مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۹) تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۱۳۸-۱۲۵

Original Article

کنترل زیستی قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* و القای آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌های آنتاگونیست *تریکودرما* و *باسیلوس*

شهناز آل‌آقائی[۱]، سعید رضائی*[۲]، مصطفی عبادی[۳]، حمیدرضا زمانی‌زاده[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع‌غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲]استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع‌غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۳]استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. [۴]استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع‌غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: در اغلب کشورها به ویژه ایران، بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی از عوامل اصلی محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی است. باتوجه به تأثیر نامناسب کاربرد ترکیبات شیمیایی بر سلامت، مطالعه راهکارهای جایگزین برای کنترل بیماری حائز اهمیت است. این پژوهش با هدف ارزیابی قابلیت برخی جدایه‌های بومی قارچ *تریکودرما* و باکتری *باسیلوس* در کنترل زیستی قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* انجام شد.

مواد و روش‌ها: بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر *فوزاریوم* توسط جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس* در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین قابلیت کلونیزاسیون این جدایه‌ها نیز بررسی شد. تأثیر کاربرد مجزا و توأم جدایه‌های آنتاگونیست بر شاخص شدت بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی وبرخی عوامل رشدی گوجه‌فرنگی تعیین گردید. همچنین پتانسیل جدایه‌های یاد شده در القای آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاهچه‌های آلوده به بیمارگر *فوزاریوم* بررسی شد.

یافته‌ها: عوامل بیوکنترلی درجات مختلفی از بازدارندگی رشد *فوزاریوم* را نشان دادند. جدایه‌های *تریکودرما* با بازدارندگی قابل‌توجه (۷۲/۰۶٪ و ۶۹/۱۶٪)، در مهار بیمارگر موفق‌تر عمل کردند. این جدایه‌ها کلونیزه کننده‌های قدرتمند بیمارگر نیز بودند. آنتاگونیست‌ها با سطوح متفاوت بر شاخص شدت بیماری تأثیرگذار بودند. تیمارهای مجزا و ترکیبی جدایه‌های *تریکودرما* در مقایسه با *باسیلوس*، در کاهش شدت بیماری و بهبود عوامل رشد مؤثرتر بودند. سطح فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نیز در تیمارهای *تریکودرما* در مقایسه با شاهد (*فوزاریوم*) افزایش یافت. کاربرد هم زمان این جدایه‌ها در مقایسه با تیمار مجزا در القای آنزیم موثرتر بود.

نتیجه گیری: در این پژوهش جدایه‌های آنتاگونیست *تریکودرما* عملکرد موفقی در مهار بیمارگر داشتند، از این رو کاربرد این جدایه‌ها به عنوان عواملی با تأثیرات چند جانبه می‌تواند در کنترل زیستی بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی گوجه‌فرنگی کارآمد باشد.

واژگان کلیدی: *تریکودرما اتروویریده*، *تریکودرما هارزیانوم*، کلونیزاسیون، مقاومت القایی، واکنش دفاعی.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: آبان ماه ۹۷

*) آدرس برای مکاتبه: گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۰۸۴۷ پست الکترونیک: srezaee@srbiau.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مقدمه

بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی ناشی از قارچ خاکزاد *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*=Fol) یکی از بیماری‌های مهم و خسارت‌زای گوجه‌فرنگی است (۱ و ۲). این بیماری گسترش جهانی دارد (۳ و ٤) و در اغلب کشورهای دنیا از جمله ایران به محصول گوجه‌فرنگی خسارت قابل توجهی وارد می‌آورد (۵). بیماری پژمردگی آوندی موجب زردی، پژمردگی و ریزش برگ‌ها، قهوه‌ای شدن شدید بافت‌های آوندی در طول ساقه و در نهایت از بین رفتن گیاه می‌شود (٦). کنترل بیماری با استفاده از سموم شیمیایی، موجب ظهور مقاومت در جمعیت بیمارگر و از بین رفتن موجودات غیر هدف می‌شود و بر سلامتی انسان و محیط زیست نیز تأثیر سوء دارد (۷ و ۸). کاربرد سایر روش‌ها نیز با توجه به ماهیت خاکزاد قارچ عامل بیماری و بقای طولانی مدت آن در خاک با مشکلاتی مواجه است (۵ و ۹). استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید، به ویژه قارچ‌های آنتاگونیست *تریکودرما* و برخی رایزوباکترها مانند *باسیلوس* به عنوان راهکاری مکمل برای مهار قارچ بیمارگر محسوب می‌گردد (۳، ٤، ۷ و ۱۰).

برخی از عوامل میکروبی آنتاگونیست از طریق مکانیسم‌های متنوع بیمارگرهای گیاهی را مهار می‌کنند (۱۱ و۱۲). در مورد اغلب عوامل بیوکنترلی مکانیسم‌های آنتاگونیسم میکروبی مستقیم، شامل: مایکوپارازیتیسم، آنتی‌بیوزیس و رقابت گزارش شده است (۸). این برهمکنش‌های مستقیم سال‌های متمادی به عنوان مشخصه اصلی گونه‌های آنتاگونیستی شناخته شده است. مطالعات صورت گرفته در سال‌های اخیر ثابت کرده که در بسیاری از موارد مکانیسم‌های غیرمستقیم با واسطه گیاه که توسط عوامل آنتاگونیستی فعال می‌شوند، از طریق القای مقاومت سیستمیک (Induced systemic resistance = ISR) در گیاه نقش محوری در ممانعت از بیماری ایفا می‌کنند (۸، ۹، ۱۳ و ١٤).

در حضور میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست تغییرات مختلفی از جمله تغییرات بیوشیمیایی در گیاه رخ می‌دهد. یکی از واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه، تولید آنزیم‌های دفاعی مانند کیتیناز، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL)، پراکسیداز است که در سرکوب بیمارگر و حفاظت از گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو نقش دارند. به این ترتیب واکنش مصونیت در تمام بافت‌های گیاه فعال می‌شود و مقاومت القایی در برابر بیمارگرهای مختلف بروز می‌کند (۱۲).

تاکنون در دنیا نتایج موفقیت‌آمیزی از مهار قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی و القای پاسخ دفاعی در گیاه توسط برخی جدایه‌های آنتاگونیستی گزارش شده است. در یک بررسی جدایه‌ای از *تریکودرما ویریده* (*Trichoderma viride*) موجب بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر شده است و فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی را نیز افزایش داده است (۱). در مطالعه دیگری قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی از طریق فعال شدن سیستم دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌ای از *تریکودرما* و افزایش سطح آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز، مهار شده است (١٤). در ایران نیز در یک مطالعه تأثیر عامل بیوکنترلی بر مهار مستقیم قارچ بیمارگر *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* بررسی و القای فعالیت آنزیم دفاعی نیز تأیید شده است (٦).

با توجه به اهمیت بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در ایران و نیز عدم کارآیی کافی سایر روش‌های مهار این بیماری، مطالعه در زمینه کنترل زیستی بیمارگر توسط جدایه های آنتاگونیست بومی ضروری به نظر می‌رسد.

از آن جایی که بررسی مکانیسم‌های بیوکنترلی مورد استفاده توسط عوامل آنتاگونیست برای استفاده کاربردی از آن‌ها در برابر بیمارگر حائز اهمیت است، در این پژوهش قابلیت برخی جدایه‌های قارچ *تریکودرما* و نیز *باسیلوس* در بازدارندگی از قارچ عامل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی و اثر آن‌ها بر شاخص شدت بیماری و برخی فاکتورهای رشدی گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. به علاوه پتانسیل این جدایه‌ها در القای آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در گیاه ارزیابی گردید.

مواد و روش ها

الف) نمونه‌برداری و آزمون بیماری‌زائی قارچ بیمارگر Fol: در سال ۱۳۹٤ از شهرستان‌های ورامین و پیشوا، نمونه‌های گیاهان بیمار گوجه‌فرنگی با علائم زردی و پژمردگی، جمع‌آوری شدند. برای جداسازی قارچ عامل بیماری از بافت‌های آلوده و خالص‌سازی جدایه‌ها از روش موانی (Mwangi) و همکاران استفاده شد (۳). تشخیص گونه جدایه‌های *فوزاریوم* نیز با استفاده از منابع موجود (۱۵ و ۱٦) صورت گرفت. آزمون بیماری‌زائی جدایه‌های Fol، با روش راجیک (Rajik) و همکاران انجام شد (۲). این آزمون با ۱۵ تیمار (۱٤ تیمار مربوط به جدایه‌های *فوزاریوم* و یک تیمار شاهد سالم)، در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. بر اساس شدت و وقوع بیماری، قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱). دامنه میزبانی با بررسی بیماری‌زائی جدایه‌های بیمارگر روی میزبان‌های نخود، خیار، بادمجان، میخک و گوجه‌فرنگی تعیین شد (۱۷) و آزمون‌های تشخیص فرم اختصاصی Fol از *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *ردیسیس-لیکوپرسیسی* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*= Forl) صورت گرفت (۱۸).

ب) تهیه جدایه‌های آنتاگونیستتریکودرما و باسیلوس: جدایه‌های قارچ *تریکودرما* شامل جدایه Th14 از گونه *تریکودرما هارزیانوم* (*Trichoderma harzianum*) و جدایه Ta30 از *تریکودرما اتروویریده* (*Trichoderma atroviride*) که در مطالعات بیوکنترلی پیشین (۱۹) نتایج موفقیت‌آمیزی نشان داده بودند، به همراه جدایه‌ای از *باسیلوس* (*Bacillus* sp.) با کدBs35، از کلکسیون بخش بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ورامین دریافت گردید.

ج) ارزیابی قابلیت بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست در مقابل قارچ بیمارگر Fol: قدرت بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگرFol توسط جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس*، بر روی محیط کشت PDA (مرک، آلمان) ارزیابی شد (٤ و ۲۰). این آزمون با چهار تیمار، که شامل سه تیمار مربوط به جدایه‌های آنتاگونیست و یک تیمار شاهد بود در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. میزان بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست از رشد میسلیومی بیمارگر نسبت به شاهد، پس از پنج روز بر اساس رابطه $I\ \% = (C - T)/C \times 100$ محاسبه شد (۱). در این رابطه، I درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط آنتاگونیست، C میزان رشد عامل بیماری در شاهد (بر حسب میلی‌متر) و T میزان رشد عامل بیماری در تیمارها (بر حسب میلی‌متر) بود.

د) بررسی قدرت هایپرپارازیتیسم جدایه‌های آنتاگونیست: به منظور بررسی قابلیت کلونیزاسیون(استقرار) جدایه‌های آنتاگونیست، اندازه‌گیری میزان رشد پرگنه جدایه‌های *تریکودرما* و هاله بازدارنده جدایه *باسیلوس*، ۱٤٤، ۱٦۸و ۱۹۲ ساعت (روزهای شش، هفت و هشت) پس از کشت متقابل ادامه پیدا کرد. محاسبه درصد کلونیزاسیون *فوزاریوم* توسط جدایه‌های آنتاگونیست طبق رابطه زیر انجام شد:

کلونیزاسیون(٪)= قطر تشتک پتری/میزان رشد پرگنه (یا قطر هاله بازدارنده) آنتاگونیست در تیمارها× ۱۰۰

این آزمون با چهار تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید.

ه) تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما و باسیلوس بر شاخص شدت بیماری و برخی فاکتورهای رشدی: قابلیت جدایه‌های Th14، Ta30 و Bs35 در کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی به صورت کاربرد مجزای جدایه‌ها و ترکیب آن‌ها با یکدیگربه روش بوین (Boyhan) و همکاران همراه با تغییراتی انجام گرفت (۲۱). پس از تهیه زادمایه میکروارگانیسم‌ها (۱۳) آغشته‌سازی خاک با سوسپانسیون۱×۱۰^{۸} اسپور در میلی‌لیتر از جدایه‌های *تریکودرما* و سوسپانسیون باکتری با ۵×۱۰^{۷} واحد پرگنه ساز در میلی‌لیتر (به صورت مجزا و توأم) صورت گرفت و یک هفته بعد سوسپانسیون اسپور (۱×۱۰^{٦} اسپور در میلی‌لیتر) قارچ بیمارگر *فوزاریوم*، توسط سرنگ انسولین به ساقه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا وای (Early urbana y) که حساس به پژمردگی فوزاریومی می‌باشند، تزریق شد. تیمارها عبارت بودند از: گروه ۱: تیمار با آنتاگونیست‌ها به صورت مجزا و توأم به همراه مایه‌زنی با بیمارگر. گروه ۲: تیمار با آنتاگونیست‌ها (مجزا و

توأم) بدون مایه‌زنی با بیمارگر. گروه ۳: مایه‌زنی با بیمارگر به تنهایی (شاهد آلوده). گروه٤: تیمار با تزریق (آب سترون) و بدون تزریق به عنوان شاهد سالم. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار و در چهار تکرار اجرا شد.

در روزهای ۷، ۱۱، ١٤، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با بیمارگر، شاخص شدت بیماری ارزیابی شد (۲۲).برای محاسبه میزان کاهش شدت بیماری از رابطه زیر استفاده شد (۲۳).

کاهش شدت بیماری (٪)= شدت بیماری در تیمار شاهد آلوده (Fol)– شدت بیماری در تیمار مایه‌زنی شده با بیمارگر و جدایه آنتاگونیست/ شدت بیماری در تیمار شاهد آلوده × ۱۰۰

تأثیر جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس* بر فاکتورهای رشدی گیاه نیز در حدود یک ماه پس از مایه‌زنی با بیمارگر بررسی شد. مشخصه‌های مورد بررسی شامل ارتفاع گیاه، وزن تر ریشه و اندام‌های هوائی بود. این آزمون براساس روش چوداپا (Chowdappa) و همکاران اجرا شد (٢٤).

و) سنجش فعالیت آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL): این آزمون به منظوربررسیکارآیی جدایه‌های آنتاگونیست در القای تغییر در فعالیت آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به بیمارگر Fol انجام شد. تیمارهای این آزمون مشابه بند قبل بودند. نمونه‌برداری از تیمارها با چهار تکرار در روزهای ۰، ۷، ۱۱، ١٤، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با Fol صورت گرفت (١٤). این آزمون به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفیاجرا شد.

برای تهیه عصاره آنزیمی روش مدهاین (Madhaiyan) و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۲۵). فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز به روش ونگ (Wang) و همکاران همراه با تغییراتی ارزیابی شد (۲٦). مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر ال–فنیل آلانین (مرک، آلمان) ۱۰ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیم در ۵/۲ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار) با pH برابر ۸/۸ تهیه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون مخلوط در ۳۷°C، ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید یک مولار اضافه گردید و انکوباسیون در ۳۷°C ادامه پیدا کرد. میزان جذب ترانس‌سینامیک اسید تشکیل شده از ال–فنیل‌آلانین توسط اسپکتروفتومتر در ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت سینامیک اسید، از رابطه A = ε.b.c استفاده شد.

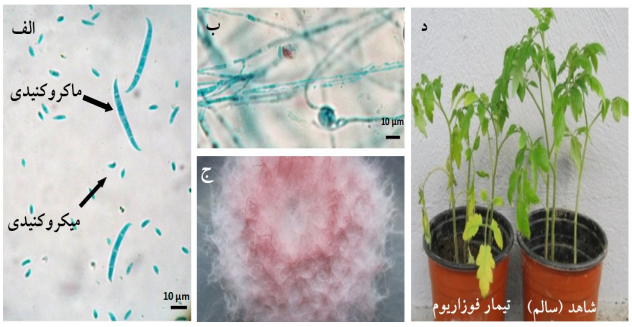
در این رابطه، A مقدار نور جذب شده توسط محلول (بدون واحد اندازه‌گیری)، ε ضریب جذب مولی یا ضریب خاموشی (mol^{-1}. cm. L)، b قطر کووت (یک سانتی‌متر) و c غلظت ماده مورد نظر (mol/L) بود. در این آزمون ضریب خاموشی معادل ۹۵۰۰ مول$^{-1}$. سانتی‌متر. لیتر در نظر گرفته شد (٢٦).

ز) ارزیابی کمی پروتئین کل: استخراج پروتئین تام از نمونه‌های گیاهی با روش مدهاین (Madhaiyan) و همکاران انجام شد (۲۵). معرف برادفورد تهیه شد و آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin=BSA) به عنوان پروتئین استاندارد مورد استفاده قرار گرفت (۲۷). برای تعیین غلظت پروتئین از روش استاندارد برادفورد (Bradford) استفاده شد و جذب به روش اسپکتروفوتومتری در ۵۹۵ نانومتر ارزیابی گردید (۲۷).

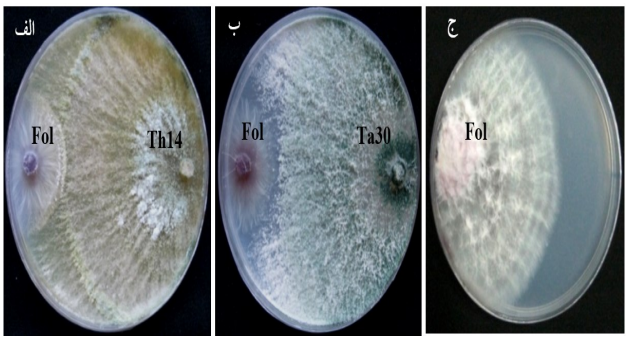
ح) تجزیه و تحلیل‌های آماری: در این پژوهش آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط جدول تجزیه واریانس انجام گرفت. میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال $p\leq$۰/۰۵ مورد مقایسه قرار گرفتند. به منظور انجام محاسبات آماری از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) استفاده شد. آزمون‌ها سه مرتبه با چهار تکرار اجرا شدند.

یافته‌ها

الف) شناسایی و آزمون بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری: پس از خالص‌سازی قارچ‌های جداسازی شده از گیاهان، از بین جدایه‌های مورد بررسی، ١٤ جدایه گونه *فوزاریوم اکسیسپوروم* تشخیص داده شدند. در تمام جدایه‌ها، ماکروکنیدی‌های قایقی شکل با سه دیواره عرضی (شکل ۱ الف)، سلول انتهایی دارای خمیدگی، سلول پایه به شکل پا و با اندازه ٤٧–٢٦×٥–٣ میکرومتر تشکیل گردید. میکروکنیدی‌های بیضوی یا قلوه‌ای شکل (شکل ۱ الف)، با ابعاد ١٢–٥×٣/٤–٢/٣ میکرومتر روی مونوفیالیدهای کوتاه تولید شدند. پس از ٤–٢ هفته نیز تعداد فراوانی کلامیدوسپور به صورت منفرد (شکل ۱ ب)، با اندازه



شکل ۱: (الف) ماکروکنیدی و میکروکنیدی، (ب) کلامیدوسپور، (ج) پرگنه قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* در محیط‌کشت PDA را نشان می دهد و (د) علایم زردی، پژمردگی و کاهش رشد ناشی از بیمارگر *فوزاریوم* در مقایسه با شاهد در آزمون اثبات بیماری زائی است.



شکل ۲: بازدارندگی از رشد پرگنه فوزاریوم (Fol) توسط جدایه‌های آنتاگونیست Th14 از گونه *تریکودرما هارزیانوم* (الف) و Ta30 از گونه *تریکودرما اتروویریده*(ب) در مقایسه با شاهد (ج).

۷/۵×۱۲/٦ در تمام جدایه‌ها مشاهده شد. میسلیوم‌های جدایه‌های *فوزاریوم* در سطح محیط کشت نسبتاً متراکم و سفید بودند که به تدریج بنفش رنگ شدند (شکل ۱ج). میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵°C، بعد از چهار روز در حدود ٤٥ میلی‌متر بود. رنگ سطح زیرین پرگنه نیز به دلیل تولید رنگ‌دانه به رنگ بنفش تغییر یافت.

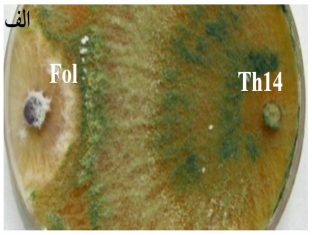
در آزمون اثبات بیماری‌زائی علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی (شکل ۱د)، توسط تمامی جدایه‌های بیمارگر در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی ایجاد شد. در بین جدایه‌های مورد بررسی یک جدایه که به اختصار Fol نام‌گذاری شد، با توجه به این که به طور معنی‌داری ($p\leq$ ۰/۰۵)درصد وقوع و شدت بیماری بالاتری (به ترتیب با ۸۷/٤۰٪ و ٦٤/۱۵٪) نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد، به عنوان جدایه با قدرت بیماری‌زائی بالا برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شد.

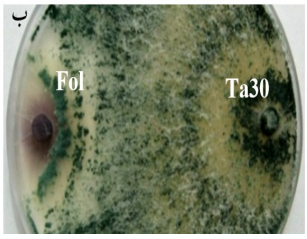
جدایه منتخب *فوزاریوم* از بین گونه‌های گیاهی مورد آزمون، فقط بر روی گوجه‌فرنگی علایم بیماری پژمردگی آوندی نشان داد. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده، دمای بهینه رشد این جدایه بر روی محیط کشت ۲۸°C بود و در دمای ۱۸°C که دمای بهینه برای قارچ Forl است، رشد چندانی نداشت. به علاوه علائم ایجاد شده در گیاه به صورت قهوه‌ای شدن گسترده آوندها بود و علایم تغییر رنگ ناحیه طوقه به صورت سطحی مشاهده نشد و تنها محدود به آوندها بود، در حالی که تغییر رنگ آوندی در فرم اختصاصی Forl محدود به چند سانتی‌متر پایین ساقه است و علایم قهوه‌ای شدن طوقه به صورت سطحی نیز قابل مشاهده است. بنابراین این گونه *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* تشخیص داده شد.

بازدارندگی از رشد بیمارگر فوزاریوم در محیط‌کشت: براساس نتایج حاصل از ارزیابی قدرت بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست در کشت متقابل، جدایه‌های مورد آزمون در مقایسه با شاهد درجات مختلفی از بازدارندگی از رشد بیمارگر را نشان دادند (شکل ۲).

جدایه‌های Th-14 و Ta-30 به طور معنی‌داری ($p\leq$ ۰/۰۵) از قابلیت بازدارندگی بالاتری نسبت به جدایه Bs-35 برخوردار بودند (جدول ۱). علاوه بر تشتک پتری مربوط به جدایهBs-35 (*باسیلوس*)، در مورد جدایه *تریکودرما اتروویریده* (Ta-30) نیز هاله بازدارنده در برابر بیمارگر ایجاد شد.

ب) کلونیزاسیون پرگنه فوزاریوم توسط عوامل آنتاگونیستی: اندازه‌گیری میزان رشد پرگنه و هاله بازدارنده جدایه‌های آنتاگونیست و محاسبه درصد کلونیزاسیون پرگنه *فوزاریوم* نشان داد جدایه‌های Th14 و Ta30 با قابلیت بالای کلونیزاسیون پرگنه فوزاریوم، به ترتیب شش و هفت روز پس از کشت متقابل، به طور کامل تشتک پتری را پوشش دادند و قدرت هایپرپارازیتی بالاتری نسبت به جدایه *باسیلوس* داشتند (شکل ۳ و ٤). جدایه Bs-35 حتی پس از ۱۰ روز نیز موفق به مهار کامل میسلیوم‌های Fol نشد.





شکل ۳: پوشش‌دهی کامل پرگنه *فوزاریوم* توسط جدایه‌های Th14 از گونه *تریکودرما هارزیانوم* (الف) و Ta30 از گونه *تریکودرما اتروویریده*(ب) به ترتیب شش و هفت روز پس از کشت متقابل.

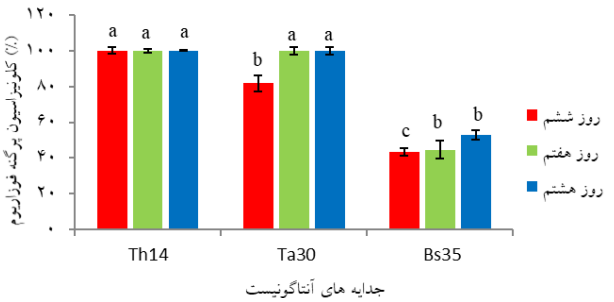
ج) کاهش شدت بیماری و اثر آنتاگونیست‌ها بر رشد گیاه: نتایج به دست آمده از ارزیابی اثر جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس* بر شاخص شدت بیماری نشان داد که این جدایه‌ها با سطوح مختلفی بر کاهش شدت بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی موثر بودند. در این بررسی مشخص شد تیمار مربوط به کاربرد توأم جدایه‌های *تریکودرما*(Th14+Ta30+Fol) به طور معنی‌داری بیشترین اثر را بر کاهش شاخص شدت بیماری داشت (جدول ۲).

در این آزمون ترکیب جدایه‌های *تریکودرما* با یکدیگر در مقایسه با تیمارهای تلفیقی مربوط به جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس* موفق‌تر عمل کردند. همچنین کاربرد مجزای جدایه‌های Th14 از گونه *تریکودرما هارزیانوم* (تیمارTh14+Fol) و Ta30 از گونه *تریکودرما اتروویریده* (تیمار Ta30+Fol) نیز در مقایسه با تیمار مجزای *باسیلوس* (Bs35+Fol) موثرتر بود (جدول ۲).

جدول ۱: میانگین رشد پرگنه *فوزاریوم* و درصد بازدارندگی از آن توسط جدایه‌های آنتاگونیست، پنج روز پس از کشت متقابل.

تیمارها	میانگین رشد پرگنه فوزاریوم (میلی‌متر)	بازدارندگی از رشد فوزاریوم (٪)
Th14+Fol	۱۰/۷۸	۷۲/۰٦ a*
Ta30+Fol	۱۱/۸۹	٦۹/۱٦a
Bs35+Fol	۳۵/٦٦	۷/۷٤b
Fol	۳۸/٦٦	–

*براساس آزمون چند دامنه دانکن حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در $p\leq$ ۰۵/۰ هستند. Th14: *تریکودرما هارزیانوم*؛ Ta30: *تریکودرما اتروویریده*؛ Bs35: *باسیلوس*؛ Fol: *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی*.



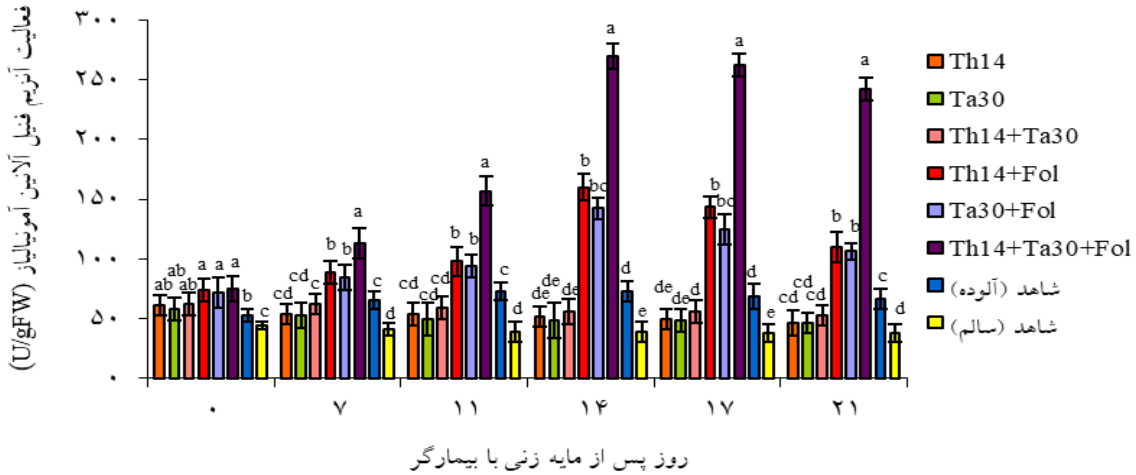
شکل ٤: میزان کلونیزاسیون پرگنه فوزاریوم (بر حسب درصد) توسط جدایه‌های *تریکودرما* (Th14 و Ta30) و *باسیلوس* (Bs35) در روزهای ششم، هفتم و هشتم پس از کشت متقابل. میله‌های عمودی بیان‌گر± انحراف معیار است. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. براساس آزمون چند دامنه دانکن، میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤۰۵/۰ هستند.

بررسی ارتفاع، وزن تر ریشه و اندام‌های هوائی گیاهان در تیمارهای مربوط به جدایه‌های آنتاگونیست همراه با *فوزاریوم* نشان داد که تیمار با جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس* بر مشخصه‌های رشدی گوجه فرنگی موثر بوده و این مولفه‌ها در تیمارهای یاد شده به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد آلوده بیشتر بود. بیشترین ارتفاع گیاهان در تیمارهای Th14+Ta30+Fol، Th14+Fol و Th14+Bs35+Fol ثبت شد (جدول ۲). تیمار با جدایه‌های *تریکودرما* به صورت هم زمان و مجزا در مقایسه با تیمار با جدایه *باسیلوس*، میانگین بالاتری از وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی را در سطح احتمال $p\leq$ ۰/۰۵ نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲: تأثیر کاربرد مجزا و هم زمان جدایه‌های آنتاگونیست *تریکودرما* و *باسیلوس* بر شاخص شدت بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی و برخی فاکتورهای رشدی گوجه‌فرنگی.

تیمارها	کاهش شدت بیماری (٪)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر اندام‌های هوایی (گرم)
Ta30+Fol	۷۷/۹۲c	۳٦/۷٤b	۹/٤۲ ab	۳۱/۵۷ bc
Ta30+Bs35+Fol	۷۸/۱٤c	۳۵/۹۱ bc	۹/٤۷ ab	۳۰/۰۸ c
Bs35+Fol	٤۲/۵۱ d	۳٤/۷۰ c	۹/۰۷ b	۲۸/۹۷ d
Th14+Fol	۷۹/٦۸ bc	۳۷/۱۵ ab	۱۰/۲۵ a	۳۲/٦۵ b
Th14+Bs35+Fol	۸۰/۱۳ b	۳۷/۲٦ ab	۱۰/۰۹ a	۳۲/۵۱ b
Th14+Ta30+Fol	۸٦/۷۷ a	۳۸/۸۰ a	۹/٦۰ ab	۳٤/۸۹ a
شاهد (Fol)	-	۲۸/۵۰ d	٦/۱۲ c	۲٤/۷۲ e

*براساس آزمون چند دامنه دانکن حروف در هر ستونمشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤ ۰۵/۰ هستند. Th14: *تریکودرما هارزیانوم*؛ Ta-30: *تریکودرما اتروویریده*؛ Bs35: *باسیلوس*؛ Fol: *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی*.



شکل ۵: فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با جدایه‌های Th14 (*تریکودرما هارزیانوم*) و Ta30 (*تریکودرما اتروویریده*) به طور مجزا و توأم با یکدیگر، در روزهای ۰، ۷، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با بیمارگر Fol (*فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی*). میله‌های عمودی بیان‌گر± انحراف معیار است. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. براساس آزمون چند دامنه دانکن، میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در $p\leq ۰/۰۵$ هستند.

د) فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز: بر اساس نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز مشخص شد بین فعالیت این آنزیم در تیمارهای Th14+Fol، Ta30+Fol و Th14+Ta30+Fol با تیمار شاهد آلوده (Fol)، در روزهای نمونه‌برداری، اختلاف آماری معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) وجود داشت (شکل ۵).

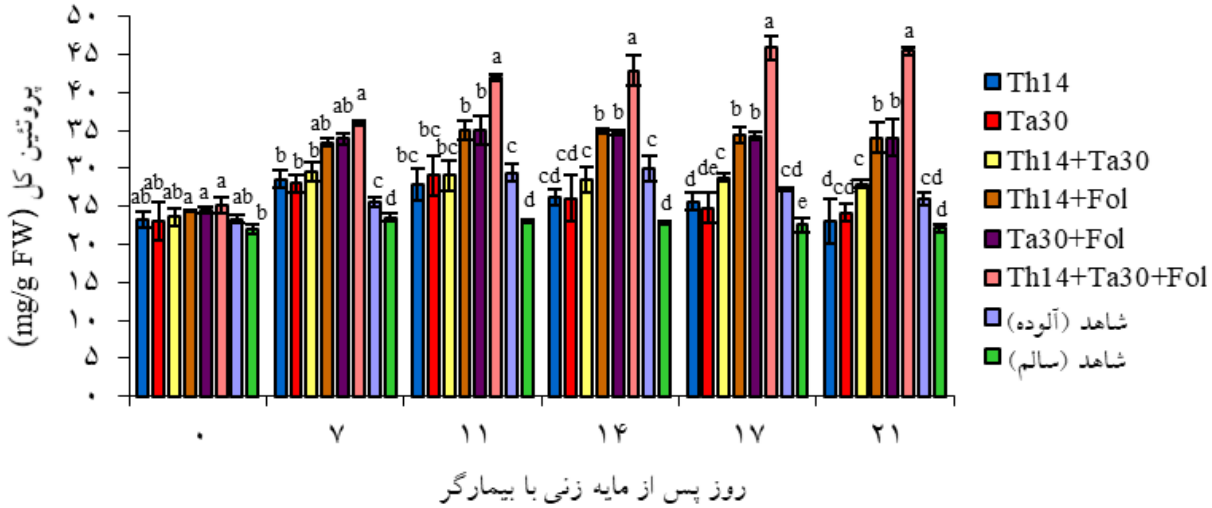
فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در روز چهاردهم پس از مایه‌زنی با *فوزاریوم* در تیمارهای Th14+Fol، Ta30+Fol و Th14+Ta30+Fol به ترتیب ۱۶۰، ۱۴۲/۱۰ و ۲۶۹/۴۷ میکرومول/دقیقه/گرم وزن تر بود. القای این آنزیم در تیمار تلفیقی Th14+Ta30+Fol در مقایسه با گیاهچه‌های تیمار شده با جدایه‌های *تریکودرما* به صورت مجزا (Th14+Fol و Ta30+Fol) به طور معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۵$) بیشتر بود (شکل ۵). از آن‌جایی که در ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز بین تیمارهای شاهد سالم (با تزریق آب و بدون تزریق)، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد، لذا داده‌های مربوط به یک تیمار شاهد سالم (با تزریق آب) در نتایج ذکر شد. همچنین بین تیمار Bs35+Fol با تیمار شاهد آلوده و نیز تیمارهای تلفیقی جدایه‌های *تریکودرما* و *باسیلوس* با تیمارهای مجزای مربوط به هر یک از جدایه‌های *تریکودرما*، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد، بنابراین داده‌های مربوط به تیمارهای یاد شده در نتایج اشاره نشد.

ه) کمی‌سنجی پروتئین تام: براساس نتایج حاصل از سنجش پروتئین تام، بین تیمارهای Th14+Fol، Ta30+Fol و Th14+Ta30+Fol با تیمار شاهد آلوده (Fol) اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد (شکل ٦).

به علاوه کمی‌سنجی پروتئین در روزهای نمونه‌برداری نشان داد که مقدار پروتئین کل در تیمار هم زمان با جدایه‌های *تریکودرما* به همراه *فوزاریوم* (Th14+Ta30+Fol) در مقایسه با کاربرد مجزای هر یک از جدایه ها (Th14+Fol و Ta30+Fol) به طور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ٦).

بحث

در این پژوهش قابلیت برخی جدایه‌های بومی قارچ آنتاگونیست *تریکودرما* و باکتری *باسیلوس* در بازدارندگی از رشد قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* و کلونیزاسیون آن، در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر کاربرد مجزا و هم زمان جدایه‌های آنتاگونیست بر شاخص شدت بیماری و برخی مؤلفه‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی نیز ارزیابی شد. به‌علاوه پتانسیل این جدایه‌ها در القای آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین آمونیالیاز و همچنین تأثیر آن‌ها بر میزان پروتئین تام گیاه مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌های حاصل نشان داد



شکل ٦: میزان پروتئین کل در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با جدایه‌های Th14 (*تریکودرما هارزیانوم*) و Ta30 (*تریکودرما اتروویریده*) به طور مجزا و در تلفیق با یکدیگر، در روزهای ۰، ۷، ۱۱، ۱٤، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با بیمارگر Fol (*فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی*). میله‌های عمودی بیانگر± انحراف معیار است. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. براساس آزمون چند دامنه دانکن، میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در $p\leq$۰/۰۵ هستند.

عوامل آنتاگونیستی با درجات مختلفی قادر به بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری و نیز کلونیزاسیون آن بودند، که جدایه‌های *تریکودرما* در این زمینه موفق‌تر عمل کردند. تیمارهای مجزا و ترکیبی جدایه‌های *تریکودرما* نسبت به *باسیلوس* در کاهش شدت بیماری و بهبود عوامل رشد گیاه مؤثرتر بودند. همچنین براساس نتایج به‌دست آمده سطح فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و نیز میزان پروتئین کل در تیمارهای *تریکودرما* در مقایسه با شاهد (*فوزاریوم*) افزایش نشان داد.

استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست روشی کارآمد و همسو با محیط زیست در مهار بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی محسوب می‌شود (۳ و ۲۸). تاثیر بیوکنترلی این میکروارگانیسم‌ها در ابتدا منحصر به برهم کنش مستقیم آن‌ها با عوامل میکروبی بیمارگر تصور می‌شد، اما تحقیقات نشان داده است که برخی القاگرهای زیستی از جمله قارچ *تریکودرما* قادر به حفاظت از گیاه از طریق مکانیسم‌های غیر مستقیم، نظیر القای مقاومت سیستمیک در گیاه نیز هستند (۸ و ۱۳).

در مطالعه حاضر نیز تأثیر مستقیم و غیرمستقیم جدایه‌های آنتاگونیست بر مهار بیمارگر *فوزاریوم*تأیید گردید. طی برهم کنش گیاه–آنتاگونیست گیاه تحریک به تولید آنزیم‌های دفاعی می‌شود که در مهار مستقیم بیمارگر و افزایش سدهای دفاعی موثر هستند. فعال شدن واکنش‌های مصونیت، سبب القای مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردد (۲ و ۱۱). در بین آنزیم‌های دفاعی، آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز نقش اساسی در سنتز متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دفاعی گیاه ایفا می‌کند و اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید (مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه) است (۲۹).

نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم‌فنیل‌آلانین آمونیالیاز در این مطالعه نشان داد که تیمارهای مجزا و توأم جدایه‌های آنتاگونیست Th14 و Ta30، موجب القای آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز شدند. از طرف دیگر مشخص شد جدایه‌های *تریکودرما* بر کاهش شدت بیماری نیز موثر بودند. این نتایج مطابق با یافته‌هایی است که نشان می‌دهد برهم کنش عوامل بیوکنترلی با بیمارگر و میزبان گیاهی، موجب فعال شدن مسیرهای دفاعی ثانویه می‌شود. تغییرات بیوشیمیایی خاصی که بعد از کاربرد عوامل القاگر رخ می‌دهد می‌تواند مارکری برای مقاومت سیستمیک القایی باشد (۱۱).

گزارش شده است که *تریکودرما* از طریق افزایش تولید آنزیم‌های دفاعی در چندین میزبان گیاهی، موجب بروز مقاومت القایی سیستمیک در برابر بیمارگرهای مختلف شده

است (۱، ۳۰ و ۳۱). در مطالعه‌ای ثابت شده است بروز تغییر در فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی توسط برخی عوامل بیوکنترلی، مهار بیماری پژمردگی فوزاریومی را در پی داشته است (۹).

نتایج یک بررسی نیز نشان داده است که جدایه‌هایی از *تریکودرما هارزیانوم* و *تریکودرما اترووریده* قادر به افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و همچنین مهار قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی* بوده‌اند (۳۲). از آن‌جایی‌که جدایه‌های تریکودرمای مورد بررسی در این مطالعه نیز علاوه بر این‌که در کنترل بیماری موفق عمل کردند، سطوح بالاتری از آنزیم دفاعی را نیز در مقایسه با تیمار شاهد (Fol) القا نمودند، بنابراین به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم مورد بررسی در القای مقاومت در گیاه و کاهش شدت بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی مؤثر بوده است.

در تیمارهای مربوط به جدایه‌های تریکودرما (به صورت مجزا و در تلفیق با یکدیگر) و Fol، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز تا روز چهاردهم پس از مایه‌زنی به تدریج افزایش نشان داد و پس از آن کاهش یافت. این مطلب احتمالاً ناشی از این است که گیاه گوجه‌فرنگی در ابتدای برهمکنش با بیمارگر و آنتاگونیست برای افزایش سطح دفاع، مقادیر بیشتری آنزیم تولید می‌کند اما در مراحل بعدی، آنتاگونیست خود از فعالیت بیمارگر جلوگیری کرده و فعالیت آنزیم‌ها کاهش می‌یابد.

بر اساس یافته‌های به دست آمده از پژوهش حاضر، مشخص شد که تیمارگیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با جدایه‌های *تریکودرما* (Th14 و Ta30) به صورت توأم، در مقایسه با کاربرد مجزای هر یک از این جدایه‌ها، بر کاهش شاخص شدت بیماری و افزایش سطح فعالیت آنزیم PAL موثرتر بود. نتایج حاصل بیان‌گر اثر سینرژیستی این دو جدایه بر یکدیگر می‌باشد. مطالعات نشان داده است که کاربرد ترکیبی آنتاگونیست‌ها با یکدیگر در مقایسه با کاربرد مستقل آن‌ها در القای واکنش‌های دفاعی گیاه و مهار بیماری موثرتر بوده است. کاربرد توأم آنتاگونیست‌ها با یکدیگر خطر تغییرپذیری در جمعیت را کاهش می‌دهد و موجب اطمینان از کنترل موثر بیمارگر می‌شود (۱ و ۹).

در این بررسی، در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی که تنها با جدایه‌های آنتاگونیست تیمار شده بودند، در ابتدا افزایش سطح آنزیم مشاهده شد. اما پس از چند روز به تدریج کاهش رخ داد. مطالعات نشان داده است که میکرواگانیسم‌های مفید در ابتدا توسط گیاه به عنوان مهاجمین ریشه شناسایی شده و فعال شدن واکنش‌های دفاعی را موجب می‌گردند (۸ و ۳۳). سپس برای برقراری ارتباط با گیاه از این واکنش‌ها ممانعت به‌عمل می‌آورند و میزان ترکیبات دفاعی کاهش می‌یابد (۳٤). از طرف دیگر، این امکان وجود دارد که گیاه خود جهت برقراری ارتباط با آنتاگونیست پاسخ‌های دفاعی را متوقف کند.

نتایج یک بررسی نشان داده است که تشخیص باکتری آنتاگونیست توسط گیاه به عنوان عامل غیر بیماری‌زا، به وابستگی گیاه به باکتری برای حذف ترکیبات زائد متابولیکی تولید شده در طی فرآیند رشد مرتبط است (۳۵). این احتمال وجود دارد که سیستم مشابهی در برهم کنش گیاه-*تریکودرما* وجود داشته باشد، که باعث می‌شود با گذشت زمان، *تریکودرما* توسط گیاه به عنوان عامل غیر بیمارگر شناسایی شود.

همچنین در پژوهش حاضر مشخص شد فعالیت آنزیم PAL در تیمارهایی که فقط با جدایه‌های آنتاگونیست تیمار شده بودند، پایین‌تر از تیمارهای آنتاگونیست به همراه Fol بود. به اثبات رسیده است که عوامل بیوکنترلی در غیاب بیمارگر سلول‌های گیاه را برای مقابله با تهاجم آماده می‌کنند و به دنبال حمله بیمارگر واکنش‌های دفاعی گیاه را با سرعت و یا قدرت بیش‌تری فعال می‌سازند. این فرآیند به عنوان پرایمینگ (Priming) شناخته می‌شود و نتیجه آن افزایش سطح مقاومت گیاه در حضور بیمارگر است (۳٦). بنابراین تفاوت فعالیت آنزیم‌ها در تیمارهای یاد شده، می‌تواند ناشی از این مطلب باشد.

مشخص شده است که برخی از ترکیبات دفاعی، در شرایط معمول و بدون تنش گیاه نیز تولید می‌شوند. بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در طی رشد گیاه تولید انواع اکسیژن فعال

(ROS) می‌کنند و گیاه برای غلبه بر تأثیر نامناسب این ترکیبات بر سلول‌ها، ترکیبات دفاعی تولید می‌کند (۳۷). براساس نتایج حاصل از این پژوهش، در گیاهچه‌های تیمار شاهد سالم نیز تا حدودی فعالیت آنزیم‌های دفاعی مشاهده شد. میزان فعالیت این آنزیم‌ها در شاهد سالم به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر تیمارها بود.

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که جدایه *باسیلوس* نیز تا حدودی بر کاهش شدت بیماری تأثیرگذار بود ولی در مقایسه با جدایه‌های *تریکودرما* عملکرد قابل توجهی نداشت. این مطلب می‌تواند با سرعت رشد و تکثیر بالاتر جدایه‌های *تریکودرما* و نیز قابلیت تطابق آن‌ها با شرایط موجود در ریزوسفر مرتبط باشد که به استقرار آن‌ها و کلونیزاسیون ریزوسفر کمک نموده و در نتیجه در مهار بیمارگر و القای آنزیم دفاعی موفق‌تر عمل کردند. بررسی‌ها نشان داده است دارا بودن قدرت تکثیر بالا و افزایش جمعیت عوامل بیوکنترلی بر توانایی آن‌ها در القای مقاومت در گیاه تأثیرگذار بوده است، که این قابلیت با افزایش ترکیبات القاگر آنتاگونیست و درک بهتر آن‌ها توسط گیرنده‌های گیاه ارتباط داشته است (۸ و ۳٤).

فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی معمولا انرژی مصرفی گیاه را افزایش می‌دهد و رشد و نمو آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین برای یک عامل بیوکنترلی دارا بودن قابلیت تحریک رشد گیاه، علاوه بر داشتن توانایجاد مصونیت و القای پاسخ دفاعی حائز اهمیت است.در مورد برخی جدایه‌های تریکودرما و نیز رایزوباکترها افزایش رشد همراه با سرکوب بیمارگرهای خاکزی گزارش شده است (۱ و ۷). در مطالعه حاضر، علاوه بر بررسی مهار بیماری توسط آنتاگونیست‌ها، برخی شاخص های رشد گیاه مانند وزن تر ساقه و ریشه و ارتفاع گیاهان تیمار شده نیز مورد بررسی قرار گرفت و اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر بهبود فاکتورهای رشدی گوجه‌فرنگی به اثبات رسید.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد مقدار پروتئین کل در گیاهان بیماری که با جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما تیمار نشده بودند (شاهد آلوده) نسبت به گیاهان سالم تیمار نشده با آنتاگونیست به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد. از سوی دیگر میزان پروتئین در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های *تریکودرما* و بیمارگر نسبت به گیاهان بیمار شاهد آلوده افزایش معنی‌داری داشت. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در اثر تهاجم بیمارگر، تنش‌های محیطی در گیاه پدید می‌آیند و در مقاومت علیه بیمارگرها نقش دارند (۳۸).

بر این اساس افزایش سطح پروتئین تام در شاهد آلوده در مقایسه با شاهد سالم، در مطالعه حاضر می‌تواند به این دلیل باشد که گیاهان در این تیمار با تولید پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌های گیاهی و پروتئین‌های دفاعی دیگر به این تنش زیستی پاسخ دادند. از طرفی بررسی‌ها نشان داده است که عوامل آنتاگونیستی در القای مولکول‌های زیستی، مانند پروتئین‌ها دخالت دارند (۳۹).

این مطلب می‌تواند افزایش میزان پروتئین کل در تیمارهای مربوط به *تریکودرما* و *فوزاریوم*در مقایسه با تیمار شاهد را در پژوهش حاضر توجیه نماید. طبق مطالعات صورت گرفته توسط راجیک (Rajik) و همکاران، پیش‌تیمار گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با عوامل القاگرزیستی از جمله برخی جدایه‌های تریکودرما، موجب افزایش سطح پروتئین محلول و به دنبال آن القای مقاومت در برابر قارچ بیمارگر فوزاریوم شده است (۲)، که با یافته‌های مطالعه حاضر هم خوانی دارد. بر اساس نتایج این بررسی تیمار گیاهان با ترکیب جدایه‌های تریکودرما، از تیمار مجزا با هر یک از آن‌ها بر القای تولید پروتئین کل مؤثرتر بود. در مطالعه‌ای که در این زمینه انجام شده نیز مشخص شده است که کاربرد توأم عوامل آنتاگونیستی در مقایسه با استفاده مستقل، القای پروتئین تام بیشتری در گیاه را در پی‌داشته است (۱).

نتیجه گیری

از آنجایی‌که جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی در این پژوهش، به ویژه دو جدایه Th14 (از گونه *تریکودرما هارزیانوم*) و Ta30 (از گونه *تریکودرما اترووریده*) قادر به مهار قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *لیکوپرسیسی*

عامل بیماری پژمردگی آوندی فوزاریومی گوجه‌فرنگی بودند، بدین ترتیب این جدایه‌ها به عنوان عواملی با تأثیرات چند جانبه پتانسیل کاربرد در مدیریت بیماری را دارا می‌باشند. این عوامل بیوکنترلی می‌توانند به عنوان مکمل یا جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی پیشنهاد شوند. به علاوه یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز پژوهش‌های آتی در مورد شناسایی و استخراج ترکیبات القاگر از جدایه‌های موفق باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل: عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از جناب آقای مهندس داریوش شهریاری عضو محترم هیئت علمی بخش بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع‌طبیعی ورامین به جهت حمایت اجرایی از این پژوهش کمال تشکر را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Juber KS, Hassan AK, Alhamiri YN. Evaluation of biocontrol agents and chemical inducers for managing a vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* J Biol Agric Healthcare. 2014; 4(27): 335-343.

2. Rajik M, Biswas SK, Shakti S. Biochemical basis of defense response in plant against *Fusarium* wilt through bio-agents as an inducer. Afr J Agric Res. 2012; 7(43): 5849-5857.

3. Mwangi MV, Monda EO, Okoth SA, Jefwa JM. Inoculation of tomato seedlings with *Trichodermaharzianum* and arbuscular mycorrhyzal fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. Braz J Microbiol. 2011; 42(2): 508-513.

4. Sundaramoorthy S, Balabaskar P. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici.* J ApplBiol Biotechnol. 2013; 1(3): 36- 40.

5. Amini J. Physiological race of and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in Kurdistan province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. J Plant Pathol. 2009; 8(2): 68-73.

6. Pourjam E, Kamali N, Sahebani N. Elicitation of defense responses in tomato against *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* wilt complex. J Crop Protect. 2015; 4(1): 29-38.

7. Naing KW, NguyenXH, Anees M, Lee YS, Kim YC, Kim SJ, Kim MH, Kim YH, Kim KY. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in tomato by *Paenibacillus ehimensis* KWN38.World J Microbiol Biotechnol. 2015; 31(1): 165-174.

8. Vos CM, Yang Y, De-Coninck B, Cammue BPA. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. Biol Control. 2014; 74(7): 65-81.

9. Amer MA, El-Samra IA, Abou-El-Seoud II, El-Abd SM, Shawertamin NK. Induced systemic resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease using biotic inducers. Middle East J Agric Res. 2014; 3(4): 1090-1103.

10. Farhangniya S, Naraghi L, Ommati F, Pirnia M. Evaluation of the efficacy of the biological compound affected by *Talaromyces flavus* in controlling tomato *Fusarium* wilt disease in the field conditions. Int J Agric Sci Res. 2015; 5(2): 153-164.

11. Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M. *Trichoderma*- from basic biology to biotechnology. Microbiol. 2012; 158(1): 1-2.

12. Nawrocka J, Malolepza V. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. Biol Control.2013; 67(2):149-156.

13. Verma N, Ahmed M, Upadhyay RS. Induction of resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* Persian Gulf Crop Protect. 2014; 3(4): 25-36.

14. Ojha S, Chatterjee NC. Induction of resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. J Plant Protect Res. 2012; 52(2): 220-225.

15. Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* laboratory manual. Manhattan. Blackwell Press; 2006.

16. NelsonPE, Toussoun TA, Marascs WFO. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Pennsylvania.University Press; 1983.

17. Cheng AA, Wu FR. *Fusarium* wilt of sesame in Taiwan. Rep TAINAN Station Council Agric. 1991; 26: 53-60.

18. Menzies JG, Koch C, Seywerd F. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant Dis. 1990; 74(8): 569-572.

19. Aleaghaee Sh, Shahriari D, Torabi M. 2012. Evaluation of the effect of *Trichoderma* spp. isolates on biological control of *Pythiumaphanidermatum*, the causal agent of cucumber damping-off and seed rot in laboratory andgreenhouse. Proceeding of the 20th Iranian Plant Protection Congress.25-28 Aug, Shiraz, Iran. 252.[In Persian]

20. Hagedron C, Gould WD, Bardinelli TR. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Appl Environ Microbiol. 1989; 55(11): 2743-2797.

21. Boyhan GE, Lagston DB, Lewis PM, Linton MO. Use of insulin syringe for *Fusarium* wilt inoculation of watermelon germplasm. Cucurbit Genet Coop Rep. 2001; 24: 49-51.

22. Altinok HH. Activation of systemic resistance by acibenzolar-s-methyl and a non-pathogenic *Fusarium oxysporummelonis* (FOM) strain against *Fusarium* wilt disease in eggplant seedlings. J Turk Phytopathol. 2009; 38(1-3): 21-32.

23. El Khaldi R, Daami-Remadi M, Cherif M. Biological control of stem canker and black scurf on potato by date palm compost and its associated fungi. J Phytopathol. 2016; 164(1): 40-51.

24. Chowdappa P, Mohan Kumar SP, Lakshmi MJ, Upreti KK. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillussubtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. Biol Control. 2013; 65(1): 109-117.

25. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Senthilkumar M, Seshadri S. Chung H, Yang J, Sundarm S, Sa,

T. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar co-47 by *methylobacterium* spp. Bot Bull Acad Sinica. 2004; 45: 315-324.

26. Wang JW, Zhang LP, Wu JY, Tan R. X. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxus Yunnanensis cell suspension culture. Nitric Oxide. 2006; 15(4): 351-358.

27. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-252.

28. Raza W, Ling N, Zhang R, Huang Q, Xu Y, Shen Q. Success evaluation of the biological control of *Fusarium* wilts of cucumber, banana, and tomato since 2000 and future research strategies. Crit Rev Biotechnol. 2017; 37(2): 202-212.

29. Chandge A, Lim MH, Lee SW, Robb EJ, Nazar RN. Tomato PAL gene family: highly redundant but strongly underutilized. J Biol Chem. 2008; 283(48): 33591-33601.

30. Elsharkawy MM, Shivanna M, Hyakumach M. Mechanism of induced systemic resistance against anthracnose disease in cucumber by plant growth-promoting fungi. Acta Agric Scand, Sec B-Soil Plant Sci. 2015; 65(4): 287-299.

31. Małolepsza U, Nawrocka J, Szczech M.*Trichoderma virens* 106 inoculation stimulates defense enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered *Rhizoctonia solani* infection. Biocontrol Sci Technol. 2017. 27(2): 180-199.

32. Aleaghee Sh, Rezaee S, Ebadi M, Zamanizadeh HR. The efficacy of some native *Trichoderma* isolates in induction of resistance in tomato against *Fusarium oxyporum* f. sp. *lycoresici*, the causal agent of *Fusarium* wilt disease. Appl Entomol phytopathol. 2017; 85(2): 219-234.

33. Pieterse CMJ, Zamioudis Ch, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM. Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annu Rev Phytopathol. 2014; 52: 347-375.

34. Zamioudis C, Pieterse CMJ. Modulation of host immunity by beneficial microbes. Mol Plant-Microbe Interact. 2012; 25(2): 139-150.

35. Holand MA. Occams razor applied to hormonology. Arc cytokinins produced by plants?. Plant Physiol. 1997; 115(3): 865-868.

36. Vos IA, Pieterse CMJ, Van Wees SCM. Costs and benefits of hormone-regulated plant defences. Plant Pathol. 2013; 62:43-55.

37. Fu J, Huang B. Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool -season grasses to localized drought stress. Environ Exper Bot. 2001; 45(2): 105-114.

38. Silva HSA, da Silva Romeiro R, Macagnan D, de Almeida Halfeld-Vieira B, Pereira MCB, Mounteer A. Rhizobacterial induction of systemic resistancein tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. Biol Control. 2004; 29(2): 288-295.

39. Mathys J, De-Cremer K, Timmermans P, VanKerckhove S, Lievens B, Vanhaecke M, Cammue BP, De-Coninck B. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytiscinerea* infection. Front Plant Sci. 2012; 3(108): 1-25.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 2, July 2019

Original Article

Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and induction of defensive enzyme of phenylalanine ammonialyse in tomato by *Trichoderma* and *Bacillus* antagonist isolates

Shahnaz Aleaghaee[1], Saeed Rezaee[2], Mostafa Ebadi[3], Hamidreza Zamanizadeh[4]

[1]PhD. Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture Science and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.[2]Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture Science and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Biology, College of Basic Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. [4]Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture Science and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Fusarium wilt disease is one of the limiting factors of tomato production in most countries, especially in Iran. Considering the malicious effect of chemicals on health, the study on the alternatives for disease controlling is important. This study aimed to evaluate the ability of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on biological control of *Fusariumoxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Materials & Methods: The inhibitory effects of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates against *Fusarium* were evaluated on PDA. The ability of the colonization of these antagonists was also examined. The effect of separate and combined application of the antagonists isolates against Fusarium vascular wilt disease severity index and some growth factors of tomato were determined. Also, the potential of these isolates on the induction of phenylalanine ammonlyase was measured in seedlings infected with Fusarium.

Results: The biocontrol agents showed different levels of inhibition of *Fusarium* growth. The *Trichoderma* isolates were more successful with a high inhibitory effect (72.06% and 69.16%). These isolates were also powerful colonizers of the pathogen. The disease severity was affected by the antagonists at different levels. Separate and combined treatments of *Trichoderma* isolates were more effective in the reduction of the disease severity and improving the growth factors. The activity of phenylalanine ammonialyase increased in the plants treated with *Trichoderma* isolates compared to control treatment (*Fusarium*). The combined application of these isolates was more effective than the separate using of them on the induction of the enzyme.

Conclusion: The investigated *Trichoderma* isolates were successful in controlling the pathogen. Therefore, the use of these isolates as agents with multiplier effects can be effective in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt.

Keywords: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum,* Colonization, Induced resistance, Defensive reaction.

Correspondence to: Saeed Rezaee

Tel: +98 9123470847

E-mail: srezaee@srbiau.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 125-1.38

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.