**دانشگاه آزاد اسلامی**

**واحد بابل**

**Babol Branch, Islamic Azad University**

**فرم پیشنهاد تحقیق**

**رساله کارشناسی ارشد/دکتری**

**عنوان تحقیق به فارسی:**

تغییرات شیمیایی ساختمان محیط کشت در افزایش آنتاگونیسمی تریکودرما بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس*

**عنوان تحقیق به انگلیسی:**

Chemical changes in the structure of the culture medium in increasing the antagonism of Trichoderma against *Aspergillus flavus*

**نام: شایان امیر خانلو** **دانشکده: آزاد اسلامی واحد بابل**

مقطع:دکتری رشته تحصیلی: دامپزشکی گروه تخصصی:

گرایش:.دامپزشکی .....نام‌دانشکده:آزاد اسلامی واحد بابل سال ورود به مقطع جاری:

نیمسال ورودی:

**ب – تعداد واحد رساله: 6**

**پ-پیش زمینه علمی موضوع:**

در بین همه عوامل بیماریزای گیاهی، قارچها بیشترین تعداد را اشغال کرده و با تولید سموم، سلامت انسان و حیوانات را تهدید می‌کنند. کنترل قارچ های بیماریزای گیاهی از نظر اقتصادی، از اهمیت بالایی برخوردار است. تاثیر منفی شناخته شده قارچ کش های مصنوعی بر محیط زیست و زنجیره غذایی دانشمندان را به یافتن گیاه بیولوژیک سوق داده است. فعالیت بیوکنترل تریکودرما نه تنها برای کشاورزی، بلکه همچنین برای محیط زیست از اهمیت بالایی برخوردار است، زیرا سموم در زنجیره غذایی، انباشته نمی شود و هیچ آسیبی برای گیاهان، حیوانات و انسانها ندارد. ترکیب محیط کشت برای کشت میکروارگانیسم ها نقش بسزایی در فرآیند تولید زیستی دارند.

**ج- بیان مسأله اساسی تحقیق به طور کلی** (شامل تشریح مسأله و معرفی آن، بیان جنبه‌های مجهول و مبهم، بیان متغیرهای مربوطه و منظور از تحقیق) :

قارچ هایی از جنس‌های آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی‌سیلیوم مهمترین تولیدکنندگان مایکوتوکسین هستند(García-Díaz et al., 2020). سازمان بهداشت جهانی آفلاتوکسین ها را در میان سمی ترین مایکوتوکسین هایی که توسط کپک های خاصی مانند ***A. flavus*** تولید می شوند، ذکر کرده اند و خواص سیتوتوکسیک بالا و سرکوب کننده سیستم ایمنی دارند، بنابراین این سموم برای سلامت انسان و حیوان خطرآفرین است(Beisl et al., 2020). تولید محصولات کشاورزی ارگانیک 21 درصد از سال 2010 تا 2015 در اروپا، افزایش یافت(Babec et al., 2019).

گونه های کپک تریکودرما تقریبا در همه خاک ها و سایر زیستگاه های مختلف وجود دارند. آن ها یکی از فرآوان ترین قارچ های قابل کشت می باشند. در ریشه گیاهان جمیعت آن بسیار افزایش می یابد. برخی از گونه های تریکودرما به قارچ های دیگر حمله کرده آنها را پارازیت می کنند و از مواد غذایی آن ها استفاده کرده و آنها را ازبین می برند(Kumar et al., 2023). این کپک همچنان در میان عوامل کنترل بیولوژیکی (Biological control agents, BCAs) تجاری در طیف وسیعی از مدیریت محصول و بیماری، چه به عنوان یک ماده یا در ترکیب با سایر مواد، جایگاه قابل توجهی دارد. تا کنون بیش از 80 گونه تریکودرما گزارش شده است و در این میان، *T. harzianum*، *T. virens*، و *T. viride* اغلب عوامل کنترل زیستی هستند(Mawar et al., 2021). گونه های تریکودرما، به ویژه *T. harzianum*، دارای خواص فوق العاده ای در کنترل زیستی گونه های فوزاریوم، جدا از گیاهان مختلف گزارش شده است(Bunbury-Blanchette & Walker, 2019). از سوی دیگر، Kifle و همکاران. (2016) نشان داد که *T. harzianum* دارای یک اثر آنتاگونیستی قابل توجهی بر *آسپرژیلوس فلاووس* است. این قارچ مهم نه تنها از نظر ابزار کنترل زیستی اهمیت زیادی دارد، بلکه به عنوان یک محرک رشد و درزیست پالایی اهمیت دارند. همچنین دریافتند که فعالیت ضد قارچی برخی از ایزوله های تریکودرما علیه قارچ های بیماریزای گیاهی از گونه *Fusarium moniliforme* و *آسپرژیلوس فلاووس* به کربن و نیتروژن بستگی دارد(Kifle et al., 2016).در اثر *Trichoderma harzianum*بر روی افزایش رشد و غلظت عناصر غذایی در خیار نشان دادند که تأثیر این این قارچ باعث افزایش سطح و طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه و افزایش سطح برگ گردید و باعث افزایش 90و 30درصدی غلظت فسفر و آهن شد(حسین زینلی و همکاران، 1399). از آنجایی که اجزای اصلی دیواره سلولی قارچ عبارتند از کیتین، کیتوزان، سایر گلوکان ها و پروتئین ها هستند، آنزیم های هیدرولیتیک مربوطه شامل کیتینازها، گلوکانازها و پروتئازها به طور انبوه توسط Trichoderma ترشح می شوند(Sun et al., 2017). مطالعات متعددی به نقش

کلیدی آنها در تخریب دیواره سلول میزبان گزارش شد(Zhang et al., 2016). گونه های تریکودرما به طور گسترده ای به عنوان عوامل قارچی آنتاگونیست در برابر چندین آفات و همچنین تقویت کننده رشد گیاهان استفاده می شود. سرعت متابولیسم سریع تر، متابولیت های ضد میکروبی و ترکیب فیزیولوژیکی عوامل کلیدی هستند که عمدتاً به تضاد این قارچ ها کمک می کنند. مایکوپارازیتیسم، رقابت فضایی و غذایی، آنتی‌بیوز توسط آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه و القای سیستم دفاعی گیاه از اقدامات کنترل زیستی(BCA) معمول این قارچ‌ها هستند. از سوی دیگر، گونه های تریکودرما همچنین در طیف وسیعی از تولیدات آنزیمی تجاری، یعنی سلولازها، همی سلولازها، پروتئازها و 1-3-گلوکاناز استفاده شده است(Verma et al., 2007). پپتای بیوتیک ها(Peptaibiotics) آنتی بیوتیک های پپتیدی خطی یا حلقوی هستند که با اسید آمینه غیر پروتئین زا، آلفاآمینو ایزوبوتیریک اسید مشخص می شوند. آنها طیف گسترده ای از زیست فعالی را در برابر پاتوژن های مختلف نشان می دهند. پپتای بیوتیک ها جزو غیر ریبوزومی ها هستند. پلی پپتیدهای موجود در تریکودرما، متشکل از 4 تا 20 پپتید باقیمانده (500-2200 دالتون) با اسید آمینه ایزوبوتیریک و غیره هستند(Víglaš et al., 2021). تریکودرما به روش های غیر مستقیم و مستقیم برای کنترل بیماریهای گیاهی استفاده می شود. عوامل روش کنترل زیستی به نوع سویه تریکودرما، پاتوژن متضاد، از جمله میزبان آن و وضعیت اکولوژیکی بستگی دارند ( Benitez et al., 2004). مکانیسم مستقیم شامل مایکوپارازیتیسم و پیچ خوردگی است، در حالی که مکانیسم غیرمستقیم شامل چالش‌هایی برای مواد مغذی و فضا، مقاومت اکتسابی سیستمیک و آنتی بیوز است. در این میان، مایکوپاازیتیسم، رقابت و آنتی بیوتیک نقش مهمی در آن دارند(Kumar et al., 2023).

افزایش استفاده از مواد شیمیایی برای حفظ نباتات در سال های اخیر به یک معضل جدی تبدیل شده است. یکی از راه حل های ممکن استفاده از میکروارگانیسم های مفید به جای قارچ کش های مصنوعی است که

به حفاظت از محیط زیست و سلامت انسان کمک می کند(Mitrović et al., 2021). جنبه های مختلف کنترل آفات، ارتقاء رشد، اصلاح زیستی، فرآیندهای تولید و ارزش های اقتصادی این قارچ، به عنوان عوامل کنترل زیستی جهت بهره برداری از پتانسیل واقعی آنها نیاز به شناخت ترکیبات مناسب رشد می باشد(Verma et al., 2007). کاربردهای مختلف تریکودرما، به عنوان کودهای زیستی، پاک کننده‌های زیستی، افزودنی‌های خاک، محرک‌های زیستی گیاهی، تجزیه‌کننده‌های زیستی، محافظ‌های زیستی و یکپارچه‌کننده خاک، باعث شده توجه زیادی را به خود جلب کرده است. تریکودرما به عنوان یک عامل کنترل زیستی در برابر پاتوژن های گیاهی برجسته است که با تضاد مستقیم و مکانیسم های دیگر برای مدیریت موثر بیماری های مهم گیاهی، از طریق عملکردهای متعدد، عمل می کند. در نتیجه، جای تعجب نیست که تریکودرما به عنوان یک عامل کنترل زیستی فعال(BCA) در فرمولاسیون های تجاری موجود متعددی که به طور رسمی به عنوان محصولات حفاظت از گیاه شناخته می شوند، عمل کند (Woo et al., 2023). گونه های تریکودرما به عنوان قارچ کش های زیستی و همچنین محرک رشد گیاه با مکانیسم های مختلفی بر رشد گیاه تأثیر میگذارند مانند کاهش سمیت آلاینده ها، القای مقاومت سیستمی در گیاه میزبان، حل شدن مواد معدنی کم محلول، تولید هورمون گیاهی و تنظیم میکروفورم های ریزوسفری(Adams et al., 2007).

عوامل کنترل بیولوژیکی می توانند یک روش جایگزین پایدار موثر و ایمن برای کاهش اثرات مضر قارچ کش های سنتتیک باشند(Adams et al., 2007). میزان اثرات ضد میکروبی در نوع میکروب، میزان غلظت بکاررفته، نوع محیط کشت مایع جهت تهیه متابولیت و میزان دما و تکانش می باشد(Anwar & Iqbal, 2017). Ramos and Said ترکیب مواد مغذی محیط براث را توصیف کردند که می توانند فعالیت ضد باکتریایی را افزایش یا بهبود بخشند(Ramos and Said, 2011). Bhattacharyya and

Jha شرایط کشت مختلف را بهینه کردند و به این نتیجه رسیدند که کشت فلاسک تکان دهنده تأثیر قابل توجهی بر تولید ترکیبات زیست فعال در طی تخمیر دارد(Bhattacharyya and Jha, 2011). فرمولاسیون محیط کشت با ارزش، در تولید این قارچ بیوکنترل، باعث کاهش قیمت تولید فرآیند و همچنین محصول نهایی می شود. اختلاف در محیط کشت های سابرودکستروز، پتیتو دکستروز و چاپکس عمدتا در منابع کربن، نیتروژن، عناصر معدنی و pH می باشند. بنابراین در این مطالعه بانوع تغییرات شیمیایی ساختمان محیط کشت (سابرودکستروز براث، پتیتو دکستروز براث و چاپکس براث)در افزایش آنتاگونیسمی تریکودرما بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط تخمیری و غیر تخمیری بررسی می شوند.

**د – اهمیت و ضرورت انجام تحقیق** (شامل اختلاف نظرها و خلاءهای تحقیقاتی موجود، میزان نیاز به موضوع، فواید احتمالی نظری و عملی آن و همچنین مواد، روش و یا فرآیند تحقیقی احتمالاً جدیدی که در این تحقیق مورد استفاده قرار می‌گیرد: امروز تولید و دستیابی برای دسترسی به ضد قارچ های جدید از چالش های امروزه جهان است

**ه- مرور ادبیات و سوابق مربوطه (بیان مختصر پیشینه تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور پیرامون موضوع تحقیق و نتایج آنها و مرور ادبیات و چارچوب نظری تحقیق):**

متابولیت‌های گونه های تریکودرما به عنوان مهارکننده باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرهای بیماریزاشناخته شده‌اند، اما در کاربردهای بالینی مورد استفاده قرار نگرفته بودند. همچنین گونه های تریکودرما منبع غنی متابولیت‌ها هستند( Saravanakumar et al., 2018).

Mitrović و همکاران اثر ترکیبات مختلف کربن و نیتروژن در محیط کشت برای تولید ***T. harzianum*** و برای کنترل بیولوژیکی و بازدارندگی دو فیتوپاتوژن قارچ های ***Aspergillus flavus*** و ***Fusarium***

*graminearum* مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که ترکیب منابع مختلف کربن و نیتروژن در محیط کشت *T. harzianum* از نظر آماری به طور معنی داری بر تولید براث کشت Trichoderma موثر بر روی دو پاتوژن گیاهی آزمایش شده تأثیر می گذارد. دکستروز به عنوان منبع کربن و آرد سویا به عنوان منبع نیتروژن بهترین ترکیب در محیط برای تولید براث کشت *T. harzianum* موثر بر *A. flavus* و *F. graminearum* بودند. حداکثر قطر ناحیه بازداری 31 میلی متر و 56/33 میلی متر در آن محیط ثبت شد(Mitrović et al., 2021). در بررسی Adams و همکاران یک میکروقارچ موجود در هوا بنام *Trichoderma yunnanense* بالاتر پتانسیل آنتاگونیستی (50-66٪) در برابر *آلترناریا براسیکولا*، *آلترناریا سولانی*، *آسپرژیلوس اوخراسئوس* را نشان داد اما کمتر پتانسیل در برابر *پنسیلیوم اکسالیکوم* (21.42%) را نشان داد(Adams et al., 2007).

Jantarac, & Thanaboripat متابولیت های ضد قارچ اتیل استاتی از گونه های Trichoderma با استفاده از روش انتشار دیسک کاغذی روی دکستروز آگار سیب زمینی در برابر *A. flavus* IMI 242684 آزمایش کردند که در غلظت 50 میلی گرم در میلی لیتر بهینه فعال بود. هنگامی که عصاره اتیل استات با غلظت 50 میلی گرم در میلی لیتر به دانه بادام زمینی اعمال شد رشد و تولید آفلاتوکسین (B1 و B2)توسط *A. flavus* IMI 242684 طی 21 روز نگهداری در دمای اتاق مهار شد(Jantarach & Thanaboripat, 2010). Ren اثر مهاری 20 جدایه آنتاگونیست Trichoderma در برابر ایزوله آفلاتوکسیژنیک *A. flavus*(Af-9) و کارایی آنها در کاهش تشکیل آفلاتوکسین و تولید متابولیت هایی با اثر بازدارندگی توسط جدایه های تریکودرما نیز مورد بررسی قرار گرفتند. اثر آنتاگونیستی Trichoderma علیه Af-9 با مهار رشد شعاعی کلنی‌ها و برهمکنش‌های قارچی در آزمون‌های مقابله دوگانه ارزیابی شد. در مجموع 8 جدایه از 20 جدایه بطور معنی‌دار باعث مهار رشد کشت های 3 روزه Af-9، از 13٪ تا

65٪ و در مجموع 14 ایزوله باعث کاهش معنی دار محتوای آفلاتوکسین B1 شد. کاهش محتوای AfB1 به ترتیب تا 84.9٪ و 71.1٪ در کشت های 7 و 15 روزه بود(Ren et al., 2022).

Zhang و همکاران 13 ترکیب، از قارچ Trichoderma جدا کردند که ترکیب شماره یک، بر علیه *باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اورئوس* موثر بودند(Zhang et al., 2017). Baazeem و همکاران از متابولیت های *Trichoderma hamatum* FB10 در برابر *A. avenae* ، *E. carafavora* فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی را نشان دادند(Baazeem et al., 2021).

Anwar & Iqbal از *Trichoderma harzianum* بر روی سویه‌های باکتریایی بیماریزای گیاهی و انسانی، در برابر باکتری های عامل پژمردگی گوجه فرنگی (*Xanthomonas campestris* و *Clavibacter michiganensis*) و سویه‌های باکتریایی بیماریزای انسانی (*اشریشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس*) اثر دادند و مشخص شد که دارای خواص آنتی بیوتیکی است، زیرا هر دو باکتری (بیماریزای گیاهی و انسانی) را مهار کرد(Anwar & Iqbal, 2017). Hassan و همکاران راندمان اثر تریکودرما برای سویه های ABSA-16، TSA-17 و ABSA-18 بر علیه قارچ ها بیماریزا در انار *P. implicatum*، *A. alternata*، *A. niger* و *F. Fusarium oxysporum chlamydosporum.* را به ترتیب 42.22–72.50 درصد، 42.30–70.21 درصد و 44.54–72.50 درصد را گزارش کرد(Hassan et al., 2022).

**و – جنبه جدید بودن و نوآوری در تحقیق:**

تاکنون هیچ پژوهش و تحقیقی درمورد افزایش حذف *آسپرژیلوس فلاووس* به وسیله تریکودرما در تنوع محیط کشت انجام نشده است.

**ز- اهداف مشخص تحقیق (شامل اهداف آرمانی، کلی، اهداف ویژه و کاربردی):**

**هدف اصلی:**

تغییرات شیمیایی ساختمان محیط کشت (سابرودکستروز براث، پتیتو دکستروز براث و چاپکس براث)در افزایش آنتاگونیسمی تریکودرما بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط تخمیری و غیر تخمیری

**اهداف جزیی:**

1- بررسی اثر متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش دیسک و چاهک برحسب نوع محیط کشت

2- بررسی میزان دز ممانعت کنندگی(MIC) و دز کشندگی(MFC)متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* برحسب نوع محیط کشت

3- بررسی اثر فلوکونازول روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش دیسک

4- بررسی درصد بازدارندگی تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* بطور مستقیم بر حسب نوع محیط کشت

5- بررسی اثر متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* و مقایسه آن با فلوکونازول.

**ح – در صورت داشتن هدف کاربردی، نام بهره‌وران** (سازمان‌ها، صنایع و یا گروه ذینفعان) ذکر شود (به عبارت دیگر محل اجرای مطالعه موردی): در این پژوهش اثر متابولیت تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* بر حسب نوع محیط کشت قابل توجه باشد، میتوان با ساخت فناوری دارویی برای تولید داروهای ضد قارچ جدید استفاده کرد.

**ظ- فرضیه های تحقیق:**

**فرضیه اصلی:**

متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* اثر داشته و قابل مقایسه با داروی فلوکونازول است و وابسته به نوع محیط کشت(سابرودکستروز براث، پتیتو دکستروز براث و چاپکس براث) است.

**فرضیه فرعی:**

1- متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش دیسک و چاهک بر حسب نوع محیط کشت اثر دارد.

2- میزان دز ممانعت کنندگی(MIC) و دز کشندگی(MFC)متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* پایین است و وابسته به نوع محیط کشت است.

3- فلوکونازول روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش دیسک هاله تشکیل می دهد.

4- تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* بطور مستقیم بر حسب نوع محیط کشت بازدارندگی رشد دارد.

5- متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* قابل مقایسه است با فلوکونازول و وابسته به نوع محیط کشت است.

**ط- سؤالات تحقیق:**

1-آیا متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش دیسک و چاهک بر حسب نوع محیط کشت اثر دارد؟

2-میزان دز ممانعت کنندگی(MIC) و دز کشندگی(MFC)متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* بر حسب نوع محیط کشت چقدر است؟

3- قطر هاله فلوکونازول روی *آسپرژیلوس فلاووس* به روش دیسک چقدر است؟

4- آیا تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* بطور مستقیم بر حسب نوع محیط کشت بازدارندگی رشد دارد؟

5-آیا متابولیت ثانویه تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* قابل مقایسه است با فلوکونازول و وابسته به نوع محیط کشت است ؟

**ک- تعریف واژه‌ها و اصطلاحات فنی و تخصصی (به صورت مفهومی و عملیاتی):**

**SC**: محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل

**گ-طراحی مطالعه:**

1-تهیه قارچ

2-کشت قارچ

3-تهیه سوسپانسیون کپک *آسپرژیلوس فلاووس*

4-تهیه متابولیت کپک تریکودرما تخمیری و غیر تخمیری در محیط کشت مختلف(سابرودکستروز براث، پتیتو دکستروز براث و چاپکس براث)

5-تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندکی (MFC ) متابولیت تخمیری و غیر تخمیری

6-مطالعه اثرات ضد میکروبی متابولیت تخمیری و غیر تخمیری به روش انتشار دیسک و چاهک

7-کشت متقابل(Dual) تریکودرما و *آسپرژیلوس فلاووس* بطور مستقیم در محیط کشت مختلف (سابرودکستروز آگار، پتیتو دکستروز آگار و چاپکس آگار)

8- تحلیل داده‌ها

## 5-روش تحقیق:

**شرح روش کار:**

**شرح کامل روش (میدانی، کتابخانه‌ای) و ابزار (مشاهده و آزمون، پرسشنامه، مصاحبه، فیش‌برداری و غیره) گردآوری داده‌ها :**

روش گردآوری اطلاعات میدانی و کتابخانه ای می‌باشد به این صورت که در ابتدا با استفاده از روش کتابخانه ای به گردآوری ادبیات و پیشینه تحقیق پرداخته شده و در ادامه در آزمایشگاه متابولیت ثانویه متابولیت تخمیری و غیر تخمیری تریکودرما روی *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط کشت های مختلف اثر داده خواهد شد.

**شرح کامل روش (میدانی) و ابزار (مشاهده و آزمون، پرسشنامه، مصاحبه، برداری و غیره) گردآوری داده‌ها**

**تهیه قارچ**

گونه تریکودرما و *آسپرژیلوس فلاووس* از مرکز کلکسیون میکروبی ایران(شهریار) تهیه خواهد شد.

**تهیه محیط کشت**

برای تهیه محیط کشت مقدار مورد نیاز از پودر را با مقدار معینی از آب مقطر مخلوط کرده به مدت 10 دقیقه روی شعله تکان داده، تا شفاف گردد. بعد از انجام این کار ارلن حاوی محیط کشت داخل اتوکلاو قرار داده و استریل شد بعد اتوکلاو، محیط کشت داخل پلیت ریخته شد(برابر دستوالعمل شرکت سازنده).

**کشت قارچ**(Fungal culture)

در آزمایشگاه ابتدا آمپول قارچ خریداری شده در محیط کشت سابرودکستروز آگار(SDA) کشت داده و در داخل انکوباتور در دمای25–28 درجه سانتی گراد به مدت ۳ تا ۵ روز قرار می گیرند. در مرحله بعد کلنی های قارچ از نظر میکرووسکوپی مورد بررسی قرار می گیرند(شهیری طبرستانی و همکاران، 1396).

**تهیه سوسپانسیون *آسپرژیلوس فلاووس***

ابتدا از یک کلونی مقداری کونیدی کپک را با مقداری(5 سی سی) آب مطر استریل یا سرم فیزیولوژی در یک لوله ای اضافه کرده و آنقدر لوله را تکان داده تا کاملاً مخلوط و یک دست شوند. برای تهیه سوسپانسیون کپک از لام نئوبار استفاده می شود که بایستی هر سی سی آن تعداد ۱×۱۰۶ سلول کپک($10^6$ cfu/ml) شمارش شوند. بدین طریق 10 لاندا از سوسپانسیون کپک تهیه شده را در وسط(+) لام نئوبار ریخته و در زیر میکروسکوپ تعداد کپک های موجود در 16 مربع وسط لام شمارش می شوند(حدود 4 عدد). با تقسیم مجموع تعداد کپک شمارش شده به 16، میانگین تعداد کپک در هر مربع بدست می

آید(0/25). از آنجایی که حجم هر مربع لام نئوبار $25\times10^{-8}$ سی سی می باشد، با تقسیم عدد این میانگین (0/25) در $25\times10^{-8}$، تعداد کونیدی کپک در یک سی سی بدست می آید که بایستی $1\times10^{6}$ برسد. با کم یا زیاد کردن حجم آب مقطر استریل و یا کم و زیاد کردن تعداد کونیدی اولیه کپک در لوله، سوسپانسیون کپکی، در هر سی سی $1\times10^{6}$ سلول کپک($10^6$ cfu/ml) تهیه می شود. از چنین سوسپانسیون کپکی در آزمایشات بعدی استفاده می شود( Khoshzaban et al., 2019: Strober, 1997: Bilal et al., 2012).

**تهیه متابولیت های غیر تخمیری و تخمیری کپک تریکودرما در سابرودکستروز براث، پتیتو دکستروز براث و چاپکس براث** (Extraction of Metabolites from Liquid Culture)

از کلنی تریکودرما در مرحله بعد به منظور تهیه متابولیت ثانویه کپک با فیلدوپلاتین استریل نمونه گیری شده و برای جداسازی کونیدی و میسلیوم، هر نمونه را با مقداری آب مقطر استریل موجود در لوله آزمایش مخلوط شده و سپس۵۰۰ لاندا محلول پلی اکسی اتیلن سوربیتان با نام تجاری توییین ۸۰ با سمپلر به نمونه اضافه شده و سانتریفیوژ در ۳ نوبت با فاصله زمانی۱۵ دقیقه انجام می شود. سپس با سمپلر، ۱۰۰۰ لاندا از کونیدی باقی مانده در پایین محلول گرفته می شود و به محیط کشت پتیتو دکستروز براث (PDB)منتقل شده و با انکوبه کردن در انکوباتور تکان دهنده به مدت10تا 14 روز در دمای 30 درجه متابولیت تهیه می شود. هفت روز اول این فرایند بصورت هوازی انجام می شود(برای متابولیت غیر تخمیری) و برای 7 روز بعدی بر روی درب ارلن ها پارافیلم زده شده تا شرایط جهت تخمیر بی هوازی گردد. سپس ارلن ها از انکوباتور خارج می شوند و برای جداسازی مایع بدست آمده از کپک موجود در محیط برای انجام سانتری‌فوژ به لوله های مخصوص منتقل می شوند. محتویات هر ارلن که معادل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت PDB می باشد، در ۱۰ لوله آزمایش به مقادیر مساوی ریخته می شود و در ۳ نوبت ۱۰ دقیقه ای با

دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ می گردد. سپس با سمپلر ۱۰۰۰ لاندا، محتویات لوله، به غیر از ۱ میلی لیتر پایینی که دارای خود قارچ می باشد، به آرامی استخراج و در ارلن‌های جداگانه ریخته می شود و در مرحله بعد یک لیتر اتیل استات 96٪به آن اضافه کرده و بعد 3 دقیقه فیلتراسیون محلول حاوی هر نمونه با استفاده از فیلتر های سر سرنگی انجام شده و جهت استخراج محیط کشت با یک روتاری تبخیری، تبخیر شده و سپس خشک می شود. به همین روش متابولیت تریکودرما در محیط کشت سابورودکستروز براث و چاپکس براث، جهت مقایسه تغییر محیط کشت در آنتاگونیسمی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس*، هم تهیه می گردد.

(Stracquadanio et al., 2020: Darshit & Pandya, 2018: Alhasan et al., 2019).

**تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی متابولیت های تخمیری و غیر تخمیری** ( MIC, Minimum Inhibitory Concentration)

جهت این کار، ابتدا رقت های متوالی متابولیت های ثانویه از کپک تریکودرما به شکل زیر تهیه می شود:

ابتدا ۱۱ لوله آزمایش استریل در نظر گرفته و به لوله های مورد نظر۱ سی سی از محیط سابورودکستروز براث افزوده و اتوکلاو شده، سپس بعد از آماده شدن محیط کشت، برای تهیه رقت های یک دوم با سمپلر ۱۰۰۰µl از متابولیت تهیه شده به لوله شماره ۱ که حاوی محیط سابورودکستروز براث است، افزوده شده و آن را کاملا شیک کرده و به این طریق رقت یک دوم از متابولیت مورد نظر در لوله 1 تهیه شده و بر همین اساس مقدار متابولیت در لوله اول ۵۰۰ µl/ml بدست می آید و سپس با استفاده از سمپلر ۱۰۰۰ µl از لوله شماره ۱ برداشته شده و به لوله شماره ۲ افزوده می شود و این عمل تا لوله شماره ۱۰ تکرار شده و در لوله شماره ۱۰مقدار ۱۰۰۰ µl برداشته و محلول اوت می شود. با این عمل در لوله ۱ تا ۱۰ به ترتیب مقدار500، 250، 125، 62.5، 31.25، 15.6، 7.8، 3.9، 1.9 و 0.9 میکرو لیتر بر میلی لیتر متابولیت

ثانویه وجود خواهد داشت. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کپکی *آسپرژیلوس فلاووس* به لوله های شماره یک تا یازده افزوده می شود. لوله شماره ۱۱ نیز به عنوان لوله کنترل یا شاهد که حاوی محیط کشت و سوسپانسیون کپکی می باشد در نظر گرفته می شود. سپس تمام لوله ها در انکوباتور 30 درجه سانتیگراد به مدت4 روز انکوبه شده و پس از آن، لوله ها برای تعیین MIC بررسی می شوند. برای تعیین آن ابتدا لوله کنترل بررسی شده و پس از تایید کدورت حاصل از رشد کپک، سایر لوله ها نیز به منظور یافتن کدورت حاصل از رشد کپک بررسی می شوند. لوله ای که دارای کمترین غلظت از متابولیت تریکودرما بوده و در آن کدورتی دیده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین می شود. به عبارتی مقدار متابولیت موجود در اولین (از طرف لوله 1 به 11) لوله فاقد کدورت، بعنوان MIC تعیین می شود. برای تعیین MIC تمام مراحل ۳ بار تکرار می شود( Espinel-Ingroff, et al., 2010 ).

**تعیین حداقل غلظت کشندکی متابولیت های تخمیری و غیر تخمیری** ( MFC, Minimum Fungicidal Concentration)

جهت تعیین MFC با توجه به نتایج MIC پلیت محیط سابورودکستروز آگار تهیه می شود و از لوله MIC و لوله های قبل از آن توسط سمپلر به میزان ۱۰ لاندا نمونه گرفته شده و به پلیت ها منتقل و از آن کشت خطی تهیه می شود. سپس این پلیت ها در انکوباتور 30درجه سانتیگراد به مدت 4 روز انکوبه می شود و پس از آن MFC محاسبه می شود که برابر است با کمترین غلظتی که باعث از بین رفتن ۹۹ درصد کپک های موجود می شود و بر اساس اینکه تعداد کپک کشت داده شده بر روی پلیت به میزان $10^6$ کپک بود، آن دسته از مواردی که تعداد کلنی کپک کمتر از 10 عدد و همچنین کمترین غلظت متابولیت ثانویه کپک تریکودرما از لوله MIC را شامل می شوند به عنوان MFC تعیین می گردد. برای تعیین MFC تمام مراحل 3 بار تکرار می شود(Stracquadanio et al., 2020).

**مطالعه ضد میکروبی متابولیت های تخمیری و غیر تخمیری به روش انتشار دیسک**( Agar Disk Diffusion test)

با توجه به نتیجه MIC، 3 دیسک کاغذی استریل (حدود 6 میلی متر در قطر) در نظر گرفته می شود. با استفاده از سمپلر یک دیسک با توجه به نتیجه MIC ، بعنوان دیسک اصلی متابولیت تریکودرما تلقیح می شود و برای کنترل، به میزان ۱۵ µl رقت های بالاتر و پایین تر از نتیجه MIC در دو دیسک دیگر متابولیت تلقیح شده و طی چند مرحله با کمک سمپلر روی دیسک ها ریخته می شود و بین این مراحل به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ٦٠ درجه سانتی گراد قرار گرفته تا خشک شود. 10 میکرولیتر(10 لاندا) سوسپانسیون کپکی را به صورت سفره ای با سوآپ استریل در محیط کشت سابورودکستروز آگار کشت داده سپس این دیسک ها روی سطح این محیط قرار داده شده و توسط پنس فیکس می شود. سپس پلیت‌ها در انکوباتور 30 درجه سانتی گراد به مدت 4 روز انکوبه می شوند. در مرحله بعد قطر هاله های ممانعت از رشد(Inhibition Zone Diameret-IZD) متابولیت ثانویه کپک اندازه گیری می شود و تمام مراحل بالا ۳ بار تکرار می‌شود. جهت مقایسه دیسک محتوی داروی فلوکونازول در وسط سابورودکستروز آگار گذاشته می شود

(Stracquadanio et al., 2020: Humphries et al., 2018: Darshit & Pandya, 2018 ).

**اثر ضد میکروبی متابولیت های تخمیری و غیر تخمیری به روش چاهک**(Agar Well Diffusion test)

برای انجام این تست در محیط SDA با سر سمپلر آبی در فواصل منظم از یکدیگر 4 چاهک ایجاد شد و 10 میکرولیتر (10 لاندا) سوسپانسیون کپکی را به صورت سفره ای با سوآپ استریل کشت داده و سپس متابولیت ها با توجه به نتیجه MIC به میزان 120 ، 140 ، 160 ، 180 و 200 میکرولیتر یا لاندا داخل

چاهک های پلیت اضافه می شوند. سپس پلیت‌ها بی حرکت نگه داشته تا متابولیت ها کاملاً در داخل محیط و اطراف چاهک‌ها نفوذ کنند و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت4 روز انکوبه می شوند. در مرحله بعد قطر هاله های ممانعت از رشد متابولیت ها اندازه گیری می شود و تمام مراحل بالا ۳ بار تکرار می شود (Stracquadanio et al., 2020).

**کشت متقابل تریکودرما و *آسپرژیلوس فلاووس* بطور مستقیم در محیط کشت(سابرودکستروز آگار، پتیتو دکستروز آگار و چاپکس آگار)** (Dual Culture Assay)

برای تعیین درصد بازدارندگی رشد شعاعی(Percentage Inhibitory of Radial Growth, PIRG) همزمان یک قطعه 5 میلی متری از کلنی 7 روزه تریکودرما و *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط سابورودکستروز آگار در دو نقطه مقابل هم کشت داده می شوند. پلیت کنترل فقط با کشت *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط سابورودکستروز آگار بدست می آید. پلیت ها به مدت یک هفته در دمای 30 درجه نگهداری می شوند. سپس با تعیین قطر کلنی ها، PIRG برابر معادله زیر بدست می آید:

$$PIRG = 100 \times \frac{(Dc - Dt)}{Dc}$$

Dc میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس* (کنترل)، Dt میزان رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور تریکودرما(Stracquadanio et al., 2020: شهیری طبرستانی و همکاران، 1396). این روش را میتوان با کشت دادن کلنی تریکودرما در وسط پلیت و در چهار طرف آن کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* را کشت داد تا با اندازه گیری میانگین قطر کلنی درصد بازدارندگی رشد را محاسبه کرد(Fan et al., 2023). به همین روش کشت متقابل تریکودرما و *آسپرژیلوس فلاووس* بطور مستقیم در محیط کشت پتیتو دکستروز آگار و چاپکس آگار، جهت مقایسه تغییر محیط کشت در آنتاگونیسمی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس*، هم انجام می شود.

**روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها**

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 20 انجام می شود و نمودارهای لازم توسط نرم افزار Excel رسم شده و میانگین و انحراف معیار قطر هاله ممانعت از رشد متابولیت های تخمیری و غیر تخمیری استخراج شده از تریکودرما، در روش چاهک و دیسک و میانگین های MIC و MFC متابولیت‌ها به تفکیک در 3 بار تکرار تست، تعیین و با آزمون دانکن در SPSS با هم مقایسه می شوند. مقادیر $p\leq0.05$ معنی دار در نظر گرفته می شوند.

**زمان بندی انجام تحقیق:**

| ردیف | مراحل اجرایی | زمان کل | |
|---|---|---|---|
| 1 | مطالاعات کتابخانه ای | 1 | |
| 2 | جمع اوری اطلاعات | 2 | |
| 3 | تجزیه تحلیل داده ها | 1 | |
| 4 | نتیجه گیری و نگارش پایان نامه | 2 | |
| 5 | تاریخ دفاع نهایی | 1 | |
| 6 | طول مدت اجرایی تحقیق | 6 | |

**جدول متغیر ها:**

| عنوان متغیر | نقش متغیر | نوع متغیر | نحوه اندازه گیری | مقیاس |
|---|---|---|---|---|
| تریکودرما | وابسته | کیفی/اسمی | میکروسکوپی و ماکروسکوپی | میلی متر |
| *اسپرژیلوس فلاووس* | وابسته | کمی/پیوسته | قطر هاله عدم رشد | میلی متر |
| نوع محیط کشت | وابسته | کمی/پیوسته | قطر هاله عدم رشد | میلی متر |

**منابع:**


حسین زینلی ع.، عباس زاده دهجی پ.،علایی ح.، حسینی فرد س. ج.، اخگری ع. (1399). بررسی تاثیر قارچ های تریکودرمای محرک رشد بر بهبود رشد و تغذیه درختان پسته در شرایط باغی. نشریه زیست شناسی خاک، 8(2)، 115-129.

شهیری طبرستانی م.، رهنما ک.، جهانشاهی م.، نصراله نژاد س. و فاطمی م.ح. 1396. استخراج و شناسایی متابولیت ثانویه Trichoderma atroviridae 6022 و بررسی اثرات ضد قارچی آنها. نشریه حفاظت گیاهان(علوم و صنایع کشاورزی). 31(1): 131-141

Alhasan, D. A., Husein, H. A., & Dawood, A. Q. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity of The Filtrate Crude Extract Produced by Aspergillus niger. *University of Thi-Qar Journal of Science*, *7*(1), 66-71.

Darshit, R., & Pandya, D. D. (2018). Screening and characteristic study of antimicrobial actinomycetes from near-by soil of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Pharma. Sci*, *10*, 66.

Espinel-Ingroff, A., Diekema, D. J., Fothergill, A., Johnson, E., Pelaez, T., Pfaller, M. A., ... & Turnidge, J. (2010). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six Aspergillus spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Journal of clinical microbiology*, *48*(9), 3251-3257.

Humphries, R. M., Kircher, S., Ferrell, A., Krause, K. M., Malherbe, R., Hsiung, A., & Burnham, C. A. D. (2018). The continued value of disk diffusion for assessing antimicrobial susceptibility in clinical laboratories: report from the clinical and laboratory standards institute methods development and standardization working group. *Journal of clinical microbiology*, *56*(8), 10-1128.

Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal activity of bioactive metabolites produced by Trichoderma asperellum and Trichoderma atroviride in liquid medium. *Journal of Fungi*, *6*(4), 263.

Mitrović I., Tančić Živanov S., Purar B., Trivunović Z., Mitrović B. (2021). Effect of different carbon and nitrogen sources combination in medium for production of biocontrol agent Trichoderma harzianum. Ratar. Povrt., 58 (1), 1-6.

García-Díaz, M., Gil-Serna, J., Vázquez, C., Botia, M.N., & Patiño, B. (2020). A Comprehensive Study on the Occurrence of Mycotoxins and Their Producing Fungi during the Maize Production Cycle in Spain. Microorganisms, 8, 141.

Beisl, J., Pahlke, G., Abeln, H., Ehling-Schulz, M., Del Favero, G., Varga, E., Warth, B., Sulyok, M., Abia, W., Ezekiel, C.N., & Marko, D. (2020). Combinatory efects of cereulide and deoxynivalenol on in vitro cell viability and infammation of human Caco-2 cells. Archives of Toxicology, 94:833-844.

Babec, B., Hladni, N., Šeremešić, S., Jocković, M., Ćuk, N., Gvozdenac, S., Miklič, V., & Vojnov, B. (2019). Feasibility of growing conventional confectionary sunflower hybrids in organic agriculture: preliminary results of organic trials. Ratarstvo i Povrtarstvo, 56(1), 26-33.

Bunbury-Blanchette, A., & Walker, A.K. (2019). Trichoderma species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against Fusarium basal rot of onion. Biological Control 130, 127-135.

Kifle, M.H., Yobo, K.S., & Laing, M.D. (2016). Biocontol of Aspergillus flavus in groundnut using Trichoderma harzanium stain kd. Journal of Plant Diseases and Protection -New Series, 124(1), 1-6.

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

Karmakar, P., SenGupta, K., Das, P., Bhattacharya, S. G., & Saha, A. K. (2021). Biocontrol and plant growth promoting potential of Trichoderma yunnanense. *Vegetos*, *34*, 928-936.

Adams P, de Leij FAAM, Lynch JM (2007) Trichoderma harzianum rifai 1295–22 mediates growth promotion of crack willow (Salix fragilis) saplings in both clean and metal-contaminated soil. Microb Ecol 54:306–313

Baazeem, A., Almanea, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P., & Abdel-Hadi, A. (2021). In vitro antibacterial, antifungal, nematocidal and growth promoting activities of Trichoderma hamatum FB10 and its secondary metabolites. *Journal of Fungi*, *7*(5), 331.

Jantarach, J., & Thanaboripat, D. (2010). The efficacy of ethyl acetate extract of Trichoderma culture broth on growth inhibition and aflatoxin production by

Aspergillus flavus IMI 242684. *CURRENT APPLIED SCIENCE AND TECHNOLOGY*, *10*(1), 19-29.

Ren, X., Branà, M. T., Haidukowski, M., Gallo, A., Zhang, Q., Logrieco, A. F., ... & Altomare, C. (2022). Potential of Trichoderma spp. for biocontrol of aflatoxin-producing Aspergillus flavus. *Toxins*, *14*(2), 86.

Anwar, J., & Iqbal, Z. (2017). Effect of growth conditions on antibacterial activity of Trichoderma harzianum against selected pathogenic bacteria. *Sarhad Journal of Agriculture*, *33*(4), 501-510.

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

Hassan, M. M., Soliman, M. M., Al-Otaibi, S., El-Shehawi, A. M., Taha, E. K. A., & Sayed, S. (2022). The effectiveness of Xanthium strumamrium L. Extract and trichoderma spp. Against pomegranate isolated pathogenic fungi in taif, Saudi Arabia. *Journal of King Saud University-Science*, *34*(6), 102185.

Kumar, V., Koul, B., Taak, P., Yadav, D., & Song, M. (2023). Journey of Trichoderma from pilot scale to mass production: A review. *Agriculture*, *13*(10), 1-37.

Mawar, R., Manjunatha, B. L., & Kumar, S. (2021). Commercialization, diffusion and adoption of bioformulations for sustainable disease management in Indian arid agriculture: prospects and challenges. *Circular Economy and Sustainability*, *1*(4), 1367-1385.

Saravanakumar, K., Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Kathiresan, K., Oh, D. H., & Wang, M. H. (2018). Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of Trichoderma atroviride. *Microbial pathogenesis*, *115*, 338-342.

Sun, Z. B., Sun, M. H., Zhou, M., & Li, S. D. (2017). Transformation of the endochitinase gene Chi67-1 in Clonostachys rosea 67-1 increases its biocontrol activity against Sclerotinia sclerotiorum. *AMB Express*, *7*, 1-9.

Víglaš, J., Dobiasová, S., Viktorová, J., Ruml, T., Repiská, V., Olejníková, P., & Gbelcová, H. (2021). Peptaibol-containing extracts of Trichoderma atroviride and the fight against resistant microorganisms and cancer cells. *Molecules*, *26*(19), 6025.

Woo, S.L., Hermosa, R., Lorito, M., Monte, E., 2023. Trichoderma: a multipurpose, plant beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. Nat. Rev. Microbiol. 21, 312–326.

Zhang, J. C., Chen, G. Y., Li, X. Z., Hu, M., Wang, B. Y., Ruan, B. H., ... & Yang, Y. B. (2017). Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from Trichoderma sp. *Natural product research*, *31*(23), 2745-2752.

Khoshzaban, F., Asl, A. D., Mirzaian, H., & Jameie, F. 2019. Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Myrtus Communis Leaves on Trophozoites and Cysts of Acanthamoeba: An In Vitro Study. IJML, 6(3): 219-225

Bhattacharyya, P.N., and D.K. Jha. 2011. Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface Aspergillus strain TSF 146. Int. J. Appl. Biol. Pharmac. Technol. 2(4):133-143

Ramos, H.P., and S. Said. 2011. Modulation of biological activities produced by an endophytic fungus under different culture conditions. Adv. Biosci. and Biotech. 2: 443-449.

Strober, W. (1997). Monitoring cell growth. *Current protocols in immunology*, *21*(1), A-3A.

Bilal, H., Hassan, S. A., & Khan, I. A. (2012). Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (Metarhizium anisopliae) for the control of Aedes

albopictus Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *2*(4), 298-300.