کنترل بیولوژیک بیماری بلاست برنج با استفاده از جدایه‌های بومی *Trichoderma* در استان مازندران

لاله جوادی[۱]، شهرام نعیمی[۲]، سعید رضائی[۱]، وحید خسروی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری شناسی گیاهی، تهران،

۲- مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، آزمایشگاه تحقیقات کنترل بیولوژیک آمل.

۳- معاونت مؤسسه‌ی تحقیقات برنج کشور در مازندران، آمل

مسئول مکاتبات: شهرام نعیمی، پست الکترونیکی: shnaeimi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۴/۲ ۲(۱) ۱-۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۵

چکیده

بیماری بلاست (Blast) با عامل *Magnaporthe oryzae* مهم‌ترین بیماری برنج در جهان می‌باشد. استفاده از سموم شیمیایی اگر چه باعث کنترل بیماری می‌گردند، اما آسیب‌های جدی متوجه انسان و محیط زیست می‌کنند. امروزه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی به‌عنوان یک روش جایگزین و بی‌خطر، مورد توجه و تأکید ویژه‌ای قرار گرفته است. در این تحقیق، نمونه‌برداری از خاک شالیزار و اندام‌های هوایی برنج در مناطق مختلف استان مازندران انجام شد و جدایه‌های *Trichoderma* با استفاده از محیط کشت انتخابی McFadden & Sutton's RB-S-F جداسازی و خالص شدند. ۸۹ جدایه تریکودرما با روش‌های مختلف آزمایشگاهی علیه *M. oryzae* غربال شدند. در روش کشت متقابل، بیش از ۹۰٪ جدایه‌های تریکودرما، موجب بازدارندگی رشد پرگنه‌ی قارچ بیمارگر گردیدند. نتایج آزمایش هیپرپارازیتیسم نشان داد که هیف‌های تریکودرما به دور هیف‌های قارچ بیمارگر هیچ پیچشی نداشتند اما در بعضی موارد، جدا شدن هیف‌های بیمارگر از محل دیواره‌ی عرضی مشاهده شد. در بررسی تأثیر متابولیت‌های فرار، جدایه‌های تریکودرمای RP3-4 و RP3-2 بیشترین کاهش رشد بیمارگر را به‌میزان ۶۶/۶٪ سبب شدند. عصاره‌ی کشت جدایه‌ی RP7-1 در نسبت ۲۰٪ تا ۹۳/۷۴٪ و در نسبت ۵٪ تا ۹۰/۶۲٪ باعث کاهش رشد بیمارگر شد. براساس نتایج مطالعات آزمایشگاهی، تعداد ۱۶ جدایه تریکودرما برای بررسی اثر آن‌ها در کنترل بیماری بلاست در گلخانه انتخاب شدند. مطابق نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های RP1-6 و RP4-2 به‌ترتیب با ۱۰۰٪ و ۹۹٪ کنترل بیماری، مؤثرترین جدایه‌های تریکودرما در کاهش شدت بیماری بلاست بودند. پس از این جدایه‌ها، *T. harzianum* RP6-1 و *T. virens* RS7-6 به‌ترتیب با ۹۸٪ و ۹۷٪ درصد کاهش بیماری با قارچ‌کش شیمیایی (کارپروپامید) در یک گروه آماری قرار گرفتند. براساس نتایج ارزیابی جمعیت جدایه‌های مختلف تریکودرما در پایان بررسی گلخانه‌ای، میزان جمعیت جدایه‌ها نسبت‌به جمعیّت اولیه متغیر بوده است. جدایه‌های *T. harzianum* RP1-6 و *T. atroviride* RS4-1، به‌ترتیب بیش‌ترین افزایش و کاهش جمعیّت را نسبت به جمعیّت اولیه به‌کار رفته در گلخانه نشان دادند. ارتباطی بین دینامیک جمعیّت و کنترل بیماری مشاهده نگردید. همچنین، نتایج شناسایی ۱۶ جدایه‌ی تریکودرمای انتخابی با روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی نشان داد که ۱۴، ۱ و ۱ جدایه به‌ترتیب متعلق به گونه‌های *T. harzianum*، *T. virens* و *T. atroviride* بودند.

واژه‌های کلیدی: بیوکنترل، برنج، فیلوسفر، گلخانه و *Magnaporthe oryzae*

مقدمه

برنج به‌عنوان یک ماده غذایی مهم، منبع اصلی کالری برای جمعیّت زیادی از مردم دنیا به‌خصوص در آسیا محسوب می‌شود (Webster & Gunnell, 1992). استان مازندران با بیشترین سطح زیر کشت برنج، یکی از قطب‌های اصلی تولید این محصول در کشور به‌شمار می‌رود. عوامل مختلفی باعث کاهش تولید برنج می‌شوند و بیماری‌های گیاهی یکی از اصلی‌ترین دلایل کاهش کمی و کیفی این محصول به‌حساب می‌آیند. در این میان، بیماری بلاست (Blast) با عامل *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch

(آنامورف: *Pyricularia oryzae* Cavara) عموماً به‌واسطه‌ی گسترش در سطح وسیع و مخرب بودن آن تحت شرایط مطلوب، بیماری اصلی برنج می‌باشد که باعث کاهش عملکرد تا ۶۵٪ در ارقام حساس برنج می‌شود (Singh *et al*., 2012). در ایران هم بلاست برنج مهم‌ترین بیماری این محصول محسوب می‌شود و تحت شرایط مطلوب برای بیمارگر و توسعه‌ی بیماری، خسارت قابل توجهی را در ارقام محلی برنج (تا ۹۰٪) ایجاد می‌نماید (Padasht & Izadyar, 2007). گیاه برنج در همه‌ی مراحل رشد در معرض بیماری بلاست قرار دارد که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود. استفاده از سموم شیمیایی رایج‌ترین روش کنترل این بیماری است که باعث ایجاد مشکلات زیست محیطی، بروز ارقام مقاوم و تهدید سلامتی انسان می‌گردد. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌ها می‌تواند یک روش جایگزین امیدبخش برای سموم شیمیایی باشد (Cook & Baker, 1983; Herrer-Estrella & Chet, 1998; Benitez *et al*., 1998, 2004). تریکودرما مشهورترین و مؤثرترین جنس قارچی در زمینه‌ی کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی است (Harman *et al*., 2004) که با مکانیسم‌های متنوعی مانند رقابت ساپروفیتی، آنتی بیوز و مایکوپارازیتیسم عمل می‌کنند. این جنس قارچی، همچنین موجب مقاومت القایی و افزایش رشد گیاهان و پالایش زیستی (bioremediation) خاک می‌گردد (Brunner *et al*., 2005; Harman, 2006; Singh *et al*., 2007).

Ouazzani *et al*., (1998) گزارش کردند که تلقیح هم‌زمان برنج با قارچ عامل بلاست و جدایه‌های مختلف تریکودرما موجب کاهش علائم بیماری به‌میزان ۷۱٪ تا ۸۸٪ گردیده است. در تحقیقی دیگر، پس از خیساندن بذور برنج در سوسپانسیون کنیدی‌های *T. viride*، *T. harzianum*، *Pseudomonas fluorescens* و Blitox (یک قارچ‌کش شیمیایی) مشخص شد که شدت بیماری در بذرهای تیمار شده با *T. viride*، *T. harzianum* و *P. fluorescens* کاهش یافته است (Anwar *et al*., 2002). هم‌چنین، در این تحقیق، شدت بیماری در تیمار Blitox نسبت به شاهد کاهش نشان داد اما میزان کاهش نسبت به‌عوامل بیوکنترل کمتر بود. Nzojiyobiri *et al*., (2003) در آزمایش‌های گلخانه‌ای با رقم حساس برنج (Yuanfengzao) نتیجه گرفتند نشاهایی که قبل از مایه‌زنی بیمارگر با سویه NF9 از *T. harzianum* تیمار شدند، مقاومت ملایمی به بیماری بلاست و بلایت باکتریایی برگ نشان دادند. Lu-ning *et al*., (2010) گلیوتوکسین *T. virens* را از محیط کشت مایع به روش کروماتوگرافی جداسازی کردند و نشان دادند که این متابولیت در نسبت ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از جوانه‌زنی کنیدی و تشکیل اپرسوریوم در *P. oryzae* ممانعت نمود. Hajano *et al*., (2012) طی تحقیقی با شش عامل بیوکنترل *T. harzianum*، *T. polysporum*، *T. pseudokoningii*، *Gliocladium virens*، *Paecilomyces variotii* و *P. lilacinus* در شرایط آزمایشگاه دریافتند که بیش‌ترین بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری بلاست توسط *P. lilacinus* و گونه‌های *Trichoderma* حاصل شده است.

در ایران، خسروی و همکاران (Khosravi *et al*., 2011) با ارزیابی سه فرآورده‌ی تجاری تریکودرمین B، تریکودرمین AB و سوبتیلین (همگی محصول شرکت تلفیق دانه) برای کنترل بیماری بلاست برنج در مزرعه نشان دادند که این قارچ‌کش‌های بیولوژیک موجب افزایش عملکرد محصول برنج شدند و در مورد همه‌ی فرآورده‌ها، افزایش دفعات مصرف آن‌ها سبب کاهش بیشتر این بیماری شد. پاداشت و همکاران (Padasht *et al*., 2002) با ارزیابی ۸۹ جدایه‌ی باکتری آنتاگونیستی جداسازی شده از مزارع برنج گیلان در مقابل قارچ عامل بیماری بلاست در شرایط آزمایشگاه دریافتند، دو گونه‌ی *P. fluorescens* 152 و *P. aeruginosa* 134 به‌ترتیب ۹۳/۲٪ و ۹۵/۲٪ از رشد رویشی و ۱۰۰٪ از جوانه‌زنی کنیدیوم‌های بیمارگر جلوگیری کرد. آن‌ها همچنین با مایه‌زنی مخلوط هر یک از باکتری‌های گونه‌های مختلف جنس‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* با کنیدیوم‌های قارچ عامل بیماری بلاست روی برگ‌های رقم برنج حساس (بینام) در شرایط گلخانه نتیجه گرفتند، کلیه‌ی باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری سبب کاهش

بیماری شده اما برخلاف نتایج آزمایشگاهی اثر *Bacillus* ها بهتر از *Pseudomonas* ها بود. پاداشت و ایزدیار (۲۰۰۷) با ارزیابی اثرات ۱۲ باکتری آنتاگونیست شامل *Bacillus circulans*، *B. subtilis*، *B. megaterium*، *Bacillus* sp. و *P. fluorescens* جهت کنترل بیماری بلاست روی رقم برنج حساس (بینام) در مزرعه نتیجه گرفتند که در هر مرحله از ارزیابی تعدادی از باکتری‌ها در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری سبب کاهش بیماری شده اما تأثیر آن‌ها همیشه کمتر از تیمار قارچ‌کش بود. در این تحقیق، باکتری *B. circulans* B.178 پایداری بیشتری در کنترل بیماری بلاست برگ و خوشه در طی دو سال داشت. احمدی و همکاران (Ahmadi *et al.*, 2007) عصاره‌ی چند گیاه خودرو و بومی را جهت کنترل عامل بیماری بلاست در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار دادند و مشخص شد که عملکرد عصاره‌های متانولی از عصاره‌های اتانولی بهتر بوده و در مجموع گندواش و آقطی بیشترین تأثیر را داشتند. رستمی و همکاران (Rostami *et al.*, 2012) طی تحقیقی در شرایط گلخانه‌ای دریافتند که جدایه‌های *Pseudomonas* spp. و *Bacillus* sp. از لحاظ کارآیی در کنترل بیماری بلاست نسبت‌به *Streptomyces* sp. و *Seratia* sp. برتر بودند.

هدف از این تحقیق ارزیابی جدایه‌های بومی تریکودرمای به‌دست آمده از خاک و اندام‌های هوایی برنج در کنترل *P. oryzae* در آزمایشگاه و بیماری بلاست در گلخانه می‌باشد. استفاده از جدایه‌های این جنس قارچی به‌منظور کنترل بیولوژیک بیماری مهم بلاست برنج برای اولین بار در استان مازندران انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی تریکودرما

نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از اندام‌های هوایی و خاک شالیزارهای ۴۳ مزرعه برنج در مناطق مختلف استان مازندران انجام شد. نمونه‌ها شامل ۳۲ اندام هوایی و ۱۱ نمونه خاک از شالیزار بود. جدایه‌های تریکودرما به‌روش کشت سری رقت خاک (Dilution plate) و با استفاده از محیط کشت انتخابی مک فادن و ساتِن (McFadden & Sutton's RB-S-F, 1975) جداسازی شدند. ۱۰ گرم از خاک مزرعه‌ی برنج (پس از هوا خشک شدن در دمای اتاق) به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون داخل یک شیشه ارلن مایر اضافه شد و به‌مدت ۳۰-۲۰ دقیقه روی دستگاه تکان دهنده‌ی (Shaker) قرارگرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و به‌مدت یک دقیقه روی دستگاه تکان دهنده‌ی به‌هم‌زده شد. این عمل تا رسیدن به‌رقت مناسب تکرار شد. یک میلی‌لیتر از رقت مطلوب، با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای L شکل روی سطح محیط کشت انتخابی پخش شد. برای جداسازی قارچ از اندام‌های هوایی مربوط به‌هرنمونه، قطعات کوچکی از ساقه و برگ برنج به‌اندازه‌ی یک سانتی‌متر مربع (جمعاً به تعداد ۳۰ قطعه) همراه با ۱۰ عدد بذر برنج درون ظرف ارلن مایر نیم لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شدند و به‌مدت ۱۰ دقیقه روی تکان دهنده قرار گرفتند. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون ایجاد شده روی سطح محیط کشت انتخابی پخش شد. بقیه‌ی مراحل مانند روش جداسازی از خاک انجام شد. جدایه‌های تریکودرما رشد یافته در محیط انتخابی با روش تک اسپور، خالص شدند. سپس این جدایه‌ها، به لوله‌های آزمایش حاوی PDA منتقل شدند و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

تهیه قارچ عامل بیماری بلاست برنج

در این تحقیق جدایه‌ی بیماری‌زای *P. oryzae* 274 که نژاد غالب در مناطق مرکزی استان مازندران محسوب می‌شود، مورد استفاده قرارگرفت (Khosravi, 2006). این جدایه از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی معاونت مؤسسه تحقیقات برنج کشور در مازندران تهیه گردید.

بررسی اثرجدایه‌های تریکودرما روی *P. oryzae* در آزمایشگاه

روش کشت دو طرفه (dual culture technique)

قرص‌هایی پنج میلی‌متری از پرگنه‌ی در حال رشد *P. oryzae* در یک طرف لبه‌ی تشتک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA گذاشته شد و در انکوباتور برای

مدت ۷۲ ساعت با دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. پس از این مدت در طرف مقابل، قرص پنج میلی‌متری از حاشیه‌ی کشت سه روزه‌ی تریکودرما قرار داده شد. در تشتک پتری شاهد فقط قرص میسلیومی بیمارگر قرارداده‌شد. پس از گذشت هفت روز، درجه‌ی آنتاگونیسم با استفاده از سیستم بل و همکاران (Bell *et al.*, 1982) سنجیده شد. در این سیستم پنج گروه برای بیان قدرت آنتاگونیستی مشخص شد. گروه ۱- تریکودرما کاملاً روی پرگنه بیمارگر رشد کرده و تمام سطح محیط کشت داخل تشتک پتری را اشغال می‌کند. گروه ۲- تریکودرما حداقل دو سوم سطح محیط کشت را اشغال می‌نماید. گروه ۳- تریکودرما و بیمارگر هریک تقریباً نصف سطح محیط کشت را می‌پوشانند. گروه ۴- بیمارگر حداقل دو سوم سطح محیط کشت را اشغال می‌کند. گروه ۵- بیمارگر کاملاً روی پرگنه تریکودرما رشد کرده و تمام سطح محیط را می‌پوشاند. جدایه‌ای از تریکودرما «آنتاگونیست» در نظر گرفته شد که میانگین درجه‌ی آن، مساوی یا کوچک‌تر از دو بود.

بررسی مایکوپارازیتیسم جدایه‌های تریکودرما علیه *P. oryzae*

قرص‌های پنج میلی‌متری میسلیوم‌های *P. oryzae* در یک طرف لام‌های سترون موجود در تشتک‌های پتری ۹ سانتی-متری و پوشش داده شده با یک لایه نازک آب آگار دو درصد قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. سپس در طرف دیگر لام‌های سترون، قرص‌های پنج میلی‌متری از حاشیه کشت سه روزه‌ی تریکودرما قرار گرفت. در اسلاید شاهد فقط قرص میسلیومی بیمارگر قرار داده شد و از روز سوم به بعد بررسی‌های میکروسکوپی انجام گرفت.

بررسی تأثیر عصاره‌ی کشت (culture filtrate) جدایه‌های تریکودرما در رشد *P. oryzae*

این آزمایش طبق روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster 1971a) انجام شد. برای تهیه ترشحات مایع خارج سلولی، جدایه‌های تریکودرما به طور جداگانه در محیط مایع Potato Dextrose Broth (PDB) کشت داده شدند و روی دستگاه تکان دهنده با ۸۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. سپس به کمک فیلترهایی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (Millipore, England) توسط پمپ خلاء عصاره‌گیری به‌عمل آمد. محیط کشت‌های PDA با نسبت‌های ۵٪ و ۲۰ ٪ از عصاره هر جدایه تریکودرما تهیه شدند. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع بدون قارچ آنتاگونیست که سترون شده و از فیلترهایی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شده بود، استفاده گردید. قرصی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت جوان سه روزه‌ی *P. oryzae* در وسط هر تشتک پتری (حاوی عصاره‌های پنج و ۲۰ درصد) کشت داده شد و در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور قرارگرفت. درصد ممانعت از رشد بیمارگر پس از ۵ و ۷ روز توسط جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه‌ی A-B/A × 100 محاسبه شد. A و B به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی قطر پرگنه‌ی بیمارگر در شاهد و تیمار بودند.

اثر متابولیت‌های فرار تریکودرما در رشد *P. oryzae*

این آزمایش مطابق روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster 1971b) انجام شد. قرصی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی کشت جوان سه روزه‌ی *P. oryzae* در وسط یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد. ۴۸ ساعت بعد قرصی به‌قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی کشت جوان سه روزه‌ی تریکودرما در وسط یک تشتک پتری دیگر حاوی محیط کشت PDA کشت داده‌شد. سپس درپوش‌های تشتک‌های پتری مربوط به‌جدایه‌های تریکودرما و بیمارگر در شرایط سترون برداشته شدند و تشتک حاوی *P. oryzae* به‌طور وارونه روی تشتک تریکودرما قرارگرفت. در تشتک‌های پتری شاهد، قرصی از محیط کشت PDA جایگزین تریکودرما شد. درصد ممانعت از رشد بیمارگر پس از ۵ و ۷ روز توسط جدایه‌های تریکودرما مطابق روش ذکر شده در مرحله‌ی قبل انجام گرفت.

بررسی اثرجدایه‌های انتخابی تریکودرما در کنترل بیماری بلاست برنج در گلخانه‌ی شیشه‌ای

براساس نتایج مطالعات آزمایشگاهی، تعداد ۱۶ جدایه تریکودرما برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

تهیه‌ی نشاء برنج

ابتدا بذور برنج (رقم طارم محلی) پس از شست‌وشو به‌مدت ۲۴ ساعت در آب قرار گرفتند. سپس آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم (به‌نسبت ۲۰ میلی‌لیتر محلول تجاری در ۸۰ میلی‌لیتر آب) به‌مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی و مجدداً شست‌وشو داده شدند. بذور برنج داخل پارچه مرطوب و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت سه روز نگهداری گردیدند. بذرهای جوانه زده‌ی برنج به‌تعداد شش عدد در گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد ۱۱×۱۳ سانتی‌متر حاوی خاک مزرعه‌ی برنج منتقل شدند و به‌خاک گلدان‌ها، کودهای اوره و فسفات به‌ترتیب به‌میزان ۲۵۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اضافه شد. در نهایت چهار گیاهچه در هرگلدان برای انجام آزمون در نظر گرفته شدند و در مرحله‌ی سه تا چهار برگی گیاهچه‌ها، کود اوره به‌صورت محلول یک در هزار برای هرگلدان به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر افزوده شد. دما و رطوبت نسبی گلخانه به‌ترتیب ۳۲-۲۴ درجه‌ی سلسیوس و ۹۰٪ بودند. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت غرقابی و به‌صورت مرتب انجام شد.

محلول‌پاشی سوسپانسیون کنیدی‌های تریکودرما

به‌منظور تهیه‌ی سوسپانسیون کنیدی، جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. بعد از ۱۰ روز، کنیدی‌ها با کمک اسکالپل سترون در آب مقطر سترون جمع‌آوری شدند. غلظت سوسپانسیون تریکودرما با استفاده از لام هموسایتومتر به‌تعداد 10^{8} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. بوته‌های برنج در مرحله‌ی چهار برگی با جدایه‌های تریکودرما در دو مرحله یعنی یک هفته قبل از تلقیح بیمارگر و سپس ۲۴ ساعت پس از تلقیح بیمارگر مایه‌زنی گردیدند. برای تهیه‌ی سوسپانسیون کنیدی *P. oryzae*، بیمارگر روی محیط کشت عصاره‌ی آلو (Prune-agar) کشت داده شد. غلظت سوسپانسیون بیمارگر با استفاده از هموسایتومتر به‌تعداد 10^{5} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. برای چسبیدن بهتر کنیدی‌ها به‌سطح اندام‌های هوایی برنج، Tween 20 (Merck, Germany) به‌میزان ۰/۰۵٪ به سوسپانسیون اضافه شد. از قارچ‌کش کارپروپامید (Win, Bayer, Germany) به‌نسبت ۴۰۰ میلی‌لیتر در هکتار نیز به عنوان یک تیمار استفاده گردید. کلیه‌ی محلول‌پاشی‌ها با محلول‌پاش دستی معمولی انجام شد. شدت بیماری بلاست مطابق سیستم ارزیابی استاندارد ارائه شده توسط مؤسسه‌ی بین المللی تحقیقات برنج (INGER Genetic Resources Center, 1996) ۱۰ روز پس از مایه‌زنی بیمارگر با تعیین درصد سطح برگ آلوده محاسبه شد. درصد کاهش بیماری توسط جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه‌ی C-T/C × 100 محاسبه شد. در این رابطه، C و T به‌ترتیب نشان دهنده‌ی درصد بیماری در شاهد و تیمار بودند. ارزیابی کارآیی جدایه‌های انتخابی تریکودرما در کنترل بیماری بلاست دو بار در گلخانه تکرار شد.

ارزیابی دینامیک جمعیت *Trichoderma* روی اندام‌های هوایی در گلخانه

در آزمایش دوم ارزیابی کارآیی جدایه‌های تریکودرما، از هر گروه جدایه‌ها (با کارآیی کنترل قوی، متوسط و ضعیف) و از کلیه‌ی گونه‌های تریکودرما تعداد هفت نماینده برای ارزیابی دینامیک جمعیت انتخاب شدند. میزان جمعیت جدایه‌های تریکودرما روی اندام‌های هوایی برنج در دو مرحله-مرحله‌ی اول، یک روز پس از دومین مرحله پاشش سوسپانسیون کنیدی‌ها و مرحله‌ی دوم، نُه روز بعد از آن یعنی در زمان ارزیابی بیماری بلاست- در گلخانه اندازه‌گیری شد (در یک بازه زمانی ۱۷ روزه). در هر تیمار ۷۰ قطعه برگ برنج به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر به آب مقطر سترون داخل یک شیشه ارلن مایر اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه روی تکان دهنده قرار گرفت. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل به نُه میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و به‌مدت یک دقیقه روی تکان دهنده به هم زده شد. این عمل تا رقت 10^{-8} تکرار گردید. نیم میلی‌لیتر از هر رقت با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای L شکل روی سطح محیط کشت انتخابی پخش شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از ظهور

پرگنه‌ها، تعداد آن‌ها شمارش و جمعیت آن‌ها بر حسب تعداد واحد پرگنه‌ساز در هر سانتی‌متر مربع برگ (Cfu/ cm^2 leaf) محاسبه گردید.

شناسایی گونه‌های تریکودرما

در این تحقیق، شناسایی جدایه‌های مؤثر انتخاب شده برای استفاده در آزمون گلخانه براساس دو روش مورفولوژیکی و مولکولی انجام شد.

برای شناسایی مورفولوژیکی، جدایه‌های تریکودرما روی محیط مالت آگار دو درصد و نیز PDA کشت شدند. کشت‌های قارچ در محیط مالت آگار ابتدا به‌مدت دو روز درون انکوباتور با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و شرایط تاریکی قرار گرفتند و سپس در شرایط دمای اتاق و نور طبیعی (نور وارد شده به داخل آزمایشگاه) نگهداری شدند. برای شناسایی جدایه‌ها تا سطح گونه، شکل، اندازه و سایر مشخصات مربوط به کنیدیوفور، فیالید، کنیدیوم و نیز مشخصات مربوط به ظاهر پرگنه‌ها و میزان رشد آن‌ها ثبت شدند. شناسایی مورفولوژیکی با استفاده از کلیدهای شناسایی بی‌ست (Bissett, 1984; 1991 *a-c*; 1992) و گمس و بی‌ست (Gams & Bissett, 1998) انجام گرفت.

برای شناسایی مولکولی ناحیه‌ی ITS مربوط به rDNA هسته‌ای شامل ITS1، ژن 5.8S و ITS2 با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.*, 1990) تکثیر شدند. مخلوط واکنش در هر لوله PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر (10X) *Taq* Buffer حاوی KCl، ۰/۷۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (50 mM، ۰/۵ میکرولیتر (10 dNTPs mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase و ۲ میکرولیتر DNA بود. حجم نهایی مخلوط واکنش در هرلوله به ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) با شرایط زیر انجام شد: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ °C (دو دقیقه) و ۳۵ چرخه به‌صورت ۹۴ °C (یک دقیقه)، ۵۶ °C (۴۵ثانیه) و ۷۲ °C (یک دقیقه) و متعاقب آن دو دقیقه در دمای ۷۲ °C (Hermosa *et al.*, 2000). قطعات تکثیر شده‌ی ITS به‌شرکت بایونیر (Bioneer) در کشور کره جنوبی ارسال شدند و با دستگاه ABI DNA sequencer تعیین توالی شدند. برای تعیین توالی نواحی ITS همان آغازگرهایی که در تکثیر آن‌ها استفاده شده بود، به‌کار گرفته شد. توالی‌های ITS با نرم افزار BankIt در بانک ژن (NCBI GenBank) ذخیره شدند و به ازای هر توالی، یک شماره دستیابی (Accession number) دریافت گردید. برای شناسایی از برنامه‌ی *Trich*OKEY 2 استفاده شد (http://www.isth.info/tools/molkey/index.php). این برنامه به‌صورت آنلاین، براساس بارکُد الیگونوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS، عمل شناسایی را تا سطح گونه و با درجه‌ی اطمینان بالا انجام می‌دهد. برای این کار ابتدا به‌منظور تهیه‌ی توده‌ی میسلیوم تازه قارچی، جدایه‌های تریکودرما در تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی مخمر-دکستروز-آگار کشت داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB استخراج گردید.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت پذیرفت. برای نرمال کردن توزیع داده‌ها، در مواردی که داده‌ها به صورت درصد بودند، از رابطه‌ی Arcsine $(Y)^{1/2}$ استفاده شد. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن و با نرم افزار SAS 9.0 صورت گرفت.

نتایج

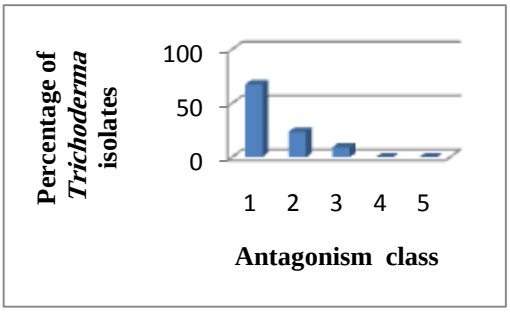
جداسازی تریکودرما

با استفاده از محیط کشت انتخابی، در مجموع ۲۶۶ جدایه تریکودرما از مزارع برنج مازندران به‌دست آمد. براساس منطقه‌ی جغرافیایی، زیستگاه (خاک شالیزار یا اندام‌های هوایی برنج) و مورفولوژی، ۸۹ جدایه (۱۹ جدایه از خاک و ۷۰ جدایه از اندام‌های هوایی) به‌عنوان نماینده برای بررسی‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند.

روش کشت دو طرفه (dual culture technique)

اغلب جدایه‌ها بر روی پرگنه *P. oryzae* رشد نمودند و در آنجا به فراوانی تولید کنیدی کردند. به‌دلیل عدم وجود هاله‌ی بازدارندگی در این آزمایش، برای ارزیابی کارآیی آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما، پس از هفت روز از

روش Bell *et al*. (1982) استفاده شد. ۶۷/۴٪ جدایه‌ها در گروه یک و ۲۳/۵٪ جدایه‌ها در گروه دو قرار داشتند و بنابراین براساس این روش، ۹۱٪ از جدایه‌های تریکودرما، آنتاگونیست *P. oryzae* محسوب شدند. از طرف دیگر، ۹٪ جدایه‌ها در گروه سه قرار گرفتند و هیچ‌کدام از جدایه‌های این آزمایش در گروه‌های چهار و پنج قرار نگرفتند (شکل ۱).



شکل ۱- درصد فراوانی جدایه‌های تریکودرما مربوط به گروه‌های مختلف آنتاگونیسم در آزمون کشت متقابل.

Fig. 1- The frequency of *Trichoderma* isolates belonging to different antagonism classes in dual culture test.

مایکوپارازیتیسم جدایه‌های تریکودرما علیه *P. oryzae*

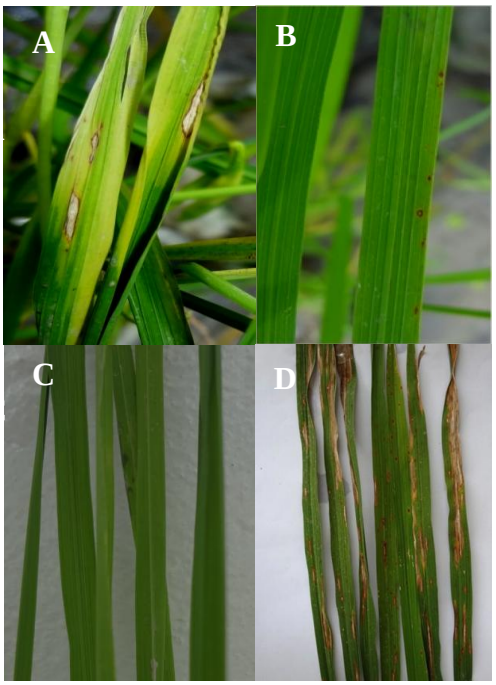
هیف‌های هیچ یک از جدایه‌های تریکودرما به‌دور هیف‌های قارچ عامل بیماری بلاست پیچش (Coiling) نداشتند. اما جدایه‌های RS8-4، RP6-1، RP9-23، RP4-15 و RP1-40 موجب پاره شدن یا جدا شدن هیف‌های بیمارگر از محل دیواره‌ی عرضی شدند.

تأثیر متابولیت‌های فرار تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیومی *P. oryzae*

متابولیت‌های فرار ۲۰ ٪ جدایه‌های تریکودرما پس از پنج روز و متابولیت‌های فرار ۶۱٪ جدایه‌ها پس از هفت روز، بیش از ۵۰٪ از رشد میسلیومی بیمارگر ممانعت به‌عمل آوردند. جدایه‌های RP3-2 و RP3-4 با ۶۶/۶۶٪ کاهش رشد در روز هفتم، بیشترین تأثیر را نشان دادند و از نظر آماری در گروه اول قرار گرفتند (جدول ۱).

تأثیر عصاره‌ی کشت (Culture filtrate) جدایه‌های تریکودرما در رشد *P. oryzae*

پنج روز پس از کشت بیمارگر در تشتک‌های پتری حاوی عصاره‌ی کشت جدایه‌های تریکودرما، جدایه‌های RP7-1 و RP10-5 در هر دو نسبت ۵ و ۲۰٪ به‌میزان ۹۳/۰۲٪ از رشد بیمارگر جلوگیری کردند و در گروه اول آماری قرار گرفتند (جدول ۲). پس از هفت روز متابولیت‌های غیر فرار جدایه RP7-1 در نسبت ۲۰٪ با ۹۳/۷۴٪ و در نسبت ۵٪ با ۹۰/۶۲٪ کاهش رشد (به‌همراه جدایه‌ی RP8-4)، بیشترین تأثیر را داشت و از نظر آماری در گروه اول قرار گرفت. در مجموع پس از هفت روز، متابولیت‌های غیرفرار ۸۰٪ و ۸۴٪ جدایه‌های تریکودرما به‌ترتیب در نسبت‌های ۵٪ و ۲۰٪ از رشد میسلیومی *P. oryzae* در آزمایشگاه ممانعت کردند.



شکل ۲- کنترل بیماری بلاست برگ برنج (رقم طارم محلی) توسط جدایه‌های تریکودرما در گلخانه. کاهش علائم بیماری پس از محلول‌پاشی سوسپانسیون کنیدی‌های جدایه‌ی *Trichoderma harzianum* RS6-7 (A)، جدایه‌ی *T. harzianum* RP8-4 (B) و جدایه‌ی *T. harzianum* RP1-6 (C). D) تیمار شاهد آلوده.

Fig. 2- Control of leaf blast disease of rice (cv. Tarom) by *Trichoderma* isolates in the greenhouse. Reduction of disease severity after spraying the conidial suspension of (A) *Trichoderma harzianum* RS6-7, (B) *T. harzianum* RP8-4, (C) *T. harzianum* RP1-6. (D) Control.

جدول ۱- تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در میزان رشد میسلیومی *P. oryzae*.

Table 1- Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* isolates on the growth rate of *P. oryzae*.

Growth inhibition (%)		Isolate	Growth inhibition (%)		Isolate
After 7 days	After 5 days		After 5 days	After 7 days	
53.84 defghi	46.02 cdefghi	RP3-1	66.66 a	62.3 a	RP3-2
55.12 cdefgh	44.44 defghi	RS4-1	66.66 a	62.3 a	RP3-4
55.12 cdefgh	44.44 defghi	RP8-3	62.81 ab	55.55 ab	RP1-4
55.12 cdefgh	44.44 defghi	RS1-3	62.81 ab	55.55 ab	RP9-23
55.12 cdefgh	44.44 defghi	RP2-16	61.53 abc	55.55 ab	RP7-1
53.84 defghi	44.44 defghi	RP9-2	62.81 ab	53.97 bc	RP5-1
53.84 defghi	44.44 defghi	RS6-5	61.53 abc	53.97 bc	RP8-4
53.84 defghi	44.44 defghi	RP2-14	61.53 abc	52.38 bcd	RS2-1
53.84 defghi	42.85 efghij	RP1-39	61.53 abc	52.38 bcd	RP6-1
53.84 defghi	42.85 efghij	RP1-49	61.53 abc	52.38 bcd	RS1-2
53.84 defghi	42.85 efghij	RS7-4	60.25 abcd	52.38 bcd	RP9-21
53.84 defghi	42.85 efghij	RP5-2	58.97 bcde	52.38 bcd	RP1-29
51.28 fghi	42.85 efghij	RP9-24	60.25 abcd	50.79 bcde	RS6-7
53.84 defghi	41.26 fghij	RP8-10	60.25 abcd	50.79 bcde	RP8-8
53.84 defghi	41.26 fghij	RP9-14	60.25 abcd	50.79 bcde	RP7-5
53.84 defghi	41.26 fghij	RP1-45	60.25 abcd	50.79 bcde	RP1-3
53.84 defghi	41.26 fghij	RP1-47	58.97 bcde	50.79 bcde	RP1-2
53.84 defghi	41.26 fghij	RP1-1	58.97 bcde	50.79 bcde	RP8-5
52.56 efghi	41.26 fghij	RP11-4	58.97 bcde	49.20 bcdef	RP2-2
50.00 ghi	41.26 fghij	RS7-1	58.97 bcde	49.20 bcdef	RP9-11
50.00 ghi	41.26 fghij	RP1-20	58.97 bcde	49.20 bcdef	RS1-7
51.28 fghi	39.68 ghij	RP1-9	58.97 bcde	49.20 bcdef	RS1-1
51.28 fghi	39.68 ghij	RP6-10	58.97 bcde	49.20 bcdef	RS7-6
50.00 ghi	38.09 hijk	RP8-2	58.97 bcde	49.20 bcdef	RS8-4
48.71 hi	38.09 hijk	RP1-25	58.97 bcde	49.20 bcdef	RP1-54
47.43 ij	38.09 hijk	RP10-2	57.69 bcdef	49.20 bcdef	RP11-6
42.30 jk	38.09 hijk	RP3-3	56.41 bcdefg	49.20 bcdef	RP1-6
48.72 hi	36.50 kij	RP4-2	56.41 bcdefg	49.20 bcdef	RP2-13
47.43 ij	34.92 jkl	RP5-13	55.13 cdefgh	49.20 bcdef	RP7-2
39.74 kl	30.16 klm	RP7-3	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RP3-8
42.3 jk	28.57 lmn	RP6-7	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RP9-1
41.02 kl	26.98 mn	RS2-2	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RS6-3
41.02 kl	26.98 mn	RP8-1	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RS1-9
38.46 kl	25.40 mn	RS6-2	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RP2-11
35.89 klmn	25.40 mn	RP1-46	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RS6-6
35.89 klmn	23.81 mno	RP4-3	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RP5-7
37.18 klm	22.22 mno	RS7-3	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RP4-16
34.61 lmn	22.22 mno	RP11- 2	57.69 bcdef	47.61 bcdefg	RS6-4
32.04 mno	20.63 pon	RP4-15	56.41 bcdefg	46.02 cdefgh	RP5-4
23.07 p	17.44 opq	RP1-55	56.41 bcdefg	46.02 cdefgh	RP2-3
30.76 no	14.28 pq	RP5-29	56.41 bcdefg	46.02 cdefgh	RP10-5
28.2 op	11.11 q	RP6-8	56.41 bcdefg	46.02 cdefgh	RP9-18
28.2 op	11.11 q	RP4-13	56.41 bcdefg	46.02 cdefgh	RP11-8
24.53 p	11.11 q	RP9-5	55.12 cdefgh	46.02 cdefgh	RP5-6
			55.12 cdefgh	46.02 cdefgh	RP4-10

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شدند، در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Data are the means of three replications. Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$).

جدول۲- تأثیر عصاره‌ی کشت جدایه‌های تریکودرما در میزان رشد میسلیومی *P. oryzae*.

Table 2- Effect of culture filtrates of *Trichoderma* isolates on the growth rate of *P. oryzae*.

Growth inhibition (%) (4 ml extract)		Growth inhibition (%) (1 ml extract)		Isolate
After 7 days	After 5 days	After 5 days	After 7 days	
93.74 a	93.02 a	90.62 a	93.02 a	RP7-1
90.62 ab	93.02 a	89.05 ab	93.02 a	RP10-5
90.62 ab	90.69 ab	90.62 a	90.69 ab	RP8-4
90.62 ab	88.37 abc	89.05 ab	82.28 bc	RP5-6
87.49 abc	81.39 bcde	85.93 bac	79.06 cd	RP4-2
78.11 fehg	86.04 abcd	74.99 fghij	79.06 cd	RP6-7
78.11 fehg	86.04 abcd	74.99 fghij	79.06 cd	RP6-7
84.37 bcde	76.73 defg	84.37 bcde	76.73 cde	RS4-1
79.68 defg	83.71 abcde	76.55 efghi	76.73 cde	RP6-1
85.93 bcd	79.06 cdef	81.24 cdef	74.41 cdef	RS7-6
85.93 bcd	83.71 abcde	79.68 cdefg	74.41 cdef	RP1-6
84.37 bcde	76.73 defg	79.68 cdefg	74.41 cdef	RP1-4
82.80 cdef	74.41 efgh	82.80 bcde	74.41 cdef	RS8-4
78.11 defg	76.73 defg	74.99 fghij	74.41 cdef	RP9-11
87.49 abc	81.39 bcde	81.24 cdef	72.08 cdefg	RP3-2
84.37 bcde	76.73 defg	81.24 cdef	72.08 cdefg	RS6-7
76.55 fghi	65.10 hij	81.24 cdef	72.08 cdefg	RS1-1
84.37 bcde	79.06 cdef	78.11 defgh	69.75 defgh	RP5-4
84.37 bcde	79.06 cdef	78.11 gfdeh	69.75 defgh	RP9-23
76.55 fghi	74.41 efgh	76.55 efghi	69.75 defgh	RP1-25
78.11 fehg	67.42 ghi	78.11 defgh	67.43 efghi	RP7-2
74.99 ghi	62.77 ijk	73.43 ghijk	67.43 efghi	RS6-5
82.80 cdef	74.41 efgh	76.55 gfieh	65.10 fghij	RP1-53
79.68 defg	69.75 fghi	74.99 fghij	65.10 fghij	RS6-6
78.11 fehg	67.42 ghi	76.55 efghi	65.10 fghij	RP2-16
76.55 fghi	65.10 hij	76.55 efghi	65.10 fghij	RP9-1
76.55 fghi	65.10 hij	76.55 efghi	65.10 fghij	RP9-24
89.06 abc	88.37 abc	68.74 jklmn	62.78 ghijk	RP2-11
76.55 fghi	65.10 hij	73.43 ghijk	60.45 hijk	RP1-9
71.87 hij	65.10 hij	73.43 ghijk	60.45 hijk	RP1-3
76.55 fghi	65.10 hij	71.87 hijkl	58.13 ijkl	RP4-13
73.43 ghi	60.45 ijkl	70.30 ijklm	58.13 ijkl	RS7-1
76.55 fghi	65.10 hij	70.30 ijklm	55.80 jklm	RP5-13
70.30 ij	55.80 jkl	70.30 ijklm	55.80 jklm	RP3-4
67.18 j	55.80 jkl	67.18 klmn	53.48 klm	RP11-2
67.18 j	51.15 l	71.87 lkijh	53.48 klm	RP8-11
74.99 ghi	62.77 ijk	67.18 klmn	53.48 klm	RP9- 21
71.87 hij	60.45 ijkl	62.49 n	48.82 lm	RS2-1
76.55 fghi	79.06 cdef	65.62 lmn	48.82 lm	RP4-16
48.42 k	53.47 kl	42.17 p	48.82 lm	RP5-7
70.3 ij	60.45 ijkl	64.05 mn	46.50 m	RP1-1
70.3 ij	55.80 jkl	54.67 o	32.54 n	RP5-6
70.3 ij	55.80 jkl	49.98 o	25.56 no	RP3-8
39.05 l	25.88 m	15.61 q	23.23 no	RP1-29
48.42 k	23.23 m	43.74 p	16.26 o	RP2-2

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شدند، در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Data are the means of three replications. Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$).

جدول۳- اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری بلاست برنج در شرایط گلخانه.

Table 3- Effect of *Trichoderma* isolates in controlling rice blast disease in greenhouse.

Disease control (%)	Disease severity (%)	Treatment	Disease control (%)	Disease severity (%)	Treatment
95.0 abcd	2.1 fheg	*T. harzianum* RP2-11	-	56.0 a	Control (inoculated)
95.9 abcd	2.0 fheg	*T. harzianum* RP8-4	73.1 g	16.0 a	*T. harzianum* RS6-7
95.9 abcd	1.9 fheg	*T. harzianum* RP1-4	85.5 f	7.3 c	*T. harzianum* RP9-11
96.5 abcd	1.8 fheg	*T. harzianum* RP9-23	85.9 f	7.25 c	*T. atroviride* RS4-1
97.2 abc	1.5 fhg	Fungicide (carpropamid)	87.2 fe	6.05 dc	*T. harzianum* RP5-6
97.5 abc	1.25 fhg	*T. virens* RS7-6	88.2 fe	5.75 dc	*T. harzianum* RP10-5
98.0abc	0.5 fhg	*T. harzianum* RP6-1	91.9 de	4.1 de	*T. harzianum* RP3-2
99.3 ab	0.25 hg	*T. harzianum* RP4-2	93.5 cd	2.85 fe	*T. harzianum* RP7-1
100.0 a	0.0 h	*T. harzianum* RP1-6	94.3 cd	2.7 feg	*T. harzianum* RS8-4
-	0.0 h	Control (non-inoculated			

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شدند، در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری ندارند.

Data are the means of three replications. Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$).

دینامیک جمعیت جدایه‌های تریکودرما در گلخانه

میزان جمعیت تریکودرما یک روز پس از دومین محلول‌پاشی سوسپانسیون کنیدی‌ها و ۱۰ روز بعد از آن هنگام ارزیابی بیماری بلاست در جدول ۴ نشان داده شده است. جمعیت جدایه‌های *T. harzianum* RP1-6 و *T. harzianum* RP1-4 در این فرصت کوتاه افزایش چشم‌گیری داشتند، در حالی که، جمعیت جدایه‌ی *T. atroviride* RS4-1، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد. در مورد بقیه‌ی جدایه‌ها نیز کاهش شدید جمعیت مشاهده نشد. در این مرحله، همبستگی میان دینامیک جمعیت و بیوکنترل مشاهده نگردید (جدول ۴).

جدول۴- دینامیک جمعیت تریکودرما (cfu/cm^{2}leaf) در گلخانه

Table 4- Population dynamics of *Trichoderma* (cfu/cm2leaf) in greenhouse.

Isolate	1st assessment*	2nd assessment
T. atroviride RS4-1	3.3×10^4	4.0×10^3
T. harzianum RP4-2	3.2×10^4	1.0×10^4
T. harzianum RP1-6	3.0×10^4	1.0×10^5
T. harzianum RP1-4	3.0×10^4	8.0×10^4
T. harzianum RP10-5	2.9×10^4	1.0×10^4
T. harzianum RS6-7	3.0×10^4	1.0×10^4
T. virens RS7-6	2.8×10^4	2.0×10^4

*ارزیابی اول، یک روز بعد از محلول‌پاشی دوم تریکودرما و ارزیابی دوم، ۱۰ روز پس از آن انجام شد.

* First evaluation was made one day after 2nd spraying of *Trichoderma* and second evaluation was made 10d later.

شناسایی جدایه‌های برتر تریکودرما

شانزده جدایه‌ی برتر که برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند، براساس مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی، مورد شناسایی قرار گرفتند که به سه گونه *Trichoderma harzianum*، *T. virens* و *T. atroviride* متعلق بودند. مکان جداسازی، زیستگاه و شماره‌های دستیابی (Accession numbers) دریافت شده از NCBI GenBank در جدول ۵ نشان داده شده است.

بحث

در این تحقیق در مجموع ۲۶۶ جدایه تریکودرما از اندام‌های هوایی برنج و خاک شالیزارهای استان مازندران جداسازی شدند که ۸۹ جدایه برای غربالگری آزمایشگاهی علیه قارچ عامل بلاست برنج مورد ارزیابی قرار گرفتند. به‌دلیل این که بلاست برنج یک بیماری هوازاد است، جستجو برای پیدا کردن آنتاگونیست‌های مؤثری که روی اندام‌های هوایی حضور دارند و در آن جا سازگاری یافته‌اند از جنبه‌ی کنترل عملی و کاربردی بیماری در اولویت بالاتری قرار دارد. از طرف دیگر، براساس گزارش‌های موجود جدایه‌های تریکودرما که ذاتاً ساپروفیت و خاکزی هستند از اندام‌های هوایی (اپیفیت واندوفیت) و به‌خصوص از فیلوسفر برنج نیز جداسازی شده‌اند (Naeimi *et al*., 2010; Khalili *et al*., 2012). به‌همین خاطر در این تحقیق جهت نمونه برداری‌ها و نیز انتخاب

جدایه‌های نماینده برای انجام آزمایش‌ها، بیشتر روی اندام‌های هوایی تمرکز شد. براساس نتایج روش کشت متقابل می‌توان گفت که اغلب جدایه‌های تریکودرمای به‌دست آمده از شالیزارهای مازندران از رشد بیمارگر جلوگیری کردند، بر روی پرگنه آن رشد و در آنجا تولید کنیدی نمودند. نتایج آزمون آنتی‌بیوز نشان داد که جدایه‌های بومی تریکودرما با تولید مواد فرار قادر به بازدارندگی معنی‌دار رشد بیمارگر بوده و جدایه‌های RP3-2 و RP3-4 با ۶۶/۶۶٪ بیش‌ترین توانایی را از خود نشان دادند. در بررسی عصاره‌ی کشت که در نسبت های ۵٪ و ۲۰٪ انجام شد، مشخص گردید که در هر دو نسبت جدایه‌های تریکودرما موجب ممانعت از رشد بیمارگر شدند به‌طوری که در نسبت ۵٪ ترشحات مایع خارج سلولی در محیط کشت نیز کنترل قابل توجهی مشاهده شد. گونه‌های تریکودرما آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر Trichodermin، Trichodermol، Harzianum A، Harzianolide، Paracelsin و آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز و بتا ۱ و ۳- گلوکاناز را تولید می‌کنند که نقش مؤثری در بیوکنترل دارا می‌باشند (Papavizas 1985; Dannis & Webster 1971). نتایج آزمون هیپرپارازیتیسم نشان داد که بیشتر جدایه‌ها قادر به پارازیته کردن میسلیوم‌های قارچ عامل بیماری بلاست نبودند؛ این یافته با نتیجه‌ی هاجانو و همکاران (Hajano *et al*., 2012) مطابقت داشت اما برخلاف نتایج آن‌ها، پنج جدایه موجب جدا شدن هیف‌های بیمارگر از محل دیواره‌ی عرضی و بدشکلی هیفی شدند.

در مجموع طبق نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی، جدایه‌های تریکودرمای فیلوسفر کارآیی آنتاگونیستی بیشتری نسبت به جدایه‌های تریکودرمای خاک نشان دادند. همچنین، نتایج آزمایش‌های اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری بلاست برگ در گلخانه نشان داد که جدایه‌های به‌دست آمده از فیلوسفر مؤثرتر بودند. تنها یک جدایه از خاک (*T. virens* RS7-6) توانایی بیوکنترل بالایی از خود نشان داد. بنابراین، با توجه به هوازاد بودن بیماری بلاست و توانایی آنتاگونیستی بیشتر جدایه‌های فیلوسفر که سازگاری بالاتری در این زیستگاه دارند، چشم‌انداز امیدبخشی در خصوص کاربرد عملی سویه‌های مؤثر پس از فرمولاسیون نهایی در مزرعه وجود دارد.

بر اساس نتایج بررسی دینامیک جمعیت جدایه‌های تریکودرما در گلخانه، کاهش جمعیت در اکثر جدایه‌های تریکودرما نسبتاً اندک بوده ولی یک جدایه دستخوش کاهشِ نسبتاً زیاد جمعیت شد. جمعیت دو جدایه با افزایش مواجه بود که جمعیت مؤثرترین جدایه در کنترل بلاست (*T. harzianum* RP1-6) افزایش قابل توجهی نشان داد. در کل، نظر به این که اغلب جدایه‌ها در گلخانه بیش‌تر از ۷۳٪ موجب کنترل بیماری گردیدند، تغییرات جمعیت ظاهراً ارتباطی با میزان خاصیت بیوکنترلی جدایه‌های تریکودرما نداشته است. البته فاصله زمانی بین دو ارزیابی فقط ۱۰ روز بود که با توجه به تاریخ اولین محلول‌پاشی سوسپانسیون کنیدی‌ها، حداکثر ۱۷ روز برای تغییرات جمعیت می‌توان در نظر گرفت که این مدت برای تعیین دینامیک جمعیت، زمان کوتاهی محسوب می‌شود.

در این تحقیق از دو روش شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی برای شناسایی جدایه‌های برتر تریکودرما استفاده شد. ۱۶ جدایه برتر تریکودرما به سه گونه تعلق داشتند. دراین میان،همه‌ی ۱۲ جدایه تریکودرمای به‌دست آمده از اندام‌های هوایی برنج به *T. harzianum* تعلق داشت؛ درحالی که، در میان چهار جدایه‌ی تریکودرمای به‌دست آمده از خاک شالیزار علاوه بر گونه‌ی *T. harzianum*، گونه‌های *T. virens* و *T. atroviride* نیز شناسایی شد. ظفری و همکاران (Zafari *et al*., 2002) گزارش کردند که *T. harzianum* فراوان‌ترین گونه‌ی تریکودرما در ایران است. همچنین *T. harzianum*، *T. virens* و *T. atroviride* فراوان‌ترین گونه‌های تریکودرمای مزارع برنج در مناطق مختلف استان مازندران معرفی شدند و گونه‌ی غالب به‌دست آمده از خاک و اندام‌های هوایی در شالیزار برنج، *T. harzianum* بود (Naeimi *et al*., 2010). در این تحقیق، جدایه‌های *T. harzianum* دارای تنوع زیادی از لحاظ مشخصات مورفولوژیکی و توالی‌های نوکلئوتیدی نواحی ITS بودند (داده‌ها نمایش داده نشده است). با توجه به غالب بودن گونه‌ی *T. harzianum* در شالیزار به‌خصوص

در فیلوسفر برنج و متعلق بودن جدایه‌های مؤثر به‌دست آمده از اندام‌های هوایی به این گونه، می‌توان گفت که این گونه از توانایی ویژه‌ای برای بقاء و استقرار روی اندام‌های هوایی گیاه برنج در مزرعه برخوردار است.

براساس نتایج تحقیق حاضر، بیش‌تر جدایه‌های تریکودرمای مورد مطالعه در بررسی گلخانه‌ای دارای قابلیت بالایی برای کنترل بیماری بلاست برنج بودند؛ به‌طوری‌که قابلیت کنترل برخی از جدایه‌ها در حدود قارچ‌کش شیمیایی(کارپروپامید) و یا حتی در مورد یک جدایه‌ی برتر از آن بود. با توجه به‌نتایج به‌دست آمده می‌توان امیدوار بود که پس از اجرای تحقیقات تکمیلی آتی، جدایه‌های تریکودرمای بومی جایگزین سموم خطرناک شیمیایی برای کنترل بیماری بلاست برنج گردد. جهت نیل به این هدف آرمانی، انجام مطالعات تکمیلی در زمینه‌ی بررسی اثر جدایه‌های مؤثر تریکودرما در شرایط طبیعی شالیزار و تهیه فرمولاسیون‌های مناسب، ضروری است.

جدول ۵- مشخصات جدایه‌های برتر تریکودرما که برای بررسی اثرشان در کنترل بیماری بلاست در گلخانه مورد مطالعه قرار گرفتند.

Table 5- Selected *Trichoderma* isolates studied for control of blast disease in greenhouse.

Isolate	Habitat	Location	Accession number
T. atroviride RS4-1	Soil	Fereydoonkenar	JX493000
T. harzianum RS8-4	Soil	Sari-Sharafdarkola	JX493011
T. harzianum RS6-7	Soil	Qaemshahr	JX492999
T. harzianum RP4-2	Phyllosphere	Mahmudabad-Masumabad	JX492996
T. harzianum RP8-4	Phyllosphere	Noor-Chamestan	JX492997
T. harzianum RP9-23	Phyllosphere	Sari-Neka road	JX493001
T. harzianum RP5-6	Phyllosphere	Nowshahr	JX493002
T. harzianum RP9-11	Phyllosphere	Sari-Semeskandeh	JX493003
T. harzianum RP3-2	Phyllosphere	Fereydoonkenar -Babolsar road	JX493004
T. harzianum RP2-11	Phyllosphere	Babol-Zargar mahaleh	JX493005
T. harzianum RP7-1	Phyllosphere	Ahudasht	JX493006
T. harzianum RP1-6	Phyllosphere	Amol- Fereydoonkenar road	JX493007
T. harzianum RP1-4	Phyllosphere	Amol-Dabudasht	JX493008
T. harzianum RP6-1	Phyllosphere	Chalus	JX493009
T. harzianum RP10-5	Phyllosphere	Jooybar-Kordkola	JX493010
T.virens RS7-6	Soil	Fereydoonkenar	JX492998

References

Ahmadi, S.B., Khodaparast, S.A., Jalali Sendi, J., Hasanzadeh, N. & Padasht Dehkaei, F. 2007. Assessment of extracts of some plant species for inhibition of *Pyricularia grisea* Sacc. The causal agent of rice blast disease *in vitro*. Proceeding of 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, Iran.

Anwar, A., Bhat, G.N. & Singhara, G.S. 2002. Effect of seed treatment through bioagents and blitox on incidence of leaf blast disease (*Magnaporthe grisea*) and seedling growth of rice under temperate conditions. New Agriculturist, 13:45-47.

Bell, D.K., Wells, H.D. & Mrkham, C.R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 12: 379-3.

Benitez, T., Delgado-Jarana, J., Rincon, A. Key, M. & Limon, M.C. 1998. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol against phytopathogenic fungi. Recent Research Developments in Microbiology, 2: 129-150.

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. & Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249-260.

Bisset, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany, 62: 924-931.

Bisset, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany, 69: 2373-2417.

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, L.S., Lorito, M., Kubicek, C.P., & Mach, R.L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonist and induction of plant systemic disease resistance. Appplied Environment Microbiology, 7: 3959-3969.

Cook, R.J. & Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogen. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 539 pp.

Dennis, C. & Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of nonvolatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25-39.

Dennis, C. & Webster, J. 1971b. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 41-48.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. Pp. 3-34, *In*: Kubicek, C. P., Harman, G. E. (Eds), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor and Francis Ltd., London.

Gouramanis, G.D. 1995. Biological and chemical control of rice blast disease (*Pyricularia oryzae*) in North Greece. Cahires Options Méditerranéennes, 15: 61-68.

Hajano, J.U.D., Lodhi, A.M., Pathan, M.A., Khanzada, M.A. & Serwar Shah, G. 2012. *In vitro* evaluation of fungicides, plant extracts and biocontrol agents against rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. Pakistan Journal of Botany, 44: 1775-1778.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species- Opportunistic, avrirulent plant symbionts. Nature Review Microbialogy, 2: 43-56.

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology, 96: 190-194.

Hermosa M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E. & Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization of biocontrol isolates of *Trichoderma.* Applied and Environmental Microbiology, 66: 1890–1898.

Herret-Estrella, A. & Chet, I. 1998. Biocontrol of bacterial and phytopathogenic fungi. *In*: Agricultural Biotechnology (ed. A. Altman), Pp. 263-282, Marcel Dekker, New York.

IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. 4th edition. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S. & Khosravi, V. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. Brazilian Journal of Microbiology. 43: 297-305.

Khosravi, V. 2006. Identification of new races of *Magnaporthe grisea*, the causal agent of rice blast disease in Mazandaran. Final Report of Research Project. Iranian Rice Research Institute Publication, 27 Pp.

Khosravi, V., Naeimi, S., Rostami, M., Omrani, M. & Bahramei, M. 2011. Evaluation of three commercial biological products on the rice blast disease in Mazandaran. Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress, 31 July-3 August, Tehran, Iran, 828.

Lu-ning, L. I. U., Tu, Y. & Zhang J. 2010. Biocontrol potential of *Trichoderma virens* strain TY009 against sheath blight and other main fungal diseases. Scientia Agricultura Sinica, 10: 2031-2038. (In Chinese with English summary).

Naeimi, S., Okhovvat, S.M., Javan-Nikkhah, M., Kredics, L. & Khosravi, V. 2010. Frequency and distribution of *Trichoderma* spp. in the paddy rice fields of Mazandaran province, Iran. Iran Journal of Plant Protection Science, 40: 79-91. (In Persian with English summary).

Naeimi, S., Okhovvat, S. M., Javan-Nikkhah, M., Kredics, L. & Khosravi, V. 2010. Biological control of *Rhizoctonia solani* AG1-1A, the causal agent of rice sheath blight with *Trichoderma* strains. Phytopathologia Mediterranea, 49: 287-300.

Nzojiyobiri, J.B., Xu T., Song F. & Shen Y. 2003. Resistance induced by *Trichoderma harzianum* NF9 against *Magnaporthe grisea* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. Chinese Journal of Biological Control**,** 3: 111-114.

Ouazzani, Touhami A., Mouria, A., Douira, A., Benkirane, R., Mlaiki, A. & El-Yachioui, M. 1998. *In vitro* effect of pH and temperature on the ability of *Trichoderma* spp. to reduce the growth of *Pyricularia oryzae*. Journal of CAB Direct, 96: 19-24.

Padasht Dehkaei, F., Popushoi, I., Izadyar, M., Khodakarmian, G. & Gharyazei, B. 2002. Effects of selected antagonistic bacteria in controlling of rice blast disease. 3rd International Rice Blast Conference. Tsukuba, Ibaraki, Japan, 73pp.

Padasht Dehkaei, F. & Izadyar, M. 2007. Study on the biological control of rice blast disease in the field conditions. Journal of Agriculture Sciences and Natural Resources, 13: 84-92.

Rostami, M., Momeni, A., Khosravi, V., Zare, L., Darvishzadeh, N., Omran, M. & Ghalandari, M. 2012. Identification and investigation of effects of antagonistic bacterial agents on Rice blast control. Proceeding of 20th Iranian Plant Protection Congress, 25-29 August, Shiraz, Iran.

Singh, V., Jodhi, B.B., 2007. Mass multiplication of *Trichoderma harzianum* on sugarcane press mud. Indian Phytopathology, 60: 530-531.

Singh, P. K., Singh, A. K., Singh, H. B., **Dhakad, B. K. 2012.** Biological control of rice blast disease with *Trichoderma harzianum* in direct seeded rice under medium low land rainfed conditions. Journal Environment and Ecology, 30: 834-837

Webster, R.K. & Gunnell, P.S. 1992. Compendium of Rice Diseases. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 62 pp.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 135-322, *In*: Innis, M.A. Gelfand, D.H. Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), PCR Protocols. A Guide to Methods and Application. Academic Press, Inc., USA.

Zafari, D., Ershad, D., Zare, R. & Alizadeh,, A. 2002. A contribution to the identification of *Trichoderma* species. Iranian Journal of Plant Pathology, 38: 21-45.

Biological control of rice blast disease with native *Trichoderma* isolates in Mazandaran province

Laleh Javadi[1], Shahram Naeimi[2], Saeid Rezaee[1], Vahid Khosravi[3]

1. Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. com
2. Department of Biological Control Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Amol, Iran
3. Faculty member of Deputy of Rice Research Institute in Mazandaran, Amol, Iran

Corresponding author: Shahram Naeimi, e-mail: shnaeimi@yahoo.com

Received: June, 23, 2014 **2 (1) 1-15** **Accepted: Jan. 05, 2015**

Abstract

Rice blast caused by *Magnaporthe oryzae* is the most important disease of rice worldwide. Although, application of chemical pesticides can control the disease, but they cause harmful effects on environment and human health. Nowadays, biological control is considered as an alternative and safe method in plant disease management. In this study, sampling was done from soils and rice phyllosphere of paddy fields in different regions of Mazandaran province. *Trichoderma* spp. were isolated following dilution plating method using McFadden & Sutton's RB-S-F selective medium, and then purified and preserved. Eighty nine *Trichoderma* isolates were screened against *M. oryzae* using various methods *in vitro*. In dual culture test, more than 90% of *Trichoderma* isolates were antagonistic against pathogen. In hyperparasitism test, no coiling of *Trichoderma* was observed around the hyphae of *M. oryzae*. However, some strains caused disintegration of *M. oryzae* hyphae. Volatile metabolites of RP3-4 and RP3-2 strains were the most effective in inhibiting the growth rate of pathogen by 66.6%. In addition, RP7-1 strain was reduced the growth of pathogen by 93.74% and 90.62% using 20% and 5% of culture filtrate, respectively. Based on the results of *in vitro* studies, 16 *Trichoderma* isolates were selected in order to evaluate their potentials in controlling blast disease in greenhouse. According to the results of greenhouse tests, *T. harzianum* RP1-6 and *T. harzianum* RP4-2 strains were the most effective isolates in terms of reducing the severity of leaf blast disease by 100% and 99%, respectively. Furthermore, *T. harzianum* RP6-1 and *T. virens* RS7-6 with disease reduction of 98% and 97%, respectively placed in same statistical group as chemical fungicides (Carpropamid). Evaluation of population dynamics showed that the populations of *Trichoderma* isolates were increased or decreased during 17d in greenhouse. *T. harzianum* RP6-1 and *T. atroviride* RS4-1, showed maximum increase and decrease of population, respectively. There was no correlation between the populations and disease control. In addition, 16 selected *Trichoderma* isolates were identified by morphological and molecular methods and 14, 1 and 1 isolates belonged to *T. harzianum*, *T. virens* and *T. atroviride*, respectively.

Keywords: Biocontrol, Rice, Phyllosphere, Greenhouse, *Magnaporthe oryzae*