

ارزیابی کارایی گونه‌های بومی *Trichoderma* در تولید آنزیم‌های خارج سلولی هنگام برهمکنش با عامل

بیمارگر *Fusarium oxysporum*

رقیه حبیبی^{۱*}، کامران رهنما^۲ و میثم تقی‌نسب^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- دانشیار و مربی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

*مسئول مکاتبه: Rogaeehhabibi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۳

چکیده

گونه‌های *Trichoderma* از مهمترین عوامل آنتاگونیست در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی می‌باشند. این عوامل سازوکارهای مختلفی نظیر آنزیم‌های خارج سلولی را در کنترل زیستی بکار می‌برند. از این رو برای بررسی توانایی عوامل آنتاگونیست و بیمارگر در تولید این آنزیم‌ها، محیط کشت‌های مختلف آنزیم آمیلاز، سلولاز، لاکاز، لیپاز و پروتئاز تهیه شد. سپس هر یک از گونه‌ها حاوی ریسه قارچ به محیط‌های کشت منتقل گردید و در 25 ± 1 درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳-۵ روز نگهداری شدند. نتایج نشان داد که *T. atroviridae* (1-3)، *T. virens* (6011) و *Fusarium oxysporum* قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز، سلولاز و لاکاز هستند. فقط گونه *T. koningii* قادر به تولید آنزیم لیپاز بود. گونه *T. harzianum* (احمدآباد) قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز بود ولی در تولید آنزیم لاکاز، لیپاز و پروتئاز فعال نبود. جدایه *T. atroviridae* (6022) در تولید آنزیم لاکاز فعال بوده ولی قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز نبود. نتایج کشت متقابل، قارچ *T. harzianum* (احمدآباد) با بیشترین درصد بازدارندگی رشد روی دو محیط کشت آمیلاز و سلولاز منجر به ممانعت از رشد عامل بیماری در مقایسه با سایر گونه‌های *Trichoderma* شد در حالی که آزمون کشت متقابل در سنجش آنزیم لاکاز نشان داد که به دلیل فعالیت زیاد این آنزیم در گونه *F. oxysporum* نسبت به گونه‌های آنتاگونیست، درصد بازدارندگی در این محیط کشت بطور معنی‌داری توسط گونه‌های آنتاگونیست متفاوت بودند. بنابراین به نظر می‌رسد هر یک از بستره‌های محیط کشت برای تولید فعالیت آنزیمی بصورت اختصاصی در تعامل *Trichoderma* و *Fusarium* نقش ایفا می‌نمایند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های خارج سلولی، درصد بازدارندگی، کنترل زیستی، *Trichoderma*، *Fusarium*.

مقدمه

بشمار می‌روند. این گونه‌ها علاوه بر مبارزه با عوامل بیماری‌زای گیاهی در موارد مختلف چون تولید آنزیم سلولاز در صنعت چوب، صنایع غذایی، کمپوست سازی و سایر موارد کاربرد دارند (قجفی و همکاران ۱۳۸۴، ساتیاپرابا و همکاران ۲۰۱۱ و جان و همکاران ۲۰۱۱). این گونه‌ها پارازیت برخی از قارچ‌های دیگر هستند که پدیده

گونه‌های قارچ *Trichoderma* در رده *Sordariomycetes*، راسته *Hypocreales* و خانواده *Hypocreaceae*، با داشتن خاصیت آنتاگونیستی از موفق‌ترین عوامل برای کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا

سوسپانسیون *Trichoderma* دو روز قبلاً از سوسپانسیون *Fusarium* استفاده شود، کاهش معنی-داری در آلودگی سنبله‌ها به *Fusarium* مشاهده می‌شود که احتمالاً در این شرایط سطح سنبله به وسیله اسپوره‌های *Trichoderma* اشغال می‌شود، این اسپوره‌ها در این فاصله زمانی دو روزه جوانه‌زنی کرده و زمانی که سلول سوسپانسیون حاوی کنیدی *Fusarium* بر روی سنبله پاشیده می‌شود قادر به رقابت با اسپوره‌های *Trichoderma* نیستند و به آسانی با این اسپوره‌ها پارازیت می‌شوند (باغانی و همکاران ۱۳۹۱).

بیشتر مطالعات بر روی آنزیم سلولاز با استفاده از سیستم‌های سلولازی قارچی انجام شده است و برای تولید آنزیم‌های سلولازی با اهداف تجاری نیز اغلب از قارچ‌ها استفاده گردیده است. در این میان گونه‌های مختلف *Trichoderma* یکی از مناسب‌ترین منابع آنزیم-های سلولازی در ارتباط با مهار کنترل زیستی عوامل بیماری‌گر می‌باشند و توجه خاصی به آنها از طریق شناسایی و تولید گونه‌های برتر از نظر تولید آنزیم شده است (جان و همکاران، ۲۰۱۱). در این قارچ میزان تولید آنزیم‌های سلولازی ترش‌حی حتی بر علیه عوامل بیماری‌زای خاکزاد شبه قارچی مانند *Pythium* و *Phytophthora* قابل ملاحظه بوده است (خواسی و همکاران ۱۳۹۲ الف و ب).

لاکاز آنزیم اکسیدکننده محیط حاوی مس می‌باشد که اکسیدکننده طیف وسیعی از سوبستراه‌های آلی و غیرآلی است. اخیراً به دلیل توانایی این آنزیم در اکسیداسیون ترکیبات مرتبط با لیگنین و گستردگی آنها در گیاهان عالی و قارچ، مورد توجه بوده است. این آنزیم جز یکی از اعضای بزرگ مس آبی رنگ می‌باشد که پروتئینی بوده و دارای توانایی اکسیداسیون ترکیبات فنولی (آلفا

پارازیته کردن با تشخیص ریشه هدف و پیچش حول آنها و تشکیل ساختار آپروسوریوم مانند صورت می‌گیرد به نحوی که اتصال با ایجاد باندهایی بین کربوهیدرات از دیواره سلولی قارچ *Trichoderma* و لکتین از دیواره سلولی قارچ هدف منجر به ترشح چندین آنزیم تخریب‌کننده سلولی از قارچ *Trichoderma* در جهت پارازیته نمودن قارچ هدف می‌گردد (رهنما و همکاران ۱۳۸۶، اسپیرمبوک و همکاران ۱۹۹۴، هارمن و همکاران ۲۰۰۴). تعامل عوامل فوق باعث پارازیته شدن سلول‌های قارچ هدف، ایجاد سوراخ و فرسایش دیواره سلولی می‌شود که حدود ۲۰-۳۰ ژن، پروتئین و متابولیت در عملکرد قارچ با دیگر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (هارمن و همکاران ۲۰۰۴). از جمله بررسی-هاییکه در ارزیابی توان آنتاگونیستی این گونه‌ها صورت گرفته است، می‌توان به استفاده از فرمولاسیون‌های عوامل کنترل زیستی *Trichoderma* در برابر *Pseudomonas* فلورسنت اشاره نمود که به طور موفق در زمینه‌ی تعدادی از محصولات استفاده شده‌اند (چادهاری و همکاران، ۲۰۱۲). در پژوهشی توسط نژادنصراله و همکاران (۱۳۸۸) در کنترل عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا (*Sclerotinia sclerotiorum*) به خاصیت آنتی‌بیوزیس و هیپرپارازیتیس در دو گونه *T. harzianum* و *T. virens* و کاهش میزان رشد عامل بیماری به میزان ۷۱/۵-۶۰ درصد در محیط کشت اشاره شده است. در رابطه با کنترل زیستی بیماری *Fusarium* سنبله گندم ناشی از *Fusarium graminearum* توسط گونه‌های بومی *Trichoderma* در زمان‌های مختلف اسپورپاشی در شرایط مزرعه‌ای بیشترین میزان عملکرد دانه به میزان ۱۰۹/۴۴، ۱۰۲/۶۰۷ و ۹۷/۲۷ گرم به-ترتیب در تیمارهای *T. harzianum*، *T. virens* و *T. Atroviridae* گزارش گردید. به عبارتی در شرایطی که

مواد و روش‌ها

در این تحقیق جدایه‌های *Trichoderma* مورد استفاده که همگی بومی مزارع جالیز (طالبی و خربزه) بودند از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که قبلاً توسط رهنما و همکاران (۱۳۸۶)، شناسایی شده بودند، تهیه گردیدند که عبارتند از: *T. T. atroviridae*(6022), *Trichoderma koningii* (1-3) *T. harzianum* و *T. virens* (6011) *atroviridae* (احمدآباد). یک جدایه مربوط به گونه *Fusarium oxysporum* f.sp. *meloni* بود که قبلاً توسط نوروزی (۱۳۹۰) از مزارع خربزه شهرستان تربت جام در استان خراسان رضوی جداسازی شده بود.

با توجه به اینکه آنزیم کیتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در گونه‌های *Trichoderma* می‌باشد و همواره مورد توجه بوده است، جهت بررسی وجود سایر آنزیم‌ها در این گونه، سنجش تولید آنزیمی روی پنج نوع محیط کشت اختصاصی آمیلاز، سلولاز، لاکاز، پروتئاز و لیپاز انجام گرفت (آمریتا و همکاران ۲۰۱۲). بدین ترتیب که یک قرص جداگانه از هر کدام از جدایه‌های *Trichoderma* و جدایه بیمارگر، جداگانه در تشتک‌های حاوی محیط کشت اختصاصی به همراه ماده زمینه مناسب کشت گردید سپس در انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه‌ی سلسیوس به مدت ۵-۳ روز نگهداری شد. آزمایشات در چهار تکرار انجام گرفت. پارامتر اندازه‌گیری شده در این بررسی، قطر هاله بازداری بود. نتایج بدست آمده توسط نرم افزار SAS (9.0 Portable) با نسخه ۹ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی-دار (LSD) در قالب طرح کامل تصادفی و در سطح یک درصد انجام گرفت.

نفتول^۱ بوده و با کاهش همزمان اکسیژن مولکولی در آب منجر به تسریع اکسیداسیون ترکیبات فنلی می‌شود؛ به ترتیبی که کمپلکسی از پلی فنل‌ها و لاکاز تشکیل شده و منجر به اهمیت مطالعه این آنزیم می‌گردد. (کانرو و رونکرا، ۲۰۰۷، دسای و همکاران، ۲۰۱۱). آنزیم لیپاز نیز یکی از انواع آنزیم‌های محلول در آب است که هیدرولیز پیوندهای استری را در سوبستراهای لیپیدی انجام می‌دهد. این آنزیم در اغلب گونه‌های حیوانی، گیاهی، باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها یافت می‌شود. پروتئازها هم از مهم‌ترین آنزیم‌های فعال در پدیده مایکوپارازیتسم هستند که تقریباً در اغلب بررسی‌های کنترل زیستی ضرورت دارد تا نقش فعال این آنزیم هم مدنظر قرار گیرد (گوپتا، ۲۰۰۵). میکروارگانسیم‌های زیادی توانایی تولید پروتئاز را دارند که انواع تولید شده به وسیله باکتری‌ها در مقایسه با پروتئازهای با منشأ قارچ و یا جانوری دارای اهمیت بیشتری هستند.

از آنجاییکه بیشتر منابع بررسی شده نشان می‌دهد فعالیت‌های زیادی در مورد آنزیم‌های مختلف موجود در جدایه‌های *Trichoderma* در سایر کشورها انجام شده است، جا دارد به پتانسیل گونه‌های مهم قارچی در تولید آنزیم که سهم بسزایی در صنعت دارند، توجه بیشتری مبذول گردد. بنابراین با توجه به سازوکارهای کنترل زیستی جدایه‌های *Trichoderma*، پژوهش حاضر به سنجش پنج آنزیم خارج سلولی متفاوت شامل آمیلاز، سلولاز، لاکاز، لیپاز و پروتئاز با هدف دستیابی به گونه‌های بومی جدید با توان تولید آنزیمی بالاتر در شرایط آزمایشگاه پرداخته است که در آن از جدایه‌های بومی مختلف قارچ *Trichoderma* و یک گونه از *Fusarium* عامل پژمردگی آوندی مزارع جالیز از نظر فعالیت این آنزیم‌ها مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

¹ α -Naphthol

آزمون تولید آنزیم آمیلاز

جهت سنجش فعالیت آمیلازی جدایه‌های منتخب، از محیط کشت گلوکز عصاره مخمر پیتون آگار^۵ (شامل یک گرم گلوکز، ۰/۱ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم پیتون، ۱۶ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۶) به همراه ۲٪ نشاسته محلول استفاده شد. محیط کشت‌های مایه‌زنی شده در ۱٪ حل شده در پتاسیم دیدید ۲٪ غوطه‌ور گردیدند که در این حالت تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه قارچ به منزله تولید آنزیم آمیلاز در نظر گرفته شد (آمریتا و همکاران ۲۰۱۲).

آزمون تولید آنزیم سلولاز

جهت سنجش فعالیت سلولیتیک، جدایه‌های مورد مطالعه در محیط اختصاصی عصاره مخمر پیتون آگار^۶ (شامل ۰/۱ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم پیتون، ۱۶ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) که با ۰/۵٪ سدیم کربوکسی متیل سلولز اصلاح شده، مایه‌زنی و نهایتاً در انکوباتور نگهداری شدند. به منظور شناسایی جدایه‌های *Trichoderma* تولیدکننده سلولاز از طریق مشاهده منطقه هیدرولیز شده (هاله)، پس از گذشت ۵-۳ روز تشتک‌ها با ۰/۱٪ معرف کنگو قرمز^۷ غوطه‌ور و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سدیم کلرید یک مولار شسته می‌شوند. بدین صورت که معرف قرمز کنگو با سلولز باقیمانده در محیط (نه با سلولز هیدرولیز شده) کمپلکس قرمز روشن رنگی (نارنجی رنگ) را تشکیل می‌دهد و نواحی که سلولز توسط آنزیم سلولاز هیدرولیز شده است ایجاد هاله شفاف در اطراف پرگنه می‌نماید (آمریتا و همکاران ۲۰۱۲).

بررسی رقابت تغذیه‌ای و کلنیزاسیون جدایه‌های

Trichoderma در کشت متقابل با قارچ بیمارگر

به منظور مقایسه قدرت رقابت تغذیه‌ای جدایه‌های *Trichoderma* با قارچ بیمارگر و اثر بیمارگر بر میزان تولید آنزیم‌های مختلف در جدایه‌های مختلف و مشاهده نحوه تشکیل هاله ایجاد شده از فعالیت آنزیمی در اثر رقابت، از کشت دو طرفه استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا جدایه‌ها جداگانه روی محیط کشت پایه (سیب‌زمینی دکستروز آگار) کشت و پس از گذشت سه روز برای تیمار *Trichoderma* و پنج روز برای گونه *Fusarium* قرص‌های میسلیمی ۹ میلی‌متری از ناحیه انتهای رشد ریشه آنتاگونیست و بیمارگرها تهیه و در سه محیط-کشت اختصاصی و آنزیمی، آمیلاز، سلولاز و لاکاز کشت شدند. سپس ظروف تشتک حاوی قرص‌های میسلیمی *Trichoderma* و *Fusarium* به انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه‌ی سلسیوس منتقل و نگهداری شدند (حاجی‌اقراری و همکاران ۲۰۰۸، کورنه‌آ و همکاران ۲۰۱۰، ژانگ و وانگ ۲۰۱۲، حافظ و همکاران ۲۰۱۳) و پس از گذشت ۵-۳ روز سنجش آنزیم‌های خارج سلولی با ماده زمینه و معرف‌های اختصاصی هر آنزیم در محیط کشت‌های اختصاصی ذکر شده در کشت متقابل با اندازه‌گیری هاله ایجاد شده در اطراف پرگنه قارچ مطابق رابطه یک، مورد مقایسه قرار گرفت (حسن و همکاران، ۲۰۱۳).

$$EA = D-d$$

رابطه [۱]

در این رابطه EA^2 : نشان دهنده فعالیت آنزیمی، D^2 : قطر پرگنه قارچ به همراه هاله روشن و d^2 : قطر پرگنه قارچ می‌باشد

⁵Glucose Yeast extract Peptone agar (GYP agar)

⁶Yeast Extract Peptone agar (YEP agar)

⁷Congo red

¹Dual Culture

²Enzyme Activity

³Diameter of colony plus clearing zone

⁴Diameter of colony

می‌شود و عدم هیدرولیز ژلاتین سبب رسوب آن با آمونیوم سولفات می‌گردد (آمیریتا و همکاران ۲۰۱۲).

نتایج و بحث

همانطور که در جدول یک ارائه شده است، نتایج حاصل از سنجش پنج آنزیم در انواع محیط کشت اختصاصی در گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* و *Fusarium* نشان‌دهنده تولید برخی از آنزیم‌های مورد مطالعه به وسیله گونه‌ها است. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که پس از گذشت ۷۲ ساعت، از بین تمامی جدایه‌های مورد مطالعه در محیط آمیلاز و سلولاز با توجه به تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه قارچ، فقط چهار مورد از گونه‌های قارچی مورد مطالعه، آنزیم آمیلاز و سلولاز را نشان دادند. در بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید هاله در محیط لیپاز و پروتئاز، فقط جدایه‌های *T. koningii* و *F. oxysporum* مثبت بوده و جدایه‌های دیگر در تولید آن ناتوان بودند (جدول ۱).

نتایج حاصل از میانگین نرخ رشد گونه‌های مورد مطالعه نشان داد که قطر هاله روشن یا شفاف ایجاد شده در جدایه‌های مختلف متفاوت می‌باشد بطوریکه قطر آن‌ها از سه تا ۵۰ میلی‌متر به ترتیب در گونه *T. atroviridae* (1-3) با محیط کشت اختصاصی لاکاز و *F. oxysporum* با محیط آمیلاز متغییر بود (جدول ۲). همچنین مشخص شد که جدایه *T. harzianum* (احمدآباد) و *T. atroviridae* (1-3) با قطر هاله ۲۳ میلی‌متر بیشترین تولید کننده آنزیم آمیلاز در بین جدایه‌های آنتاگونیست می‌باشند که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته و در یک گروه آماری قرار گرفتند. جدایه *T. virens* (6011) با قطر هاله ۱۳ میلی‌متر دارای کمترین فعالیت در تولید آنزیم آمیلازی بود. در حالی که قطر هاله اندازه‌گیری شده در گونه *F. oxysporum* (شکل ۱، A) ۵۰ میلی‌متر بود. دو جدایه *T. harzianum* (احمدآباد) (شکل ۱، B) و *T. virens* (6011) به

آزمون تولید آنزیم لاکاز

فعالیت لاکازی با رشد جدایه‌ها در محیط کشت گلوکز عصاره مخمر پپتون آگار و اضافه نمودن معرف ۱- نفتول (آلفا نفتول) صورت گرفت که در نتیجه اکسیداسیون بین معرف ۱- نفتول و آنزیم لاکاز تولید شده توسط جدایه قارچی، محیط کشت از رنگ سفید به رنگ آبی تغییر می‌یابد (آمیریتا و همکاران ۲۰۱۲).

آزمون تولید آنزیم لیپاز

فعالیت استرازی جدایه‌های مورد مطالعه با مایه‌زنی آن‌ها در محیط کشت پپتون آگار^۱ (شامل ۱۰ گرم پپتون، پنج گرم NaCl، ۰/۸ گرم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ، ۱۶ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=۶) صورت گرفت. زمانی که درجه‌ی حرارت محیط کشت به ۵۰-۴۵ درجه‌ی سلسیوس رسید، توئین^۲ ۲۰ (بعنوان منبع کربن) با غلظت ۱٪ حجمی (V/V) اضافه نموده و بعد از کشت جدایه‌های قارچی در آن و نگهداری در مدت زمان یاد شده با تشکیل هاله کدر اطراف پرگنه مورد بررسی قرار گرفت (آمیریتا و همکاران ۲۰۱۲).

آزمون تولید آنزیم پروتئاز

سنجش فعالیت پروتولیتیک با رشد جدایه‌های قارچی در محیط کشت گلوکز عصاره مخمر پپتون آگار به همراه ۰/۴٪ ژلاتین می‌باشد. به محیط سسترون شده، مقدار ۸ گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر از قبل سسترون شده اضافه نموده، سپس مایه‌زنی و نگهداری صورت گرفت. بعد از گذشت زمان لازم محیط کشت‌های مایه‌زنی شده با سولفات آمونیوم آبدار اشباع شده غوطه‌ور گشته و در صورت وجود آنزیم پروتئاز، هیدرولیز ژلاتین در محیط سبب ایجاد هاله‌ای روشن در اطراف پرگنه قارچ

^۱Peptone agar

^۲Tween 20

های *F. oxysporum* (شکل ۱، C) و *T. virens* (6011) به ترتیب با قطر هاله ۲۵ و ۲۳ میلی‌متر بود. در این آزمون *T. koningii* و *T. harzianum* احمدآباد نتوانستند ماده زمینه ۱- نفتول (آلفا نفتول) موجود در محیط را تجزیه کنند. سنجش مثبت دو آنزیم لیپاز و پروتئاز به ترتیب فقط در گونه‌های *T. Koningii* (شکل ۱، D) و *F. oxysporum* (شکل ۱، E) با قطر هاله ۲۵ و پنج میلی-متر مشاهده گردید.

ترتیب با قطر هاله ۶۶ و ۴۵ میلی‌متر بعنوان بیشترین جدایه *F. oxysporum* با قطر هاله ۳۹ میلی‌متر بعنوان کمترین تولید کننده آنزیم سلولازی در نظر گرفته شد. دو گونه آنتاگونیست *T. koningii* و *T. Atroviridae* (6022) در سنجش آمیلاز و سلولاز فاقد هاله بوده که قادر به تجزیه ماده زمینه نشاسته و سدیم کربوکسی متیل سلولاز در شرایط ذکر شده نبودند. در سنجش آنزیمی لاکاز بیشترین هاله مربوط به جدایه-

جدول ۱- نتایج حاصل از سنجش پنج آنزیم در گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* و *Trichoderma*.

انواع محیط کشت‌های اختصاصی جهت سنجش آنزیم	قارچ‌های آنتاگونیست و بیمارگر				
پروتئاز	لیپاز	لاکاز	سلولاز	آمیلاز	
-	+	-	-	-	<i>T. koningii</i>
-	-	+	-	-	<i>T. atroviridae</i> (6022)
-	-	+	+	+	<i>T. atroviridae</i> (1-3)
-	-	+	+	+	<i>T. virens</i> (6011)
-	-	-	+	+	<i>T. harzianum</i> احمدآباد
+	-	+	+	+	<i>F. oxysporum</i>

درمقایسه با سایر گونه‌های *Trichoderma* داشته است (جدول ۴). همانطور که در جدول سه مشاهده می‌شود بین جدایه‌های *Trichoderma* از نظر توانایی بازدارندگی از رشد این بیمارگر اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین درصد بازدارندگی روی سه محیط کشت آمیلاز، سلولاز و لاکاز با ۶۸ و ۱۰/۲۵ درصد به *T. harzianum* (احمدآباد) و هشت درصد به *T. virens* (6011) تعلق داشت. محاسبه اختلاف‌ها در این جدول براساس میزان ممانعت گونه *Trichoderma* از رشد بیمارگر *Fusarium* بوده است. (جدول ۵).

با توجه به نتایج بدست آمده از میانگین نرخ هاله تشکیل شده در گونه‌های آنتاگونیست و بیمارگر در جدول دو، آزمون کشت متقابل (شکل ۱، F، G و H) مندرج در جدول سه، هر سه جدایه *Trichoderma* و بیمارگر *Fusarium* در سه محیط کشت اختصاصی دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند و توانستند از رشد *F. oxysporum* جلوگیری نمایند. بر این اساس گونه‌های *Trichoderma* مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفتند. قارچ *T. harzianum* (احمدآباد) با میانگین ۲۳/۴۱ درصد بازدارندگی رشد روی هر سه محیط کشت، مناسب‌ترین میزان ممانعت از رشد عامل بیماری را

جدول ۲- میانگین نرخ هاله تشکیل شده در گونه های مختلف *Fusarium* و *Trichoderma* روی پنج محیط کشت اختصاصی پس از ۷۲ ساعت نگهداری در دمای ۱ ± ۲۵ درجه ی سلسیوس.

محیط کشت	آمیلاز	سلولاز	لاکاز	لیپاز	پروتناز
<i>T. koningii</i>	۰۰/۰۰ ^d ± ۰/۰*	۰۰/۰۰ ^d ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^d ± ۰/۰	۲۵/۰۰ ^a ± ۰/۵	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰
<i>T. atroviridae</i> (6022)	۰۰/۰۰ ^d ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^d ± ۰/۰	۱۹/۵۰ ^b ± ۰/۳	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰
<i>T. atroviridae</i> (1-3)	۲۳/۰۰ ^b ± ۰/۵	۴۳/۰۰ ^b ± ۰/۶	۰۳/۰۰ ^c ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰
<i>T. virens</i> (6011)	۱۳/۰۰ ^c ± ۰/۳	۴۵/۰۰ ^a ± ۰/۸	۲۳/۰۰ ^a ± ۰/۵	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰
<i>T. harzianum</i> (احمدآباد)	۲۳/۰۰ ^b ± ۰/۵	۴۶/۰۰ ^a ± ۰/۵	۰۰/۰۰ ^d ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰
<i>F. oxysporum</i>	۵۰/۰۰ ^a ± ۰/۵	۳۹/۰۰ ^c ± ۰/۶	۲۵/۰۰ ^a ± ۰/۵	۰۰/۰۰ ^b ± ۰/۰	۰۵/۰۰ ^a ± ۰/۱

اعداد با حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح یک درصد می باشند.
*: خطای استاندارد (Standard error).

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی از رشد *F. oxysporum* توسط گونه های *Trichoderma* روی سه محیط کشت اختصاصی آمیلاز، سلولاز و لاکاز (خطای آزمایش در سطح یک درصد).

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات (SS)
<i>Trichoderma</i>	۲	۱۴۵۵/۶۳۵**
محیط کشت	۲	۱۱۱۶۶/۷۸۱**
اثر متقابل	۴	۲۶۲۴/۲۷۱**
CV (درصد)	۵۰	

** معنی دار در سطح یک درصد.

بیمارگر را از لحاظ رسیدن به ماده غذایی موجود در محیط محدود می نماید.

آزمون کشت متقابل در سنجش آنزیم لاکاز نشان می دهد که به دلیل فعالیت زیاد این آنزیم در گونه ی *F. oxysporum* نسبت به گونه های آنتاگونیست، درصد بازدارندگی در این محیط توسط گونه های آنتاگونیست کمتر بوده به طوری که در گونه ی *T. harzianum* (احمدآباد) درصد بازدارندگی دو میلی متری باشد این در حالی است که رشد بیمارگر *Fusarium* در حضور این گونه ۲۴ میلی متر اندازه گیری شد (شکل ۱، H). در بررسی های میکروسکوپی، تمامی جدایه ها باعث تغییرات مورفولوژیکی از قبیل پیچش فنری به دور ریشه بیمارگر،

همچنین در مقایسه اثر بازدارندگی گونه *T. harzianum* (احمدآباد) با بیمارگر *F. oxysporum* در کشت متقابل مشخص شد که این بیمارگر در حضور *T. harzianum* (احمدآباد) در محیط کشت آمیلاز با ۱۶ میلی متر کمترین میزان تشکیل هاله را داشت در حالی که اندازه هاله تشکیل شده در کشت تنهای بیمارگر در محیط کشت اختصاصی آنزیم آمیلاز بزرگتر بود (جدول ۲). این موضوع نشان دهنده قدرت رقابت تغذیه ای سریع در کشت متقابل اینگونه ها با عوامل بیمارگرمی باشد که در حضور گونه های *Trichoderma*، نشاسته موجود در محیط به عنوان منبع کربن، سریع تر به مصرف رسیده و

جدول ۴- گروه‌بندی گونه‌های *Trichoderma* در کشت متقابل با *F. oxysporum* روی سه محیط کشت اختصاصی آمیلاز، سلولاز و لاکاز.

گونه‌ها	میانگین درصد بازدارندگی از رشد روی سه محیط کشت (درصد)
<i>T. harzianum</i> (احمدآباد)	۲۳/۴۱ ^a
<i>T. atroviridae</i> (1-3)	۱۳/۷۰ ^b
<i>T. virens</i> (6011)	۶/۸۷ ^c

اعداد با حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

جدول ۵- میانگین بازدارندگی از رشد *F. oxysporum* در کشت متقابل با *Trichoderma* روی سه محیط کشت اختصاصی آمیلاز، سلولاز و لاکاز.

گونه	میانگین IP [®] (درصد)	میانگین رشد شعاعی هاله بیمارگر در حضور آنتاگونیست (mm/day)		
		لاکاز	سلولاز	آمیلاز
<i>T. virens</i> (6011)	۲۸/۰۰ ^b ± ۰/۵*	۰۸/۰۰ ^a ± ۰/۳	۳۶/۰۰ ^a ± ۰/۶	۳۸/۰۰ ^b ± ۰/۶
<i>T. harzianum</i>	۶۸/۰۰ ^a ± ۰/۵	۰۲/۰۰ ^c ± ۰/۱	۱۶/۰۰ ^b ± ۰/۳	۴۵/۰۰ ^a ± ۰/۶
<i>T. atroviridae</i> (1-3)	۳۲/۰۰ ^b ± ۰/۵	۰۴/۰۰ ^{bc} ± ۰/۱	۳۴/۰۰ ^a ± ۰/۵	۳۷/۰۰ ^b ± ۰/۶

اعداد با حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

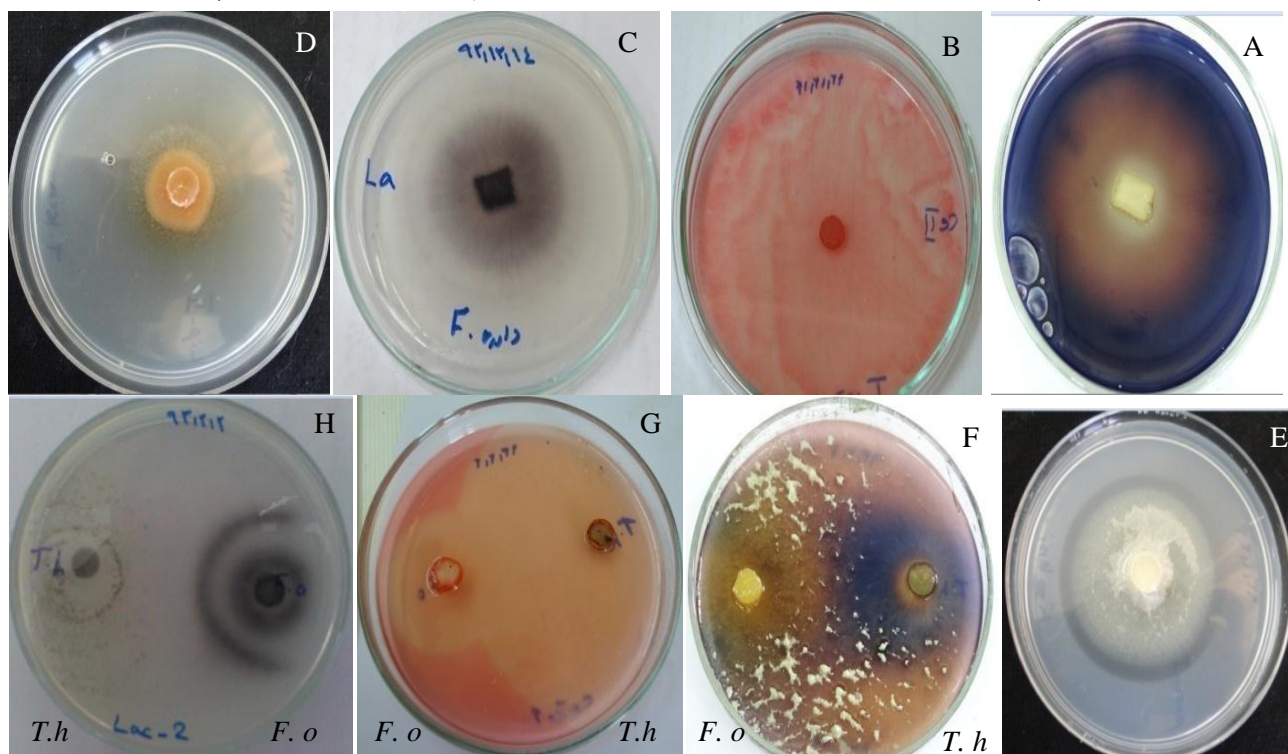
IP[®]: درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر به وسیله گونه‌های *Trichoderma*.
*: خطای استاندارد (Standard error).

بنابر سنجش فعالیت آنزیمی سلولاز مشخص گردید که بدلیل وجود سلولز در دیواره سلولی این شبه قارچ‌ها می‌توانند بستر مناسبی برای فعالیت و تحریک به تولید آنزیم سلولاز فراهم نماید که در نتیجه سازوکار میکوپارازیتیسم توسط گونه *T. harzianum* و کارایی آنزیم بصورت فعال به جهت ممانعت از رشد عوامل بیمارگر ثابت گردید. باید توجه داشت که عوامل مختلفی نظیر دما، pH، مدت زمان نگهداری، منابع کربن، عوامل القاء کننده‌ای چون لاکتوز و سلوبیوز در میزان تولید آنزیم‌های مختلف تأثیرگذار است (لایی و همکاران ۲۰۰۴، لیمینق و اکس‌یولیانق ۲۰۰۴، ون و همکاران ۲۰۰۵). نکته قابل توجه در کارایی افزایش مهارکنترل زیستی

روشن شدن و تشکیل وزیکل یا حباب در انتهای هیف بیمارگر شدند. توانایی آنتاگونیستی گونه‌های *Trichoderma* به عوامل مختلفی وابسته است. در این تحقیق تاثیر عواملی نظیر نوع جدایه *Trichoderma* و نوع محیط کشت مورد استفاده بررسی شد. اخیر در بررسی توسط خواسی (۱۳۹۲) مشخص شد که گونه‌های *T. atroviridae*(1-3) و *T. harzianum iso6*، روی سه محیط کشت متفاوت و در برابر هر سه نوع بیمارگر *Pythiumaphanidermatum*، *P. ultimum* و *Phytophthora nicotianae* عامل پوسیدگی بذر و ریشه جالیز قادر به بازدارندگی از رشد ریشه‌ها بودند و توانستند به خوبی مانع از گسترش آنها گردند. در این بررسی

روش های DNA نو ترکیب و مهندسی پروتئین می تواند قسمتی از مشکلات یاد شده را حل کند به طوری که در اکثر موارد هزینه تولید پروتئین نو ترکیب بسیار کمتر از استخراج آن از میکروارگانیسم وحشی می باشد. از طرفی آنزیم های قارچی نسبت به آنزیم های بدست آمده از سایر موارد چون گیاهان و حیوانات پایدارتر هستند.

بهبود آنزیم ها از طریق تغییر ژنتیکی گونه های *Trichoderma* به منظور افزایش کارایی تولید آنزیم ها با پرتو گاما و تولید بیشتر کمپلکس آنزیمی با استفاده از تکنیک القای جهش در ژنوم *Trichoderma* با اشعه گاما می باشد (امیرلو و همکاران ۱۳۹۱، اهری و همکاران، ۲۰۱۰). از سوی دیگر پیشرفت و گسترش استفاده از



شکل ۱- مقایسه اثر فعالیت آنزیم های مختلف در گونه های قارچ *Trichoderma* و *Fusarium* در کشت تنها (تصاویر A تا E) و کشت متقابل (تصاویر F تا H) در حضور ماده زمینه اختصاصی با تشکیل هاله های متفاوت در شرایط کشت مختلف. (A) تولید آنزیم های آمیلاز در گونه *F. oxysporum* (B) سلولاز در *T. harzianum* (احمدآباد)، (C) لاکاز در *F. oxysporum* (D) لیپاز در *T. koningii* (E) پروتئاز در *F. oxysporum* و کشت متقابل قارچ *T. harzianum* (*T. h*) و *F. oxysporum* (*F. o*) در محیط اختصاصی (F) آمیلاز، (G) سلولاز و (H) لاکاز.

آنزیم توسط هر گونه و میزان فعالیت آن ها با این روش نشان داد که در کشت متقابل در جدایه بومی *T. harzianum* تهیه شده از منطقه (احمدآباد) استان خراسان مربوط به مزرعه جالیز (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۳) با گونه *Fusarium* بالاترین فعالیت آنزیمی

در این تحقیق مشخص شد که تفاوت زیادی در بین پنج گونه مختلف قارچ *Trichoderma* در برهمکنش با قارچ *F. oxysporum* در توانایی آن ها به تولید انواع آنزیم در محیط کشت های اختصاصی وجود دارد. لیکن در این بررسی بواسطه قطر هاله تولید شده، قابلیت نسبی تولید

نظراسست (حاجی‌اقرای و همکاران، ۲۰۰۸: حافظ و همکاران، ۲۰۱۲). از سوی دیگر توصیه می‌شود در ارزیابی عوامل کنترل زیستی در آینده، کارایی فعالیت آنزیمی *Trichoderma* بصورت غربال کردن علاوه بر سایر ویژگی‌ها، بیشتر مد نظر قرار گیرد (نژادنصرالله و همکاران، ۱۳۸۸، اهری و همکاران، ۲۰۱۰). زیرا برخی از گونه‌ها مانند: *T. koningii* و *T. atroviridae* فعالیت آنزیمی ضعیفی را در این بررسی بروز دادند و یا بصورت اختصاصی در ارتباط با نوع کاربری بر روی عوامل بیماریزا و گیاهان مورد هدف احتمالا با سازو کار دیگری فعال هستند. چه بسا این گونه‌ها در قابلیت بهبود ریزوسفر، افزایش رشد گیاه، دارا بودن قدرت تهاجمی بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط دیگر بیشتر موثر بوده اند (باغانی و همکاران، ۱۳۹۱).

سلولاز و آمیلاز را دارد. زیرا دلیل لازم جهت توضیح این موضوع به آزمایش در دمای 25 ± 1 درجه‌ی سلسیوس و شرایط محیطی $pH=6$ نوع بستره به احتمال زیاد نیز ارتباط دارد (ون و همکاران، ۲۰۰۵: جان و همکاران، ۲۰۱۱: ژانگ و وانگ، ۲۰۱۲). در حالی که جدایه مربوط به گونه‌ی *F. oxysporum* عامل بیمارگر به تنهایی در شرایط ذکر شده، بالاترین فعالیت آنزیمی لاکاز را دارا بود. بنابراین یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که تفاوت زیادی بین استرین‌های بومی *Trichoderma* به عنوان عوامل کنترل زیستی وجود دارد که این موضوع را می‌توان به دلایل قابلیت تولید و تکثیر بالای گونه‌ها، توانایی بقا و زنده ماندن تحت شرایط نامساعد و نوع بستره به عنوان شرایط مورد نیاز فعالیت آنزیم نسبت داد که در کشت‌های تنها و متقابل با عامل بیمارگر تایید کننده این

منابع

- امیرلو ف، شهبازی س، باقری خ، عسگری ح، اهری مصطفوی ح و میرمجلسی س م، ۱۳۹۱. مطالعه تأثیر پرتو گاما بر فعالیت آنزیم سلولاز قارچ *Trichoderma*. صفحه ۴-۱، خلاصه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، مشهد.
- باغانی ف، رهنما ک، آقاجانیم ع و دهقان م ع، ۱۳۹۱. کنترل بیولوژیکی بیماری *Fusarium* سنبله گندم ناشی از *Fusarium graminearum* با استفاده از سه گونه بومی *Trichoderma* در زمان‌های مختلف اسپورپاشی در شرایط مزرعه. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۱۹(۲): ۱۳۹-۱۲۳.
- خواسی ح، ۱۳۹۲. تاثیر گونه‌های بومی *Trichoderma* بر دو عامل پوسیدگی بذر و ریشه جالیز: *Pythium* و *Phytophthora*. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- خواسی ح، رهنما ک، صادقی پور ح ر و رضوی س ا، ۱۳۹۲. (الف) تاثیر گونه‌های *Trichoderma* بومی مزارع جالیز بر شبه قارچ *Phytophthora nicotiana*. صفحه‌های ۹-۱. همایش ملی پژوهش‌های محیط زیست ایران. دانشگاه بوعلی سینا، همدان.
- خواسی ح، رهنما ک، صادقی پور ح ر و رضوی س ا، ۱۳۹۲. (ب) بررسی اثر آنتاگونیستی *Trichoderma* بومی مزارع جالیز بر شبه قارچ *Pythiumaph anidermatum*. صفحه‌های ۶-۱، مجموعه خلاصه مقالات پنجاهم غیر عامل در بخش کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، قشم.

- رهنما ک، محمدزاده ع و طاهری ع، ۱۳۸۶. اثر دو نوع کود ازته بر روی رشد و تولید اسپور قارچ *Trichoderma akoningii* برهم کنش آن با گونه *Fusarium* عامل بیماری بادزدگی سنبله گندم از استان گلستان. مجله علوم و صنایع کشاورزی. ۱۹(۲): ۱۹۷-۲۰۶.
- قجفی ف، مطلبی م و زمانی م، ۱۳۸۴. مطالعه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در قارچ *Trichoderma reesei*. مجله زیست-شناسی ایران. ۱۸(۱): ۲۲-۱۵.
- نژادنصراله ف، رهنما ک، ظفری د، صدروی م، نصراله نژاد س و وکیلی زارج ز، ۱۳۸۸. بررسی توانایی آنتاگونیستی گونه-هایی از *Trichoderma* روی عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۶: ویژه-نامه ۱-ب، ۴۵۵-۴۴۶.
- نوروزی ز، ۱۳۹۰. کنترل بیولوژیک *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی *Fusarium* خربزه با استفاده از قارچ *Trichoderma* spp. و باکتری های آنتاگونیست در شرایط گلخانه. پایان نامه کارشناسی ارشد، بیماری شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- نوروزی ز، رهنما ک، ربانی نسب ح آ و تقی نسب م. ۱۳۹۳. ارزیابی کارایی جدایه های *Trichoderma* و *Bacillus* در کنترل بیولوژیک عامل پژمردگی خربزه. مجله مهار زیستی در گیاه پزشکی. ۱(۲): ۴۹-۴۳.
- Ahari Mostafavi H, Safaie N, Fathollahi H, Babaie MHR and Lak MR, 2010. Pathological and molecular identification of *Fusarium solani* f.sp.*phaseoli* isolates and determination of suitable gamma ray dose rate for mutation induction. Journal of Nuclear Science and Technology 51: 48-51.
- Amirita A, Sindhu P, Swetha J, Vasanthi NS and Kannan KP, 2012. Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. World Journal of Science and Technology 2: 13-19.
- Canero DC and Roncero MIG, 2007. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. Mycology, 98: 509-518.
- Chaudhary V, Prasanna R, Nain L, Dubey SC, Gupta V, Singh R, Jaggi S and Bhatnagar AK, 2012. Bioefficacy of novel cyanobacteria amended formulations in suppressing damping off disease in tomato seedling. World journal of microbial biotechnol, 28: 3301-3310.
- Cornea CP, Matei S, Ciuca M, Voaides C and Matei M, 2010. In vitro biocontrol activity of new *Trichoderma* spp. Romanian isolates on different plant pathogenic fungi. Scientific bulletin biotechnology 14: 5-15.
- Desai SS, Tennali GB, Channur N, Anup AC, Deshpande G and Murtuza BPA. 2011. Isolation of laccase producing fungi and partial characterization of laccase. Journal of Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering 1(4): 543-549.
- Gupta A, Roy I, Patel RK, Singh SP, Khare SK and Gupta MN, 2005. One step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkalophilic *Bacillus* sp. J Chromatography A1075: 8-103.
- Hafez EE, Meghad A, Elsalam HAA and Ahmed SA, 2013. Biological and molecular studies on *Trichoderma viride*-plant pathogenic fungi interactions. World Applied Sciences Journal 21: 1821-1828.
- Hajieghrari B, Torabi-Giglou M, Mohammadi M and Davari M, 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology 7: 967-972.

- Harman G, Hawell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M, 2004. *Trichoderma* species opportunistic-avirulent plant symbionts. *Nature Reviews, Microbiology* 5: 43-54.
- Hasan S, Ahmad A, Purwar A, Khan N, Kundan, R and Gupta G, 2013. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Biomedical Informatics*, 9(5): 238-242.
- Jun H, Kieselbach T and Jönsson L, 2011. Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories* 10:68.
- Lai D, Freire DMG, Soares RMA, Leite SGF and Coelho RRR, 2004. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme Microbial Technology* 34: 354–358.
- Liming X and Xueliang S, 2004. High- yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology* 91: 259-262.
- Sathyaprabha G, Panneerselvam A, and Muthukkumarasamy S, 2011. Production of cellulase and amylase from wild and mutated fungal isolates. *E-Journal of Life Sciences* 1: 39-45
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE and Kubicek CP, 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4364-4370.
- Wen Z, Liao W and Chen S, 2005. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology* 96: 491- 499.
- Zhang R and Wang D, 2012. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. *African Journal of biotechnology* 11: 4180-4186.

Evaluating the effectiveness of Native *Trichoderma* Species in Production of Extracellular Enzymes During Interaction with Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*

R Habibi^{1*}, K Rahnama² and M Taghi nasab²

¹MSc. Student, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

²Associated Professor and Instructor, Department of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding author: Rogaeehhabibi@yahoo.com

Received: 4 Dec 2014

Accepted: 24 May 2015

Abstract

Trichoderma species are of important antagonist agents in plant pathogens biocontrol. These agents utilize different mechanisms in their biocontrol activities such as production of extracellular enzymes. In order to evaluate the ability of antagonist and pathogenic fungus in producing extracellular enzymes, specific culture media such as amylase, cellulose, laccase, lipase and protease were prepared. Subsequently, each antagonist and pathogenic fungus was separately inoculated on the appropriate media and incubated for 3-5 days in $25\pm 1^\circ\text{C}$. Results indicated that *T. atroviridae* (1-3), *T. virens* (6011) and *F. oxysporum* produced amylase, cellulase and laccase. *T. koningii* was only able to produce lipase enzyme. *T. harzianum* (Ahmedabad) produced amylase and cellulase but not laccase. *T. atroviredae* (6022) produced laccase but, was unable to produce amylase and cellulase enzymes. The results of the dual cultures, leads to *T. harzianum* (Ahmedabad) compared with other *Trichoderma* species had maximum growth inhibition on amylase and cellulase medium. While the dual culture assay of laccase medium indicated that the higher activity percentage of growth inhibition in *F. oxysporum* species compared with antagonists was significantly different. However, it seems each substrate during interaction of *Trichoderma* species with *Fusarium* sp., had different specific action due to enzyme production.

Keywords: Biocontrol, Extracellular enzymes, *Fusarium*, Inhibition percentage, *Trichoderma*.