ارزیابی کارآیی جدایه‌های تریکودرما در مهارزیستی بیماری پوسیدگی ذغالی سویا در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

رضاپور مهدی علمدارلو[۱]، آیدین حسن‌زاده[۱]، علی زمان میرآبادی[۱]، کامبیز فروزان[۲]

۱- مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعهٔ کشت دانه‌های روغنی، ساری، ایران

۲- شرکت توسعهٔ کشت دانه‌های روغنی، دفتر مرکزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: رضاپور مهدی علمدارلو، پست الکترونیک: rezapoorma@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۲۸ ۵ (۱) ۷۱-۸۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۹

چکیده

سویا مهم‌ترین دانهٔ روغنی در دنیا به‌حساب می‌آید. یکی از بیماری‌های شایع سویا پوسیدگی ذغالی با عامل *Macrophomina phaseolina* می‌باشد. مبارزهٔ شیمیایی روی بیماری مؤثر نبوده و مدیریت تلفیقی آن با روش‌های مختلف اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش به‌منظور دستیابی به‌جدایه‌های آنتاگونیست مناسب برای مهارزیستی بیماری، اثر ۱۲۶ جدایه تریکودرما (*Trichoderma* spp.) روی قارچ بیمارگر *M. phaseolina*، با روش‌های کشت متقابل و تأثیر ترکیبات فرّار در آزمایشگاه بررسی و ۱۲ جدایهٔ برتر برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شد. شناسایی جدایه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و با کلیدهای معتبر انجام شد که سه جدایه *Trichoderma reesei*، هفت جدایه *T. harzianum* و دو جدایه *T. atroviride* تشخیص داده شد. اثر ۱۲ جدایهٔ فوق به‌همراه دو تیمار شاهد (مثبت و منفی) روی بیماری پوسیدگی ذغالی سویا در گلخانه بررسی شد. پس از سترون نمودن خاک گلدان‌ها، بیمارگر به آن اضافه شده و جدایه‌های تریکودرما هنگام کاشت سویا، مایه‌زنی شد. برای ایجاد شرایط مناسب برای آلودگی، در اوایل گل‌دهی تنش خشکی در گلدان‌ها اعمال شد. در پایان دورهٔ آلودگی، میزان کاهش وقوع بیماری روی سویا و کاهش جمعیت میکرواسکلروت‌های بیمارگر در خاک تعیین شد که از هر دو لحاظ بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P<0/01$). بیشترین میزان کاهش وقوع بیماری و کاهش تعداد میکرواسکلروت در شاهد منفی (بدون ماکروفومینا و تریکودرما) مشاهده شد. جدایه‌های ARCTr144 (*T. reesei*)، ARCTr102 (*T. harzianum*)، ARCTr184 (*T. reesei*) و ARCTr105 (*T. atroviride*) با داشتن بیشترین میزان کاهش وقوع بیماری (۷۵-۶۲ درصد) و کاهش تعداد میکرواسکلروت (۸۵-۷۳ درصد) پس از شاهد منفی، به‌عنوان تیمارهای برتر معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: مهار زیستی، پوسیدگی ذغالی سویا، جدایه تریکودرما، میکرواسکلروت، آلودگی

مقدمه

سویا مهم‌ترین دانهٔ روغنی در دنیا بوده و بیشترین سطح زیر کشت و تولید در میان دانه‌های روغنی مختلف، به این محصول اختصاص دارد (http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC). کشت سویا در ایران از اوایل دههٔ ۱۳۴۰ شروع شده و براساس آمار وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ میزان کشت سویا در کشور ۶۱۵۰۰ هکتار و میزان تولید آن ۱۴۰۰۰۰ تن بوده که بیشترین سطح کشت و تولید مربوط به استان‌های گلستان، اردبیل و مازندران می‌باشد. پوسیدگی ذغالی سویا با عامل *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid از بیماری‌های رایج این زراعت در مناطق مختلف کشت آن در دنیا می‌باشد که در استان‌های مازندران وگلستان نیز شایع است. در سال‌های خشک و کم باران میزان آلودگی به این بیماری و خسارت آن بیشتر بوده و سبب کاهش کمیّت و کیفیت محصول سویا می‌شود (Rayatpanah & Alavi, 2006; Smith & Wyllie, 1999). به‌دلیل خاکزی بودن قارچ بیمارگر و توان بالای ساپروفیتی آن در خاک، کنترل آن به‌راحتی امکان‌پذیر نمی‌باشد و قارچ‌کش‌ها نیز کارآیی چندانی در کنترل بیماری ندارند

(Wrather *et al.*, 1998; Mengistu *et al.*, 2011). بنابراین استفاده از روش کنترل بیولوژیک مورد توجه محققین قرارگرفته و نتایج مثبتی نیز به‌همراه داشته است (Gajera *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2012). جدایه‌های تریکودرما یکی از عوامل مهم کنترل بیولوژیک می‌باشند که با رقابت غذایی، تماس مستقیم هیف، حل کردن دیوارهٔ سلولی و نفوذ به‌داخل آن، ترشح مواد فرّار و برخی از آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها، باعث متلاشی شدن و اختلالات فیزیولوژیکی در میزبان شده و از این رو قادر به کنترل برخی از عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند (Benitez *et al.*, 2004; Howell, 2003; Khaledi & Taheri, 2016). تحقیق در زمینهٔ کنترل بیولوژیک عامل بیماری پوسیدگی ذغالی توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما دارای سابقه طولانی می‌باشد. در یک تحقیق اثرات چهار جدایه *Trichoderma harzianum* روی *M. phaseolina* در شرایط مختلف بررسی شده که جدایه‌های تریکودرما سبب جلوگیری از رشد پرگنه و کاهش تولید میکرواسکلروت بیمارگر در آزمایشگاه شد. در گلخانه تلقیح خاک با جدایه‌های تریکودرما سبب کاهش وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی لوبیا به‌میزان ۷۴-۳۷ درصد و همچنین کاربرد تریکودرما سبب کاهش پوسیدگی ذغالی ریشهٔ خربزه و ذرت به‌ترتیب به‌میزان ۲۲ و ۲۸ درصد در شرایط مزرعه شد (Elad *et al.*, 1986). در تحقیقی دیگر، جدایه‌ای از *T. harzianum* سبب بازداری از رشد *M. phaseolina* به‌ترتیب به‌میزان ۵۵/۳ و ۱۲/۲ درصد در آزمون‌های کشت متقابل و تأثیر ترکیبات فرّار در شرایط آزمایشگاه شد و در گلخانه نیز جدایه فوق باعث کاهش اثرات سوء بیمارگر و افزایش وزن تر و خشک ریشه به‌ترتیب به‌میزان ۵۷/۵ و ۵۳/۶ درصد و افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی به‌ترتیب به‌میزان ۲۲/۹ و ۱۱/۸ درصد در مقایسه با شاهد شد (Vasebi *et al.*, 2012). همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر ۱۲ جدایه تریکودرما روی قارچ *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاه بررسی شد که دو جدایه *T. harzianum* در آزمون‌های کشت متقابل و ترکیبات فرّار اثر خوبی در بازداری از رشد بیمارگر داشتند و در آزمایش‌های صحرایی نیز این دو جدایه سبب کاهش بیماری پوسیدگی ذغالی سویا و رشد بهتر گیاه شدند (Khaledi & Taheri, 2016). هم‌چنین تأثیر دو جدایه از گونه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* در کنترل این بیمارگر و القای مقاومت گیاه نسبت به آن در شرایط گلخانه بررسی شده که پس از آلوده‌سازی خاک با بیمارگر، جدایه *T. harzianum* سبب کاهش بیماری به ترتیب به میزان ۶۲ و ۶۵ درصد در خاک سترون و غیر سترون شده و این مقادیر برای جدایه *T. atroviride* به‌ترتیب به‌میزان ۵۹ و ۶۲ درصد و در حالت تلفیق دو جدایه یاد شده با هم، به‌ترتیب به‌میزان ۶۷ و ۷۰ درصد بوده است که در مجموع جدایه *T. harzianum* تأثیر بیشتری از جدایه *T. atroviride* در کاهش بیماری داشته و تلفیق دو جدایه مؤثرتر از کاربرد تکی آن‌ها بوده است (Kia & Rahnama, 2016). در یک مطالعه دو ساله، تأثیر *T. harzianum* روی میزان بقای *M. phaseolina* و سایر قارچ‌های همراه بقایای سویا در شرایط محیطی استان گلستان مورد بررسی قرارگرفت و نتایج نشان داد که نقش ترکیبی *T. harzianum* به‌عنوان مایکوپارازیت و تجزیه کننده قوی مواد گیاهی، سبب کاهش بقای *M. phaseolina* و سایر قارچ‌های همراه در بقایای گیاهی مدفون در خاک شد (Taliei *et al.*, 2012). در تحقیق دیگری برای دستیابی به جدایه قارچی با پتانسیل تولید آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز، تعداد ۳۰ جدایه از گونه‌های مختلف تریکودرما مورد مطالعه قرارگرفت که جدایه *T. reesei* فعال‌ترین جدایه از نظر تولید این آنزیم در شرایط بهینه بود (Bahramsari *et al.*, 2005). هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما روی بیمارگر *M. phaseolina* و دستیابی به جدایه‌های مؤثر برای مهار زیستی این بیمارگر می‌باشد تا از این طریق بتوان اقدامات مؤثرتری برای مدیریت تلفیقی بیماری انجام داد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک و جداسازی تریکودرما

تعداد ۴۸ نمونه خاک به‌طور تصادفی از زمین‌های زراعی و بایر مناطق مختلف استان‌های مازندران و گلستان

طی سال ۱۳۸۹ گرفته شد. برای تهیه نمونه، پس از کنار زدن خاک سطحی، از عمق ۳۰-۵ سانتی‌متری خاک نمونه‌برداری انجام شده و نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی جدایه‌های تریکودرما از خاک با استفاده از محیط کشت انتخابی الاد و چت (Elad & Chet, 1983) انجام شد. ترکیبات این محیط کشت شامل MgSO4، K2HPO4، KCL، NH4NO3، گلوکز، کلرامفنیکول، پنتاکلرونیتروبنزن، رزبنگال، آگار و کاپتان می‌باشد. ابتدا سوسپانسیون از نمونه خاک به‌روش رقیق نمودن متوالی (Serial Dilution) تهیه شده و یک میلی‌لیتر از آن روی محیط مذکور پخش شده و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. هر کدام از پرگنه‌های تریکودرمای رشد کرده، روی محیط کشت جدید منتقل شده و خالص سازی آن‌ها به‌روش تک اسپور انجام شد. جدایه‌های حاصله به‌کمک دستگاه خشک‌کن انجمادی (freeze dryer) منجمد شده و برای بررسی‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

تهیه جدایه بیمارگر

قارچ *M. phaseolina* از نمونه‌های سویا دارای علایم بیماری پوسیدگی ذغالی که از مزرعه آزمایشی واقع در ساری تهیه شده بود، جداسازی شد. قطعاتی از طوقه بوته بیمار سویا تهیه و پس از شستشوی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی شده و سپس شستشوی سطحی و خشک شده و روی محیط کشت سیب زمینی، دکستروز و آگار (PDA) کشت داده شد. برای رشد قارچ بیمارگر، نمونه‌های کشت داده شده در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس و در شرایط تاریکی به‌مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شدند و خالص‌سازی قارچ برای بررسی‌های بعدی به‌روش نوک ریسه صورت گرفت (Almomani *et al.*, 2013).

بررسی‌های آزمایشگاهی

آزمون کشت متقابل

دیسک‌های پنج میلی‌متری از قارچ بیمارگر و هر کدام از جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز آگار (PDA) در دو طرف ظرف پتری ۹ سانتی‌متری مقابل هم کشت داده شد و در ظرف پتری شاهد نیز در یک طرف قارچ بیمارگر و در مقابل آن دیسک محیط کشت قرار داده شد. سپس ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت چهار روز نگهداری شده و میزان رشد قارچ‌ها در آن‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد (Abassi *et al.*, 2014; Dennis & Webster, 1971a & Khodaei *et al.*, 2012). به‌کمک معادلهٔ $I = [(C - T)/C] \times 100$ میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما، محاسبه شد که در آن I درصد بازدارندگی از رشد ماکروفومینا، C میزان رشد ماکروفومینا در شاهد و T میزان رشد ماکروفومینا در برابر جدایه‌های تریکودرما می‌باشد.

آزمون تأثیر ترکیبات فرّار (volatile compounds)

در این آزمون دیسک پنج میلی‌متری از بیمارگر و هرکدام از جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز و آگار (PDA) در مرکز پتری نه سانتی‌متری به‌طور جداگانه کشت شده، درب پتری‌ها در شرایط سترون برداشته شده و قسمت ته ظروف پتری که حاوی محیط کشت و پرگنه قارچ‌های بیمارگر و آنتاگونیست بود، روبه‌روی هم قرار داده شده و با پارافیلم دور آن‌ها پوشانده شد. در نمونه شاهد نیز روبه‌روی ظرف پتری حاوی قارچ ماکروفومینا، یک ظرف پتری حاوی محیط کشت بدون قارچ قرار داده شد. پس از چهار روز نگهداری در انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، میزان رشد قارچ‌ها در ظروف پتری اندازه‌گیری و ثبت شد (Abassi *et al.*, 2014; Dennis & Webster, 1971b & Khodaei *et al.*, 2012). میزان بازداری از رشد قارچ ماکروفومینا توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما به‌کمک معادله $I = [(C - T)/C] \times 100$ محاسبه شد که در آن I درصد بازدارندگی از رشد ماکروفومینا، C میزان رشد ماکروفومینا در شاهد و T میزان رشد ماکروفومینا در برابر جدایه‌های تریکودرما می‌باشد.

شناسایی گونه‌های تریکودرما

شناسایی جدایه‌های تریکودرما که در مطالعات آزمایشگاهی نتایج بهتری داشته و برای استفاده در آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند، انجام شد. این جدایه‌ها روی

محیط‌های مختلف کشت شده و براساس میزان رشد، مشخصات پرگنه و خصوصیات ریخت‌شناختی شامل نحوهٔ انشعاب کنیدیوفورها، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و ریسه‌ها و به‌کمک کلیدهای معتبر شناسایی شد (Gams & Bisset, 1998).

بررسی‌های گلخانه‌ای

در این مرحله ۱۲ جدایه تریکودرما که در بررسی‌های آزمایشگاهی بیشترین تأثیر را در بازداری از رشد قارچ ماکروفومینا داشتند، برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند. اجرای آزمایش در شرایط طبیعی در داخل گلدان و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. آزمایش دارای ۱۴ تیمار بود که تیمارهای ۱ تا ۱۲ شامل جدایه‌های تریکودرما ARCTr102، ARCTr105، ARCTr142، ARCTr144، ARCTr164، ARCTr174، ARCTr183، ARCTr184، ARCTr187، ARCTr266، ARCTr281 و ARCTr318 بررسی شده در تحقیقات آزمایشگاهی بوده و تیمارهای ۱۳ و ۱۴ نیز به‌ترتیب شاهدهای مثبت و منفی بوده که در شاهد مثبت فقط جدایه ماکروفومینا با خاک تیمار شده بود و در شاهد منفی هیچ نوع تیماری انجام نشده بود. جدایه‌های تریکودرما و ماکروفومینا در شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت PDA تکثیر شد. برای هر تیمار تعداد سه گلدان هرکدام حاوی چهار بوته سویا در نظرگرفته شد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها مخلوطی از ورمی‌کمپوست و خاک زراعی بوده که ابتدا در اتوکلاو و با دمای ۱۲۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت یک ساعت سترون شده و سپس جدایهٔ ماکروفومینا مورد نظر با درنظر گرفتن حداقل ۷۰ عدد میکرو اسکلروت در هر گرم خاک و به‌طور یکنواخت به‌آن اضافه شده (Mihail, 1989) و در زمان کاشت سویا سوسپانسیون هاگ جدایه‌های تریکودرما (دارای حداقل 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر) به‌شکل خیساندن خاک و به‌میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌ازای هر کیلوگرم خاک به گلدان‌ها اضافه شده (Parakhia & Vaishnav, 1986) و بذرهای سویا رقم تلار در آن‌ها کشت شد. برای ایجاد شرایط مناسب برای آلودگی در ابتدای دوره گل‌دهی تنش خشکی در گلدان‌ها اعمال شد. با شروع آلودگی به بیماری، علایم بیماری در تیمارهای مختلف بررسی شده و در مرحلهٔ رسیدگی سویا، میزان وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی در هر تیمار براساس تعداد بوته‌های دارای علایم بیماری نسبت به کل بوته‌های داخل گلدان‌های مربوط به آن تیمار تعیین شد (Smith & Carvil, 1997). میزان کاهش وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی در تیمارهای مختلف با استفاده از معادله $II = [(IC - IT)/IC] \times 100$ محاسبه شد که در آن II درصد کاهش وقوع بیماری، IC میزان وقوع بیماری در شاهد مثبت و IT میزان وقوع بیماری در تیمار مورد نظر می‌باشد. پس از مرحلهٔ رسیدگی سویا و پایان دورهٔ آلودگی به‌بیماری، جمعیت میکرواسکلروت‌های قارچ ماکروفومینا در خاک گلدان‌ها در تیمارهای مختلف تعیین شد. برای تعیین تعداد میکرواسکلروت‌های قارچ نمونه‌های ۱۰ گرمی خاک از هر گلدان تهیه شده و در دمای معمولی آزمایشگاه هوا دهی و خشک شد. سپس نمونه‌ها را از الک دو میلی‌متری عبور داده تا ذرات بزرگ شامل سنگ‌ریزه‌ها و بقایای گیاهی همراه حذف شوند. یک گرم از خاک الک شده به ۲۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۵۲۵ درصد هیپوکلریت سدیم اضافه شده و ۱۰ دقیقه روی هم‌زن کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل روی الک ۴۰۰ مش با آب مقطر استریل شسته شد و مواد باقی‌مانده روی الک به ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. به مخلوط حاصل ۱۰۰ میلی لیتر محیط PDA با حرارت ۵۵ درجهٔ سلسیوس حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات استرپتومایسین ۵ درصد و ۰/۱۳ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم ۰/۵۲۵ درصد اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به خوبی تکان داده شد و در داخل ظروف پتری استریل ریخته شد. این پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۳۱ درجهٔ سلسیوس و شرایط تاریکی نگه‌داری شده و پرگنه‌های قارچ سپس از سه روز شمارش شده و جمعیت قارچ بیمارگر در هرگرم نمونه خاک تعیین شد (McCain & Smith, 1972). همچنین میزان کاهش جمعیت میکرواسکلروت‌ها با استفاده از معادلهٔ $IS = [(SC - ST)/SC] \times 100$ محاسبه شد که در آن IS درصد کاهش میکرواسکلروت‌ها، SC تعداد میکرواسکلروت‌ها در شاهد مثبت و ST تعداد میکرواسکلروت‌ها در تیمار مورد نظر می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. داده‌های مربوط به مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب فایل اکسل تنظیم شده و تجزیه و تحلیل آماری آن به‌کمک نرم‌افزار StatGraphics Centurion XV, Version 15.2 انجام شد. مقایسهٔ میانگین تیمارها نیز با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج

تعداد جدایه‌های تریکودرما

از ۴۸ نمونه خاک مربوط به استان‌های گلستان (۲۶ نمونه) و مازندران (۲۲ نمونه)، تعداد ۱۲۶ جدایهٔ قارچ تریکودرما جداسازی و خالص‌سازی شد که ۶۴ جدایه مربوط به‌نمونه‌های خاک استان گلستان و ۶۲ جدایه مربوط به استان مازندران بود.

بررسی‌های آزمایشگاهی

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد بیمارگر ماکروفومینا و جدایه‌های مختلف تریکودرما در پتری‌های مربوط به‌روش‌های کشت متقابل($df=125,\ F=26.1,\ P<0.01$) و مواد فرّار ($df=125,\ F=12.33,\ P<0.01$)، نشان داد که در هر دو آزمون از لحاظ درصد بازدارندگی از رشد ماکروفومینا، بین جدایه‌های تریکودرما اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به‌میزان بازدارندگی از رشد قارچ ماکروفومینا توسط جدایه‌های تریکودرما در هر دو روش با استفاده از آزمون دانکن انجام شد که در جدول ۱ فهرست ۱۵ جدایه برتر و ۱۰ جدایه ضعیف‌تر هر کدام از بررسی‌ها درج شده است. با توجه به زیاد بودن تعداد جدایه‌ها، کل اسامی آورده نشده است.

براساس میانگین نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی، تعداد ۱۲ جدایه تریکودرما که تأثیر بیشتری در بازداری از رشد قارچ ماکروفومینا داشتند، انتخاب شدند که شامل جدایه‌های ARCTr102، ARCTr105، ARCTr142، ARCTr144، ARCTr164، ARCTr174، ARCTr183، ARCTr184، ARCTr187، ARCTr266، ARCTr281 و ARCTr318 بود که در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند.

مشخصات جدایه‌های تریکودرما

نتیجه شناسایی جدایه‌های برتر بررسی‌های آزمایشگاهی، براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و به‌کمک کلیدهای معتبر نشان داد که سه جدایه متعلق به‌گونهٔ *T. reesei*، هفت جدایه متعلق به *T. harzianum* و دو جدایه نیز متعلق به *T. atroviride* می‌باشد که مشخصات جدایه‌ها در جدول ۲ درج شده است.

جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Macrophomina phaseolina* توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما با روش‌های کشت متقابل و ترکیبات فرّار (۱۵ جدایه برتر و ۱۰ جدایه ضعیف‌تر).

Table 1. Results of mean comparison of data related to inhibition percent of *Macrophomina phaseolina* by different *Trichoderma* isolates with dual culture and volatile compounds tests (15 better isolates and 10 worse isolates).

Inhibition in dual culture test (%)		Inhibition in volatile compounds test (%)	
Treatment	Mean	Treatment	Mean
ARCTr266	84.8 a	ARCTr144	97.1a
ARCTr105	84.1 a	ARCTr102	95.2ab
ARCTr184	81.8 ab	ARCTr281	91.9bc
ARCTr187	81.8 ab	ARCTr318	91.4bcd
ARCTr183	78.8 abc	ARCTr187	90.0bcd
ARCTr164	75.0 abcd	ARCTr142	89.5bcd
ARCTr142	72.7 bcde	ARCTr105	89.0bcd
ARCTr281	71.2 bcde	ARCTr174	89.0bcd
ARCTr144	71.2 bcde	ARCTr164	88.1bcde
ARCTr145	70.5 cdef	ARCTr184	86.2cdef
ARCTr103	69.7 cdef	ARCTr248	81.4defg
ARCTr168	68.9 cdefg	ARCTr250	81.0defg
ARCTr113	66.7 defgh	ARCTr234	80.5defghi
ARCTr162	65.9 defgh	ARCTr241	80.5defghi
ARCTr139	65.2 defgh	ARCTr162	80.0defghi
⋮	⋮	⋮	⋮
ARCTr269	8.3 uvwxy	ARCTr156	10 vwxy
ARCTr261	8.3 uvwxy	ARCTr151	6.2 wxyz
ARCTr125	7.6 vwxy	ARCTr130	5.2 xyz
ARCTr300	6.8 vwxy	ARCTr152	4.8 yz
ARCTr267	5.3 wxyz	ARCTr147	3.8 z
ARCTr106	5.3 wxyz	ARCTr150	2.4z
ARCTr130	5.3 wxyz	ARCTr148	0z
ARCTr262	4.5 xyz	ARCTr155	0z
ARCTr268	3.8 yz	ARCTr153	0z
ARCTr260	2.3 z	ARCTr149	0z

بررسی‌های گلخانه‌ای

نتایج حاصل از تجزیه آماری و مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بررسی جدایه‌ها در شرایط گلخانه، نشان داد (جدول ۳) که هم از لحاظ درصد کاهش وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی (df=13, F=134.69, P<0.01) و هم از لحاظ درصد کاهش میکرواسکلروت‌های قارچ ماکروفومینا موجود در خاک گلدان‌ها (df=13, F=1111.64, P<0.01)، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های تریکودرما استفاده شده در بررسی‌های گلخانه‌ای.

Table 2. Characteristic of *Trichoderma* isolates used in greenhouse studies.

Isolate code	Species	Habitat	Location (province)
ARCTr102	*T. harzianum*	soil	Mazandaran
ARCTr105	*T. atroviride*	soil	Mazandaran
ARCTr142	*T. harzianum*	soil	Mazandaran
ARCTr144	*T. reesei*	soil	Golestan
ARCTr164	*T. harzianum*	soil	Golestan
ARCTr174	*T. harzianum*	soil	Golestan
ARCTr183	*T. harzianum*	soil	Mazandaran
ARCTr184	*T. reesei*	soil	Golestan
ARCTr187	*T. reesei*	soil	Golestan
ARCTr266	*T. atroviride*	soil	Mazandaran
ARCTr281	*T. harzianum*	soil	Golestan
ARCTr318	*T. harzianum*	soil	Golestan

در تیمار شاهد منفی قارچ بیمارگر وجود نداشته و بیماری رخ نداده است و تیمار شاهد مثبت که تنها حاوی قارچ بیمارگر بوده، بیشترین میزان آلودگی به‌بیماری و بیشترین تعداد میکرواسکلروت بیمارگر را داشته است. میزان کاهش وقوع بیماری و کاهش جمعیت میکرواسکلروت در خاک در تیمارهای مربوط به‌جدایه‌های تریکودرما در مقایسه با شاهد مثبت تعیین شده براین اساس تیمارهای مربوط به‌جدایه‌های تریکودرما ARCTr144، ARCTr102، ARCTr184 و ARCTr105 با داشتن بیشترین میزان کاهش وقوع بیماری و کاهش جمعیت میکرواسکلروت در نمونه‌های خاک، به‌عنوان تیمارهای برتر برای ادامه تحقیقات روی آن‌ها معرفی شدند.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به درصد کاهش وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی و کاهش جمعیت میکرواسکلروت‌های *Macrophomina phaseolina* در خاک در بررسی گلخانه‌ای.

Table 3. Results of mean comparison of data related to decreasing the incidence of charcoal rot disease and decreasing the population of *Macrophomina phaseolina* microsclerotia in the soil in greenhouse study.

Decrease of disease incidence (%)		Decrease of microsclerotia population (%)	
Treatment	Mean	Treatment	Mean
ARCTr144	74.7 b	ARCTr144	84.8 b
ARCTr102	73.1 bc	ARCTr102	82.2 c
ARCTr184	67.2 cd	ARCTr184	78.9 d
ARCTr105	62.7 d	ARCTr105	73.1 e
ARCTr164	56.6 e	ARCTr187	68.3 f
ARCTr187	50.8 ef	ARCTr164	63.4 g
ARCTr174	49.2 fg	ARCTr174	62.8 g
ARCTr142	46.2 fgh	ARCTr142	62.7 g
ARCTr266	44.8 gh	ARCTr266	58.3 h
ARCTr183	41.8 h	ARCTr183	57.9 h
ARCTr318	32.5 i	ARCTr281	35.7 i
ARCTr281	26.8 i	ARCTr318	23.9 j

بحث

در این پژوهش همان‌طور که در جداول ۱ و ۳ نشان داده شده است، جدایه‌های مختلف تریکودرما در شرایط آزمایشگاه و در آزمون‌های کشت متقابل و تأثیر ترکیبات فرّار به‌ترتیب سبب بازداری از رشد قارچ بیمارگر *M. phaseolina* به‌میزان ۲ الی ۸۵ و صفر الی ۹۷ درصد شده و در شرایط گلخانه نیز جدایه‌های برتر تریکودرما در مقایسه با شاهد مثبت سبب کاهش وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی به‌میزان ۲۷ الی ۷۵ درصد و کاهش جمعیت میکرواسکلروت‌های قارچ بیمارگر به‌میزان ۲۴ الی ۸۵ درصد شده است. محققین مختلف در ایران و سایرکشورها، بررسی‌های زیادی در زمینه مهارزیستی بیمارگر *Macrophomina* توسط جدایه‌های مختلف قارچ آنتاگونیست تریکودرما در شرایط آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه انجام داده‌اند که نتایج برخی از این مطالعات با پژوهش حاضر مطابقت داشته و در مواردی نیز اختلافاتی

بین نتایج حاصل از این بررسی‌ها با هم و یا با این تحقیق وجود داشته است. برای مقایسه به‌نتایج تعدادی از بررسی‌های انجام شده در این زمینه اشاره می‌شود. در یک تحقیق جدایه‌های مربوط به‌گونه‌های مختلف تریکودرما (*T. harzianum, T. virens, T. atroviride, T. viride*) در آزمون‌های کشت متقابل و تأثیر ترکیبات فرّار به‌ترتیب به‌میزان ۲۸ الی ۷۵ و ۱۳ الی ۷۴ درصد سبب بازداری از رشد قارچ *Macrophomina* شده است (Rashmi *et al.,* 2012) و در مطالعهٔ دیگر، جدایه‌ای از *T. harzianum* در آزمون کشت متقابل به‌میزان ۵۵ درصد و در ترکیبات فرّار ۱۲ درصد از رشد *Macrophomina* جلوگیری نموده است (Vasebi *et al.,* 2012). جدایه‌ای از *T. viride* سبب بازداری از رشد شعاعی ماکروفومینا به‌میزان ۷۱ درصد شده است (Doley & Jite, 2012) و در بررسی دیگر چهار جدایه از *T. harzianum* در کشت متقابل با *Macrophomina* سبب بازداری از رشد شعاعی آن به‌میزان ۳۷، ۶۲، ۷۴ و ۸۳ درصد شده است. کاربرد این جدایه‌ها در گلخانه نیز سبب کاهش وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی در میزبان‌های لوبیا و خربزه به‌ترتیب به‌میزان ۷۴-۳۷ درصد و ۴۶/۳-۳۷/۵ درصد شده است (Elad *et al.,* 1986). جدایه‌ای از قارچ *T. harzianum* سبب کاهش ۵۱ درصدی پوسیدگی ذغالی در شرایط گلخانه‌ای در گیاه ماش شده است (Shahid & Khan, 2016). هم‌چنین دو جدایه از *T. viride* و *T. harzianum* سبب کاهش وقوع این بیماری به‌میزان ۷۳ و ۶۷ درصد روی گیاه بادام‌زمینی در شرایط گلخانه‌ای شده است (Kumar *et al.,* 2015). نتایج مربوط به‌این بررسی و مطالعات انجام شده توسط سایر محققین بیان‌گر این است که میزان تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی قارچ ماکروفومینا در شرایط آزمایشگاه و گلخانه متفاوت می‌باشد که این اختلاف می‌تواند مربوط به‌نوع گونه، منشأ جغرافیایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها باشد. بنابراین جداسازی تریکودرما از مناطق مختلف و بررسی تأثیر آن‌ها روی بیمارگرهای مختلف برای دست‌یابی به‌نتایج مثبت ضروری است.

دو جدایه‌ای که در بررسی‌های گلخانه‌ای تأثیر مثبتی در کاهش بیماری پوسیدگی ذغالی داشتند، از گونهٔ *T. reesei* تشخیص داده شدند که براساس تحقیقات انجام شده این گونه از نظر تولید آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز، فعالیت بالایی دارد و بیشترین میزان تولید این آنزیم را در بین جدایه‌های مختلف تریکودرما دارا بوده است (Bahramsari *et al.,* 2005) و دو جدایه دیگر که از گونه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* شناسایی شدند نیز در تولید آنزیم‌های کیتیناز فعالیت بالا داشته‌اند (Harighi *et al.,* 2007; Seyed Asli *et al.,* 2004) که با توجه به‌این‌که دیوارهٔ سلولی بیشتر قارچ‌ها از کیتین و گلوکان تشکیل شده است، این جدایه‌ها می‌توانند نقش زیادی در مهارزیستی بیمارگرهای قارچی مختلف از جمله *M. phaseolina* داشته باشند و ادامه تحقیق روی آن‌ها توصیه می‌شود.

References

Abassi, S., Safaie, N., Shamsbakhsh, M. & Shahbazi, S. 2014. Evaluation of antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* mutants against some plant pathogenic fungi in vitro. Journal of plant protection, 37(4): 91-102. (In Persian with English summary).

Almomani, F., Alhawatema, M. & Hameed, K. 2013. Detection, identification and morphological characteristic of *Macrophomina phaseolina*: The charcoal rot disease pathogen isolated from infected plants in Northern Jordan. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 46(9): 1005-1014.

Bahramsari, N., Zamani, M.R. & Motallebi, M. 2005. β- 1, 3-glucanase production in *Trichoderma* isolates. Iranian Journal of Biology, 18(3): 261-271. (In Persian with English summary).

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

Dennis, C. & Webster, J. 1971a. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma*. III: Hyphal interaction. Transactions of British Mycological Society, 57: 363-369.

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

Doley, K. & Jite, P.K. 2012. In-Vitro Efficacy of *Trichoderma viride* against *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. Notulae Scientia Biologicae, 4(4): 39-44.

Elad, Y. & Chet, I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica, 11: 55-58.

Elad, Y., Zvieli, y. & Chet, I. 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum.* Crop Protection, 5(4): 288-292.

Gajera, H.P., Bambharolia, R.P., Patel, S.V., Khatrani, T.J. & Goalkiya, B.A. 2012. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina:* Evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 3: 149.

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.

Gupta, G.K., Sharma, S.K. & Ramteke, R. 2012. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Journal of Phytopathology, 160(4): 167-180.

Harighi, M.J., Zamani, M.R. & Motallebi, M. 2007. Evaluation of antifungal activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. Biotechnology, 6(1): 28-33.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87: 4-10.

Khaledi, N. & Taheri, P. 2016. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Plant Protection Research, 56(1): 21-31.

Khodaei, A., Arzanlou, M. & Babai Ahari, A. 2012. Inhibitory effects of three *Trichoderma* species against three species of *Fusarium* in laboratory conditions. Journal of Agricultural Science and Sustainable production, 22(4.1): 105-115. (In Persian with English summary).

Kia, S. & Rahnama, K. 2016. Study on the efficiency of *Trichoderma* isolates in controlling charcoal rot disease of soybean caused by *Macrophomina phaseolina* under greenhouse conditions. Biocontrol in Plant Protection, 4(1): 1-10. (In Persian with English summary).

Kumar, P., Gaur, V.K., & Rani, R. 2015. Evaluation of antagonists against *Macrophomina phaseolina* causing root rot of groundnut. African Journal of Microbiology Research, 9(3): 155-160.

McCain, A.H., & Smith, R.S. 1972. Quantitative assay of *Macrophomina phaseoli* from soil. Phytopathology, 62: 1098.

Mengistu, A., Smith. J.R., Ray, J.D., & Bellaloui, N. 2011. Seasonal progress of charcoal rot and its impact on soybean productivity. Plant Disease, 95: 1159-1166.

Mihail, J.D. 1989. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculum and of disease in a highly susceptible crop. Phytopathology, 79: 848-855.

Parakhia, A.M., & Vaishnav, M.U. 1986. Biocontrol of *Rhizoctonia bataticolana*. Indian Phytopathology, 39: 439-440.

Rashmi, S., Maurya, S. & Upadhyay, R.S. 2012. Antifungal potential of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina.* Journal of Agricultural Technology, 8(6): 1925-1933.

Rayatpanah, S. & Alavi, S.V. 2006. Study on soybean charcoal rot disease in Mazandaran. Journal of Agricultural Science and Natural Resources, 13: 107-114. (In Persian with English summary).

Seyed Asli, N., Zamani, M.R., Motallebi, M. & Harighi, M.J. 2004. Study of chitinolytic enzyme production in *Trichoderma* isolates. Iranian Journal of Biology, 17(3): 227-246. (In Persian with English summary).

Shahid, S. & Khan, M.R. 2016. Biological control of root-rot on Mungbean plants incited by *Macrophomina phaseolina* through microbial antagonists. Plant Pathology Journal, 15: 27-39.

Smith, G.S. & Carvil, O.N. 1997. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease, 81: 363-368.

Smith, G.S. & Wyllie, T. 1999. Charcoal rot. pp. 29-31. In: Hartman, G.L., Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (eds.), Compendium of Soybean Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Taliei, T., Safaei, N. & Aghajani, M.A. 2012. Survival of *Macrophomina phaseolina* and associated mycobiota on soybean residuals and the effect of *Trichoderma harzianum* on their population dynamics. Journal of Applied Researches in Plant Protection, 1: 1-13. (In Persian with English summary).

Vasebi, Y., Alizadeh, A. & Safaie, N. 2012. Biological control of soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* using *Trichoderma harzianum.* Journal of Sustainable Agriculture and Production Science, 22(1): 41-54. (In Persian with English summary).

Wrather, J.A. & Kendig, S.R. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. Plant Disease, 82: 247-250.

Evaluation of the efficacy of *Trichoderma* isolates in the biological control of soybean charcoal rot disease in the laboratory and greenhouse conditions

Rezapoor Mehdi Alamdarlou[1], Idin Hasanzadeh[1], Ali Zaman Mirabadi[1], Kambiz Foroozan[2]

1. Applied Research and Seed Production Center, Oilseeds Research and Development Co., Sari, Iran

2. Oilseeds Research and Development Co., Tehran, Iran

Corresponding author: Rezapoor Mehdi Alamdarlou, email: rezapoorma@gmail.com

Received: Oct., 19, 2016 5 (1) 71-80 Accepted: Jan., 09, 2018

Abstract

Soybean is considered as the most important oilseed crop in the world. One of the common diseases of soybean is charcoal rot which is caused by *Macrophomina phaseolina.* Chemical control of this disease is not effective and its integrated management using different methods is important. In this research study, in order to obtain suitable antagonist isolates for the disease biological control, effect of 126 *Trichoderma* isolates on the causal pathogen, *M. phaseolina* was studied using dual culture and the effect of volatile compounds tests in the laboratory and 12 most effective isolates were selected for the greenhouse studies. Identification of the isolates was done based on the morphological characteristics using valid keys showed that three isolates recognized as *Trichoderma reesei,* seven as *T. harzianum* and two as *T. atroviride.* Effects of the above-mentioned isolates with two control treatments (positive and negative) were investigated on soybean charcoal rot in the greenhouse. After soil pasteurization in the pots, pathogen was added and *Trichoderma* isolates were used at soybean planting time. In order to create suitable conditions for the pathogen infection, drought stress applied in the pots at early flowering. At the end of infection period, decreasing the disease incidence on soybean and decreasing the population of pathogen microsclerotia in the soil were observed and there were significant differences among different treatments ($P<0.01$) regarding both factors. The highest decrease of disease incidence and microsclerotia population were observed in the negative control (without *Macrophomina* and *Trichoderma*). Isolates ARCTr144 (*T. reesei*), ARCTr102 (*T. harzianum*), ARCTr184 (*T. reesei*) and ARCTr105 (*T. atroviride*) showing the highest decrease of disease incidence (62-75 percent) and microsclerotia population (73-85 percent) after the negative control were the best and most effective isolates.

Keywords: biological control, soybean charcoal rot, *Trichoderma* isolate microsclerotium, infection