

بررسی پاسخ‌های دفاعی گیاهچه پنبه به ایستورهای قارچ تریکودرما

فاطمه آزاددیسفانی^{۱*}، حمید روحانی^۲، ماهرخ فلاحتی رستگار^۲ و عصمت مهدیخانی مقدم^۴

^۱ استادیار پژوهش موسسه تحقیقات پنبه کشور (گرگان)

^۲ استاد و دانشیار دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۴

چکیده

بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های مهم پنبه در مناطق مختلف کشور می‌باشد که همه ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه‌کاری وارد می‌نماید. اخیراً، گونه‌های تریکودرما به عنوان یکی از روش‌های کنترل بیولوژیکی مرگ گیاهچه در نظر گرفته شده است. مهم‌ترین مکانیسم بیوکنترلی تریکودرما تحریک سیستم دفاعی گیاه است. در این بررسی ترشحات خارج سلولی دو جدایه متعلق به قارچ *Trichoderma virens* جدایه A224، به‌عنوان جدایه برتر و آنتاگونیست علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه و جدایه A442 به‌عنوان جدایه غیرموثر در بیوکنترل مورد آزمایش قرار گرفتند. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول عصاره ریشه‌چه پنبه به‌عنوان معیارهایی در بررسی خصوصیات تحریک‌کنندگی (الیستوری) ترشحات خارج سلولی با استفاده از روش‌های کالریمتری و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت برخی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی مواد القاءکننده مقاومت در ترشحات خارج سلولی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی‌های آزمایشگاهی مشخص گردید ترشحات خارج سلولی جدایه تریکودرما A224 موثر در بیوکنترل، در مقایسه با جدایه غیرموثر در بیوکنترل (جدایه تریکودرما A442) باعث القاء ترکیبات مرتبط با دفاع (فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول) در ریشه‌چه پنبه گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که ایستوره‌های موجود در این ترشحات مقاوم به حرارت، غیر قابل حل در کلروفرم و حساس به پروتئیناز k هستند. از آنجایی که این ایستورها به پروتئیناز k حساسیت نشان دادند می‌توان پی به ماهیت پروتئینی یا گلیکوپروتئینی این ترکیبات برد.

واژگان کلیدی: ایستور، پاسخ دفاعی، تریکودرما، مرگ گیاهچه پنبه.

مقدمه

بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های مهم پنبه در مناطق مختلف کشور می‌باشد که همه ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه‌کاری وارد می‌نماید (حمداله‌زاده، ۱۹۸۹). این بیماری دارای گسترش جهانی است که بوسیله مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زا، خصوصاً عوامل قارچی بوجود می‌آید. از بین عوامل بیمارگر قارچ‌های *Rhizoctonia solani* spp.، *Fusarium* spp. و *Pythium* spp. با اهمیت‌ترین قارچ‌ها در سبب شناسی مرگ گیاهچه به شمار می‌آیند (هیلدز، ۱۹۹۲؛ ملرو- وارا، ۱۹۹۰). استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست برای مبارزه با عوامل بیمارگر قارچی گیاهان یکی از روش‌های موثر جهت کاهش مصرف سموم و در نتیجه جلوگیری از آلودگی محیط زیست است. تریکودرما یک مدل استثنایی خوب برای مطالعه بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی می‌باشد و یکی از موفق‌ترین و پر مصرف‌ترین میکروارگانیسم‌ها است. از جمله مهم‌ترین مکانیسم بیوکنترلی تریکودرما تحریک سیستم دفاعی گیاه است که طی پروسه پیچیده‌ای منجر به نوعی مقاومت سیستمیک میزبان در مقابل عامل بیماری‌زا شود (وو و همکاران، ۲۰۰۶). تاکنون مکانیسم‌های دفاعی متعددی در گیاهان شناخته شده است. از جمله سنتز و ترشح مواد فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی^۱، سنتز گلیکو پروتئین غنی از اسید آمینه غیر معمول مانند هیدروکسی پرولین یا هیدروکسی گلیستین و غیره (هاول و همکاران، ۱۹۹۷؛ هامند-کوزاک و جونز، ۱۹۹۶). در بین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی می‌توان به پراکسیدازها (خانواده PR-9) اشاره کرد (فریک، ۱۹۷۶). پراکسیدازها اثر مستقیم در مقاومت داشته و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسید هیدروژن که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می‌شوند (یدیا و همکاران، ۱۹۹۹؛ لیو و اکراموداله، ۲۰۰۶؛ پنگ و کوک، ۱۹۹۲). تحقیقات ویدیهاسکارن نشان داده است که افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ‌های پنبه در طی واکنش ناسازگار به باکتری عامل بلایت *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* با کاهش تعداد باکتری‌ها و تجمع مواد قهوه‌ای رنگ در محل مایه کوبی شده همراه است. این تحقیقات همچنین نشان می‌دهد، اکسیداسیون ترکیبات فنلی از قبیل کاتچین به وسیله آنزیم پراکسیداز ممکن است فاکتور محدودکننده رشد بیمارگرهای باکتریایی در گیاهان پنبه مقاوم به سوختگی باکتریایی باشد (ویدیهاسکارن، ۲۰۰۲).

بطور کلی در گیاه پنبه ترکیبات ترپنوئیدی و آنزیم پراکسیداز مهم‌ترین ترکیبات در القاء مقاومت می‌باشند. ترکیبات ترپنوئیدی در پنبه نقش مهمی در مقاومت گیاهان در برابر آفات و بیماری‌ها دارد. تحقیقات متعدد در گیاه پنبه نشان داده است گونه‌های تریکودرما با کلونیزاسیون ریشه پنبه باعث القاء

1- Pathogenesis related proteins (PR-proteins)

ترکیبات ترپنوئیدی (گوسیپول^۱ و ایزومرهای آن) در گیاه می‌شود که بدنبال آن گیاه به بیماری‌ها مقاومت نشان می‌دهد. گوسیپول یک ترپنوئید آلدئیدی یا دی‌سکوئی‌ترین^۲ به رنگ زرد است که در غدد رنگی خانواده مالواسه بویژه جنس گوسیپیوم یافت می‌شود. غدد روی شاخ و برگ حاوی گروهی از ترکیبات ترین‌ها بوده که شامل دزکسی همی گوسیپول^۳، همی گوسیپول^۴، گوسیپول، همی گوسیپولون^۵ و هلیوسید^۶های H1, H2, H3 و H4 است. در بذر و ریشه‌ها نیز ترپنوئید پیش فعال وجود دارد. این ترکیبات باعث حفاظت گیاه در برابر رنج وسیعی از آفات گیاهی می‌گردد. برای مثال گوسیپول و هلیوسید در غدد شاخ و برگ گیاه پنبه را در برابر آفاتی از قبیل کرم قوزه محافظت می‌کند. هاول و همکاران در بررسی‌هایی نشان دادند که تیمار بذر پنبه با قارچ *Trichoderma virens* باعث القاء آنزیم پراکسیداز و ترکیبات ترپنوئیدی می‌شود. تولید دزکسی همی گوسیپول (dHG) و همی گوسیپول (HG) از پیشروی قارچ بیمارگر *R. solani* جلوگیری می‌کند (هاول و همکاران، ۲۰۰۰). علی‌رغم اینکه فیتوالکسین‌های ترپنوئیدی به‌طور کلی برای بیشتر قارچ‌ها سمی هستند (هاول و همکاران، ۲۰۰۰)، اما گونه‌های تریکودرما نسبت به توکسین‌های مختلف و ترکیبات زنبیوتیک شامل آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط دیگر میکروارگانیسم‌ها، ترکیبات ضد میکروبی گیاه و قارچکش‌های شیمیایی دارای مقاومت بالا می‌باشند (هارمن، ۲۰۰۰).

پونس معتقد است برای اندازه‌گیری مقدار گوسیپول استفاده از معرف ۳- آمینو- ۱- پروپانول بسیار دقیق و مناسب است (هرن، ۱۹۹۰). روش‌های اندازه‌گیری مقدار گوسیپول بر پایه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۴۵ نانومتر و با معرف آنیلین و انواع کروماتوگرافی استوار است (واتکینز و والروپ، ۱۹۹۴؛ هرن، ۱۹۹۰؛ من و همکاران، ۱۹۶۲). روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (تحت فشار)^۷ پیچیده‌ترین و در عین حال بهترین نوع کروماتوگرافی می‌باشد، مقادیر بسیار کم از ترکیب مورد نظر قابل اندازه‌گیری است (هرن، ۱۹۹۰).

تحریک سیستم دفاعی میزبان تحت تاثیر ترکیباتی است که بطور عمومی تحریک‌کننده یا الیسیتور^۸ نامیده می‌شوند. این ترکیبات نقش کلیدی در خصوص کارایی و قابلیت بیوکنترلی جدایه دارند. شناخت این الیسیتورها که در بعضی جدایه‌های تریکودرما ردیابی شده‌اند می‌تواند کمک زیادی

-
- 1- Gossypol
 - 2- Disequetherpen
 - 3- Desoxyhemigossypol (dhg)
 - 4- Hemi gossypol (hg)
 - 5- Hemi gossypoline (hgq)
 - 6- Heliocide
 - 7- High pressure liquid chromatography(HPLC)
 - 6- Elicitor

به شناخت مکانیسم دقیق و مولکولی تریکودرما در تحریک سیستم دفاعی میزبان بنماید. این مواد دارای ترکیب شیمیایی متنوعی هستند مانند پپتیدها و پلی‌پپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها، لیپیدها و الیگوساکاریدها. اولین الیستوری که شناسایی شد از گروه الیگوساکاریدها بود (نمادو، ۲۰۰۷). دژنویک و کرنلی پروتئین^۱ کوچک را به‌عنوان الیستوری از *T.virens* شناسایی و معرفی نمودند که در القاء بیان ژن‌های مرتبط با دفاع بصورت موضعی و سیستمیک در گیاه پنبه نقش دارد (دژنویک و کرنلی، ۲۰۰۵). تسینگ و همکاران پروتئین‌های ترشح شده از قارچ *T.harzianum* را در مدل شبیه‌سازی شده، از تداخل گیاه - تریکودرما- رایزوکتونیا بدست آوردند. این ترکیبات شامل آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز، زایلیناز، بتا-۱ و ۳ گلوکاناز، بتا-۱ و ۶ گلوکاناز، ماناز و پروتئاز بودند (تسینگ و همکاران، ۲۰۰۸). تروشینا و همکاران نیز در بررسی، نقش پروتئین‌های کوچک ترشح شده^۲ در تداخل تریکودرما و ریشه‌های گیاه ذرت در پدیده مایکوپارازیسیسم در ریزوسفر و خاک را نشان دادند. بیان ژن‌های SSP وابسته به سیگنال‌های ریشه گیاه در کشت توأم گیاه و تریکودرما بود (تروشینا و همکاران، ۲۰۱۰). هدف از این تحقیق بررسی ترکیبات القاء شده در عصاره گیاهچه پنبه تلقیح شده بوسیله جدایه‌های تریکودرما و بررسی خصوصیات الیستورهای مسئول برانگیختن سیستم دفاعی گیاه در ترشحات خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما بود و سطح آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول بعنوان معیارهایی در فعالیت تحریک‌کنندگی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه ترشحات مایع خارج سلولی قارچ تریکودرما: در این بررسی ترشحات مایع خارج سلولی جدایه A224، به‌عنوان جدایه برتر قارچ تریکودرما (جدا شده از خاک مزارع پنبه گرگان و حاصل از بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای قبلی نگارنده) و آنتاگونیست علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه و جدایه A442 به‌عنوان جدایه غیرموثر در بیوکنترل و هر دو متعلق به گونه *T. virense* مورد آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش طبق روش‌هاول و همکاران و با استفاده از محیط مایع حاوی سبوس گندم (۰.۵٪)، پیت موس (۰.۱٪) (وزن به وزن) با پی‌اچ ۵ (اسید کلریدریک) انجام شد. تیمار شاهد فاقد جدایه قارچی بود (هاول و همکاران، ۱۹۹۷). بعد از ۷ روز محتویات کشت با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و عصاره بدست آمده از صافی میکروبیولوژیک ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و تا هنگام استفاده در حرارت ۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. جهت استفاده طولانی مدت عصاره فریز درای گردید و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

1- Small protein(sm1)

2- Secreted small proteins(SSPs)

تأثیر ترشحات خارج سلولی دو جدایه تریکودرما (با خاصیت بیوکنترلی و بدون خاصیت بیوکنترلی) بر روی خاصیت تحریک‌کنندگی: جدایه A224، به‌عنوان جدایه برتر قارچ تریکودرما و A442 به‌عنوان جدایه غیر موثر در بیوکنترل جهت این بررسی انتخاب شدند. بذره‌های پنبه رقم دلتاپاین ۵۰ با روش هنسون وهاول ضدعفونی گردیدند. سپس بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب شده با آب مقطر سترون درون تشتک‌های پتری کشت گردید. تشتک‌های پتری داخل فویل آلومینیوم پیچیده شدند. این تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۵ روز، کاغذهای صافی با ۲ میلی‌لیتر از ترشحات خارج سلولی تریکودرما اشباع گردیدند. هر تشتک پتری حاوی ۱۲ عدد بذر پنبه بود. این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار انجام شد. تیمارها شامل بذره‌های پنبه تحت تیمار با ترشحات خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما A224 و A442، تیمار شاهد عصاره صاف شده محیط کشت بدون جدایه قارچی و تیمار آب مقطر بودند. هر تیمار آزمایش نیز شامل ۳ تکرار بود. پس از ۲ روز، ریشه‌چه‌ها با آب مقطر استریل شسته شدند و تا قبل از ارزیابی میزان آنزیم پراکسیداز و گوسیپول در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (هنسون وهاول، ۲۰۰۴).

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره ریشه گیاهچه پنبه

استخراج آنزیم پراکسیداز از ریشه‌چه پنبه: برای تهیه بافرهای مورد نیاز در مراحل مختلف تحقیق از روش استول و بلانچارد استفاده شد (استول و بلانچارد، ۱۹۹۰). ریشه‌های نمونه‌برداری شده، آب‌گیری سطحی شدند. مقدار ۰/۵ گرم از ریشه درهاون چینی سرد با استفاده از ازت مایع بصورت پودر نرمی ساییده شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (بی‌اچ برابر ۶) به آن اضافه و به خوبی یکنواخت گردید. عصاره حاصل به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتر منتقل و به‌مدت ۲۰ دقیقه در $15000 \times g$ به وسیله سانتریفوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و رونسست آن به عنوان عصاره پروتئینی جدا شد. عصاره حاصل در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (چن و همکاران، ۲۰۰۰).

ارزیابی فعالیت پراکسیداز عصاره ریشه‌چه پنبه: ارزیابی فعالیت پراکسیداز بر اساس اکسیداسیون گوایکول و تغییر رنگ محلول به رنگ نارنجی متمایل به قرمز به روش چنس و مالی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، برنامه کنیتیک و طول موج حداکثر ۴۷۰ نانومتر صورت گرفت. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت تغییر میزان جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین کل^۱ محاسبه گردید (اسمیت و دوربی، ۱۹۹۷).

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه‌چه پنبه

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه‌چه پنبه با استفاده از اسپکتروفتومتری: این سنجش به روش آ اء سی اس (۱۹۸۵a) و با محلول‌های ۲- پروپانول ۶۰٪ و هگزان و معرف ۳-آمینو ۱ پروپانول انجام شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۴۵ نانومتر، میزان گوسیپول آزاد نمونه‌ها بصورت میکروگرم بر گرم بافت ریشه محاسبه گردید (آ اء سی اس، ۱۹۸۵a).

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی ترکیبات تحریک‌کننده در ترشحات خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما

تأثیر دو فاز محلول در کلروفرم و محلول در آب بر خاصیت تحریک‌کنندگی ترشحات خارج سلولی: ترشحات خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما به نسبت حجمی ۵ به ۱ توسط کلروفرم سه مرتبه عصاره‌گیری شد و سپس دو فاز محلول در آب و محلول در کلروفرم به صورت جداگانه در دستگاه بخارکننده گردان^۱ مدل هیدولف ۴۰۰۰ به مدت ۱/۵ ساعت و نیم ساعت به ترتیب قرار گرفت. سپس ماده بدست آمده با آب مقطر استریل به حجم اولیه رسانده شد. این محلول‌ها به همراه ترشحات خارج سلولی که تیمارهای آزمایش بودند، جهت اثر تحریک‌کنندگی در ریشه‌چه پنبه مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارها شامل ۳ تکرار برای ارزیابی میزان آنزیم پراکسیداز و ۲ تکرار برای ارزیابی گوسیپول بودند (هنسون و هاول، ۲۰۰۴).

اثر دما بر خاصیت تحریک‌کنندگی ترشحات خارج سلولی: ۵ میلی‌لیتر ترشحات خارج سلولی داخل لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری قرار گرفت. سپس این لوله‌ها در حمام آب گرم (دستگاه بن ماری) ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. این آزمایش با دو تیمار حرارتی انجام شد. دو تیمار شامل: مواد حرارت داده شده و حرارت ندیده، بودند. این مواد جهت فعالیت تحریک‌کنندگی ریشه‌چه پنبه به تولید آنزیم پراکسیداز و گوسیپول مانند بندهای قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارها شامل ۳ تکرار برای ارزیابی میزان آنزیم پراکسیداز و ۲ تکرار برای ارزیابی گوسیپول بودند (هنسون و هاول، ۲۰۰۴).

اثر تریپسین^۳ و پروتئیناز^۴ K بر خاصیت تحریک‌کنندگی: در این آزمون از آنزیم پروتئیناز k و تریپسین استفاده شد. این بررسی به صورت دو آزمایش جداگانه صورت گرفت:

-
- 1- Rotary evaporator
 - 2- Heidolf 4000
 - 3- Trypsin
 - 4- Proteinase K

آزمایش اول: ۵ واحد از آنزیم پروتئیناز k و تریپسین با یک میلی لیتر از ترشحات خارج سلولی مخلوط گردید و به ترتیب در ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۲ ساعت بر روی دستگاه شیکر با دور rpm ۱۰۰ قرار گرفت. سپس مواد حاصل از نظر تحریک در تولید گوسیپول و آنزیم پراکسیداز در ریشه چه گیاه پنبه مانند بندهای قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت (هنسون و هاول، ۲۰۰۴).

آزمایش دوم: ۵ واحد از آنزیم پروتئیناز k و تریپسین در یک میلی لیتر آب مقطر استریل سوسپانسه شد و سپس این مواد از نظر تحریک در تولید گوسیپول و آنزیم پراکسیداز در ریشه چه گیاه پنبه مانند بندهای قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت (هنسون و هاول، ۲۰۰۴). تیمارها شامل ۳ تکرار برای ارزیابی میزان آنزیم پراکسیداز و ۲ تکرار برای ارزیابی گوسیپول بودند. تجزیه و تحلیل در این تحقیق با استفاده از نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین ها به روش دانکن (سطح احتمال یک و پنج درصد) انجام شد.

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه چه پنبه با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: در این تحقیق جهت تأیید نتایج بررسی گوسیپول آزاد در عصاره ریشه چه به روش طیف سنجی از روش هرن و تریپلت و همکاران جهت سنجش میزان گوسیپول با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد (هرن، ۱۹۸۷؛ تریپلت و همکاران، ۲۰۰۸). یک نمونه تحت تیمار (تیمار تریپسین و ترشحات خارج سلولی) از آزمایش اسپکترومتری انتخاب شد. دستگاه ساخت شرکت شیمادزو ژاپن و مجهز به ستون جداسازی اکتا دسیل سیلان و دتکتور ناحیه ماوراء بنفش بود. اندازه ستون $150 \times 6/4$ میلی متر بود. بافرها و معرف های مورد استفاده به شرح زیر تهیه شد.

فاز متحرک و معرف کمپلکس دهنده (مشتق ساز) به این صورت تهیه شدند: فاز متحرک: شامل متانول (۸۷ میلی لیتر)، آب مقطر دو بار تقطیر (۱۳ میلی لیتر) و اسید ارتو فسفریک (۰/۱ میلی لیتر). معرف کمپلکس دهنده: شامل ۳ آمینو-۱-پروپانول (۴ میلی لیتر) و اسیداستیک گلاسیال (۲۰ میلی لیتر) و N و N دی متیل فرمامید (تا حجم ۲۰۰ میلی لیتر). محلول آبی استون ۷۰ درصد: شامل استون (۷۰ میلی لیتر) و آب مقطر دوبار تقطیر (۳۰ میلی لیتر).

عملیات استخراج گوسیپول آزاد از نمونه ریشه چه با محلول استون ۷۰ درصد آبی و در ۲ تکرار انجام شد. استاندارد اولیه گوسیپول با هدف، کالبره نمودن دستگاه اچ پی ال سی برای تزریق نمونه های استاندارد و مجهول و همچنین تهیه محلول های استاندارد برای رسم منحنی استاندارد بدین صورت تهیه گردید. ۱۰ میلی گرم از پودر استاندارد گوسیپول در ۱۰ میلی لیتر از معرف کمپلکس دهنده اضافه گردید. بدین ترتیب محلولی با غلظت یک میلی گرم در یک میلی لیتر بدست آمد. میکروگرم گوسیپول خالص بر حسب سطح زیر منحنی حاصله برای هر نمونه محاسبه گردید.

نتایج و بحث

تأثیر ترشحات خارج سلولی دو جدایه تریکودرما (با خاصیت بیوکنترلی و بدون خاصیت بیوکنترلی) بر روی خاصیت تحریک‌کنندگی: نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین تیمارها در فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول اختلاف معنی‌داری از نظر آماری ($P \leq 0/01$) و وجود دارد. نتایج نشان داد ترشحات خارج سلولی جدایه تریکودرما A224 موثر (شکل ۱ و ۲) در بیوکنترل بطور معنی‌داری در سطح یک درصد آنزیم پراکسیداز محلول در عصاره ریشه‌چه و در سطح پنج درصد القاء گوسیپول را در مقایسه با تیمار جدایه غیرموثر در بیوکنترل (A442) و دو تیمار شاهد (آب مقطر و سبوس خرد شده و پیت موس) را تحریک نمود. هرچند جدایه غیر موثر در بیو کنترل (A442) نیز باعث تحریک آنزیم پراکسیداز گردید اما این میزان با تیمارهای شاهد (آب مقطر و سبوس خرد شده و پیت موس) از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱).



شکل ۲- فیالید در جدایه
T.virense A224



شکل ۱- پرگنه جدایه *T.virense* A224
بر روی محیط پی دی آ

جدول ۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب نور/دقیقه/میلی گرم پروتئین) ریشه‌چه پنبه تیمار شده با ترشحات مایع خارج سلولی دو جدایه تریکودرما در شرایط آزمایشگاه. A442, A224: کد جدایه‌های تریکودرما، WBPM: سبوس خرد شده و پیت موس)

تیمار	فعالیت	آنزیم پراکسیداز	میزان	گوسیپول
آب مقطر	c	۵/۹۸	b	۱۶۰/۵
WBPM	b	۹/۳۴	b	۱۹۱
A 224	a	۱۱/۲۰	a	۳۴۵/۵
A 442	b	۸/۲۸	b	۱۹۰

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن ($P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

در این آزمایش مشخص گردید، جدایه مؤثر در بیوکنترل A224 باعث افزایش فعالیت آنزیم و ترپنوئید گوسیپول شده است و این نتایج حاکی از آن است ترشحات این جدایه دارای مواد تحریک کننده یا الیستور در ریشه چه می باشند که این مواد در ترشحات جدایه A442 وجود نداشت (شکل ۳). هنسون وهاول نیز نشان دادند ترشحات خارج سلولی جدایه مؤثر در بیوکنترل *T.virens* G6 (جدا شده از مزارع پنبه و مؤثر بر عامل مرگ گیاهچه پنبه (*R.solani*) نسبت به ترشحات خارج سلولی جدایه غیر مؤثر *T.virens* G6-4 اثرات تحریک کنندگی بیشتری در تولید آنزیم پراکسیداز و ترپنوئیدهای گوسیپول، همی گوسیپولیک، اسید لاکتون و همی گوسیپول بر روی ریشه چه پنبه داشت (هنسون و همکاران، ۲۰۰۴).



شکل ۳- مقایسه تغییر رنگ عصاره ریشه چه حاوی گوسیپول نسبت به شاهد.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی ترکیبات تحریک کننده ترشحات خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما

تأثیر دو فاز محلول در کلروفورم و محلول در آب بر خاصیت تحریک کنندگی ترشحات خارج سلولی: نتایج آماری نشان داد که بین تیمارها در القاء فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول و میزان گوسیپول از نظر فاز محلول در کلروفورم و محلول در آب اختلاف معنی داری در سطح یک درصد از نظر آماری وجود دارد ($P \leq 0.01$, $P \leq 0.05$). ترشحات خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما به تنهایی دارای بالاترین اثرات تحریک کنندگی بر فعالیت آنزیم و ترپنوئید گوسیپول را داشت و بعد از آن فاز محلول در آب دارای اثر تحریک کنندگی بهتری بود. این اختلافات از نظر آماری معنی دار بودند (جدول ۲). در این آزمایش نتایج نشان داد مواد تحریک کننده در ترشحات خارج سلولی قابلیت حل شونده کمی در کلروفورم داشتند. نتایج هنسون وهاول نیز نشان داد ترشحات خارج سلولی جدایه مؤثر در

بیوکنترل *T.virens* G6 قابل حل در کلروفورم اثر تحریک‌کنندگی در ریشه‌چه پنبه نداشت و به عبارتی این مواد محرکه در ترشحات خارج سلولی غیر قابل حل در کلروفورم بودند (هنسون و همکاران، ۲۰۰۴).

جدول ۲- بررسی خصوصیات تحریک‌کنندگی ترشحات مایع خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما در ریشه‌چه پنبه

تیمار	فعالیت	آنزیم پراکسیداز	میزان	گوسیپول
حلالیت				
CFS	a	۱۰/۲۲	a	۳۴۰
فاز حلال در آب	a	۸/۳۴	a	۳۰۹
فاز حلال در کلروفورم	b	۴/۳۷	b	۱۲۴
دما				
۲۸ (درجه سانتی‌گراد)	a	۱۱/۶۸	a	۲۶۴/۵
۸۰ (درجه سانتی‌گراد)	a	۱۱/۰۲	a	۲۴۳

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن ($P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند. CFS: ترشحات خارج سلولی

اثر دما بر خاصیت تحریک‌کنندگی ترشحات خارج سلولی: نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین دو تیمار دمایی (۲۸ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول وجود نداشت ($P \leq 0/01$). نتایج نشان داد نگهداری جدایه A224 تریکودرما در دمای ۸۰ سانتی‌گراد تاثیری بر روی فعالیت تحریک‌کنندگی آن و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز در عصاره ریشه‌چه نداشت (جدول ۲). این نتیجه موافق نتیجه هنسون و هاول بود (هنسون و همکاران، ۲۰۰۴). الیستور بدست آمده در تحقیقات این دانشمندان نیز مقاوم به حرارت بود.

اثر تریپسین و پروتئیناز K

اثر تریپسین و پروتئیناز K بر خاصیت تحریک‌کنندگی ترشحات خارج سلولی: نتایج نشان داد، بین تیمارهای آزمایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول عصاره ریشه‌چه پنبه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0/05$) وجود دارد. در این آزمون مشخص گردید هر دو تیمار ترشحات خارج سلولی با تریپسین و پروتئیناز K بر روی فعالیت تحریک‌کنندگی ترشحات خارج سلولی اثر داشته است و باعث کم شدن میزان آنزیم پراکسیداز و گوسیپول شده است (جدول ۳). به عبارتی مواد الیستوری یا محرکه ترشحات خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما به دو ترکیب تریپسین و پروتئیناز

K حساسیت نشان داد. حساسیت به پروتئیناز K می‌تواند نشان‌دهنده ماهیت پروتئینی یا گلیکوپروتئینی این مواد محرکه یا الیسیتور باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب نور/دقیقه/میلی گرم پروتئین) و میزان گوسیپول (میکروگرم بر گرم بافت ریشه) ریشه‌چه پنبه تحت تیمار آنزیمی ترشحات مایع خارج سلولی (CFS) جدایه A224 تریکودرما در شرایط آزمایشگاه

تیمار	فعالیت	آنزیم پراکسیداز	میزان	گوسیپول
CFS	a	۱۱/۰۶	a	۲۴۷/۵
+CFS تریپسین	b	۹/۹۴	b	۲۰۰/۵
+CFS پروتئیناز K	b	۹/۶۷	b	۲۱۱

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن ($P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

اثر تریپسین و پروتئیناز K بر خاصیت تحریک‌کنندگی ریشه‌چه: نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها در تحریک فعالیت آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول وجود دارد ($P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$). در تیمار ریشه‌چه با تریپسین مشخص گردید این ماده به تنهایی باعث تحریک ریشه به تولید آنزیم پراکسیداز و میزان گوسیپول گردید (جدول ۴). تیمار پروتئیناز K هر چند به نسبت تیمار شاهد (آب مقطر) کمی افزایش فعالیت آنزیم و افزایش میزان گوسیپول را داشت ولی این اختلاف در سطح یک درصد برای فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار نبود.

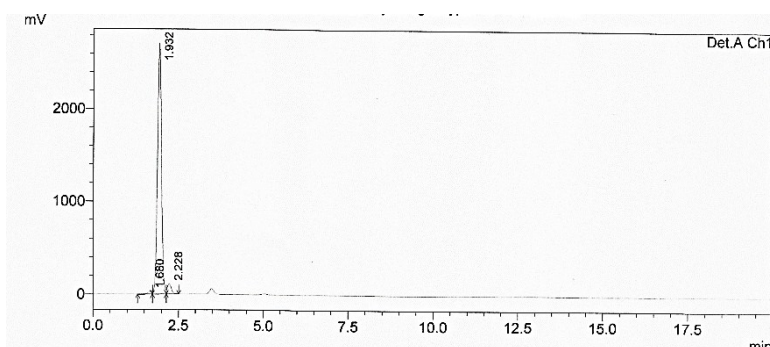
جدول ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب نور/دقیقه/میلی گرم پروتئین) و میزان گوسیپول (میکروگرم بر گرم بافت ریشه) ریشه‌چه پنبه تحت تیمار آنزیم در شرایط آزمایشگاه

تیمار	فعالیت	آنزیم پراکسیداز	میزان	گوسیپول
آب مقطر	b	۵/۹۴	c	۱۳۱/۵
تریپسین	a	۷/۷۷	a	۱۷۰/۵
پروتئیناز K	b	۶/۱	b	۱۵۱/۵

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، در آزمون دانکن ($P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه‌چه پنبه با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: نتایج ارزیابی میزان گوسیپول یک نمونه ریشه‌چه پنبه (تیمار تریپسین و ترشحات خارج سلولی) با

استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، سنجش میزان گوسیپول با استفاده از روش اسپکتروفتومتری را تأیید نمود (شکل ۴). این نمونه میزان ۲۰۶ میکروگرم برگرم بافت ریشه‌چه گوسیپول را در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که در روش اسپکتروفتومتری نیز این میزان ۲۰۰/۵ میکروگرم برگرم بافت ریشه بود. از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار (سنجش با اسپکتروفتومتر و اچ پی ال سی) وجود نداشت.



شکل ۴- کروماتوگرام حاصل از دستگاه اچ پی ال سی: نمونه ریشه‌چه

امروزه گلیکوپروتئین‌ها و گلیکوپپتیدهای زیادی با خاصیت تحریک‌کنندگی یا ایسیتوری در تعدادی از قارچ‌ها و امیست‌ها شناسایی و گزارش گردیده‌اند (هون، ۱۹۹۶). برخی از این مواد بخش‌هایی از دیواره سلولی قارچ‌ها می‌باشند (کوگل و همکاران، ۱۹۸۸) هرچند در این تحقیق نیز با توجه به حساسیت ترشحات خارج سلولی به پروتئیناز K و تریپسین می‌توان چنین استنباط کرد که این مواد نیز ماهیتی شبیه پروتئین دارند. برخی قارچ‌ها یا امیست‌های ایسیتورهای شناخته شده‌ای دارند از جمله ایسیتورهای بدست آمده از گونه‌های *Phytophthora spp.* که هولوپروتئین‌هایی با توده مولکولی ۱۰ کیلودالتون هستند (هیوت و همکاران، ۱۹۹۲؛ نسیپولوس و همکاران، ۱۹۹۲؛ پرنولت و همکاران، ۱۹۹۳). آنزیم سلولاز جداسازی از *T. viride* نیز به‌عنوان ایسیتور در تحقیقات معرفی شده است. کالدرون و همکاران نشان دادند *T. viride* با تولید آنزیم سلولاز، باعث پاسخ فوق حساسیت و تولید فیتوالکسین رسوراتول^۱ در سلول‌های انگور شده است (کالدرون و همکاران، ۱۹۹۳). آلماتسین گروه جدیدی از ایسیتورها می‌باشد. این ایسیتور یک پپتید مرکب از *T. viride* است که باعث القاء بیوسنتز ترکیبات فرار در لوبیا و آرابیدوپس گردیده است (چن و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه بر این ایسیتورهای شناخته شده، *T. viride* چندین پروتئین و پپتید (۶-۴۲ کیلو دالتون) تولید می‌کند که

منجر به تولید ترپنوئیدها و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه‌چه گیاه پنبه شده است (هنسون، ۲۰۰۰).

امروزه بررسی پدیده القاء مقاومت به کمک روش‌های ملکولی و بررسی ماهیت ژنتیکی مقاومت رواج پیدا کرده که در تلفیق با روش‌های مورد استفاده در این آزمایش، می‌تواند بر دقت و صحت نتایج بیفزاید. همچنین پژوهش‌های اخیر نشان داده که مسیرهای متعدد هدایت سیگنال بعد از تحریک گیاه بوسیله عوامل القاگر وجود دارد (ون لون و همکاران، ۱۹۸۸). بررسی دقیق و مولکولی این مسیرها می‌تواند در روشن شدن هرچه بیشتر مکانیزم‌های القاء مقاومت و در نتیجه بهینه‌سازی استفاده از این مکانیسم در کنترل بیماری‌های گیاهی، حائز اهمیت باشد. فعال کردن واکنش‌های دفاعی با استفاده از ایسیتورها می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی ارزشمند و یک گزینه مطلوب در استفاده از گیاهان تراریخته برای حفاظت گیاهان در مقابل عوامل بیمارگر نیز به کار گرفته شوند. تولیدات ناشی از بیان ژن‌های گیاهان تراریخته نیز تحریک‌کننده مقاومت گیاهی هستند که همگی منجر به ساختن فیتوالکسین‌ها، PR- پروتئین‌ها و ترکیبات دیگر می‌شوند و در نتیجه باعث افزایش مقاومت به چند عامل بیمارگر گیاهی از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شوند، همچنان مقاوم به شرایط مضر غیر زنده نیز می‌شوند (هارمن و همکاران، ۲۰۰۴). ابزار پایه پروتئومیکس و الکتروفورز دو بعدی با قدرت تفکیک بالا که تجزیه همزمان هزاران پروتئین را میسر می‌سازد می‌تواند به‌عنوان عاملی مهم در تشخیص پروتئین‌های گونه‌های تریکودرما که در استقرار بیوکنترل تأثیر دارند، مطرح باشد. تاکنون با استفاده از این تکنیک پروتئین‌های متعددی با ماهیت آنزیمی و غیر آنزیمی شناسایی و غربال گردیده‌اند. بسیاری از این پروتئین‌ها به‌عنوان ایسیتور یا ماده محرکه معرفی شده‌اند. امروزه اغلب آنزیم‌های ترشح شده توسط گونه‌های تریکودرما که بصورت پروتئین خالص درآمده‌اند و مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، فعالیت ضد قارچی وسیعی از خود نشان دادند. کارهای بنیادی طی سالیان اخیر انجام شده است و مشخص گردیده است که آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی حاصل از استرین‌های تریکودرما، پتانسیل بالقوه‌ای در کشاورزی به‌عنوان ترکیبات فعال در فرمولاسیون‌های قارچ‌کشی جدید دارند (مونت، ۲۰۰۱).

منابع

- A.O.C.S. 1985a. Determination of free gossypol. Official Method Ba 7-58. In: Official and Tentative Methods of Analysis, 3rd ed., Amer. Oil Chem. Soc., Chicago.
- Calderon, A.A., Zapata, J.M., Munoz, R., Pedreno, M.A. and Barclero, A.R. 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytologist*, 124(3): 455-463.

- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N., and Paulitz, T.C. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56:13-23.
- Djonovic, S. and Kenerly, C.M. 2005. Role of two secreted proteins from *Trichoderma virens* in mycoparasitism and induction of plant resistance. PhD teesis submitted to the office of graduated studies of Texas A & M University. 217 Pp.
- Fric, F. 1976. Oxidative enzymes. In: Heitefuss, R. & P.H. Williams (Eds), *Encyclopedia of plant physiology*, Vol. 4, Springer-verlag Berlin Heidelberg New York. Pp: 617-631.
- Hamdullahzadeh, A. 1989. Survey of cotton diseases in Gorgan, Final report designe, Agricultural research center of Golestan province. 42 Pp.
- Hammand-Kosack, E. and Jones, D.G.I.J. 1996. Resistance gene-dependent plant. *The Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perception derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disaeses*, 84: 377-393.
- Hohn, M.G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review Phytopathology*, 34:387-412.
- Hanson, L.E. and Howell C.R. 2004. Elicitors of plant responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 94:171-174.
- Hanson, L.E. 2000. Reductions of Verticillium wilt symptoms in cotton following seed treatment with *Trichoderma virens*. *Journal of Cotton Science*, 4: 224-231.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, virulent plant symbionts. *Nature Reviews*, 2: 43-56.
- Hillocks, R.J. 1992. *Cotton Diseases*. C.A. B International Wallingford. UF. 415pp.
- Howell, C.R., Devay, J.E. and Batson, W.E. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatment. *Journal of Cotton Science*, 1:15-20.
- Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. and Puckhaber, L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90: 284-252.
- Hron, R.J. 1990. Determination of free and total gossypol by HPLC. *Journal of Ammerican Oil Chemistry Society*, 67: 182-187.
- Hron, R.J. 1987. The potential commercial aspects of gossypol by HPLC. *Journal of Ammerican Oil Chemistry Society*, 64: 1315-1319.
- Huet, J.C., Nespoulous, C., and Pernollet, J.C. 1992. Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry*, 31:1471-1476.
- Kogel, G., Beissmann, B., Reisener, H.J., and Kogel, K.H. 1988. A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* cell walls elicits the hypersensitive lignification response in wheat. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 33:173-185.

- Liu, J. and Ekramoddoullah, A.K.M. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68:3–13.
- Mann, G.E., Carter, F.L., Frampton, V.L., Watts, A.B., and Johnston, C. 1962. Evaluation of cotton seed meals prepared by solvent extraction with acetone-hexane- water. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 39: 85-90.
- Melero-Vara, J.M. and Jimenez-Dias, R.M. 1990. Etiology, incidence and distribution of cotton seedling damping-off in southern Spain. *Plant Disease*, 74: 597-600.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International of Microbiology*, 4:1-4.
- Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacognosy Reviews*, 1: 69-79.
- Nespoulous, C., Huet, J.C., and Pernollet, J.C. 1992. Structure-function relationships of and elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta*, 186:551-557.
- Peng, M. and Kuc, J.A. 1992. Peroxidase- generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, 82: 696-699.
- Pernollet, J.C., Sallantin, M., Salle-Tourne, M., and Huet, J.C. 1993. Elicitor isoforms from seven *Phytophthora* species: Comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco. 2002. *Molecular biology of fungal development*. Marcel Dekker, New York. 607 pp.
- Smit, F. and Durbey, I.A. 1997. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry*, 44: 811-815.
- Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. Buffers: Principles and practice. Pp. 24-38 in M.P. Deutscher (Edi). *Methods in Enzymology*, Vol. 182: Guide to protein purification. Academic Press, San Diego.
- Triplett, B.A., Moss, S.C., Bland, J.M. and Dowd, M.K. 2008. Induction of hairy root cultures from *Gossypium barbadense* to produce gossypol and related compounds. *In Vitro Cell. Developmental Biology - Plant*, 44:508-517.
- Trushina, N., Mukherjee, P.K., Kenerley, C.M. and Horwitz, B.A. 2010. Expression of small secreted proteins in response to co-culture of *Trichoderma virens* with maize roots. Pp: 42. BARD Workshop. *Trichoderma* (Molecular mechanisms and applications of biocontrol in Agriculture). Technion, Haifa, Israel. October 12-15, 68 Pp.
- Tseng, S.C., Liu, S.Y., Yang, H.H., Lo, C.T., and Peng, K.C. 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* T323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 6914-6922.
- Van Loon, L.C., Bakker, C. and Pieters, C.M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of Phytopathology*, 36: 453-483.

- Vidhyasekaran, D. 2002. Bacterial disease resistance in plants. CRC Press. 492Pp.
- Watkins, S.E., and Waldroup, P.W. 1994. Reduction in dietary nutrient density level improves acceptance of cotton seed meal by broiler. *The Poultry Science*, 3:7-16.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., and Lorito, M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96: 181-185.
- Yedidia, I., Behamou, N., and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1061-1070.

Defense responses of cotton seedling to *Trichoderma* elicitors

F. Azad Disfani^{*1}, H. Rohani², M. Falahati Rastegar²
and E. Mahdikhani Moghaddam⁴

¹Assistant Prof. Cotton Research Institute of Iran (Gorgan)

^{2&3}Professor and Associate Prof. Ferdowsi University of Mashhad

Received: 2013/12/3

Accepted: 2014/5/4

Abstract

Seedling damping-off is a major disease of cotton in various areas of Iran that damages to cotton fields every year. Recently, *Trichoderma* spp. are considered as one of the biological agents for seedling damping-off control. Induction of plant defensive system is the most important mechanism to biocontrol of *Trichoderma* spp. In this study, extra-cellular fluids derived from culture filtrates of two isolates of *Trichoderma virens* as effective biocontrol on cotton seedling damping-off caused by *Rhizoctonia solani* isolate A224 and non-effective biocontrol isolate A442 were studied. The characteristics of elicitation activity were assayed by peroxidase and gossypol level of rootlet extracts and were evaluated by colorimetric methods and spectrophotometer. Biochemical and physical aspects of elicitor compounds of culture filtrates were measured too. The results showed that culture filtrates from effective biocontrol isolate A224 of *Trichoderma virens* was found to stimulate elicitor compounds (peroxidase and gossypol) in cotton radicle than non-effective biocontrol isolate A442 of *T.virens*. The results confirmed these elicitors were found to be heat stable, insoluble in chloroform and sensitive to treatment by proteinase K. The elicitors are most likely proteins or glycoproteins.

Keywords: Elicitor, Defense Response, *Trichoderma*, Cotton Seedling Damping-off.

*Corresponding author; f_azaddisfani@yahoo.com

