداری شده و بعد از ۴ روز به گلدان‌ها منتقل شدند. در روش اول ابتدا یک سانتی‌متر از عمق گلدان را با ماسه پر کرده و سپس شش سانتی‌متر عمق بعدی را از خاک پاستوریزه‌ای که حاوی ۶ گرم سوسپانسیون میسلیوم *P. sojae* به ازای یک گیلوگرم بود، پر شد، سپس در هر گلدان ۵ گیاهچه سویا کشت شده و پنج روز بعد به هر گلدان سه گرم از مایه تریکودرما که در بستر سبوس گندم

تهیه شده بود اضافه کرده و سطح گلدان با یک لایه ماسه پوشانده شد. در روش دوم ابتدا سه گرم از مایه تریکودرما با خاک مخلوط شد و پنج روز بعد سوسپانسیون میسلیوم *P. sojae* به خاک اضافه شد. فاکتورهای مورد ارزیابی در آزمون گلخانه‌ای شامل ارتفاع بوته از سطح خاک تا نوک بوته در پایان آزمایش، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، درصد مرگ گیاهچه و شدت بیماری بود. به منظور محاسبه شاخص‌های مذکور ۳۰ روز پس از کشت و زمانی که در شاهد آلوده ساقه‌ها تقریباً زرد شده بودند، بوته ها از خاک خارج شده و شدت بیماری با مقیاس صفر تا چهار (Xiao *et al*. 2002) که در آن شاخص صفر برای بوته‌های دارای ریشه سالم و سیستم ریشه‌ای گسترده، شاخص یک برای کاهش انشعابات نسبت به ریشه سالم و وجود لکه‌های نکروز قهوه‌ای روشن و مشخص که اغلب در نوک و یا حاشیه ریشه‌ها دیده می‌شد، شاخص دو برای ریشه‌های جانبی کم و لکه-های نکروز قهوه‌ای تیره و واضح که فقط در یک طرف ریشه‌ها دیده می‌شد، شاخص سه برای ریشه‌های جانبی کم و لکه‌های نکروز قهوه‌ای تیره که در تمام سیستم ریشه و یا تمام اطراف طوقه‌ها دیده می‌شد، شاخص چهار برای گیاهچه مرده، ارزیابی شد.

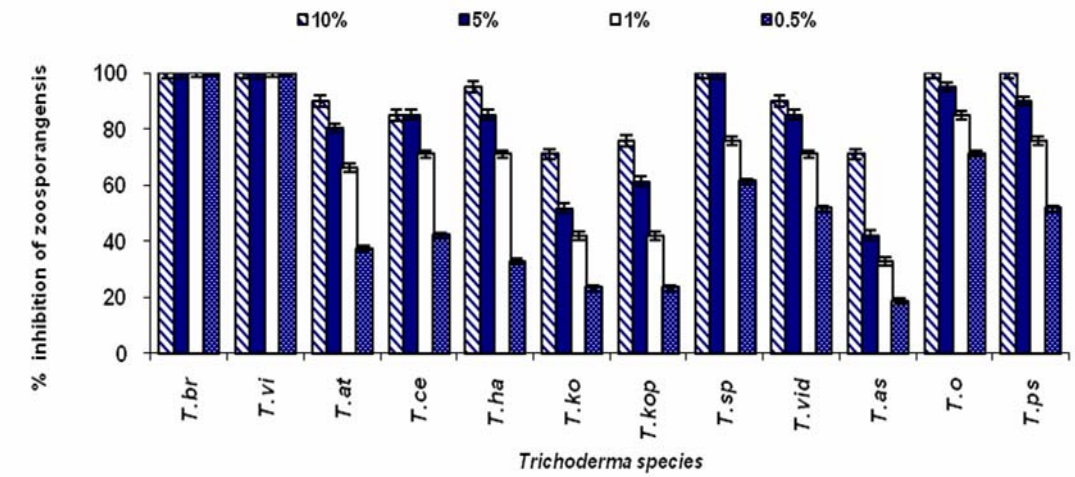
نتایج

نتایج اثر ترشحات خارج سلولی تولید شده در محیط مایع بر تولید زئوسپور

در بررسی میکروسکوپی کشت چهار روزه فیتوفتورا در محیط half-strength LBA اسپورانژیومی دیده نشد که با غوطه‌ور نمودن محیط ظروف پتری شاهد بعد از گذشت سه ساعت اسپورانژیوم شروع به ظهور کرد، در حالی‌که در ظروف پتری‌حاوی ترشحات خارج سلولی همه جدایه‌های تریکودرما بعد از تقریباً پنج الی شش ساعت اسپورانژیوم‌ها با تراکم کمتری ظاهر شدند. نتایج تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی تریکودرما بر تولید زئوسپور نیز، نشان داد که غلظت ۵٪ و ۱۰٪ ترشحات خارج سلولی اکثر جدایه‌های تریکودرما مانع از تولید زئوسپور شده است. بیشترین ممانعت از تولید زئوسپور در همه غلظت‌ها مربوط به *T. virens* و *T. brevicompactum* با ۱۰۰٪ بازداری بوده و کمترین ممانعت مربوط به *T. asperellum* با ۴۱٪ بازداری بود (شکل ۱).

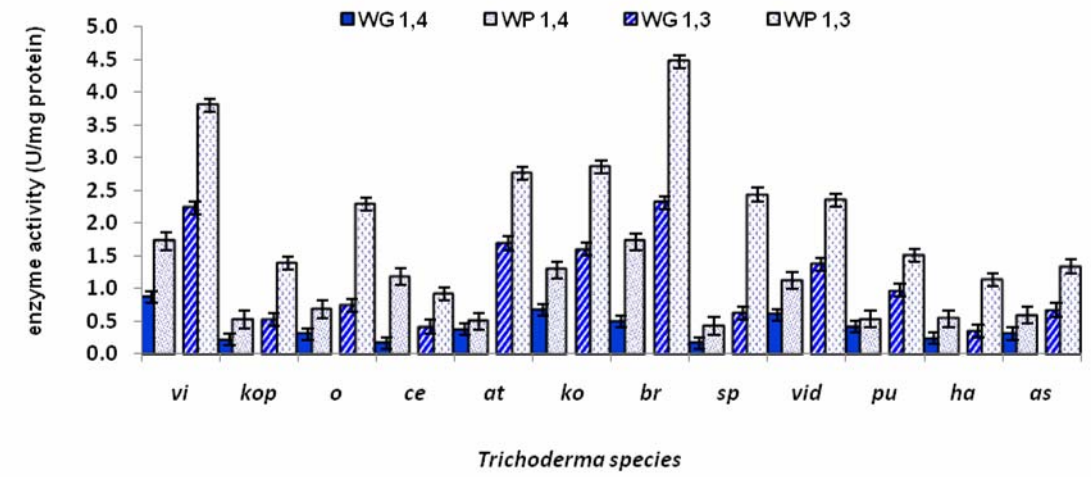
نتایج فعالیت آنزیمی، تریکودرما

فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین کل تعیین شد. فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در همه گونه‌ها به جز *T. ceramicum* بیشتر از فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکاناز بود. فعالیت هر دو آنزیم گونه‌های تریکودرما در شرایط رشد در محیط حاوی هیف اتوکلاو شده فیتوفتورا تقریباً دو برابر محیط حاوی گلسیرین بود و بیشترین میزان فعالیت هر دو آنزیم مربوط به *T. brevicampactom* و *T. virens* بود که میزان فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز به ترتیب معادل U/mg protein ۲/۳۱ و ۲/۲۳ مربوط به تیمار گلیسرین، U/mg protein ۴/۴۷ و ۳/۹۱ مربوط به تیمار هیف P . sojae بود و میزان فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکاناز مربوط به این دو گونه به ترتیب U/mg protein ۰/۶۶ و ۰/۸۶در تیمار حاوی گلیسرین و U/mg protein ۱/۷۲ و ۱/۷۲ در تیمار حاوی میسلیوم فیتوفتورا در محیط کشت بود (جدول ۱ و شکل ۲).



شکل۱. مقایسه میانگین اثر بازدارندگی غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰، در صد ترشحات مایع فیلتر شده گونه‌های تریکودرما بر تولید زئوسپور *Phytophthora sojae* ، در آب مقطر دیونیزه در شرایط آزمایشگاه

Fig. 1. Mean comparison of inhibitory effect at .5%,5%,1% and 40% concentrations of *Trichoderma* species liquid culture filtrates on mycelial growth of P. sojae, in deionized distilled water, in vitro
abbreviation of *Trichoderma* species in this experiment showed as : *T. virens* (T. vi), *T. orientalis*(T. o), *T . ceramicum* (T. ce), *T. atroviride* (T. at), *T. koningii* (T. ko), *T. brevicompactum* (T. br), *T. spirale* (T. sp), *T. viridescens* (T. vid), *T. pseudokoningii* (T. pu), *T. harzianum* (T. ha), *T. asperellum* (T. as)



شکل۲. مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی، گونه‌های تریکودرما (واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین یا U/mg protein) در محیط حاوی هیف اتوکلاو شده(WP) و محیط حاوی گلیسیرین(WG) .

Fig. 2. Mean comparison of *Trichoderma* species enzyme assay (released glucose milligram in minute in milligram protein or U/mg protein) in medium plus autoclaved hyphae (WP) and medium plus glycerol (WG)
abbreviation of *Trichoderma* species in this experiment: showed as *T. virens* (vi), *T. orientalis*(o), *T . ceramicum* (ce), *T. atroviride* (at), *T. koningii* (ko), *T. brevicompactum* (br), *T. spirale* (sp), *T. viridescens* (vid), *T. pseudokoningii* (pu), *T. harzianum* (ha), *T. asperellum* (as)

جدول ۱. مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی، تریکودرما (U/mg protein). در محیط‌های متفاوت

Table 1. Mean comparison of enzyme activities from *Trichoderma* species grown on various media

β-1,3-glucanase		β-1,4-glucanase		Enzyme / *Trichoderma* species
WP	WG	WP	WG	
۳/۹۷± ۰/۰۶^{a}	۱/۷۳± ۰/۰۷^{a}	۱/۷۲± ۰/۰۸ ^{a}	۰/۸۶± ۰/۰۲^{a}	*T. virens*
۲/۲۷± ۰/۰۵^{bc}	۰/۷۳± ۰/۰۴^{dc}	۰/۶۸± ۰/۰۳^{d}	۰/۳± ۰/۰۱^{ab}	*T. orientalis*
۰/۹۱± ۰/۰۵^{d}	۰/۴۱± ۰/۰۳^{fg}	۱/۱۸± ۰/۰۷^{c}	۰/۱۶± ۰/۰۰۸^{d}	*T . ceramicum*
۲/۷۶± ۰/۰۵^{b}	۱/۶۹± ۰/۰۵^{b}	۰/۵± ۰/۰۲ ^{fg}	۰/۳۷± ۰/۰۱^{ab}	*T. atroviride*
۲/۸۵± ۰/۰۶^{b}	۱/۵۹± ۰/۰۵^{bc}	۱/۲۸± ۰/۰۴^{b}	۰/ ۴۹± ۰/۰۱^{abcd}	*T. koningii*
۴/۴۷± ۰/۰۷^{a}	۲/۳۱± ۰/۰۵^{a}	۱/۷۲± ۰/۰۳^{a}	۰/۶۶± ۰/۰۳^{ab}	*T.brevicompactum*
۲/۴۴± ۰/۰۵^{b}	۰/۶۱± ۰/۰۳^{efg}	۰/۴۲ ± ۰/۰۲ ^{g}	۰/۱۶± ۰/۰۰۷^{cd}	*T. spirale*
۲/۳۴± ۰/۰۶^{b}	۱/۳۶± ۰/۰۳^{c}	۱/ ۱۲± ۰/۰۳^{c}	۰/۶± ۰/۰۳^{ab}	*T. viridescens*
۱/۵۱± ۰/۰۵^{dc}	۰/۹± ۰/۰۳^{d}	۰/۵۳± ۰/۰۲^{ef}	۰/۴۱± ۰/۰۲۴^{abc}	*T. pseudokoningii*
۱/۱۳± ۰/۰۴^{d}	۰/۳۵± ۰/۰۲^{g}	۰/۵۴± ۰/۰۱^{ef}	۰/۲۳± ۰/۰۰۷^{bcd}	*T. harzianum*
۱/۳۴± ۰/۰۸^{d}	۰/۶۷± ۰/۰۲^{ef}	۰/۵۸± ۰/۰۱^{e}	۰/۳± ۰/۰۱^{bcd}	*T. asperellum*
۱/۳۹± ۰/۰۸^{d}	۰/۵۳± ۰/۰۳^{efg}	۰/۵۲± ۰/۰۲^{ef}	۰/۲۱± ۰/۰۰۵^{bcd}	*T. koningiopsis*

*** : گونه‌های تریکودرما در محیط کشت مایع و معدنی Wiendling که توسط جونز و هنکوک تغییر یافته، به علاوه ۰/۵٪ glycerol (WG) و یا ۰/۵ ٪ دیواره سلولی فیتوفتورا(WP) کشت شدند. اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف کُسان نشان داده شده‌اند، در آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (P≤ ۰/۵) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.**

***: *Trichoderma* species were grown in Wiendling's minimal salts (Jones and Hancock, 1987) plus 0.5% (v/v) glycerol (W G), Wiendling's minimal salts plus %0.5 (w/v) hyphae of *Phytophthora sojae* (W P). values are average of 3 replicates. Means with the same letter in each column are not significantly different at least significant difference(P≤ 0.5)**

نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای

افزودن زادمایه *P. sojae* قبل از گونه‌های تریکودرما باعث افزایش معنی‌دار تعداد گیاهچه زنده نسبت به شاهد آلوده پس از ۳۰ روز شد (شکل۳)، هم‌چنین در این حالت شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده کاهش یافت (شکل ۴) و در بررسی فاکتورهای رویشی از قبیل وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، طول ریشه، وزن تر اندام هوایی و طول اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری داشته و وجود تریکودرما در خاک باعث افزایش این فاکتورها در تمامی تیمارها شد (جدول ۳ و ۴).موفق‌ترین گونه در کاهش مرگ گیاهچه و شدت بیماری، گونه *T. brevicampactom* و در افزایش فاکتورهای رویشی گونه‌های *T. orientalis* ، *T.brevicompactum* و *T. spirale* شناخته شد.

جدول ۲. تجزیه واریانس برای تاثیرگونه‌های تریکودرما بر شدت بیماری *P. sojae* و فاکتورهای رویشی در گلخانه

Table 2. analysis of variance for the effect of *Trichoderma* species on *P. sojae* disease severity and growing factors in vivo

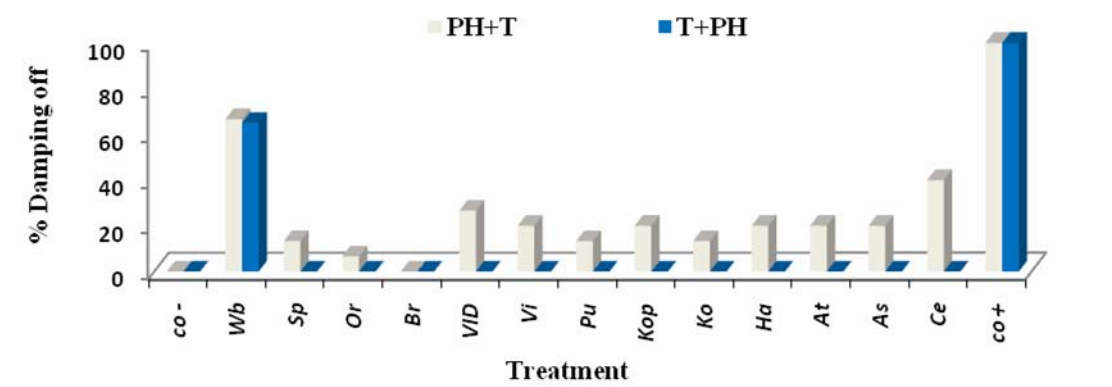
Disease severity	Shoot height	Shoot fresh weight	Root dry weight	Root length	Root fresh weight	Degree of freedom	Source of variation
۹۰۷/۰۷*	۱۰۱۰/۷۵*	۱۱/۰۳*	۱۰۱۰/۱۲*	۷۸/۷۹*	۰/۳۵*	۱۴	Treatment
۷۹۱۰۸/۱۹*	۱۹۵۰/۹*	۳۷/۱*	۱۹۴۱/۸*	۱۳۸/۳۴*	۱/۳۸*	۱	Ph +T and T+Ph methods
۶۱۵/۱۸*	۱۱۶/۷۳*	۱/۰۰۳*	۱۱۵/۵۶*	۶/۶*	۰/۰۴*	۱۴	Interact of Ph +T * T+Ph
۵۰/۱۳	۹/۰۵۲	۰/۰۵۷	۹/۴۳	۰/۵۴	۰/۰۰۱	۶۰	Error
						۸۹	Total

ضریب تغییرات (CV) برای وزن تر ریشه ۷/۹۴ ، طول ریشه ۶/۶۸، وزن خشک ریشه ۴/۵،وزن اندام هوایی ۵/۴، طول اندام هوایی ۴/۷ و شدت بیماری ۱۵ می‌باشد.

*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد

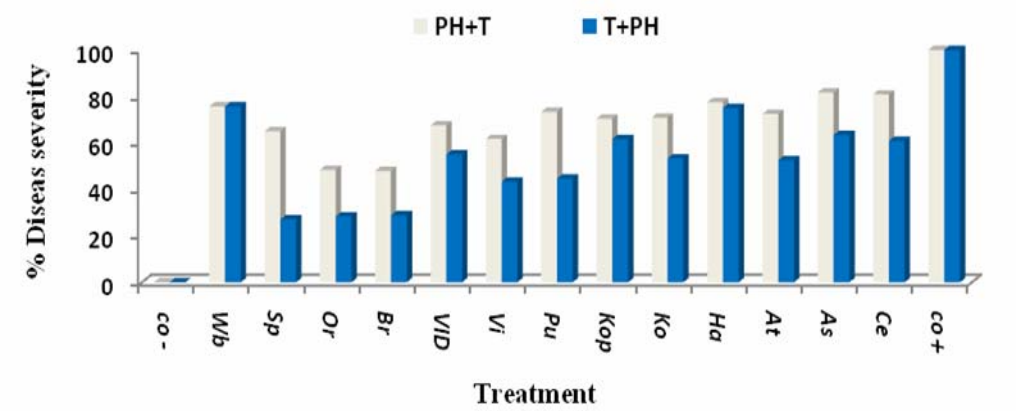
Coefficient of variation (C.V.) is 7.49 for Root fresh weight, 6.68 Root length,4.5 Root dry weight, 5.4 Shoot fresh weight, 4.7 Shoot height and 15 for Disease severity

*: significant at 5% level



شکل ۳. اثر گونه های تریکودرما روی مرگ گیاهچه با افزودن زادمایه فیتوفتورا پنج روز قبل از تریکودرما به خاک(PH+T) و پنج روز بعد از تریکودرما به خاک (T+PH)همراه با شاهد بدون فیتوفتورا (co-)، شاهد آلوده بدون تریکودرما (co+) و Wb شاهد سبوس گندم به علاوه عامل بیماری در شرایط گلخانه

Fig. 3. Effect of *Trichoderma* species on damping off for *Phytophthora* inoculum were introduced to soil five days before the *Trichoderma* inoculation (PH+T) and five days after the Trichoderma inoculation (T+PH) mid control without *P. sojae* (co-) , infected control without *Trichoderma* (co+) and wheat bran control with pathogen (Wb), in vitro



شکل ۴. اثر گونه‌های تریکودرما بر شدت بیماری با افزودن زادمایه فیتوفتورا پنج روز قبل از تریکودرما به خاک(PH+T) و پنج روز بعد از تریکودرما به خاک(T+PH) همراه با شاهد بدون فیتوفتورا (- co) و شاهد آلوده بدون تریکودرما (+ co) و Wb شاهد سبوس گندم به علاوه عامل بیماری در شرایط گلخانه

Fig. 4. effect of Trichoderma species on disease severity for Phytophthora inoculum were introduced to soil five days before the Trichoderma inoculation (PH+T) and five days after the *Trichoderma* inoculation (T+PH) mid control without *P. sojae* (co-) and infected control without Trichoderma (co+) and wheat bran control with pathogen (Wb), in vitro

*: اعداد به کار رفته در نمودار ۳ و ۴ میانگین سه تکرار هستند.

***: values in fig.3, 4 are average of 3 replicates.**

abbreviation of *Trichoderma* species in this experiment: showed as: *T. virens* (vi), *T. orientalis*(o), *T . ceramicum* (ce), *T. atroviride* (at), *T. koningii* (ko), *T. brevicompactum* (br), *T. spirale* (sp), *T. viridescens* (vid), *T. pseudokoningii* (pu), *T. harzianum* (ha), *T. asperellum* (as)

در آزمون افزودن تریکودرما پنج روز قبل از زادمایه P. sojae به خاک، مرگ گیاهچه در هیچ کدام از تیمارهای گونه های تریکودرما دیده نشد (شکل۳)، شدت بیماری نیز نسبت به شاهد آلوده کاهش یافته(شکل ۴) و فاکتورهای رویشی هم در این حالت افزایش یافته و حتی در برخی از تیمارها نسبت به شاهد سالم، افزایش نشان داد (جدول ۳ و ۴) موفق‌ترین گونه‌ها در کنترل بیماری و کاهش شدت بیماری و افزایش فاکتورهای رویشی *T. orientalis* ، *T.brevicompactum* و *T. spirale* بودند. این آزمون نسبت به آزمون اول مؤثرتر واقع شده و تفاوت بین دو روش در آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح ۰/۵ ≥P معنی‌دار بود (جدول ۲).

بحث

موفق‌ترین گونه‌ها در تولید ترشحات مایع خارج سلولی جهت کاهش تولید زئوسپور در این بررسی *T. virens* ، *T. brevicampactom* بودند که بر اساس تحقیقات نیلسن و همکاران گونه *T. brevicampactom* پس از رشد روی محیط کشت مایع و جامد تولید تریکوتسین و هارزیانوم‌آ می‌کنند که در محیط کشت مایع میزان آن بیشتر است. بر اساس مطالعات چت و همکاران (Chet *et al.* 1997) موتانت‌هایی از *T. virens* که میزان زیادی گلایوویرین تولید می‌کنند، گیاهچه‌های پنبه را از *P. ultimum* (عامل مرگ گیاهچه) حفاظت می‌کنند.

طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های هسته‌دار (یوکاریوتی) و پیش هسته‌ای (پروکاریوتی) زمانی که در

جدول۳. مقایسه میانگین اثر جدایه‌های تریکودرما (T) روی بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی سویا (Ph) در شرایط گلخانه‌ای (شاخص‌های رویشی ریشه)

Table 3. Mean comparison of *Trichoderma* (T) isolates on soybean *Phytophthora* (Ph) rot *in vivo* (root growing factors

	Shoot fresh weight		Shoot height		Disease severity	
Treatment	Ph+T	T+Ph	Ph+T	T+Ph	Ph+T	T+Ph
T. asperellum	۳/۴۲^{cd}	۵/۴^{de}	۵۸/۹۳^{def}	۷۸/۶^{cd}	۸۱/۶۶^{abc}	۶۳/۳bcd
T. ceramicum	۲/۹۳^{def}	۴/۲۶^{gf}	۵۵/۷۵^{fe}	۷۲/۹^{fe}	۸۰/۸۳^{abc}	۶۰/۸۳bcd
T. harzianum	۳/۰۴^{cdef}	۳/۸^{hi}	۵۹/۶۳^{def}	۶۷/۹^{gf}	۷۷/۵^{bc}	۷۵ab
T. orientalis	۴/۳۹^{b}	۶/۵^{ab}	۷۹/۹۸^{a}	۸۶/۳^{b}	۴۸/۳^{d}	۲۸/۳ef
T. koningi	۳/۱۸^{cdef}	۴^{hi}	۶۲/۹۱^{de}	۶۳/۳^{gh}	۷۰/۸^{bc}	۵۳/۳bcdef
T. atroviride	۳/۴۳^{c}	۶/۰۷^{c}	۵۷/۹۱^{def}	۸۲/۲^{c}	۷۲/۵^{bc}	۵۲/۵bcdef
T. koningiopsis	۳/۵۲^{c}	۴/۶۲^{fg}	۶۳^{de}	۶۲/۵^{hi}	۷۲/۱^{bc}	۷۰/۴۲bc
T. virens	۳/۳۳^{cde}	۳/۵^{i}	۵۹/۹۱^{def}	۶۶/۳^{hg}	۶۱/۶^{dc}	۴۳/۳cdef
T. brevicompactum	۴/۴^{b}	۶/۲^{abc}	۷۱/۳۳^{bc}	۷۹/۷۶^{cd}	۴۷/۹^{d}	۴۰/۸def
T. viridescens	۴^{b}	۵۷/۸۷^{dc}	۶۵/۲۶^{cd}	۷۴^{de}	۶۷/۵^{bcd}	۵۵bcde
T. pseudokoningii	۳/۱۴^{cdef}	۵/۱۲^{ef}	۶۰/۱^{def}	۷۹/۳^{cd}	۷۳/۳^{bc}	۴۴/۵cdef
T. spirale	۴/۱^{b}	۶/۷^{a}	۵۷/۳۸^{ab}	۹۶/۴^{a}	۶۵^{bcd}	۲۷/۰۸fg
Co +	۶/۵۹^{a}	۶/۵^{ab}	۵۷/۰۶^{ef}	۵۷/۱۶^{ij}	۰^{e}	۰g
Co -	۰/۵۲^{g}	۰/۵۲^{k}	۳۰/۶۶^{g}	۳۰/۶^{k}	۱۰۰^{a}	۱۰۰a
Wb	۲/۸۴^{ef}	۲/۸^{j}	۵۳^{f}	۵۳^{j}	۷۵/۶^{bc}	۷۵ab

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، در آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار ($P \leq ۰/۵$) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values of table are average of three replicates. Means with the same letter in each column are not significantly different at least significant difference ($P \leq 0.5$).

محیط کشت آنها کیتین و یا دیواره سلولی قارچی موجود باشد پتانسیل تولید بالای آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی را دارند. فعالیت مستقیم میکوپارازیتی گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما به عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌های آنها برای فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ‌های پاتوژن گیاهی است. تریکودرما به وسیله ساختارهای قلاب مانند، اپرسوریوم و یا پیچیدن، به هیف میزبان متصل می‌شوند و به وسیله ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند گلوکاناز، کیتیناز و پروتئاز به دیواره سلولی میزبان نفوذ می‌کنند (Viterbo *et al*. 2002)

تولید آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، سلولاز، کیتیناز و پروتئاز به طور معنی‌داری زمانی‌که تریکودرما در محیط کشت هیف اتوکلاو شده یا دیواره سلولی قارچ میزبان رشد کرده است، افزایش یافته است. این مشاهدات با این حقیقت که کیتین، بتا ۱ و ۳ گلوکان، سلولز و پروتئین از ترکیبات ساختمانی مهم دیواره سلولی اکثر قارچ‌ها

جدول۴. مقایسه میانگین اثر جدایه‌های تریکودرما (T) روی شدت بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی و فاکتورهای رویشی هوایی در شرایط گلخانه‌ای

Table 4. Mean comparison of *Trichoderma* (T) isolates on disease severity of Phytophthora rot disease and aerial growing factors, in vivo

Treatment	Root fresh weight		Root dry weight		Root length	
	Ph+T	T+Ph	Ph+T	T+Ph	T+Ph	Ph+T
T. asperellum	۰/۳ ^{fg}	۰/۶۹^{de}	۰/۰۸^{ef}	۰/۱۷^{dc}	۸/۲۵^{def}	۱۴/۵^{bc}
T. ceramicum	۰/۲۵ ^{h}	۰/۴۲^{h}	۰/۰۷^{gh}	۰/۱^{g}	۷/۶^{fe}	۱۱/۷۶^{def}
T. harzianum	۰/۲۴^{h}	۰/۶۶^{ef}	۰/۰۵۷ ^{i}	۰/۱۶^{d}	۷/۵۶^{fe}	۱۰/۴^{f}
T. orientalis	۰/۴۳^{d}	۰/۸۵^{d}	۰/۱ ^{d}	۰/۲^{c}	۱۲/۶۶^{bc}	۱۵/۷۶^{ab}
T. koningi	۰/۲^{h}	۰/۴۸^{gh}	۰/۰۵۳^{i}	۰/۱۲^{f}	۹^{ed}	۱۲/۴^{ed}
T. atroviride	۰/۳۲^{fe}	۰/۵۵^{fg}	۰/۰۷۲ ^{g}	۰/۱۳^{fe}	۹/۵۱^{d}	۱۲/۷^{d}
T. koningiopsis	۰/۳۴^{e}	۰/۵۳^{gh}	۰/۰۸۷^{ef}	۰/۱۳^{fe}	۹/۱۶^{ed}	۱۰/۹^{ef}
T. virens	۰/۴^{d}	۰/۵۲^{gh}	۰/۰۹۶^{de}	۰/۱۱^{fe}	۸/۹۱^{edf}	۱۰/۵^{f}
T. brevicompactum	۰/۵۳^{d}	۰/۹۶^{bc}	۰/۱۱^{c}	۰/۲۵^{b}	۱۱/۵۸^{c}	۱۵/۶۶^{abc}
T. viridescens	۰/۳^{fe}	۰/۵۴^{gh}	۰/۰۷۱^{gh}	۰/۱۳^{ef}	۹/۱۳^{ed}	۱۲/۵۳^{de}
T. pseudokoningii	۰/۲۳^{h}	۰/۷۴^{d}	۰/۰۵۹^{i}	۰/۲۵^{b}	۷/۳۳^{f}	۱۴/۴^{c}
T. spirale	۰/۸۴^{b}	۰/۹۸^{b}	۰/۲۲^{b}	۰/۳۱^{a}	۱۴/۰۸^{b}	۱۶/۰۸^{ab}
Co +	۱/۱۶^{a}	۱/۱۳^{a}	۰/۳۱^{a}	۰/۳۱^{a}	۱۷/۰۸^{a}	۱۷/۰۸^{a}
Co -	۰/۰۹^{i}	۰/۰۸۸^{j}	۰/۰۲۱^{j}	۰/۰۲^{i}	۳/۴^{g}	۳/۴۶^{g}
Wb	۰/۲۵^{h}	۰/۲۸^{i}	۰/۰۶۱^{hi}	۰/۰۶^{h}	۴/۱۶^{g}	۴/۱۳^{g}

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند .میانگین‌هایی که در هر ستون با حروف یکسان نشان داده شده اند، در آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0.5$) با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values of table are average of 3 replicates. Means with the same letter in each column are not significantly different at least significant difference ($P \leq 0.5$).

هستند، اساسی برای این پیشنهاد است که آنزیم‌های هیدرولیتیک تولید شده به وسیله تریکودرما نقش مهمی در تخریب بیمارگرهای گیاهی بازی می‌کنند (El-Katanty *et al*. 2001).

در بررسی میزان غعالیت آنزیم در این تحقیق گونه‌های تریکودرما کشت شده در محیط مایع معدنی، به مدت هفت روز درحالت تکان خوردن نگه‌داری شدند که بر اساس نتایج *ون و همکاران* (۲۰۰۵) و *زالدیوار و همکاران* (۲۰۰۱) میزان تولید آنزیم در تریکودرما در پنج روز اول کشت افزایش یافته و در روزهای پنجم تا هشتم به حداکثر میزان خود می‌رسد و پس از آن به تدریج کاهش می‌یابد (El-Katanty *et al*. 2001).

در سنجش فعالیت آنزیمی زمانی که میسلیوم فیتوفتورا به محیط کشت اضافه شد میزان فعالیت آنزیمی بیشتر شده که با نتایج *تونـدج و همکـاران* که میسلیوم *P. capsici*، *P. citrophthora* و *P. palmivora* را به محیط کشت *T. asperellum* اضافه کرده بود و باعث پنج برابر شدن فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و کربوکسی‌متیل‌سلولاز

شده بود، مطابقت دارد. در نتایج *تونداج و همکاران* میزان فعالیت آنزیم کربوکسی‌متیل‌سلولاز بیشتر از بتا ۱ و ۳ گلوکاناز بوده ولی در این بررسی فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در همه گونه‌ها به جز *T. ceramicum* بیشتر از فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ گلوکاناز بوده است.

بررسی‌های آزمایشگاهی روش خوبی برای شناسایی مقدماتی میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست محسوب می‌شود، ولی بر اساس نتایج آزمایشگاه نمی‌توان مفید بودن یک آنتاگونیست را تعیین کرد، زیرا در آزمایشگاه عموماً اثر آنتاگونیست مستقیماً در تقابل با عامل بیماری روی یک محیط کشت غذایی بررسی می شود در حالی‌که اثر میکروارگانیسم‌ها در محیط طبیعی تحت تأثیر عوامل زیادی نظیر دما، اسیدیته، رطوبت، بافت خاک و رفتار سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. مثلاً ممکن است یک جدایه در آزمایشگاه اثر قوی بر عامل بیماری داشته باشد اما در محیط طبیعی و در رقابت با سایر آنتاگونیست‌ها نتواند موفق ظاهر شود، به همین علت تمامی گونه‌های مورد آزمون در آزمایشگاه، در شرایط گلخانه بررسی شدند. *هدر و همکاران* (Hadar *et al*. 1978) نشان دادند که استقرار و تکثیر تریکودرما در خاک بستگی به کاربرد آن دارد و هنگامی که روی سبوس گندم سترون تکثیر شود و سپس به خاک اضافه شود تا یک میلیون برابر تکثیر می‌شود و استقرار و پایداری آن از زمان کاربرد در خاک ۹ تا ۳۶ هفته به طول می انجامد. به نظر می‌رسد این روش یکی از بهترین روش‌های کاربرد تریکودرما می‌باشد. با توجه به این مطلب جدایه‌های تریکودرما با این روش به گلدان‌های آزمایشی اضافه شدند. در آزمون گلخانه‌ای زمانی که مایه زنی عامل بیماری زودتر از تریکودرما صورت گرفت، بیمارگر فرصت استقرار روی گیاهچه را داشته،و در این حالت تنها گونه *T. brevicompactum* باعث کنترل بیماری و مانع مرگ گیاهچه شد ولی دیگر گونه‌های تریکودرما نتوانستند صد درصد مانع از مرگ گیاهچه شوند ولی شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده تا اندازه‌ای کاهش یافت، در حالی که با مایه‌زنی تریکودرما زودتر از قارچ عامل بیماری تریکودرما فرصت استقرار و تسخیر فراریشه را یافته و زمانی که عامل بیماری اضافه شد به علت تسخیر فضای اطراف ریشه گیاه توسط تریکودرما، بیمارگر تنها قادر به استقرار روی ریشه های فرعی شده و مرگ گیاهچه به صفر رسیده و شدت بیماری نیز کاهش یافت ، این نتایج با تحقیقات *هدر و همکاران* (Hadar *et al*. 1978) که قارچ *Rhizoctonia solani* را با استفاده از *T. harzianum* کنترل نمودند مطابقت دارد.

در یک دید کلی می‌توان گفت که *T. brevicompactum* که در مطالعات آزمایشگاهی به عنوان گونه موفق شناخته شده بود در بررس‌های گلخانه‌ای توانست از شدت بیماری کاسته و باعث افزایش فاکتورهای رویشی گیاه شود و می‌توان آن را به عنوان بهترین گونه جهت کنترل این بیماری معرفی نمود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (59-57) متن انگلیسی مراجعه شود.