گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۷ شماره ۴، زمستان ۹۳

بررسی خصوصیات آنتاگونیستی چندین جهش یافته *Trichoderma harzianum* علیه تعدادی قارچ بیمارگر گیاهی در شرایط درون شیشه ای

سکینه عباسی ایرانق[۱]، ناصر صفایی[۲]*، مسعود شمس بخش[۳] و سمیرا شهبازی[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲*- **نویسنده مسوول:** دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(nsafaie@modares.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، پژوهشکده تحقیقات پزشکی، کشاورزی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۳۱

چکیده

قارچ های بیمارگر خاک برد با ایجاد مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و کاهش جوانه زنی بذر، باعث کاهش تولید محصولات کشاورزی می شوند. گونه های تریکودرما از مهم ترین عوامل بیوکنترل شناخته شده علیه بیمارگرهای خاکزی می باشند. در این پژوهش جهت بهبود فعالیت آنتاگونیستی *Trichoderma harzianum*، القای جهش تصادفی با استفاده از اشعه گاما در دستگاه گاماسل با مقدار مصرف بهینه ۲۵۰ گری روی جدایه *Th65* انجام پذیرفت و ۲٤ جهش یافته از این جدایه مادری انتخاب شدند. مطالعه خواص آنتاگونیستی علیه قارچ های *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani* AG4، *Sclerotinia sclerotiorum* و *Fusarium graminearum* به صورت سه آزمون کشت متقابل، متابولیت های فرار و عصاره های خارج سلولی در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. جدایه های Th ۱۵، Th ۱۱، Th ۵، Th۱، Th ٤ و Th ۲۲ بیشترین میزان بازداری از رشد را نشان داده و به عنوان جدایه های جهش یافته برتر شناخته شدند. این جدایه‌ها توانایی استفاده در آزمون‌های کنترل زیستی گلخانه را دارا می باشند.

کلید واژه ها: ***Trichoderma harzianum*، پرتوتابی، کنترل زیستی، *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani AG4*، *Sclerotinia sclerotiorum* و *Fusarium graminearum***

مقدمه

بیمارگرهای گیاهی خاک برد همه ساله خسارت های زیادی را ایجاد می کنند و کنترل آن ها بسیار مشکل بوده است به نحوی که روش های زراعی و کاربرد مواد شیمیایی نتوانسته است سبب ممانعت از خسارت عوامل بیماری زا شود (هال[۱]، ۱۹۸۱). گونه های قارچ تریکودرما مهمترین عوامل کنترل بیولوژیکی و تقویت کننده رشد گیاهی هستند که با القای واکنش های دفاعی گیاه و یا با اثرات مستقیم مایکوپارازیتیسم، آنتی بیوز و رقابت باعث حفاظت گیاهان در برابر قارچ های بیماری زا می شوند (قیسال برتی و سیواسی تامپارام[۲]، ۱۹۹۱). القای موتاسیون تصادفی با به کارگیری موتاژن های فیزیکی نظیر امواج الکترومغناطیس UV، ایکس، گاما و یا با استفاده از موتاژن های شیمیایی مانند

1- Hall

1- Ghisalberti & Sivasithamparam

اتیل متان سولفونات یکی از راه کارهای مختلف جهت دست ورزی ژنتیکی برای بهبود جدایه ها و افزایش توانایی بیوکنترلی می باشد (کتلت و همکاران[1]، ۲۰۰۳؛ گوهل و همکاران[2]، ۲۰۰۴). لی و همکاران[3] (۲۰۱۰) گزارش کردند القای جهش با استفاده از UV باعث به وجود آمدن جهش یافته های *T. viride* با میزان تولید بالایی از سلولاز شده است. جیانگ و همکاران[4] (۲۰۱۱) از نمونه خاک های سنگاپور گونه *T. viride* را جداسازی کرده و جدایه های جدیدی در اثر جهش با اتیل متیل سولفونات و تیمار با اشعه UV به دست آوردند. نتایج حاصل از سنجش آنزیمی نشان داد که جدایه *T. viride* EU2-77 سطح بالایی از سلولازهای خارج سلولی و بتاگلوکوزیداز را تولید می کند.

مطالعات انجام شده تاکنون تنها به بررسی گونه های تریکودرمای موجود در ایران و کارایی آن ها در کنترل بیماری های گیاهی معطوف بوده است و هیچ مطالعه ای در خصوص القای جهش با اشعه گاما در این قارچ و تاثیر جهش بر خاصیت آنتاگونیستی آن صورت نگرفته است. هدف از این پژوهش، القای جهش با اشعه گاما و بررسی خاصیت آنتاگونیستی جدایه های جهش یافته در مقایسه با جدایه مادری (تیپ وحشی) علیه چند قارچ مهم و خاک برد و تعیین جدایه های برتر می باشد.

مواد و روش ها

تعیین دز، پرتوتابی با دز بهینه و جداسازی موتانت های قارچ تریکودرما

پس از جداسازی و شناسایی جدایه 65 *T.harzianum* (نمونه برداری از استان خوزستان) سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر تهیه و با استفاده از میله ی شیشه ای سترون روی سطح محیط کشت آب – آگار پخش شد. تشتک های حاوی اسپور بلافاصله در دستگاه گاماسل (با چشمه کبالت ۶۰ و اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه) و در معرض تابش اشعه گاما با دز بهینه قرار گرفتند. برای تعیین دز مناسب اشعه گاما ابتدا سوسپانسیونی از اسپور خالص قارچ حاوی ۱۰ اسپور در هر میلی لیتر تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور با استفاده از میله شیشه ای بر سطح تشتک های حاوی محیط کشت PDA پخش شد. برای بررسی تاثیر اشعه گاما بر جوانه زنی، سوسپانسیون اسپورهای قارچ در معرض دزهای ۰- ۵۰- ۱۵۰- ۲۰۰- ۲۵۰- ۳۰۰- ۳۵۰- ۴۰۰- ۴۵۰ گری قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از پرتوتابی سه عدد اسپور مربوط به هر دز (تک اسپور در سه تکرار) به محیط Potato-Dextrose-Agar (PDA) منتقل شدند (مرادی و همکاران[5]، ۲۰۱۲). آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و داده ها با استفاده از نرم افزار MSTAT تجزیه و تحلیل شد. عملیات پرتوتابی در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران صورت گرفت.

ارزیابی درون شیشه ای خواص آنتاگونیستی جدایه های جهش یافته تریکودرما

خصوصیات آنتاگونیستی جدایه های جهش یافته و جدایه مادری *T. harzianum* علیه چهار قارچ بیمارگر خاک برد شامل *M. phaseolina* (عامل بیماری پوسیدگی ذغالی خربزه)، *R. solani*AG4 (عامل مرگ گیاهچه خیار و خربزه)، *F. graminearum* (عامل بیماری بلایت گیاهچه و سنبله گندم)، *S. sclerotiorum* (عامل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا) که از کلکسیون قارچ شناسی گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شده بود، با تعیین میزان کاهش رشد آن ها در آزمون های مختلف ارزیابی شد. آزمون‌های مختلفی در آزمایشگاه جهت غربال جدایه‌های جهش یافته برتر استفاده شد که شامل:

1- Catlett *et al*.
2- Gohel *et al*.
3- Li *et al*.
4- Jiang *et al*.
5- Moradi *et al*.

آزمون کشت متقابل

بررسی آزمون کشت متقابل جدایه های تریکودرما علیه بیمارگر با استفاده از روش دنیس و وبستر[1] (۱۹۷۱c) صورت گرفت. تشتک های با قطر ۹ سانتی متری حاوی محیط عصاره سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) با قرص های به قطر هفت میلی متری از کشت سه روزه بیمارگر و تریکودرما مایه زنی شده (رو به روی هم) و در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. در تشتک تیمار شاهد قرصی از محیط PDA به جای قرص تریکودرما استفاده شد. میزان رشد شعاعی بیمارگر۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت اندازه گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار صورت گرفت.

آزمون متابولیت های فرار

ارزیابی بازدارندگی از رشد جدایه های تریکودرما علیه بیمارگر به وسیله تولید متابولیت های فرار با استفاده از روش دنیس و وبستر (۱۹۷۱b) صورت گرفت. در این روش یک قرص به قطر ۷ میلی متر تریکودرما در وسط تشتک حاوی محیط PDA گذاشته شده و سر تشتک محیط حاوی تریکودرما با کف تشتک حاوی قرص سه روزه بیمارگر جایگزین شده و اطراف آن ها با نوار پارافیلم بسته شده و در انکوباتور (در دمای ۱±۲۷°C) قرار گرفت. در کف تشتک شاهد قرص تریکودرما قرار داده نشد. میزان رشد شعاعی بیمارگر ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت اندازه گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار صورت گرفت.

آزمون ترشحات مایع خارج سلولی

اثر مواد غیر فرار تولید شده توسط تریکودرما توسط روش دنیس و وبستر (۱۹۷۱a) ارزیابی شد. یک قرص ۷ میلی متر ازکشت سه روزه جدایه های تریکودرما در ۱۰۰ میلی لیتر محیط (Potato Dextrose Broth) PDB فاقد آنتی بیوتیک مایه زنی شد. ارلن های حاوی محیط مایه زنی شده با تریکودرما به مدت ۱۲ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۱±۲۲ درجه سلسیوس و دور ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. محتویات ارلن ها پس از عبور از کاغذ صافی، از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و عصاره های گرفته شده با محیط PDA مذاب (با دمای ۴۲ °C) مخلوط شد تا غلظت نهایی به ٪۱۰ (حجم/حجم) برسد. پس از بسته شدن محیط قرصی به قطر هفت میلی متر از کشت سه روزه بیمارگر در وسط تشتک قرار داده شد ومیزان رشد شعاعی بیمارگر ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت اندازه گیری شد. در تیمار شاهد قرص تریکودرما در تشتک فاقد عصاره کشت شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار صورت گرفت. در تمامی آزمون ها میزان بازداری (GI) از رشد بیمارگر توسط تریکودرما با استفاده از این فرمول محاسبه شد: GI%=dc-dt/dc*100 که در آن dc قطر کلونی شاهد و dt قطر کلونی در تیمار می باشد. تجزیه و تحلیل آزمون های آنتاگونیستی جدایه های تریکودرما علیه چهار قارچ مذکور براساس طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل (برای آزمون متابولیت های فرار نشان داده شده است) انجام شد و مقایسه میانگین تیمارها، توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح آلفا برابر ۰/۰۵، با استفاده از نرم افزار (version9.1) SAS صورت گرفت و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

دزیابی برای بدست آوردن جهش یافتگان

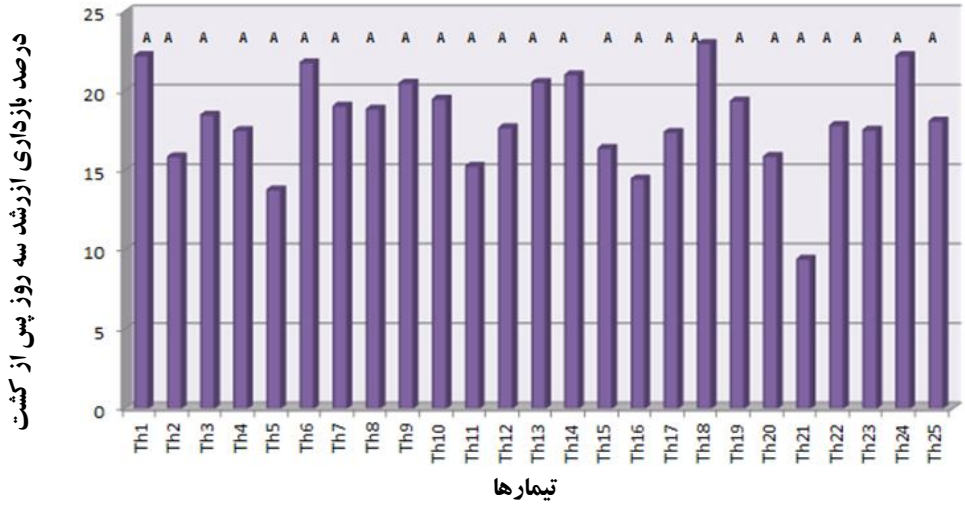
مقایسه درصد جوانه زنی اسپور بعد از ۲۴ ساعت از پرتوتابی با دزهای مختلف، نشان داد که پرتوتابی با اشعه گاما در محدوده دز ۲۵۰ گری هیچ گونه ممانعتی برای رشد ریسه نداشته و حدود (۴۳/۴) ۵۰-۴۰ درصد اسپورها توان جوانه زنی خود را در این محدوده دز حفظ نمودند. پس دز ۲۵۰ گری به عنوان دز بهینه برای پرتوتابی انتخاب شد. در پرتوتابی با دز ۴۵۰ گری تقریبا

1- Dennis & Webster

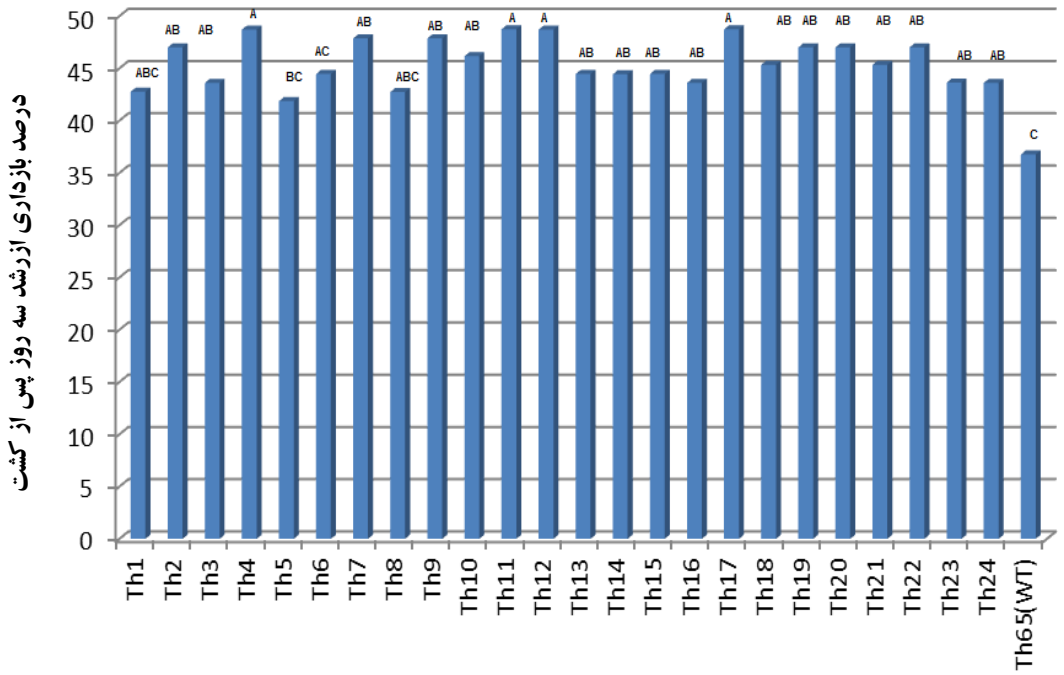
۱۰۰ درصد اسپورها توان جوانه زنی خود را از دست داده بودند. پرتو گاما باعث تنوع درخصوصیات مورفولوژیکی قارچ تریکودرما از جمله شکل پرگنه، رنگ، میزان اسپوردهی و سرعت رشد ریسه در ساعت های مختلف شد. پنج روز پس از نگهداری در انکوباتور(۲۵±۱°C) جدایه های جهش یافته Th۶, ۵ Th, Th۱ و Th۸ رشد و اسپورزایی سریع تر (پرکردن تشتک پتری ۹ سانتی متری حاوی محیط PDA) و جدایه Th۱۷ رشد و اسپورزایی کندتری نسبت به جدایه مادری نشان دادند. از ۱۱۵ جدایه جهش یافته ۲۴ جدایه از یک جدایه مادری براساس بازدارندگی رشد علیه *R. solani* AG4 انتخاب شدند (داده ها نشان داده نشده است). اهری مصطفوی و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی های خود به منظور به وجود آوردن جهش یافته های غیر بیماری زای فوزاریوم جهت بیوکنترل جدایه های بیماری زای فوزاریوم (*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*) با دزهای ۰ (شاهد)، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ نتیجه گرفتند که پرتودهی با دزهای ۱۵۰ و ۱۸۰ گری به طور معنی داری سبب کاهش قطر کلونی نسبت به شاهد و سایر دزها می شود و دز ۱۵۰ گری را به عنوان دز بهینه انتخاب نمودند.

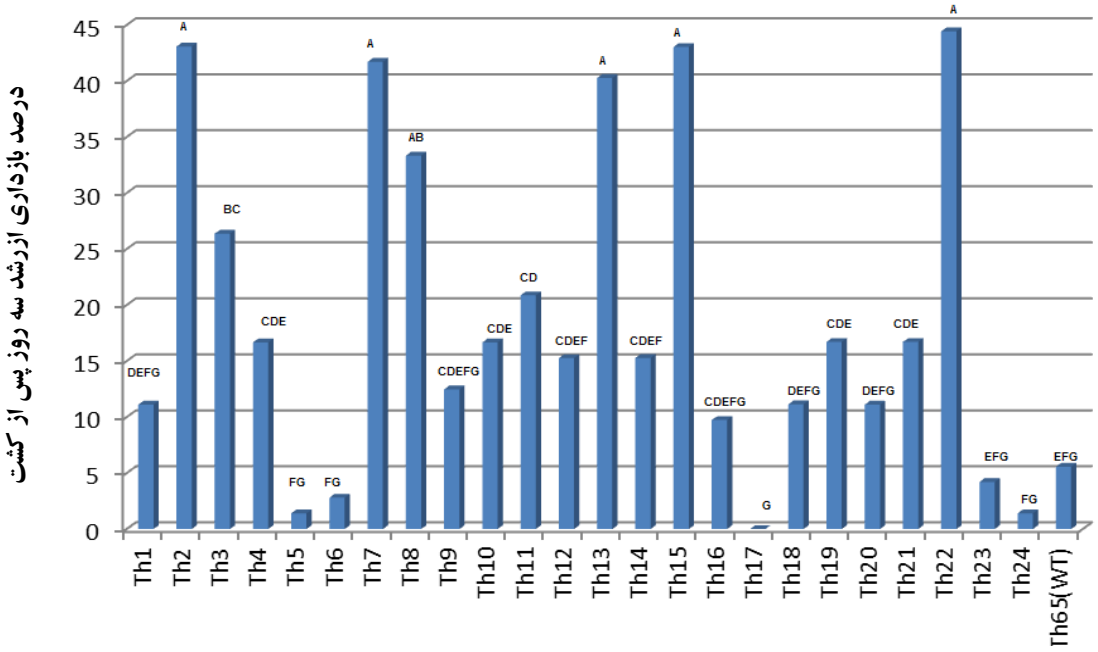
آزمون های آنتاگونیستی

در آزمون متابولیت های فرار تریکودرما به صورت کشت همزمان عامل بیمارگر و تریکودرما (به جز در مورد قارچ *S. sclerotiorum*) در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری در بین جدایه ها مشاهده نشد وحروف آماری در همه تیمارها یکسان نوشته شد (شکل ۱). در آزمون کشت متقابل وعصاره های خارج سلولی در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری بین جدایه های جهش یافته و جدایه مادری وجود داشت($p<$ ۰/۰۵) در آزمون های کشت متقابل جدایه های جهش یافته Th۱۷ و Th۴ با ۵۷ و ۵۸ درصد و در آزمون عصاره های خارج سلولی Th۲۲ و Th۲ به ترتیب با ۴۴ و ۴۳ درصد بازدارندگی از رشد علیه *F. graminearum* (شکل۲)، در آزمون های کشت متقابل جدایه های جهش یافته Th۲۱ و Th ۵ با ۶۰ و ۵۹ درصد و در آزمون عصاره های خارج سلولی Th۱۱ و Th۱ با ۴۹ و ۴۷ درصد بازدارندگی از رشد علیه AG4 *R. solani* (شکل۳)، در آزمون های کشت متقابل جدایه های جهش یافته Th۱۱ و Th ۵ با ۸۹ و ۸۸ درصد و در آزمون عصاره های خارج سلولی Th ۴ و Th۲۲ با ۹۹ و ۹۸ درصد بازدارندگی از رشد علیه *S. sclerotiorum* (شکل۴) و در آزمون های کشت متقابل جدایه های جهش یافته Th۱۵ با ۶۱ درصد و در آزمون عصاره های خارج سلولی Th۱ با ۶۹ درصد بازدارندگی از رشد علیه *M. phaseolina* (شکل۵).

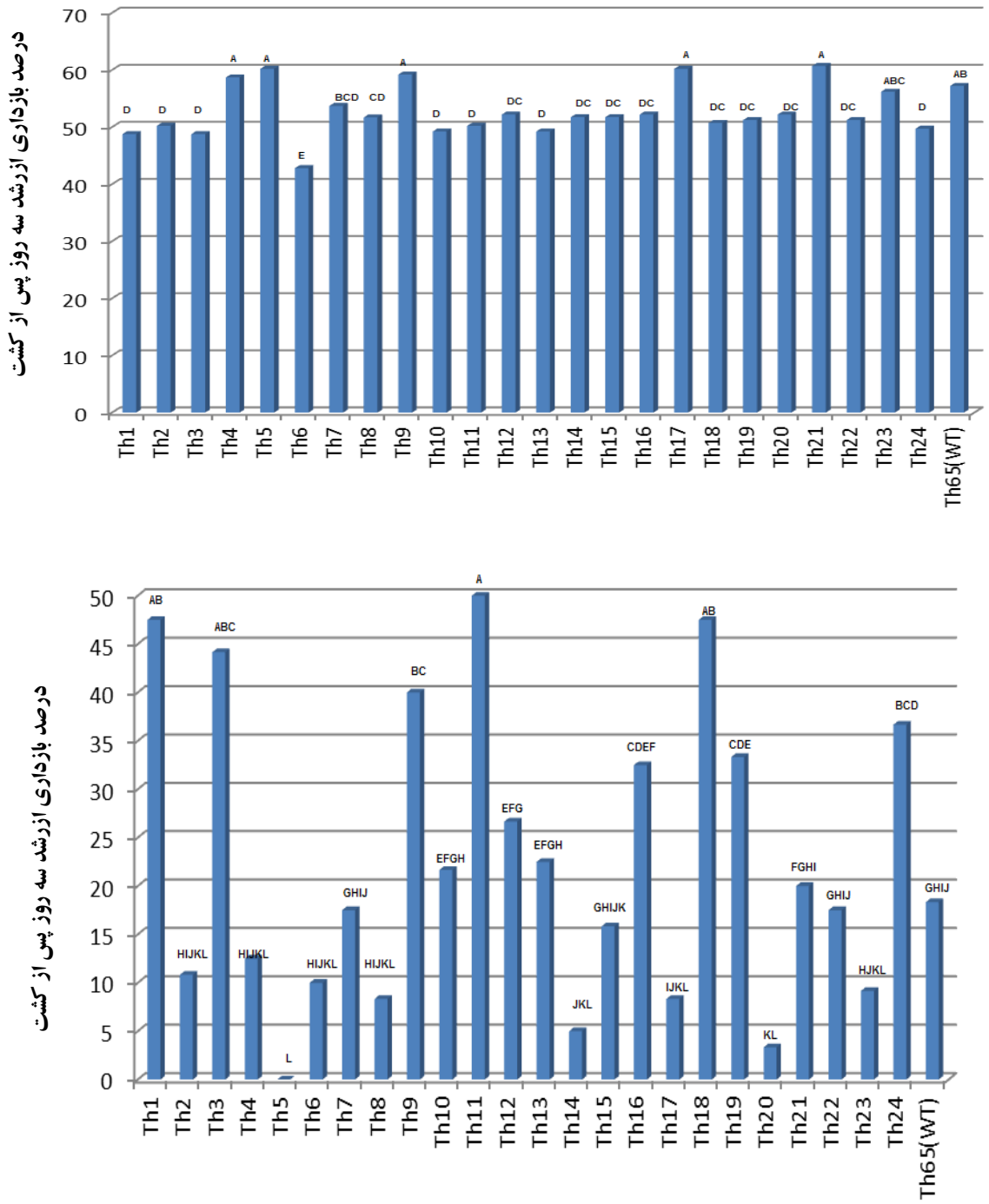


شکل۱- هیستوگرام مقایسه میانگین آزمون متابولیت های فرار جدایه های تریکودرما علیه *M. phaseolina*، *R. solani*، *S. sclerotiorum* و *F. graminearum* با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۱ و آزمایش فاکتوریل(Th25:جدایه مادری).

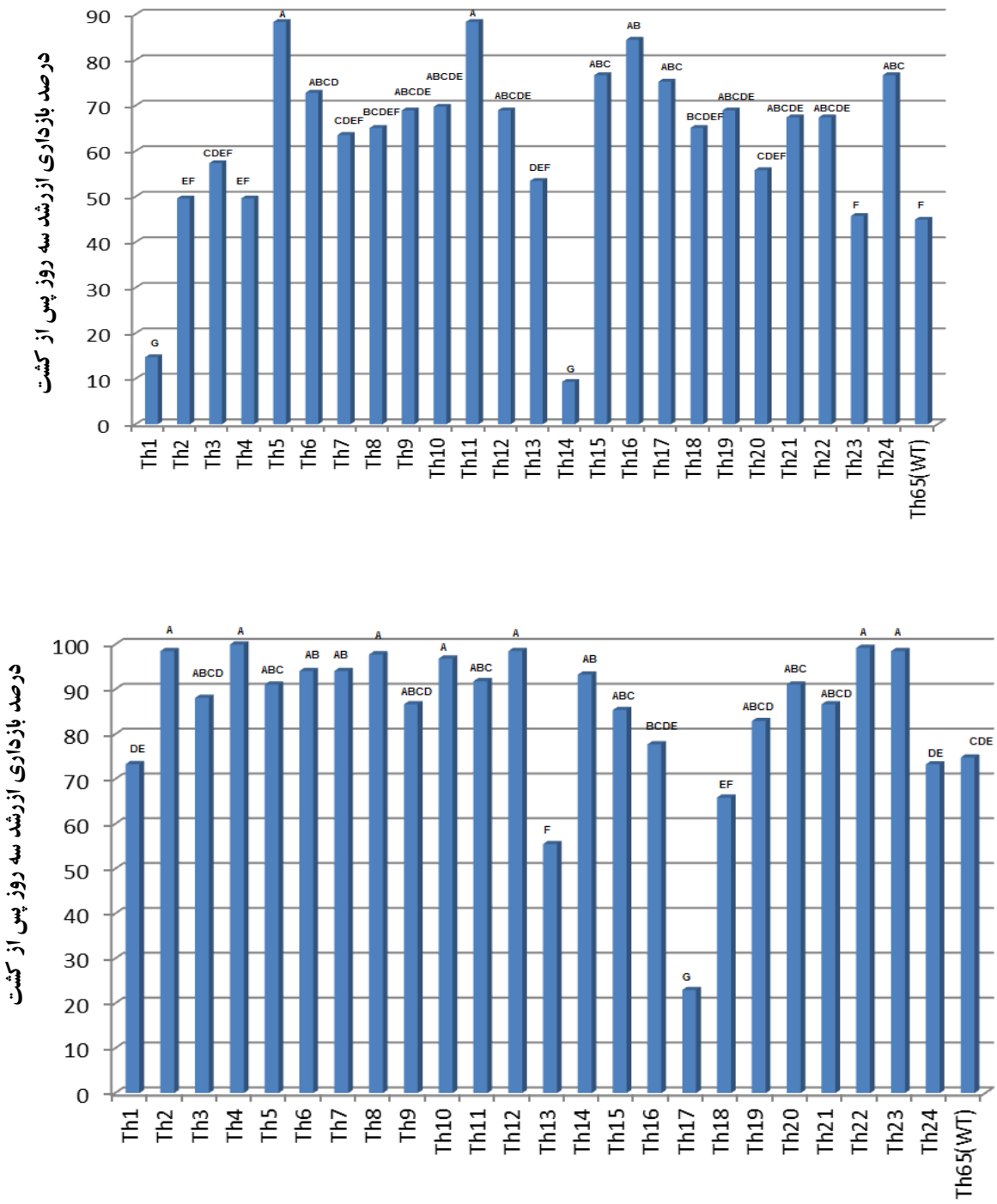




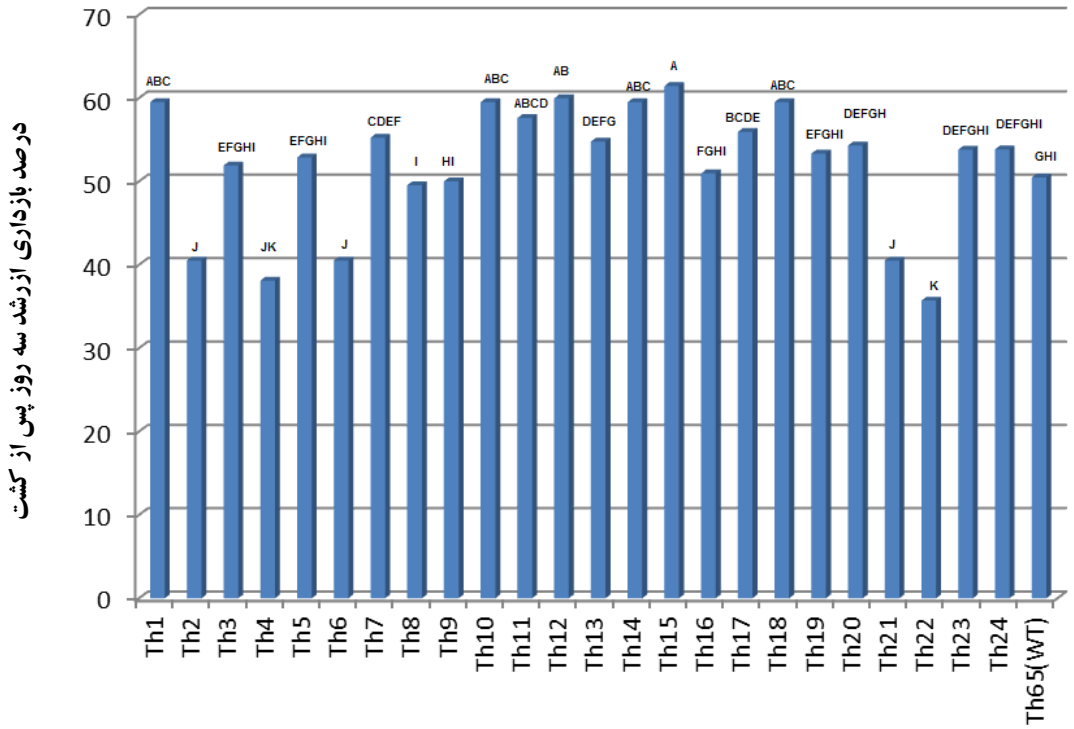
شکل۲- هیستوگرام مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد (محور عمودی) در آزمون های کشت متقابل (بالا) و عصاره های خارج سلولی (پایین) جدایه های تریکودرما(محور افقی) علیه *F. graminearum*(Th25: جدایه مادری).

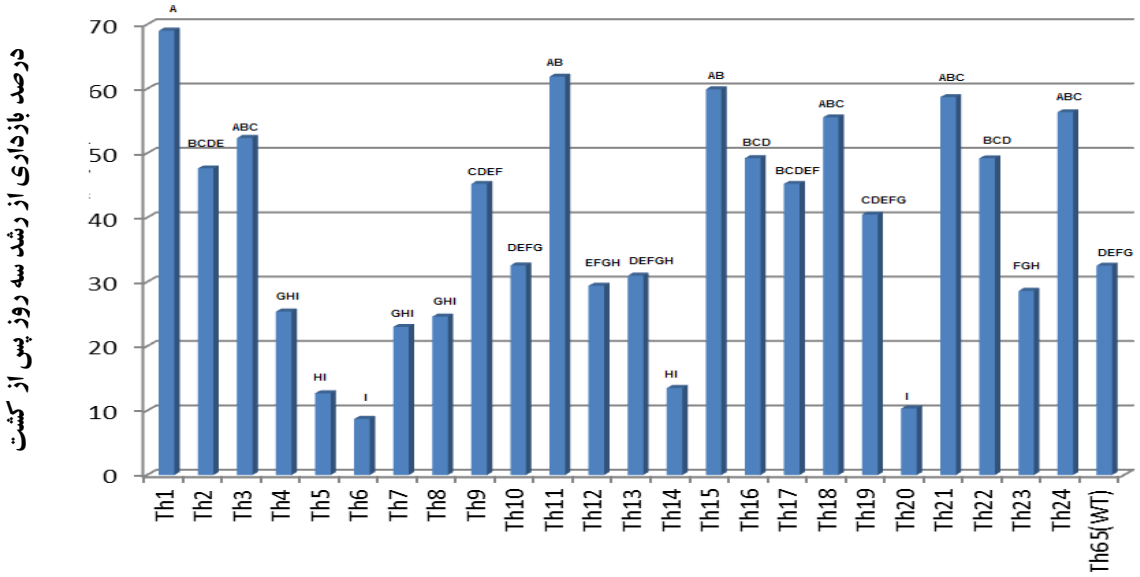


شکل۳- هیستوگرام مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد (محور عمودی) در آزمون های کشت متقابل (بالا) و عصاره های خارج سلولی (پایین) جدایه های تریکودرما(محور افقی) علیه *R. solani* (Th25: جدایه مادری).



شکل٤- هیستوگرام مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد (محور عمودی) در آزمون های کشت متقابل (بالا) و عصاره های خارج سلولی (پایین) جدایه های تریکودرما (محور افقی) علیه *S. sclerotiorum* (Th25: جدایه مادری).





شکل۵- هیستوگرام مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد (محور عمودی) در آزمون های کشت متقابل (بالا) و عصاره های خارج سلولی (پایین) جدایه های تریکودرما(محور افقی) علیه *M. phaseolina* (Th25: جدایه مادری).

بیشترین میانگین بازدارندگی از رشد را نشان دادند. هم چنین جدایه های جهش یافته مذکور در آزمون کشت متقابل پس از سه روز نگهداری در انکوباتور کلونیزاسیون و اسپورزایی روی پرگنه مقابل (قارچ بیمارگر) سریع تر از جدایه مادری مشاهده گردید. جدایه های Th ۱۵، Th ۱۱، Th ۵، Th ۱، Th ۴ و Th ۲۲ به عنوان جدایه های برتر نسبت به جدایه مادری شناخته شده و برای آزمون‌های کنترل زیستی درگلخانه انتخاب شدند.

آزمون های خواص آنتاگونیستی تریکودرما علیه *F. graminearum* نشان داد تریکودرما در بازداری از رشد این بیمارگر نقش دارد. در بررسی کشت متقابل ۷۲ ساعت پس از کشت، بین خود جدایه های جهش یافته ی تریکودرما از نظر بازداری از رشد تفاوت چندانی وجود نداشت (تقریبا ۵ درصد اختلاف در بازداری از رشد) ولی با جدایه مادری تفاوت زیادی هم از نظر رشد (۱۱-۶ درصد) و هم کلونیزه کردن پرگنه مقابل (سریع تر از جدایه مادری) مشاهده گردید. در بررسی عصاره های خارج سلولی تفاوت های معنی داری بین خود جهش یافتگان و جدایه مادری وجود داشت. جدایه های Th۲، Th ۲۲ (با ۳۹ درصد افزایش در بازداری از رشد نسبت به جدایه مادری در آزمون عصاره های خارج سلولی) ، Th ۷ و Th ۱۵ به عنوان جدایه های برتر معرفی گردید($P < ۰/۰۵$). لوز و همکاران[1] (۲۰۰۳) توان بیوکنترلی برخی از عوامل باکتریایی و قارچی از جمله تریکودرما را روی *F. graminearum* بررسی کردند. مکانیسم های کنترل شامل آنتی بیوز، تولید متابولیت های جلوگیری کننده از سنتز میکوتوکسین، میکوپارازیتیسم و القای مقاومت نقش مهمی در بیوکنترل بیماری داشته است.

در هر سه آزمون بیوکنترل انجام شده قارچ *S. sclerotiorum* در مقایسه با سایر قارچ های بیمارگر مورد بررسی از نظر رشد رویشی بیشترین میزان حساسیت را نشان داد (با ۸۹ و ۹۹ درصد بازداری از رشد به ترتیب در آزمون کشت متقابل و عصاره های خارج سلولی در جدایه جهش یافته برتر). هم چنین بررسی های صورت گرفته در آزمون عصاره های خارج سلولی تریکودرما روی این قارچ نشان داد علاوه بر رشد رویشی تعداد سختینه ها نیزتحت تاثیر قرار گرفتند. پس از هفت روز نگهداری در انکوباتور ۱±۲۳ درجه سلسیوس تیمار شاهد (فاقد عصاره تریکودرما) تعداد سختینه های زیاد با اندازه بزرگ(به طورمتوسط ۱۲ عدد)، تیمار جدایه مادری (حاوی عصاره تریکودرمای جدایه مادری) و تیمار Th۱۷ تعداد سختینه کم با قطر کم (به طور متوسط هشت عدد) در مقایسه با تیمار شاهد و بقیه تیمارهای جهش یافته تعداد بسیار کمتری سختینه (به طور متوسط دو عدد سختینه در Th۲۲) را تولید کردند(داده ها نشان داده نشده است). سختینه ها فرم بقا این قارچ می باشند که عصاره های خارج سلولی تریکودرما مانع از تولید آن می شوند. جدایه های جهش یافته Th ۴، Th ۵ و Th ۲۲ به عنوان جدایه های برتر در بازداری از رشد این قارچ بیمارگر در شرایط درون شیشه ای معرفی شدند ($P < ۰/۰۵$). علت حساسیت بیشتر *S. sclerotiorum* در مقایسه با سه قارچ بیمارگر مذکور را می توان به رشد کم و پایین بودن توانایی رقابتی آن نسبت به تریکودرما نسبت داد. اینبار و همکاران[2] (۱۹۹۶) نیز در بررسی های خود گزارش کردند که قارچ مایکوپارازیت *T. harzianum* هم به صورت درون شیشه ای و هم گلخانه ای باعث بازداری از رشد در *S. sclerotiorum* شده است. آزمون های درون شیشه ای پتانسیل تریکودرما را جهت کنترل پژمردگی اسکلروتینیایی خیار(۸۰-۶۹ درصد) و کاهو (۷۲- ۴۶ درصد) اثبات کرد.

بررسی های درون شیشه ای تریکودرما روی قارچ عامل مرگ گیاهچه کدوئیان (*R. solani*) نشان داد تریکودرما باعث بازداری از رشد در *R. solani* می شود. در آزمون کشت متقابل ۷۲ ساعت (سه روز) پس از

1-Luz *et al*.

1- Inbar *et al*.

کشت بین جدایه های جهش یافته برتر و جدایه مادری از نظر بازداری از رشد تفاوت زیادی وجود نداشت (۳ درصد اختلاف در بازداری از رشد) وخود جدایه مادری عملکرد بهتری نسبت به اغلب جدایه های جهش یافته نشان داد. در آزمون عصاره های خارج سلولی بازداری از رشد بین خود جهش یافتگان (۱-۴۹ درصد) و جهش یافتگان برتر و جدایه مادری تفاوت های معنی داری وجود داشت (۳۱ درصد اختلاف در بازداری از رشد) که نشان می دهد القای جهش با گاما از نظر تولید یا افزایش بیان برخی از آنزیم ها یا متابولیت ها در برخی جدایه های جهش یافته موثر بوده است. جدایه های جهش یافته Th ۱۱ (با ۳۲ درصد افزایش در بازداری از رشد نسبت به جدایه مادری در آزمون عصاره های خارج سلولی) و Th ۹ به عنوان جدایه های برتر در آزمون های آنتاگونیستی علیه *R. solani* معرفی شدند (P <۰/۰۵). این دو جدایه از نظر ژنتیکی نیز متفاوت با جدایه مادری بودند. آنس و همکاران[1] (۲۰۱۰) شانزده جدایه از تریکودرما را از خاک مزارع چغندرقند آلوده به رایزوکتونیای چغندرقند جداسازی کردند و نتایج آزمون های آنتاگونیستی درون شیشه ای و گلخانه ای آن ها نشان داد این جدایه ها از نظر خواص آنتاگونیستی و ژنتیکی متفاوت هستند و جدایه T30 متعلق به *T. gamsii* را به عنوان جدایه برتر معرفی کردند.

آزمون های آنتاگونیستی جدایه های جهش یافته و جدایه مادری تریکودرما علیه *M. phaseolina* جدا شده از خربزه آلوده به بیماری پوسیدگی ذغالی به صورت درون شیشه ای مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون کشت متقابل و عصاره های خارج سلولی تریکودرما علیه *M. phaseolina*، به ترتیب جدایه های جهش یافته Th۱ و Th۱۵ با ۳۶ و ۱۲ درصد افزایش در بازداری از رشد نسبت به جدایه مادری در آزمون های عصاره های خارج سلولی و کشت متقابل بیشترین میزان بازداری از رشد را نشان دادند (P <۰/۰۵). الاد و همکاران[2] (۱۹۸۶) گزارش کردند چهار جدایه *T. harzianum* Rifai از رشد و تولید میکرواسکلرت قارچ *M. phaseolina* در شرایط درون شیشه ای جلوگیری کردند.

کارایی کنترل بیولوژیکی جدایه های جهش یافته *T. viride* علیه دو بیمارگر مهم *R. solani* و *S. rolfsii* از طریق بالابردن محتوای آنزیم های کیتیناز و گلوکاناز، افزایش چشمگیری یافته است (قیسال برتی و سیواسی تامپارام، ۱۹۹۱). سکریس و همکاران[3] (۲۰۰۴) استفاده از جهش یافته های (توسط UV) *T.harzianum* با توانایی تولید پروتئاز بالا و در نتیجه فعالیت بیوکنترل بالا علیه بیمارگر های قارچی گیاهی را پیشنهاد نموده اند. گرم-کوک و فول[4] (۱۹۹۱) اثر جهش توسط UV را روی تغییر تولید آنتی بیوتیک *T. harzianum* روی بیمارگرهای *Fusarium, Rhizoctonia solani, Pythium*, در شرایط درون شیشه ای بررسی کردند. میزان بازدارندگی از رشد این بیمارگر ها افزایش یافته که به نظر می رسد ناشی از بازداشتن کلونیزاسیون توسط آنتی بیوتیک افزایش یافته باشد. اشعه گاما بسیار پر انرژی و قدرت نفوذ آن نیز بسیار زیاد است. پرتوتابی با اشعه گاما سبب تغییر ساختمان شیمیایی مولکول های ماده وراثتی می شود که نتیجه آن جهش ژن در اثر جایگزینی نوکلئوتید ها (با اکسیداتیو دآمیناسیون) و ترتیب مجدد بازهای آلی یا شکستن کروموزوم خواهد بود. القای جهش در جدایه های رایج *T. harzianum* با استفاده از فنون هسته ای (پرتوتابی) می تواند به بهبود کارایی و افزایش خاصیت آنتاگونیستی تریکودرما و متعاقب آن دستیابی به شیوه های مدیریت موثرتر بیماری های گیاهی قارچی بیانجامد. ارایه جدایه های جهش یافته تریکودرما که از توانایی بالاتری نسبت به جدایه های مادری برخوردار باشند می تواند افقی تازه در زمینه بیوکنترل بسیاری از بیماری های خاک برد، که

1- Anees *et al*.

2- Elad *et al*.
3- Szekeres *et al*.
4- Grame- Cook & Faull

در حال حاضر در تولید محصولات مختلف به صورت معضل غیر قابل حل درآمده اند، بگشاید و در راستای کاربرد های صلح آمیز فناوری هسته ای، در گسترش ذخایر توالی های ژنتیکی و افزایش کارایی عوامل مفید بیوکنترل موثر واقع شود (شهبازی و همکاران، ۱۳۹۱).

سپاسگزاری

کلیه نویسندگان از مساعدت ها و همکاری های مسئولین محترم آزمایشگاه گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تشکر می نمایند.

منابع

۱. .اهری مصطفوی، ح.، صفایی، ن.، فتح الهی، ه.، بابایی، م.، دری، ح. و لک، م. ۱۳۸۹. شناسایی پاتولوژیکی و مولکولی جدایه های فوزاریوم سولانی اختصاصی لوبیا و تعیین آهنگ دز پرتوگاما مناسب برای القای جهش در آن. مجله علوم وفنون هسته ای، ۵۱(۱): ۵۱-۴۸.

۲. .شهبازی، س.، عسکری، ح.، اهری، ح. و میرمجلسی، س. م. ۱۳۹۱. افزایش پتانسیل آنتاگونیستی تریکودرما با القای جهش در آنزیم گلوکاناز. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی در کشاورزی ایران. ۱۵-۱۳ شهریور، فردوسی مشهد، ایران. ص ۱۸۱.

3. Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Faloya, V., and Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of Trichoderma antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal biology, 114(9): 691-701.

4. Catlett, N., Lee, B.N., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. 2003. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. Fungal Genetics Newsletter, pp: 9-11.

5. Dennis, C., and Webster J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*1. Production of non-volatile antibiotics. Translational British Mycology Society, 57: 25-39.

6. Dennis, C., and Webster J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*11.Production of volatile antibiotics. Translational British Mycology Society, 57: 41-48.

7. Dennis, C., and Webster J. 1971c. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*111.Hyphal interactions. Translational British Mycology Society, 57: 363-369.

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

9. Ghisalberti, E., and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology & Biochemistry, 23 (11): 1011-1020.

10. Gohel, V., Megha, C., Vyas, P., and Chhatpar, H.S. 2004. Strain improvement of chitinolytic enzyme producing isolate *Pantoea dispersa* for enhancing its biocontrol potential against fungal plant pathogens. Annual Microbiology, 54(4): 503-515.

11. Graeme-Cook, K., and Faull, J. 1991. Effect of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens *in vitro*. Canadian Journal of microbiology, 37: 659-664.

12. Hall, R. 1981. Correction: Benomyl increases the selectivity of the Nash-Snyder medium for *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Canadain Journal of Plant Pathology, 3(2): 97-102.

13. Inbar, J., Menendez, A., and Chet, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* & *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. Soil Biology and Biochemistry, 28(6): 757-763.

14. Jiang, X., Geng, A., He, N., and Li, Q. 2011. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. Journal bioscience & bioengineering, 111(2): 121-127.

15. Li, X., Yang, H., and Roy, B. 2010. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave & ultraviolet. Microbiologial Research, 165 (3): 190-198.

16. Luz, W.C., Stockwell, C., and Bergstrom, G.C. 2003. Biological control of *Fusarium graminearum*. Fusarium head blight of wheat and barley, pp: 381-394.

17. Moradi R., Shahbazi S., Ahari Mostafavi H., Askari H., Mirmajlesi M., and Ebrahimi M. A. 2012. Optimization of irradiation for Gamma induced mutation in *Trichoderma viride* , 18th Iranians Nuclear Conference, Feb, pp: 22-23.

18. Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F., and Manczinger, L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiologial Letters, 233: 215-222.