ارزیابی کارایی گونه‌های بومی تریکودرما 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 دریافت: ۹۳/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۳

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 این‌رو برای بررسی توانایی عوامل آنتاگونیست و بیمارگردر 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 ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۵-۳ 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 درتولید آنزیم لاکاز، لیپاز و پروتئاز فعال نبود. جدایه (6022)*T. atroviridae* در تولید آنزیم لاکاز فعال بوده ولی قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز نبود. در 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،*Fusarium*، *Trichoderma*.

مقدمه

گونه‌های قارچ *Trichoderma* در رده Sordariomycetes، راسته Hypocreales و خانواده Hypocreaceae، با داشتن خاصیت آنتاگونیستی از موفق‌ترین عوامل برای کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا 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 ۱۳۸٤، ساتیاپرابا و همکاران ۲۰۱۱ و جان و همکاران۲۰۱۱). این گونه‌ها پارازیت برخی از قارچ‌های دیگر هستند که پدیده

پارازیته کردن با تشخیص ریسه 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 تخریب کننده سلولی از قارچ *Trichoderma* در جهت پارازیته نمودن قارچ هدف می‌گردد (رهنما و همکاران ۱۳۸٦، اسچیرمبوک و همکاران ۱۹۹٤، هارمن و همکاران ۲۰۰٤). تعامل عوامل فوق باعث پارازیته شدن سلول‌های قارچ هدف، ایجاد سوراخ و فرسایش دیواره سلولی می‌شود که حدود ۳۰-۲۰ ژن، پروتئین و متابولیت در عملکرد قارچ با دیگر میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (هارمن و همکاران ۲۰۰٤). از جمله بررسی‌هاییکه 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 هیپرپارازیتیسم در دو گونه *T.virens* و *T. harzianum* و کاهش میزان رشد عامل بیماری به میزان ۷۱/٥-٦۰ 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 به‌میزان ۱۰۹/٤٤، ۱۰۲/٦۰۷ و ۹۷/۲۷ گرم به‌ترتیب درتیمارهای *T. harzianum*،*T. virens* و *T. Atroviridae* گزارش گردید. به عبارتی در شرایطی که سوسپانسیون *Trichoderma* دو روز قبل از سوسپانسیون*Fusarium* استفاده شود، کاهش معنی‌داری در آلودگی سنبله‌ها به *Fusarium* مشاهده می‌شود که احتمالا در این شرایط سطح سنبله به وسیله اسپورهای *Trichoderma* اشغال می‌شود، این اسپورها 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 اسپورهای *Trichoderma* نیستند و به آسانی با این اسپورها پارازیته 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 آنزیم‌های سلولازی در ارتباط با مهار کنترل زیستی عوامل بیمارگر 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 اکسید کننده محیط حاوی مس می باشد که اکسید کننده طیف وسیعی از سوبستراهای آلی و غیرآلی است. اخیرا به دلیل توانایی این آنزیم در اکسیداسیون ترکیبات مرتبط با لیگنین و گستردگی آن‌ها در گیاهان عالی و قارچ، مورد توجه بوده است. این آنزیم‌جز یکی از اعضای بزرگ مس آبی رنگ می‌باشد که پروتئینی بوده ودارای توانایی اکسیداسیون ترکیبات فنولی (آلفا

نفتول[1]) بوده و باکاهش 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 می-دهد. این آنزیم در اغلب گونه‌های حیوانی، گیاهی، باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها یافت می‌شود. پروتئازها هم از مهم‌ترین آنزیم‌های فعال در پدیده مایکوپارازیتیسم هستند که تقریبا در اغلب بررسی‌های کنترل زیستی ضرورت دارد تا نقش فعال این آنزیم هم مدنظر قرار گیرد (گوپتا، ۲۰۰۵). میکروارگانیسم‌های زیادی توانایی تولید پروتئاز را دارند که انواع تولید شده به وسیله باکتری‌ها در مقایسه با پروتئازهای با منشا 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 گونه-های 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 جالیزاز نظر فعالیت این آنزیم‌ها مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق جدایه‌های *Trichoderma*مورد استفاده که همگی بومی مزارع جالیز (طالبی و خربزه) بودنداز آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که قبلا توسط رهنما و همکاران (۱۳۸٦)، شناسایی شده بودند، تهیه گردیدند که عبارتند از: *Trichoderma koningii*،(6022)*T. atroviridae*، *T. atroviridae* (1-3)،(6011) *T. virens* و *T. harzianum* (احمدآباد). یک جدایه مربوط به گونه *Fusarium oxysporum* f.sp. *meloni* بود که قبلا 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 آنزیم-ها 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 (آمیریتا و همکاران ۲۰۱۲). بدین ترتیب که یک قرص جداگانه ازهر 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 ۱±۲۵ 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 (9.0Portable 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.

[1] α- Naphthol

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[1]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 میسلیومی ۹ میلی‌متری از ناحیه انتهای رشد ریسه آنتاگونیست و بیمارگرها تهیه و در سه محیط-کشت اختصاصی و آنزیمی، آمیلاز، سلولاز و لاکاز کشت شدند. سپس ظروف تشتک حاوی قرص‌های میسلیومی *Trichoderma* و *Fusarium* به انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس منتقل و نگهداری شدند (حاجی‌اقراری و همکاران ۲۰۰۸، کورنه‌آ و همکاران ۲۰۱۰، ژانگ و وانگ۲۰۱۲، 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).

رابطه [۱] $EA= D-d$

در این رابطه EA[2]: نشان دهنده فعالیت آنزیمی، D[3]:قطر پرگنه قارچ به همراه هاله روشن و d[4]: قطر پرگنه قارچ می‌باشد

[1]Dual Culture
[2]Enzyme Activity
[3]Diameter of colony plus clearing zone
[4]Diameter of colony

آزمون تولید آنزیم آمیلاز

جهت سنجش فعالیت آمیلازی جدایه‌های منتخب، از محیط کشت گلوکز عصاره مخمر پپتون آگار[5](شامل یک گرم گلوکز، ۰/۱ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم پپتون، ۱۶ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=٦) به همراه ۲٪ نشاسته محلول استفاده شد. محیط کشت‌های مایه‌زنی شده در ید ۱٪ حل شده در پتاسیم یدید ۲٪ غوطه‌ور گردیدند که در این حالت تشکیل هاله روشن در اطراف پرگنه قارچ به منزله تولید آنزیم آمیلاز در نظر گرفته شد(آمیریتا و همکاران ۲۰۱۲).

آزمون تولید آنزیم سلولاز

جهت سنجش فعالیت سلولیتیک، جدایه‌های مورد مطالعه در محیط اختصاصی عصاره مخمر پپتون آگار[6](شامل ۰/۱ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم پپتون، 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 کنگوقرمز[7] 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 (آمیریتا و همکاران ۲۰۱۲).

[5]Glucose Yeast extract Peptone agar (GYP agar)
[6]Yeast Extract Peptone agar (YEP agar)
[7]Congo red

آزمون تولید آنزیم لاکاز

فعالیت لاکازی با رشد جدایه‌ها در محیط کشت گلوکز عصاره مخمر پپتون آگارو 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[1] (شامل ۱۰ گرم پپتون، پنج گرم NaCl، ۰/۱ گرم $CaCl_2 2H_2O$، ۱٦ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، pH=٦) صورت گرفت. زمانی که درجه‌ی حرارت محیط کشت به ۵۰-٤۵ درجه‌ی سلسیوس رسید،توئین[2] 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 آگاربه همراه ۰/٤٪ ژلاتین می‌باشد. به محیط سترون شده، مقدار ۸ گرم ژلاتین در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر از قبل سترون 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 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 ۵۰میلی‌متر به ترتیب در گونه *T. atroviridae*(1-3) با محیط کشت اختصاصی لاکاز و *F. oxysporum*با محیط آمیلاز متغییر بود (جدول۲). 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 میلی-متر دارای کمترین فعالیت درتولید 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) (شکل۱، B) و *T. virens*(6011) به

[1]Peptone agar
[2]Tween 20

ترتیب با قطر هاله ٤٦ و ٤٥ میلی‌متر بعنوان بیشترین و 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 جدایه‌های *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* احمد آباد 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.

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

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

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، Gو H) مندرج در جدول سه، هر سه جدایه *Trichoderma*و بیمارگر *Fusarium* در سه محیط کشت اختصاصی دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند و توانستنداز رشد *F.oxysporum* جلوگیری نمایند. بر این اساس گونه‌های *Trichoderma* مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفتند.

قارچ *T. harzianum* (احمدآباد) با میانگین ۲۳/٤۱ درصد بازدارندگی رشد روی هر سه محیط کشت، مناسب‌ترین میزان ممانعت از رشد عامل بیماری را درمقایسه با سایر گونه‌های *Trichoderma*داشته است (جدول ٤). 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 ٦٨ 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 ٥).

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

محیط کشت / قارچ‌های آنتاگونیست و بیمارگر	آمیلاز	سلولاز	لاکاز	لیپاز	پروتئاز
T. koningii	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
***T. atroviridae* (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
***T. atroviridae* (1-3)**	۲۳/۰۰^{b} ± ۰/۵	٤۳/۰۰^{b} ± ۰/٦	۰۳/۰۰^{c} ± ۰/۰	۰۰/۰۰^{b} ± ۰/۰	۰۰/۰۰^{b} ± ۰/۰
***T. virens* (6011)**	۱۳/۰۰^{c} ± ۰/۳	٤۵/۰۰^{a} ± ۰/۸	۲۳/۰۰^{a} ± ۰/۵	۰۰/۰۰^{b} ± ۰/۰	۰۰/۰۰^{b} ± ۰/۰
T. harzianum(احمدآباد)	۲۳/۰۰^{b} ± ۰/۵	٤٦/۰۰^{a} ± ۰/۵	۰۰/۰۰^{d} ± ۰/۰	۰۰/۰۰^{b} ± ۰/۰	۰۰/۰۰^{b} ± ۰/۰
F. oxysporum	۵۰/۰۰^{a} ± ۰/۵	۳۹/۰۰^{c} ± ۰/٦	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 معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

*: خطای استاندارد (**Standard error**).

جدول۳- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی از رشد ***F. oxysporum*** توسط گونه‌های ***Trichoderma*** روی سه محیط کشت اختصاصی آمیلاز، سلولاز و لاکاز (خطای آزمایش در سطح یک درصد).

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات (SS)
Trichoderma	۲	۱٤۵۵/٦۳۵**
محیط کشت	۲	۱۱۱٦٦/۷۸۱**
اثر متقابل	٤	۲٦۲٤/۲۷۱**
CV (درصد)	۵۰	

** معنی‌دار در سطح یک درصد.

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 ۱٦ میلی‌متر 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 تغذیه‌ای سریع درکشت متقابل اینگونه‌ها با عوامل بیمارگرمی‌باشد که در حضور گونه‌های *Trichoderma*، نشاسته موجود در محیط به عنوان منبع کربن، سریع‌تر به مصرف رسیده و بیمارگر را از لحاظ رسیدن به ماده غذایی موجود در محیط محدود می‌نماید.

آزمون کشت متقابل در سنجش آنزیم لاکاز نشان می‌دهد که به دلیل فعالیت زیاد این آنزیم در گونه‌ی *F. oxysporum* نسبت به گونه‌های آنتاگونیست، درصد بازدارندگی در این محیط توسط گونه‌های آنتاگونیست کمتر بوده به طوری که درگونه‌ی *T. harzianum* (احمدآباد) درصد بازدارندگی دو میلی‌مترمی‌باشد این در حالی است که رشد بیمارگر *Fusarium*در حضور این گونه ۲٤ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (شکل ۱، H). در بررسی‌های میکروسکوپی، تمامی جدایه‌ها باعث تغییرات مرفولوژیکی از قبیل پیچش فنری به دور ریسه بیمارگر،

جدول ٤- 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)
T. harzianum(احمدآباد)	۲۳/٤۱[a]
***T. atroviridae* (1-3)**	۱۳/۷۰[b]
***T. virens* (6011)**	٦/۸۷[c]

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

جدول ٥- میانگین بازدارندگی از رشد ***F. oxysporum*** در کشت متقابل با ***Trichoderma***روی سه محیط کشت اختصاصی آمیلاز، سلولاز و لاکاز.

	میانگین IP* (درصد)			میانگین رشد شعاعی هاله بیمارگر در حضور آنتاگونیست (mm/day)		
گونه	آمیلاز	سلولاز	لاکاز	آمیلاز	سلولاز	لاکاز
***T. virens* (6011)**	۲۸/۰۰[b] ± ۰/۵*	۰۲/۵٦[c] ± ۰/۱	۰۸/۰۰[a] ± ۰/۳	۳٦/۰۰[a] ± ۰/٦	۳۸/۰۰[b] ± ۰/٦	۲۳/۰۰[a] ± ۰/۵
T. harzianum	٦۸/۰۰[a] ± ۰/۵	۱۰/۲۵[a] ± ۰/۳	۰۲/۰۰[c] ± ۰/۱	۱٦/۰۰[b] ± ۰/۳	٤۵/۰۰[a] ± ۰/٦	۲٤/۰۰[a] ± ۰/۵
***T. atroviridae* (1-3)**	۳۲/۰۰[b] ± ۰/۵	۰۵/۱۲[bc] ± ۰/۱	۰٤/۰۰[bc] ± ۰/۱	۳٤/۰۰[a] ± ۰/۵	۳۷/۰۰[b] ± ۰/٦	۲٤/۰۰[a] ± ۰/۵

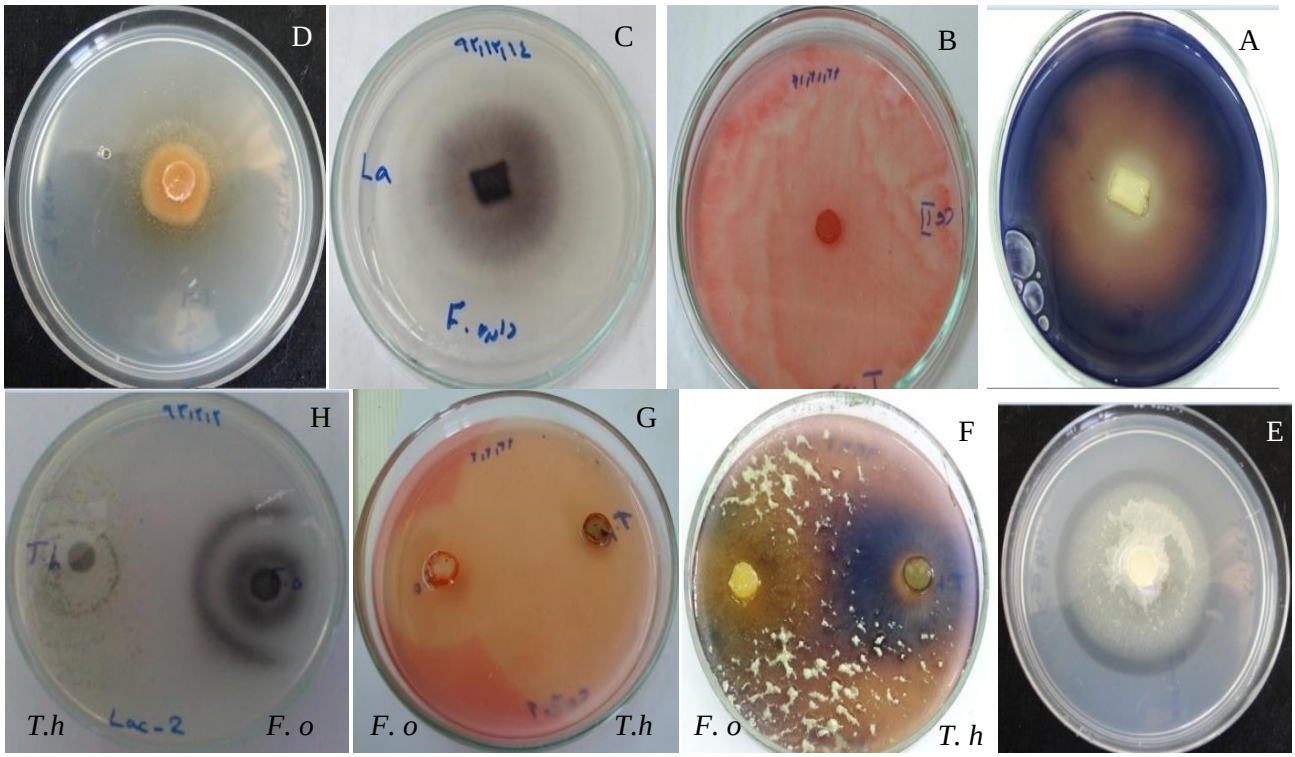
اعداد با حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد می‌باشند.

*IP: درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر به وسیله گونه‌های ***Trichoderma***.

*: خطای استاندارد (**Standard error**).

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 بازداری از رشد ریسه‌ها بودند و توانستند به خوبی مانع از گسترش آنها گردند. در این بررسی 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 ۲۰۰٤، لیمینق و اکس‌یولیانق ۲۰۰٤، ون و همکاران ۲۰۰۵).نکته قابل توجه در کارایی افزایش مهار کنترل زیستی

بهبـودآنزیم‌هـا از طریـق تغییـر ژنتیکـی گونـه‌هـای *Trichoderma*به منظور افزایش کارآیی تولید آنزیم‌ها بـا پرتو گاما و تولید بیشتر کمـپلکس آنزیمـی بـا اسـتفاده از تکنیک القای جهش در ژنوم *Trichoderma* با اشـعه گامـا مـی‌باشـد (امیرلـو و همکـاران ۱۳۹۱، اهـری و همکـاران، ۲۰۱۰). از سـوی دیگـر پیشـرفت و گسـترش اسـتفاده از روش‌های DNA نوترکیب و مهندسی پـروتئین مـی‌توانـد قسمتی از مشکلات یاد شده را حل کند بـه طـوری کـه در اکثر موارد هزینه تولید پروتئین نوترکیب بسـیار کمتـر از استخراج آن از میکروارگانیسم وحشی می‌باشد. از طرفی آنزیم‌های قارچی نسـبت بـه آنـزیم‌هـای بدسـت آمـده از سایر موارد چون گیاهان و حیوانات پایدارتر هستند.



شکل۱- مقایسه اثر فعالیت آنزیم‌های مختلف در گونه‌های قارچ *Trichoderma*و *Fusarium*در کشت تنها (تصاویر Aتا E) و کشت متقابل (تصاویر Fتا H)در حضور ماده زمینه اختصاصی با تشکیل هاله‌های متفاوت در شرایط کشت مختلف. (A) تولید آنزیم‌های 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. h*) *T. harzianum*و (*F. o*) *F. oxysporum*در محیط اختصاصی (F) آمیلاز، (G) سلولاز و (H)لاکاز.

در این تحقیق مشخص شد که تفـاوت زیـادی در بـین پنج گونـه مختلـف قـارچ *Trichoderma*در بـرهمکنش بـا قارچ *F.oxysporum* در توانایی آن‌ها به تولید انواع آنزیم در محیط کشت‌های اختصاصی وجود دارد. لیکن در ایـن بررسی بواسطه قطر هاله تولید شده، قابلیت نسبی تولیـد آنزیم توسط هر گونه و میزان فعالیت آن‌ها بـا ایـن روش نشـان داد کـه در کشـت متقابـل در جدایـه بـومی *T. harzianum* تهیـه شـده از منطقـه (احمـدآباد) اسـتان خراسان مربوط به مزرعه جـالیز (نـوروزی و همکـاران، ۱۳۹۳) بـا گونـه *Fusarium* بـالاترین فعالیـت آنزیمـی

سلولاز و آمیلاز را دارد. زیرا دلیل لازم جهت توضیح این موضوع به آزمایش در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس و شرایط محیطی pH=٦و 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 می-توان 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 نظراست (حاجی‌اقرای و همکاران، ۲۰۰۸: حافظ و همکاران، ۲۰۱۳). 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 (نژادنصراالله 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 گونه ها درقابلیت بهبود ریزوسفر، افزایش رشد گیاه، دارا بودن قدرت تهاجمی بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا درشرایط دیگربیشترموثر بوده اند (باغانی و همکاران، ۱۳۹۱).

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 ٤-۱، 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 گونه های *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 ٦-۱،مجموعه خلاصه مقالات پندافند غیر عامل در بخش کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، قشم.

رهنما ک، محمدزاده ع و طاهری ع، ۱۳۸٦. اثردو نوع کود ازته بر روی رشد و تولید اسپور قـارچ*Trichoderm akoningii*و برهم‌کنش آن با گونه *Fusarium* عامل بیماری بادزدگی سنبله گندم از استان گلستان. مجله علوم و صنایع کشاورزی. ۱۹(۲): ۲۰٦-۱۹۷.

قجفی ف، مطلبی م و زمانی م، ۱۳۸٤. مطالعه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در قـارچ *Trichoderma reesei*. مجلـه زیسـت-شناسی ایران. ۱۸(۱):۲۲-۱۵.

نژادنصراله ف، رهنما ک، ظفری د، صدروی م، نصراله‌نژاد س و وکیلی‌زارج ز، ۱۳۸۸. بررسی توانایی آنتاگونیستی گونـه-هایی از *Trichoderma* روی عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱٦: ویژه-نامه ۱-ب، ٤٥٥- ٤٤٦.

نـوروزی ز، ۱۳۹۰. کنتـرل بیولوژیـک *Fusarium oxysporum* عامـل پژمردگـی *Fusarium* خربـزه بـا اسـتفاده از قـارچ *Trichoderma* spp. و باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، بیماری شناسی گیـاهی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

نوروزی ز، رهنما ک، ربانی‌نسب ح آ و تقی‌نسب م. ۱۳۹۳. ارزیابی کارایی جدایه‌هـای *Trichoderma*و *Bacillus*در کنتـرل بیولوژیک عامل پژمردگی خربزه. مجله مهار زیستی در گیاه پزشکی. ۱(۲):٤۹-٤۳.

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, Microbiology5: 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 MicrobialTechnology 34: 354–358.

Liming X and Xueliang S, 2004. High- yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. Bioresoure 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 Microbiology60: 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 Rahnama[2] and M Taghi nasab[2]

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

[2]Associated 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±1°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.*