مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد دوم، شماره اول، ۱۳۹۳
۱-۱۷
www.jcri.ir

بررسی پاسخ‌های دفاعی گیاهچه پنبه به الیسیتورهای 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)
[۲و ۳] 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 virense* 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 (الیسیتوری) 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 الیسیتورهای موجود در این ترشحات مقاوم به حرارت، غیر قابل حل در کلروفرم و حساس به پروتئیناز k هستند. از آنجایی که این الیسیتورها به پروتئیناز k حساسیت نشان دادند می‌توان پی به ماهیت پروتئینی یا گلیکوپروتئینی این ترکیبات برد.

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

*نویسنده مسئول: f_azaddisfani@yahoo.com

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*، *Fusarium* spp.، *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 مکانیزم‌های دفاعی متعددی در گیاهان شناخته شده است. از جمله سنتز و ترشح مواد فنلی داخل و خارج سلول، سنتز فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی[1]، سنتزگلیکو 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 می توان به پراکسیدازها (خانواده PR-9) اشاره کرد (فریک، ۱۹۷۶). پراکسیدازها اثر مستقیم در مقاومت داشته و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسیدهیدروژن که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می‌شوند (یدیا و همکاران، ۱۹۹۹؛ لیو و اکرامودااله، ۲۰۰۶؛ پنگ و کوک، ۱۹۹۲). تحقیقات ویدهیاسکارن نشان داده است که افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ‌های پنبه در طی واکنش ناسازگار به باکتری عامل بلایت *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacerrm* 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 (ویدهیاسکارن، ۲۰۰۲).

بطورکلی 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[1] و ایزومرهای آن) در گیاه می‌شود که بدنبال آن گیاه به بیماری‌ها مقاومت نشان می‌دهد. گوسیپول یک ترپنوئید آلدئیدی یا دی‌سکوئی‌ترپن[2] به رنگ زرد است که در غدد رنگی خانواده مالواسه بویژه جنس گوسیپیوم یافت می‌شود. غدد روی شاخ و برگ حاوی گروهی از ترکیبات ترپن‌ها بوده که شامل دزکسی همی‌گوسیپول[3]، همی‌گوسیپول[4]، گوسیپول، همی گوسیپولون[5] و هلیوسید[6]های 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 *Thrichoderma virens* باعث القاء آنزیم پراکسیداز و ترکیبات ترپنوئیدی می‌شود. تولید دزکسی‌همی‌گوسیپول (dHG) و همی‌گوسیپول (HG) از پیشروی قارچ بیمارگر *R.solani* جلوگیری می‌کند (هاول و همکاران، ۲۰۰۰). علی‌رغم اینکه فیتوالکسین‌های ترپنوئیدی به‌طورکلی برای بیشتر قارچ‌ها سمی هستند (هاول و همکاران، ۲۰۰۰)، اما گونه‌های تریکودرما نسبت به توکسین‌های مختلف و ترکیبات زنوبیوتیک 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 اندازه گیری 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)[7] پیچیده‌ترین و در عین حال بهترین نوع کروماتوگرافی می‌باشد، مقادیر بسیار کم از ترکیب مورد نظر قابل اندازه گیری است (هرن،۱۹۹۰).

تحریک سیستم دفاعی میزبان تحت تاثیر ترکیباتی است که بطور عمومی تحریک‌کننده یا الیسیتور[8] نامیده می‌شوند. این ترکیبات نقش کلیدی در خصوص کارائی 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 الیسیتوری که شناسایی شد از گروه الیگوساکاریدها بود (نمادو، ۲۰۰۷). دژنویک و کرنلی پروتئین[1] کوچک را به‌عنوان الیسیتوری 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، زایلناز، 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[2] در تداخل تریکودرما و ریشه‌های گیاه ذرت در پدیده مایکوپارازیتیسم 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 الیسیتورهای 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 (۵٪)، پیت موس (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. بذرهای 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 بذرهای 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 (پی‌اچ برابر ۶) به آن اضافه و به خوبی یکنواخت گردید. عصاره حاصل به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتر منتقل و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰×g به وسیله سانتریفوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید و رونشست 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[1] محاسبه گردید (اسمیت و دوربی، ۱۹۹۷).

1- Total protein

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه‌چه پنبه

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه‌چه پنبه با استفاده از اسپکتروفتومتری: این سنجش به روش آ اف سی اس (a۱۹۸۵) 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 اف سی اس، a۱۹۸۵).

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 به‌صورت جداگانه در دستگاه بخارکننده گردان[1] مدل هیدولف ۴۰۰۰[2] به‌مدت ۱/۵ ساعت و نیم ساعت به‌ترتیب 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 وهاول، 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 به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. این آزمایش با دو تیمار حرارتی انجام شد. دو تیمارشامل: مواد حرارت داده شده و حرارت ندیده، بودند. این مواد جهت فعالیت تحریک کنندگی 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 وهاول، ۲۰۰۴).

اثر تریپسین[3] و پروتئیناز K[4] بر خاصیت تحریک کنندگی: 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 میلی‌لیتر از ترشحات خارج سلولی مخلوط گردید و به‌ترتیب در ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت 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 ریشه‌چه گیاه پنبه مانند بندهای قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت (هنسون وهاول، ۲۰۰۴).

آزمایش دوم: ۵ واحد از آنزیم پروتئیناز k و تریپسین در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسه شد و سپس این مواد از نظر تحریک در تولید گوسیپول و آنزیم پراکسیداز در ریشه‌چه گیاه پنبه مانند بندهای قبلی مورد ارزیابی قرار گرفت (هنسون وهاول، 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 نرم‌افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (سطح احتمال یک و پنج درصد) انجام شد.

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه‌چه پنبه با استفاده ازکروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: در این تحقیق جهت تائید نتایج بررسی گوسیپول آزاد در عصاره ریشه‌چه به روش طیف سنجی از روش هرن و تریپلت و همکاران جهت سنجش میزان گوسیپول با استفاده ازکروماتوگرافی 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 ۱۵۰× ۶/۴ میلی متر بود. بافرها و معرف‌های 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 میلی‌لیتر)، آب مقطر دو بار تقطیر (۱۳ میلی‌لیتر) و اسید ارتو فسفریک (۰/۱ میلی‌لیتر). معرف کمپلکس دهنده: شامل ۳ آمینو-۱-پروپانول (۴ میلی‌لیتر) و اسیداستیک گلاسیال (۲۰ میلی‌لیتر) و N و N دی متیل فرمامید (تا حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر). محلول آبی استون ۷۰ درصد: شامل استون (۷۰ میلی‌لیتر) و آب مقطر دوبار تقطیر (۳۰ میلی‌لیتر).

عملیات استخراج گوسیپول آزاد از نمونه ریشه‌چه با محلول استون ۷۰ درصد آبی و در ۲ تکرار انجام شد. استاندارد اولیه گوسیپول با هدف، کالبیره نمودن دستگاه اچ پی ال سی برای تزریق نمونه‌های استاندارد و مجهول و همچنین تهیه محلول‌های استاندارد برای رسم منحنی استاندار بدین صورت تهیه گردید. ۱۰ میلی‌گرم از پودر استاندارد گوسیپول در ۱۰ میلی‌لیتر از معرف کمپلکس دهنده اضافه گردید. بدین‌ترتیب محلولی با غلظت یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر 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 ($P\leq ۰/۰۱$) و ($P\leq ۰/۰۵$) 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 ۱- پرگنه جدایه *T.virense* A224 بر روی محیط پی دی آ

شکل ۲- فیالید در جدایه *T.virense* A224

جدول ۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب نور/دقیقه/میلی‌گرم 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 ($P\leq ۰/۰۵$ و $P\leq ۰/۰۱$) 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 الیسیتور در ریشه‌چه می‌باشند 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 تحریک‌کنندگی بیشتری در تولید آنزیم پراکسیداز و ترپنوئیدهای گوسیپول، همی‌گوسیپولیک، اسید لاکتون و همی‌گوسیپول بر روی ریشه‌چه پنبه داشت (هنسون و همکاران، ۲۰۰۴).

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

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

تأثیر دو فاز محلول در کلروفرم و محلول در آب بر خاصیت تحریک‌کنندگی ترشحات خارج سلولی

سلولی: نتایج آماری نشان داد که بین تیمارها در القاء فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول و میزان گوسیپول از نظر فاز محلول در کلروفرم و محلول در آب اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد از نظر آماری وجود دارد (($P\leq ۰/۰۱$ ،$P\leq ۰/۰۵$)). ترشحات خارج سلولی جدایه A224 تریکودرما به تنهایی دارای بالاترین اثرات تحریک‌کنندگی بر فعالیت آنزیم و ترپنوئید گوسیپول را داشت و بعد از آن فاز محلول در آب دارای اثر تحریک‌کنندگی بهتری بود. این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار بودند (جدول ۲). در این آزمایش نتایج نشان داد مواد تحریک‌کننده در ترشحات خارج سلولی قابلیت حل‌شوندگی کمی در کلروفرم داشتند. نتایج هنسون وهاول نیز نشان داد ترشحات خارج سلولی جدایه مؤثر در

بیوکنترل *T.virens* G6 قابل حل در کلروفرم اثر تحریک کنندگی در ریشه‌چه پنبه نداشت و به‌عبارتی این مواد محرکه در ترشحات خارج سلولی غیر قابل حل در کلروفرم 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 کلروفرم	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 ($P\leq۰/۰۵$ و $P\leq۰/۰۱$) 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 ($P\leq۰/۰۱$). نتاج 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 وهاول بود (هنسون و همکاران، ۲۰۰۴). الیسیتور 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 ($P\leq۰/۰۵$). 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 الیسیتوری 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/میلی‌گرم 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≤۰/۰۵ و P≤۰/۰۱) 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≤۰/۰۵ و P≤۰/۰۱). 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.

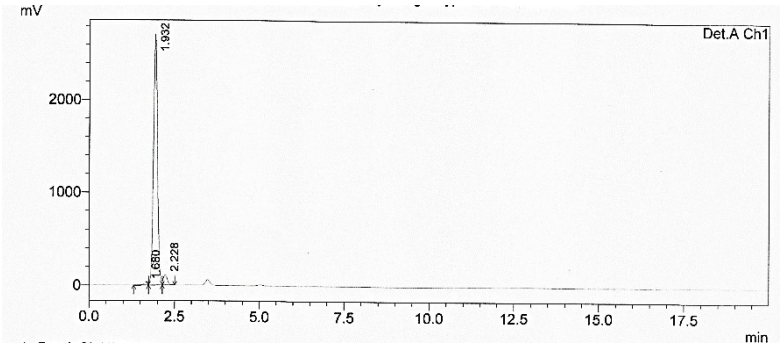
جدول ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (تغییرات جذب نور/دقیقه/میلی‌گرم پروتئین) و میزان گوسیپول (میکروگرم بر گرم بافت ریشه) ریشه‌چه پنبه تحت تیمار آنزیم در شرایط آزمایشگاه

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≤۰/۰۵ و P≤۰/۰۱) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند.

سنجش میزان گوسیپول در عصاره ریشه چه پنبه با استفاده ازکروماتوگرافی 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 تائید 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 بر گرم 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 الیسیتوری در تعدادی از قارچ‌ها و اامیست‌ها 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 اُامیست‌های الیسیتورهای شناخته شده‌ای دارند از جمله الیسیتورهای بدست آمده از گونه‌های .*Phytophthora* spp که هولوپروتئین‌هایی با توده مولکولی ۱۰ کیلودالتون هستند (هیوت و همکاران، ۱۹۹۲؛ نسپولوس و همکاران، ۱۹۹۲؛ پرنولت و همکاران، ۱۹۹۳). آنزیم سلولاز جداسازی از *T.viride* نیز به‌عنوان الیسیتور در تحقیقات معرفی شده است. کالدرون و همکاران نشان دادند *T.viride* با تولید آنزیم سلولاز، باعث پاسخ فوق حساسیت و تولید فیتوالکسین رسوراتول[1] در سلول‌های انگور شده است (کالدرون و همکاران، ۱۹۹۳). آلماتسین گروه جدیدی از الیسیتورها می‌باشد. این الیسیتور 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 الیسیتورهای شناخته شده، *T.viride* چندین پروتئین و پپتید (۶-۴۲ کیلو دالتون) تولید می‌کند که

1- Resveratol

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 الیسیتورها 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 الکتروفوز 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 بعنوان الیسیتور 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 تجزیه کننده دیواره سلولی حاصل از استرین‌های تریکودرما، پتانسیل بالقوه‌ای در کشاورزی به عنوان ترکیبات فعال در فرمولاسیون‌های قارچ‌کشی جدید دارند (مونته، 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 Phytopathologist, 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 palnt 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. Survay 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 Ammerican 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 Disaese, 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 elationships of and elicitins, 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. Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: Comparison of theihysico-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 gossypl and related ompounds. 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. Jornal 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 bilogy 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.

Iranian Journal of Cotton Researches
Vol. 1, No. 2, 2014
www.jcri.ir

Defense responses of cotton seedling to *Trichoderma* elicitors

F. Azad Disfani[*1], H. Rohani[2], M. Falahati Rastegar[2] and E. Mahdikhani Moghaddam[4]
[1]Assistant Prof. Cotton Research Institute of Iran (Gorgan)
[2&3]Professor and Associate Prof. Ferdowsi University of Mashhad
Recieved: 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 controll. Induction of plant defensive system is the most important mechanism to biocontrol of *Trichoderma* spp. In this study, extra-cellular flouids derived from culture filtrates of two isolates of *Trichoderma virens* as effective biocontrol on cotton seedling damping-off caused by *Rhozoctonia solani* isolate A224 and noneffective 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 elicitore 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 elicitore compounds (peroxidase and gossypol) in cotton radicle than noneffective 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*:** Eilicitore*,* Defense Response, *Trichoderma,* Cotton Seedling Damping-off.

[*]Corresponding author; f_azaddisfani@yahoo.com