گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۹ شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

تاثیر تریکودرما در کاهش آلودگی گندم به زنگ قهوه‌ای و میزان آنزیم پراکسیداز

هدی شریفی[1*]، محمد سالاری[2]، سید مهدی شتاب بوشهری[3]، ناصر پنجه که[2]

۱- ***نویسنده مسوول:** دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
(sharifi.hoda62@gmail.com)

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی خوزستان

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۹

چکیده

تاثیر تیمارهای بیولوژیک در کاهش شدت بیماری زنگ قهوه‌ای *Puccinia recondite* Rob. ex. Desemf. sp. *tritici*، در یک آزمایش کرت‌های دو بار خرد شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار با قرار دادن ارقام گندم چمران و بولانی درکرت‌های اصلی و سه گونه قارچ تریکودرما شامل *Trichoderma harzianum*، *T. citrinoviride* و *T. longibrachiatum* در کرت‌های فرعی اول و روش‌های کاربرد برگی و یا بذری در کرت‌های فرعی دوم در گلخانه بررسی گردید. همچنین نوسان در سطح آنزیم پراکسیداز در روش‌های بذری و برگی به روش Hemeda and Kelin اندازه‌گیری شد. نتایج، تفاوت معنی‌داری میان ارقام گندم ($P<0.05$)، گونه‌های تریکودرما و روش‌های تیمار کردن ($P<0.01$) را نشان داد. کاهش بیماری در رقم چمران بیشتر از رقم بولانی ($P<0.05$)، و روش تیمار بذری آلودگی کمتری در مقایسه با تیمار برگی نشان داد ($P<0.05$). اثرات متقابل در تمام حالات ممکن معنی‌دار بود ($P<0.01$). نوسان سطوح آنزیم پراکسیداز در تیمارها در مقایسه با شاهد دارای تفاوت معنی‌دار بود ($P<0.05$).گونه های تریکودرما تاثیر مستقیمی بر بیمارگر نشان ندادند و ساز و کار آنها در کنترل بیماری به صورت کاهش غیرمستقیم بیماری و به روش مقاومت القایی ارزیابی گردید.

***کلید واژه‌ها:** Pucciniarecondita، کنترل بیولوژیک ، Trichoderma spp.*

مقدمه

زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه زراعی مهم است و گسترشی جهانی دارد (Roelfs and Bushnell, 1985). این بیماری تحت نام‌های زنگ برگی (Leaf rust) ، زنگ قهوه‌ای (Brown rust) ، زنگ کوتوله (Dwarf rust) و زنگ نارنجی (Orange rust) شناخته می‌شود و یکی از وسیع‌الانتشارترین بیماری‌های گندم است (Okhovat, 2000). این بیماری می‌تواند سبب کاهش ۱۰ تا ۳۰ درصدی محصول در مزارع گندم ایران شود (Sadravi, 2009). در سال‌های اخیر استفاده از آنتاگونیست‌ها در مدیریت مبارزه با بیماری‌های گندم مورد توجه قرار گرفته است (Ahmad and Ahmad, 1999). گونه‌های تریکودرما از اجزاء غالب میکوفلور خاک‌ها در زیستگاه‌های مختلف هستند و از آنها برای کنترل قارچ‌های بیمارگر گیاهی استفاده شده است (Sarami et al., 2002). این قارچ آنتاگونیست علاوه بر پارازیتیسم مستقیم و رقابت برای کسب مواد غذایی

موجود در محیط، تولید متابولیت‌های ثانویه شامل آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌هایی با تاثیر ضد قارچی می‌کند و از این طریق سبب بازدارندگی رشد قارچ‌های بیمارگر گیاهی می‌شود؛ علاوه بر این ترکیبات فعال بیولوژیکی، تریکودرما می‌تواند در ایجاد مقاومت القایی مورد استفاده قرار گیرد (Vinale et al., 2008). یکی از ساز و کارهایی که تریکودرما بر علیه بیمارگرها به کار می‌برد انگیزش سامانه دفاعی گیاهان به صورت مقاومت القایی است. در صورتی‌که پیش از حمله بیمارگر، گیاه به وسیله‌ی قارچ تریکودرما تیمار شود در برابر آلودگی مقاومت نشان می‌دهد، این پدیده هم در گیاهان تک لپه و هم گیاهان دو لپه مشاهده شده است (Yedidia et al., 1999). تیمار پیش از آلودگی گیاهان با تریکودرما میزان آلودگی گیاه به بیمارگر را در اندام‌های تیمار نشده و با فاصله از محل تیمار کاهش می‌دهد، این پدیده تحت عنوان مقاومت سیستمیک القایی Induced Systemic Resistance (ISR) شناخته شده است. در حالت ایجاد مقاومت القایی، تیمار با قارچ تریکودرما بدون ایجاد افزایش فعالیت پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (*PR-proteins*) روی می‌دهد و ایجاد مقاومت القایی در گیاه توسط تریکودرما مانند آنچه در تنش‌های محیطی و زیستی روی می‌دهد به متابولیسم RNA و DNA و پروتئین بستگی دارد (Cordo et al., 2007). عکس‌العمل‌های دفاعی گیاه ممکن است به صورت موضعی و یا سیستمیک بروز نماید که در حالت سیستمیک میزان برخی مواد مثل محتویات فنلی و آنزیم‌های دفاعی از قبیل پراکسیداز در گیاه افزایش می‌یابد (Mohammadi and Kazemi, 2002). لازم به ذکر است که رفتار گیاهان ارتباط ویژه‌ای با فعالیت آنزیم پراکسیداز دارد. آنزیم پراکسیداز باعث تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود؛ همچنین این آنزیم در رشد و تقسیم سلولی گیاهان نقش دارد. بیان ژن‌های کد کننده این آنزیم در شرایط تنش افزایش می‌یابد (Inze and Van Montagu, 1995). قارچ آنتاگونیست تریکودرما می‌تواند باعث بیان ژن‌های دفاعی از قبیل پراکسیداز قبل از حمله بیمارگرها شود (Wang et al., 2005).هدف از انجام این پژوهش بررسی اثرات مستقیم و غیر مستقیم تریکودرما در بازدارنگی از خسارت بیماری زنگ در دو ژنوتیپ حساس و نیمه‌حساس گندم و نیز مکانیسم بکار گرفته شده توسط این آنتاگونیست است.

مواد و روش ها

تهیه گونه‌های تریکودرما و ارقام گندم

در آزمایش‌ها از سه گونه تریکودرما شامل *Trichoderma harzianum*، *T. citrinoviride* و *T. longibrachiatum* استفاده شد. این گونه‌ها از آزمایشگاه تولید فرآورده‌های بیولوژیک مرکز تحقیقات کشاورزی استان خوزستان تهیه شدند. بذر ارقام گندم بولانی(حساس) و چمران(نیمه‌حساس) از مرکز تحقیقات صفی‌آباد دزفول دریافت گردید. بذور مورد استفاده در این آزمایش پیش از تیمار کردن درون اتانول ۷۰٪ به مدت ۴ دقیقه سترون و سپس با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند(Cordo et al., 2007).

تولید مایه تلقیح بیمارگر *Puccinia recondita*

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به یک تشتک پتری حاوی پودر یوردوسپورهای زنگ قهوه‌ای جمع‌آوری شده از برگ‌های گندم رقم بولانی اضافه و یک سوسپانسیون غلیظ تهیه گردید. سپس از این سوسپانسیون اسپور اولیه و به کمک لام اسپورشمار غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه گردید و برای یکنواخت کردن Tween 20 به نسبت ۵۰ میکرولیتردر ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اضافه شد(Abdel-Kader et al., 2012).

تهیه مایه تلقیح تریکودرما

برای تهیه سوسپانسیون اسپور مقدار ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شده به محیط کشت هر یک از سه گونه‌ی تریکودرمای مورد استفاده اضافه شد و سپس با یک قلم‌موی سترون یا یک میله شیشه‌ای سطح محیط کشت به

آرامی تراشیده شد. غلظت‌های 10^4، 10^5 و 10^6 اسپور در میلی‌لیتر از سوسپانسیون بدست آمده به کمک لام اسپورشمار تهیه گردید و سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از Tween 20 به هر ۱۰۰ میلی‌لیتر آن افزوده شد (Cordo et al., 2007).

تولید چکیده کشت مایع گونه‌های تریکودرما

در سه ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری هر کدام به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت داوت ریخته شد و به هر یک از آنها یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور گونه‌های تریکودرما به غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شد. ارلن‌ها به مدت ۱۰ روز روی شیکر دوار با ۷۰ تکان در دقیقه قرار گرفت. پس از ۱۰ روز عصاره‌گیری در شرایط سترون انجام شد. به این ترتیب که ابتدا محتویات کشت از کاغذ صافی واتمن شماره یک برای جداسازی پالت‌های قارچی عبور داده شده و محتویات آن درون یک ارلن استریل جمع آوری شد. سپس تحت شرایط استریل با استفاده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون و پمپ خلاء عصاره خالص آنتاگونیست‌ها تهیه گردید (Shetab Bushehri, 1998).

ارزیابی تأثیر مستقیم اسپور و چکیده گونه‌های تریکودرما بر زنگ قهوه‌ای گندم در آزمایشگاه

برای این منظور از یک لام حفره‌دار استفاده گردید. این آزمایش با سه تکرار انجام شد. ابتدا لام را سترون کرده و سپس با استفاده از یک قطره‌چکان مدرج مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از کشت مایع آنتاگونیست‌ها و سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6در یک حفره ریخته شد.سپس در هر یک از حفره‌ها ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون زنگ قهوه‌ای گندم با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر ریخته شد. در تیمار شاهد، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون ریخته شد. لام حفره‌دار درون دسیکاتور در دمای 22^oC در مکان تاریکی قرار گرفت تا شرایط مطلوب جوانه‌زنی برای اسپورهای زنگ قهوه‌ای گندم فراهم شود. بعد از گذشت ۴۸ ساعت میزان تندش یورودیوسپورها شمارش و توسط نرم‌افزار MSTA-C مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت (Perazzolii et al., 2008).

آزمایش‌های گلخانه‌ای

برای انجام این تحقیق یک آزمایش کرت‌های دو بار خرد شده بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه با قرار دادن ارقام بولانی(حساس) و چمران(نیمه‌حساس) در کرت‌های اصلی و سه گونه قارچ تریکودرما شامل *Trichoderma harzianum*، *T. longibrachiatum*، *T .citrinoviride* در کرت‌های فرعی اول و روش‌های کاربرد برگی و بذری با استفاده از سوسپانسیون اسپور و یا چکیده کشت گونه‌های نامبرده، در کرت‌های فرعی دوم به اجرا در آمد. بذور ارقام گندم ابتدا در اتانول ۷۰٪ به مدت ۴ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از آب‌کشی با آب مقطر سترون برای تهیه تیمار بذری به مدت ۴ ساعت درون چکیده کشت مایع و یا سوسپانسیون اسپور با غلظت‌های 10^4، 10^5و 10^6قرار گرفتند. از کربوکسی متیل سلولز (CMC) به میزان یک گرم در لیتر در سوسپانسیون اسپور و چکیده کشت مایع استفاده شد. خاک مورد نیاز این آزمایش از مخلوط یکنواخت شده با نسبت یک به سه خاک برگ و خاک مزرعه تهیه و درون اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۶۰ دقیقه سترون و برای انجام آزمایش درون گلدان‌های پلاستیکی یک کیلوگرمی ریخته شد. تعداد ۲۵ عدد بذر تیمار شده در هر گلدان کشت گردید. یک هفته پس از کشت، مایه‌زنی با عامل زنگ قهوه‌ای به صورت مالشی با استفاده از گوش پاک‌کن تمیز آغشته به یوردیوسپور انجام شد. در روش تیمار برگی گلدان‌های کشت شده پس از هفت تا ۱۰ روز که گیاهچه‌ها از رشد و سبزینگی کافی برخوردار شدند (مرحله‌ی یک برگی) با استفاده از سوسپانسیون اسپور و چکیده کشت مایع گونه‌های تریکودرما با یک مه‌پاش دستی تیمار شدند طوری که پوشش مناسب بر روی گیاهچه ایجاد گردید. سه روز پس از این مرحله گلدان‌ها توسط اینوکولوم زنگ قهوه‌ای با استفاده از گوش

پاک‌کن به روش مالشی مایه‌زنی شدند و برای حفظ رطوبت از سرپوش‌های پلاستیکی بر روی گلدان‌ها استفاده شد. گلدان‌ها در رطوبت نسبی ۷۰٪ و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی نگه‌داری و سپس در شرایط نور طبیعی قرار گرفتند و پس از ۲۱ روز شدت و تیپ آلودگی به روش اصلاح شده‌ی Cobb (Peterson et al., 1948) برای تیمارها ثبت و نتایج حاصل با استفاده از ضرایب مربوط به هر تیپ آلودگی برای قابل استفاده شدن در تجزیه آماری به ارقام کمی تبدیل شدند (Cordo et al., 2007) . تجزیه آماری توسط نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت (Mohammadi and Kazemi, 2002).

اندازه‌گیری میزان آنزیم پراکسیداز

بررسی میزان آنزیم پراکسیداز در تیمارهای برگزیده‌ای که در روش برگی و بذری میزان آلودگی کمتری را نشان دادند به روش Hemeda and Kelin (1990) با استفاده از جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، در دمای آزمایشگاه (۵ ±۲۵) انجام شد. بدین منظور ۹ تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی برگ‌های تیمارهای برگزیده، بریده و در یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شدند. یک گرم از بافت برگ وزن شده و در هاون مخصوص در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در حضور ۳ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم کاملاً خرد و سپس با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس یک میلی‌لیتر از مخلوط واکنش با ۱۰ میکرولیتر از عصاره خام به وسیله همزن مخلوط گردید و میزان جذب نوری نمونه قرائت شد. مخلوط واکنش شامل: ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰ میلی‌لیتر گایاکول ۱٪ و همچنین ۱۰ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۳٪ بود. میزان آنزیم پراکسیداز در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $Mm^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶ تعیین گردید.

نتایج

ارزیابی تأثیر مستقیم اسپور و چکیده گونه‌های تریکودرما بر زنگ قهوه‌ای گندم در آزمایشگاه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها از نظر تاثیر مستقیم چکیده تریکودرما و سوسپانسیون اسپور بر میزان تندش تلیوسپورهای قارچ عامل زنگ قهوه‌ای تفاوت معنی‌داری میان گونه‌های تریکودرما و شاهد نشان نداد. و بدین طریق مشخص گردید که اثرات مشاهده شده در این آزمایشات نه آنتاگونیسم مستقیم، بلکه حاصل القای مقاومت و بصورت غیر مستقیم بوده است(جدول‌های ۱ و ۲).

آزمایش گلخانه‌ای

نتایج تجزیه واریانس آزمایش انجام شده نشان داد که میان ارقام گندم ($P<0.05$)، گونه‌های تریکودرما ($P<0.01$) و روش تیمار کردن ($P<0.01$) واثرات متقابل رقم × تیمار، تریکودرما × تیمار و رقم × تریکودرما × تیمار تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($P<0.01$) (جدول ۳). اثر متقابل گونه تریکودرما × رقم معنی‌دار نبود. آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که هر سه گونه‌ی تریکودرما توانستند (کلاس b) میزان بیماری را در ارقام مورد بررسی کاهش دهند ولی در این بین گونه‌ی *T. harzianum* سبب کاهش بیشتر بیماری گردید(جدول ۴). در تیمار بذری چکیده کشت مایع *T. harzianum* بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری داشت و در مراتب بعدی *T. citrinoviride* و همچنین سوسپانسیون اسپور گونه‌ی *T. harzianum* به غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر تیمارهای برگزیده بودند. در تیمار برگی نیز چکیده کشت مایع *T. harzianum* و سوسپانسیون اسپور آن با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور آن سبب کاهش بیشتر شدت بیماری زنگ قهوه‌ای در هر دو رقم گردیدند. در تیمار برگی نیز *T. citrinoviride* و همچنین سوسپانسیون اسپور گونه‌ی *T. harzianum* به غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر، تیمارهایی بودند که بیشترین سهم را در کنترل بیماری داشتند.

جدول ۱-نتیجه آزمون F برای مقایسه واریانس اثر چکیده و سوسپانسیون اسپور بر تندش اسپور زنگ قهوه ای

Table1. ANOVA results of comparison of *Trichoderma* extract and spore suspension effect on leaf rust spore germination.

Trichoderma sp.	Source	df	Mean Square	F	P
T. harzianum	extract	8	2601.80	0.8125	0.3880
	Spore Suspension	8	2617.12		
T. longibrachiatum	extract	8	2691.00	1.4074	0.6402
	Spore Suspension	8	2739.50		
T. citrinoviride	extract	8	2754.12	1.4559	0.6075
	Spore Suspension	8	2743.50		

جدول ۲- میانگین تندش اسپور زنگ قهوه ای در چکیده وسوسپانسیون اسپورتریکودرما

Table2- Mean of leaf rust spore germination in *Trichoderma* extract and spore suspension

Treatment	germination mean±SE
Trichoderma harzianum [a]	49.66±1.746
Trichoderma longibrachiatum[a]	48.00±0.577
Trichoderma citrinoviride [a]	48.33±0.882
Trichoderma harzianum [b]	52.00±1.453
Trichoderma longibrachiatum[b]	51.66±0.334
Trichoderma citrinoviride [b]	50.66±0.577
check	50.66±0.445

حروف a و b بترتیب نشانگر چکیده و سوسپانسیون اسپور می باشد

Letters a and b indicate extract and spore suspension, respectively.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس آزمایش گلخانه‌ای در کاهش شدت آلودگی به زنگ قهوه‌ای

Table3- Analysis of variance for infection reduction to leaf rust in glasshouse experiment

Sources of variation	MS	DF	significance
cultivar	1470.776	1	*
Trichoderma species	1807.442	1	**
application methods	82534.377	12	**
cultivar × species of *Trichoderma*	143.846	12	ns
cultivar × application methods	3007.961	12	**
Trichoderma species× application methods	5480.841	12	**
cultivar ×application methods×species of *Trichoderma*	444.410	12	**

* و ** بترتیب به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ است و ns نشانگر غیر معنی‌دار بودن است.

*and ** and ns indicate respectively significance at 0.05 and 0.01 probability level and non-significant

جدول ٤- مقایسه میانگین درصد آلودگی به *Puccinia recondita* در اثر کاربرد تیمارهای اعمال شده، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن- غلظت سوسپانسیون اسپور گونه‌های تریکودرما بر حسب اسپور در میلی‌لیتر است.

Table 4-Comparison of means (%) of infection to *Puccinia recondita* based on Duncan Multiple Range test- spore suspension concentration is spore/ml

Treatment	Mean of infection(%)±SE	Grouping
check	83.33±1.184	a
Spore suspension *T. longibrachiatum*10^4	44.33±0.578	ab
spore suspension *T. longibrachiatum*10^5	41.33±0.763	ab
spore suspension *T. longibrachiatum*10^6	32.33±0.254	ab
Spore suspension *T. citrinoviride* 10^4	16.67±1.562	ab
Spore suspension *T. citrinoviride* 10^5	13±0.568	b
Spore suspension *T. harzianum* 10^4	7.917±0.234	b
Extract of liquid culture of *T. longibrachiatum*	4.017±0.241	b
Spore suspension *T. harzianum* 10^5	2.333±0.331	b
Spore suspension *T. citrinoviride* 10^6	1.083±0.011	b
Spore suspension *T. harzianum* 10^6	0.4833±0.130	b
Extract of liquid culture of *T. citrinoviride*	0.667±0.113	b
Extract of liquid culture of *T. harzianum*	0.3167±0.170	b

حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند و در گروه‌های جداگانه قرار می‌گیرند.

Unsimilar letters show significant difference for different groups.

میزان آنزیم پراکسیداز

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از اسپکتروفتومتر نشان داد که در تیمار (شاهد مثبت) مایه‌زنی با زنگ قهوه‌ای سبب افزایش فعالیت پراکسیداز شد که این افزایش فعالیت در رقم بولانی به عنوان رقم حساس به زنگ قهوه‌ای نسبت به رقم چمران که نیمه حساس می‌باشد بسیار قابل توجه بود. همچنین نتایج حاصل از این بررسی در تیمار بذری و برگی نشان داد که تیمار با تریکودرما سبب افزایش فعالیت آنزیمی در هر دو رقم و در هر دو شیوه برگی و بذری می‌شود ولی در کل آزمایش‌ها در رقم بولانی قابل توجه‌تر بود و همچنین مشخص شد که تیمار بذری سبب افزایش بالاتر فعالیت آنزیم نسبت به تیمار برگی شد. از بین تیمارهای اعمال شده تیمار مخلوط چکیده کشت مایع *T. harzianum* و *T. citrinoviride* که با یوردیوسپورهای بیمارگر *Puccinia recondita* آلوده شده بود بالاترین مقدار فعالیت آنزیمی را نشان داد. از بین دو روش چکیده کشت مایع و سوسپانسیون اسپور نیز، چکیده کشت مایع تریکودرما توانست سبب افزایش بالاتر فعالیت آنزیم نسبت به سوسپانسیون اسپور گردد (جدول ۵).

بحث

آلودگی بالایی که در محیط به وسیله‌ی قارچ‌کش‌ها و مواد شیمیایی مضر به وجود می‌آمد باعث شد که راهکاری جدید در جهان برای کنترل بیماری‌های گیاهی ایجاد شود. در این میان کنترل بیولوژیکی برای مدیریت اکولوژیکی بیماری‌های گندم به عنوان بهترین استراتژی پذیرفته شد. گزارش‌های بسیاری در مورد ویژگی‌های بیوشیمیایی پاسخ‌های دفاعی گیاهان به استرس‌های غیرزنده و عوامل زنده منتشر شده است (Cordo et al., 2007).

در این بررسی استفاده از تریکودرما به طور مستقیم هیچ تأثیری بر یوردیوسپورهای *Puccinia recondita* نداشت که این یافته با نتایج تحقیق Perazzolii et al. (2008) در مورد عوامل سفیدک داخلی مشابهت داشت. نامبرده و همکاران چنین اظهار داشتند که تریکودرما هیچ تأثیر مستقیمی روی مورفولوژی و جوانه‌زنی اسپورانژیوم *Plasmopara viticola* و *Plasmopara parasitica* نداشت و چنین استنباط کردند که اثرات بازدارندگی مشاهده شده بر علیه این عوامل بیمارگر وابسته

جدول ۵- تغییرات میزان آنزیم پراکسیداز در تیمارهای بذری و برگی در اثر کاربرد تیمارهای اعمال شده - غلظت سوسپانسیون اسپور گونه‌های تریکودرما بر حسب اسپور در میلی‌لیتر است.

Table 5-Differences of peroxidase levels in seed and leaf treatments following treatment application-spore suspension concentration is spore/ml

treatment	vol/vol	enzyme activity(%) ± SE	
		seed	leaf
T. citrinoviridea+ &*T. harzianum*	Extract of liquid culture/ Extract of liquid culture	19.45±1.171a	17.33a±0.241a
T. harzianum+	Extract of liquid culture	18.42±0.248b	16.28±0.481b
T. harzianum	Extract of liquid culture	18±2.534bc	16±1.251bc
T. citrinoviridea & *T. harzianum*	Extract of liquid culture/ Extract of liquid culture	17.52c±0.521c	15.44c±0.840c
T. citrinoviridea+	Extract of liquid culture	15.69±0.473d	13.76±1.811d
T. citrinoviridea	Extract of liquid culture	15.13±0.861de	13.20±2.330de
T. harzianum+	Spore suspension 10^6	14.49±0.674ef	12.55±0.254ef
T. harzianum	Spore suspension 10^6	13.86±0.861f	11.90±0.861f
+ check	0	9.50±0.887g	9.43±0.331g
- check	0	9.20±1.187g	8.11±1.154g

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشند و در گروه‌های جداگانه قرار می‌گیرند. علامت + نشان‌دهنده آلوده شدن به اسپور زنگ قهوه‌ای گندم می‌باشد.

Different letters indicate significance among treatments which are located in different groups. + indicates infection to brown rust.

به مقاومت القایی است. زیرا در مواجهه با عوامل بیمارگر نامبرده، تریکودرما پارازیتیسم و نفوذ مستقیم علیه این عوامل را از خود نشان نداد. بنابراین چنین استنتاج شد که تریکودرما توانایی انگیزش مقاومت القایی در گیاه بر علیه عامل بیمارگر را دارد. همچنین Cordo et al. (2007) کنترل بیماری توسط تریکودرما را غیر مستقیم اعلام کردند و بیان کردند که تریکودرما توانایی بروز تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی را در گیاه دارد و بنابراین تحریک مقاومت در گیاه را سبب می‌شود. در این بررسی هر سه گونه استفاده شده آنتاگونیست تریکودرما توانستند بیماری را کنترل کنند، ولی گونه *T. harzianum* از بین گونه‌های استفاده شده در کنترل بیماری موفق‌تر بود. گزارش‌های زیادی مبنی بر استفاده از تریکودرما در کنترل بیماری‌های گندم منتشر شده است. Howel (2003) القا مقاومت در میزبان‌های متفاوت را توسط گونه‌های مختلف تریکودرما گزارش کرد.

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که بین دو تیمار برگی و بذری، تیمار بذری درکنترل بیماری موفق‌تر بود. Cordo et al., (2007) نیز تیمار بذری تریکودرما را بر علیه سفیدک حقیقی گندم مؤثرتر از تیمار برگی اعلام کردند و بیان کردند که فعالیت تریکودرما وقتی که روی برگ‌های گندم به کار برده می‌شود کاهش پیدا می‌کند. ولی در مطالعه‌ای که در روی سفیدک پودری مو در ارقام انگور انجام شد Perazzolii et al. (2008) تیمار برگی تریکودرما را در کنترل بیماری بسیار موفق و امیدبخش دانستند. در این بررسی در بازیابی تریکودرما از برگ‌های رشد کرده از گیاهانی که تحت تیمار بذری تریکودرما در گلخانه رشد کرده بودند اثری از تریکودرما یافت نشد که این موضوع با گزارش‌های Cordo et al. (2007) مطابقت داشت که نتیجه گرفتند که کنترل بیماری توسط تریکودرما غیر مستقیم و از طریق القای مقاومت بوده و این قارچ آنتاگونیست توانایی ایجاد تغییرات غیر مستقیم بیوشیمیایی و مورفولوژیکی را دارد.

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه پراکسید هیدروژن در شرایط تنش و بیماری باعث فعال شدن مسیرهای انتقال پیام در سلول شده و در نهایت با

افزایش بیان ژن‌های کد کننده آنزیم پراکسیداز فعالیت آن را افزایش می‌دهد (Inze and Van Montagu, 1995). در این آزمایش تیمار با تریکودرما و آلوده‌سازی با یوردیوسپورهای بیمارگر زنگ قهوه‌ای سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز شد. می‌توان گفت که بخشی از تأثیر محافظت این عوامل القا کننده مقاومت می‌تواند نمایی از فعالیت آنزیم پراکسیداز باشد که با نظرات Ushmalini et al. (2008) مطابقت داشت. آنها القا آنزیم‌های دفاعی گیاه در گیاهان زردچوبه را به وسیله گونه‌های تریکودرما مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که تریکودرما باعث افزایش و تسریع در بیان ژن‌های دفاعی می‌شود که می‌تواند سبب القا مقاومت در گیاه بر علیه بیمارگر شود. Roldan Serrano et al. (2007) نیز فعالیت پراکسیداز را با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری کردند و تغییر در مقدار جذب را بیان کردند، آنها افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز را بعد از مایه‌زنی با عامل سفیدک کرکی در گیاهان آفتابگردان حساس نسبت به بیماری گزارش کردند و بیان کردند که در گونه‌های حساس افزایش فعالیت قابل توجه می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی از این پژوهش نشان می‌دهد که اگر از گونه مناسب قارچ آنتاگونیست تریکودرما به صورت تیمار بذر استفاده شود می‌تواند با ایجاد مقاومت القایی که از طریق فعال کردن ژن‌های واکنش دفاع صورت می‌گیرد شدت بیماری ایجاد شده توسط عامل بیمارگر را در حد معنی‌داری کاهش دهد و از آنجائیکه شدت بیماری ایجاد شده با میزان خسارت ارتباط مستقیم دارد می‌تواند در عمل سبب کاهش خسارت آن گردد.

REFERENCES

Abdel-Kader, M.M., El-Mougy, N.S., Aly, M.D.E. and Lashin S.M. 2012. Long activity of stored formulated bio-agents against some soil-borne plant. Pathogenic fungi causing root rot of some vegetables. Journal of Applied Sciences Research, 8(4): 1882-1892.

Ahmad, S., and Ahmad, N. 1999. Biological control of pigeon pea wilt cause by *Fusarium oxysporum* f.sp.*undum* with *Trichoderma* spp. Iranian Journal of Plant Pathology, 35 (1-4):15-22.

Okhovvat, M. 2000. Cereal diseases. University of Tehran Publication, Tehran. (in Farsi).

Cordo, C., Monaco, C., Segarra, C., Simon, M., Mansilla, A., Perello, A., Kripelz, N., Bayo, D., and Conde, R. 2007.*Trichoderma* spp. As elicitors of wheat plant defense responses against *Septoriatritici*. Biocontrol Science and Technology, 17: 687 – 698.

Hemeda, H.M., and Kelin, B.P. 1990. Effects of naturally occurring antioxidans on peroxidase activity of vegetables extracts. Journal of Food Science, 55: 184-185.

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

Inze, D., and Van Montagu, M. 1995. Oxidative stress in plant. Current Opinion in Biotechnology, 6: 153-158.

Mohammadi, M., and Kazemi, H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science, 162: 491-498.

Perazzolii, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y., and Pertot, I. 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grape vine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. Biological control, 47: 228 – 234.

Peterson, R.F., Cambell, A.B., and Hannah, A.E. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereal. Canadian Journal of Agricultural Research, 26: 496 – 500.

Roelfs, A.P., and Bushnell, W.R. 1985. The cereal rusts. Vol. II. diseases distribution, epidemiology and control. Academic Press, Orlando.

Roldan Serrano, A., Lunadelcastillo, J., Jorrin Novo, J., Fernandez Ocana, A., and Gomez Rodriguez, M.V. 2007.Chitinaze activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halestedii*. Biological plantarum, 51(1): 149 - 152.

Sadravi, M. 2009.Important diseases of crop plants. Jehad-e-daneshgahi Mashhad, Mashhad. (in Farsi)

Sarami, H., Peyghami, A., and Pajuhande, M. 2002 Principles of Mycology.University of Mashhad publication, Mashhad. (in Farsi).

ShetabBooshehri, M. 1998. The effect of several fungicides and antagonistic fungi (*Trichoderma* spp.) on date palm inflorescence rot. Master thesis. University of Tehran, Karaj. (in Farsi with English abstract)

Ushmalini, C., Nakeerran, P., and Marimuthu, T. 2008. Induction of plant defence enzymes in turmeric plants by *Trichoderma viridae*. Phytopathology and Plant Protection, 41(2): 79-93.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Gistaberti, E., Marra, R., Woo, S., and Lorita, M. 2008. *Thricoderma*- plant- pathogen interactions. Soil biology & biochemistry, 40: 1-10.

Wang, Y., Ohare, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. 2005. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescence* in Arabidopsis. Molecular Plant, Microbe Interaction, 18: 385-396.

Yedidia, I., Benhamou, N., and chet, I. 1999. Induction of defence response in cucumber plants by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1061-1070.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 39(3) Fall 2016

Effect of *Trichoderma* on reduction of wheat infection to wheat brown rust and amount of peroxidase enzyme

H. Sharifi[1*], M. Salari[2], S.M. Shetab Booshehri[3] and N. Panjehkeh[2]

1. [*]**Corresponding author:** Former M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran (sharifi.hoda62@gmail.com)
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran
3. Researcher, Khuzestan Agricultural Research Center, Iran

Received: 22 March 2016 Accepted: 13 September 2016

Abstract

Effects of biological treatments on disease intensity reduction of wheat brown rust caused by *Puccinia recondite*Rob. ex. Desem f.sp. *tritici* was studied in a split-split plot design, conducted based on completely randomized design in a glasshouse with three replications. Chamran and Boolani cultivars planted in main plots and three *Trichoderma* species including *Trichoderma harzianum*, *T. citrinoviride* and *T. longibrachiatum* were located in first subplots and leaf and seed treatments inoculation methods were used in second subplots. Changes in peroxidase enzyme level were also determined by Hemeda and Kelin method. The results showed a significant difference between chamran and boolani cultivars ($P<0.05$), the *Trichoderma* species ($P<0.01$), methods of antagonist inoculation ($P<0.01$) and their interactions ($P<0.01$). Disease reduction in Chamran cultivar was more than Boolani and seed inoculation method was more effective than leaf treatment ($P<0.05$). Interactions of treatments in all possible cases were significant ($P<0.01$). Changes in proxidase enzyme level in treatments in comparison to control were significantly different. This study revealed that the observed disease reduction in this study was motivated by induced resistance mechanism because no direct inhibition of germination of pathogen uridiospore was observed by *Trichoderma* spp.

Key Words: Biological control, Trichoderma* spp., *Puccinia recondita