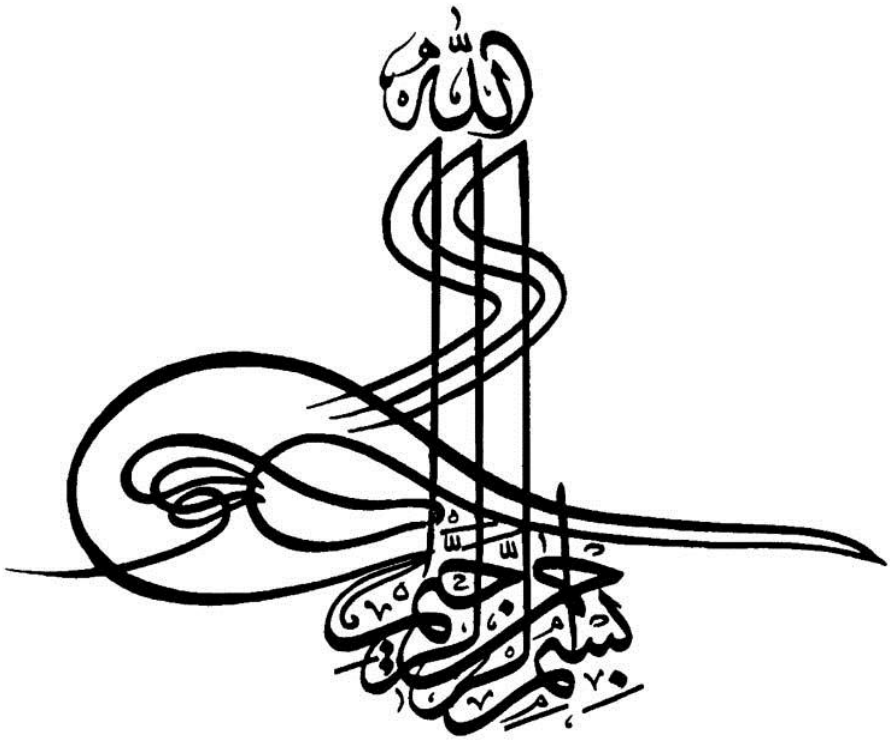
الله
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده تولیدات گیاهی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.) در رشته بیماری شناسی گیاهی

# تولید انبوه چهار گونه تریکودرما، فرموله کردن و کاربرد آن در کنترل قارچ های بیماریزای خاکزاد

پژوهش و نگارش:

غلامرضا پناهیان

استاد راهنما:

دکتر کامران رهنما

استاد مشاور:

دکتر سید مهدی جعفری

۱۳۹۱

## تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **غلامرضا پناهیان** دانشجوی رشته **بیماری شناسی گیاهی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

ستایش خداوندی را که صفت هایش همیشگی است و صفتی بر صفت دیگرش پیشی نگرفته، تا اول باشد پیش از آنکه آخر باشد، و ظاهر باشد پیش از آنکه باطن باشد. هر واحد و تنهایی غیر او اندک است. هر عزیزی غیر از او ذلیل و هر نیرومندی غیر از او ضعیف است. هر مالکی غیر او مملوک و هر دانایی غیر او دانش آموز است. هر توانایی غیر او گاهی قادر و گاهی عاجز است. هر شنونده ای غیر او صدای آهسته را نمی شنود و آواز بلند او را ناشنوا می سازد و آوایی که دور است به گوش او نمی رسد. هر بیننده ای غیر او از دیدن رنگ های پنهان و جسم های لطیف کور است. هر آشکاری جز او غیر باطن است. مخلوقات را نه برای تقویت فرمانروایش آفرید و نه به خاطر پیشامدهای زمان، و نه برای آنکه از آن ها برای همتای پرخاشگر، یا شریک پر نخوت، یا ضد طغیانگر یاری جوید. بلکه همه مخلوقاتی هستند پرورده او و بندگانی هستند کوچک و ناتوان. در اشیا حلول نکرده تا گفته شود خدا در آن هاست و از آن ها دور نشده تا گویند جدای از آن هاست. نه آفریدن آنچه پدید آورد و تدبیر آنچه خلق کرد خسته و درمانده اش ساخته و نه ناتوانی از ایجاد کائنات او را متوقف نموده و نه در آنچه حکم داده و مقدر ساخته اشتباهی بر او وارد شده، بلکه کار او قضایی است استوار و علمی است محکم و امری است قطعی. خدای که گرفتاران عذاب و خشم به او امید دارند، و بر خورداران نعمت از او بیمناکند. (نهج البلاغه، خطبه ۶۵).

## چکیده

در این مطالعه ابتدا قارچ *T.koningii* Iso2 داخل محیط کشت ملاس چغندر قند به مدت ۱۰ روزکشت داده شده و همراه این محیط با دستگاه فریز درایر خشک شد. بعد از شش ماه نگهداری در دمای ۴°C تعداد کنیدی‌های زنده مانده در این محصول ۱۰/۵۶×۱۰$^{۹}$ Cfu/g یعنی دو برابر حد استاندارد بود. سپس چهار گونه از گونه‌های قارچ تریکودرم شامل *Trichoderma harzianum* 1211, *T.virens* 9011 *T.atroviride* 6022, *T.koningii* Iso2 در شش محیط ملاس چغندر قند، تفاله چغندر قند، ذرت، کنجاله سویا، سبوس گندم و سیب زمینی کشت داده شدند که پس از ۱۰ روز *T.atroviride* روی محیط کشت ذرت بیشترین تعداد کنیدی‌ها را تولید کرد. سوسپانسیون کنیدی‌های این محیط با سه ترکیب کپسوله کننده شامل صمغ کتیرا، مالتودکسترین، پودرآب پنیر به ترتیب با درصدهای ۲/۵، ۵ ۵ مخلوط شده و با دستگاه فریز درایر خشک شدند. پس از سه ماه نگهداری محصول در دمای ۴°C تعداد کنیدی‌های زنده مانده در محصول فرموله شده در هر کدام از مواد نگهدارنده فوق به‌ترتیب ۲/۸ ×۱۰$^{۹}$ Cfu/g، ۲/۵ ×۱۰$^{۹}$ Cfu/g، ۲/۵ ×۱۰$^{۹}$Cfu/g و زیر حد استاندارد بود. همچنین در روش دیگری کنیدی‌ها و کلنی قارچ تشکیل شده روی محیط کشت ذرت به همراه این محیط با رطوبت ۳۵٪ برداشت شده و داخل ظروف کوچک پلاستیکی در دمای ۴°C نگهداری شدند. بعد از شش ماه نگهداری کنیدی‌های فرموله شده تریکودرما همراه ذرت تعداد کنیدی‌های زنده مانده ۵/۱×۱۰$^{۹}$ عدد کنیدی زنده در هر گرم ماده فرموله شده و بیش از حد استاندارد (۵×۱۰$^{۹}$ Cfu/g) بود. برای بررسی تاثیر آنتاگونیستی *T.atroviride* فرموله شده در ۳ ترکیب آلی کتیرا، مالتودکسترین، پودر آب پنیر، این پودرها برای محافظت از گیاه سویا در برابر قارچ *Pythium ultimum* عامل بیماری Damping-off یا مرگ گیاهچه به بذرهای سویا تیمار شدند. نتایج آزمایش بعد از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در تیماری که بذرهای سویا تنها با قارچ بیماریزای (*Pythium ultimum*) آغشته شده شده بودند تعداد گیاهان سبز شده سویا ۴۰٪ و از تیمارهایی که یا با هیچ کدام از قارچ‌های بیماریزا و کنترل کننده و یا با هر دو قارچ بیماریزا و کنترل کننده با هم تیمار شده بودند کمتر بوده و با اطمینان ۹۹٪ اختلاف معنی‌داری داشت. در بین پودرها از نظر تاثیر آنتاگونیستی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.



**کلمات کلیدی:** گونه‌های تریکودرما، تولید انبوه، فرموله کردن، کنترل بیولوژیک


**فهرست مطالب**

**عنوان** **صفحه**

**فصل اول**


۱- مقدمه ..... ۲
۱-۱- کنترل بیماری‌های گیاهی و کنترل بیولوژیک ..... ۲
۱-۲- کنترل بیولوژیک ..... ۳
۱-۳- اهمیت کنترل بیولوژیک در سطح انبوه تولید صنعتی ..... ۳
۱-٤- فرضیات ..... ٤
۱-۵- اهداف ..... ٤


**فصل دوم**


۲- کلیات و سابقه تحقیق ..... ٦
۲-۱- تاریخچه ..... ٦
۲-۲ – گونه‌های قارچ تریکودرما ..... ٦
۲-۳ - تعامل بین تریکودرما و گیاهان و سایر میکروارگانیسم‌های رایزوسفر ..... ٦
۲-۳-۱- خاصیت مایکوپارازیتی تریکودرما ..... ۷
۲-۳-۲- کاهش متابولیت‌های سمی رایزوسفر که توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها یا انسان تولید می‌شود ..... ۸
۲-۳-۳- القا مقاومت در گیاهان ..... ۹
۲-۳-۳-۱- پروتئین‌هایی با خاصیت آنزیمی و یا عملکردهای دیگر ..... ۹
۲-۳-۳-۲- پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌هایAvr یا ژن‌های غیر بیماریزا ..... ۱۰
۲-۳-۳-۳- تولید الیگوساکاریدها و ترکیبات با وزن مولکولی کم توسط قارچ تریکودرما ..... ۱۰
۲-۳-٤- افزایش جذب عناصر معدنی ..... ۱۳
۲-۳-۵- توسعه ریشه و افزایش رشد گیاهان ..... ۱٤
۲-۳-٦- تولید ترکیبات فرار ..... ۱٦
۲-٤- تاریخچه تولید انبوه ..... ۱۷
۲- ۵- تولید انبوه عوامل کنترل بیولوژیک ..... ۲۱
۲-٦- فرموله کردن ..... ۲۲


**فهرست مطالب**

**عنوان** **صفحه**

**فصل سوم**


۳- مواد و روش‌ها ..... ۲۶
۳-۱- کشت و فرموله کردن قارچ *Trichoderma koningii* iso2 داخل ملاس چغندر قند ..... ۲۶
۳-۲- انتخاب و کشت چهارگونه از قارچ تریکودرما ..... ۲۷
۳-۳- تهیه محیط‌های کشت ..... ۲۷
۳ -٤- محاسبه رطوبت محیط‌های کشت ..... ۲۸
۳-۵- تلقیح و کشت قارچ ..... ۲۸
۳-٦- برداشت کنیدی‌ها ..... ۲۹
۳-۷- کشت مجدد گونه منتخب روی محیط کشت انتخاب شده ..... ۳۰
۳-۸- برداشت کنیدی‌ها و فرموله کردن آنها ..... ۳۰
۳-۹- اضافه کردن مواد نگهدارنده به سوسپانسیون کنیدی‌های برداشت شده ..... ۳۰
۳-۱۰- یکنواخت کردن مواد کپسوله کننده در سوسپانسیون ..... ۳۱
۳-۱۱- میکروانکپسوله کردن کنیدی‌ها ..... ۳۱
۳-۱۲- بررسی ماندگاری کنیدی‌های آزاد شده و زنده مانده کنیدی‌ها ..... ۳۲
۳-۱۳- انبارداری محصول فرموله شده ..... ۳۳
۳-۱٤- بررسی تاثیر آنتاگونیستی قارچ فرموله شده ..... ۳۳
۳-۱۵- طرح‌ها و نرم افزارهای آماری استفاده شده برای آنالیز داده‌ها ..... ۳٦


**فصل چهارم**


٤- نتایج ..... ۳۸
٤-۱- نتایج حاصل از کشت و فرموله کردن قاچ *Trichoderma koningii* iso2 در محیط کشت ملاس چغندر قند ..... ۳۸
٤-۲- نتایج کشت چهار گونه تریکودرما روی شش محیط کشت آلی و برداشت آن‌ها ..... ۳۹
٤-۳- نتایج حاصل از فرموله کردن کنیدی‌ها در سه ترکیب آلی کتیرا، مالتودکسترینو پودر آب پنیر ..... ٤۱
٤-٤- نتایج بررسی ماندگاری کنیدی‌های فعال بلافاصله بعد از فرموله کردن و در هر ماه، در سه ترکیب آلی ..... ٤۲


**فهرست مطالب**

**عنوان** **صفحه**

٤-٥- بررسی ماندگاری کنیدی‌های آزاد شده از کنیدی‌های فرموله شده به همراه ذرت .....٤٣
٤-٦- نتایج بررسی تاثیر آنتاگونیستی قارچ*T.atroviride*روی قارچ‌های بیماری‌زای خاکزاد .....٤٥

**فصل پنجم**

٥- بحث.....٥٠
٥-١- پیشنهادات .....٥٩
منابع .....٦٢

## فهرست جداول

**عنوان** **صفحه**

**فصل چهارم**

٤-١- نتایج حاصل از تعداد کنیدی‌های آزاد شده در مراحل مختلف انبارداری قارچ *Trichoderma koningii iso2* همراه ملاس .....٣٨
٤-٢- آنالیز واریانس تعداد کنیدی‌های آزاد شده در مراحل مختلف انبارداری .....٣٩
٤-٣- نتایج حاصل از آنالیز واریانس اسپوردهی قارچ‌ها در محیط کشت‌های انتخاب شده .....٤٠
٤-٤- نتایج حاصل از ماندگاری کنیدی‌های آزاد شده در محیط‌های مختلف و در مراحل مختلف انبارداری .....٤٢
٤-٥- نتایج حاصل از آنالیز واریانس تعداد کنیدی‌های آزاد شده و زنده مانده در ترکیبت مختلف و در مراحل مختلف انبارداری .....٤٢
٤-٦- نتایج حاصل از کنیدی‌های آزاد شده از تریکودرمای فرموله شده همراه ذرت .....٤٤
٤-٧- نتایج حاصل از آنالیز واریانس ماندگاری کنیدی‌های آزاد شده از تریکودرمای فرموله شده همراه ذرت در دوره‌های مختلف انبارداری .....٤٤
٤-٨- نتایج حاصل از آنالیز واریانس بررسی قدرت آنتاگونیستی قارچ تریکودرمای فرموله شده در محیط‌های مختلف روی قارچ *Pythium ultimum* بر اساس درصد سبز شدن بذرگیاه سویا.....٤٦

## فهرست اشکال

**عنوان** **صفحه**

**فصل سوم**


۳-۱- الف- *Trichoderma konnigii* Iso2 ب- *T.virense* 9011 پ- *T.atroviride* 6022 ت- *T.harzianum* 1211 ..... ۲۷

۳-۲- الف- محیط کشت ذرت ب- محیط کشت تفاله چغندر قند پ- ملاس چغندر قند ت- محیط کشت سیب زمینی ..... ۲۹

۳-۳- سوسپانسیون کنیدی های برداشت شده ..... ۳۰

۳-٤- خشک کردن سوسپانسیون کنیدی‌های برداشت شده با دستگاه فریز درایر ..... ۳۱

۳-۵- کنیدی‌های فرموله شده همراه محیط کشت ذرت ..... ۳۲

۳-٦- شکل کنیدی‌های جوانه زده ..... ۳۳

۳-۷- انبارداری محصول تولید شده داخل ظروف پلاستیکی ..... ۳۳

۳-۸- الف) آغشته کردن بذرها با پودر فرموله شده تریکودرما ب) اضافه کردن کشت چهار روزه پیتیوم به سبوس گندم به عنوان کمپوست همراه آن ..... ۳۵

۳-۹- بررسی قدرت آنتاگونیستی قارچ تریکودرما روی پیتیوم با شمارش تعداد بذرهای سبز شده سویا داخل گلدان ..... ۳۵


**فصل چهارم**


٤-۱- کنیدی‌های فرموله شده *Trichoderma koningii* iso2 ..... ۳۸

٤-۲- تاثیر محیط‌های کشت در اسپوردهی چهار گونه قارچ تریکودرما ..... ٤۰

٤-۳: الف- کنیدی‌های فرموله شده با پودر آب پنیر ب- کنیدی‌های بصورت خالص فرموله شده - شاهد پ- کنیدی‌های فرموله شده با مالتودکسترین ت- کنیدی‌های فرموله شده با صمغ کتیر ..... ٤۱

٤-٤- پیچیدگی (ب) و خاصیت مایکوپارازیت (الف) ریسه‌های *Trichoderma atroviride* 6022 روی ریسه‌های *Fusarium oxysporum* ..... ٤۵

٤-۵- نتایج حاصل از بررسی قدرت آنتاگونیستی قارچ تریکودرمای فرموله شده در محیط‌های مختلف روی قارچ پیتیوم بر اساس درصد سبز شدن بذرگیاه سویا ..... ٤٦

فصل اول

# مقدمه

## ۱- مقدمه

### ۱-۱- کنترل بیماری‌ها گیاهی و کنترل بیولوژیک

آفات گیاهی (حشرات مضر، علف‌های هرز پارازیت و پاتوژن‌های بیماریزا) مهمترین عوامل زنده‌ای هستند که باعث خسارت و آسیب به محصولات کشاورزی می‌شوند. برای تامین غذا و تولید مواد فیبری با کیفیت وکمیت آفات گیاهی نیاز به کنترل دارند (اگریوس، ۱۹۸۸؛ بیکر، ۱۹۸۷؛ کوک، ۱۹۹۳).

آنسوی زراعت و عملیات کشاورزی خوب کشاورزان اکثرا متکی به استفاده از سموم شیمیایی هستند (اگریوس، ۱۹۸۸؛ بیکر، ۱۹۸۷).

آلودگی محیط زیست به دلیل استفاده‌های مفرط از سموم شیمیایی باعث تغییر در نگرش عمومی نسبت به سموم کشاورزی شده و امروزه کنترل و فشار روی استفاده از سموم کشاورزی بوده و این در حالی است که فشارهای سیاسی برای حذف سموم خطرناک از فروشگاه‌ها وجود دارد. علاوه بر آن گسترش بیماری‌های گیاهی در اکوسیستم طبیعی مانع استفاده موفقیت آمیز سموم کشاورزی شده است.

در نتیجه برخی از پژوهشگران مدیریت آفات تلاش‌های خود را روی روش‌های جایگزین با سموم شیمیایی برای کنترل بیماری‌ها و حشرات مضر گیاهی متمرکز کرده‌اند (بیکر، ۱۹۸۷؛ کوک، ۱۹۹۳).

نیاز به توسعه روش جایگزین غیر شیمیایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی ضروری است. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی روی استفاده از روش جایگزین برای مدیریت بیماری‌های گیاهی تاکید می‌کند (کوک، ۱۹۹۳).

### ۱-۲- کنترل بیولوژیک

در طول چهار دهه گذشته بسیاری از مخاتبان علاقه مند هستند اثبات کنند که میکرو ارگانیسم‌ها می‌توانند فعالیت پاتوژن‌های خاکزاد را کاهش دهند (بیکر واسنایدر، ۱۹۶۵). واژه کنترل بیولوژیک یا بیوکنترل بیشتر به استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید برای کنترل بیماری‌ها اطلاق می‌شود اگرچه مواردی دیگری را نیز شامل می‌شود.

کنترل بیولوژیک ممانعت یا بازداری از رشد، تاثیر یا تولید مثل یک ارگانیسم با استفاده از ارگانیسم دیگر است (بیکر، ۱۹۸۷؛ کوک، ۱۹۹۳).

کنترل بیولوژیک، دشمنان طبیعی حشرات و عوامل بیماری‌زا را برای حذف یا کنترل جمعیت آن‌ها بکار می‌گیرد. آن می‌تواند شامل گونه‌های غیربومی و یا هر ماده بکار گرفته شده برای کنترل در اکوسیستم بومی باشد. تحریک سیستم دفاعی گیاه با استفاده از میکروارگانیسم‌های غیر بیماریزا و یا ناسازگار نیز می‌تواند جزو کنترل بیولوژیک باشد (کوک، ۱۹۹۳؛ اسکوتن و همکاران، ۲۰۰۴). کنترل بیولوژیک از نظر محیطی امن بوده و در برخی موارد تنها راه در دسترس برای حفاظت گیاه از عوامل بیماری‌زا است (کوک، ۱۹۹۳).

## ۱-۳- اهمیت کنترل بیولوژیک در سطح انبوه تولید صنعتی

استرین‌هایی از لاکتو باسیلوس برای غذاهای مختلف انسانی و حیوانی، قارچ‌های حشره خوار مثل *Beaveria bassiana* (جین و همکاران، ۲۰۰۸؛ لیو و همکاران، ۲۰۰۹) *Metarhizium anisopliae* (جین و همکاران، ۲۰۰۹؛ لیو و همکاران، ۲۰۰؛ هورازک و همکاران، ۲۰۰۴) برای مقابله با حشرات آفت که به گیاهان حمله می‌کنند، استفاده می‌شوند. قارچ‌هایی که گیاهان را از بیماری‌ها حفظ می‌کنند نظیر *Trichoderma* spp (کو و لی، ۱۹۹۹؛ فراول و همکاران، ۱۹۸۵؛ هارمان، ۲۰۰۶؛ جین و همکاران، ۱۹۹۶؛ مافیا و همکاران، ۲۰۰۳؛ جین و کاستیس، ۲۰۱۰؛ هارمان و همکاران، ۲۰۱۱) *Fusarium oxysporum* fo47 و *Clonostachys* (فوکس و همکاران، ۱۹۹۷) برخی گونه‌های *Rhizoctonia* (هاوانگ و همکاران، ۲۰۰۳) باکتری‌هایی که گیاهان را از بیماری‌ها حفظ می‌کنند مثل *Bacillus spp, Pseudomonas spp* (کیسلر و همکاران، ۲۰۰۴) برخی از باکتری‌ها که با همزیستی با بقولات و قارچ‌ها باعث تثبیت نیتروژن می‌شوند، برخی مثل قارچ‌های *Alternaria, Colletotrichum* که برای مبارزه با علف‌های هرز با ایجاد بیماری روی آن‌ها استفاده می‌شود (صدیقی، ۲۰۱۰؛ هارمان و کاستیس، ۲۰۱۱).

در برخی موارد ویروس‌های پلی‌هدرال و باکتری باسیلوس تورنجینسیس نیز فرموله شده و برای کنترل حشرات مضر گیاهی بکار می‌روند (بوهن و فرند، ۱۹۹۰؛ به نقل از جین و کاستیس، ۲۰۱۰).

همچنین در برخی موارد قارچ‌های مایکوریزا و اکتینومایست‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌های مفید در سطح انبوه تولید و فرموله شده و برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی بکار می‌روند.

گونه‌های جنس تریکودرما یکی از مهمترین قارچ‌های آنتاگونیست هستند که برای کنترل بیولوژیک سایر پاتوژن‌های گیاهی بکار می‌روند. این قارچ‌ها علاوه بر مبارزه با بیماری‌های گیاهی در موارد مختلف دیگری نیز کاربرد دارند به عنوان مثال تولید آنزیم سلولاز در صنعت چوب (یانق و لیو، ۲۰۱۰؛ ساسی آپرابا، ۲۰۱۱؛ مندارین و همکاران، ۱۹۷۰؛ جان و همکاران، ۲۰۱۱؛ قجفی و همکاران، ۱۳۸۴) همچنین در صنایع غذایی و سایر صنایع در تولید برخی ترکیبات نیز بکار می‌روند.

## ۱-۴- فرضیات

۱- محیط کشت‌های گندمیان بیشترین کارایی را خواهند داشت.
۲- از بین مواد کپسوله کننده صمغ کتیرا موثرترین خواهد بود.

## ۱-۵- اهداف

۱- انتخاب گونه و محیط کشتی مناسب که بیشترین توده اسپور قارچ را تولید نماید.
۲- مواد فرموله کننده‌ای که بیشترین محافظت را از اسپورهای قارچ کرده و هنگام مصرف به بهترین نحو آزاد کنند.

فصل دوم

# کلیات و سابقه تحقیق

## ۲- کلیات و سابقه تحقیق

### ۲-۱- تاریخچه

تاریخچه کنترل بیولوژیک پاتوژن‌های گیاهی مربوط به سال‌های اخیر نیست. در سال ۱۹۲۳ ساندفورد کنترل بیولوژیک جرب سیب‌زمینی را شروع کرد. اما تحقیق روی این موضوع بعد از برگزاری اولین کنگره بین المللی اکولوژی پاتوژن‌های گیاهی که در سال ۱۹۶۳ در برکلی برگزار شد انگیزه دانشمندان را بر انگیخت. علارغم چندین دهه تحقیق در کنترل بیولوژیک آفت‌کش‌های بیولوژیک تنها ۱٪ آفت‌کش‌های فروشگاه‌های دنیا را تشکیل می‌دهند. عوامل کنترل بیولوژیک محدود به فروشگاه‌های بومی بوده و علارغم پسند عمومی بین مردم و کارشناسان عوامل کنترل بیولوژیک با طیف کمتری از فعالیت شناخته می‌شوند که از نظر محیطی مطلوب ولی از نظر اقتصادی مطلوب نمی‌باشد. گونه‌های جنس تریکودرما از سال ۱۹۳۴ که اولین بار توسط وینند لینق به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک شناخته شدند آغاز شد (به نقل از جین و کاستیس، ۲۰۱۰ (وینند لینق، ۱۹۳۴)).

### ۲-۲- گونه‌های قارچ تریکودرما

تریکودرما جنسی از آنامورف قارچ‌هایی است که برای اولین بار در سال ۱۷۹۴ توسط پرسون از مواد پوسیده گیاهی جداسازی و توصیف شد. تریکودرما جزو قارچ‌هایی است که به روش غیر جنسی تکثیر می‌شود و اغلب از دیگر قارچ‌های جدا شده از خاک فراوانتر است. تقریبا تمام خاک‌های معتدل حاره‌ای $۱۰^{۳}$-$۱۰^{۱}$ عدد از پروپاگول‌های قارچ تریکودرما در هر گرم خاک خود دارند. این قارچ مواد علفی و چوبی را نیز کلنیزه می‌کند که اغلب فرم جنسی آن *Hypocerea* یافت می‌شود. به هر حال بسیاری از استرین‌های آن از جمله آن‌هایی که در کنترل بیولوژیک استفاده می‌شوند فرم جنسی برای آن‌ها یافت نشده است. در طبیعت فرم جنسی اغلب پایدارتر از فرم کلونال است (هارمان و همکاران، ۱۹۹۸).

### ۲-۳- تعامل بین تریکودرما و گیاهان و سایر میکروارگانیسم‌های رایزوسفر

گونه‌های تریکودرما قارچ‌های آزادزی هستند که در اطراف ریشه، خاک و قسمت‌های هوایی گیاهی فعالیت می‌کنند. و به تولید مواد آنتی‌بیوتیک و پارازیته کردن سایر قارچ‌ها معروف هستند این

قارچ‌ها بر سر ترشحات کلیدی از بذرها که محرک جوانه زدن پروپاگول‌های عوامل بیماریزا هستند و بر سر فضا و مواد غذایی با دیگر میکروارگانیسم‌ها رقابت می‌کنند (هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

مطالعات بوسیله شرکت‌های INC(ABM),Vanvert, Ohio و دانشگاه کورونل نشان داد که استرین‌های تریکودرما موقعیت میکروبی ریشه را تغییر می‌دهند، جذب مواد غذایی توسط ریشه را افزایش می‌دهند، عناصر خاک را تثبیت می‌کنند، توسعه ریشه را بیشتر کرده و ریشه‌های فرعی یا موئین گیاه در خاک را افزایش می‌دهند (هارمان، ۲۰۰۶).

همچنین مطالعات نشان داد تیمار گیاهان با گونه‌های تریکودرما در اطراف ریشه سطح پروکسیدازها و کیتینازها را بالا برده، لایه کالوزی در دیواره سلولی گیاهی را غنی کرده و پروتئین‌های پاتوژن کننده را علیه پاتوژن‌های گیاهی تولید می‌کنند همچنین رشد ریشه و وزن خشک ناحیه ریشه و قسمت‌های هوایی گیاه را افزایش می‌دهند (هاول، ۲۰۰۳).

استفاده از گونه‌های تریکودرما به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بیش از ۷۰ سال است که مورد بررسی قرار می‌گیرد ولی تنها اخیرا برخی از گونه بصورت تجاری تولید می‌شوند. گونه‌های تریکودرما و بطور عمده *T.viride T, harzianum, T.virens,* توانایی پارازیته کردن و کنترل برخی از جنس‌های قارچ‌های بیماریزای گیاهی شامل: *Colletotrichum , Armillaria, Botrytis, Chondrostereum, Dematophora, Diaporthe, Endothia, Fulvia, Fusarium, Fusicladium, Helminthosporium, Macrophomina, Monilia, Nectria, Phoma, Phytophthora, Plasmopara, Pseudoperonospora Pythium, Rhizoctonia, Rhizopus, Sclerotinia, Sclerotium, Venturia, Verticillium* را دارند (لمسدن، ۱۹۹۳؛ مونت، ۲۰۰۱).

### ۲-۳-۱- خاصیت مایکوپارازیتی تریکودرما

گونه‌های جنس تریکودرما پارازیت برخی از قارچ‌های دیگر هستند. پدیده پارازیته کردن پیچیده است ابتدا گونه‌های قارچ تریکودرما دیگر قارچ‌ها را تشخیص داده و حول ریسه‌های آنها رشد می‌کنند (کت و همکاران، ۱۹۸۱؛ به نقل از هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

استرین‌های مختلف آن عملکردهای متفاوتی دارند اما بطور آشکار همیشه قارچ سطح پایینی از اگزوکیتینازهای خارج سلولی را تولید می‌کند پخش آنزیم فوق الیگومرهای دیواره سلولی قارچ هدف

را کاتالیز می‌کند که این موجب تولید اندوکیتیناز شده و به این طریق قبل از اینکه تماس بطور واقعی صورت گیرد به سلول‌های هدف آسیب وارد می‌کند (ویتربو و همکاران، ۲۰۰۲؛ زلینگر، ۱۹۸۷).

زمانی که قارچ‌ها تماس پیدا می‌کنند ریسه‌های تریکودرما دور ریسه‌های قارچ هدف می‌پیچند و ساختار اپروسوریوم مانند تولید می‌کنند. اتصال با باند شدن کربوهیدرات از دیواره سلولی قارچ تریکودرما و لکتین از دیواره سلولی سلول قارچ هدف صورت می‌گیرد (رهنما و همکاران، ۱۳۸۶؛ اینبار و همکاران، ۱۹۹۶).

موقع تماس تریکودرما چندین آنزیم تخریب کننده سلولی ترشح می‌کند (کت و همکاران، ۱۹۹۸) و احتمالا آنتی بیوتیک‌های هضم کننده (اسکریمبوک و همکاران، ۱۹۹۴).

تعامل عوامل فوق باعث پارازیته شدن سلول‌های قارچ هدف شده و باعث حل شدن و سوراخ شدن دیواره سلولی قارچ هدف می‌شود. حدود ۳۰-۲۰ ژن و پروتئین و متابولیت در این عملکرد قارچ با دیگر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

### ۲-۳-۲- کاهش متابولیت‌های سمی رایزوسفر که توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها یا انسان تولید می‌شود

گونه‌های تریکودرما به مواد سمی متنوع مثل ترکیبات زنوبیوتیک، آنتی‌بیوتیک‌های سایر میکروارگانیسم‌ها، مواد میکروب کش گیاهی و ترکیبات سمی قارچ‌کش و ... مقاوم هستند (هارمان و همکاران، ۱۹۹۶).

تحقیقات مولکولی در مورد فرایندی که گونه‌های تریکودرما را قادر به کلنیزه کردن محیط‌های با غلظت بالای مواد سمی را می‌سازد این است که برخی از استرین‌های تریکودرما انتقال دهنده‌های ABC (یا نوارهای باند شونده یا متصل شونده به ATP) تولید می‌کنند این پرمیازهای وابسته به ATP در انتقال مواد از غشای بیولوژیکی به بیرون نقش حد واسط را بازی می‌کنند بیان ژن‌های کد کننده انتقال دهنده‌های ABC از تجمع مواد سمی در داخل سلول‌های تریکودرما ممانعت می‌کند (لانزوئیس و همکاران، ۲۰۰۲، به نقل از هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

ایجاد جهش در *Trichoderma atroviride* نشان داد که انتقال دهنده‌های ABC در خاصیت مایکوپارازیتی قارچ فوق روی قارچ‌های *Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Botrytis cinera* نیز نقش موثری دارد (لانزوئیس و همکاران، ۲۰۰۲؛ روئوکو و همکاران، ۲۰۰۲).

### ۲-۳-۳- القا مقاومت در گیاهان

اولین سند واضح برای تولید مقاومت تریکودرما در گیاهان به سال ۱۹۹۷ توسط بیگیریمانا و همکارانش بر می‌گردد آن‌ها مشاهده کردند که تیمار ریشه لوبیا با قارچ *T.harzianum* T39 برگ‌های گیاه لوبیا را نسبت به قارچ‌های *Botrytis cinerea* و *Colletotrichum lindemathianum* مقاوم می‌کرد هر چند که قارچ فوق فقط در ریشه حضور داشت (بیگیریمانا و همکاران، ۱۹۹۷).

سه ردیف ترکیبات که توسط استرین‌های تریکودرما تولید شده و در گیاهان مختلف مقاومت ایجاد می‌کنند شناخته شده است: ۱- پروتئین‌هایی با خاصیت آنزیمی و یا عملکردهای دیگر ۲- هومولوگ‌هایی از پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های Avr یا ژن‌های غیر بیماریزا ۳- الیگوساکاریدها و ترکیبات با وزن مولکولی کم که از دیواره سلول‌های قارچ تریکودرما یا گیاهان تولید می‌شوند (هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

حتی قبل از مدارک قانع کننده از القا مقاومت در گیاهان بوسیله استرین‌های تریکودرما مشخص بود که a22 KDa xylanse که بوسیله چندین گونه تریکودرما ترشح و تولید اتیلن و واکنش‌های دفاعی گیاه را منجر می‌شد (آندرسون و همکاران، ۱۹۹۳؛ فوکس و همکاران، ۱۹۸۹). جالب توجه است که با بریدن دمبرگ‌های گیاه مشخص شد که این پروتئین‌های کوچک از طریق سیستم آوندی توتون جابجا می‌شدند تولید آن مقاومت موضعی و واکنش نکروزیس را منجر می‌شد (بائیلی و همکاران، ۱۹۹۱). بنابراین القا مقاومت سیستمیک بویسله این پروتئین‌ها می‌تواند نیازمند جابجایی توسط گیاه باشد.

اخیرا چند سری از پروتئین‌ها و پپتیدها که در تحریک تولید ترپنوئید فیتوآلکسین و فعالیت پروکسیداز در پنبه نقش دارند و توسط گونه *T.virens* تولید می‌شوند معرفی شده است. شش پپتید یا پروتئین جدا که اندازه بین 6.2-42 KDa کیلو دالتون داشته و فعالیت القا کنندگی مقاومت را دارند (هانسون و هاول، ۲۰۰۴).

**۲-۳-۳-۱- پروتئین‌هایی با خاصیت آنزیمی و یا عملکردهای دیگر**

چندین مطالعه نشان داد کلنیزه شدن ریشه‌های گیاهان توسط تریکودرما سطوح ترکیبات آنزیمی مرتبط با سیستم دفاعی گیاه نظیر پروکسیدازها، کیتینازها، بتا ۳-۱ گلوکانازها، لیپواکسیژنازها و هیدروپروکسید لیازها را بالا می‌برد (روئوکو و همکاران، ۲۰۰۲؛ یدیدیا و همکاران، ۱۹۹۹؛ یدیدیا و همکاران، ۲۰۰۳؛ هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

تیمار ریشه گیاه خیار با *T.asperellum* T203 تولید فنیل آلانین آمونیالیاز در ریشه و ساقه افزایش یافت همچنین در برگ‌های آن فنولیک گلوکوزید افزایش یافته و مقاومت به *Pseudomonas syringae pv lachrymans* را منجر می‌شد این تنها موقعی بود که قارچ تریکودرما تیمار و سپس باکتری تلقیح می‌شد و در هیچکدام از کاربرد دو میکروارگانیسم‌های فوق به تنهایی پدیده فوق صورت نمی‌گرفت (یدیدیا و همکاران، ۲۰۰۳).

**۲-۳-۳-۲- پروتئین‌های کد شده توسط هومولوگ‌هایی از ژن‌های Avr یا ژن‌های غیر بیماریزا**

ژن‌هایAvr یا غیر بیماریزا در قارچ‌ها و باکتری‌های متنوع پاتوژن گیاهی معرفی شده‌اند. آنها معمولا بصورت القا کننده‌های اختصاصی نژاد یا پتووار عمل می‌کنند. این ژن‌ها می‌توانند واکنش فوق حساسیت و دیگر مکانیسم‌های دفاعی در کولتیوارهای گیاهی که دارای ژن‌های قرینه هستند را القا کنند.

آنالیز پروتئومی (آنالیز ترکیبی از پروتئین‌های تولید شده) *T.harzianum* T22 پروتئین‌هایی را نشان داد که با AV4,Av9 در *Cladosporium.fulvum* قرینه بودند (بیکر، ۱۹۹۷؛ دویت و همکاران، ۲۰۰۲). در *T.atroviride* p1 هم پروتئین‌های مشابهی تولید کرد (وو و همکاران، ۲۰۰۳؛ کوبیک، ۲۰۰۲، به نقل از هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

**۲-۳-۳-۳- تولید الیگوساکاریدها و ترکیبات با وزن مولکولی کم توسط قارچ تریکودرما**

موتاژن‌هایی (جهش یافته‌هایی) از گونه‌های قارچ تریکودرما با سیستم‌های گزارش شده نظیر پروتئین سبز فلوئوروسنت یا با فعالیت‌های آنزیمی (گلوکوز اکسیداز) تحت کنترل پروموتورهای مرتبط با بیوکنترل تولید شده است. این کار امکان جداسازی و توصیف مولکول‌های زنده و فعال آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی مترشحه از تریکودرما روی دیواره سلولی قارچ پاتوژن و