مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران
جلد ۳۸ شماره ۳، صفحه ۱۹۲-۱۸۱ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijwpr.2023.361446.1748
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350913.1402.38.3.2.8

تأثیر زمان تیمار با قارچ *Trichoderma harzianum* بر کارآمدی حفاظت زیستی چوب راش در برابر پوسیدگی سفید

عطیه‌السادات موسوی سنگدهی[۱]، رضا اولادی[۲*]، داود افهامی سیسی[۳] و ملیحه اختری[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران، پست‌الکترونیک: oladi@ut.ac.ir
۳- استادیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده فنی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱

چکیده

حفاظت زیستی، یکی از شیوه‌های نوین و دوستدار محیط‌زیست در حفاظت چوب بوده که در آن میکروارگانیسم‌های زنده جایگزین مواد شیمیایی می‌شوند. این پژوهش با هدف بررسی حفاظت زیستی چوب راش در برابر قارچ عامل پوسیدگی سفید (*Trametes versicolor*) با استفاده از قارچ مایکوپارازیت تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) انجام شد. به همین منظور، قدرت بازدارندگی تریکودرما در برابر قارچ عامل پوسیدگی چوب، در محیط کشت دوگانه و روی چوب ارزیابی گردید. نمونه‌های چوبی در دو بازه زمانی چهار و هشت هفته‌ای در مجاورت قارچ تریکودرما قرار داده شده و بعد به مدت ۱۶ هفته در معرض قارچ پوسیدگی سفید قرار گرفتند. آزمون کشت دوگانه، قدرت آنتاگونیستی تریکودرما در برابر قارچ مخرب چوب را اثبات کرد؛ به‌نحوی‌که پس از ۱۴ روز، تریکودرما نه‌تنها مانع گسترش ریسه‌های قارچ مخرب شده بود، بلکه روی میسیلیوم آنها را نیز پوشانده بود. سنجش آنزیم سلولاز نشان داد که این جدایه از تریکودرما توانایی اندکی در ترشح این آنزیم داشته و به همین دلیل پس از تیمار چوب با تریکودرما، نمونه‌ها کاهش جرم بسیار کمی داشتند؛ نتیجه‌ای که با طیف‌سنجی مادون قرمز نیز تأیید شد. مدت زمان مجاورت‌دهی چوب با تریکودرما عامل مهمی در قدرت بازدارندگی بود؛ به‌نحوی‌که افزایش یک ماهه زمان تیمار باعث شد که میزان کاهش جرم چوب‌های راش از حدود ۱۵٪ به زیر ۱٪ برسد، این در حالی است که کاهش جرم نمونه‌های شاهد بیش از ۳۰٪ بود. درمجموع می‌توان نتیجه گرفت که تیمار بلندمدت چوب راش با قارچ تریکودرما تأثیر مخربی بر چوب نداشته و باعث حفاظت آن در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید می‌شود. ازاین‌رو، استفاده از این نوع حفاظت زیستی برای پیش‌تیمار چوب راش یا ترکیب آن با مواد حفاظتی دیگر پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیسم، پوسیدگی سفید، تخریب چوب، کاهش جرم، کنترل زیستی.

مقدمه

قارچ‌های عامل پوسیدگی در چوب از کربن موجود در ترکیبات دیواره چوبی مانند سلولز، همی‌سلولز و لیگنین استفاده می‌کنند. این دسته از قارچ‌ها همچنین هیدروژن مورد نیاز خود را برای تولید انرژی از ترکیبات آلی چوب تهیه می‌کنند. قارچ‌های مخرب چوب در مراحل اولیه پوسیدگی از قندها و دیگر ترکیبات موجود در سلول‌های پارانشیمی چوب استفاده می‌کنند که معمولاً در برون‌چوب وجود دارد (Bailey *et al.*,

(1968 البته نگرانی‌های عمومی در مورد استفاده از مواد شیمیایی مصنوعی همراه با مقررات زیست‌محیطی به‌طور قابل‌توجهی باعث ایجاد تقاضا برای توسعه روش‌های جایگزین به‌جای حفاظت شیمیایی چوب شده است (Schmidt, 2007). حفاظت زیستی چوب توسط میکروب‌های آنتاگونیست به‌تنهایی یا در ترکیب با مواد شیمیایی، یکی از راه‌حل‌های امیدوارکننده و دوستدار محیط‌زیست برای حفاظت از چوب است (Susi *et al.*, 2011). در این شیوه، به‌جای مواد شیمیایی از میکروارگانیسم-های زنده برای حفاظت چوب در برابر عوامل مخرب استفاده می‌شود. اساس حفاظت زیستی، بر پایه پدیده آنتاگونیسم (Antagonism) است. پدیده آنتاگونیسم به معنای ممانعت از رشد، تکثیر، آلوده‌سازی، گسترش و پایداری یک موجود زنده توسط موجودات زنده دیگر است (Shahraki *et al.*, 2009). سازوکار کلی حفاظت‌زیستی بر پایه رقابت برای مواد مغذی یا فضا، تولید آنتی‌بیوتیک و آنزیم‌های لیتیک، غیرفعال شدن آنزیم های پاتوژن و پارازیت است (Viterbo *et al.*, 2002).

پوسیدگی سفید به مفهوم تخریب سلولز، همی‌سلولز و لیگنین چوب با ترجیح لیگنین است که معمولاً به‌وسیله قارچ‌های بازیدیومیست و به ندرت توسط آسکومیست‌ها ایجاد شده و عمدتاً در پهن‌برگان دیده می‌شود. در این نوع پوسیدگی، اگر میزان تخریب لیگنین بیشتر از سلولز و همی سلولز باشد، نوع پوسیدگی را انتخابی می‌نامند. در نوع دیگر از قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید، میزان تخریب ترکیبات چوب کمابیش یکسان است (پوسیدگی سفید همزمان). در هر دوی این نوع پوسیدگی‌ها دیواره سلولی به‌تدریج از سمت حفره سلولی تخریب می‌شود. قارچ *Trametes versicolor* در اروپا به قارچ دم بوقلمونی معروف است و در ایران قارچ رنگین‌کمان نامیده می‌شود. قارچ رنگین‌کمان در سراسر جهان به‌ویژه در مناطق معتدل پراکنش داشته و به دلیل دارا بودن طیف کاملی از آرایه‌های آنزیمی می‌تواند به چوب و تقریباً تمام گیاهان لیگنینی شده حمله کند (Rayner and Boddy, 1988). این قارچ عامل پوسیدگی سفید از نوع تخریب همزمان (غیرانتخابی) است (Bari *et al.*, 2015; 2018).

مؤثرترین آنتاگونیست‌های کنترل زیستی متعلق به قارچ‌های جنس *Trichoderma* و *Gliocladium* و باکتری‌های جنس *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Streptomyces* هستند (Susi *et al.*, 2011; Ramezanpour *et al.*, 2020). این موجودات با ترشح طیفی از مواد بیوشیمیایی مؤثر بر پاتوژن‌های مختلف قارچی، با آنها بر سر استفاده از مواد مغذی موجود رقابت می‌کنند (Viterbo *et al.*, 2002). گونه‌ها و جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما، نمونه‌های بسیار موفقی برای کنترل زیستی محسوب می‌شوند، زیرا به آسانی جداسازی و کشت شده و به‌سرعت در بسیاری از بسترها تکثیر می‌یابند. این قارچ از سازوکارهای مختلفی برای کنترل و کاهش بیماری‌های گیاهی استفاده می‌کند. یکی از مهمترین این سازوکارها، مایکوپارازیتیسم (مهار توسعه بیماری با تغذیه مستقیم از بیمارگر) است. در طول فرایند مایکوپارازیتی، آنزیم‌های مختلف تخریب کننده دیواره سلولی قارچ رقیب توسط گونه-های تریکودرما تولید می‌شود (Harman *et al.*, 2004). به دلیل قابلیت‌های بالای جدایه‌های تریکودرما، حدود ۹۰٪ از تحقیقات مربوط به استفاده از آنتاگونیست‌ها برای کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی با استفاده از جدایه‌های مختلف این قارچ انجام شده است (Benítez et al., 2004). همچنین تریکودرما مهمترین جنس قارچی است که به‌صورت تجاری درآمده و نیمی از بازار مربوط به عوامل کنترل زیستی تجاری به گونه‌های تریکودرما اختصاص دارد (Verma *et al.*, 2007). دو گونه *Trichoderma.harzianum* و *T. virens* رایج‌ترین گونه‌های تریکودرما به‌عنوان عوامل کنترل زیستی محسوب می‌شوند (Benítez et al., 2004).

در دو دهه گذشته، تلاش‌های آزمایشگاهی برای استفاده از تریکودرما در حفاظت زیستی چوب‌آلات برابر انواع پوسیدگی قارچی انجام شده است (Schubert *et al.*, 2008; Susi *et al.*, 2011; Schwarze *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Burcham *et al.*, 2017; Ribera *et al.*, 2017). در تمام این پژوهش‌ها، تیمار چوب با تریکودرما کوتاه‌مدت

(چند روز تا چهار هفته) بوده، گرچه نتایج نشان از قدرت بازدارندگی تریکودرما داشت، ولی این قارچ موفق به ممانعت کامل پوسیدگی و رسیدن درصد کاهش جرم چوب‌آلات در معرض پوسیدگی به زیر ۳٪ نشد. ازاین‌رو، در این پژوهش فرض برای آن است که مجاورت طولانی‌مدت‌تر چوب با تریکودرما موجب افزایش قدرت بازدارندگی آن و رسیدن درصد کاهش جرم به میزان قابل قبول براساس استاندارد (EN-113, 1996) می‌شود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه‌های چوبی

در این مطالعه از چوب راش (*Fagus orientalis* Lipsky) استفاده شد. نمونه‌های چوبی از قسمت برون‌چوب با ابعاد ۱۵×۲۵×۵۰ (مماسی × شعاعی × طولی) با تغییرات ۰/۵ میلی‌متر مطابق استاندارد تهیه شدند (EN-113, 1996). نمونه‌ها قبل از قرار گرفتن در محیط کشت، به مدت ۴۸ ساعت در آون قرار داده شدند و بعد وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

کشت قارچ تریکودرما و تیمار چوب با آن

در این پژوهش، جدایه ۴۴۴۹ قارچ *Trichoderma harzianum* از بانک قارچ آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تهران، تهیه شد. طبق استاندارد EN-113، محیط کشت مالت اکسترکت آگار تهیه و پس از مراحل استریل، به ظروف شیشه ای منتقل شدند. برای اطمینان از عدم آلودگی محیط کشت، ظروف شیشه‌ای یا پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت پیش از انتقال قارچ، به مدت یک هفته در انکوباتور قرار گرفتند تا از عدم رشد هر نوع قارچ یا کپکی روی آن اطمینان حاصل شود. انتقال تکه‌های کوچک قارچ تریکودرما به ظروف حاوی محیط کشت با استفاده از وسایل استریل شده و در زیر هود لامینار انجام شد. ظروف حاوی محیط کشت و قارچ تریکودرما در دستگاه انکوباتور در شرایط رطوبت نسبی ۷۰٪ و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. این شرایط، بهینه‌ترین دما و رطوبت برای فعالیت قارچ عامل پوسیدگی سفید رنگین‌کمان گزارش شده است (Karim *et al*., 2018). پس از یک هفته که میسیلیوم‌های قارچ تریکودرما به‌طور کامل ظروف را پوشانده بودند، انتقال نمونه‌های چوبی به داخل محیط کشت انجام شد. بلوک‌های چوبی به‌صورت ساعت‌گرد به ظروف حاوی تریکودرما انتقال و در دو مدت زمان چهار و هشت هفته در انکوباتور قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از محیط کشت خارج و ریسه‌های قارچی از روی بلوک‌های چوبی پاک شدند. برای بررسی تأثیر احتمالی تخریبی قارچ تریکودرما بر چوب، تعدادی از نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون قرار داده شده و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد. آنگاه نمونه‌های باقیمانده تیمار شده، از محیط قارچ تریکودرما خارج شدند، نخست برای رسیدن به رطوبت تعادل به مدت ده روز و در حالت استریل در اتاق کلیما قرار داده شدند و بعد به شرح زیر در معرض قارچ مولد پوسیدگی سفید قرار گرفتند. همچنین در مدت مشابه، تعدادی نمونه شاهد (تیمار نشده) نیز در اتاق کلیما قرار داده شدند.

مجاورت نمونه‌های تیمار شده با قارچ مولد پوسیدگی سفید

در این پژوهش از قارچ پوسیدگی سفید *Trametes versicolor* موجود در بانک قارچی گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ دانشگاه تهران استفاده شد. قارچ در ظروف شیشه‌ای و به شیوه استاندارد تجدید کشت شد. بعدازاینکه بیش از دوسوم پتری‌دیش‌های شیشه‌ای با ریسه قارچ پوشانده شد، انتقال نمونه‌های چوبی استریل شده به ظروف انجام گردید. تعدادی از نمونه‌های تیمار شده با تریکودرما در دو مدت زمان چهار و هشت هفته و پس از طی مرحله اتاق کلیما، زیر هود استریل لامینار به محیط قارچ پوسیدگی انتقال داده شدند. در هر ظرف، دو نمونه تیمار شده با تریکودرما و یک نمونه شاهد (تیمار نشده) قرار داده شد. پتری‌دیش‌ها به مدت ۱۶ هفته داخل دستگاه انکوباتور در رطوبت نسبی ۷۰٪ و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد ماندند. سپس، وزن خشک نمونه‌های چوبی –پس از پاک کردن سطح‌شان از ریسه– با ترازوی دیجیتال و دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد.

علاوه بر این، تعدادی از نمونه‌های شاهد در ظرفی مستقل و

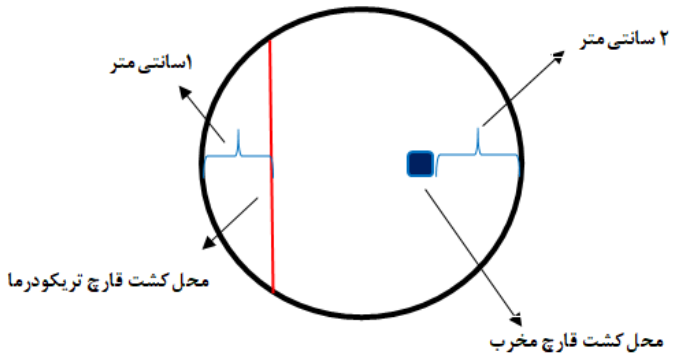
جدا از نمونه‌های تیمار شده، در معرض قارچ پوسیدگی قرار گرفتند. نمونه‌های شاهد (تیمار نشده با تریکودرما) که در کنار نمونه‌های تیمار شده در یک ظرف قرار گرفتند، «شاهد وابسته» نامیده شده و نمونه‌های شاهدی که در ظروف مستقل با قارچ پوسیدگی سفید تخریب شدند، «شاهد مستقل» نامیده شدند.

بررسی فعالیت آنتاگونیستی قارچ تریکودرما در محیط کشت دوگانه بدون بافت چوبی

در بررسی فعالیت آنتاگونیستی قارچ تریکودرما و قدرت ضد قارچی در محیط کشت دوگانه، بعد از کشت تریکودرما و قارچ مخرب، از هر یک مقداری در دوطرف پتری‌دیش گذاشته شد. نمونه‌ها در دمای ۲±۲۸ به مدت هفت و چهارده روز در انکوباتور قرار داده شدند. میزان بازدارندگی قارچ تریکودرما پس از هفت روز براساس رابطه زیر محاسبه شد (Saechow *et al.*, 2016).

$$\frac{C-E}{C}\times 100$$

که در آن C قطر پرگنه قارچی در پتری‌دیش‌های شاهد و E قطر پرگنه قارچی در پتری‌دیش‌های حاوی قارچ تریکودرما بوده است (شکل ۱). ده پتری‌دیش بدین شکل آماده و قدرت بازدارندگی به شکل میانگین گزارش شد.



شکل ۱– شیوه کشت دوگانه (متقابل) قارچ تریکودرما و قارچ عامل پوسیدگی سفید در پتری‌دیش

Figure 1. The method of dual cultivation of *Trichoderma harzianum* and the white rot fungus (*Trametes versicolor*) in a Petri dish

اندازه‌گیری درصد کاهش وزن نمونه‌ها

کاهش وزن نمونه‌های چوبی تیمار شده با قارچ آنتاگونیست و آلوده شده با قارچ مخرب و نمونه‌های تیمار نشده (شاهد) که در معرض قارچ مخرب قرار گرفته‌اند، طبق استاندارد EN-113 و براساس رابطه زیر محاسبه شد. W_1 وزن خشک اولیه و W_2 وزن خشک ثانویه نمونه‌ها می‌باشد

$$\frac{W2-W1}{W1}\times 100$$

سنجش آنزیم سلولاز

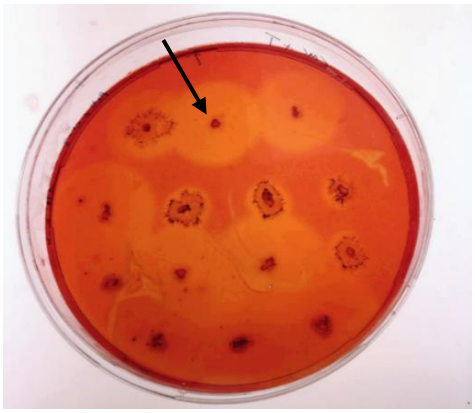
برای ارزیابی قدرت تولید آنزیم سلولاز در جدایه‌های قارچی، محیط سنتزی حاوی سوبستراهای اختصاصی آویسل ۰/۵ درصد و کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۰/۵ درصد تهیه شدند. مواد و مقادیر مورد استفاده برای تهیه یک لیتر محیط سنجش سلولاز در جدول ۱ نشان داده شده است. یادآوری می‌شود که محیط‌ها قبل از سترون شدن، در pH=۷ تنظیم شدند. پتری‌دیش‌های محتوی محیط کشت، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته در انکوباتور نگهداری شدند. سپس سطح پتری‌دیش‌ها با استفاده از محلول کنگورد رنگ‌آمیزی شد. پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه، به‌منظور رنگ

بری، تشتک‌های پتری با استفاده از محلول ۱ مولار کلرید سدیم (NaCl) شسته و تولید هاله بررسی گردید (Florencio *et al.*, 2012). ظهور هاله با لبه‌های نارنجی به معنای فعالیت سلولازی است (شکل ۲).

جدول ۱- مقادیر مواد مورد استفاده برای تهیه محیط سنجش آنزیم سلولاز (حجم یک لیتر)

Table 1- Amounts of materials used for the preparation of cellulase assay medium (one-liter volume)

مقدار (گرم) Amount (grams)	ترکیبات Compounds
3	$NaNO_3$
1	K_2HPO_4
0.5	$MgSO_4.\ 7H_2O$
0.5	KCl
0.01	$FeSO_4.\ 7H_2O$
15	Agar
5	Avicel
1000 ml	H_2O



شکل ۲- سنجش کیفی فعالیت آنزیم سلولاز (ظهور هاله نارنجی به معنای فعالیت آنزیم سلولاز است)

Figure 2. Qualitative measurement of cellulase enzyme activity. The appearance of an orange halo means cellulase enzyme activity

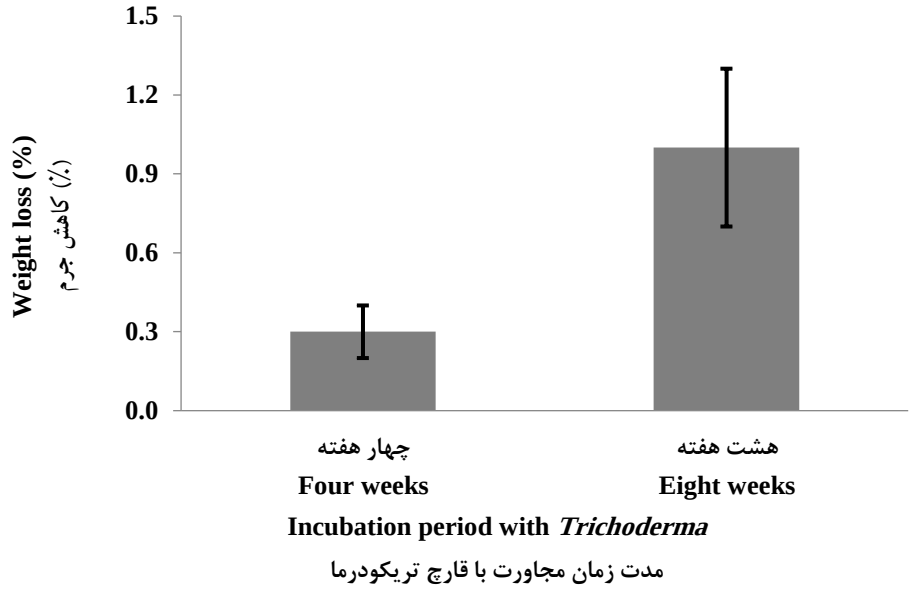
بررسی طیف‌سنجی ATR-FTIR

به‌منظور آنالیز شیمیایی و بررسی تغییر ترکیبات شیمیایی نمونه‌های چوبی قبل و بعد از پوسیدگی، نمونه‌هایی به ضخامت ۲۵ تا ۵۰ میکرون به ابعاد ۱×۱ با استفاده از میکروتوم لغزشی GSL1 تهیه و به آزمایشگاه آنالیز فیزیکی دانشکده علوم دانشگاه تهران منتقل شدند. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه FT-IR ATR-IR مدل Tensor27 با وضوح طیفی (رزولوشن) ۴ cm^{-1} آنالیز گردیدند.

نتایج

کاهش جرم ناشی از فعالیت قارچ تریکودرما در چوب راش

نتایج آزمون کاهش جرم نمونه‌های چوب راش تیمار شده با تریکودرما در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در هر دو بازه زمانی، میزان کاهش جرم زیر یک درصد است.



شکل ۳- کاهش جرم نمونه‌های چوب راش پس از تیمار با تریکودرما در مدت زمان مجاورت چهار و هشت هفته‌ای

Figure 3. Weight loss of beech wood after four and eight weeks of incubation with *Trichoderma*

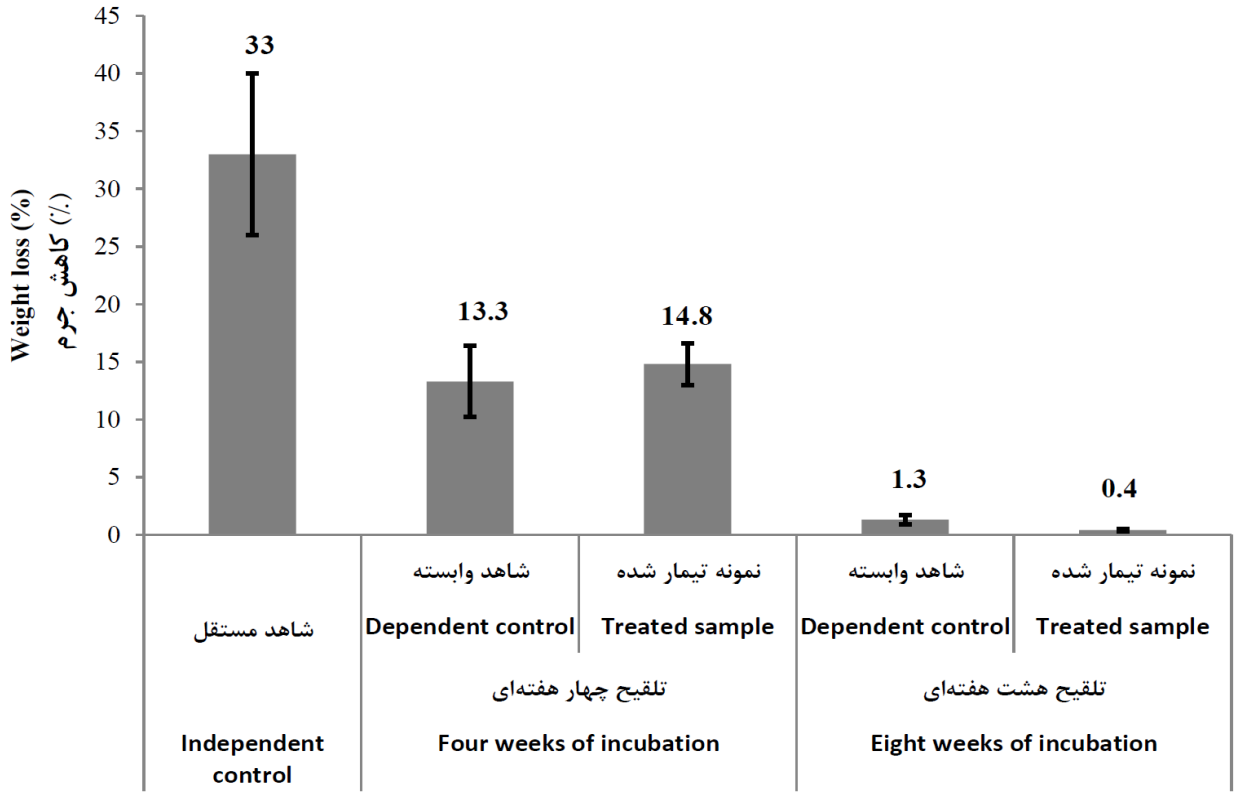
کاهش جرم نمونه‌های چوب راش تیمار شده با قارچ تریکودرما در دو حالت (چهار و هشت هفته مجاورت) نمونه های شاهد مستقل و وابسته پس از قرار گرفتن در محیط پوسیدگی سفید به مدت ۱۶ هفته در شکل ۴ آورده شده است. حداقل کاهش جرم مربوط به نمونه‌های هشت هفته‌ای و بیشترین آن مربوط به شاهد مستقل می‌باشد. میزان تخریب نمونه‌های شاهد وابسته بر اثر پوسیدگی سفید، مشابه نمونه‌های تیمار شده و مستقر در همان ظرف بود.

بررسی آنزیم سلولاز

در این پژوهش سنجش کیفی آنزیم سلولاز تولیدشده توسط سویه قارچ تریکودرما در دو محیط کشت CMC و آویسل انجام شد. هاله‌های بسیار کمی در پتری‌دیش‌ها مشاهده شد (شکل ۵) که نشان‌دهنده ترشح بسیار کم آنزیم سلولاز در این جدایه از گونه تریکودرما است.

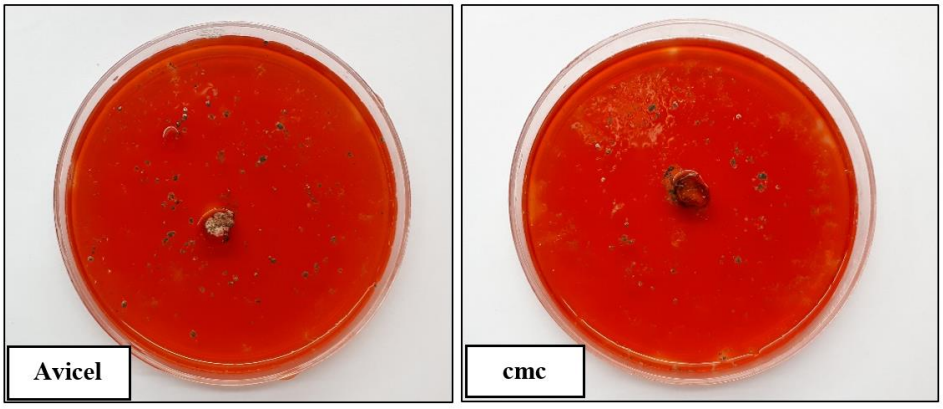
فعالیت آنتاگونیستی قارچ تریکودرما در محیط کشت دوگانه بدون بافت چوبی

شکل ۶ مربوط به کشت دوگانه بین قارچ تریکودرما و قارچ پوسیدگی سفید بوده که در سمت راست هر پتری‌دیش، قارچ تریکودرما و سمت چپ قارچ پوسیدگی سفید قرار گرفته است. پس از گذشت هفت روز، تریکودرما مانع از رشد بیشتر پوسیدگی سفید شد (شکل ۶-الف). پس از گذشت مدت زمان بیشتر (۱۴ روز)، تریکودرما روی ریسه‌های پوسیدگی سفید را نیز پوشش داده و آنها را دربرگرفته است (شکل ۶-الف). درصد بازدارندگی قارچ تریکودرما در برابر قارچ پوسیدگی سفید ۷۵٪ محاسبه شد.



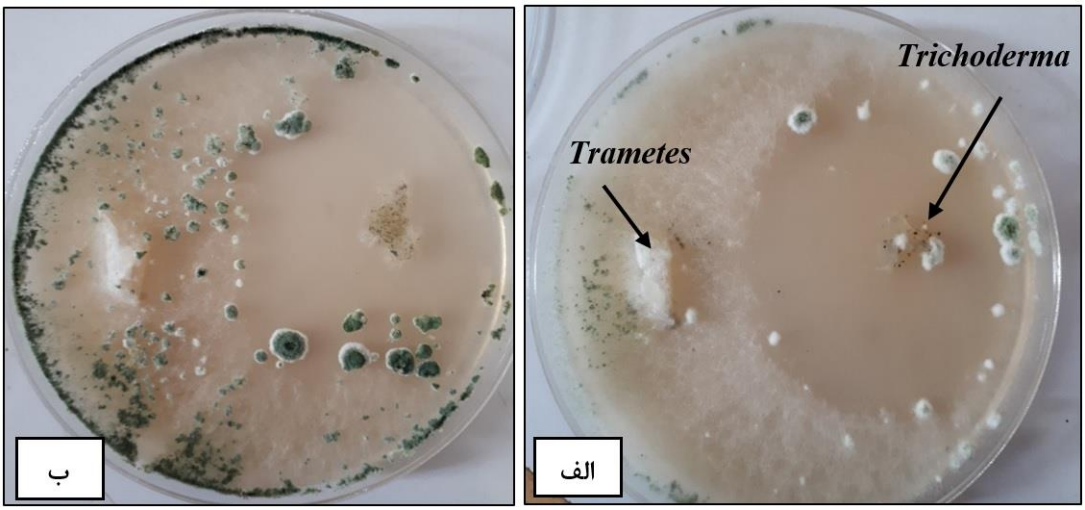
شکل ۴- کاهش جرم نمونه‌های تیمار شده، شاهد وابسته و مستقل چوب راش پس از ۱۶ هفته مجاورت با قارچ پوسیدگی سفید

Figure 4.. Weight loss of treated wood samples, dependent and independent control of beech wood after 16 weeks of incubation with *Trametes versicolor*



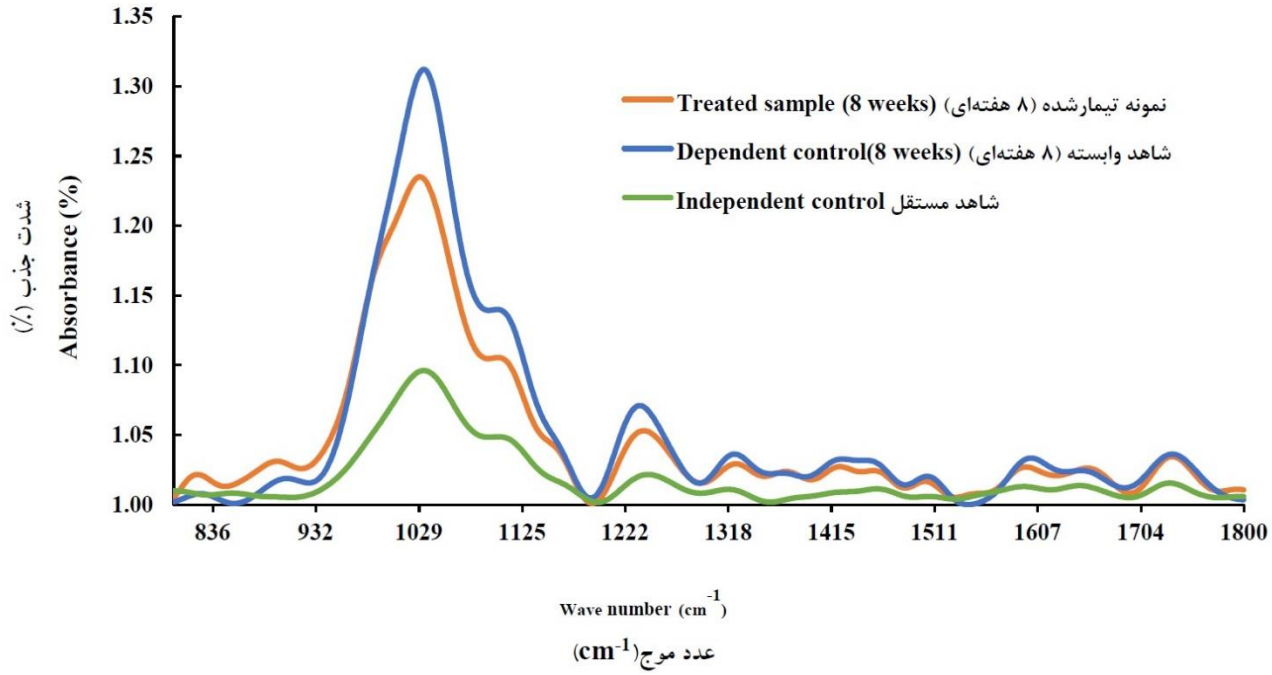
شکل ۵- فعالیت آنزیم سلولاز قارچ تریکودرما در دو محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (cmc) و آوسیل

Figure 5. Qualitative measurement of cellulase enzyme activity of *Trichoderma* fungus in Carboxymethyl cellulose (CMC) and Aucil culture medium



شکل ۶- کشت دوگانه قارچ تریکودرما و قارچ پوسیدگی سفید (***Trametes versicolor***) پس از یک (الف) و دو هفته (ب)

Figure 6. Dual cultivation of *Trichoderma harzianum* and the white rot fungus (*Trametes versicolor*) after one (right), and two weeks (left)



شکل ۷- طیف‌سنجی مادون قرمز در چوب‌های تیمار شده به روش مجاورت هشت هفته‌ای و شاهد راش پس از ۱۶ هفته مجاورت با قارچ پوسیدگی سفید

Figure 7. ATR-FTIR of wood treated by eight-week incubation of *Trichoderma harzianum* and beech control after 16 weeks of exposure to *Trametes versicolor*

بررسی‌های شیمیایی (ATR-FTIR)

با توجه به اینکه عوامل پوسیدگی چوب از ترکیبات دیواره سلولی آن (سلولز، همی‌سلولز و لیگنین) تغذیه می‌کنند، می‌توان با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی مادون قرمز و تغییرات شیمیایی ایجاد شده در چوب، الگوی تغییرات را بررسی کرد. طیف‌سنجی چوب‌های تیمار شده به روش

مجاورت‌دهی هشت هفته‌ای، شاهد وابسته و شاهد مستقل راش (پوسیده) پس از ۱۶ هفته مجاورت با قارچ پوسیدگی سفید در شکل ۷ آمده است. بارزترین تفاوت شدت پیک در عدد موجی $1024\ cm^{-1}$ دیده می‌شود. این پیک ناشی از ارتعاش کششی C-O در سلولز و همی‌سلولزها بوده که در شاهد مستقل دارای کمترین مقدار بود.

بحث

براساس نتایج، تریکودرمای مورد آزمون، در نمونه‌های چوبی به‌عنوان قارچ مخرب محسوب نشده و فقط حالت چوب زی دارد. بیشتر گونه‌های تریکودرما، مایکو پارازیت هستند، بااین‌حال، برخی از گونه‌های تریکودرما، قارچ ساپروفیت محسوب می‌شوند (Błaszczyk *et al*., 2016) ولی حتی این گونه‌ها نیز به‌تنهایی قادر به تخریب چوب سالم نیستند. استفاده از سلولز و همی‌سلولز توسط گونه‌های ساپروفیت تریکودرما تنها پس از تجزیه اولیه لیگنین توسط قارچ‌های پوسیدگی سفید آسکومایست و یازیدیومایست امکان‌پذیر است (Fukasawa *et al*., 2011). کم بودن یا عدم ترشح آنزیم سلولاز توسط قارچ مورد بررسی نیز تأییدکننده غیرمخرب بودن این قارچ برای چوب است. گونه‌های مختلف تریکودرما یا از طریق رقابت برای مواد مغذی و فضا یا با استفاده از سازوکارهای آنتی‌بیوز و مایکوپارازیتیسم در فعالیت تجزیه‌کننده‌های اولیه چوب تداخل ایجاد می‌کنند (Jaklitsch, 2009). بررسی مقایسه‌ای ژنوم چند گونه از این قارچ نشان داد که مایکوپارازیتیسم، سبک زندگی اولیه (اجدادی) تریکودرما است، درحالی‌که گندروی (ساپروفیتیسم) بر روی چوبِ از پیش تخریب شده، بعدها در معدودی از گونه‌های این قارچ ایجاد شده است (Atanasova *et al*., 2013).

قدرت آنتاگونیستی این قارچ نیز در آزمون کشت دوگانه به اثبات رسید. میزان بازدارندگی سویه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* در برابر قارچ پوسیدگی سفید *Phellinus noxius* بین ۶۰ تا ۱۰۰٪ (Schwarze *et al*., 2012; Burcham *et al*., 2017) گزارش شده است. به‌طورکلی، قدرت پارازیتیسم (انگل‌گونه‌ای) گونه‌های مختلف تریکودرما در برابر قارچ‌های آسکومایست و یازیدیومایست مخرب چوب در محیط کشت دوگانه بالاست (Schubert *et al*., 2008)، گرچه این میزان به گونه یا سویه قارچ تریکودرما و نوع محیط کشت بستگی دارد (Burcham *et al*., 2017). برای بررسی قدرت آنتاگونیستی قارچ تریکودرما در محیط کشت دوگانه، شیوه دیگری نیز وجود دارد که در آن، براساس میزان رشد تریکودرما روی ریسه‌های قارچ پاتوژن، مقیاس ۱ تا ۵ داده می‌شود (Bell *et al*., 1982). کلاس یک حالتی است که تریکودرما به‌طور کامل روی ریسه‌های قارچ پاتوژن را پوشانده باشد. با توجه به حضور هاگ‌های مایل به سبز تریکودرما (Lee *et al*., 2012) روی ریسه‌های قارچ *Trametes versicolor*، قدرت بازدارندگی تریکودرمای مورد بررسی در کلاس یک قرار می‌گیرد. مشابهت میزان کاهش جرمِ نمونه‌های شاهد وابسته با نمونه‌های تیمار شده نیز به همین دلیل است؛ زیرا هر دو این نمونه‌ها در یک ظرف قرار داشتند و تریکودرما نه فقط از فعالیت قارچ مخرب در چوب تیمار شده ممانعت کرد بلکه به روی چوب شاهد نیز گسترش یافت.

این پژوهش نشان داد که مدت زمان تیمار چوب با تریکودرما نقش مهمی در میزان محافظت از چوب در برابر قارچ مخرب دارد. افزایش یک ماهه زمان تیمار باعث شد که میزان کاهش جرم چوب‌های راش از حدود ۱۵٪ به زیر ۱٪ برسد، این در حالی است که کاهش جرم نمونه‌های شاهد مستقل بیش از ۳۰٪ بود. مجاورت بیشتر چوب راش با تریکودرما باعث استقرار این قارچ در چوب شده و حفاظت را افزایش داده است. شیوه مجاورت‌دهی تریکودرما روی چوب و مدت زمان آن، نقش مهمی در میزان کارآیی حفاظت زیستی دارد (Schubert *et al*., 2008). در پژوهش‌های گوناگون، گزارش‌های متفاوتی از میزان کاهش جرم نمونه‌های چوبی پس از تیمار با تریکودرما و مجاورت با قارچ‌های مخرب منتشر شده است (Schubert *et al*., 2008; Schwarze *et al*., 2012; Ribera *et al*., 2017). بااین‌حال، به دلیل تفاوت در نوع و ابعاد چوب مورد آزمون، نوع قارچ مخرب، نحوه و مدت زمان تیمار با تریکودرما و مدت زمان مجاورت با قارچ مخرب، مقایسه دقیقی بین این گزارش‌ها و

نتایج این پژوهش نمی‌توان کرد. Kubicek و همکاران (۲۰۱۱) نیز در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که گونه‌های تریکودرما عامل مناسبی برای کنترل زیستی محسوب می‌شوند، زیرا به آسانی جداسازی شده و به‌سرعت در بسیاری از بسترها تکثیر می‌یابند و یکی از مهاجمان قدرتمند، فرصت‌طلب و همزیست‌های بی‌آزار گیاه محسوب می‌شوند. Behdad (۱۹۸۸) نشان داد که قارچ تریکودرما انگل طبیعی قارچ پارزیت و مهاجم پوسیدگی سفید ریشه عسلی (*Armillaria mellea*) بوده و در خاک‌هایی که این قارچ وجود داشته باشد، قارچ عسلی نمی‌تواند فعالیت کند.

بررسی تغییرات شیمیایی در نمونه‌های آزمون، مؤید این مطلب است که فعالیت تخریبی قارچ عامل پوسیدگی در بافت چوبی بسیار ضعیف و محدود به مصرف کربوهیدرات‌های موجود در سلول‌های پارانشیمی توسط قارچ تریکودرما می باشد. میزان سلولز و همی‌سلولزهای نمونه‌های شاهد پوسیده به مراتب کمتر از نمونه‌های تیمار شده بود که نشان از تجزیه این اجزای دیواره سلولی توسط قارچ در نمونه شاهد مستقل و عدم فعالیت قارچ مخرب در نمونه‌های تیمار شده داشت. بیشتر بودن شدت پیک در عدد موجی $۱۰۲۴\ cm^{-1}$ در شاهد وابسته نسبت به نمونه‌های تیمار شده را می‌توان به تجزیه جزئی لیگنین در ابتدای پوسیدگی توسط قارچ مولد پوسیدگی سفید در نمونه‌های شاهد مستقل ربط داد که نسبت سلولز و همی‌سلولزها به لیگنین را در آنها افزایش داده است. نشان داده شده است که قارچ *Trametes versicolor* در ابتدای تخریب چوب پهن‌برگان، به شکل گزینشی لیگنین را مصرف کرده ولی با ادامه روند پوسیدگی، الگوی تخریب همزمان تغییر کرده و سلولز و همی‌سلولزهای دیواره سلولی نیز به شدت مورد حمله قرار می‌گیرند (Bari *et al*., 2015; 2018: 2020; Karim *et al*., 2017).

درمجموع می‌توان نتیجه گرفت که تیمار بلندمدت چوب راش با قارچ تریکودرما تأثیر مخربی بر چوب نداشته و باعث حفاظت آن در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید می‌شود. ازاین‌رو، استفاده از این نوع حفاظت زیستی برای پیش‌تیمار چوب راش یا ترکیب آن با مواد حفاظتی دیگر (Ribera *et al*., 2017) پیشنهاد می‌شود. همچنین بررسی شیوه‌های میدانی‌تر تیمار چوب‌آلات با این قارچ، مثلاً شیوه اسپری کردن (Seng *et al*., 2014) یا آغشته‌سازی سطحی با قلم‌مو نیز می‌تواند موضوع پژوهش‌های آینده باشد.

منابع مورد استفاده

-Atanasova, L., Crom, S. L., Gruber, S., Coulpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P. and Druzhinina, I. S., 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. BMC genomics, 14: 1-15.

-Bailey P.J., Liese, W. and Rosch, R., 1968. Some aspects of cellulose degradation in lignified cell walls. Biodeterioration of Materials. 1st Int Biodetn Symp Southampton. Elsevier, Essex, 546–557.

-Bari, E., Schmidt, O., and Oladi, R. 2015. A histological investigation of Oriental beech wood decayed by *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. Forest Pathology, 45(5): 349-357.

-Bari, E., Mohebby, B., Naji, H. R., Oladi, R., Yilgor, N., Nazarnezhad, N. and Nicholas, D. D., 2018. Monitoring the cell wall characteristics of degraded beech wood by white-rot fungi: Anatomical, chemical, and photochemical study. Maderas. Ciencia y tecnología, 20(1): 35-56.

-Bari, E., Daniel, G., Yilgor, N., Kim, J. S., Tajick-Ghanbary, M. A., Singh, A. P., and Ribera, J., 2020. Comparison of the decay behavior of two white-rot fungi in relation to wood type and exposure conditions. Microorganisms, 8(12): 1931.

-Behdad, E., 1988. Pests and Diseases of Forest Trees and Shrubs and Ornamental Plants of Iran. Sepehr Publication, Esfahan, 807p (In Persian).

-Bell, D. K., Wells, H. D. and Markham, C. R., 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 72(4): 379-382.

-Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. and Codon, A. C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology, 7(4): 249-260.

-Błaszczyk, L., Strakowska, J., Chełkowski, J., Gąbka-Buszek, A. and Kaczmarek, J., 2016. *Trichoderma* species occurring on wood with decay symptoms in mountain forests in Central Europe: genetic and enzymatic characterization. Journal of Applied Genetics, 57: 397-407.

-Burcham, D. C., Wong, J. Y., Abarrientos Jr, N. V., Mohamed Ali, M. I., Fong, Y. K. and Schwarze, F. W., 2017. In vitro evaluation of antagonism by *Trichoderma* spp. towards *Phellinus noxius*

Tarmian, A., 2020. Bio-control of white and brown rot in beech and spruce wood using *Bacillus amyloliquefaciens*, Iranian Journal of Wood and Paper Industries, 11(2):293-303 (In Persian).

-Rayner, A. D. and Boddy, L., 1988. Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology. John Wiley & Sons Ltd., 602p.

-Ribera, J., Fink, S., del Carmen Bas, M. and Schwarze, F.W., 2017. Integrated control of wood destroying basidiomycetes combining Cu-based wood preservatives and *Trichoderma* spp. PloS one, 12(4), e0174335.

-Saechow, S., Thammasittirong, A. and Thammasittirong, S., 2016. In vitro inhibitory effect of Bacillus subtilis BAS114 against *Curvularia lunata*. Advances in Environmental Biology, 10(1): 176-183.

-Seng, J., Herrera, G., Vaughan, C. S. and McCoy, M. B., 2014. Use of *Trichoderma* fungi in spray solutions to reduce *Moniliophthora roreri* infection of *Theobroma cacao* fruits in Northeastern Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 62(3): 900-907.

-Schubert, M., Fink, S. and Schwarze, F. W., 2008. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. Biological control, 45(1): 111-123.

-Schmidt, O., 2007. Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. Mycological Progress, 6:261-279.

-Schwarze, F. W., Jauss, F., Spencer, C., Hallam, C. and Schubert, M., 2012. Evaluation of an antagonistic *Trichoderma* strain for reducing the rate of wood decomposition by the white rot fungus *Phellinus noxius*. Biological Control, 61(2): 160-168.

-Shahraki M., Heydari A. and Hasanzadeh N., 2009. Investigation of antibiotic, siderophore, volatile metabolites production by *Bacillus* and *Pseudomonas* bacteria. Iranian Journal of Biology, 22(1): 71-84. (In Persian).

-Susi, P., Aktuganov, G., Himanen, J. and Korpela, T., 2011. Biological control of wood decay against fungal infection. Journal of Environmental Management, 92:1681-1689.

-Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. N. and Valero, J. R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37(1): 1-20.

-Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. and Chet, I., 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie Van Leeuwenhoek, 81:549-556.

associated with rain tree (*Samanea saman*) and Senegal mahogany (*Khaya senegalensis*) in Singapore. BioRxiv, 151753.

-European Standard EN 113, 1996. Wood preservatives—test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes—determination of the toxic values. CEN, European Committee for Standardization.

-Florencio, C., Couri, S. and Farinas, SC., 2012, Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains Enzyme Research, 28(7):1-8.

-Fukasawa, Y., Osono, T. and Takeda, H., 2011. Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. Mycologia, 103(3): 474-482.

-Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature reviews microbiology, 2(1): 43-56.

-Jaklitsch, W. M., 2011. European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. Fungal diversity, 48: 1-250.

-Karim, M., Daryaei, M. G., Torkaman, J., Oladi, R., Ghanbary, M. A. T., Bari, E. and Yilgor, N., 2017. Natural decomposition of hornbeam wood decayed by the white rot fungus *Trametes versicolor*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 89: 2647-2655.

-Karim, M., Ghodskhah Daryaei, M., Torkaman, J., Oladi, R. and Tjick Ghanbary M. A., 2018. Effect of environmental changes (temperature and moisture) on destructive behavior of the white rot fungus *Trametes versicolor* on chestnut-leaved oak, Iranian Journal of Wood and Paper Industries, 9(1):75-85. (In Persian).

-Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M. and Mukherjee, M., 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome biology, 12(4), R40.

-Lee, J., Huh, N., Hong, J. H., Kim, B. S., Kim, G. H. and Kim, J. J., 2012. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. Holzforschung, 66(7): 883-887.

-Pandey, K. and Pitman, A., 2003. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. Internationnal biodeteroration and biodegradation 52: 151-160.

-Ramezanpour, M., Oladi, R., Ahmadzadeh, M. and

The effect of treatment duration with *Trichoderma harzianum* fungus on the

biopreservation efficacy of beech wood against white rot

A.S. Mousavi-Sangdehi[1], R. Oladi[2*], D. Efhamisisi[3] and M. Akhtari[4]

1- Ph.D. candidate, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2*- Corresponding author, Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, E-mail: oladi@ut.ac.ir
3- Assistant Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4-Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Engineering, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

Received: Jan., 2023 Accepted: April, 2022

Abstract

Biological protection is one of the rather new and environmentally friendly methods of wood protection, in which living microorganisms have replaced chemical substances. This research was carried out with the aim of investigating the biological protection of beech wood against the white rot fungus (*Trametes versicolor*) using *Trichoderma harzianum*. For this purpose, the antagonistic ability of *Trichoderma harzianum* against wood rotting fungus was evaluated in dual culture medium as well as on wood. *Trichoderma harzianum* was incubated on wood samples in two time periods of four and eight weeks, and then samples were exposed to white rot fungus for 16 weeks. The dual culture test proved the antagonism of *Trichoderma harzianum* against wood-destroying fungus, in a way that after 14 days, *Trichoderma harzianum* had not only prevented the spread of *T. versicolor* hyphae, but also overgrew on its mycelia. Cellulase enzyme assay showed that the isolate of *Trichoderma harzianum* had little ability to secrete this enzyme, and for that reason, sample weight loss due to fungal treatment was neglegable; a result that was also confirmed by infrared spectroscopy. The duration of wood incubation with *Trichoderma harzianum* was an important factor in the efficiency of treatment: increasing the time by one month significantly reduced weight loss of treated samples from 15% to below 1%. While the weight loss of the control samples was more than 30%. It can be concluded that the long-term treatment of beech wood with *Trichoderma harzianum* does not have a destructive effect on the wood and protects it against the white rot fungus. Therefore, it is suggested to use this type of biological agent as a pretreatment of beech wood or to combine it with other preservative materials.

Keywords: Antagonism, biocontrol, mass loss, white rot, wood decomposition.