

بررسی امکان کنترل بیولوژیکی قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (عامل بیماری مرگ نارون) توسط دو گونه قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* و *T. virens* در شرایط آزمایشگاهی

میرمعصوم عراقی^۱، کامران رهنما^۲، دوستمراد ظفری^۳ و میثم تقی نسب^۴

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
^۲دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آستادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینای همدان،
^۳مربی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۶؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۷

چکیده

اثر آنتاگونیستی ۴ جدایه Th1, Th2, Th3 و Th4 قارچ *Trichoderma harzianum* و ۲ جدایه Tv1 و Tv2 قارچ *T. virens* جدا شده از خاک بر روی جدایه ONU5 قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (عامل بیماری مرگ هلندی درختان نارون) در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور مکانیسم‌های آنتاگونیستی مختلف نظیر مایکوپارازیتسم، قدرت رقابت تغذیه‌ای، قدرت کلونیزاسیون، تأثیر متابولیت‌های ترشحی خارج سلولی فرار و غیرفرار جدایه‌های مزبور روی جدایه ONU5 قارچ *O. novo-ulmi* مورد آزمایش قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپی نشان داد که تمامی جدایه‌های فوق از طریق رفتارهای مایکوپارازیتسم باعث اختلال رشد و بد شکلی ریشه شده‌اند. نتایج حاصل نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما از نظر مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی روی قارچ عامل بیماری بسیار متفاوت عمل می‌کنند. از میان ۶ جدایه فوق الذکر، جدایه Tv2 با بیشترین میزان سرعت رشد در کشت دوطرفه با قارچ عامل بیماری، از نظر رقابت تغذیه‌ای بهتر از سایرین عمل کرد، به طوری که پس از ۴ روز کل سطح محیط کشت و پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری را پوشانید. جدایه Th3 نیز از نظر قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی روی کشت ۳ روزه قارچ عامل بیماری بهتر از بقیه جدایه‌ها عمل نمود. در آزمایش تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه Tv1 به ترتیب با ۹۲/۷۴ و ۵۸/۷۵ درصد بیشترین تأثیر بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری را داشته است. امکان بکارگیری این جدایه‌ها برای کنترل بیولوژیکی علیه قارچ عامل بیماری مرگ نارون قابل بحث می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیماری مرگ نارون، کنترل بیولوژیکی، *Ophiostoma novo-ulmi*، *Trichoderma harzianum* و *T. virens*.

مقدمه

درخت نارون با دارا بودن قسامتی بلند دارای زیبایی قابل ملاحظه‌ای بوده و به دلیل خصوصیات مفیدش از دیرباز در زمینه‌های مختلف اعم از صنعتی و زیتی مورد استفاده قرار گرفته است (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۲). بیماری مرگ هلندی نارون^۱ یکی از مهمترین، زیانبارترین و مخربترین بیماری‌های آوندی این درختان در نیمکره شمالی محسوب می‌شود (استییز و کامپانا، ۱۹۸۱). این بیماری تاکنون با از بین بردن میلیون‌ها درخت نارون در اروپا و آمریکای شمالی موجب بلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی شده است (سینکلیر و کامپانا، ۱۹۷۸). امکان انتشار عامل بیماری به وسیله سوسک‌های پوستخوار خانواده *Scolytidae* این بیماری را از خیلی از بیماری‌های مشابه متمایز می‌کند. در یک قرن گذشته، انتشار سریع عامل بیماری به مناطق دوردست از یک سو و حساسیت ارقام مختلف نارون از سوی دیگر، به ترتیب در دهه ۱۹۱۰ و ۱۹۴۰ باعث بروز دو اپیدمی با درجات شدت مختلف شده است (بریزیر، ۱۹۹۰). اپیدمی اول مربوط به گونه غیرمهاجم *Ophiostoma ulmi* با شدت بیماریزایی کمتر و اپیدمی بعدی مربوط به گونه مهاجم با نام *O. novo-ulmi* با شدت بیماریزایی بیشتر می‌باشد (بریزیر، ۱۹۹۱). بریزیر جدایه‌های با منشأ اروپایی را به نام نژاد اروپا-آسیایی (اوراسیایی) و جدایه‌های با منشأ آمریکای شمالی را به نام نژادهای آمریکای شمالی نامید (استییز و کامپانا، ۱۹۸۱؛ بریزیر و کیرک، ۲۰۰۱). اخیراً گونه سومی به نام *O. himal-ulmi* در ارتباط با بیماری مرگ درختان نارون در هیمالیا یافت شده است که یک بیماری اندمیک در این ناحیه محسوب می‌شود (بریزیر و مهرتورا، ۱۹۹۵). اعتقاد بر اینست که این بیماری از چین منشأ گرفته و سپس طی جنگ جهانی اول به اروپا و آمریکای شمالی راه پیدا کرده است (بریزیر، ۱۹۹۰).

تاریخچه پیدایش بیماری در ایران به درستی معلوم نیست، زیرا تا قبل از سال ۱۳۳۸ (۱۹۶۰) نامی از این بیماری در نشریات ایران برده نشده است ولی بیماری برای اولین بار در سال ۱۳۳۸ در جنگل‌های گلستان و در ارتفاعات پایین کرنفکتر و کندسکوی بر روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد و بعد در بقیه نواحی جنگلی و حتی فضای سبز شهری گسترش یافت (رهجو و همکاران، ۲۰۰۰). گونه جدید عامل بیماری نه تنها باعث زوال شدید درختان نارون شده است، بلکه به گونه جدیدی از درختان جنگلی در شمال کشور به نام آزاد با نام علمی *Zelkova carpinifolia* نیز حمله کرده است و این اولین گزارش رسمی از وجود بیماری مرگ درختان آزاد در استان گلستان می‌باشد (رهنما و طاهری، ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت بسیار زیاد بیماری تاکنون روش‌های متعددی برای کنترل بیماری بکار گرفته شده است که می‌توان به استفاده از حشره‌کش‌ها جهت کاهش ناقل بیماری (کات برت و همکاران، ۱۹۷۳)، تیمار خاک برای جلوگیری از انتقال عامل بیماری از طریق پیوند ریشه‌ای (نیلی و هیملیک، ۱۹۶۵). استفاده از قارچکش‌های سیستمیک (استییز، ۱۹۷۵؛ لانیر، ۱۹۸۷)، ریشه‌کشی درختان آلوده یا هرس اندام‌ها و شاخ و برگ آلوده درختان (مارسدن، ۱۹۵۲)، معرفی و استفاده از ارقام مقاوم (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۲) و روش‌های بیولوژیکی (برنیر و همکاران، ۱۹۹۶؛ سولا و جیل، ۲۰۰۳) اشاره کرد. از یک طرف، افزایش بی‌رویه مصرف آفتکش‌ها و مشکلات زیست محیطی تیمارهای شیمیایی بر علیه قارچ و ناقلین حشره‌ای و از سوی دیگر هزینه‌های بسیار بالای تهیه ارقام مقاوم درختان نارون در مقایسه با نهال‌های مشابه و یا محصولات زراعی، زمان بر بودن روش‌های اصلاح مقاومت و از همه مهمتر خطر شکستن مقاومت در برابر نژادهای مختلف عامل بیماری، سبب گردیده تا محققین اهمیت کنترل بیولوژیکی را بیشتر مدنظر قرار دهند (رهنما، ۱۳۷۵؛ بیکر و کوک، ۱۹۷۴). گونه‌های بسیار زیادی از باکتری‌ها، اکتینومیسیت‌ها و قارچ‌ها

مواد و روش‌ها

الف) قارچ‌های بیمارگر و آنتاگونیست: برای انجام این طرح از یک جدایه قارچ عامل بیماری *Ophiostoma novo-ulmi ssp. novo-ulmi* که قبلاً از روی اوجا جداسازی شده بود و بیشترین سرعت رشد شعاعی را در بین جدایه‌ها داشت (رهنما، ۲۰۰۳) و ۶ جدایه مربوط به دو گونه قارچ *T. harzianum* (۴ جدایه) و *T. virens* (۲ جدایه) جداسازی شده از خاک (که از کلکسیون قارچ بخش گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینای همدان دریافت گردید) که با استفاده از منابع معتبر (ریفایی، ۱۹۶۵؛ گمس و بیست، ۱۹۹۸) شناسایی و تأیید شدند مورد استفاده قرار گرفت (ظفری و همکاران، ۲۰۰۲). برای خالص‌سازی جدایه‌ها نیز از روش تک اسپور کردن بر روی محیط کشت آب-آگار (WA) استفاده شد. پس از اطمینان از خلوص جدایه‌ها، بر روی محیط کشت PDA منتقل و برای انجام آزمایش‌های بیولوژیکی در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند.

ب) بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های تریکودرما روی هیف‌های قارچ بیمارگر: برای انجام این آزمایش ابتدا داخل هر ظرف پتری نه سانتی‌متری سترون، یک لام سترون قرار داده و سپس ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر محیط PDA ریخته به طوری که لایه‌ای نازک از محیط کشت روی لام را بپوشاند. بعد از منعقد شدن محیط، یک دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه جدایه *ONU5* قارچ بیمارگر و یک دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه هر کدام از جدایه‌های قارچ تریکودرما در دو طرف لام کشت داده شد. در تیمارهای شاهد نیز از کشت جدایه بیمارگر با یک دیسک ۵ میلی‌متری از محیط کشت فاقد قارچ آنتاگونیست استفاده شد. برای هر جدایه تریکودرما ۴ تکرار در نظر گرفته شد. ظروف پتری پس از کشت به انکوباتور منتقل و در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت که هیف‌های قارچی رشد کردند، اقدام به بررسی نحوه تأثیر جدایه‌های تریکودرما در رشد و مورفولوژی هیف‌های قارچ بیمارگر زیر میکروسکوپ شد.

خاصیت آنتاگونیستی نسبت به عامل بیماری مرگ نارون تحت شرایط آزمایشگاه یا در شرایط گیاه نشان داده‌اند که می‌توان به‌موارد زیر اشاره کرد: استرین‌هایی از *Streptomyces albobovineus* و *S. griseus* (ابراین و همکاران، ۱۹۸۴)، استرین‌هایی از باکتری *Pseudomonas syringae* (مایرز و استروبل، ۱۹۸۳)، *P. fluorescens* (موردک و همکاران، ۱۹۸۴)، *P. maltophilia* (گرگوری و همکاران، ۱۹۸۶)، تأثیر باکتری *Bucillus subtilis* (شریبر و همکاران، ۱۹۸۸)، تحریک نهال با جدایه غیر بیماری‌زا قارچ *erticillium dahliae* (الگرسما و همکاران، ۱۹۹۳؛ سولا و جیل، ۲۰۰۳؛ وتن، ۲۰۰۳)، *Phaeotheca dimorphospora* (برنیسر و همکاران، ۱۹۹۶)، *T. harzianum* و *Trichoderma viride* (ریکارد، ۱۹۸۱ و ۱۹۸۳).

همچنین ترکیبی از قارچ *T. viride* و *Scytalidium sp.* که دارای یک ترکیب ضد قارچی به نام *Scytalidin* است، بطور مشابهی به کار گرفته شده است (شفر و استروبل، ۱۹۸۸). به‌طور کلی گونه‌های تریکودرما جزء قارچ‌هایی هستند که از آنها به‌عنوان عوامل بیوکنترل تجاری استفاده می‌شود. تنوع در مکانیسم‌های موجود در گونه‌های تریکودرما برای توقف بیمارگرها، این قارچ را به‌عنوان عامل بیوکنترلی مطلوب مطرح می‌سازد (پاپاویزاس، ۱۹۸۵؛ ساموئل، ۱۹۹۶). در ایران تاکنون مطالعات انجام شده توسط گونه‌های تریکودرما فقط روی قارچ‌های بیماری‌زای مهم در کشاورزی مانند انواع فوزاریوم‌ها بوده است (پیغامی و نیشابوری، ۱۹۹۱؛ پیغامی، ۱۹۹۲؛ رهنما و همکاران، ۲۰۰۵). لذا نظر به اهمیت بیماری‌های جنگلی و به ویژه بیماری مرگ هلندی نارون، هدف از انجام این مطالعه بررسی امکان کنترل بیولوژیکی قارچ *O. novo-ulmi* (عامل جدید بیماری مرگ نارون) توسط دو گونه قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. virens* در شرایط آزمایشگاهی و بررسی رفتارهای مختلف آنتاگونیستی جدایه‌های این دو گونه بر روی عامل بیماری می‌باشد.



شکل ۱- کنیدی و کنیدیوفورهای گونه *Trichoderma virens* (X۱۰۰۰).

تهیه لام میکروسکوپی از ناحیه کلونیزاسیون و شمارش آنها با بزرگنمایی X۱۰۰۰ در زیر میکروسکوپ گردید. این آزمایش با ۴ تکرار و ۱۰ مشاهده برای هر ظرف پتری انجام شد. داده های بدست آمده نهایتاً مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

هـ) بررسی اثر ترکیبات فرار (**Volatile metabolites**) جدایه های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: این آزمایش در ۴ حالت و به شرح زیر انجام گرفت:

- ۱- کشت همزمان *O. novo-ulmi* با تریکودرما
 - ۲- کشت تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از *O. novo-ulmi*
 - ۳- کشت تریکودرما ۴۸ ساعت قبل از *O. novo-ulmi*
 - ۴- کشت تریکودرما ۷۲ ساعت قبل از *O. novo-ulmi*
- در این آزمایش از روش پتری های روی هم استفاده گردید، به طوری که ظروف پتری حاوی قارچ بیمارگر در بالا و ظروف پتری حاوی جدایه های آنتاگونیست در پایین قرار گرفتند. دور ظروف پتری روی هم قرار گرفته با پارافیلیم بخوبی مسدود شد تا ارتباط دو پتری با محیط خارج کامل قطع شده و از خروج ترکیبات فرار به خارج جلوگیری گردد. در تیمارهای شاهد نیز به جای استفاده از جدایه های تریکودرما (در پتری پایینی) از دیسک حاوی محیط کشت PDA استفاده شد. پتری ها در انکوباتور با دمای 24 ± 1 نگهداری شده و به فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اقدام به اندازه گیری قطر پرگنه در تیمارهای

ج) بررسی رقابت تغذیه ای جدایه های تریکودرما در کشت متقابل با قارچ بیمارگر: به منظور مقایسه قدرت رقابت تغذیه ای جدایه های مختلف تریکودرما با قارچ بیمارگر، از کشت دو طرفه (Dual Culture) استفاده شد. بدین ترتیب که یک دیسک ۵ میلی متری از حاشیه فعال پرگنه جدایه ONU5 قارچ بیمارگر و یک دیسک ۵ میلی متری از حاشیه فعال پرگنه هر کدام از جدایه های قارچ تریکودرما در دو طرف ظرف پتری حاوی PDA کشت داده شدند. برای هر جدایه ۴ تکرار در نظر گرفته شد. در تیمارهای شاهد نیز از کشت جدایه بیمارگر با یک دیسک ۵ میلی متری از محیط کشت فاقد قارچ آنتاگونیست استفاده شد. ظروف پتری پس از کشت به انکوباتور منتقل و در دمای 24 ± 1 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میزان سرعت رشد روزانه جدایه قارچ بیمارگر در کشت متقابل با جدایه های تریکودرما در مقایسه با کشت شاهد محاسبه شد.

د) بررسی قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه های تریکودرما روی پرگنه قارچ بیمارگر: برای این منظور یک دیسک ۵ میلی متری از هر جدایه تریکودرما به وسط کشت ۳ روزه قارچ بیمارگر منتقل و در دمای 24 ± 1 در انکوباتور نگهداری شدند. با انجام بازدیدهای روزانه قدرت کلونیزاسیون جدایه های تریکودرما بدست آمد. همچنین به منظور مقایسه میزان اسپورزایی جدایه های تریکودرما بر روی کشت ۳ روزه جدایه بیمارگر، اقدام به

قطر رشد پرگنه قارچ بیمارگر شد و درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از رابطه $X = \frac{A-B}{A} \times 100$ بدست آمد.

تمام آزمایش‌ها بجز آزمایش ترکیبات فرار از نوع فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. آزمایش ترکیبات فرار نیز از نوع اسپیلت پلات در زمان در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SAS استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با آزمون ال. اس. دی و در دو سطح احتمال $\alpha = 0.05$ و $\alpha = 0.01$ انجام گرفت.

نتایج

الف) بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های تریکودرما روی هیف‌های قارچ بیمارگر: بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که جدایه‌های مختلف تریکودرما با ایجاد تغییر شکل، تورم و خمیدگی انتهای هیف و واکنوله کردن باعث کاهش رشد قارچ عامل بیمارگر شده، اما اثری از نفوذ مستقیم هیف مشاهده نشد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

مختلف و مقایسه آنها با تیمار شاهد گردید. نهایتاً درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه $X = \frac{A-B}{A} \times 100$ محاسبه گردید. در این رابطه X - درصد بازدارندگی، A - قطر رشد پرگنه در پتری شاهد و B - قطر رشد پرگنه در هر یک از تیمارها می‌باشد. این آزمایش در قالب طرح اسپیلت پلات در زمان با چهار تکرار انجام گردید.

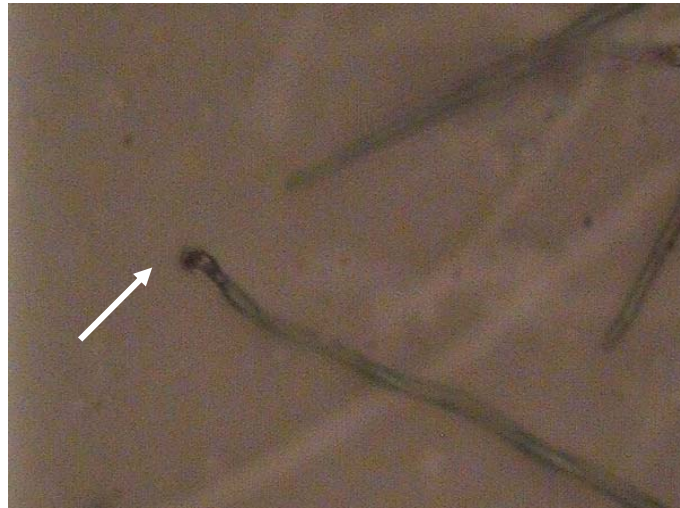
و) بررسی اثر ترکیبات غیرفرار (Culture filtrate): جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: پس از کشت جدایه‌های تریکودرما به صورت چهار دیسک ۵ میلی‌متری در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط PDB فاقد آنتی‌بیوتیک و نگهداری بر روی شیکر با ۶۰ تکان در دقیقه به مدت ۱۰ روز و عصاره‌گیری با استفاده از کاغذ صافی میکروبیولوژیکی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون، محیط کشت‌های PDA حاوی رقت‌های ۵، ۱۵، ۲۵ و ۵۰ درصد از عصاره فیلتر شده تهیه و سپس اقدام به کشت دیسک‌های ۵ میلی‌متری از قارچ بیمارگر گردید. پتری‌ها در دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اقدام به اندازه‌گیری



شکل ۲- بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی هیف‌های *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۷۲ ساعت (X۱۰۰).



شکل ۳- بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی هیف‌های *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۷۲ ساعت (فلش‌ها پیچش، دفرمه شدن، تورم و خمیدگی‌های هیفی قارچ عامل بیماری را نشان می‌دهند).



شکل ۴- بررسی میکروسکوپی تأثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی ریشه‌های *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۷۲ ساعت (فلش خمیدگی انتهای ریشه را نشان می‌دهد).

سرعت رشد و رقابت تغذیه‌ای را داشتند (شکل ۵). از میان ۶ جدایه بکار رفته، جدایه Tv2 بیشترین سرعت پیشروی و رشد را از خود نشان داد به طوری که پس از ۵ روز به طور کامل سطح پرگنه قارچ بیمارگر را پوشاند (شکل ۶). میزان سرعت رشد روزانه جدایه قارچ بیمارگر در کشت متقابل با جدایه‌های تریکودرما در مقایسه با کشت شاهد نیز محاسبه گردید (جدول ۱).

ب) بررسی رقابت تغذیه‌ای جدایه‌های تریکودرما در کشت متقابل با قارچ بیمارگر: در این آزمایش مشخص شد که تمام جدایه‌های تریکودرما بعد از رشد و برخورد با پرگنه‌های قارچ بیماری‌زا مانع رشد و توسعه آن شده سپس شروع به پیشروی و کلونیزاسیون و اسپورزایی روی هیف‌های عامل بیماری‌زا کردند ولی در این میان دو جدایه Tv2 و Th3 بیشترین و جدایه Th4 کمترین



شکل ۵- مقایسه قدرت رقابت تغذیه‌ای دوجدایه *T. virens* 2 (سمت راست، پایین) و Th4 (سمت چپ، پایین) با جدایه ONU5 عامل بیمارگر در کشت متقابل، با کشت شاهد (بالا) پس از ۵ روز بر روی محیط کشت PDA.



شکل ۶- قدرت رقابت تغذیه‌ای و کلونیزاسیون جدایه *T. virens* 2 (سمت چپ) بر روی قارچ عامل بیمارگر (سمت راست) در کشت متقابل پس از ۵ روز بر روی محیط کشت PDA.

جدول ۱ - مقایسه میانگین سرعت رشد قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* (NOU5) در کشت متقابل با جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما *T. harzianum*(Th) و *T. virens*(Tv)

جدایه	قطر رشد کلونی پس از ۶ روز (میلی متر)*
شاهد (NOU5)	۳۹/۲۵ ^{**a}
Th4/ NOU5	۲۴/۲۵ ^b
Th2/ NOU5	۲۱/۷۰ ^{bc}
Th1/ NOU5	۲۰/۵۰ ^{bc}
Th3/ NOU5	۱۹/۵۰ ^c
Tv1/ NOU5	۱۹/۵۰ ^c
Tv2/ NOU5	۱۹/۲۵ ^c
LSD($\alpha=0.05$)	۳/۹۸

* داده‌ها مربوط به میانگین ۴ تکرار می‌باشد.

** حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

ج) بررسی قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما روی پرگنه قارچ بیمارگر: از بین جدایه‌های مورد آزمایش جدایه Th3 و Th4 نسبت به بقیه جدایه‌ها از قدرت بیشتری برخوردار بود و پس از ۵ روز تمام پرگنه عامل بیماری را پوشانده و به شدت اسپورزایی کرده بود (شکل ۷). جدایه Tv2، Tv1 و Th4 پس از ۷

روز تمام پرگنه عامل بیماری را پوشانده و بقیه جدایه‌ها حتی پس از ۱۰ روز نیز ضعیف عمل کردند. مقایسه میزان اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما بر روی کشت ۳ روزه جدایه بیمارگر نیز نشان داد که جدایه Th3 بیشترین میزان اسپورزایی را در میان جدایه‌ها دارد (جدول ۲).



شکل ۷ - نمایش قدرت کلونیزاسیون جدایه Th3 روی پرگنه قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* پس از ۵ روز.

جدول ۲- مقایسه میزان اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما بر روی کشت ۳ روزه قارچ *Ophiostoma novo-ulmi*

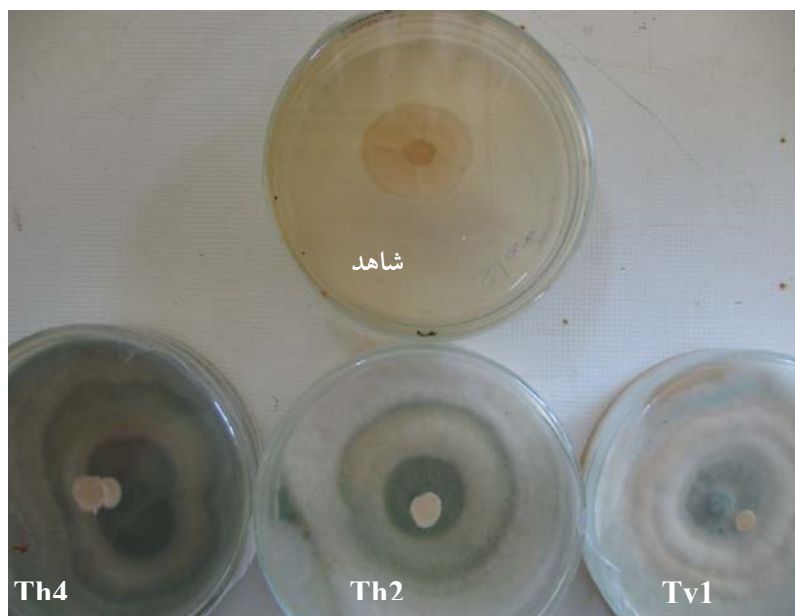
تیمار	تعداد اسپور*
Th3	۶۹۹/۴۷ ^{**a}
Th4	۶۹۲/۶۰ ^a
Th2	۴۳۲/۰۷ ^b
Th1	۴۰۱/۳۰ ^b
Tv1	۲۱۰/۷۰ ^{cd}
Tv2	۲۰۰/۳۵ ^d
LSD ($\alpha=0.05$)	۶۵/۷۲

* شمارش شده در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی X۴۰۰.

** داده‌ها مربوط به میانگین ۱۰ مشاهده و ۳ تکرار می‌باشد

اختلاف معنی دارند (جدول ۳). سه جدایه دیگر فعالیت آنتی بیوز بسیار کمتری در این آزمایش از خود نشان دادند. بیشترین میزان کنترل در این حالت نیز مربوط به Tv1 بوده که به میزان ۹۲/۱ درصد از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کرد (شکل ۸).

د) بررسی اثر ترکیبات فرار (Volatile metabolites) جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: در این آزمایش مشخص شد که از میان ۶ جدایه بکار رفته تنها سه جدایه Th2، Tv1 و Th4 در حالی که ۷۲ ساعت زودتر از عامل بیمارگر کشت شدند بهتر عمل کرده و در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۸- تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های مختلف تریکودرما *T.harzianum* (Th) و *T.virens* (Tv) در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *O. novo-ulmi* (کشت ۷۲ ساعته).

جدول ۳- تاثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های مختلف تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *O.novo-ulmi* (قارچ بیماری‌زا در معرض کشت ۷۲ ساعته جدایه‌های تریکودرما).

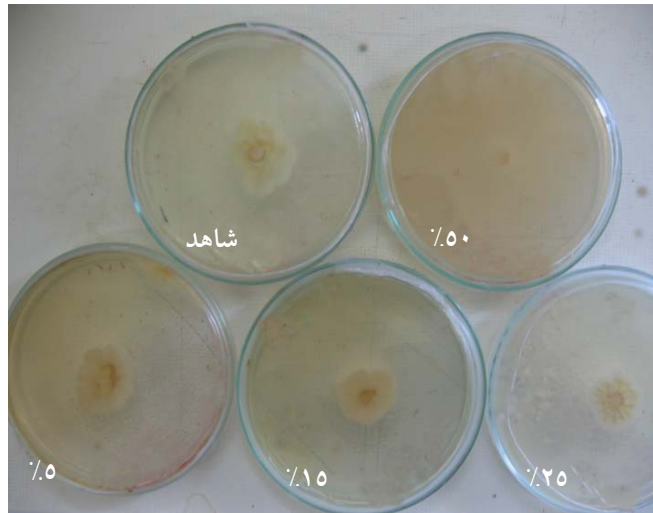
جدایه	درصد بازدارندگی*
شاهد	۰/۰ ^{***a}
Th3	۲۶/۷ ^{ab}
Th1	۴۰/۰ ^{bc}
Tv2	۵۳/۷ ^{bcd}
Th4	۷۷/۰ ^{de}
Th2	۸۲/۷ ^e
Tv1	۹۲/۷۴ ^e
LSD ($\alpha=0/05$)	۲۶/۹

* داده‌ها مربوط به میانگین ۴ تکرار می‌باشد.

**حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

جلوگیری از رشد پرگنه عامل بیماری داشته و به میزان ۷۹/۷۸ درصد باعث جلوگیری از رشد پرگنه شد (شکل ۹) (جدول ۴).

هـ): بررسی اثر ترکیبات غیرفرار (Culture filtrate) جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر: در این آزمایش مشخص گردید که جدایه Tv1 در غلظت ۵۰ درصد بیشترین تأثیر را در



شکل ۹- بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) فارچ Tv1 در جلوگیری از رشد پرگنه فارچ *O. novo-ulmi*

جدول ۴- تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی (Culture filtrate) فارچ Tv1 در جلوگیری از رشد پرگنه فارچ *Ophiostoma novo-ulmi*

غلظت (بر حسب درصد)	درصد بازدارندگی*
۰ (شاهد)	۰/۰۰**a
۵	۶۳/۷۵ ^a
۱۵	۱۴/۷۵ ^a
۲۵	۵۸/۷۵ ^b
۵۰	۷۹/۷۸ ^c
LSD($\alpha=0/05$)	۱۰/۰۱

* داده‌ها مربوط به میانگین ۴ تکرار می‌باشد.

**حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

بحث

قارچ تریکودرما یکی از عوامل بیوکنترل قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* است که مکانیسم کنترلی آن به چهار صورت رقابت، مایکوپارازیتسم، اثر ترشحات مایع خارج سلولی^۱ و ترکیبات فرار^۲ ظاهر می‌شود. این مکانیسم‌ها در کار خیلی از محققان دیگر از جمله دنیس و

ویستر (۱۹۷۱) و ریکارد (۱۹۸۱ و ۱۹۸۳) مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است.

نکته مهمی که بسیاری از محققان به آن اشاره کرده‌اند وجود اختلاف بین گونه‌ها و بخصوص جدایه‌های مختلف یک گونه از نظر مکانیسم‌های کنترلی ذکر شده و شدت و ضعف این مکانیسم‌ها است که نتایج این تحقیق نیز این مطلب را تأیید می‌کند. نتایج حاصله حاکی از توانایی قارچ تریکودرما در رقابت تغذیه‌ای در برابر قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* می‌باشد. رشد سریع و اسپورزایی فراوان از ویژگی‌هایی هستند که قارچ تریکودرما را قادر می‌سازد تا بهره‌برداری مطلوبی از زیستگاهش به عمل آورد و حتی در شرایط و

- 1- Culture filtrate
- 2- Volatile antibiotics
- 3- Trichodermin
- 4- trichotoxin
- 5- paracelsin
- 6- dermadin
- 7- alamethicin

زیستگاه‌های نامطلوب بقاء آن را حفظ نماید. یک چنین خصوصیتی باعث شده تا از این قارچ به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک مناسب بر علیه عوامل بیماری‌زای مختلف استفاده شود (باتناگار، ۱۹۹۶). نتایج حاصل از کلونیزاسیون و به ویژه اسپورزایی نشان داد که قارچ تریکودرما احتمالاً در شرایط طبیعی در داخل آوند گیاه بتواند با انجام کلونیزاسیون، اسپورزایی زیاد و از طرفی کاهش میزان اسپور قارچ عامل بیماری با فعالیت آنتی بیوزی باعث کاهش سرعت انتشار عامل بیماری در داخل آوند شود. اگرچه میزان تراکم موثر اینوکولوم آنتاگونیست می‌تواند از جمله عوامل مهم در بالا بردن عملکرد آن باشد. طبق تحقیقات ریکارد (۱۹۸۱ و ۱۹۸۳) جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و *T. viride* در شرایط طبیعی توان آنتاگونیستی مناسبی را در برابر قارچ عامل بیماری مرگ نارون نشان داده‌اند.

البته باید به این نکته توجه کرد به‌دلیل این که در شرایط طبیعی مجموعه پیچیده‌ای از عوامل مختلف بر روی روابط عامل بیمارگر، آنتاگونیست و میزبان اثر می‌گذارند، ارتباط دادن ویژگی‌ها یا توانایی‌های آزمایشگاهی جدایه‌ها با توان کنترل‌کنندگی آنها در شرایط طبیعی بسیار سخت و مشکل است. نتایج حاصل از آزمایش مواد فرار و ترشحات مایع خارج سلولی نیز با نتایج محققانی نظیر ژیس آلبرتی و رولند (۱۹۹۳)، ریکارد (۱۹۸۳) و ریچاردز (۱۹۸۸) مطابقت داشته است. تحقیقاتی که توسط پاپاویزاس (۱۹۸۵)، دنیس و وبستر (۱۹۷۱) و ژیس آلبرتی و رولند (۱۹۹۳) انجام گرفته نشان داده که متابولیت‌های غیر فرار تریکودرما حاوی آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز، لامیناریناز و β -۳، ۱ گلوکاناز و آنتی بیوتیک‌هایی نظیر تریکودرمین^۳، تریکوتوکسین^۴، پاراسلین^۵، درمادین^۶ و آلامتیسین^۷ هستند که تعداد و میزان ترشح این مواد در گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی در جدایه‌های مربوط به یک گونه ممکن است متفاوت باشد به طوری که انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌های ایزونیتریلی در تشخیص برخی گونه‌های مهم تریکودرما

نظیر *T. hammatum*، *T. viride*، *T. harzianum* و *T. koningii* نقش مهمی دارد (اکودا و همکاران، ۱۹۸۲).

گلیوتوکسین^۱ و گلیوورین^۲ از مهمترین ترکیبات آنتی بیوتیکی گونه *T. virens* محسوب می‌شوند. این ترکیبات عمدتاً بر روی غشاء قارچ بیمارگر اثر گذاشته و باعث اختلال در دیواره میسلیم و نهایتاً اختلال در رشد و بد شکلی آن می‌شوند (الاد و همکاران، ۱۹۷۹؛ کرووز و همکاران، ۱۹۹۳). کلایدون و همکاران (۱۹۸۷) و همچنین سرانو و همکاران (۱۹۹۲) بوی نارگیلی تولید شده توسط برخی از جدایه‌های *T. viride* و *T. harzianum* را به یک ترکیب پیرونی غیر اشباع با خاصیت ضدقارچی به نام 6-pentyl- α -pyrone نسبت دادند (اسکارلتی و فاول، ۱۹۹۴). طبق تحقیقات دنیس و وبستر (۱۹۷۱) استالدئید به‌عنوان عمده‌ترین ترکیب کربنیل دار متابولیت‌های فرار برخی از گونه‌های تریکودرما مشخص گردید. آنها همچنین توانستند مشتقات هیدرازونی را از ترشحات این قارچ پیدا کنند. با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش‌ها مشخص می‌شود که گونه‌ها و حتی جدایه‌های یک گونه از نظر مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی و بیوکنترلی بر علیه عامل بیمارگر متفاوت عمل می‌کنند. بنابراین بایستی جدایه‌های بسیار بیشتری جداسازی و مورد آزمایش و بررسی‌های بیشتری قرار بگیرند. از طرفی، عدم وجود همبستگی مناسب بین نتایج آزمایشگاهی و نتایج مزرعه‌ای در مورد بیوکنترل عامل بیماری مرگ نارون به‌ویژه نژادهای مهاجم بیماری در موارد بسیاری به اثبات رسیده است (برنیر، ۱۹۹۶). بنابراین در کنار این آزمایش‌ها، انجام مطالعات گلخانه‌ای باعث گزینش مناسبتر و دقیقتر جدایه‌های مورد آزمایش بر علیه عامل بیماری می‌گردد.

منابع

1. Baker, R., and Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.h. Freeman, Sanfrancisco, 433pp.
2. Bernier, L., Yang, D., Ouellette, G.B., and Dessureault, M. 1996. Assessment of *Phaeothea dimorphospora* for biological control of Dutch elm disease pathogens, *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi*. Plant Pathology. 45: 609-617.
3. Bhatnagar, H. 1996. Influence of environmental condition on antagonistic activity *Trichoderma* spp. against *Fusarium udum*. Indian. PL. Pathol. 26:58-65.
4. Brasier, C.M. 1990. China and the origin of Dutch elm disease an appraisal Plant Pathology. 39: 5-16.
5. Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. Nov., Causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia. 115:151-161.
6. Brasier, C.M., and Mehrotra, M. D. 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. Mycol. Res., 99: 205-215.
7. Brasier, C.M., and Kirk, S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. Mycol. Res. 105(5): 547-554.
8. Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R., and Avent, A.G. 1987. Antifungal alkyo pyrones of *Trichoderma harzianum*. Transactions of the British Mycological Society. 88: 503-513.
9. Cruz, J., Hidalgo, A., Lora, J. M., Bbenitez, T., Pintor-Toro, J., and Lobll, A. 1993. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry. 206: 859-869.
10. Cuthbert, R.A., Barger, J.H., and Reed, P.A. 1973. Formulation and application of methoxychlor for elm bark beetle control. Washington; US. Forest service Research Paper NE. 283.
11. Denis, C., and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. Transactions of the British Mycological Society. 57: 363-369.
12. Elad, Y., Chet, I., and Henis, Y. 1979. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology. 28: 719-725.
13. Elgersma, D.M., Roosier, T., and Scheffer, R.J. 1993. Biological control of Dutch elm disease by exploiting resistance in host. In; M.B. Sticklen and J.L. Sherald. (eds.), Dutch Elm Disease Research , Cellular and Molecular Approaches. New York: Springer-Verlag. 188-192.
14. Gams, W., and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. 3-34. In: C.P. Kubicek and G. Harman (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London. Vol 1. 278 pp.
15. Gams, W., and Meyer, W. 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*?. Mycologia. 90(5): 904-915.
16. Ghisalberti, E., and Rowland, G.Y. 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products. 56: 1799-1804.
17. Gregory, G., Lewis, R., Schreiber, L., Roberto, N., Ichida, J., and Thomas, J. 1986. A *Pseudomonas* species isolated from live oaks antagonistic to several tree pathogens. Phytopathology. 76:652-653.
18. Lanier, G.N. 1987. Fungicides for Dutch elm disease; comparative evaluation of commercial products. Journal of Arboriculture. 13: 189-195.
19. Marsden, D.H. 1952. Pruning elms affected with Dutch elm disease. Phytopathology. 42:113-114.
20. Murdoch, C.W., Campana, R.J., and Hoch, J. 1984. On the biological control of *Ceratocystis ulmi* with *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology. 74: 805.
21. Myers, D.F., and Strobel, G.A. 1983. *Pseudomonas syringae* as a microbial antagonist of *Ceratocystis ulmi* in the apoplast of American elm. Transactions of the British Mycological Society. 80: 389-394.
22. Neely, D., and Himelick, E.B. 1965. Effectiveness of vapam in preventing root graft transmission of the Dutch elm disease fungus. Plant Disease Reporter. 49: 106-108.
23. Ó Brien, J.G., Blanchette, R.A., and Stherland, J.B. 1984. Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of Dutch elm disease. Plant Disease. 65: 104-106.
24. Okuda, T., Fujiwara, A., and Fujiwara, M., 1982. Correlation between species of *Trichoderma* and production of isonitrile antibiotics. Agricultural and Biological Chemistry. 46: 1811-1822.
25. Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathology. 23: 23-57.

26. Peighami, E. 1992. Investigation of potential biological control of *Stigmina carpophila* (Lev.) Ellis. by *Trichoderma harzianum*. Journal of Agri. Sci. Tabriz University. 2 (3, 4).
27. Peighami, E. and Neishaboori. 1991. Investigation of potential biological control of Cucumber fusarium wilt by *Trichoderma harzianum*. Journal of Agri. Sci. Tabriz University. 2 (3, 4).
28. Rahjo, V., Mojdehi, H., Zamanizadeh, H., and Mosahebi, GH. 2000. Investigation of distribution of Dutch elm disease, in Tehran and Karaj cities, and initial evaluation effect of some fungicides against *Ophiostoma ulmi*. Scientific Reaserch Journal of Agri. Sci. Islamic Azade Univ. Press. 15-32.
29. Rahnama, K. 1996. Biotechnology: and its importance on the biological control of Pests and Plant Diseases in modern agriculture. Journal of Agri. Sci. and Natur. Reso. 3(3): 20-28.
30. Rahnama, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. In Proceeding: The Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. 34pp.
31. Rahnama, K., and Taheri, A.H. 2004. Distribution of Dutch elm disease pathogens, aggressive and non-aggressive isolates in Iran. Canadian Journal of Plant Pathology. 26: 121-126.
32. Rahnama, K., Mohammadzadeh, A., and Razavi, S.E. 2005. Investigation of effect pH and temperature on growth *Trichoderma koningi* and comparation with causal agents of ear blight, and antagonistic activity *T.koningi* against their diseases. Journal of Agri. Sci. and Natur. Reso. 12(1):127-136.
33. Ricard, J.L. 1981. Commercialization of a *Trichoderma*_based mycofungicide some problems and solutions. Biocontrol News and information. 2: 95-98.
34. Ricard, J.L. 1983. Field observations on the biocontrol of Dutch elm disease with *Trichoderma viride* pellets. European Journal of Forest Pathology. 13: 60-62.
35. Richards, N.T. 1988. Trichothecin revisited ?. Mycologist. 2: 123-124.
36. Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Pap. 116:1-56.
37. Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus (Centenary Review). Mycol. Res., 100(8): 923-935.
38. Santini, A., Fagnani, A., Ferrini, F., and Mitter pergher, L. 2002. "San Zanobi" and "Plinio" Elm Trees. Hortscience. 37(7): 1139-1141.
39. Scarselletti, R., and Faull, J.L. 1994. In vitro activity of 6-pentyl-I-pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Mycol. Res., 98:1207-1209.
40. Scheffer, R.J., and Strobel, G.A. 1988. Dutch Elm Disease, a model tree disease for biological control, In; K.G. Mukeri, and K.I. Garg (eds.). Biocontrol of Plant Disease. CRC. Press. Inc., B. ca. Raton, FL., 103-119.
41. Schreiber, L., Gregory, G.F., Krause, C.R., and Ichida, J.M. 1988. Production partial purification and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana* , Canadian Journal of Botany. 66: 2338-2346.
42. Serrano-carreon, L., Hathout, Y., Bensoussan, M., and Belin, J. M. 1992. Lipid accumulation in *Trichoderma* species. FEMS Microbiological Letters. 93: 181-188.
43. Sincliar, A., and Campana, R.J. 1978. Dutch Elm Disease; Perspectives after 60 years. Agric. Pl. Pathol., 8(5): pp.55.
44. Solla, A., and Gil, L. 2003. Evaluating *Verticillium dahliae* for biological control of *Ophiostoma novo-ulmi* in *Ulmus minor*. Pl. Path., 52:579-585.
45. Stipes, R.J. 1975. Chemical control of *Ceratocystis ulmi*; an overview. In; D.A. Burdekin, and H.M. Heybrock (eds.), Dutch Elm Disease: Proceedings of the IUFRO Congress. 1974. pp.1-15. Saint Paul, MN: USFS.
46. Stipes, R.J., and Campana, R.J. 1981. Compendium of elm disease. APS. Press. Pp. 96.
47. Voetten, J. 2003. Dutch Trig®: A decade of successful biological control Dutch elm disease in Europe and the USA, In Proceeding: second International Elm Conference Valsain, Segovia, Spain. Pp. 35.
48. Zafari, D., Ershad, D. Zare, R. and Alizadeh, A. 2002. A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. Iranian J. of Pl. Pathol. 38(1-2). 21-47.

Investigating biological control of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of Dutch Elm Disease by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro

M.M. Iraqi¹, *K. Rahnama², D. Zafari³ and M. Taghinasab⁴

¹Former M.Sc. Student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ²Associate Prof, Dept. of Plant Protection Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ³Assistant Prof, Dept. of Plant Protection, Abuali Sina Univ. of Hamadan, Iran, ⁴Instructor of Dept. of Plant protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Abstract

Antagonistic effect of four *Trichoderma harzianum* (Th) and two *T. virens* (Tv) soil isolates were studied against one isolates of *Ophiostoma novo-ulmi* in vitro. In this aim, different ntagonistic mechanisms such as; mycoparasitism, competition and antibiosis (effect of volatile metabolites and culture filtrate) were investigated. Microscopic studies indicated that all isolates of *Trichoderma* spp. had adverse effect on the development of *Ophiostoma novo-ulmi*. All isolates differed in antagonistic mechanisms against the causal agent. Tv2 isolate, showed the most growth rate in dual culture and competition with *O.novo-ulmi* and covered the colony of *O.novo-ulmi* after four days. Th3 isolate, had the highest colonization and sporulation rate on the three days culture of *O.novo-ulmi*. Volatile metabolites and culture filtrate of Tv1 isolate, showed the highest effect on growth inhibition of pathogen fungal mycelia, 92.74 and 78.75 percent, respectively. The potential of using *Trichoderma* spp. isolates for biological control against the causal agent Dutch Elm Disease is worth considering.

Keywords: Antagonist; Dutch elm disease; Biological control; *Ophiostoma novo-ulmi*; *Trichoderma harzianum*; *T. virens*