بررسی اثر آنتاگونیست چندجدا شده Trichoderma روی Phytophthora erythroseptica عامل بیماری پوسیدگی صورتی غده سیب زمینی

محمود اخوت، قربانعلی حجارود، حمید روحانی و دوستمراد ظفری

بترتیب استادیار ودانشیار گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج و دانشیار و مربی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان

تاریخ وصول بیست و پنجم اسفند ماه ۱۳۷۱

چکیده

قارچ Phytophthora erythroseptica Pethybr که باعث پوسیدگی سیاه ریشه، ساقه‌های زیرزمینی و صورتی[1] غده‌های سیب زمینی می‌شود، به گیاهان دیگر نیز زیان می‌رساند. در این بررسی اثرآنتاگونیست جدا شده‌هائی از Trichoderma Per.ex Fr. به چند روش مورد مطالعه قرار گرفت.

درآزمایش کشت متقابل[2] روی محیط کشت پ دآ[3] حاوی ۱۰ میلیگرم بنومیل[4] در میلی لیتر[5] نتایج نشان داد که کلیه جدا شده‌های تریکو درما قادر به جلوگیری از رشد رویشی قارچ عامل بیماری بوده و ملاحظه شد که پس از کلنیزه کردن ریسه‌های فیتوفترا باعث هضم آنها گردیده و قدرت رویشی آنها را از بین برده است. متابولیتهای تریکودرما ویریده[6] جدا شده از خاك مزرعه شهریار به میزان صدرصد کلنی فیتوفترا را از بین برد. ولی‌متابولیت اتوکلاو شده آن فقط به میزان ۳۳- ۲۴/۷ درصد رشد آن را تقلیل داد. ترکیبات فرار جداشده‌های تریکودرما در کاهش رشد کلنی فیتوفترا در مورد گونه تریکودرما هارزیانم[7] جدا شده از خاك مزرعه اهواز، دراختیار قرار گرفته از موسسه تحقیقات آفات و بیمارهای گیاهی، گونه تریکودرما کونین جی ای[8] دریافتی از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی، جدا شده‌های تریکودرما ویریده از خاك مزرعه شهریار و نمونه موسسه بترتیب ۲/۴، ۱۷/۷، ۲۹/۵، ۲۰ و ۱۷ درصد اندازه‌گیری شد.

مقدمه

سیب زمینی که نیازهای غذایی و صنعتی را تامین می‌کند از محصولات عمده و اساسی بشمار می‌رود. این گیاه مورد حمله آفات و بیماریهای زیادی قرار گرفته و در خلال دوره رشد و مدت انبارداری خسارت می‌بیند. قارچ P. erythroseptica نیز از جمله قارچهایی است که زیان آور بوده و سبب کاهش محصول می‌گردد. برای جلوگیری از خطرات

1- Pink rot 2- Double culture 3- PDA 4- Benomyl

5- 10 PPM 6- T. Viride 7- T. harzianum 8- T. koningii Oudem

ناشی از حمله عوامل بیماری زا در سیب زمینی باید راههای گوناگون را بکار برد و حتی المقدورمبارزات تلفیقی را اعمال نمود. به طوریکه از آلودگی محیط زیست کاسته و از بهم خوردن تعادل میکربی خاك و از بین رفتن عوامل مفید پرهیز شود.

استفاده از عوامل بیولوژیك یکی از روشهای مبارزه است که قبل از مبادرتُ به استفاده از آن باید اطلاعات کافی کسب کرد و ماهیت اثر آنها را شناخت.

Trichoderma قارچی است خاکزی که باعث کاهش جمعیت بسیاری از عوامل بیماریزا می‌گردد. کارآیی گونه‌هایی از تریکودرما بر علیه بعضی از قارچها به حدی بوده که حتی آن را به‌صورت تجارتی درآورده و به عنوان قارچکش میکربی مانند تریکوکیل[1] به بازار عرضه شده است. این گونه ها برخی اثر میکوپارازیتیسم، بعضی حالت‌آنتی بیوز (متابولیت ها و ترکیبات فرار)، عده‌ای در محل و یا غذا با عامل بیماری زا ضدیت و رقابت می‌کنند.

دنیس و وبستر (۹) به سال ۱۹۷۱ در آزمایشهای خود توانائی آنتاگونیسمی گونه‌های تریکودرما را روی تعدادی از قارچها مطالعه نموده و از آن جمله در بررسی اثر متقابل آنها و فیتوفترا به دو جدا شده تریکودرما ویریده دست یافتند که علاوه برهضم نمودن[2] ریسه‌های قارچ فیتوفترا اریتروسپتیکا در آنها نیز نفوذ کرد.

وین و اپتون (۱۵) وجود قارچها و باکتریهای آنتاگونیست را روی ائوسپورهای[3] این قارچ بیماریزا را گزارش نمودند.

پاپاویزا (۱۰) گزارش کرده، می‌توان جداشده‌ای از تریکودرما هارزیانم تهیه نمود که به سموم کلروتالونیل[4]، ایپرودین[5] و بنومیل[6] مقاوم بوده و قابل استفاده به صورت توام یا تلفیقی با این قارچکشها باشد و برعلیه بسیاری از قارچها بکار رود. این محقق در مبارزه تلفیقی از تریکودرما هارزیانم و قارچکش پنتا کلرونیتروبنزن[7] برعلیه بیماریهای سبزیجات و همچنین از این گونه و متیل برومایید[8] برعلیه قارچ ریزوکتونیا[9] روی توت فرنگی و گوجه‌فرنگی استفاده کرده‌است. طبق نظر او کاربرد قارچکشهای تیرام[10] و متالاکسیل[11]، کلروتالونیل، ایپرودین، پروسیمیدون[12]، وینکلوزولین[13] هیچگونه اثر بازدارندگی روی تریکودرما ندارند و قارچکشهای بنزیمیدازول[14] مانند بنومیل، تیابندازول[15] و تیوفانات متیل[16] روی تریکودرما تاثیر شدید دارد.

اسمیت و همکاران (۱۳) ثابت کردند که جدا شده‌های تریکودرما و گلیوکلدیوم[17] موجب جلوگیری از بیماریهای پوسیدگی ریشه و طوقه درخت سیب توسط گونه‌های فیتوفترا به ویژه گونه فیتوفترا کاکتوروم[18] می‌گردند.

فیتوفترا اریتروسپتیکا عامل بیماری پوسیدگی صورتی غده سیب زمینی به ریشه‌ها و ساقه‌های زیرزمینی نیز حمله کرده و آنها را قهوه‌ای و سیاه می‌کند. این قارچ درسال ۱۳۵۶ توسط ارشاد (۱) از غده‌های سیب زمینی آلوده مزارع دماوند جدا و بیماری زایی آن اثبات شد. نامبرده میزبانهای آن را گوجه فرنگی، اسفناج، نخودفرنگی، باقلای مصری[19]؛

1- Trichokill 2- lyses 3- Oospores 4- Chlorothalonil
5- Prodione 6- Benomyl 7- Pentachloronitobenzene 8- Methyl bromide
9- Rhizoctonia 10- Thiram 11- Methalaxyl 12- Prosimidon 13- Vinchlozline
14- Benzimidazole 15- Thianendazole 16- Thiophanat methyl 17- Gliocladium
18- Phytophthora cactorum 19- Luqine

وچندگیاه دیگر ذکر کرده و خسارت حاصل روی غده‌های سیب زمینی رقم پشندی را در دماوند ۵۰ درصد تخمین زد. بهروزین (۳) در سال ۱۳۶۴ بیماری را در مزارع سیب زمینی آذربایجان شرقی مشاهده و عامل آن را جدا نمود.

به منظور بررسی اثرچند جدا شده تریکودرما روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی صورتی غده سیب‌زمینی برای استفاده عملی از آن در مبارزه با بیماری مطالعاتی صورت گرفت که به شرح آنها و نتایج حاصله می‌پردازد.

مواد و روشها

تحقیقات در این زمینه به شرح زیر است:

۱ـ تهیه قارچهای آنتاگونیست و عامل بیماری:

دراین بررسی‌دوجداشده‌ازگونه T. viride یکی از مزارع لوبیای شهریارکرج به‌روش داوه(۷)به‌نقل ازظفری (۵) جدا، ودیگری‌ازموسسه‌تحقیقات‌آفات‌وبیماریهای گیاهی‌دریافت‌گردید. دوجداشده T. harzianum یکی ازمزارع اهوازجدا ودیگری‌ازموسسه ویك نمونه T. koningii ازسازمان‌پژوهشهای‌علمی‌وصنعتی کشوراخذشد. این‌گونه‌هابااستفاده‌ازکلیدریفائی (۱۱)، تشخیص داده‌شد. قارچ P. erythroseptica از موسسه‌تحقیقات‌آفات‌وبیماریهای‌گیاهی‌دراختیارقرارگرفت.

۲ ـ بررسی اثر میکوپارازیتیسم[1] جدا شده‌های تریکو درما روی کلنی فیتوفترا اریتروسپتیکا:

دراین روش یك قرص از محیط کشت که قارچ تریکودرما (جداشده‌ها) روی آن رشد کرده بود، روی نیمی از محیط عصاره سیب زمینی، دکستروز، آگار[2] داخل ظرف پتری گذاشته و در طرف مقابل قرص دیگر محیط کشت با قارچ عامل بیماری قرار گرفت و پتریها در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. این بررسی به منظور سهولت در امر رویت و اطمینان، به ۳ روش به ترتیب زیر انجام پذیرفت.

الف ـ فقط کشت متقابل[3] آنتاگونیست و پاتوژن به نحو فوق الذکر صورت گرفت.

ب ـ پس از کشت دو قارچ، قطعه‌ای از محیط کشت به شکل مثلث از وسط پتریهابا اسکالپر استریل برداشت شد.

ج ـ یك لام استریل درم در بین دو قارچ روی محیط کشت قرار داده شد. بعد از تماس ریسه های دو قارچ با یکدیگر تا مدت ۷ روز از آنها نمونه‌های میکروسکپی تهیه و مطالعه گردید.

۳ ـ بررسی قدرت کلنیزه کردن جدا شده های تریکودرما روی قارچ عامل بیماری:

در این بررسی ابتدا قارچ عامل بیماری روی محیط غذایی سیب زمینی، دکستروز، آگار در ۱۸ ظرف پتری کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تا زمانی که سطح محیط کاملا" توسط قارچ پوشانده شد (به مدت ۷ روز)، نگهداری گردید. آنگاه قرصهائی از کشت دو روزه جداشده‌های از خاك مزرعه شهریار و دریافتی از موسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی (موسسه)، گونه تریکودرما ویریده از خاك مزرعه اهواز و موسسه گونه تریکودرما هارزیانم و دریافتی از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی کشور گونه تریکودرما کونین جی ای را برداشته و هرقرص به طور جداگانه در پتری حاوی کشت ۷ روزه فیتوفترا قرار

1-Mycoparasitism 2- PDA 3- Double culture

داده و مجددا " در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۷ روز نگهداری شد. از کشت فیتوفترا بدون اضافه کردن قرصهای کشت جدا شده‌های آنتاگونیستها به‌عنوان شاهد استفاده گردید. برای هر تیمار از هر جدا شده و شاهد ۳ تکرار (پتری) بکاربرده شد. قدرت کلنیزه کردن جدا شده‌های مختلف تریکودرما با دقت مشاهده و قدرت زنده ماندن فیتوفترا در اثر آنتاگونیستها به روش زیر بررسی گردید:

۴ - بررسی زنده ماندن قارچ عامل بیماری کلنیزه شده توسط جدا شده‌های تریکودرما:

دراین آزمایش محیط کشت سیب زمینی، دکستروز آگار حاوی بنومیل به نسبتهای ۵ و ۵۰ میکروگرم درمیلی‌لیتر[1] جهت کشت فیتوفترای کلینزه شده توسط جدا شده‌های تریکودرما به طریقه فوق الذکر تهیه گردید (بنومیل روی فیتوفترا بی اثر، ولی رشد قارچهای تریکودرما را جلوگیری می‌کند). بعد از آماده شدن پتریهای حاوی محیط غذایی فوق به تعداد کافی قرصهای محیط کشت با میسلیوم فیتوفترا که توسط هریك از جدا شده های تریکودرما کلینزه شده بود (آزمایش قبل) و شاهد برداشته و روی آنها منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. دو روزبعد چگونگی رشد میسلیوم فیتوفترا بررسی و درآنهایی که فیتوفترا رشد نموده بود، قطر رشد آنها یك روز در میان تا ۸ روز اندازه‌گیری شد. شاهد در اینجا کشت فیتوفترا بدون اضافه شدن قرص میسلیومی حاوی تریکو درما بود.

۵ - بررسی اثر ترشحات غیر فرار جدا شده‌های تریکو-درما روی قارچ فیتوفترا:

برای تهیه ترشحات تریکودرما از محیط کشت داوه (۷) که بعضی از مواد آن مانند آگار، استرپتو-مایسین، آلیل الکل و فرمالین به منظور جلوگیری از انعقاد و اثر احتمالی سوء آنها حذف و قند آن از ۲ گرم به ۵ گرم افزایش داده شد، استفاده گردید.

محیط فوق را به میزان یك دهم حجم و درتعدادی ارلن مایر ریخته و در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو، استریل و سپس در کنار شعله به نسبت هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت یك قرص میسلیومی به قطر ۹ میلیمتر از حاشیه کشت جدا شده‌های تریکو درما روی محیط غذایی پ د آ به ارلن اضافه و روی بهم زن[2] با ۵۰ تکان در دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. بعداز ده روز که جدا شده‌های مختلف ترکودرما کاملا" رشد نمودند، اقدام به عصاره گیری گردید. ارلن وقیف مخصوص عصاره‌گیری را داخل کاغذ بزرگی پیچیده و همراه صافیهای میکروبیولوژیك با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرو-متر (در پتری) به مدت نیم ساعت در اتو ۱۲۰ درجه سانتیگراد استریل و سپس در کنار شعله توسط پنس ضدعفونی شده صافیها در محل مخصوص خود قرارگرفت. ابتدا قبل از عبور عصاره از صافیها، از کاغذهای صافی معمولی استفاده شد که میسلیومها و اسپرها جدا، سپس توسط صافیهای میکروبیولوژیك و پمپ خلاء عصاره گیری به عمل آمد. عصاره هر جدا شده به نسبت های ۲۰ و ۳۳٪ با محیط پ د آ در حال سرد شدن مخلوط و به میزان ۲۰ میلی لیتر در هر پتری به قطر ۹ سانتیمتری ریخته شد.

دراین آزمایش قرصهای ۹ میلی متر کلنی های

1- 10, 100 PPm Benlate 50% WP

2- Shaker

۵ روز فیتوفترا در پتریهای حاوی محیط غذایی مخلوط با ترشحات مایع جدا شده‌های تریکودرما کشت شده و در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و نور دائم قرار داده وبعد از ۲ روز اندازه‌گیری قطر رشد کلنی شروع و تا ۷ روز ادامه یافت. این بررسی در قالب طرح کاملا" تصادفی با تیمارهای زیر در ۴ تکرار (پتری) انجام شد. تیمارها شامل جداشده‌های از اهواز و دریافتی ازموسسه گونه تریکودرما هارزیانم و جداشده‌های از خاك مزرعه شهریار و بستر قارچ خوراکی گونه تریکودرما ویریده و شاهد به غلظتهای ۲۰ و ۳۳٪ عصاره بود. به‌دلیل وجود صفر در بین اعداد محاسبات آماری روی $\sqrt{x + \frac{1}{2}}$ انجام شد (۶).

۶ - بررسی تاثیر ترشحات مایع جدا شده از خاك شهریار گونه تریکودرما ویریده روی تشکیل زئوسپورانژ قارچ عامل بیماری:

دراین آزمایش قارچ فیتوفترا اریتروسپتیکا را روی محیط پ د آ در ۱۵ پتری کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بعد از ۵ روز به پتریهای مذکور بذر شاهدانه استریل اضافه و پتریها به سه دسته ۵ تایی تقسیم گردیدند:

- به‌دسته اول آب مقطر استریل
- به دسته دوم محیط غذایی مایع پ د استریل (بدون آگار)
- به دسته سوم عصاره محیط غذایی مایع جدا شده از خاك مزرعه شهریار که قبلا" بهترین اثررا روی فیتوفترا داشت، اضافه گردید. پتریها به محیط با حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد و تابش نور روزانه به‌مدت ۱۲ روز قرار گرفت. پس از این مدت چگونگی تشکیل زئوسپورانژ در هر سری از پتریها با مشاهده مستقیم پتریها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر مطالعه شد.

۷- بررسی اثر ترکیبات فرار جداشده‌های تریکودرما روی عامل بیماری (فیتوفترا اریتروسپتیکا):

برای انجام این بررسی جداشده‌های تریکودرما روی محیط غذایی پ د آ در ظرف پتری کشت گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعداز ۳۶ساعت در وسط ظرف پتری حاوی محیط پ دآ قرصهایی به قطر ۹ میلیمتر از کشت ۵ روز فیتوفترا قرار داده شد. در شرایط کاملا" استریل درب پتریها را برداشته و پتریهای حاوی محیط کشت با فیتوفترا به طور معکوس روی پتریهای کشت جداشده‌های تریکو درما گذاشته و درز آنها با نوار چسب مسدود شد (که مانع آلودگی و خروج ترکیبات فرار گردد). این پتریها در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح آماری کاملا"تصادفی با ۴ تکرار (پتری) با تیمارهای جداشده‌های از خاك شهریار و دریافتی از موسسه گونه تریکودرما ویریده جداشده از خاك اهواز و دریافتی از موسسه تریکودرما هارزیانم و گونه تریکودرما کونین جی ای و تیمار شاهد انجام گردید. در تیمارشاهد درهر دو پتری که روی هم نصب شده بود فقط از قرصهای محیط کشت فیتوفترا استفاده شد. دو روز بعد قطر رشد کلنی فیتوفترا اندازه‌گیری و تا ۸ روز به طور یك روز درمیان ادامه یافت.

نتایج

دربررسی اثر میکوپارازیتیسم جداشده‌های

تریکودرما روی فیتوفترا اریتروسپتیکا ملاحظه شد که آنها قادرند به راحتی از رشد قارچ عامل بیماری چلوگیری کرده و آن را کلنیزه کنند. جدا شده های از شهریار و دریافتی موسسه گونه تریکودرما ویریده هرچند مانع رشد کلنی فیتوفترا شد، ولی قدرت کلنیزه کنندگی کمتری نسبت به جداشده های تریکودرما هارزیانم و گونه کونین جی ای داشتند. از محل تلاقی جداشده‌ها با قارچ فیتوفترا در کشت متقابل و در حفره‌های مثلثی ایجاد شده در وسط محیط کشت و لامهای نصب شده روی محیط غذایی در بین دو قارچ مطالعات میکروسکوپی به عمل آمد. در این مشاهدات هیچگونه پیچش هیفی تریکودرما به دور فیتوفترا، یا نفوذ به داخل ریسه‌های آن و یا قطعه قطعه شدن آن ملاحظه نشد، ولی علائم هضم ریسه‌ها به خوبی رویت گردید. دراین آزمایش رقابت غذائی و مکانی کاملا" مشهود بود و جداشده‌های تریکودرما به طور قابل توجهی بر رشد فیتوفترا غلبه داشتند.

درآزمایش بررسی قدرت کلنیزه‌کنندگی جداشده‌های تریکودرما روی قارچ عامل بیماری ملاحظه گردید که هرکدام ازجداشده‌ها که توانسته بودند بطور کامل فیتوفترا را کلنیزه کنند، درسطح پتری رشد و اسپورزایی نمود و سطح محیط کاملا" سبز شده و اثری از ریسه‌های فیتوفترا دیده نمی‌شد. در بین جداشده‌های بکاررفته جداشده از خاک اهواز و دریافتی از موسسه گونه تریکودرما هارزیانم و دریافتی از سازمان پژوهشها گونه تریکودرما کونین جی ای بطور کامل سطح محیط فیتوفترا را پوشانده و کاملا" سبز رنگ شده بود. جداشده از خاک شهریار و دریافتی از موسسه گونه تریکودرما ویریده به صورت پراکنده و کم تراکم روی کشت فیتوفترا را گرفته و ۷ روز بعد هنوز ریسه‌های فیتوفترا در لابلای ریسه‌ها واندام بارده تریکودرما رویت می‌شد.

نتایج اثر جداشده‌های تریکودرما روی قدرت حیاتی فیتوفترا در جدول ۱ نشان می‌دهد که جداشده‌های از خاک اهواز و دریافتی از موسسه گونه تریکودرما هارزیانم و جداشده‌ای از تریکودرما کونین جی‌ای توانست قارچ فیتوفترا را از بین ببرد. زیرا این قارچ روی محیط کشت پ دآ حاوی ۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بنومیل رشدی نداشت، در حالی که در مورد جداشده‌های از خاک شهریار و دریافتی از موسسه تریکودرما ویریده بعد از ۷ روز رشد کلنی‌ها حتی افزایش داشت و نسبت به تیمارشاهد ۱۰۸ و ۱۰۶ درصد بود (جدول ۱).

میانگین نتایج تاثیر ترشحات مایع جداشده‌های تریکودرما روی رشد رویشی فیتوفترا در جدول ۲ ثبت شده و جهت تعدیل نرمال به دلیل وجود صفر در بین اعداد (x) محاسبات آماری روی $\sqrt{x+\frac{1}{2}}$ انجام و ملاحظه شد بین تیمارها در سطح ۱٪ اختلاف معنی دار وجود دارد (۶). این اختلاف ها به کمک آزمون دانکن گروه‌بندی و مشاهده می‌شود که جداشده شهریار تریکودرما ویریده در هر دو غلظت ۲۰ و ۳۳ درصد به‌طور صددرصد از رشد فیتوفترا جلوگیری می‌نماید. سپس جداشده قارچ خوراکی تریکودرما ویریده بود که قدرت جلوگیری آن به ۲۸٪ می‌رسید. سایر جداشده‌ها با شاهد فرقی نداشت. حتی در مورد تیمار جدا شده موسسه تریکودرما هارزیانم با غلظت ۳۳٪ قطر رشد بیشتر از آن در تیمار ۲۰٪ و مساوی با شاهد ۳۳٪ بود.

در بررسی اثر ترشحات جدا شده شهریار تریکودرما ویریده روی رشد کلنی فیتوفترا که دردمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو شده بود، در تیمارهای

جدول ۱ـ چگونگی رشدفیتوفترا کلنیزه‌شده‌توسط جدا شده‌های تریکودرما روی محیط پ دآ حاوی ۵۰ میکروگرم‌درمیلی لیتربنومیل

تیمار (جدا شده)		میانگین قطررشدبه میلی‌متر (۱)	درصدرشدکلنی نسبت به‌شاهد
T. viride	جداشده‌شهریار	۶۴	۱۰۸
" "	" " موسسه	۶۳	۱۰۶
T. harzianum	" " اهواز	۰	۰
" "	" " موسسه	۰	۰
T. koningii	" " سازمان پژوهشها	۰	۰
شاهد		۵۹	۱۰۰

(۱) قطررشدپس از ۷ روز اندازه‌گیری شد واعداد میانگین مربوط به ۳ تکرار است.

حاوی ۲۰ و۳۳٪ ترشحات نسبت به شاهد ۳۳درصد بترتیب ۲۴/۷ و۳۳ درصد از رشد کلنی جلوگیری نمود. درمطالعه مربوط به اثر ترشحات تریکودرما در تشکیل اسپورانژیم قارچ فیتوفترا معلوم نمود که در پتریهای حاوی آب مقطر استریل طبق معمول بعد از ۱۲روز اسپورانژیم و تورم ریسه ایجاد می‌شود. در پتریهایی که بجای آب مقطر ازمحیط کشت داوه استفاده شده به دلیل وجود مواد معدنی، اسپورانژیوم و تورم هیفی بیشتر از تیمار قبلی بود. در پتریهایی که ترشحات مایع غیرفرار جداشده شهریار تریکودرما ویریده استفاده شده بود، اسپورانژیوم و تورم ریسه ملاحظه نگردید و دربررسی اثر ترشحات در تندش زئوسپورها حتی پس از ۵ روز مانع‌جوانه زنی آنها شد.

اثرترکیبات فرار جداشده‌های تریکودرما روی مرحله رویشی فیتوفترا درجدول ۳ نشان داده شده و ملاحظه می‌شود که جداشده شهریار تریکودرما ویریده و جداشده تریکودرما کونین جی ای‌بترتیب با ۳۰ و ۲۹/۵ درصد قدرت بازدارندگی رشد نسبت به سایر جداشده‌هاتاثیربهتری دارد. جداشده‌اهوازتریکودرما هارزیانم با ۳/۴ درصد، کمترین اثر را روی رشد رویشی فیتوفترا داشته است. دراین آزمایش جداشده‌های تریکودرما علاوه بر جلوگیری از رشد، سبب هضم شدن ریسه‌های رشد کرده نیز شده که جداشده شهریار تریکودرما ویریده از همه موثرتر بود.

جداشده‌های دیگر بترتیب تریکودرما کونین جی ای، جداشده موسسه تریکودرما ویریده، جداشده موسسه تریکودرما هارزیانم قرار داشت. جداشده اهواز تریکو-درما هارزیانم دارای رشد سریع‌بوده و پتری حاوی‌کشت

جدول ۲ـ تاثیر ترشحات مایع جدا شده‌های تریکودرما روی قطر رویشی فیتوفترا اریتروسپتیکا بعد از ۷ روز

جدا شده (تیمار)		غلظت (۲)	میانگین قطر رشد فیتوفترا به میلیمتر (۱)	درصد کاهش رشد با توجه به میانگین های معکوس
موسسه	T. harzianum	%۲۰	۹/۳۶	۲/۹۴ ab (۳)
"	"	%۳۳	۹/۵۰	۰ a
اهواز	"	%۲۰	۹/۳۸	۲/۵۴ ab
"	"	%۳۳	۹/۲۷	۴/۸ b
شهریار	T. viride	%۲۰	۰/۷	۱۰۰ d
"	"	%۳۳	۰/۷	۱۰۰ d
قارچ خوراکی	"	%۲۰	۸/۰۶	۳۸ c
"	"	%۳۳	۸/۱۳	۲۷ c
شاهد	عاری محیط کشت	%۲۰	۹/۴۷	۰/۶ a
"	"	%۳۳	۹/۵۰	۰ a

(۱)ـ بدلیل وجود صفر در بین اعداد (x) از $\sqrt{x+\frac{1}{2}}$ برای تعدیل نرمال استفاده شد.

(۲)ـ غلظت ها درصد ترشحات مایع هریک از جدا شده‌ها ست که به محیط کشت اضافه شده است.

(۳)ـ بین تیمارهائی که با یک حرف نشان داده شده، در سطح ۵% اختلاف معنی دار وجود ندارد.

فیتوفترا را کلنیزه کرد.

بحث

آزمایشهای انجام شده در مورد چند جدا شده آنتاگونیست Trichoderma روی قارچ P. erythroseptica عامل بیماری پوسیدگی سیاه ریشه و صورتی غده سیب زمینی نشان داد که آنها از عوامل کنترل کننده این قارچ بوده و مکانیزم اثر هرکدام از جداشه‌ها به چهار صورت میکو-پارازیتیسم، رقابت غذایی و محل، اثر ترشحات خارج سلولی و ترکیبات فرار می‌باشد. اسمیت و همکاران (۱۳) در سال ۱۹۹۰، دیکون (۸)، روحانی و همکاران(۴) بازگیر(۳) و ظفری (۵) اختلافاتی را بین گونه‌ها و حتی جداشده‌های یك گونه تریکودرما روی قارچهای مختلف از جمله ریزوکتونیا و فیتوفترا مشاهده کرده‌اند. در این بررسی نیز جداشده‌های مورد بررسی برعلیه قارچ فیتوفترا تاثیرات متفاوتی داشت. در شرایط آزمایشگاه در مطالعات مربوط به مقابله دادن قارچ پاتوژن با

جدول ۳ـ تاثیرترکیبات فرار جداشده‌های تریکودرما روی قطررشد کلنی قارچ فیتوفترا اریتروسپتیکا :

جدا شده	گونه آنتاگونیست تریکودرما	درصدجلوگیری از رشدفیتوفترا	میانگین قطررشدفیتوفترا(۱) به میلیمتر ۴روزپس ازکشت
شهریار	T. viride	۳۰ b(۲)	۵۰/۲۵
اهواز	T. harzianum	۳/۴ a	۶۹/۷۵
موسسه	" "	۱۷/۷ ab	۵۹/۲۵
موسسه	T. viride	۱۷ ab	۵۹/۷۵
سازمان پژوهشها	T. koningii	۲۹/۵ b	۵۰/۷۵
شاهد		۰ a	۷۲

(۱)ـ میانگین قطررشدکلنی مربوط به ۴ تکرار (پتری) است که درحرارت ۲۵ درجه قرار داشت.

(۲)ـ بین تیمارهائی که با یک حرف یا حروف مشابه نشان داده شده ،اختلاف معنی‌دار وجودندارد.

جدا شده‌های مختلف تریکودرما ثابت شد که تمامی آنها قادر به جلوگیری از رشد کلنی فیتوفترا هستند. این خاصیت را باید مربوط به بالا بودن قدرت رقابت رشد گونه‌های تریکودرما دانست که سرعت رشد آنها بسیار بیشتر از رشد فیتوفترا بوده به طوریکه پس از چند روز کلنی های آن را کلنیزه نمود (رقابت بر سر غذا و محل)، در این مورد جدا- شده موسسه تریکودرما هارزیانم سرعت رشد بیشتری داشت. خاصیت میکوپارازیتیسم و هضم شدن ریسه‌های فیتوفترا در اثر بعضی از جداشده‌ها مانند جداشده اهواز و موسسه تریکودرما هارزیانم و جدا شده تریکودرما کونین جی ای با اظهارات دنیس و وبستر(۹) مطابقت نمود، ولی نفوذ ریسه‌های هیچکدام از آنتاگونیستهای مورد بررسی در ریسه‌های فیتوفترا دیده نشد.

پاپاویزا (۱۰) اعلان داشت که تریکودرما و گلیوکلدیوم علاوه بر تولید توکسین های ویریدین[1] تریکودرمین[2] و گلیوتوکسین[3]، آنزیمهایی مانند کیتیناز[4]، سلولاز[5]، آلفا ۱ـ۳ گلوکوناز[6] و دیگر متابولیتها ایجاد کرده که تاثیر بازدارنده داشته و به

1- Viridine 2- Trichodermine 3- Gliotoxin
4- Chitinase 5- Cellulase 6- 1-3, gluconase

نحو مطلوب روی سلولهای ریسه و سایر اندامهای پاتوژن‌ها اثر می‌کند. لذا مسئله آنتی بیوز از اهمیت بیشتری نسبت به میکوپارازیتیسم برخوردار است. ترشحات خارج سلولی جداشده‌های تریکودرما اثر متفاوتی داشته و در بررسیها ملاحظه گردید جداشده شهریار تریکودرما ویریده تاثیر بیشتری روی فیتوفترا دارد، به طوریکه عصاره این جداشده به نسبت ۲۰٪ مخلوط با محیط غذایی پ دآ به میزان ۱۰۰ درصد از رشد این قارچ جلوگیری کرد ولی جداشده موسسه تریکودرما هارزیانم چنین قدرتی نداشت.

از نظر نوع تاثیر با بررسی که از کشت قرصهای محیط غذایی حاوی میسلیومهای تحت تاثیر عصاره تریکودرما قرار گرفته، فیتوفترا اریتروسپتیکا روی محیط پ د آ رشد نمود و مشخص شد که ترشحات خاصیت قارچکشی [1] ندارند و به صورت بازدارنده[2] سبب جلوگیری از رشد فیتوفترا می‌گردد. بنابراین درطبیعت، حضور دائم و گسترده تریکودرما برای کنترل این قارچ ضروری به‌نظرمی‌رسد. ازنظرترکیبات فرار، قدرت کنترل‌کنندگی در جداشده‌های تریکودرما روی قارچ فیتوفترا نیز تفاوتهای زیادی وجود دارد. در آزمایشها مشخص شد که جدا شده شهریار تریکودرما ویریده اثر جلوگیرکنندگی بیشتری روی قارچ عامل بیماری داشت.

برخلاف‌ترشحات‌مایع، هرچندتاکنون اطلاعات دقیقی از مکانیزم و میزان کارآیی ترکیبات فرار روی قارچهای مختلف در شرایط طبیعی در دست نیست، ولی به نظر می‌رسد که با جمع‌شدن آنها در خلل و فرج ذرات خاك بتواند روی رشد و توسعه عوامل بیماری زا اثر بگذارد.

سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران تامین شده و در دانشکده کشاورزی کرج اجرا گردیده است. آقای مهندس علیرضا کریمی روزبهانی نیز در این بررسی همکاری داشته‌اند که بدین وسیله از ایشان سپاسگزاری می‌شود.

مراجع مورد استفاده:

REFERENCES:

۱ ـ ارشاد، ح. ۱۳۵۶. قارچهای ایران. موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، وزارت کشاورزی و منابع طبیعی، اوین.

۲ ـ بازگیر، ع. ۱۳۷۰. بررسی اثر قارچ Trichoderma علیه Rhizoctonia solani عامل مرگ‌گیاهچه و پوسیدگی بذر لوبیا، پایان‌نامه فوق‌لیسانس گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ۱۸۰ ص.

۳ ـ بهروزین، م. ۱۳۶۴. گزارش نهایی طرح بررسی بیماریهای مهم سیب زمینی در آذربایجان شرقی، ۶۴ ـ ۱۳۵۹. موسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی تبریز.

۴ ـ روحانی، ح.، ع. کریمی و ف. نوع پرست. ۱۳۷۰. نقش ایزوله‌های تریکودرما درمبارزه بیولوژیك علیه Rhizoctonia solani، مجله آفات و بیماریهای گیاهی، موسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی اوین،

1- Fungicide 2- Fungistatic

ایـــران.

۵ ـ ظفری، د. ۱۳۷۰. بررسی اثر آنتاگونیست قارچ Trichoderma علیه قارچهای : Colletorichum coccodes و Phythophthora erythroseptica جداشده از سیب زمینی، پایان نامه فوق لیسانس، گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج ، ۱۶۷ ص.

۶ ـ یزدی صمدی، ب. ۱۳۶۰. طرح آزمایشات. پلی کپی درسی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشـــــاورزی دانشگاه تهران، کرج.

7 - Davet, P. 1979. Technique pour l'analyse des population de Trichoderma et de Gliocladium virens Dar. Le sol. Ann. Phytopathol. 11: 529-533.

8 - Deacon, J.W. 1983. Microbial control of plant pest and disease Von Nostrand Reinhod (U.K.) Co. Ltd. 87 PP.

9 - Dennis, C., J. Webster. 1971. Antagonistic properies of species groups of Trichoderma: 1- Production of non volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 25-39.

10- Papavizas, G. C. 1985. Trichoderma and Gliocladium, Biology, ecology and potential for biocontrol, Ann. Rev. Phytopathol, 23: 23-54.

11- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus Trichoderma. Mycological papers. (116) 56PP. CMV. Kew, England.

12- Row, R.C. & A.F. Sehmitthenner. 1977. Potato pink rot in Ohio, caused by Phytophthora erythroseptica and P. eryptogea. Plant Diseases. Vol. 61: 807-810.

13- Smith, V.L., W.F. Wilcox & G.E. Harman. 1990. Potential for biological control of phytophthora root and crown rot of apple by Trichoderma and Gliocladium spp. Phytopathology. 80: 880-885.

14- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of Phytophthora de Bary. C.M.I. Kew, Mycol. Pap. 92: 1-22.

15- Wynn, A.R. & H.A.S. Epton. 1979. Parasitism of Oospores of Phtophthora eyrthroseptica in soil. Trans. Brit Mycol. Soc. 73: 254-255.

Evaluation of Antagonistic Effect of Few Isolates of Trichoderma on Phytophthora erythroseptica the Cause of Potato Pink Rot.

M. OKHOVAT, Gh.A. HEDJAROUDE, H. ROHANI and D. ZAFARI
Assistant, Associate Professor plant Pathology Depatment College of Agriculture University of Tehran Karaj, Associate Professor and Instructor Plant Protection Department College of Agriculture University of BouAli Hamedan, Iran Respectively.
Received for Bublication March 16, 1993.

SUMMARY

Phytophthora erythroseptica is a soil borne fungus that causes root,.crown rots and tuber pink rot of potato and other plants. Invitro the effect of few isolates of Trichoderma investigated, using several methods. In double culture method it was proved that all isolates of Trichoderma were able to colonize and prevent growth of the pathogen, Colonies of the P. erythroseptica colonized by Trichoderma placed on PDA contains 5 PPm benomyl showed that 2 isolates of T. harzianum and 1 isolate of T. koningii completly eliminated the potential of mycelial growth of pathogen.

Culture filterate of T. viride completly innibited the mycelial growth of the pathogen. Volatile metabolites of T. viride (2 isolates), T. koningii and T. harzianum (2 isolates) reduced mycelial growtn of the fungus pathogen from 3 to 29%