Crop Biotech.
Summer (2019) 8(4):65-79. DOI: 10.30473/CB.2019.42738.1752

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هشتم، پیاپی چهارم، شماره بیست‌وششم، تابستان ۱۳۹۸ (۶۵-۷۹)

تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه *Phaseolus vulgaris* به *Rhizoctonia solani* با استفاده از قارچ‌کش بیولوژیک

زهرا رضالو[۱]، سمیرا شهبازی[۲*]، حامد عسکری[۲]
۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران
۲. پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۹/۱۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۵/۸)

Induction of Resistance Related Responses of *Phaseolus vulgaris* to *Rhizoctonia solani* by Bio-fungicides

Zahra Rezaloo[1], Samira Shahbazi[2*], Hamed Askari[2]
1. Seed Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
(Received: Nov. 2, 2018 - Accepted: Jul. 30, 2019)

Abstract

Damping-off is one of the major diseases of *Phaseolus vulgaris* in different parts of the country. Because damping-off agents are soil-borne, the use of chemical methods had not satisfactory results, therefore, in recent years much attention has been paid to the biological struggle, especially the use of *Trichoderma* fungi. One of the *Trichoderma* mechanism is the induction of the plant's defense system. In this research, five spices of *Trichoderma harzaianum*, *T. viride*, *T. Konigi*, *T. atroviride*, *T. virense* were used to induce resistance of bean plant (*Phaseolus vulgaris*) against *Rhizoctonia solani*. In order to investigate the effect of mutation induction in the Trichoderma genome on the rate of plant resistance induction, five superior mutants (from each *Trichoderma* spices) were used for treatment of plants. The experiments were carried out in a completely randomized design with four replications. Yield, malondialdehyde, proline, chlorophyll a and b, carotenoids and protein concentration in treated plants in greenhouse condition were evaluated. The data from the evaluations showed that the mutants of these *Trichoderma* species decrease the diseases incidence more than the same wild type *Trichoderma* species, which lead to increase the bio control potential of mutant based bio-fungicides in competitive with wild type based or chemical compounds. The amount of soluble protein, enzymes activity, chlorophyll a and b and carotenoids increased in *Trichoderma* treatments compared to control (pathogen treatment). The results of these experiments showed that seed coating formulations (mutant and wild) had better efficiency than other formulations for controlling damping-off disease and resistance induction in bean plant.

Keywords: *Trichoderma*, *Rhizoctonia solani*, Induced Resistance, *Phaseolus vulgaris*.

چکیده

بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های عمده *Phaseolus vulgaris* در نقاط مختلف کشور است. به‌دلیل خاک‌زاد بودن عوامل مرگ گیاهچه، استفاده از سموم شیمیایی نتیجه رضایت‌بخشی به بار نمی‌آورد، به همین جهت در سال‌های اخیر توجه زیادی به مهار زیستی به‌خصوص با استفاده از قارچ *تریکودرما* شده است. یکی از مکانیسم‌های *تریکودرما*، تحریک سیستم دفاعی گیاه است. در تحقیق حاضر از پنج گونه *تریکودرما* (*هارزیانوم، ویریده، وارینس، اتروویریده و کنینجی*) برای مقاومت در گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) علیه *Rhizoctonia solani* استفاده شد. برای بررسی تأثیر القای جهش در ژنوم *تریکودرما* در میزان القای مقاومت در گیاه، از هر گونه موتانت برتر آن نیز برای تیمار گیاهان استفاده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شدند. عملکرد، غلظت مالون‌دی‌الدهید، پرولین، کلروفیل a، b و کارتنوئیدها و پروتئین گیاهان تحت تیمار در گلخانه ارزیابی شد. داده‌ها نشان دادند، موتانت‌های این گونه‌های *تریکودرما* توانایی بیوکنترل بیماری بالاتری از والد همان گونه‌ها دارند که قدرت رقابت قارچ‌کش زیستی تهیه‌شده از موتانت‌ها را در مقایسه با قارچکش زیستی گونه‌های والد یا سموم شیمیایی بالاتر برد. میزان پروتئین محلول، فعالیت آنزیم‌ها و کلروفیل a، b و کارتنوئید در تیمارهای *تریکودرما* در مقایسه با شاهد تلقیح‌شده با بیمارگر افزایش یافت. در مجموع نتایج این آزمایش‌ها نشان داد، فرمولاسیون‌های پوشش بذر با قارچ‌های *تریکودرمای* موتانت و والد نسبت به سایر فرمولاسیون‌ها در کنترل بیماری مرگ گیاهچه و القای مقاومت در لوبیا دارای کارایی بهتری هستند.

واژه‌های کلیدی: *تریکودرما*، *رایزوکتونیا سولانی*، *Phaseolus vulgaris*، مقاومت القایی.

* نویسنده مسئول: سمیرا شهبازی
E-mail: samira.shahbazi.aeoi@gmail.com

مقدمه

قارچ *تریکودرما* در بین عوامل کنترل زیستی بیش از همه قارچ‌ها مورد مطالعه قرار گرفته و به‌عنوان عامل بیوکنترل کاربرد داشته است. تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر فاکتورها از جمله عواملی هستند که در زمان حمله بیمارگر در قارچ *تریکودرما* القاشده و به‌نظر می‌رسد که مستقیماً در مکانیسم کنترل زیستی این قارچ مشارکت دارند. آنزیم‌های مختلفی که توسط گونه‌های مختلف این قارچ ترشح می‌شوند به‌دلیل فعالیت تجزیه‌کنندگی و ممانعت‌کنندگی تقریباً همه قارچ‌های پاتوژن گیاهی بیشتر مورد توجه قرار دارند. اما یکی از عوامل محدودکننده کاربرد گونه‌های *تریکودرما* به‌عنوان قارچ‌کش‌های زیستی میزان تأثیر نسبتاً پایین ترکیبات زیستی در شرایط مزرعه‌ای (در مقایسه با سموم شیمیایی) می‌باشد. بنابراین دستکاری ژنتیکی با استفاده از عوامل جهش‌زا بر روی عوامل کنترل زیستی می‌تواند راهگشای به‌دست‌آوردن محصولات کنترل بیولوژیک ارتقایافته باشد. گونه‌های *T. harzaianum*، *T.viride*، *T.konigi*، *T. atroviride* و *T. virence* بیش از سایر گونه‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند.

قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn که نام تلومرف آن (*Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk است به لحاظ تنوع ژنتیکی به گونه مرکب مشهور است که مطالعات ژنتیکی جمعیت آن از نظر درک صحیح از چگونگی تکامل در پاسخ به روش‌های مختلف مبارزه و اتخاذ روش‌های مؤثر مدیریت از اهمیت ویژه‌ای برخودار است. جنس *Rhizoctonia* به معنی کشنده ریشه، در سال ۱۸۱۵ توسط دکاندول و گونه *R. solani* توسط Kuhn (1815) نامگذاری شد. یکی از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای خاکزی *R. solani* است که مورد بررسی قرار گرفته و قادر است خسارت‌های جدی را به محصولات کشاورزی از قبیل لوبیا، پنبه و سیب زمینی وارد کند.

گونه‌های *تریکودرما* عوامل بیوکنترل شناخته‌شده خوبی برای توقف پوسیدگی به‌وسیله قارچ‌های خاک‌زاد پوسیدگی ریشه مثل*Rhizoctonia solani* هستند (Kucuk & Kivanc, 2004). گونه‌های مختلف *تریکودرما* پوسیدگی حاصل از *R. solani* را در تخم گیاهان پنبه، چغندرقند و سویا متوقف کردند (Kumari *et al.*, 2012). خیلی از گزارش‌های قبلی تأکید بر استفاده از *T. harzianum* و *T. viride* برای کنترل گندیدگی ریشه داشته‌اند. برای جلوگیری از رشد قارچ‌های پوسیدگی ریشه *T. polysporum* یک عامل بیوکنترل برای کنترل قارچ پوسیدگی ریشه است (Abdol qayoom Rajput and Saleem shahzad, 2015).

Anith و همکاران (۲۰۱۱) نیز در بررسی اثر توأم قارچ‌های *تریکودرما* و *P. indica* روی گیاه فلفل سیاه افزایش تعداد برگ بوته را گزارش دادند. همچنین بهبود فعالیت ریزجانداران خاک و خصوصیات رشدی گیاهانی مانند زیره (Haggag and Abo-sedra, 2005)، خیار (Yedidia *et al.*, 2001)، اسفناج (Mottaghian *et al.*, 2009)، نخود فرنگی (Kukuk *et al.*, 2007)، سویا (Yazdani *et al.*, 2008) و گندم (Shahsavari *et al.*, 2010) در تیمار با گونه‌های مختلف قارچ *تریکودرما* نیز گزارش شده است. برقراری ارتباط همزیستی میکوریزایی از طریق بهبود گسترش هیف‌های قارچ در منافذ خاک، سبب افزایش وزن خشک در گیاه رازیانه گزارش گردید (Kapoor *et al.*, 2004).

یکی از روش‌های به‌کار گرفته شده برای افزایش توانایی آنتاگونیست‌ها القای موتاسیون تصادفی با بکارگیری موتاژن‌های فیزیکی نظیر امواج الکترومغناطیس، UV، X و اشعه گاما و استفاده از موتاژن‌های شیمیایی مانند اتیل‌متان سولفانات می‌باشد. مطالعات متعددی در زمینه افزایش پتانسیل آنتاگونیستی *T. harzianum* با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ (با

استفاده از مواد شیمیایی موتانت‌زا و اشعه فرابنفش و گاما) صورت گرفته است (Howell, 1998).

بسیاری از پژوهش‌های عمده درباره کاربرد پروبیوتیک‌های گیاهی، بر استفاده مستقیم سوسپانسیون سلولی روی بذر متمرکز شده است. ارزش واقعی تکنولوژی تولید و فرمولاسیون این عوامل تنها وقتی است که یافته‌های پژوهش از آزمایشگاه به سطح مزرعه منتقل شود. اگرچه این عوامل میکروبی توانایی زیادی در مدیریت آفات و بیماری‌ها دارند، نمی‌توانند در شرایط مزرعه‌ای به‌صورت سوسپانسیون یا توده سلولی به‌کار روند؛ بنابراین، زیست‌توده میکروبی باید در حامل‌های معدنی‌تثبیت‌شده، به‌صورت فرمولاسیون‌هایی برای کاربرد آسان، نگهداری (انبارداری)، تجاری‌سازی و استفاده در مزرعه، فراهم شوند. در این تحقیق سعی بر آن شد تا با بررسی تیمارهای پرایمینگ به‌همراه مواد بیولوژیک و تأثیر آن بر عملکرد، مؤلفه‌های فیزیولوژیکی و همچنین تأثیر آن بر کنترل بیماری *R. solani* در گیاه *Phaseolus vulgaris*، نگرشی جدید در استفاده از تیمارهای بیولوژیک و فرمولاسیون آنها ارائه گردد.

مواد و روش‌ها

قارچ‌های *T. harzianum*، *T. virense*، *T. konigi*، *T. atroviride* و *T. viride* و قارچ پاتوژن *R. solani* از کلکسیون پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای تهیه شدند. برای بررسی میزان تحریک پاسخ دفاعی لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) به قارچ پاتوژن *R. solani* چند شاخص از جمله عملکرد، غلظت مالون‌دی الدهید، پرولین، کلروفیل a، b و کارتنوئیدها و پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. عملکرد گیاه به دلیل نامحدود بودن رشد گیاه در مرحله‌ای بود که ۷۰٪ غلاف‌ها خشک شده بودند و برای آنالیز فیزیولوژی گیاه نمونه-های برگی در مرحله قبل از گلدهی گرفته شدند. هدف از انجام این آزمایشات مطالعه تأثیر این قارچ‌ها بر میزان عملکرد و فیزیولوژی گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) بود.

تهیه فرمولاسیون‌های قارچ‌کش بیولوژیک

جمعیت 10^8 اسپور فعال در هر میلی‌لیتر تهیه‌شده از کشت هفت روزه در محلول TCM[1] (Shahbazi *et al.*, 2014) برای تهیه فرمولاسیون پوشش بذر (w/v ۴۰٪) استفاده شد و ترکیبات چسباننده و حمل‌کننده برای این فرمولاسیون با روش Rezaloo و همکاران (۱۳۹۷) انتخاب و استفاده شدند. از سوسپانسیون اسپور با جمعیت 10^8 اسپور هر یک از جدایه‌های مورد مطالعه در هر میلی‌لیتر برای تهیه فرمولاسیون گرانول، با روش Fravel *et al.* (1999) استفاده شد. برای تهیه فرمولاسیون پودر از پودر تالک و کشت جامد هر یک از جدایه‌ها با جمعیت 10^8 اسپور در میلی‌متر مکعب استفاده شد.

تهیه اینوکلوم از قارچ‌ها

بذرهای گندم به‌مدت یک شب خیس شدند و دو بار طی دو روز متوالی اوتوکلاو شدند (فشار ۵۰ پوند و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت نیم ساعت). سپس از حاشیه کشت ۵ روزه جدایه‌های *تریکودرما* قطعاتی (در مجموع ۲×۲ سانتی‌مترمربع به‌ازای هر ۵۰ گرم بذر) روی سطح بذرها تلقیح شده و به‌مدت ۲ هفته در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Rezaloo و همکاران، ۱۳۹۷). برای تهیه اینوکلوم بذر برای *R. solani* نحوه تهیه پروپاگول مانند *تریکودرما* بود، ولی روی سوبسترای کلش برنج برای تهیه ماده تلقیح استفاده شد. برای استفاده در خاک سوبسترای تلقیح شده به‌مدت دو روز انکوباتور ۳۰ درجه قرار گرفتند تا خشک شوند سپس پودر شده و ۳ گرم به‌ازای هر کیلوگرم خاک گلدان استفاده شدند. ماده تلقیح (*R. solani*) ۵ روز قبل از *تریکودرما* به خاک افزوده شدند تا حداکثر تشابه با شرایط آلودگی خاک به محیط

1. Trichoderma Complete Medium

طبیعی به‌وجود آید. خاک گلدان یک روز قبل از افزودن اینوکلوم آبیاری شدند تا میزان رطوبت به حد ظرفیت مزرعه برسد. کاشت بذرها (۱ عدد در هر گلدان) همزمان با افزودن اینوکلوم *تریکودرما* صورت گرفت. آبیاری پس از کاشت بذرها با تناوب‌های ۲ و ۳ روزه صورت گرفت. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار صورت گرفت. درصد مرگ‌ومیر ۱۵ روز پس از کاشت اندازه‌گیری شد.

ارزیابی کارایی فرمولاسیون‌ها در شرایط گلخانه‌ای

خاک لازم برای گلدان‌ها درون کیسه‌های قابل اوتوکلاو به‌مدت ۱ ساعت در فشار ۵۰ پوند و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اوتوکلاو شد. سپس به نسبت ۱:۱:۱، پرلیت، خاک و پیت مخلوط شد. و به‌ازای هر گلدان دو کیلو گرم استفاده شد. بذرهای *Phaseolus vulgaris* تهیه شده از موسسه اصلاح و تهیه نهال بذر در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شده و ۳ بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. این عمل دو بار تکرار شد. سپس در دستمال حوله‌ای دو لایه کاملاً خشک شدند. پس از خشک‌شدن بذرها در خاک گلدان‌های دو کیلوگرمی حاوی بذرهای تلقیح شده با عامل بیوکنترل (افزوده شده به خاک در همان روز کاشت بذر) و (قارچ بیمارگر افزوده شده به خاک ۵ روز قبل از کاشت بذر) کشت شدند.

جهت تیمار شیمیایی بذرها ۲۵۰ میلی‌لیتر از قارچ‌کش بنومیل به‌ازای هر صد کیلوگرم بذر به‌صورت دو در هزار استفاده شد. بذرها در محلول قارچ‌کش به‌مدت نیم ساعت قرار گرفتند و پس از خشک شدن در گلدان‌های دو کیلوگرمی حاوی اینوکلوم عامل بیماری و فاقد عامل بیماری (شاهد) کاشته شدند. گلدان‌ها در گلخانه پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای با دمای ۲۵-۲۸ درجه سلسیوس و شدت نور ۲۵۰۰۰ لوکس و دوره روشنایی/ تاریکی (۸/۱۶ ساعت) با رطوبت نسبی ۹۰٪ و آبیاری منظم از طریق زیر گلدانی نگهداری شدند. در جدول ۱ تیمارهای مورد استفاده در این آزمون ذکر شده که برای رعایت اختصار از این حروف برای ارائه نتایج آزمایش‌ها استفاده شده است. برای آلودگی گلدان‌ها مقدار ۳ گرم قارچ بیمارگر که روی سوبسترای گندم کشت داده شده بود. بدین ترتیب که یک‌سوم خاک رویی گلدان با قارچ *R. solani* خوب مخلوط شد. بیماری آن‌ها بر اساس مقیاس ۱ تا ۵ از روش اصلاح شده (Kim *et al*., 1997) به‌صورت زیر ارزیابی شد.

۰= گیاهان سالم و بدون هیچ گونه علائم آلودگی.

۱= کمتر از ۲۰ درصد گیاه آلوده شده و حداقل یک شانکر درشت قهوه ای داشته باشد.

۲= حدود ۵۰ درصد گیاه دارای شانکر تیپیک باشد.

۳= بیش از ۶۰ تا ۷۰ درصد گیاه دارای شانکر باشد.

۴= مرگ گیاهچه پس از سبز شدن از خاک (Postemergence) طول گیاهچه کمتر از ۵ سانتی‌متر باشد.

۵= مرگ گیاهچه قبل از سبز شدن از خاک (Preemergence) یا پوسیدگی بذر.

شاخص بیماری بر حسب درصد از رابطه زیر محاسبه شد.

$$DI\% = \frac{\sum_{i=1}^{n}(\text{گیاهچه تیمار} \times \text{مقیاس آلودگی})}{\text{تعداد کل گیاهچه‌ها} \times ۵} \times ۱۰۰.$$

مخرج کسر حداکثر مقیاس آلودگی × تعداد گیاهچه‌های کشت شده است، که نتیجه آن حداکثر شدت بیماری ممکن می‌باشد.

تهیه عصاره برگی از گیاهان برای بررسی پروفایل پروتئینی و آنزیمی

به میزان ۱ گرم از بافت خردشده ۵ سی‌سی بافر استخراج (۰/۲ tris M. HCl (pH = ۸,۰) اضافه شدند. اندازه گیری پروتئین به‌روش Bradford (1976) انجام گرفت. مقدار ۳ سی‌سی از معرف بردفورد در داخل لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۱۵۰ میکرومول از عصاره حاوی پروتئین اضافه شد.

جدول ۱. تیمارهای اعمال شده روی گیاه *Phaseolus vulgaris* در ارزیابی گلخانه‌ای

تیمارها	علامت اختصاری	تیمارها	علامت اختصاری
شاهد	Control	پاتوژن بدون سم	Pathogen
بذور پوشش داده شده با *تریکودرما* والد	CW	بذور پوشش داده شده با تریکوردما والد + پاتوژن	CWP
بذور پوشش داده شده با *تریکودرما* موتانت	CM	بذور پوشش داده شده با تریکوردما موتانت + پاتوژن	CMP
پودر *تریکودرما* والد	PW	پودر *تریکودرما* والد+ پاتوژن	PWP
پودر *تریکودرما* موتانت	PM	پودر *تریکودرما* موتانت+ پاتوژن	PMP
گرانول *تریکودرما* والد	GW	گرانول *تریکودرمای* والد + پاتوژن	GWP
گرانول *تریکودرما* موتانت	GM	گرانول *تریکودرما* موتانت + پاتوژن	GMP
		سم شیمیایی بنومیل + پاتوژن	Chemical

جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانش شد. برای محاسبه میزان پروتئین با استفاده از نمودار استاندارد به‌دست‌آمده از پروتئین خالص بووین سرم آلبومین، در محدوده غلظت ۰–۱۰۰۰ مایکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. آزمون الکتروفورز با استفاده از روش لاملی با استفاده از ژل متراکم‌کننده ۴٪ و ژل تفکیک‌کننده ۱۲/۵٪ انجام شد (Laemmli, 1970). جهت آماده‌سازی نمونه ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل از ۰/۵ گرم نمونه برگی و بافر تریس ۰/۱ مولار را با ۵ میلی‌لیتر استون سرد مخلوط شد و رسوب پروتئینی آن با استفاده از سانتریفیوژکردن در ۴۵۰۰rpm به‌مدت ۷ دقیقه جمع‌آوری شد. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرومول آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه شد و به‌خوبی مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ میکرومول از بافر نمونه به آن اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. بعد به مقدار ۲۰ میکرومول از نمونه ها در چاهک‌ها تزریق شد.

تعیین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

از سوبسترای پیروگالول ۹۰۰ ماکرولیتر در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار در pH=۶/۵ و ۱۰۰ ماکرولیتر عصاره با غلظت ۱ به ۲ در بافر استخراج پروتئین و برای صفر کردن از پیروگالول در جذب ۴۲۰ نانومتر استفاده شد. سپس عصاره آنزیمی اضافه شد و در ۲ دقیقه و هر ۱۰ ثانیه تغییرات ثبت شد.

تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز

از سوبسترای گایاکول که یک ترکیب فنلی است، استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۱ میلی‌لیتر بود که شامل ۸۰۰ ماکرولیتر محلول گایاکول ۱۰ میلی‌مولار در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۶، ۱۰۰ ماکرولیتر عصاره آنزیمی با رقت ۱ به ۲۰ در بافر استخراج پروتئین و ۱۰۰ ماکرولیتر H_2O_2، ۳۵ میلی‌مولار بود. پس از صفر کردن دستگاه، میزان جذب این سه محلول قرائت گردید. تغییرات جذب در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در طول موج ۴۷۰ نانومتر بعد از گذشت هر ۱۰ ثانیه تا مدت زمان ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری کلروفیل a، b و کاروتنوئید

مقدار ۰/۵ گرم بافت گیاهی را در هاون چینی با ازت مایع آسیاب می‌کنیم. ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه اضافه کرده و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار می‌دهیم. موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۴۶۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ برای کاروتنوئیدها توسط اسپکتروفوتومتر مقدار جذب را قرائت می‌نماییم. در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به‌دست می‌آید (Arnon, 1967).

$$chl\ a = \frac{(19.3 * A663 - 0.86 * A645)\,v}{100w}.$$

$$chl\ b = \frac{(19.3*A645-3.6*A663)v}{100w}.$$

$$caretenoides = \frac{100\,(A470)-3.27(mg\ chl\ a)-104\ (mg\ chl\ b)}{227}.$$

v = حجم محلول صاف‌شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفوژ)

a= جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۵۴ و ۴۷۰ نانومتر

w = وزن تر نمونه بر حسب گرم

سنجش پراکسیداسیون لیپید

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (TBA) با سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. ۰/۵ گرم بافت تر برگ و ریشه در ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد همگن شده سپس عصاره حاصل به فالکون انتقال یافته و به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰,۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید بود اضافه شد. مخلوط فوق به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سلسیوس)، انکوبه گردیدند. سپس مخلوط حاصل بلافاصله در حمام یخ سرد شد و بعد از آن در سرعت ۶۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین و جذب ناویژه در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر شد. غلظت مالون‌دی آلدئید (MDA) با استفاده از ضریب تصحیح ($\mu\ mol^{-1}\ cm^{-1}$) ۰/۱۵۵ محاسبه و بر اساس واحد میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu mol\ g^{-1}$ FW) بیان شد (Health and Packer, 1968).

سنجش پرولین

برای تعیین مقدار پرولین برگ‌ها، از روش Bates *et al.* (1973) استفاده شد. ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از نمونه برگی تر در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیک سه درصد به‌وسیله هاون ساییده شد و عصاره حاصل در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد.

سپس دو میلی‌لیتر از عصاره‌های صاف‌شده را به لوله‌های دربدار منتقل نموده و به همه لوله‌ها مقدار دو میلی‌لیتر معرف نینیدرین و دو میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه گردید. آن‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام بن‌ماری و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و بعد از سردشدن، به هر یک از لوله‌ها مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. غلظت استاندارد بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه تعیین شد. پرولین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر بر حسب میلی‌گرم خوانش شد.

نتایج و بحث

عملکرد گیاهان *Phaseolus vulgaris* در گلخانه

عملکرد گیاهان *P. vulgaris* کاشته‌شده در حضور *تریکودرما* (وحشی و موتانت) در مقایسه با شاهد بهبود قابل‌توجهی داشته و اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان دادند. به‌طوری‌که افزایش عملکرد دانه نسبت به شاهد، در تیمار با *تریکودرما* پرتوندیده ۶۲/۹ درصد و در تیمار با *تریکودرما*موتانت ۵۸/۲ درصد بود (شکل ۱). همچنین ریشه‌های خارج‌شده از خاک تفاوت‌های چشم‌گیری داشتند که ریشه‌های گیاهان شاهد بسیار کم حجم، ضعیف و بدون گره بودند. ریشه‌های تیمار شیمیایی نیز کم حجم بود. اما ریشه گیاهانی که دارای تیمار فرمولاسیون‌های *تریکودرما* بودند بسیار حجیم و پر از گره بودند و وزن بیشتری داشتند.

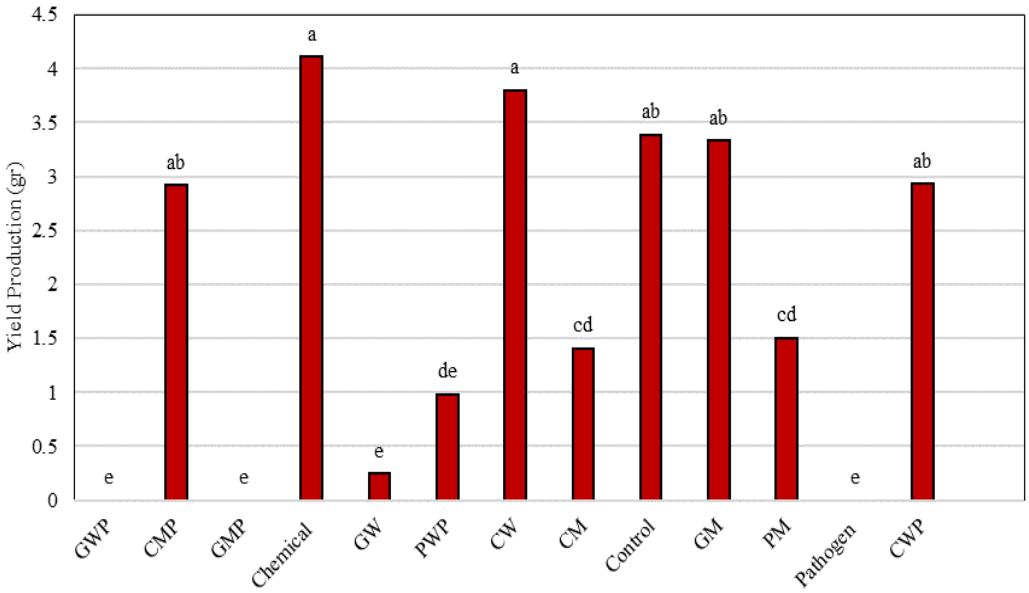
بیوکنترل *R. solani* با قارچکش بیولوژیک

مقایسه میانگین شاخص درصد وقوع بیماری[1] نشان داد که در شرایط عدم وجود پاتوژن (control) درصد

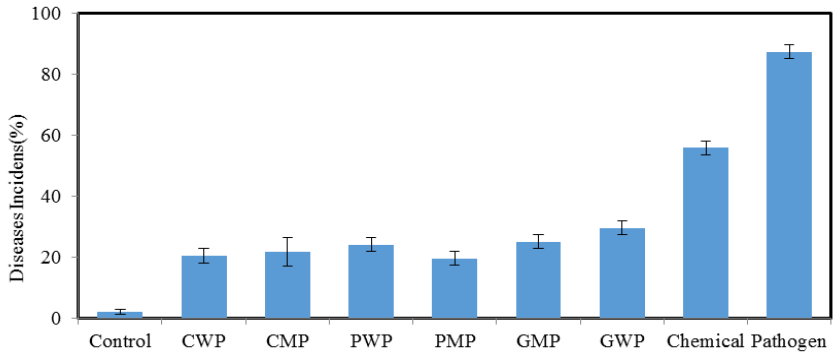
1. Disease Incidens (DI)

مشاهده پوسیدگی ریشه و طوقه کمتر از ۱٪ بود (عوامل محیطی) در حالی‌که در سایر تیمارها با *R. solani* استفاده از روش‌های کنترل مختلف اختلاف معنی‌داری از نظر میزان وقوع بیماری با شاهد (بیمارگر) نشان دادند. در گیاهان رشدیافته در خاک آلوده به *R. solani*، ۹۰٪ گیاهان دچار پوسیدگی ریشه و طوقه شدند.

قارچکش شیمیایی (بنومیل با غلظت دو در هزار) درصد وقوع بیماری ۵۸٪ بود. در مقایسه با کنترل شیمیایی، کلیه گیاهان تحت تیمار با قارچ کش زیستی در سطح ۵٪ به‌طور معنی‌داری درصد وقوع بیماری کمتری داشتند که نشان می‌دهد برای *R. solani* بیوکنترل مؤثر تر از روش شیمیایی است. تیمار پودر *تریکودرما* موتانت با بیمارگر با ۱۸٪ وقوع بیماری و ضعیف‌ترین میزان بیوکنترل در فرمولاسیون گرنوال *تریکودرمای* والد با بیمارگر (۳۰٪) مشاهده شد. در بین فرمولاسیون‌ها در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری بین فرمولاسیون‌ها در کاهش وقوع بیماری مشاهده نشد. اما مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که فرمولاسیون گرانول کمتر از سایر فرمولاسیون‌ها باعث کاهش وقوع بیماری شد. از سوی دیگر در هر فرمولاسیون استفاده از اسپورهای *تریکودرما* موتانت در کاهش وقوع بیماری عملکرد بهتری از همان فرمولاسیون تهیه شده از *تریکودرما* وحشی داشتند (شکل ۲). این نتایج با گزارش Begum *et al.* (2010) که از تیمار بیوپرایمینگ بذر سویا با *تریکودرما* برای مقابله با بیمارگر *Colletotrichum truncatum* و همچنین Abuamsha *et al.* (2011) که برای کنترل *Leptosphaeria maculans* از بیوپرایمینگ با باکتری سودوموناس استفاده کرد، مطابقت دارد. بعضی از گونه‌های *تریکودرما* از جمله: *T. harzianum* و *T. viride* با برخورداری توام از خواصی مثل میکوپارازیتیسم، آنتی‌بایوزیس و قابلیت رقابت ساپروفیتی قادرند جمعیت قارچ‌های بیماری زا را به میزان قابل‌توجهی کاهش دهند (Soltani, 2008). ولی در شرایط طبیعی به دلیل پایین بودن واحدهای تکثیری آن‌ها در خاک، به نحو مؤثری در کنترل بیماری‌های قارچی مؤثر نیستند (Cavalcante *et al.*, 2008).



شکل ۱. عملکرد *P. vulgaris* (وزن خشک دانه) در اثر تیمار با فرمولاسیون‌های



تریکو

شکل ۲. میزان وقوع بیماری در اثر تیمار با فرمولاسیون‌های *تریکودرما*

اندازه گیری پروتئین

با ترسیم رابطه رگرسیون بین BSA و میزان جذب، میزان پروتئین محلول استخراج شده از اندام هوایی گیاهان *P. vulgaris* (۴۰ روز پس از اعمال تیمارها) اندازه گیری شد. مقایسه گروه‌بندی‌های انجام شده برای پروتئین‌های اندازه‌گیری‌شده نشان می‌دهد تیمارها در سطح ۵٪ معنی‌دار بودند. در مقایسه میانگین پروتئین محلول در همه تیمارها (جدول ۲) نشان داد، مقدار پروتئین در تیمار بذر پوشش شده با *تریکودرما* والد از همه تیمارها بیشتر بود. و در جایگاه بعدی سم شیمیایی بنومیل قرار داشت. در سایر فرمولاسیون‌های تهیه شده از *تریکودرمای* والد و موتانت، میزان پروتئین تجمع یافته در سلول‌های گیاهی تحت تیمار با آن‌ها، پایین‌تر از فرمولاسیون پوشش بذر بوده است و تفاوت معنی‌داری با گیاه کنترل نداشتند. در شرایط وجود بیمارگر، میانگین پروتئین‌های گیاهی در همه فرمولاسیون‌ها بالاتر از شرایط عدم وجود بیمارگر بوده‌اند. تنها در گیاهان آلوده به با بیمارگر که با گرانول تهیه‌شده از موتانت تیمار بذر بودند میزان پروتئین به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. با انجام آنالیزهای آنزیمی بعدی می‌توان تعبیر نمود که چه میزان از تجمع این مرتبط با پروتئین‌ها دخیل در مقاوت به بیمارگر بوده است. و کدام فرمولاسیون توانسته است به تجمع پروتئین‌های مؤثر در مقاومت بیشتری در گیاه منجر شود.

جدول ۲. مقایسه گروه‌بندی مقدار پروتئین اندازه‌گیری شده در تیمارهای *تریکودرما*، پاتوژن و بدون پاتوژن به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

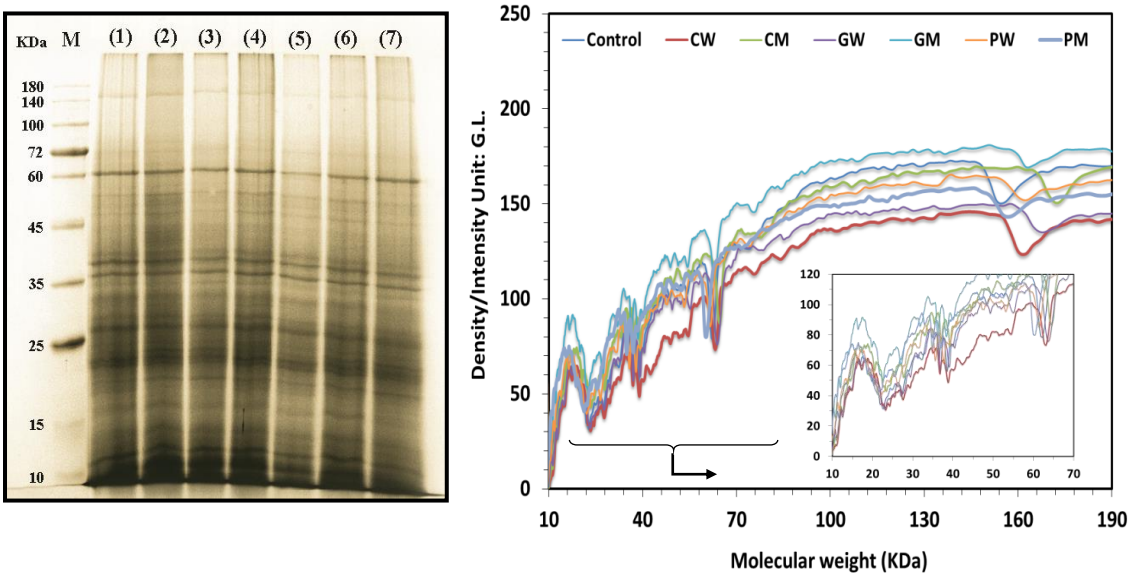
تیمار	پروتئین محلول (µg/g fw)
Control	2225.53 gh
CW	4138.78 a
GW	2355.64 fg
PW	2411.35 gh
CM	2127.26 fg
GM	2251.46 h
PM	2476.53 f
CWP	2867.69 de
GWP	2949.97 de
PWP	2776.69 e
CMP	2994.89 d
GMP	1859.84 i
PMP	3286.76 c
Chemical	3757.12 b

بررسی پروفایل پروتئینی SDS-PAGE

کلیه تیمارها و گیاه شاهد (فاقد قارچ *تریکودرما*، والد و موتانت) در محدوده‌های وزن مولکولی ۱۰ الی ۱۸۰ کیلودالتون دارای باندهای پروتئینی مختلف بودند. در پروفایل پروتئین لوبیا قرمز کوچک نیز باندهایی در حدود وزن مولکولی ۸۰ و ۷۴ کیلودالتون مشاهده شده است (Rui, 2012). کلیه نمونه‌ها به غیر از بذر تیمار شده با گرانول جدایه‌های موتانت دارای باند شارپی در وزن مولکولی ۶۲ لی ۶۶ کیلو دالتون بودند. که البته نمونه بذر تیمار شده با گرانول جدایه موتانت در وزن مولکولی ۶۲/۷ نیز دارای باند پروتئین بود، اما

نسبت به دیگر تیمارها از شدت باند کمتری برخوردار بود. از لحاظ حضور دیگر باندهای شارپ (وزن مولکولی ۳۶ الی ۴۰ کیلودالتون، ۲۵ الی ۲۹ کیلودالتون و ۲۰ الی ۲۳ کیلودالتون) اختلافی بین نمونه‌های بذور تیمارشده با بیوفرمولاسیون‌های مختلف قارچ *تریکودرما* و نمونه گیاه شاهد مشاهده نگردید. باندهایی با همین مشابهت‌ها در گونه‌های مختلف لوبیا مشاهده شده است (Pak *et al*., 2011). لوبیا صورتی، لوبیا چیتی و لوبیا قرمز کوچک دارای باندهایی شارپ در با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون بودند (Rui, 2012). با این حال بیشترین شدت باندهای ذکرشده در جدایه‌های پوشش والد، پودر موتانت و گرانول والد مشاهده گردید. این نتایج با مطالعات قبلی توسط Baker *et al*. (1976) مطابقت دارد که نشان می‌دهد بخشی از پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۲۳ کیلودالتون از دانه‌های *P. vulgaris* دارای ویژگی‌های مشابه به فازئولین است. در مشابهت‌هایی با باندهای به‌دست‌آمده از پروفایل پروتئین در این این آزمایش، باندهایی با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون برای لوبیا مشاهده شده است و باند ۱۷ کیلودالتون برای لوبیا چیتی مشاهده است که هر دو مربوط به مهارکننده α- آمیلاز در β- subunit مربوط می‌شود (Rui, 2012). در لوبیا چیتی پروتئین‌هایی کوچک با وزن مولکولی ۱۴ کیلودالتون وجود دارد. همچنین باندهایی کمتر با در دامنه بین ۲۴ تا ۳۸ وجود داشت (Rui, 2012).

کلیه نمونه‌ها دارای بازهای پروتئینی مختلف در محدوده وزن مولکولی بین ۱۰ تا ۱۸۰ کیلودالتون بودند. کمترین شدت باند در بین نمونه‌های مورد مطالعه در نمونه پروتئینی گیاه شاهد مشاهده گردید. نمونه بذر گرانول با جدایه موتانت از لحاظ تنوع باندهای پروتئینی موجود نسبت به دیگر تیمارها دارای اختلاف بود. باند شارپی که در وزن مولکولی حدود ۶۲ الی ۶۶ کیلودالتون در تیمارهای مختلف قابل مشاهده بود. نمونه بذر گرانول موتانت به صورت باند خیلی ضعیفی مشاهده گردید.



(b) (a)

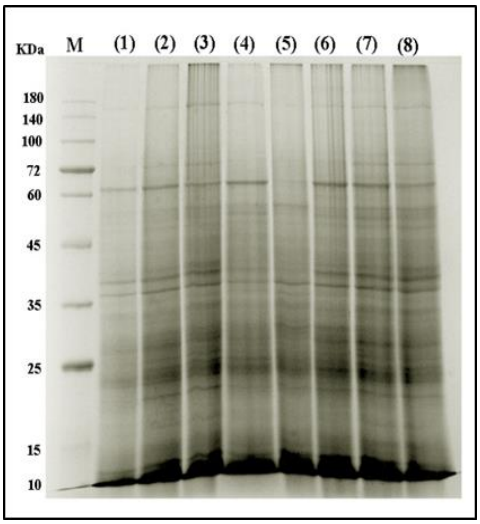
شکل ۳. (b): SDS-PAGE ژل پروتئین‌های استخراجی از نمونه های برگ *P. vulgaris*: (۱) گیاه شاهد، (۲) بذر پوشش‌دار با جدایه‌های والد تریکودرما، (۳) بذر پوشش‌دار با جدایه‌های موتانت، (۴) بذر تیمارشده با گرانول جدایه‌های والد، (۵) بذر تیمار شده با گرانول جدایه‌های موتانت، (۶) بذر تیمارشده با پودر جدایه‌های والد، (۷) بذر تیمارشده با پودر جدایه‌های موتانت. (a): دانسیتومتری ژل SDS-PAGE

همچنین باند پروتئینی در وزن مولکولی ۳۰ تا ۴۰ کیلودالتون نیز در این تیمار خیلی ضعیف بود. شارپ ترین باندها در نمونه بذر تیمار شده با پودر موتانت قابل مشاهده بود. همچنین بعد از این تیمار پوشش موتانت و پودر والد شدت باند بیشتری نسبت به دیگر تیمارها نشان داد. پروفایل‌های پروتئین لوبیا چیتی، لوبیا قرمز روشن و لوبیا قرمز تیره دارای وزن مولکولی ۶۳ کیلودالتون بودند (Rui, 2012). لوبیاهای رقم (navy, pink, pinto, great northern, and small red bean) باندهای تقریباً کمتر از ۶۰ کیلودالتون نشان دادند (Rui, 2012). لوبیا چیتی، لوبیا قرمز روشن و لوبیا قرمز تیره باندهایی با وزن مولکولی ۱۷ کیلودالتون داشتند، درحالی‌که ارقام نامبرده باندهایی با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون داشتند (Rui, 2012). لوبیا قرمز باندهای شارپی در حدود ۳۵ کیلودالتون نشان دادند (Rui, 2012).

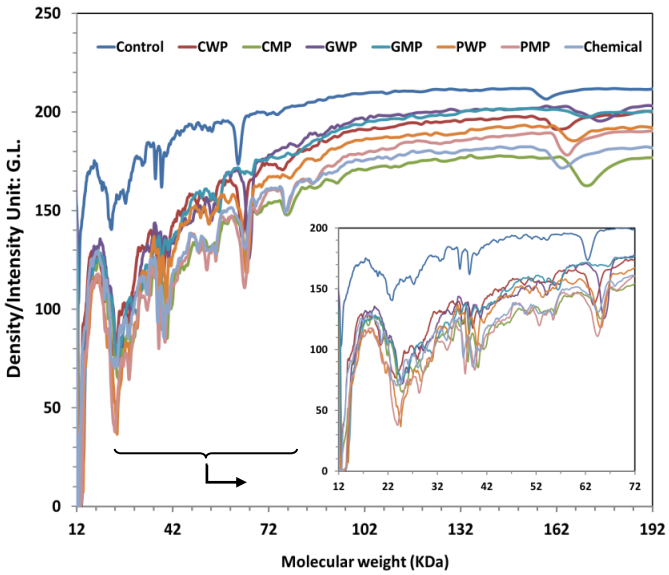
اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کارتنوئیدها

در مقایسه میانگین اندازه‌گیری کلروفیل (شکل ۴) مشخص شد، بذر پوشش شده با *تریکودرمای* والد بیش از بقیه تیمارها کلروفیل داشت و بعد از آن گرانول تهیه شده از *تریکودرمای* موتانت بود. بذر پوشش‌شده با *تریکودرمای* موتانت در گروه بعدی قرار داشت. مقایسه میانگین کلروفیل a تیمارهای قارچی در حضور مقدار قابل‌توجهی از پاتوژن *R. solani* (شکل ۴) نشان داد، سم شیمیایی بنومیل بیش از همه بود.

شاهد، بذر پوشش‌شده با *تریکودرمای* والد با پاتوژن و پودر *تریکودرمای* موتانت با پاتوژن در یک سطح معنی‌داری بودند. گرانول *تریکودرمای* موتانت و والد با پاتوژن در پایین‌ترین دسته‌بندی قرار داشتند و با هم در یک سطح معنی‌داری بودند. البته تیمار پاتوژن بدون حضور سم بیولوژیک *تریکودرما* کاملاً از بین رفته بود.



(b)



(a)

شکل ۴. (b): ژل SDS-PAGE پروتئین‌های استخراجی از نمونه‌های برگ لوبیای کشت‌شده در مجاورت پاتوژن: (۱) گیاه شاهد، (۲) بذر پوشش‌دار با جدایه‌های والد *تریکودرما*، (۳) بذر پوشش‌دار با جدایه‌های موتانت، (۴) بذر تیمارشده با گرانول جدایه‌های والد، (۵) بذر تیمارشده با گرانول جدایه‌های موتانت، (۶) بذر تیمارشده با پودر جدایه‌های والد، (۷) بذر تیمارشده با پودر جدایه‌های موتانت، (۸) بذر تیمارشده با قارچ‌کش شیمیایی. (a): دانسیتومتری ژل SDS-PAGE.

مقایسه میانگین کلروفیل b اندازه‌گیری‌شده (شکل۴) نشان داد. میزان کلروفیل b در بذر پوشش شده با *تریکودرمای* والد بیش از بقیه تیمارها بود. بعد از آن گرانول *تریکودرمای* موتانت و پور *تریکودرمای* والد قرار داشتند. مقایسه میانگین گروه‌بندی‌های اندازه‌گیری‌شده کلروفیل b (شکل ۴) نشان داد، گرانول *تریکودرمای* موتانت و والد با پاتوژن در آخرین گروه‌بندی قرار گرفتند. تیمار پاتوژن بدون حضور سم بیولوژیک *تریکودرما* کاملاً از بین رفته بود.

مقایسه میانگین کاروتنوئیدهای اندازه‌گیری‌شده (شکل ۴) نشان داد که طبق انتظار بذر پوشش‌شده با *تریکودرمای* والد بیش از همه دارای کارتنوئید بود. گرانول *تریکودرمای* موتانت و پودر *تریکودرمای* والد هر دو در یک گروه قرار داشتند. در بین تیمارهای مختلف قارچ *تریکودرما* شاهد از همه تیمارها کمترین میزان کارتنوئید را داشت. نتایج گروه‌بندی‌ها در اندازه‌گیری کاروتنوئیدها (شکل ۴) نشان داد. میزان کاروتنوئیدها در تیمارهای سم شیمیایی، بذر پوشش شده با *تریکودرمای* والد با پاتوژن و شاهد در یک سطح معنی‌داری قرار داشتند و تیمار پودر *تریکودرمای* موتانت با پاتوژن و تیمار بذر پوشش شده با *تریکودرمای* والد با پاتوژن در یک سطح معنی‌داری قرار داشتند.

پراکسیداسیون لیپید

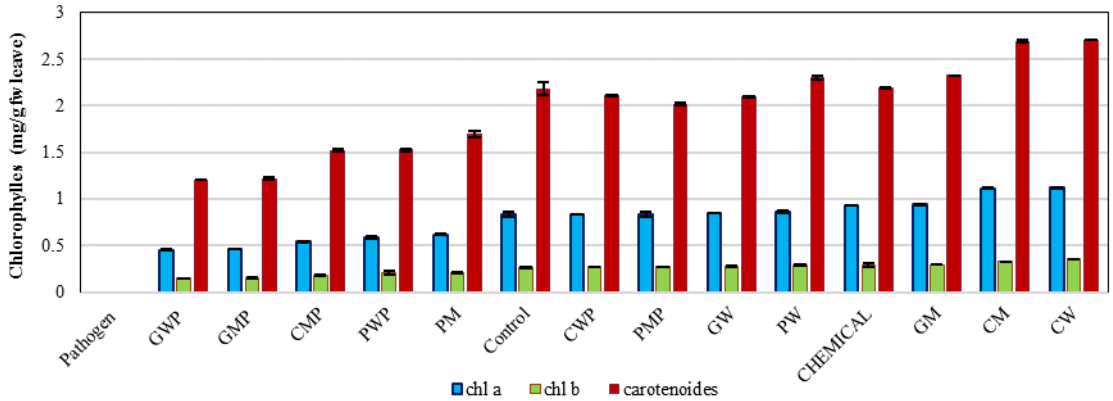
با توجه به افزایش غلظت مالون‌دی‌الدهید سلول‌های گیاهی در شرایط تنش تجزیه واریانس داده‌های مالون‌دی‌الدهید نشان داد، در بین تیمارها (با نادیده گرفتن تیمار پاتوژن بدون سم بیولوژیک) بیشترین مقدار مالون‌دی‌الدهید به‌ترتیب در تیمار سم شیمیایی بنومیل با پاتوژن و پودر *تریکودرمای* والد بود (شکل۵). می‌توان گفت سم شیمیایی کمترین میزان کنترل تأثیرات پاتوژنی را داشته است. همچنین باید توجه داشت که تیمارهای گرانول *تریکودرمال* والد و موتانت مقدار مالون‌دی‌الدهید بیشتری نسبت به کنترل داشتند، ولی بقیه فرمولاسیون‌های بیولوژیک توانایی بیشتری برای کنترل تنش‌های ناشی از پاتوژن داشتند. به‌ترتیب تیمارهای فرمولاسیون پودر *تریکودرمای* والد و بذر پوشش شده با *تریکودرمای* والد با پاتوژن و پودر *تریکودرمای* موتانت و گرانول و پودر *تریکودرمای* والد با پاتوژن، پودر *تریکودرمای* موتانت با پاتوژن کمترین مقدار مالون‌دی‌الدهید را در بین همه تیمارها داشتند و از لحاظ آماری با هم تفاوت نداشتند. Borojerdnia *et al.* (1395) نشان دادند با افزایش تنش‌ها میزان مالون‌دی‌الدهید بیشتر می‌شود. افزایش مالون‌دی‌الدهید بیانگر تخریب شدید غشا سلولی در این رقم تحت تنش بیماری است. Gunez *et al.* (2007) افزایش غلظت مالون‌دی‌الدهید برگ تحت تنش را در ذرت گزارش کردند.

پرولین

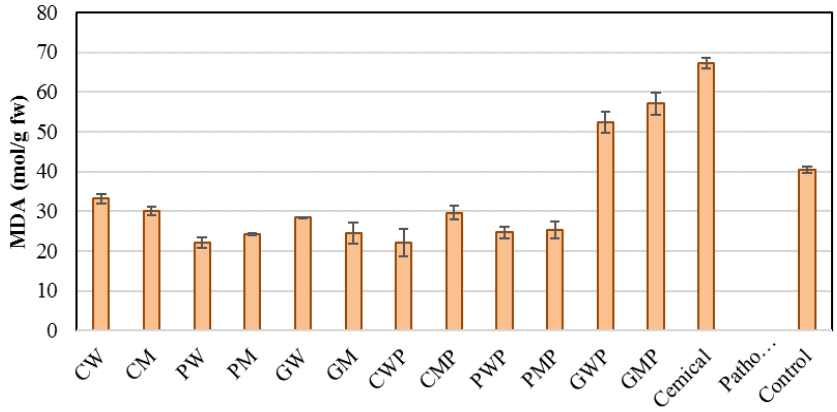
مقایسه میانگین تیمارهای استفاده‌شده نشان داد، غلظت پرولین در اغلب تیمارهای دارای پاتوژن بیشتر از شاهد بود. کمترین مقدار پرولین را تیمار فرمولاسیون پوشش با قارچ *تریکودرمای* موتانت داشت و اختلاف معنی‌داری نسبت به بقیه تیمارها داشت. بیشترین میزان پرولین را نیز تیمار فرمولاسیون گانول *تریکودرمای* والد و وحشی داشتند (شکل ۶). در مقایسه میانگین‌ها دیده می‌شود که تأثیر اعمال فرمولاسیون‌های پودر *تریکودرمای* موتانت و والد با پاتوژن بیشتر از کنترل بوده‌اند. کم بودن میزان پرولین نشان‌دهنده کنترل فرمولاسیون‌های حاصل از قارچ *تریکودرما* است. همچنین سم شیمیایی بنومیل با اختلاف قابل توجهی نسبت به پودر *تریکودرمای* موتانت و والد با پاتوژن مقدار پرولین بیشتری داشت.

پرولین اسیدامینه‌ای می‌باشد که بخش عمده بسیاری از پروتئین‌های درگیر در تنظیم اسمزی، دیواره سلولی و غشا را تشکیل می‌دهد (Szabados and

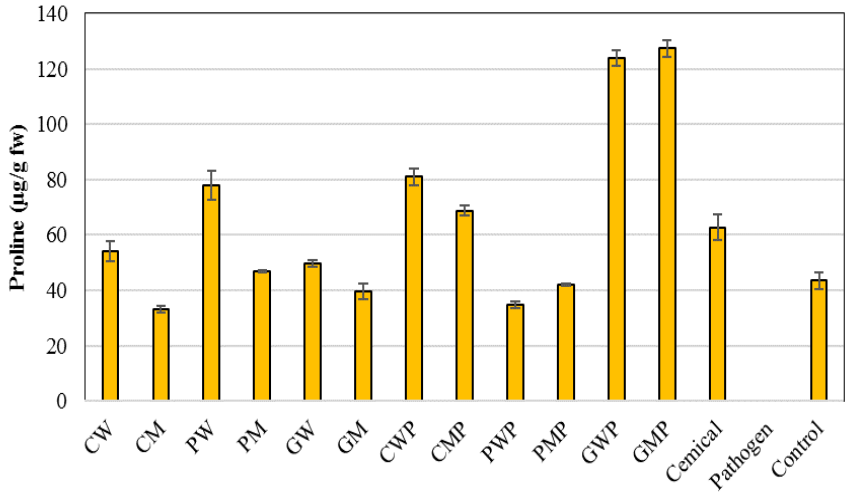
Savoure, 2009). تجمع پرولین با افزایش شدت تنش به میزان ۳۰ درصد ظرفیت زراعی در نتیجه افزایش بیوسنتز پرولین و کاهش تخریب ان صورت می‌گیرد. همچنین توزیع پرولین در درون و بیرون سلول نقش مهمی در مقاومت اسمزی بافت‌های مختلف نسبت به تنش‌ها ایفا می‌کند.



شکل ۵. مقایسه مقدار کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در تیمار با فرمولاسیون‌های مختلف *تریکودرما*



شکل ۶. مقایسه گروه‌بندی مقدار مالون دی آلدهید اندازه‌گیری‌شده در تیمار با فرمولاسیون‌های مختلف *تریکودرما*



شکل ۷. مقایسه گروه‌بندی مقدار پرولین اندازه‌گیری‌شده در اثر تیمار با فرمولاسیون‌های *تریکودرما*

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از فرمولاسیون‌های تهیه‌شده از *تریکودرما* توانایی کنترل بیماری را بیشتر از قارچ‌کش‌های شیمیایی داشته و می‌توان این پژوهش را در شرایط گلخانه‌ای آلوده به چنین بیمارگرهایی آزمود. در نتایج آزمون SDS-PAGE مشاهده شد که پروتئین‌های گیاهی در تیمار با *تریکودرما* تغییراتی را نشان می‌دهند که به معنای القای بیان برخی پروتئین‌ها در حضور این قارچ در لوبیا است. پراکسیداسیون لیپید در تیمارهای *تریکودرما* در حضور پاتوژن و بدون آن در مقایسه با شاهد به مقدار قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت. میزان تجمع پرولین در برگ گیاه که با ایجاد پتانسیل اسمزی نیروی لازم برای جذب آب را فراهم می‌کند در تیمارهای مختلف و شاهد متغیر بود.

همچنین نتایج نشان داد که القای جهش در ژنوم قارچ *تریکودرما* نه تنها آثار سوئی بر گیاهان میزبان نداشته بلکه با ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده خارج ریسه ای در محیط ریزوسفر و رهاسازی و قابل جذب کردن مواد مغذی برای گیاه، عملکرد و توسعه سیتم ریشه‌ای را تقویت کرده و باعث القای مقاومت سیستمیک و عمومی نیز در گیاهان بیشتر از جدایه پرتو ندیده (والد) خود می‌شود.

تهیه این فرمولاسیون از قارچ‌کش بیولوژیک، علاوه بر بهبود کارایی قارچ *تریکودرمای* ارتقا یافته در کنش متقابل بین *P. vulgaris* و بیمارگر به نفع گیاه، منجر به بالا رفتن میزان پروتئین گیاه نیز می‌شود و میزان فعالیت آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را که ارتباط مستقیم با مقاومت گیاه به بیماری دارد افزایش می‌دهد.

سپاسگزاری

از همکاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، آقای دکتر توحیدلو و دکتر حبیبی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERNCES

Abdol Qayoom R, Saleem S (2015) growth and sporulation of *Trichoderma polyspprum* on organic substrates by addition of carbon and nitrogen sources, pest and disease research lab. Department of agriculture and agribusiness management, University of Karachi-75270. 47(3); 979-986.

Abuamsha R, Salman M, Ehlers RU (2011) Effect of seed priming *Serratia plymutica* and *Pseudomonas chlororaphis* to control *Leptospheria maculans* in different oilseed rape cultivars Ruba & Mazen. Eur. J. Plant Pathology. 130: 287-295.

Anith KN, Faseela KM, Archana PA, Prathan KD (2011) Compatibility of *Piriformospora indica* and *Tricoderma harzianum* as dual inoculants in black papper (*piper nigrum* L.). Symbiosis, 55:11-17.

Arnon AN (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal. 23: 112-121.

Barker RDJ, Derbyshir E, Yarwood A, Boulter D (1976) Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seed, and their intracellular and cotyledonary distribution. Phytochemistry. 15: 751-757.

Bates LS, Waldren RP, Terae ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.

Begum, MM, Saraih M, Puteh AB, Zianal Abidin MA, Rahman MA, Siddiqui Y (2010) Field performance of bioprimed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping off and seedling stand of soy

bean. Biological Control. 53: 18-23.

Boroujerdnia M, Behematha MR, Alami SK, Abdusi V (1395) Effect of drought stress on proline content, soluble carbohydrates, electrolyte leakage and relative water content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Plant Growth Physiology. Eighth Year, Number 29, Spring.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry Quantities. 72: 248-254.

Cavalcante, FR, Lima PMS, Silva SLF, Viegas RA, Silveira JAG (2008) Roots and leaves display contrasting Oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. Journal of Plant Physiology. 164: 591-600.

Fravel DR, Rhodes DJ, Larkin RP (1999) Production and commercialization of biocontrol products. In: integrated pest and disease management in greenhouse crops (Albrajes, R., Lodovica Gullino, M., Van Lenteren, J. C and Elad, Y. eds.,) Kluwer Academic publishers, Boston pp. 365-376.

Gunez, A, Inal A, Alpuslan M, Fraslan F, Guneri E, Cicek N (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize grown under salinity. Journal of Plant Physiology. 164: 728-736.

Haggag WM, Abo-sedera SA (2005) Characteristics of three *Trichoderma* species in peanut haulms compost involved in biocontrol of cumin wilt disease. International Journal Agriculture Biology. 7(2): 222-229.

Health RL, Packer L (1968) Photo peroxidation in isolated chlorI. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Howell CR (1998) Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping- off of cotton seedlings. Phytopathology. 72:496-498.

Kapoor R, Giri B, Mukerji KG (2004) Improvement growth and essential oil yield and quality in *foeniculum vulgar* mill on mycorrizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresource Technology. 93: 703- 311.

Kim DS. Cook RJ. Waller DM (1997) *Bacillus* sp. L324-92 for Biologycal control of three roots diseases of wheat grown with reduce tillage. Phytopatology. 87: 551-558.

Kukuk C, Kivanc M, kinaki E, Kinaci G (2007) Efficacy of *Trichoderma harzianum* (*Riffaii*) on inhabitation of ascochyta blight disease of chickpea. Annals of Microbiology. 57: 665-668.

Kumari M, Yadav V, N Tuteja N, Johri AK (2012) Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. Microbiology. 155: 780-790.

Mottaghian A, Pirdashti H, Bahmanyar MA, Shahsavari A, Hasanpour R (2009) Effect of three *Trichoderma* species and different amounts of enriched municipal waste compost on growth parameters in spinach (*spinacia oleracea*). In: Proceeding of 5th International Scientific Conference of Iran and Russia on Agricultural Development Problems. Saint Petersburg, Russia, 8-9 October. 267-270.

Rui X, Boye JI, Ribereau S, Simpson BK, Prasher SO (2011) Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties. Food Research International. 44: 2497-2504.

Shahbazi S, Askari H, Naseripour T (2014) Chitinolytic enzymes production by different strains of Trichoderma and investigation of their antagonistic interactions against soil borne pathogens. International Journal

of Agriculture and Crop Sciences, 7(8), 472.

Shahsavari A, Pirdashti H, Motaghian A, Tajik Ghanbari MA (2010) Response of wheat (*Triticum aestivum* L.) growth parametrs and yield to co-inoculation of farmyard manure, *Tricoderma* spp. And *psudomunas* app. Journal of Agroecology. 2 (3): 448-458.

Soltani A (2008) Re-concidration of Application of Application of Statistical methods in agricultural researches. Jahad-e-daneshgahi Mashhad. P73.

Szabados L. Savoure A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science. 15: 89-97

Yazdani M, Pirdashti H, Tajik GHanbari MA (2008) Effect of *Tricoderma* ssp. And different organic manures on growth and development in soybean [*Glysine max* (L.) Merril.]. Electron journal of Crop production. 1(3): 65-82.

Yedidia I, Srivastava AK, Kapulnik Y, Chet I (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and soil. 235(2): 235-242.