نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی
دوره۲، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۷۹-۷۱)

بررسی تأثیر جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد قارچ *Aspergillus flavus* و کاهش آفلاتوکسین روی پسته

ساناز چگینی[1]، کیوان بهبودی[2*]، محمد جوان نیکخواه[3] و محسن فرزانه[4]
۱، ۲، ۳، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.
۴، گروه کشاورزی، پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران.
(تاریخ دریافت:۹۲/۸/۲۰ - تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۱)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر جدایه‌هایی از قارچ تریکودرما برای کاهش رشد قارچ *Aspergillus flavus* R5 و آفلاتوکسین ناشی از آن در شرایط آزمایشگاه در محیط کشت و مغز پسته مطالعه شد. غربالگری اولیه براساس تأثیر ترکیبات فرّار و غیرفرّار جدایه‌ها روی رشد استرین *A. flavus* R5انجام شد. نتایج نشان داد که ترکیبات فرار ۴ جدایهٔ T1، T3، T4 و T17 به ترتیب با ۶۰/۶۶ درصد، ۶۸/۸۸ درصد، ۶۳/۳۳ درصد و ۵۹ درصد و ترکیبات غیرفرار جدایه‌های ذکرشده در غلظت ۵۰ درصد به ترتیب با ۵۰ درصد ، ۸۲ درصد، ۷۵ درصد و ۵۸ درصد کاهش، بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیومی *A. flavus* R5 دارند. در حضور عصارهٔ برون‌سلولی این ۴ جدایه، میزان آفلاتوکسین و رشد استرین *A. flavus* R5 در محیط مایع کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش آفلاتوکسین مربوط به جدایه‌های T3 و T4 به ترتیب با ۸۹/۷۶ درصد و ۸۶/۲۵ درصد بود. تأثیر عصارهٔ این ۴ جدایه در پاک‌سازی آفلاتوکسین اضافه‌شده به محیط کشت نشان داد که این جدایه‌ها باعث کاهش معنی‌دار آفلاتوکسین شدند و جدایهٔ T3 با ۸۸/۰۳ درصد کاهش آفلاتوکسین، بیشترین تأثیر را از خود نشان داد. بررسی کاربرد عصارهٔ برون سلولی جدایه‌های T1، T3، T4 و T17 به ترتیب سبب ۶۴/۱۱ درصد، ۸۴/۴۰ درصد، ۷۷/۸۸ درصد و ۵۱/۴۴ درصد کاهش میزان آفلاتوکسین تولیدشده در پسته شدند. جدایه‌های T1، T3، T4 و T17 به ترتیب متعلق به گونه‌های *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* بودند.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین، تجزیه، تریکودرما، پسته، عصارهٔ خارج سلولی

مقدمه

پسته به‌عنوان محصولی استراتژیک، در بین محصولات صادراتی کشاورزی رتبهٔ نخست را به خود اختصاص داده است و جایگاه ویژه‌ای را در بین تولیدات کشاورزی ایران دارد. مهم‌ترین مشکل صادراتی که در ارتباط با پسته وجود دارد، آلودگی آن به مایکوتوکسین خطرناک آفلاتوکسین است. از آنجا که آفلاتوکسین‌ها سمّی و سرطان‌زا هستند، مقدار آن‌ها در مواد غذایی به دقت بررسی می‌شود و در بیشتر کشورها حد مجاز آن‌ها بین ۵ تا ۱۵ نانوگرم در گرم مشخص شده است (Aguero *et al.* 2008). هرچند ممکن است سموم شیمیایی در کاهش رشد قارچ آسپرژیلوس مفید باشند، مشکلات مصرف سموم از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول و اثرات نامطلوب روی سلامت، توجه را به سمت استفاده از روش‌های بیولوژیکی سوق داده است که با کاربرد قارچ‌ها و باکتری‌های مؤثر، امکان‌پذیر است

تلفن: ۰۹۱۲۳۰۷۸۳۷۸
E-mail: behbodi@ut.ac.ir

(Harman *et al*. 1998, Chet and Inbar, 1994). از جملهٔ ایـن عوامل مـی‌توان به قارچهایی مانند *Trichoderma Ampelomyces*، *Gliocladium* اشـاره کرد که مهم‌ترین آن‌ها *Trichoderma* spp. است (Harman *et al*. 1998). واکنش‌های بین تریکودرما و بیمارگرهای قارچی به‌طور خلاصه شامل ۳ مکانیزم مایکوپارازیتیسم، آنتی‌بیوز و رقابت است (Howell, 2003). گونه‌هـای تریکودرمـا بـا تولید آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی مانند گلوکانازها، پروتئازها و کیتینازها باعث تخریب دیوارهٔ سلولی *A. flavus* و در نتیجه، کاهش عملکرد بیمارگر می‌شوند (El Katatsny *et al*. 2001). فعـالیت آنتاگونیستی گونه‌های تریکودما در برابر بیمارگرهای گیاهـی مختلـف ماننـد *A. flavus*، *A. niger*، *A. oryzae* و *Penicillium* sp. به اثبات رسیده است (Gheorghe *et al*. 2008).

تـاکنون، برای پاک‌سازی آفلاتوکسین از محیط غذایی نیز میکروارگـانیسم‌هـای زیـادی استفاده شده‌اند. قـــارچهـــایـــی از قبیـــل *A. niger*، *A. parasiticus*، *Trichoderma viride* و *Mucor ambiguous* توانایی چشمگیری در تجزیهٔ آفلاتوکسین B1 دارند (Mann and Rehm 1976). از میان عوامل بیوکنترلی مورداستفاده، *T. viride* باعث کاهش قابل توجه رشد *A. flavus* و همچنین، کاهش تولید آفلاتوکسین B1 در دانه‌های برخی غلات شد (Aguero *et al*. Reddy *et al*. 2010, 2008, Choudhary, 1992). براساس بررسی‌های انجام‌شده، در ایران تحقیقات کمی در مورد کنترل آفلاتوکسین پسته به کمک قارچ تریکودرما روی پسته انجام شده است. بنابراین، هدف از این تحقیق دستیابی به جدایه‌های تریکودرمای بومی از باغات پسته ایران و بررسی مکانیسم تأثیر آن‌ها در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین B1 روی پسته است.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگه‌داری استرین توکسین‌زای *A. flavus* R5

جدایهٔ توکسین‌زایـــی *A. flavus* R5، از کلکسیـــون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایهٔ مذکور داخل ویال‌های حاوی محیط PDA در یخچال نگه‌داری شد.

جداکردن جدایه‌های تریکودرما از پسته

تهیهٔ میوهٔ پسته به‌صورت نمونه‌برداری حالت N از باغات مناطق مختلف پسته‌کاری شامل رفسنجان، راور، ساوه و قزوین انجام شد. پسته‌های رسیده و سالم که پوستهٔ سبز آن‌ها به پوستهٔ استخوانی نچسبیده بود از باغ‌های مناطق مذکور جمع‌آوری شدند و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و پوشش سبز میوه و پوستهٔ استخوانی و مغز پسته از همدیگـر جـــدا شدنـد. برای جداکـردن جدایه‌های تریکودرما ابتدا پوستهٔ سبز پسته‌ها جدا و به‌صورت قطعاتی کوچک خرد شدند و در ارلن حاوی محلول نمک فیزیولوژیک ۰/۸ درصد استریل‌شده منتقل شدند و به مدت ۲ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط کشت انتخابی مک فادن و ساتن (۱ گرم KH2PO4، ۰/۵ گرم MgSo4، ۵ گرم NaCl، ۱۰ گرم Glucose،۳۰ میلـی‌گـرم سولفات استرپتومایسین، ۲۰ گرم آگار، ۰/۲ میلی‌لیتر فرمالدهید، ۱ لیتر اب مقطر، ۱۷ میلی‌گرم Rose bengale) پخش شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۶ روز نگه‌داری شد و پس از گذشت زمان ذکرشده، پرگنه‌های قارچ تریکودرما رشد کردند. سپس، جدایه-های به‌دست‌آمده از هریک از نمونه‌های پسته به محیط آب ـ آگار ۲ درصد منتقل شدند و با گرفتن نوک ریسه از آن‌ها و انتقال به محیط کشت PDA خالص شدند. علاوه بر این ۱۵ استرین از گونه‌های مختلف تریکودرما از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشگی دانشگاه تهران تهیه شد. به منظور نگه‌داری از محیط کشت PDA مورب طبق روش Fradkin *et al*. (1985) استفاده شد.

بررسی قدرت رقابت ساپروفیتی جدایه‌های تریکودرما با استرین *A. flavus* R5

برای مقایسهٔ قدرت رقابتی ساپروفیتی (جلوگیری از رشد میسلیومی و اسپورزایـی قـارچ بیمـاری‌زا) دیسک‌های ۵ میلی‌متری از کشت جوان استرین‌های تریکودرما و قارچ *A. flavus* R5 در روش آزمون کشت متقابل (Dual Culture) درون تشتک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط PDA قرار داده و تشتک‌ها به مدت ۴ روز در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس و در شرایط تاریکی نگه‌داری

شدند. تیمار شاهد فقط حاوی دیسک قارچ *A. flavus* بود. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد محاسبه شد (Rama Bahadra Rajo *et al*. 2000).

تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار و فرّار جدایه‌های تریکودرما بر رشد میسلیومی *A. flavus* R5

تأثیر متابولیت‌های فرّار جدایه‌های تریکودرما بر رشد میسلیومی *A. flavus* R5 با استفاده از روش Fiddaman and Rossal (1993) انجام شد. تیمار شاهد فقط حاوی قارچ *A. flavus* R5 بود.

به منظور بررسی تأثیر متابولیت‌های غیرفرار جدایه‌های تریکودرما بر رشد میسلیومی *A. flavus* R5، عصاره خارج سلولی تریکودرما به روش Berg and Ballin (1995) تهیه شد. به‌طور خلاصه از کشت ۷ روزه تریکودرما در محیط مایع PDB، عصارهٔ خارج سلولی سترون به کمک دستگاه پمپ خلا و صافی میکروبیولوژیک با قطر روزنهٔ ۰/۲۲ میکرومتر، تهیه شد. سپس، غلظت‌های ۱۰ درصد، ۲۵ درصد و ۵۰ درصد از عصارهٔ برون سلولی جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت PDA تهیه شد. درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های تریکودرما از رابطهٔ زیر محاسبه شد.

$$IG=[(C-T)/C]\times 100$$

IG=درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی *A. flavus* R5

C=قطر رشد میسلیوم *A. flavus* R5 در تشتک پتری شاهد

T=قطر رشد میسلیوم *A. flavus* R5 در هر تیمار

تأثیر عصارهٔ خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین روی مغز پسته

به منظور انجام این آزمایش ابتدا با استفاده از اسکالپل، روی مغز پسته‌ها در طول درز پوستهٔ استخوانی و با کمک سوزن استریل زخمی به عمق ۲ و عرض ۱ میلی‌متر ایجاد شد. سپس، به‌طور جداگانه از هر جدایه تریکودرما عصارهٔ خارج سلولی به میزان ۲۰۰ml/kg تهیه شد و پسته‌های زخم‌شده به مدت ۲۰ دقیقه درون هر یک از عصاره‌ها به روش غوطه‌ورشدن تیمار و به درون تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری (در هر تشتک پتری ۵ مغز پسته قرار داده شد که تقریباً ۱۰ گرم وزن داشتند) منتقل شدند. بلافاصله به میزان ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ *A. flavus* R5 با غلظت 5×10^4 محل زخم هر پسته مایه‌زنی و به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس و شرایط تاریکی نگه‌داری شد. پس از گذشت مدت زمان ذکرشده، تعداد اسپور قارچ در گرم پسته محاسبه و میزان آفلاتوکسین تولیدشده در نمونه‌ها استخراج و اندازه‌گیری شد.

تأثیر عصارهٔ خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین در محیط مایع

عصارهٔ برون سلولی تریکودرما مطابق بند ۴ تهیه شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ خارج سلولی تریکودرما به ارلن‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDB ریخته شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیونی با غلظت ۵×۱۰۴ اسپور قارچ به هر ارلن اضافه شد؛ پس از ۷ روز نگه‌داری در دستگاه شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه، توده‌های میسلیومی رشدکرده به کمک کاغذ واتمن شمارهٔ ۴ از محیط کشت جدا و در آون با دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند. سپس، وزن خشک میسلیوم محاسبه و میزان آفلاتوکسین تولیدشده طبق روش Teniola *et al*. (2005) ارزیابی شد.

تأثیر عصارهٔ خارج سلولی تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین

این آزمایش طبق روش Alberts *et al*. (2006) انجام شد. ابتدا، عصارهٔ خارج سلولی تریکودرما تهیه شد. سپس، داخل لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، ۱ میلی‌لیتر از این عصاره خارج سلولی ریخته شد و بعد از آن به هر کدام از این لوله‌ها، ۲۰ میکرولیتر آفلاتوکسین B1، استاندارد آفلاتوکسین B1 از شرکت آگروس ارگانیکس آمریکا، AFB1, ACROS ORGANICS Company, (USA) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد. پس از گذشت زمان ذکرشده، آفلاتوکسین موجود در محیط استخراج و مقدار آن تعیین شد.

استخراج و ردیابی آفلاتوکسین

برای استخراج آفلاتوکسین B1 از میسلیوم، وزن مشخصی از میسلیوم به کمک ازت مایع منجمد و در هاون پودر شد. محتوای آفلاتوکسین پودر حاصل در حضور کلروفرم با استفاده از قیف دکانتور ۳ مرتبه استخراج شد. استخراج آفلاتوکسین‌های موجود در محیط کشت مایع نیز ۳ مرتبه و طبق روش Teniola *et al.* (2005) با استفاده از حلال کلروفورم انجام شد. سپس، کلروفورم در دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس با استفاده از گاز نیتروژن یا حمام آبی تبخیر شد. نمونه-های حاصل حداکثر به مدت ۲ هفته تا انجام آنالیز کروماتوگرافی در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس درون یخچال نگه‌داری شدند.

برای انجام کروماتوگرافی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی لایهٔ نازک با کارایی بالا[1] (HPTLC) استفاده شد. ابتدا، هر نمونه در ۱ میلی‌لیتر کلروفورم به کمک دستگاه تولیدکنندهٔ امواج ماورای صوت، پاور سونیک[2]، کاملاً حل شد. سپس، نمونه‌ها روی صفحهٔ سلیکاژلی TLC Silica gel 60 (F254, Merck, Darmstadt, Germany) به فاصلهٔ مناسب لکه‌گذاری شدند. سپس، صفحات لکه‌گذاری‌شده در حلال کلروفورم ـ استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار داده شدند و عمل جداکردن آفلاتوکسین انجام شد. پس از جداکردن، صفحات مذکور درون قسمت آنالیز دستگاه HPTLC قرار گرفتند و با استفاده از نرم‌افزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evalution Software V. 1.01) به‌صورت کمی و کیفی در طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. برای تجزیه داده‌ها از ۲ نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز استفاده شد. در ابتدا، نرمال‌بودن داده‌ها با نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد. برای تجزیه واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیهٔ واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱ درصد یا ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بررسی قدرت رقابتی ساپروفیتی جدایه‌های تریکودرما با *A. flavus* R5

نتایج توانایی آنتاگونیستی ۸ جدایه از قارچ تریکودرمای جداشده از پوستهٔ خارجی پسته و ۱۵ استرین دریافت‌شده از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران در مقابل *A. flavus* R5 به روش کشت متقابل در تشتک پتری نشان داد که ۱۳ جدایه از ۲۳ جدایه مورد بررسی، بازدارندگی بیش از ۵۰ درصد را سبب شدند که برای آزمایش‌های بعدی استفاده شدند (داده‌ها نشان داده نشده است). این بازدارندگی از رشد می‌تواند بر اثر تولید آنزیم‌های خارج سلولی و همچنین، بر اثر پدیدهٔ مایکوپارازیتیسم باشد. مایکوپارازیتیسم، یکی از مکانیزم‌های اصلی بیوکنترلی قارچ تریکودرما است و این فرآیند شامل چندین مرحله است که به ترتیب عبارتند از تشخیص میزبان، رشد به طرف هیف‌های آن، تماس، پیچش، نفوذ و سرانجام لیزکردن و مرگ قارچ هدف است (Woo et al. 2006).

تأثیر متابولیت‌های فرّار و غیرفرّار جدایه‌های تریکودرمای برتر روی رشد میسلیومی *A. flavus* R5

مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که همهٔ جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری با شاهد دارند به طوری که، بالاترین درصد کاهش رشد میسلیومی آسپرژیلوس مربوط به جدایهٔ T3 با ۶۸٫۸۸ درصد کاهش بود و پس از آن جدایه‌های T1، T4 و T17 به ترتیب با ۶۰/۶۶ درصد، ۶۳/۳۳ درصد و ۵۹ درصد بازدارندگی، بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیومی *A. flavus* R5 را نشان دادند (جدول ۱).

از نظر تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *A. flavus* در سطح ۱ درصد بین تمام جدایه‌ها در هر ۳ غلظت تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. به‌طور کلی با افزایش غلظت از ۱۰ به ۲۵ و ۵۰ درصد، قدرت بازداری عصارهٔ

1. High performance tin layer chromatography
2. Power sonic

برون سلولی جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت جامد افزایش یافت و تأثیر غلظت ۵۰ درصد بیش از سـایر غلظت‌هـا است (داده‌ها نشان داده نشده است). غلظت ۵۰ درصد از عصارهٔ خارج سلولی جدایه‌های T1، T3، T4 و T17 به ترتیب با ۵۱ درصد، ۸۲ درصد، ۷۵ درصد و ۵۹ درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی *A. flavus* R5، بیشترین تأثیر را داشتند.

جدول ۱. تأثیر ترکیبات فرّار و غیرفرّار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیومی *A. flavus* R5

جدایه‌های تریکودرما	درصد بازدارندگی	
	ترکیبات فرار	غلظت ۵۰ درصد عصاره خارج سلولی
T1	**۶۰/۶۶ c*	**۵۰ cd*
T2	۳۵/۱۸ d	۴۶ cde
T3	۶۸/۸۸ a	۸۲ a
T4	۶۳/۳۳ b	۷۵ ab
T5	۲۷/۷۷ f	۴۱ cdefg
T6	۳۲/۲۲ e	۴۳ cdefg
T8	۳۲/۴۴ de	۴۳/۳۳ cdefg
T9	۳۶ d	۴۶ cdef
T12	۳۳/۳۳ e	۴۵ cdef
T13	۲۲/۲۲ g	۲۰ mnopq
T17	۵۹ c	۵۸ cd
T20	۳۵ de	۳۲/۲۲ ghijklm
T21	۳۳/۳۳ ef	۴۱ defgh
شاهد	۰ h	۰ r

* حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p\leq$ است.

** اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

یکی از مکانیزم‌های قارچ تریکودرما در برابر بیمارگرها، آنتی‌بیوز است که با تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی فرّار و غیرفرّار خارج سلولی از فعالیت قارچ دیگر بازدارندگی می‌شود. مهم‌ترین ترکیب شناخته‌شده در پدیدهٔ آنتی‌بیوز، آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (Ghisalberti *et al*. 1991).

قارچ تریکودرما مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کند که این متابولیت‌ها شامل ترکیبات طبیعی مختلف است که دارای فعالیت‌های محافظتی علیه بیمارگرهای گیاهی است (Demain and Fang 2000). قبلا، Aguero *et al*. (2008) تأثیر متابولیت‌های فرّار تریکودرما در کاهش رشد *A. flavus* روی دانه‌های ذرت را گزارش کرده بود. Claydon *et al*. (1987) بیان کردند که آلکیل پیرون‌ها می‌توانند به‌عنوان مواد فرّار در مکانیسم آنتاگونیسم بعضی از جدایه‌های تریکودرما نقش داشته باشند. تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار تریکودرما را نیز Calistru *et al*. (1997) گزارش کرده است.

تأثیر عصارI خارج سلولی جدایه‌های برتر تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین مغز پسته

توانایی آنتاگونیستی ۴ جدایه برتر تریکودرما در کاهش میزان آفلاتوکسین تولیدشده با *A. flavus* R5 روی مغز پسته مطالعه شد. براساس مقایسهٔ میانگین داده‌ها در سطح ۱ درصد جدایه‌ها نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌داری بودند و هر ۴ جدایهٔ تریکودرما توانایی کاهش آفلاتوکسین را داشتند. جدایهٔ T3 نسبت به سایر جدایه‌ها، با ۸۴/۴۰ درصد کاهش آفلاتوکسین مؤثرترین بود (جدول ۲). علاوه بر این غوطه‌ورکردن پسته‌ها در عصارهای خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در کاهش جمعیت قارچ *A. flavus* (تعداد اسپور در گرم مغز پسته)

نقش معنی‌داری نشان داد. بیشترین کاهش جمعیت مربوط به جدایهٔ T3 است که میزان اسپور تولیدی قارچ روی پسته ۸۰/۴۸ درصد کاهش پیدا کرد (جدول ۲).

جدول ۲. تأثیر جدایه‌های تریکودرما در کاهش رشد قارچ و میزان آفلاتوکسین *A. flavus* R5 بر مغز پسته

تیمارها	میانگین میزان تولید آفلاتوکسین (ppb)	تعداد اسپور قارچ در گرم مغز پسته
T1	۶۱۰/۳۲	**۵/۴ × ۱۰۶ c*
T3	۲۶۵/۲۹	۲/۱ × ۱۰۶ e
T4	۳۷۶/۰۳	۳/۷ × ۱۰۶ d
T17	۸۲۵/۷۵	۶/۵ × ۱۰۶ b
شاهد پسته+*A. flavus*	۱۷۰۰/۶۳	۱۲/۳ × ۱۰۶ a
شاهد پسته سالم	۰	۰ e

* حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.

** اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

Reddey *et al.* (2009) بیان کردند که از میان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده *T. viride* باعث ۶۵ درصد کاهش رشد *A. flavus* و ۳۹ درصد کاهش در تولید آفلاتوکسین B1 در دانه‌های سورگوم می‌شود. همچنین، *T. virens* روی دانه‌های برنج کاهش ۸۰ درصد از رشد *A. flavus* و ۷۲/۲ درصد از تولید آفلاتوکسین B1 را سبب می‌شود (Reddy et al. 2009, Reddy et al. 2010).

Choudhary در سال ۱۹۹۲ بیان کرد که *T. viride* باعث ۷۳/۳ درصد کاهش در تولید آفلاتوکسین B1 و ۱۰۰ درصد کاهش در تولید آفلاتوکسین G1 در دانه‌های ذرت آلوده می‌شود.

همچنین، مطالعه‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که تریکودرما با تولید آنزیم‌های سلولیتیک، پکتینولیتیک، پروتئولیتیک و آمیلولیتیک باعث تغییر در مورفولوژی هیف‌های آسپرژیلوس می‌شود (Calisstru *et al.* 1997).

تأثیر عصارهٔ خارج سلولی تریکودرما در جلوگیری از رشد *A. flavus* R5 و کاهش آفلاتوکسین در محیط کشت مایع

مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان می‌دهد که هر ۴ جدایهٔ تریکودرما هم از نظر وزن خشک میسلیومی و هم از نظر میزان آفلاتوکسین تولیدشده در محیط کشت مایع نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد دارند. عصارهٔ خارج سلولی جدایهٔ T3 با قدرت بازداری ۷۹ درصد از رشد میسلیومی قارچ، بیشترین تأثیر را نشان داد. به‌طور کلی با به‌کاربردن عصارهٔ برون سلولی جدایه‌های تریکودرما میزان آفلاتوکسین کاهش یافت. جدایهٔ T3 با ۸۹/۷۶ درصد کاهش آفلاتوکسین، کارآمدترین جدایه بود و جدایهٔ T4 با ۸۶/۲۵ درصد کنترل، در مرتبهٔ بعدی قرار گرفت (جدول ۳).

این مقدار کاهش در میزان آفلاتوکسین درون سلولی ممکن است بر اثر تولید ترکیباتی باشد که در الگوی بیان ژن‌های درگیر در سنتز آفلاتوکسین دخالت داشته‌اند و اختلال ایجاد کنند.

طبق تحقیقات Reddey *et al.* (2010) ترشحات مایع خارج سلولی *T. virens* به‌طور مؤثری از رشد قارچ *A. flavus* (۸۰ درصد) و تولید آفلاتوکسین B1(۷۲/۲ درصد) جلوگیری کرد. گزارش شده است که تولید آفلاتوکسین با عواملی مانند قارچ‌های جنس *Trichoderma*، باکتری‌های لاکتیک اسید و *Bacillus subtilis* ممانعت می‌شود که این ممانعت ممکن است بر اثر فاکتورهای مختلفی مانند رقابت برای مکان و مواد غذایی و تولید متابولیت‌های ضدآفلاتوکسین باشد (Reddey *et al.* 2009).

جدول ۳. تأثیر جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد استرین *A. flavus* R5 در محیط کشت مایع

تیمارها	میانگین وزن خشک توده میسلیومی تولیدشده (میلی گرم)	میانگین میزان تولید آفلاتوکسین (ppb)
T1	۷۱/۸۵ d* **	۱۷۴/۴۱
T3	۶۹/۶۰ d	۷۵/۸۷
T4	۷۷/۸۵ c	۱۳۸/۷۳
T17	۹۲/۰۰ b	۳۸۰/۰۲
شاهد	۱۲۰/۰۰ a	۱۷۹۱/۴۵

* حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.

** اعداد میانگین سه تکرار هستند.

تأثیر عصارهٔ خارج سلولی تریکودرما در کاهش میزان AFB1 موجود در محیط

براساس نتایج به‌دست‌آمده و مقایسهٔ میانگین‌ها، همه تیمارها با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد هستند. از بین تیمارها، جدایهٔ T3 فعالیت پاک‌سازی بسیار قوی از خود نشان داد به طوری که، ۸۸/۰۳ درصد آفلاتوکسین اولیهٔ موجود در محیط کشت را پس از ۷۲ ساعت پاک‌سازی کرد و جدایهٔ T17 با ۵۵/۲۲ درصد کاهش آفلاتوکسین، کمترین توانایی را در حذف آفلاتوکسین موجود در محیط نشان داد (جدول ۴).

جدول ۴. تأثیر عصارهٔ خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در کاهش میزان AFB1 موجود در محیط

تیمارها	میانگین میزان تولید آفلاتوکسین (ppb)	درصد کاهش آفلاتوکسین
T1	۱۴۷/۲۵	۶۷/۷۸ c* **
T3	۵۴/۸۳	۸۸/۰۳ a
T4	۹۲/۸۶	۷۹/۷۳ b
T17	۲۰۵/۱۹	۵۵/۲۲ d
شاهد	۴۵۸/۳۳	۰ e

* حروف غیرمتشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد $p \leq$ است.

** اعداد میانگین ۳ تکرار هستند.

مکانیسم‌های کاهش و غیرفعال‌کردن زیستی توکسین‌ها که تاکنون شناخته شده است شامل تجزیه، هضم و جذب سطحی است (Laciakova *et al*. 2008). طبق تحقیقات Reddey *et al*. (2010) گونه‌های تریکودرما در تجزیهٔ آفلاتوکسین B1 نقش دارند. در این تحقیق پاک‌سازی زیستی آفلاتوکسین در هر ۴ جدایه مشاهده می‌شود، اما میزان کارایی این مکانیسم در هر ۴ جدایه یکسان نیست. جدایهٔ T3 فعالیت پاک‌سازی بسیار قوی از خود نشان داد در حالی که، جدایهٔ T17 کمترین توانایی را در حذف آفلاتوکسین موجود در محیط نشان داد. با این اوصاف به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های اصلی در کاهش آفلاتوکسین با جدایهٔ T3، مکانیسم پاک‌سازی زیستی آفلاتوکسین و تجزیهٔ آفلاتوکسین است. در این تحقیق معلوم شد عصارهٔ برون سلولی جدایهٔ T3 باعث پاک‌سازی چشمگیر آفلاتوکسین می‌شود که نشان از فعالیت آنزیمی عصارهٔ برون سلولی قارچ تریکودرما در پاک‌سازی و تخریب آفلاتوکسین است. براساس بررسی‌های انجام‌شده، ترشحات برون سلولی برخی از گونه‌های تریکودرما در تجزیهٔ آفلاتوکسین B1 مؤثر هستند و آنزیم‌های پراکسیداز در عمل سم‌زدایی آفلاتوکسین دخالت دارند. کومارین اساس ساختار مولکولی تمام آفلاتوکسین‌هاست؛ بنابراین، مشخص شده است میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند از کومارین به‌عنوان منبع کربن استفاده کنند می‌توانند آفلاتوکسین‌ها را استفاده و آن‌ها را نیز تجزیه کنند. فزون بر این، حلقه‌های لاکتون و فورانون نیز از ساختار آفلاتوکسین B1 هستند، لذا، میکروارگانیسم‌های تولیدکننده لاکتونازها و تجزیه‌کننده فورانون، می‌توانند آفلاتوکسین B1 را نیز تجزیه کنند (Reddey *et al*. 2010).

نتیجه‌گیری

دستاوردی که از این پژوهش می‌توان به آن اشاره کرد دست‌یافتن به جدایه‌هایی از تریکودرما است که نقش مؤثری در کاهش رشد قارچ و میـزان آفلاتوکسین دارند. پتانسیل خوبی که این جدایه‌ها در کنترل بیولوژیکی قارچ A. flavus و مقدار آفلاتوکسین نشان دادند امکان کاربرد تجاری آن‌ها را برای کاهش میزان آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین و تأمین امنیت غذایی فراهم می‌کند. از طرفی پاک‌سازی زیستی و تجزیهٔ آفلاتوکسین با جدایهٔ T3 کاندیدی توانمند را معرفی می‌کند. جدایه T3 به‌طور مؤثری از رشد قـارچ A. flavus ممانعت کرد و احتمالاً پتانسیل لازم برای کاهش زادمایه اولیه قارچ در اندام‌های گیاهی و خاک مزارع و باغات را دارد و در پیشگیری آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین به‌ویژه در مرحلهٔ قبل از برداشت سودمند است.

همچنین، مکانیسم‌های عمل متعددی با میزان کارآیی‌های مختلف، در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین آن مؤثر است؛ شناخت مکانیسم‌های عمل این جدایه‌های انتخاب‌شده در کاهـش آفلاتوکسیـن می‌تواند نقش مهمی در طراحی استراتژی کنترل آفلاتوکسین براساس کاربرد منفرد یا مخلوط استرین‌ها و یا کاربرد متابولیت‌های خالص‌شدهٔ آن‌ها در مراحل مختلف باغ، انبار و حمل و نقل داشته باشد و امکان طراحی آسان، کارآمد و مقرون به صرفه، سم‌زدایی آفلاتوکسین موجود در محیط‌های مختلف را نیز فراهم می‌سازد. در نهایت، دستیابی به ترکیبات ضدّ قارچی مؤثر در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین می‌تواند مرحلهٔ مقدماتی برای سنتز و ساخت سموم ارگانیک و طبیعی باشد. همچنین، باید به این نکته نیز توجه داشت که سلول‌های قارچـی از نظر داشتـن اندامک‌های مشابه و غشای فسفولیپیدی شباهت زیادی به سلول پستانداران دارند، جز اینکه قارچ‌ها به جای کلسترول حاوی ارگسترول هستند؛ بنابراین، یک وظیفه بسیار مشکلی به‌وجود می‌آید که جدایه‌هایی غربال شوند و یا ترکیباتی از آن‌ها استخراج و مصرف شوند که برای قارچ‌ها سمّی باشند، اما برای سلول‌های پستانداران غیر سمّی باشند. بنابراین، باید به تحقیق روی این جدایه‌ها و توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات سمّی نیز توجه کرد.

REFERENCES

Aguero LEM, Alvarado R, Martinez A, Dorta B (2008) Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* RIFAL. Interciencia. marzo. Anol. Caracas. 33: 219-222.

Alberts JF, Gelderblomc WCA, Botha A, Van Z yl WH (2009) Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. Int. J. Food Microbiol. 135: 47-52.

Alberts JF, Engelbrecht Y, Steyn PS, Holzapfel WH, Van Z yl WH (2006) Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. Int. J. Food Microbiol. 109: 121-126.

Berg G, Balin G (1995) Bacterial antagonists to *Verticillium dahlia*. J. Phytopathol. 141: 99-110.

Calistru C, McLea n M, Berjak P (1997) In vitro studies in the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. Mycopathol. 137: 115-124.

Chet I, Inbar J (1994) Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochemistry and Biotechnol. 48: 37-43.

Choudary KA, Redday KRN, Redday MS (2007) Antifungal activity and generic variability of *Trichoderma harzianum* isolates. J. Mycol. Plant Pathol. 37(2): 295-300.

Choudary KA (1992) Influence of microbial co-inhibitants on aflatoxin synthesis of *Aspergillus flavus* on maize kernels. Lett. Appl. Microbiol. 14: 143-147.

Claydon N, Allan M, Hanson IR, Avont AG (1987) Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. 88: 503-513.

Demain AL, Fan g A (2000) The natural functions of secondary metabolites. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnol. 69: 1-39.

El-Katatny MH, Gudelj M, R obra KH (2001) Characterization of chitinase and endo glucanases from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 137-143.

Fiddaman PJ, Rossal S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J. Appl. Bacteriol. 74:119-126.

Gheorghe A, Jeca L, Rosu A, Popea F, Voicu A, Nita A (2008) Antagonism of *Trichoderma* sp. vs phytopatogen microorganisms. Proceedings of the International Conference BIOATLAS Transilvania University of Brasov, Romania.

Ghisalberti EL, Sivasithamparam K (1991) Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. & Biochemistry. 23: 1011-1020.

Ghisalberti EL, Narbey MJ, Dewan MM, Sivasithamparam K (1990) Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. Plant and Soil. 121: 287-291.

Harman GE (2000) Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Diseases. 84: 377-393.

Harman GE (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phythopathol. 96(2): 190-194.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species-opportunistic avirulant plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.

Harman GE, Kubicek CP (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London. 278 pages.

Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Diseases. 87: 4-10.

Howell CR (2006) Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathol. 96: 178-180.

Howell CR, Puckhaber LS (2005) A study of the characterisitics of ‘‘P,, and ‘‘Q,, strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy cotton seeding diseases. Biological Control. 33: 217-222.

Howell CR, Hanson EL, Stipanovic RD, Puckhaber LS (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathol. 90: 248-252.

Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CK, Lorito M (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83: 11-23.

Mann R, Rehm HJ (1976) Degradation products from aflatoxin by Corynebacterium rubrum, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Mucor ambrigus*. E. J. Appl. Microbiol. 2: 297-306.

Rama Bhadra Raju M, Krishna Murthy KVM (2000) Effect of *Trichoderma* spp. in the management of collar rot of groundnut caused by *Aspergillus niger* Van Teighem. Indian J. Plant Prot. 28: 197-199.

Reddey KRN, Raghavender CR, Reddy BN, salleh B (2010) Biological Control of *Aspergillus flavus* growth and subsequent aflatoxin B1production in sorghum grains. Africa. J. biotechnol. 9 (27): 4247-4250.

Reddey KRN, Reddy CS, Muralidharan K (2009) Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. Africa. J. biotechnol. 8 (14): 3303-3308.

Reddey SV, Reddy BN, Waliyar F (2008) Properties of aflatoxin and it producing fungi. Focusion from: www. Aflatoxin. Info/aflatoxin. Asp.

Teniola OD, Addo PA, Brost IM, Farber P, Jany KD, Alberts JF, Van Zyl WH, Steyn PS, Holzapfel WH (2005) Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM 44556(T). Int. J. Food Microbiol. 105: 111-117.

Woo SL, Donzelli B, Scala F, Mach R, Harman GE, Kubicek CP, Del Sorbo G, Lorito M (1999) Disruption of the ech42 gene effect biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. Molecular Plant-Microbe Interaction. 12: 419-429.

Woo SL, Formisano F, Fogliano V, Cosenza C, Mauro A, Turra D, Soriente I, Ferraioli S, Scala F, Lorito M (2004) Factors that contribute to the mycoparasitism stimulus in *Trichoderma atroviride* P1. J. Zhejiang University Science. 30: 421.

Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M (2006) The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., Phytopathol. 96: 181-185.