بررسی کنترل بیولوژیک بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* با استفاده از جدایه‌های مختلف قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* و فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه خیار

Evaluation of biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* using different isolates of *Trichoderma harzianum* antagonist and activation of defense mechanisms of cucumber plant

کاوه جوانشیرجاوید[1*]، حمیدرضا علیزاده[2] و جلال غلام‌نژاد[3]

دریافت: ۹۹/۵/۴ پذیرش: ۹۹/۹/۱۸

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار با عامل*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* یکی از بیماری‌های خسارت‌زا و مهم در گلخانه‌های خیار در ایران می‌باشد. قارچ‌کش‌های شیمیایی توانایی کنترل قابل قبول این بیمارگر را ندارند، همچنین بخاطر هزینه‌های اقتصادی آنها و اثر سوء روی محیط زیست، در سال‌های اخیر استفاده از عوامل بیوکنترل در مبارزه با بیماری‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. استرین‌های قارچ آنتاگونیست*Trichoderma* به‌عنوان عامل مؤثر بیوکنترل در مقابل طیف وسیعی از بیمارگرهای قارچی مطرح می‌باشند. در این مطالعه اثر جدایه‌های *Trichoderma*بر قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار بررسی شده است. تعداد سه جدایه *Trichoderma*(T11و T6 و T9) از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت گردید. میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)به‌عنوان مارکر مقاومت القایی، با استفاده از اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. همچنین تأثیر جدایه‌های *Trichoderma*در کنترل بیماری در شرایط گلخانه به روش خیساندن خاک با سوسپانسیون اسپور قارچ آنتاگونیست و بیمارگر بررسیگردید. هر سه جدایهT11و T6 و T9 تأثیر قابل قبولی بر بازداری از رشد *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*نشان دادند. در جدایه‌های T11 و T9 به ترتیب ۸۵/۵۱٪ و ۸۱/۰۳٪ بازدارندگی از رشد میسلیومی استرین F42 دیده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز طی هفت روز بعد از مایه‌زنی بررسی شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز چهارم و در جدایه T11مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت جدایه (*T.* T11 *harizianum*T11) بیشترین تأثیر را در بین جدایه‌های *Trichoderma*در القاء مقاومت داشته است.

واژگان کلیدی:خیار، بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه، مقاومت القایی،*Trichoderma*

۱-دپارتمان گیاهی دانشکده علوم کشاورزی، خاک و سیستم‌های کشاورزی، دانشگاه ایلینوی جنوبی، ایلینوی، ایالات متحده آمریکا

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

۳-استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: plant.1380@gmail.com

مقدمه

خیار *Cucumis sativs* یکی از مهم‌ترین گیاهان جالیزی در ایران و بسیاری از کشورها به‌شمار می‌آید. بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار گلخانه‌ای برای اولین بار از یونان گزارش و قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radices-cucumerinum* (Forc) به‌عنوان عامل بیماری معرفی شده است (Vakalounakis*et al*., 2004) و سپس از کشورهای کانادا، فرانسه و اسپانیا گزارش و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در گلخانه‌های خیار معرفی شد (Cerkauskas *et al*., 2001; Vakalounakis *et al*.,2004). در ایران، بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار یکی از عوامل محدود کننده کشت خیار بوده که برای اولین بار در سال‌های ۱۳۸۳و۱۳۸۴ از گلخانه‌های منطقه ورامین و پیشوا جداسازی و شناسایی شد (شهریاری و همکاران، ۱۳۹۰). زمانی‌که گیاه خیار مورد حمله فوزاریوم پژمردگی آوندی قرار می‌گیرد، قارچ وارد ریشه‌ها شده و به بافت‌های آوندی محدود می‌شود (Vakalounakis *et al*., 2004). مدیریت این بیماری شامل استفاده از ارقام مقاوم، استفاده از پیوندهای رویشی سالم (به صورت تحقیقاتی)، تناوب زراعی، تعویض خاک و ضدعفونی خاک با قارچ‌کش‌های تدخینی است(Qiu *et al*.,2012). استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی یکی از سریع‌ترین راه‌های مبارزه با بیماری‌های گیاهی است، اما آسیب به محیط زیست و سلامت انسان از یک طرف و مقاومت عوامل بیماری‌زا به ترکیبات شیمیایی از طرف دیگر محققان را بر آن داشت که به دنبال روش‌های جایگزین جهت جلوگیری از آثار مخرب این ترکیبات باشند (Javanshir Javid *et al*., 2016). موفقیت در صادرات محصولات زراعی و باغی بدون باقیمانده سموم شیمیایی، از یک طرف و تأثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زی، هزینه‌های اقتصادی آن و همچنین کاهش تأثیر آنها به علت ظهور نژادهای مقاوم به آفت‌کش‌ها از طرف دیگر سبب محدودیت کاربرد آنها بخصوص در کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زی شده است (Tripathi and Dubay, 2004).دلایل فوق دست‌یابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به‌عنوان یک چالش جدی فراروی محققان قرار داده است. بدین جهت در سال‌های اخیر دانشمندان توجه خود را به سمت تحقیق درباره توانایی میکروارگانیزم‌های مفید کنترل کننده آفات و بیماری‌های گیاهی معطوف کرده‌اند. عوامل کنترل زیستی رشد گیاه را افزایش داده و مکانیزم‌های مقاومت را در میزبان فعال می‌کنند و باعث افزایش تولید عملکرد و محصول می‌شوند (Harman *et al*., 2004).

میکروارگانیزم‌های مفید از طریق آنتی بیوز، آنزیم‌های تجزیه کننده نظیر کیتیناز و پروتئاز، پارازیتیسم، تحریک سیستم دفاعی گیاه، تحریک رشد گیاه و همچنین از طریق رقابت برای جا و غذا عمل می‌کنند (Toenniessen*et al*. 2003). استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست به منظور کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی هم‌سو با اهداف کشاورزی پایدار بوده و می‌تواند یک جایگزین مؤثر و امیدبخش برای مبارزه شیمیائی باشد (Vatchev, 2007). قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* sp. مشهورترین و مؤثرترین جنس قارچی در زمینه کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی است که خوشبختانه بعضی استرین‌های آن به تولید تجاری رسیده و در دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Harman and Kubicek,1998).گونه‌های این قارچ طیف میزبانی وسیعی دارند و با مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی (پارازیتیسم-رقابت-آنتی بیوز) بیمارگرهای مختلف را کنترل می‌کنند (Harman *et al*., 2004). این قارچ‌ها در پدیده مایکوپارازیتیسم از آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی مانند کتیناز و گلوکاناز بهره می‌گیرند (John *et al*., 2010). رقابت،

زمانی مؤثر است که کنیدی پاتوژن برای جوانه‌زنی نیاز به مواد غذائی خارجی داشته باشد (Batta, 1999).در فرآیند آنتی‌بیوز هم میکروارگانیسم با تولید موادآنتی‌بیوتیک خاصیت بیوکنترل خود را اعمال می‌کند. مقاومت القائی از مهم‌ترین روش‌های بیوکنترل در بافت زنده گیاهی است (Zhang *et al.*,2013). سلول‌ها و بافت‌های آسیب دیده گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا یا آسیب‌های مکانیکی و شیمیایی از خود واکنش‌های دفاعی نشان می‌دهند که هدف از این واکنش‌ها، دفاع در برابر حمله عوامل بیماری‌زا به‌صورت جلوگیری از رشد و توسعه آن‌ها و التیام زخم‌های ایجاد شده به وسیله صدمات مکانیکی یا شیمیایی است.

واژۀ مقاومت القایی به‌عنوان یک واژه عمومی پذیرفته شده و به عنوان کلیه واکنش‌هایی که به صورت فعال شدن مقاومت گیاه از طریق ایجاد موانع فیزیکی و شیمیایی میزبان در برابر عوامل زنده یا غیرزنده بیمارگر ابراز گردد، تعریف شده است (Kloepper *et al.*,1992). وقتی گیاه توسط عامل بیماری‌زا آلوده می‌شود، بسته به نوع تعامل ایجاد شده بین گیاه و بیمارگر عکس‌العمل گیاه ممکن است به صورت موضعی و یا سیستمیک بروز نماید که در حالت اول میزبان ترکیبات فنلی، اکسیژن‌های فعال، فیتوالکسین و ترکیباتی مثل سوبرین و لیگنین در گیاه افزایش یافته و باعث چوب پنبه‌ای و چوبی شدن می‌شوند و از نفوذ عامل بیمارگر جلوگیری می‌کنند و در حالت دوم علاوه بر ترکیبات مذکور میزان برخی آنزیم‌ها مانند پرکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز، گلوکاناز و ترکیبات دفاعی در گیاه افزایش می‌یابد (Ogalloand Mcclure,1996).

با توجه به این‌که عامل بیماری *F. oxysporum* f.sp. *radices-cucumerinum* یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گیاه خیار در ایران می‌باشد و از طرفی قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* sp. یکی از بهترین عوامل بیوکنترل شناخته شده است، لذا در این تحقیق، با استفاده از تعدادی از جدایه‌های *Trichoderma* sp. به‌عنوان عوامل آنتاگونیست، کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار بررسی شد. نتایج این تحقیق می‌تواند به تولید قارچ‌کشی با خصوصیات بالای بیوکنترلی منجر شود.

مواد و روش‌ها

تهیۀ قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (F42)

جدایه F42 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* جدا شده از خیار که بیماری‌زایی آن قبلاً اثبات شده بود (علیزاده و سالاری،۱۳۹۵)، از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شد.

جدایه‌های آنتاگونیست *Trichoderma*

نمونه‌برداری از خاک مزارع خیار به‌صورت اتفاقی از مناطق مختلف کشت خیار در مکان‌های مختلف از شهرستان ورامین (جلیل آباد، فیلستان، پیشوا، پاکدشت) صورت گرفت. نمونه خاک از مزرعه به‌طور تصادفی جمع‌آوری شد.جدایه‌های T6 و T9 از قارچ *T. harzianum* با استفاده از محیط انتخابی McFadden و Satin از خاک کشاورزی جدا شدند. ایزوله T22 به‌عنوان موفق‌ترین نمونه در بین جدایه‌های *T. harzianum* از آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تهران دریافت شد. بعد از انتقال جدایه‌های قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* به محیط کشت، سپس جدایه‌های به‌دست آمده از هر یک از نمونه‌های خاک

به محیط آب - آگار ۲٪ منتقل شدند و با گرفتن نوک ریسه از آنها و انتقال به محیط کشت PDA خالص گردیدند.

بررسی اثر جدایه‌های *Trichoderma* در کنترل استرین F42 در شرایط گلخانه

برای این منظور از گلخانه آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بخش بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران استفاده شد و سه جدایه *T. harzianum* برای ارزیابی تأثیر آن‌ها برکنترل بیماری درشرایط گلخانه استفاده گردید. بذور ضدعفونی شده خیار با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در گلدان‌های استریل ۱۴۰ گرمی (قطر دهانه گلدان ۵ سانتی‌متر)حاوی خاک سترون شامل خاک، ماسه، کود برگ (۲: ۱:۱) و مقداری پیت و پرلیت کشت گردید.گیاهچه‌ها در مرحله سه برگی توسط سوسپانسیون اسپور جدایه‌های *T. harzianum* با غلظت 10^6اسپور در میلی‌لیتر به میزان ۱۵ میلی‌لیتر به روش خیساندن خاک، در هر گلدان مایه‌زنی شد و ۲۴ ساعت بعد هر گیاهچه (گلدان۱۴۰ گرمی) توسط سوسپانسیون اسپور استرین F42مایه‌زنی گردید.جهت تهیه سوسپانسیون *T. harzianum*چند لوپ از محیط کشت این قارچ برداشتهشد، و بعد از مخلوط کردن با آب مقطر، غلظت آن در حد 10^6اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. گیاهچه‌ها به مدت ۴۵ روز در شرایط گلخانه (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس) نگهداری شدند و سپس از گیاهچه‌ها برای سنجش فاکتور شدت بیماری استفاده گردید. تیمار شاهد آزمایش فقط با سوسپانسیون اسپور *F.o*.f.sp. *radicis-cucumerinum* F42 مایه‌زنی گردید.آزمایش با پنج تیمار و چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار طبق روش Akrami*et al*.(2009) بررسی گردید.

بر اساس این روش، شدت بیماری با اعداد ۰ تا سه بیان می‌شود و درصد ظهور بیماری (Disease incidence=DI) از فرمول زیر محاسبه می گردد:

۰: هیچ علائمی در بوته‌های خیار مشاهده نشود.

۱: زردی روشن یا متوسطو پوسیدگی روی طوقه و ریشه‌های ثانویه و پوسیدگی طوقه در بوته خیار دیده شود.

۲: پژمردگی متوسط یاشدید بوته، پوسیدگی شدید در بالای ریشه و ریشه‌های ثانویه،پوسیدگی طوقه با یا بدون پوسیدگی کوتیلدون‌هاو تغییر رنگ آوندی درساقه.

۳:مرگ کامل بوته.

شدت بیماری (٪) =[مجموع (نمره × تعداد گیاهان آلوده) ÷ (بیشترین نمره ×تعداد تکرار)]× ۱۰۰

تهیه گیاهچه‌های خیار

بذور ضدعفونی شده خیار رقم بارز توسط هیپو کلریت سدیم ۰/۵ درصد در گلدان‌های استریل حاوی خاک، ماسه،کود برگ (۲: ۱:۱) و مقداری پیت و پرلیت کشت گردید و در شرایط گلخانه (شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی،دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. گیاهچه‌ها در مرحله ۳ برگی جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه سوسپانسیون اسپور جدایه‌های *T. harzianum* و استرین F42

اسپورهای قارچ مورد استفاده از کشت ۱۰ روزه روی محیط کشت PDAجداسازیشد؛ به این صورت که ابتدا لوپ از اسپور قارچ آنتاگونیست از روی محیط کشت برداشته شد و بعد در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم)توئین ۲۰ غوطه‌ور گردیدند. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت مورد نیاز استفاده شد. غلظت مورد نیاز ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود که با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به‌دست آمد (Saman, 2007).

بررسی برخی مکانیسم‌های دفاعی بیوشیمیایی گیاه

بذور ضدعفونی شده خیار رقم بارز در گلدان‌های استریل (شامل خاک مزرعه، ماسه،کود برگ به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ به همراه مقداری پیت و پرلیت) کشت شدند. گیاهچه‌های خیار در مرحله سه برگی توسط جدایه‌های *T. harzianum* و استرین F42 (به نسبت $۱۰^{۶}$Spore/ml)،به روش خیساندن خاک مایه‌زنی گردید. و گلدان‌ها در شرایط گلخانه (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۶- ۲۸ درجه سلسیوس) نگهداری شد. تیمارها در این بررسی شامل موارد زیر بودند:

۱)تیمار T11: سوسپانسیون اسپور جدایه T11 و F42

۲)تیمار T9: سوسپانسیون اسپورجدایه T9 و F42

۳)تیمار T6:سوسپانسیون اسپور جدایه T6 و F42

۴) تیمار شاهد آلوده: فقط سوسپانسیون اسپور F42

۵) تیمار شاهد: بدون مایه‌زنی قارچ

از گیاهچه‌ها بعد از مایه‌زنی به مدت ۷ روز نمونه‌برداری صورت گرفت، برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. آزمایشات به صورت طرح فاکتوریل ۵ × ۷ بر پایه کاملاً تصادفی که فاکتور A شامل ۵ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۷ زمان نمونه‌برداری ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ روز بعد از مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپور بود، در قالب طرح کاملاًتصادفی انجام شد و میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز در روزهای اول تا هفتم مورد بررسی قرار گرفت. برای هر تیمار در هر روز نمونه‌برداری ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره

به منظور ارزیابی و تعین میزان فعالیت آنزیم لازم است ارزیابی دقیقی از میزان کل پروتئین موجود در عصاره برگ گیاه مورد آزمایش صورت گیرد. بدین منظور برای تعیین غلظت پروتئین محلول عصاره از روش بردفورد(Bradford,1976) استفاده گردید.

استخراج پروتئین از بافت گیاه

نیم گرم از بافت گیاهی برگ در هاون چینی با استفاده از ازت مایع کوبیده و له شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول با pH=۶ به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲۰

دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. مایع رویی برای انجام آزمایش‌ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰-درجه سلسیوس نگهداری شد (Reuveni,1995).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

ارزیابی آنزیم پرکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر -Milton Roy Company-Unterfoehring Germany به‌صورت زیر انجام شد:

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات فسفات ۲۵ میلی‌مول pH ۵/۴تا به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر برسد، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۵ نانومتر صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به این مخلوط اضافه شد و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بردقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD/Min./mg.protein)(Reuveni, 1995).

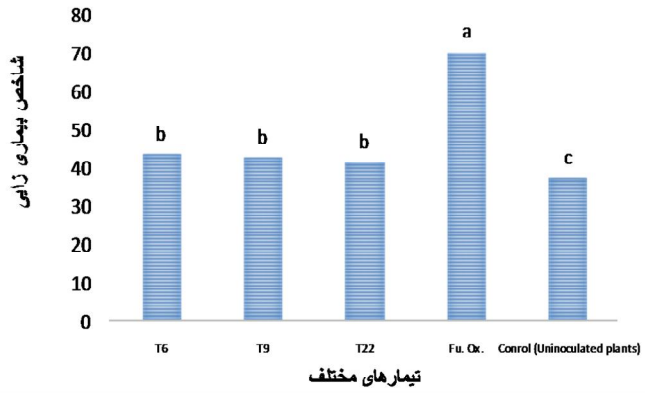
آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p \leq \%1$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

بررسی اثر جدایه‌های *T. harzianum* در کنترل استرین (*F.O*.f.sp. *radicis-cucumerinum* F42) در شرایط گلخانه

گیاهچه‌ها ۴۵ روز بعد از مایه‌زنی با سوسپانسیون اسپور قارچ آنتاگونیست و بیمارگر برای بررسی شاخص شدت بیماری مورد مطالعه قرار گرفتند(شکل ۱). بررسی فوق نشان داد که سه جدایهٔ قارچی T11 ،T9 و T6از *T. harzianum*، به میزان قابل قبولی بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار را کنترل کردند.



شکل ۱- بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز تولید شده در گیاه در حضور جدایه‌های *T. harzianum*

Fig. 1. Evaluation of changes in peroxidase activity produced in plants in the presence of *T. harzianum* isolates

نتایج حاصل از آزمایشات نشان می‌دهد که جدایه T11 بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را داشته و با تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین تیمار شاهد کمترین میزان فعالیت آنزیم را داشته است و با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داده است(جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس تاثیر تیمارها بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

Table 1. Analysis table of variance of the effect of treatments on peroxidase activity

میانگین مربعات Ms.	درجه آزادی df.	s.o.v	منابع تغییرات
212.25**	4	(Treatments)	تیمار
2.85**	10	(Error)	خطا
	14	(Total)	کل
6.59		(CV)	ضریب تغییرات

داده‌ها نرمال بودند. The data were normal.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه خیار در حضور جدایه‌های *T. harzianum* در روزهای مختلف نمونه‌برداری

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز تولید شده در گیاه در حضور جدایه‌های *T. harzianum* در روز اول

در روز اول نمونه‌برداری (اولین روز بعد از مایه‌زنی) بیشترین فعالیت آنزیم در تیمار شاهد آلوده و کمترین میزان فعالیت آنزیم در جدایه T6 مشاهده گردید (جدول ۳، شکل ۲) .

جدول۲- تأثیرتیمارهابرمیزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

Table 2. The effect of treatments on peroxidase activity

گروه‌بندی تیمارها Grouping of treatments	میانگین Mean	تیمار Treatments
a*	14.57**	T11
b	14	T6
c	13.45	Fusarium
c	13.38	T9
d	11.65	control

*گروه‌بندی بر اساس آزمون دانکن در سطح P≤%1 انجام شد..*Grouping was performed based on Duncan test at the level of P≤%1

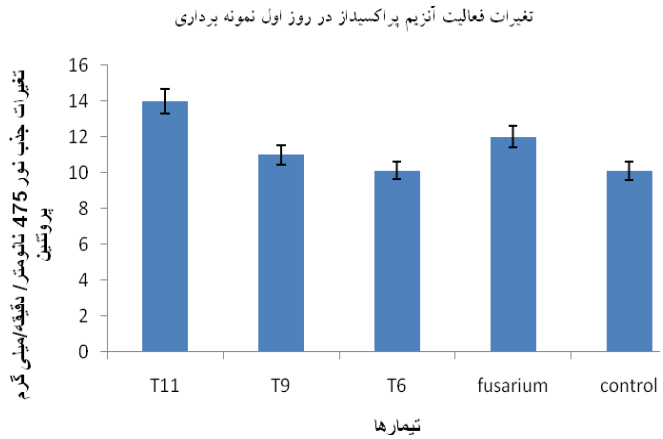
**اعداد میانگین چهار تکرار می‌باشد. **Data are the average of four repetitions.

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس تأثیرتیمارهابرمیزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز اول پس از تیمار

Table 3.Analysis of variance of the effect of treatments on peroxidase activity on the first day after treatment

میانگین مربعات Ms.	درجه آزادی df.	منابع تغییرات s.o.v
2.16.35**	4	تیمار (Treatments)
3.95**	10	خطا (Error)
	14	کل (Total)
9.19		ضریب تغییرات (CV)

داده‌ها نرمال بودند. The data were normal.



شکل ۲- تغیرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز اول پس از تیمار با جدایه‌های تریکودرما

Fig. 2. Changes in peroxidase activity on the first day after treatment with *Trichoderma* isolates

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز تولید شده در گیاه در حضور جدایه‌های *T. harzianum* در روز چهارم

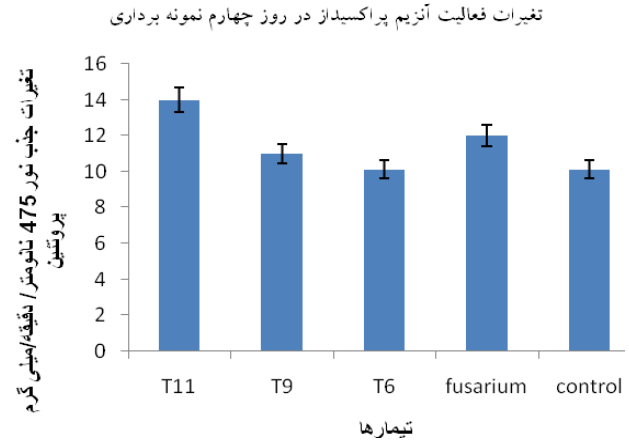
در روز چهارم نمونه‌برداری (چهارمین روز بعد از مایه‌زنی) بیشترین فعالیت آنزیم در تیمار ایزوله T11 و کمترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد مشاهده گردید (جدول ۴، شکل ۳) .

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس تأثیرتیمارهابرمیزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز چهارم پس از تیمار

Table 4. Analysis of variance of the effect of treatments on peroxidase activity on the fourth day after treatment

منابع تغییرات s.o.v	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Ms.
تیمار (Treatments)	4	221.17**
خطا (Error)	10	4.72**
کل (Total)	14	
ضریب تغییرات (CV)	11.20	

داده‌ها نرمال بودند. The data were normal.



شکل ۳- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز چهارم پس از تیمار با جدایه‌های تریکودرما

Fig. 3. Changes in peroxidase activity on the fourth day after treatment with *Trichoderma* isolates

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز تولید شده در گیاه در حضور جدایه‌های *T. harzianum* در روز هفتم

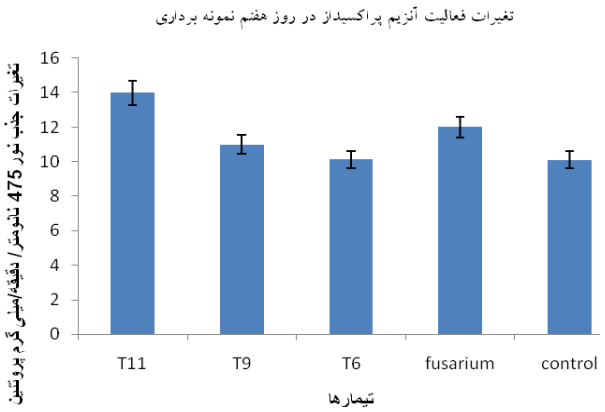
در روزهفتم نمونه‌برداری (هفتمین روز بعد از مایه‌زنی) بیشترین فعالیت آنزیم در T11و کمترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد مشاهده گردید (جدول ۵، شکل ۴).

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس تأثیرتیمارهابرمیـزان فعالیت آنزیم پراکسیـداز در روز هفتـم پس از تیمار با جدایه‌های تریکودرما

Table 5. Analysis of variance of the effect of treatments on peroxidase activity on the seventh day after treatment with *Trichoderma* isolates

منابع تغییرات s.o.v	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Ms.
تیمار (Treatments)	4	210.03**
خطا (Error)	10	2.02**
کل (Total)	14	
ضریب تغییرات (CV)	2.17	

داده‌ها نرمال بودند. The data were normal.



شکل ۴- تغیرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز هفتم پسازتیماربا جدایه‌هایتریکودرما

Fig. 4. Changes in peroxidase activity on the seventh day after treatment with *Trichoderma* isolates

تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* در روزهای مختلف بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که تیمار شاهد آلوده در روز چهارم آنزیم بیشتری را نسبت به بقیه تیمارها در روزهای مختلف داشته است. همچنین نتایج نشان داد که تیمار شاهد آلودهدر روز چهارم با تیمار جدایه T9 در روز پنجم از لحاظ فعالیت آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی‌داری نداشت.اما این تیمار با بقیه تیمارها در روزهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان داد.نتایج نشان داد که تیمار شاهد در روز دوم کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را داشته و با تمامی تیمارها در تمامی روزها تفاوت معنی‌داری را از لحاظ فعالیت آنزیم پراکسیداز داشت (جدول ۶).

جدول ۶- تأثیر تیمارها در روزهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

Table 6. Effect of treatments on different days on peroxidase activity

تیمارها Treatments	روز اول First day	روز چهارم Forth day	روز هفتم Seventh day
T11	12.82cd	14.95b	14.10bc
T9	10.10e	14.6b	11.92de
T6	14.27bc	15.05ab	10.67e
Fusarium	13.72c	16.05a	12.15cd
Control	11.6de	14.02b	10.67e

اعداد میانگین چهار تکرار است. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪≥P می‌باشد.

Data are the average of four repetitions. Non-identical letters indicate a significant difference at the level of P≤%1.

بحث

گیاهان به آلودگی با بیمارگرها با تغییر واکنش‌های بیوشیمیایی که در مجموع پاسخ‌های دفاعی نامیده می‌شوند، پاسخ می‌دهند. همچنین گیاهان در برابر بیمارگرها،با تولید موادی از قبیل فیتوالکسین‌ها، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی،ترکیبات فنلی اکسیده و آنزیم‌های مرتبط با این ترکیبات دفاع می‌نمایند (بصیرنیاو بنی‌هاشمی، ۱۳۸۵). اگر چه گیاهان مکانیزم‌های فعالی دارند، اما با بیمارگرهای ویرولانت آلوده می‌گردند. زیرا این بیمارگرها بیماری‌زایی خود را با سرعت بیشتری نسبت به دفاع گیاه اعمال می‌کنند، از تحریک جلوگیری کرده و یا واکنش‌های دفاعی را سرکوب نموده و یا این‌که اثرات دفاعی فعال شده را از بین می‌برند. بازدارندگی مؤثر بیماری‌ها توسط عوامل بیوکنترل تا حد بسیار زیادی از شرایط زنده و غیرزنده تأثیر می‌پذیرد (Al-Fatteh*et al*., 2007). مقاومت القایی که از آن به‌عنوان مقاومت سیستمیک القایی نیز یاد می‌شود، ترکیبی از فرایندهای بیوکنترل شامل مکانیسم‌های متفاوت است. همان‌طور که گفته شد مقاومت القایی ممکن است با ترکیبات شیمیایی(مولکول‌های محرک) یا توسط تعدادی از میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا ایجاد شود (Archer, 2002).طبق نتایج آتی‌تالا و همکارانحضور یا غیاب ژن‌های مقاومت عامل تعیین کننده در مقاومت حاصله نسبت به‌عوامل بیماری‌زا نیست، بلکه سرعت و مقدار بیان این ژن‌ها و میزان تأثیر این ترکیبات روی پاتوژن هدف است که سبب واکنش سازگاری یا ناسازگاری می‌شود(Attitalla *et al*., 2004).

بنابراین احتمالاً همه گیاهان پتانسیل ژنتیکی برای القاء ژن‌های مقاومت را به‌صورت بالقوه دارند. گیاهان می‌توانند چنین پتانسیلی را به‌صورت ایمنی بعد از تلقیح محدود به‌وسیله جمعیت پائین پاتوژن، تلقیح به‌وسیله جدایه‌های غیربیماری‌زای پاتوژن یا تیمار با مواد شیمیایی که به‌عنوان القاءگر محسوب می‌شوند و مواد شیمیایی که الیسیتور آزاد می‌کنند، بروز دهند.

عکس‌العمل گیاه ممکن است به‌صورت موضعی و یا سیستمیک باشد. تولید ترکیباتی مثل سوبرین باعث می‌شود اطراف محل آلودگی چوب‌پنبه‌ای شده و از نفوذ و توسعه عامل بیماری به بقیه قسمت‌های گیاه جلوگیری می‌شود. ضمناً میزان بعضی آنزیم‌ها مانند کیتیناز،پراکسیداز،کاتالاز و ترکیبات فنلی در گیاه افزایش می‌یابد و باعث ایجاد مقاومت در گیاه می‌گردند (Gholamnezhad, 2019).

ژن‌های مرتبط با مقاومت و واکنش‌های دفاعی گیاهان به‌طور معمول بیان نمی‌شوند مگر این‌که یک القاءکننده مقاومت آنها را فعال کرده و یا بیان آنها را افزایش دهد و یا تغییراتی که در متابولیسم گیاه ایجاد می‌کند، اثرات این ژن‌ها را افزایش دهد.در این پژوهش جدایه‌های آنتاگونیستی استفاده شده در این

تحقیق، آزمایش گلخانه‌ای برای تعیین شاخص شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار، به روش افزودن سوسپانسیون اسپور قارچ به‌طریق خیساندن خاک استفاده شد، کنترل کنندگی قابل قبولی در هر سه ایزوله مشاهده شد.

القاء مقاومت با افزایش و سنتز یک‌سری از واکنش‌های پیچیده در گیاه میزبان صورت می‌گیرد که باعث تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌شود. بسیاری از مواد که ماهیت پروتئینی دارند؛ از جمله آنزیم دفاعی پراکسیداز که در فرآیند لیگنینی شدن، تولید سوبرین و تانن مؤثرند، در نفوذناپذیر شدن بافت گیاه علیه نماتد مولد گره ریشه و سایر بیمارگرها نقش دارند.در این تحقیق آنزیم پراکسیداز به‌عنوان مارکرمقاومت القاییمورد بررسی قرار گرفت.

Mitchel and Walters (2004) نشان دادند که تیمار برگ‌های اولیه جو با فسفات پتاسیم منجر به کاهش معنی‌دار آلودگی برگ‌های ثانویه به قارچ سفیدک پودری *Blumeria graminis* f.sp *hordei* می‌گردد. تیمار با فسفات در برگ‌های اولیه منجر به افزایش معنی‌داری در فعالیت PAL، POX و لیپوکسی‌ژناز در برگ‌های ثانویه می‌گردد. فعالیت‌های آنزیمی، به‌ویژه PAL وPOX زمانی افزایش یافت که برگ‌های ثانویه گیاهان تیمار شده با فسفات با سفیدک سطحی مایه‌زنی گردیدند. بیمارگر سفیدک سطحی خیار *Sphaerotheca fuliginea*، *Pseudomonas syringas pv pisi* و اسیدسالیسیلیک فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، بتا ۱، ۳ گلوکاناز، پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و PAL را در بافت‌های برگ توتون ۲-۳ روز پس از مایه‌زنی افزایش می‌دهند. این آنزیم‌ها با تیمار عصاره گیاهان مختلف و اتیلن فعال گردیدند.

برخی مطالعات نشان می‌دهند که کاهش مقاومت (در دماهای مختلف) می‌تواند با کاهش ترکیبات فنلی ،PAL و فعالیت POX مرتبط باشد. کاهش سطح این آنزیم‌ها و سوبستراهایشان توانایی دفاع فعال را در سلول کاهش داده و گیاه را برای حمله بیمارگر مستعد می‌سازد (Arrigoni*et al*.,1979).

در ارتباط میزبان و عامل بیماری‌زا و وقتی که ارقام و حساس با هم مقایسه می‌شوند، در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد(Shetty and Wehner, 2002).ترکیبات فنلی نقش‌های مهمی در مقاومت دارند، بخصوص با ساختن موانع غیر قابل نفوذ مهمی که از انتشار بیمارگر و اثرات آنزیمی آن ممانعت می‌نمایند.

اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کینون‌های میکروبی توسط آنزیم‌های اکسیدکننده طی واکنش ناسازگار رخ می‌دهد و مقاومت گیاهان به بیماری اغلب با فعالیت این آنزیم‌ها و اکسیداسیون ترکیبات فنلی در بافت میزبان مرتبط می‌باشد (Mohammadi *et al.*, 2012).

ترکیبات فنلی توسط آنزیم‌های پراکسیداز به دی‌کینون‌ها تبدیل می‌گردند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که این دو آنزیم هر دو در پاسخ به عوامل زنده و غیرزنده افزایش می‌یابند. آنزیم POX به عنوان القاء شونده سیستمیک و مارکری برای القاء مقاومت در گیاه برای ایجاد cross-link و محکم کردن دیواره سلولی می‌باشد(Kuc, 2001). این آنزیم با دخالت در مرحله آخر تولید لیگنین باعث افزایش مقاومت به بیماری می‌گردد(Yao and Tian, 2005).

گیاهان به منظور از بین بردن اثرات رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های زنده و غیرزنده مکانیسم‌های دفاعی خود را به‌کار می‌گیرند، تجمع چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکساید

دیسموتاز،پلی‌فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به استرس، در گیاهان به اثبات رسیده است(Honty *et al*.,2005).

پراکسیدازها در فرآیند ساختن دیوارۀ سلولی مثل اکسیداسیون فنل،سوبرینی کردن و لیگنینی شدن سلول گیاهی در حین دفاع بر علیه عامل بیماری‌زا شرکت دارند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مثل پراکسیداز،سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز، ترکیباتی مثل H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کنندافزایش فعالیت پداز با القاء مقاومت ارتباط دارد(Gong *et al.*, 1997).

POXها به‌طور مستقیم فعالیت ضد بیمارگر ندارند، اما با کاتالیز فرآیندهای بیوشیمیایی که در مقاومت به بیماری نقش دارند،عمل می‌نمایند.POX در ایجاد سوپراکساید و لیگنینی شدن نقش دارند (Gholamnezhad, 2017).

مشخص شده است که افزایش فعالیت POX با القاء مقاومت سیستمیک در خیار و توتون در مقابل بسیاری از بیمارگرها مرتبط می‌باشد(Wang*et al*, 2010).

در واقع می‌توان گفت که تجمع پراکسیداز اغلب با شروع القاء مقاومت ارتباط دارد. این آنزیم در دفاع علیه پاتوژن‌ها بسیار فعال عمل می‌کند. در گیاهانی که دفاع خیلی دیر اتفاق می‌افتد، پاتوژن به راحتی بافت گیاه را کلونیزه می‌کند(Kuc, 2001).

پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و پلی‌مریزاسیون لیگنین باعث سفت شدن دیواره سلولی می‌شود، در نتیجه سدهای مکانیکی افزایش یافته و سرعت نفوذ عامل بیماری‌زا کاهش می‌یابد و به سلول‌های گیاه اجازه داده می‌شود که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال شدن به زمان بیشتری نیاز دارد تنظیم کند (Durner *et al.*, 1997).

در یک تحقیق انجام شده گزارش شد که تیمار درختان مانگو با باکتری *P. fluorescens* به‌علاوه کیتین بعد از ۱۵ روز موجب افزایش میزان فنل و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز،پلی‌فنل اکسیداز و PAL می‌گردد (Vivekananthan *et al*., 2004).

پاتوژن‌ها و نیز استرین‌های غیر بیماری‌زا سبب القاء متابولیت‌های مرتبط با مقاومت می‌شوند و متابولیت‌های ثانویه را القاء می‌کنند (Shimono *et al*., 2000).

در یک بررسی مخلوطی از عوامل بیوکنترل باکتریایی را جهت القا مقاومت میزبان علیه بیماری‌های گیاهی استفاده شد که نتایج بررسی این محققین نشان داد، گاهی ترکیب باکتری‌های آنتاگونیست می‌تواند توانایی آنها را برای القاء مقاومت میزبان افزایش دهد (Jetiyanon *et al*., 2002).

در این بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد نشان داده شد.نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در روز چهارم بعد از مایه‌زنی وبه ترتیب در تیمارهای T11 وT9 دیده شد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت جدایه T11 که استرین شناسایی شده*T. harzianum T11* می‌باشد، بهترین نتیجه را در القا مقاومت در گیاه مورد بررسی دارد.نتایج به‌دست آمده در گلخانه نیز مؤید این نقش می‌باشد، پس می‌توان از این جدایه در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار استفاده نمود.

یکی از دلایلی که می‌توان به اثر بیشتر یک جدایه در برانگیخته نمودن سیستم‌های دفاعی گیاه نسبت داد، تأثیر بر روی ژن‌هایی است که در دفاع گیاهی نقش دارند. قارچ تریکودرما دارای سیگنال‌های شیمیایی است که می‌تواند بر روی روشن شدن بیان ژن‌های دفاعی تأثیر گذارد، و با فعال نمودن آن‌ها، سیستم دفاعی گیاه را روشن نماید. یکی از این ژن‌ها که در گیاه تحت تأثیر سیگنال‌های شیمیایی قرار می‌گیرد، ژن NPR1 است. سیگنال‌های شیمیایی مانند ترکیبات فنلی بر روی بیان این ژن تأثیر می‌گذارند و با روشن نمودن آن، مکانیسم‌های دفاعی گیاه را فعال می‌سازند (Gholamnezhad, 2019).

در طولانی مدت هم می‌توان انتظار داشت که کنترل بیولوژیکی سطح کنترل قابل مقایسه‌ای را با سطح کنترل سموم شیمیایی به وجود آورند. نتایج به‌دست آمده بیانگر اهمیت توجه بیشتر به بحث کنترل بیولوژیکی در جهت کاهش خسارت بیماری‌های گیاهی می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که بسیاری از عوامل زراعی مانند تناوب، افزایش مواد اصلاح کننده خاک، تغییرات اسیدیته محیط و تغییر بافت خاک و غیره به نفع آنتاگونیست می‌تواند در استقرار آنتاگونیست مؤثر باشد و اثر آن‌ها را افزایش یا کاهش دهد، بررسی اثر آنتاگونیست‌های مورد نظر در شرایط مزرعه‌ای و خاک غیر استریل برای شناسایی شرایط ایده‌آل در جهت بالا بردن کارایی عوامل بیوکنترل و روش‌های به‌کار گرفته شده ضروری می‌باشد. مورد بعدی فرموله کردن مناسب عوامل بیوکنترل است که باعث بیشتر شدن اثر این عوامل و همچنین زنده‌مانی طولانی این عوامل می‌شوند.با توجه به این‌که آنتاگونیست‌ها بیشتر خاصیت پیشگیری کننده دارند تا خاصیت کنترل کنندگی، لذا تلفیق این روش‌ها با سایر روش‌های کنترل بیماری‌های قارچی که اثر سوء بر عامل آنتاگونیست ندارند و در عین حال سبب افزایش اثر آنتاگونیستی می‌شوند، می‌تواند مؤثر واقع شود.

منابع References

بصیرنیا، ط.، و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۵. بررسی انتقال *Fusarium oxysporum* f.sp.*sesami* با بذور کنجد در مزارع استان فارس. بیماری‌های گیاهی ۴۲(۱): ۱۱۷-۱۲۴.

شهریاری، د.، مولوی، ا.، امینیان، ح.، و اعتباریان، ح. ۱۳۹۰. واکنش هیستوپاتولوژیکی ارقام مقاوم و حساس خیار نسبت به قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه-*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. مجله به نژادی نهال و بذر ۲۷-۱(۳): ۳۷۵-۳۹۱.

علیزاده، ح.، و سالاری، خ. ۱۳۹۵. القای مقاومت علیه پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار بوسیله جدایه‌های تریکودرما و سودوموناده‌ای فلورسنت جدا شده از ریزوسفر خیار. پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی (دانش کشاورزی) ۵(۲): ۲۱۵-۲۲۵.

Akrami, M., Ibrahimov, A., Zafari, D.M. and Valizadeh, E. 2009. Control Fusarium rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in Greenhouse condition. Agriculture Journal 4(3): 121-123.

Al-Fatteh Dababat, A. and Sikora. A. 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognito* on Tomato. Jordan Journal Agricultural Sciences 3:297-309.

Archer, C. 2002. The use of honeybees as a transfer vector for core rot in apples. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC project, TAR-IA.RIRDC publication No.02-046

Arrigoni, O., Zacheo, G., Arrigone-Liso, R., Bleve-Zecheo, T. and Lamberti, F. 1979. Relationship between ascorbic acid and resistance intomato plants of *Meloidogyne incognata*. Phytopathology 69: 579-581.

Attitalla, H., Fatehi, J., Levenfors, J. and Brishammar, S. 2004. A rapid molecular method for differentiating two special forms (*lycopersici* and *radicis-lycopersici*) of *Fusarium oxysporum*. Mycological Research 18(7): 787-794.

Batta, Y.A. 1999. Biological effect of two strains of microorganisms antagonistic to *Botrytis cinerea*: causal organism of gray mold on strawberry. An-Najah University Journal for Research-A (Natural sciences) 13:67-83

Blakeman, J.P. and Fokkema, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20:167-192.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cerkauskas, R.F., Brown J. and Ferguson, G. 2001. First report of Fusarium stem and root rot of greenhouse cucumber caused by *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum* in Ontario. Plant Disease 85(9): 1028-1028.

Durner, J., Shah, J. and Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid and disease in plants. Trends in Plant Science 2: 266–274.

Gholamnejad, J., Etebarian H.R. and Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science 4: 001-007.

Gholamnezhad J. 2017. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Applied Microbiology in Food Industries 3(1): 53-66.

Gholamnezhad, J. 2019. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture 17(0): 1-10.

Gong, M., Li, Y., Dai, X., Tian, M. and Li, Z. 1997. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of HS induced thermotolerance in maize seeding. Journal of Plant Physiology 150: 615-621.

Harman, G. E. and Kubicek, P. K. 1998. Trichoderma and Gliocladium.Vol. 2.Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis, Londan, 393 p.

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.

Honty, K., Hevesi, M., Toth, M. and Stefanovits-Banyai, E. 2005. Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia aymlovora*. Proceeding of Hungarian Congressof Plant Physiology. Hungarian Conference of Photosynthesis 49: 127-129.

Javanshir Javid, K., Mahdian, S., Behboudi, K. and Alizadeh, H. 2016. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* by some *Trichoderma harzianum* isolates. Archives of Phytopathology and Plant Protection 49 (17-18): 471-484.

Jetiyanon, K., and Kloepper, J. W. 2002. Mixtures of plant growth-promoting *Rhizobacteria* for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. Biological Control 24: 285-291.

John, R.P., Tyagi, R.D., Prévost, D., Brar, S.K., Pouleur, S. and Surampalli, R.Y. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. Crop Protection 29(12): 1452-1459.

Kloepper, J.W., Tuzun, S. and Kuc, J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Science and Technology 2:349 – 351.

Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application.Pub med, 310p.

Mitchell, A.F. and Walters, D. R. 2004. Potassium phosphate induces systemic protection in barley to powdery mildew infection. Pest Management Sciense 60: 126-134.

Mohammadi, M.J., Abbasi, A. and Sabaghnia, N. 2012. Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). Acta Agriculture Slovenica 99(1): 31-40.

Ogallo, J.L. and McClure, M. A. 1996. Systemic acquired resistanceand susceptibility to root-knot nematodes in tomato. Phytopathology 86: 498-501.

Qiu, J.B., Huang, T.T., Xu, J.Q., Bi, C.W., Chen, C.J. and Zhou, M.G. 2012. β-Tubulins in *Gibberella zeae*: their characterization and contribution to carbendazim resistance. Pest Managment Science 68: 1191-1198.

Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. Pp. 99-114. In: Singh, R.P. and Singh, U. S.(eds.). Molecular Methods in Plant Pathology.

Saman, A. 2007. Biological control of *Fusarium solani f. sp. phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum*. Ruo 1. Ruhuna Journal of Science 2: 82-88.

Shetty, N.V. and Wehner, T.C. 2002. Screening the cucumber germ plasm collection for fruit yield and quality, Crop Science 42: 2174-2183.

Shimono, M., Yazaki, J., Nakamura, K., Kishimoto, N., Kikuchi, S., Kubo, N., Kadowaki, K., Mochizuki, A., Yamamoto, K., Sasaki, T. and Nishiguchi, M. 2000. Analysis of gene expression in rice plants treated with an inducer of disease resistance, probenazole using DNA microarray. Annals of the Phytopathological Society of Japan 66:115-116.

Toenniessen, G.H., O-Toole, J.C. and De-Vries, J. 2003. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. Current Opinion in Plant Biology 6:191-198.

Tripathi, P. and Dubay, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables review.Postharvest Biology and Technology 32: 235- 245.

Vakalounakis, D.J., Wang, Z., Fragkiadakis, G.A., Skaracis, G.N. and Li, D.B. 2004. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cumber in China by pathogenicity, VCGs and RAPD. Plant Disease 88: 645–9.

Vatchev, T.D. 2007. First report of Fusarium root and stem rot of greenhouse cucumber caused by *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* in Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science 13: 151-152.

Vivekananthan, R., Ravi, M. and Ramanathan, A.S. 2004. Lytic enzymes induced by *Pseudomonas fluorescens* and other biocontrol organisms mediate defense against the anthracnose pathogen in mango. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20(3):235-244.

Wang, X., Liu, W., Chen, X., Tang, C., Done, Y., Ma, J., Huang, X., Wei, G., Han, Q. and Huang, L. 2010. Differential gene expression in incompatible interaction between wheat and stripe rust fungus revealed by cDNA-AFLP and comparison to compatible interaction.BMC plant biology 10: 9.

Yao, H.J. and Tian, S.P. 2005. Effect of biocontrol agent methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms invoLned.Applied Microbiology 98:941-950.

Zhang, Y., Lubberstedt, T. and Xu, M. 2013. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. Journal of Genetics and Genomics 40: 23-35.

Evaluation of biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* using different isolates of *Trichoderma harzianum* antagonist and activation of defense mechanisms of cucumber plant

K. Javanshir Javid[1*], H. Alizadeh[2] and J. Gholamnezhad[3]

Received: 25 Jul., 2020 Accepted: 8 Dec., 2020

ABSTRACT

Root and stem rot of cucumber with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* is one of the most harmful diseases in cucumber greenhouses in Iran. Chemical fungicides do not have the acceptable ability to control this pathogen. Also, due to their economic costs and adverse effects on the environment, the use of biocontrol agents in the control plant diseases has been considered in recent years. *Trichoderma* antagonist isolates has been shown to be an effective biocontrol agent against a wide range of fungal pathogens. In this study, the effect of *Trichoderma* isolates on root rot and cucumber rot fungi was investigated. Three *Trichoderma* isolates were obtained from the mycology collection of the Department of Plant Protection, University of Tehran. Mean peroxidase activity (POX) as a marker of induced resistance was measured using a spectrophotometer. Also, the effect of *Trichoderma* isolates on disease control in greenhouse conditions was determined by soaking the soil with spore suspension of antagonist and fungal pathogen. All three *Trichoderma* isolates, T11, T6 and T9 have an acceptable effect on growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. radicis-cucumerinum. T11 and T9 isolates showed 85.51% and 81.03% inhibition of mycelial growth of F42 strain, respectively. Peroxidase activity was assessed within seven days after inoculation. The highest peroxidase activity was observed on the fourth day in T11 isolate. Based on the results obtained in this study, it can be concluded that T11 isolate (*T. harizianum* T11) had the greatest effect among Trichoderma isolates in inducing resistance.

Keywords: Peroxidase, Induction resistance, *Trichoderma harzianum*

1. School of Agricultural Sciences Department of Plant, Soil, and Agricultural Systems, Southern Illinois University, Illinois, United states of America
2. Assistant Professor, Department of Botany, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran
3 Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
Corresponding author: plant.1380@gmail.com