

## ارزیابی مقاومت ارقام رایج کشت گلخانه‌ای گوجه فرنگی در استان آذربایجان شرقی به بیماری

### پژمردگی فوزاریومی و بررسی امکان کنترل زیستی این بیماری

رویا منافی<sup>1</sup>، اسدالله بابای اهری<sup>2</sup>، مهدی ارزنلو<sup>2</sup> و مصطفی ولیزاده<sup>3</sup>

تاریخ دریافت: 90/7/30 تاریخ پذیرش: 91/1/23

1- فارغ التحصیل دوره کارشناسی ارشد، رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- به ترتیب استاد و استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

3- استاد گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

\* مسئول مکاتبه E-mail: [ababaiahari@yahoo.com](mailto:ababaiahari@yahoo.com)

#### چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه فرنگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* با دو فرم مخصوص *F. o. f. sp. lycopersici* و *F. o. f. sp. radicans* از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه می‌باشد. به کارگیری ارقام مقاوم و رعایت تناوب چند ساله از روش‌های کنترل این بیماری می‌باشد. از سویی استراتژی کنترل زیستی این بیماری با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست نیز توسط محققین به کار رفته است. در این پژوهش میزان مقاومت ارقام رایج کشت گوجه فرنگی در گلخانه‌های استان آذربایجان شرقی شامل سه رقم ارگون، دانفیلد و کلوز، در مقابل دو جدایه مرجع (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (004) و *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicans*) و یک جدایه محلی *Fusarium oxysporum* (C142) محاسبه درصد علایم بیماری و نیز ارزیابی متغیرهایی مانند وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، وزن تر و خشک ریشه‌ها و ارتفاع بوته‌ها ارزیابی شد. بر این اساس رقم دانفیلد به عنوان حساسترین رقم و جدایه *F. o. f. sp. radicans* به عنوان بیماری‌زاترین جدایه مشخص شد. در مرحله بعد کنترل زیستی بیماری با به کارگیری حساس‌ترین رقم و بیماری‌زاترین جدایه در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای با استفاده از میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی انجام گرفت. میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریایی به کار گرفته شده در این تحقیق شامل دو جدایه از قارچ T22 *Trichoderma harzianum* و یک جدایه از باکتری *Pseudomonas fluorescens* بودند. نتایج بررسی اثر آنتاگونیستی با استفاده از روش کشت متقابل نشان داد که کاربرد جدایه T22 تهیه شده از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران و T22 جدا شده از محصول تجاری تریانوم - پی و باکتری *Pseudomonas fluorescens* به ترتیب 48/42 و 41/21 و 33/08 درصد، رشد قارچ بیمارگر را در مقایسه با شاهد کاهش می‌دهند. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز استفاده از جدایه‌های *T. harzianum* در مقایسه با شاهد بیشترین اثرات کنترلی را در سطح احتمال 1 و 5 درصد نشان دادند، به طوری که این جدایه‌ها باعث شدند کمترین کاهش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌های بوته‌های گوجه فرنگی آلوده به بیماری پژمردگی فوزاریومی نسبت به شاهد اتفاق افتد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه و ریشه، کنترل بیولوژیک، گوجه فرنگی *Pseudomonas fluorescens* و *Trichoderma*

## Assessment of Resistance in Tomato Varieties Under Greenhouse Conditions Against Fusarium Wilt, and Biological Control of the Disease

R Manafi Dizaji<sup>1</sup>, A Babay ahari<sup>2\*</sup>, M Arzanlou<sup>2</sup> and M Valizadeh<sup>3</sup>

Received: 22 October 2011 Accepted: 11 April 2012

<sup>1</sup>Graduated MSc Student of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Univ of Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Prof and Assist Prof, Dept of Plant Pathology, Plant Protection, Faculty of Agriculture, Univ of Tabriz, Iran

<sup>3</sup>Prof and Assist Prof, Dept of Plant Breeding and Biothecnology, Faculty of Agriculture, Univ of Tabriz, Iran

\*Corresponding author: E-mail: [ababaiahari@yahoo.com](mailto:ababaiahari@yahoo.com)

### Abstract

Tomato crown and root rot caused by *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* and *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, is one of the most important disease of this crop. The disease control is mainly achieved by the use of resistant cultivars and crop rotation. Biological control is considered as a potential alternative strategy for disease management. In present study, resistance of common tomato cultivars namely Ergon, Daehnfild, Clause grown in green houses in East Aazrabayjan province were evaluated. For this purpose, three *Fusarium* isolates including two reference isolates (*F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* and *F. oxysporum f. sp. lycopersici*) and a highly virulent local isolate of *F. oxysporum* were used. Resistance of cultivars was assessed based on different factors such as disease percentage, wet and dry weight of foliage, wet and dry weight of roots and the height of each plant. Based on our results, Daehnfild showed highest degree of susceptibility and *F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* showed the highest degree of pathogenicity. Biological control of disease was evaluated by using the most virulent isolate of *Fusarium* and the most susceptible tomato cultivar. Two isolates of *Trichoderma harzianum* (Strain T22 isolated from TRIANUM-P and the second was obtained from Iranian Institute of Plant Protection) and single strains of *Pseudomonas fluorescens* (CHAO) were evaluated for antagonistic potential against causal fungus of this disease in laboratory and greenhouse conditions. Our results based on laboratory experiments showed that *T.harzianum* recovered from commercial biological control product (TRIANUM-P), together with *P. fluorescens* (CHAO) showed the highest degree of control in compare with control. But the greenhouse experiments revealed that the second isolate of *T. harzianum* showed the highest degree of control in compare with control.

**Keyword:** Fusarium wilt, Biocontrol, Tomato, *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas flurescence*

## مقدمه

نیز ریزوباکترها مانند *Azospirillum brasilense* در کنترل زیستی پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی موثر شناخته شده‌اند. تحقیقات کمال و همکاران (2009) نشان داده است که *Azospirillum brasilense* به ترتیب باعث کاهش 75 و 52/5 درصد بیماری در شرایط گلخانه و مزرعه‌ای شده است.

در این تحقیق ضمن ارزیابی میزان مقاومت سه رقم گوجه فرنگی رایج کشت در گلخانه‌های استان آذربایجان شرقی در مقابل دو گونه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* عامل پژمردگی آوندی اثرات کنترلی دو جدایه *T. harzianum* و جدایه CHA0 باکتری *Pseudomonas fluorescens* در مقابله با بیماری پژمردگی و مدیریت آن در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

## ارزیابی میزان مقاومت ارقام

## کشت بذور و تولید گیاهچه

برای ارزیابی میزان مقاومت سه رقم گوجه فرنگی رایج کشت گلخانه‌ای در استان آذربایجان شرقی به نام‌های ارگون، دانفیلد (ارقام هلندی) و کلوز (رقم فرانسوی) نسبت به هر کدام از جدایه‌ها، ابتدا بذور ارقام بعد از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم 1 درصد به مدت یک دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل، به مدت 48 ساعت لای پارچه لملل خیس‌انده شدند و پس از جوانه زنی تعداد 9 بذر جوانه زده به بسترهای کشت حاوی خاک علاوه پرلیت به نسبت 1:1 انتقال داده شدند. 20 روز بعد از نگهداری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با دوره نوری 12 ساعت روشنائی، گیاهچه‌های 2-4 برگی حاصل از کشت بذور ارقام مورد آزمایش برای مایه‌زنی در نظر گرفته شدند.

## تهیه ایناکولوم و ایناکولاسیون گیاهچه

برای تهیه ایناکولوم هر کدام از جدایه‌های قارچ بیمارگر، بعد از خالص‌سازی از طریق تک اسپور به

دو گونه قارچی *Fusarium oxysporum* و *f.sp. radicis-lycopersici* و *f.sp. lycopersici* جزو پاتوژن‌های خاکزی و عامل بیماری پژمردگی گوجه فرنگی هستند که گاهی باعث خسارات شدیدی در مزارع گوجه فرنگی می‌شوند. مدیریت بیماری پژمردگی گوجه فرنگی عمدتاً از طریق ضد عفونی خاک با استفاده از ترکیبات شیمیایی تدخینی (بلانکارد 1993) و یا کاشت ارقام مقاوم صورت می‌پذیرد (یکمن 1987). با این حال تولید نژاد‌های جدید در دو گونه قارچی فوق باعث شکسته شدن مقاومت ارقام گوجه فرنگی مقاوم می‌شوند (رودریقه و همکاران 2003). شاید به همین دلیل امروزه علی‌رغم تلاش‌های بسیار زیادی که در تولید واریته‌های مقاوم از طریق اصلاح صورت پذیرفته، استفاده از روش‌های مدیریتی کنترل زیتی به همراه ایجاد ارقام مقاوم در برنامه‌های مدیریت این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار شده است. در بین میکروارگانیسم‌های متعددی که در کنترل پژمردگی فوزاریومی مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به گونه‌های مختلف *Trichoderma* اشاره کرد که از طریق آنتی بیوزیس و پارازیتیس (هارمن و کویچک 1998 و هاوول 2003) می‌توانند باعث انهدام قارچ بیمارگر و یا کاهش اثرات آن شوند. همچنین جدایه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* می‌توانند با تولید انواع مختلف آنتی بیوتیک‌های برون سلولی و سیدروفورها مستقیماً بر روی رشد و توسعه ریشه گونه‌های قارچی عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی اثر بازدارنده داشته باشند (فراول 1988، اورسولا و همکاران 2000 و گوپتا و همکاران 2001). استفاده از جدایه‌های غیر بیماری‌زای گونه *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در کنترل این بیماری موثر شناخته شده است. جدایه‌های غیر بیماری‌زای این قارچ که از خاک‌های بازدارنده جدا شده‌اند می‌توانند از طریق رقابت در جذب مواد غذایی، کاهش جوانه زنی کلامیدوسپورها و القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان باعث ایجاد واکنش در گیاه میزبان در مقابل پژمردگی فوزاریومی گردند (کور و همکاران 2010). بکارگیری بعضی از مخمرها مانند *Candida sake* و

## کنترل زیستی بیماری

## آزمون هاله بازدارندگی

پس از ارزیابی واکنش سه رقم گوجه فرنگی گلخانه‌ای در مقابل سه جدایه فوزاریوم، حساس ترین رقم و بیماری‌زاترین جدایه قارچی به منظور ارزیابی کارائی عوامل بیوکنترل انتخاب شدند. بدین منظور دو جدایه از قارچ *Trichoderma harzianum* (جدایه T22 از محصول تجاری Trianum- P تولید شرکت Kopert جدا گردید و جدایه T22 دیگر از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران تهیه شد) و یک جدایه از باکتری *Pseudomonas fluorescense* موسوم به CHA0 (دریافتی از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشکده کشاورزی تبریز) در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

برای ارزیابی هاله بازدارندگی از روش کشت متقابل بر روی محیط کشت PDA استفاده شد. در این روش یک قرص شش میلی متری از هر کدام از جدایه‌های سه روزه تریکودرما در مقابل یک قرص شش میلی متری از جدایه هشت روزه قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* قرار داده شد. پتری‌های کشت شده در دمای 25 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای ارزیابی قدرت بازدارندگی جدایه CHA0 یک قرص از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* به قطر 9 میلی متر در یک طرف پتری دیش و 1/10 (یک دهم) میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری فوق به غلظت  $10^7$  اسپور در میلی لیتر به طریق نکته گذاری در طرف مقابل دیسک در پتری دیش قرار داده شد و سپس پتری‌ها مدت چهار روز در دمای 27 درجه سانتی گرد نگهداری شدند میزان بازدارندگی هر کدام از جدایه‌های قارچی در روزهای سوم، هفتم و یازدهم ارزیابی و میزان میانگین برای هر کدام از روزهای فوق از رابطه  $IG = [(C-T)/T] \times 100$  محاسبه گردید. که در این فرمول IG: نشان دهنده درصد بازدارندگی رشد میسلیومی بیمارگر، C: میزان رشد قطری پرگنه قارچی بیمارگر در شاهد و T: میزان رشد قطری پرگنه قارچی بیمارگر در تیمار را شامل می شوند. ارزیابی میزان

مدت 8 روز بر روی محیط کشت PDA رشد داده شدند سپس به هرکدام از محیط‌های کشت مقدار پنج میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و بعد از رها سازی اسپورها از روی محط کشت و تنظیم غلظت اسپورها با استفاده از لام هماسیتومتر ایناکولاسیون گیاهچه‌ها مطابق روش ویتانگ و همکاران (2004) با اندکی تغییرات انجام گرفت. بدین ترتیب که ریشه‌های هر کدام از گیاهچه‌ها بعد از شستشو با آب جاری به مدت 10 دقیقه درون سوسپانسیون اسپور به غلظت  $10^7$  اسپور در میلی لیتر از هر کدام از جدایه‌های انتخاب شده یعنی *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (اهدائی دکتر مارتاین رپ از موسسه علوم زیستی سامردام، دانشگاه آمستردام، کشور هلند) و یک جدایه محلی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* که در مطالعات پیشین در بین جدایه‌های بیماریزای فوزاریوم بیشترین بیماری زایی را نشان داده بود (خرسندی و همکاران 1388) غوطه ور شدند. سوسپانسیون اسپور از کشت هشت روزه جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA تهیه گردید. سپس تعداد 9 گیاهچه مایه زنی شده انتخاب و به قرار سه گیاهچه در هرکدام از گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک و پرلیت به نسبت 1:2 کاشته شدند، تعداد سه گلدان هرکدام حاوی سه گیاهچه نیز که ریشه‌های آن‌ها درون آب مقطر استریل غوطه ور شده بودند به عنوان شاهد تهیه شدند. آبیاری هر چهار روز یک بار انجام گرفت و ارزیابی میزان مقاومت هر کدام از ارقام در مقابل جدایه‌های مورد آزمایش 35 روز بعد از مایه زنی به روش کمال و همکاران (2009) و امینی (2009) و با در نظر گرفتن معیارهای زیر صورت پذیرفت:

الف: علائم اندامهای هوایی: 0= گیاه سالم و مصون از هر گونه علایم، 1= ظهور علائم در برگ‌ها اعم از کلروز، پیچیدگی و... به میزان 25 درصد، 2= ظهور علائم به میزان 26-50 درصد، 3= ظهور علائم به میزان 51-75 درصد، 4= ظهور علائم به میزان 76-100 درصد؛ ب: وزن تر اندامهای هوایی؛ ج: وزن تر ریشه؛ د: وزن خشک اندامهای هوایی؛ ه: وزن خشک ریشه؛ ی: ارتفاع بوته

بوته‌ها انجام پذیرفت. یاد آور می‌شود که علاوه بر گیاهان مایه زنی شده با *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* گلدان‌های شاهد نیز در دو گروه طبقه بندی شدند. گروه اول حاوی گیاهان سالم و عاری از آلودگی و میکرواورگانسیم آنتاگونیست بود و گروه دوم حاوی گیاهان مایه زنی شده با قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* و میکرواورگانسیم آنتاگونیست بود. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار انجام گرفت و تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید.

### نتایج

ارزیابی میزان مقاومت ارقام مورد آزمایش

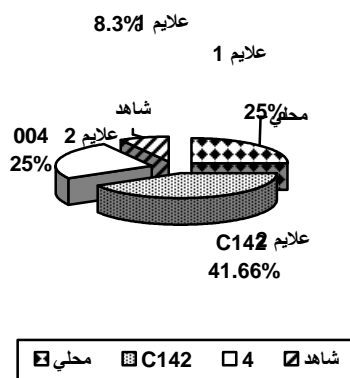
الف- درصد نسبی علائم بیماری در ارقام گوجه فرنگی نسبت به سه جدایه مورد بررسی

شکل 1، 2 و 3 درصد نسبی علائم بیماری حاصل از جدایه‌ها در سه رقم مورد آزمایش را نشان می‌دهند که بیشترین درصد علائم بیماری در هر سه رقم مربوط به آلودگی با جدایه C142 می‌باشد. از سوئی همین تصاویر نشان می‌دهند که بیشترین شدت علائم بیماری (مقیاس 3) در رقم دانفیلد مشاهده گردیده است. لذا می‌توان نتیجه گرفت که حساسترین رقم بین ارقام مورد بررسی رقم دانفیلد بوده و بیشترین شدت علائم بیماری در اثر آلودگی این رقم به جدایه C142 به وجود می‌آید. در حالیکه مقیاس شدت آلودگی در دو رقم کلوز و ارگون به هنگام آلودگی با همین جدایه هر چند دو می‌باشد. اما مقیاس شدت آلودگی رقم ارگون به هنگام آلودگی با جدایه 004 برابر دو برآورد گردیده در حالی مقدار این مقیاس برای رقم کلوز برابر یک ارزیابی شده است.

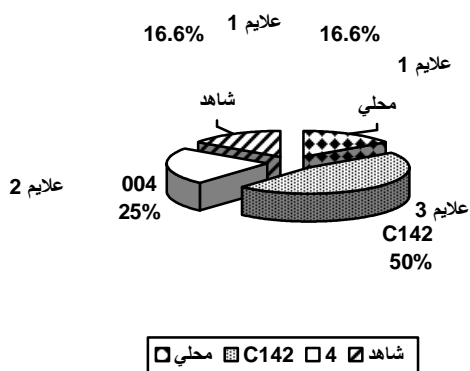
بازدارندگی برای جدایه CHA0 چهار روز بعد از تاریخ کشت متقابل با استفاده از خط کش انجام پذیرفت.

### بررسی‌های گلخانه‌ای

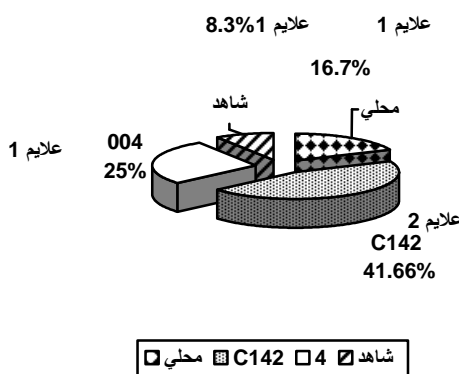
در بررسی‌های گلخانه‌ای برای ارزیابی میزان بازدارندگی جدایه‌های قارچی و جدایه CHA0 ابتدا خاک استریل درون گلدان‌ها با استفاده از بذور گندم آغشته به میسلیم 21 روزه جدایه *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* به نسبت وزنی 1:10 مخلوط گردید. گلدان‌ها ضمن آبیاری مرتب هر دو روز یک بار به مدت 10 روز در شرایط گلخانه‌ای (دمای 25 درجه سانتی‌گراد و فتو پریود 12 ساعت روشنایی) نگهداری شدند تا بیمارگر بتواند در خاک گلدان‌ها توسعه یابد (نیک نژاد و همکاران 1378). در مرحله بعد برای ارزیابی قدرت آنتاگونیستی هر کدام از جدایه‌های قارچ تریکودرما و جدایه CHA0 ریشه گیاهچه‌های 2-4 برگی رقم حساس دانفیلد (تهیه شده به روشی که قبلاً مورد اشاره قرار گرفت) درون سوسپانسیون اسپور جدایه‌های تریکودرما به غلظت  $10^7$  و یا سوسپانسیون جدایه CHA0  $10^9$  در میلی لیتر غوطه ور شدند و سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های حاوی خاک آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* کشت گردیدند. این آزمایش نیز در سه تکرار و در هر تکرار اثر بازدارندگی جدایه‌های قارچی و باکتریایی بر روی سه گیاهچه مورد ارزیابی قرار گرفت. گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های کشت شده در گلخانه با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتیگراد قرار گرفتند و ضمن آبیاری مرتب هر دو روز یک بار، ارزیابی میزان بازدارندگی به ترتیب 28 و 35 روز بعد برای جدایه CHA0 و جدایه‌های قارچی با استفاده از روش ئیگیت و دیکی تاش (2007) و با ارزیابی وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و نیز ارتفاع



شکل 1- درصد نسبی بیماری بین جدایه های مورد بررسی در رقم ارگون



شکل 2- درصد نسبی بیماری بین جدایه های مورد بررسی در رقم دانفیلد



شکل 3- درصد نسبی بیماری بین جدایه های مورد بررسی در رقم کلوز

وزن تر اندامهای هوایی و وزن خشک اندامهای هوایی اختلاف معنی دار بین ارقام وجود ندارد.

از سوئی بررسی اثر متقابل ارقام و جدایه ها برای صفات مختلف نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در وزن خشک اندامهای هوایی و ریشه ها می باشد در حالیکه برای صفات وزن تر اندامهای هوایی، وزن تر ریشه و ارتفاع بوته اثر متقابل معنی دار دیده شد (جدول 1).

ب- تجزیه آماری صفات مورد بررسی سه رقم گوجه فرنگی نسبت به سه جدایه عامل بیماری و ارزیابی میزان مقاومت

جدول تجزیه واریانس (جدول 1-ا) صفات مورد بررسی در ارقام مورد آزمایش نشان می دهد که وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و ارتفاع بوته اختلاف معنی داری در بین ارقام به ترتیب در سطح احتمال 5 درصد و 1 درصد نشان می دهد. در حالیکه برای صفات

جدول 1- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی سه رقم گوجه فرنگی نسبت به سه جدایه عامل بیماری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه
رقم	2	11/551 <sup>ns</sup>	9/458*	0/092 <sup>ns</sup>	0/034**
جدایه	3	66/28**	32/379**	4/22**	0/061**
رقم × جدایه	6	13/797 <sup>+</sup>	9/121**	0/365 <sup>ns</sup>	0/007 <sup>ns</sup>
خطا	24	6/708	1/912	0/239	0/007
ضریب تغییرات (%)	-	25/7	30/5	41	52
					14

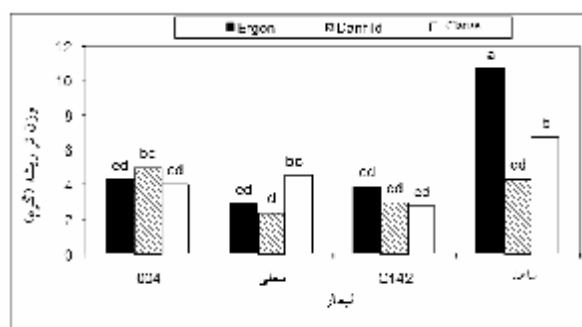
ns، +، \* و \*\* به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی دار و معنی دار در سطح احتمال 10 درصد، 5 درصد و 1 درصد

مقیاس 1، 2 و 1 به ترتیب در تعامل با جدایه‌های محلی، C142 و 004 مقاومترین رقم در بین ارقام شناخته شد. در ارزیابی اثر آلودگی بر وزن تر و خشک ریشه وزن تر و خشک اندام های هوایی و ارتفاع گیاهان ارقام مورد آزمایش روشن شد که آلودگی گیاهان ارقام مختلف اثر معنی داری بر روی وزن خشک اندام هوایی و ریشه نداشته ولی توانسته وزن تر ریشه و اندام های هوایی و ارتفاع گیاهان را بطور معنی دار به شرح زیر متاثر سازد:

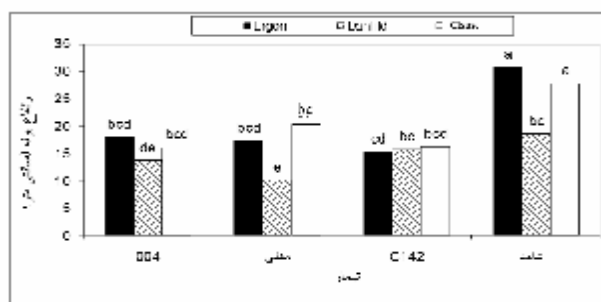
الف - کاهش وزن تر ریشه در هر سه رقم آلوده با هر کدام از جدایه ها معنی دار بوده و بیشترین کاهش در گیاهان رقم دانفیلد آلوده با جدایه محلی مشاهده شد. ب - کاهش ارتفاع گیاهان در مقایسه با حالت شاهد در هر سه رقم مورد آزمایش مشاهده شد، که بیشترین کاهش ارتفاع مربوط به دو رقم محلی و ارگون و کمترین کاهش برای رقم دانفیلد بود که می تواند نشان از مقاومت بیشتر این رقم باشد. ج - کاهش وزن تر اندام های هوایی باز در گیاهان هر سه رقم گوجه فرنگی آلوده با هر کدام از جدایه ها معنی دار بود و بیشترین کاهش در گیاهان رقم ارگون آلوده به جدایه C142 بود.

شکل 4 مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ارقام گوجه فرنگی و جدایه ها را برای صفات وزن تر ریشه، وزن تر اندام های هوایی و ارتفاع نشان میدهد. صرفنظر از اختلاف معنی دار بین شرایط شاهد و جدایه ها بیشترین و کمترین میانگین ترکیبات رقم - جدایه در همه صفات نوسان نشان میدهد و تأییدی است بر اینکه اثر متقابل رقم و جدایه از نوع تغییر در ترتیب است. برای مثال در آلودگی به جدایه محلی بیشترین ارتفاع برای رقم محلی گوجه فرنگی بدست آمده است در حالی که در مقابل جدایه 004 بیشترین ارتفاع برای رقم ارگون و دانفیلد مشاهده می شود. از سوی دیگر عمده ترین دلیل معنی دار شدن اثر متقابل را می توان به میانگین رقم ارگون در شرایط شاهد نسبت به حالتی که آلودگی توسط جدایه ها بر روی آن انجام پذیرفته منسوب دانست. بطوریکه اگر شرایط شاهد از تجزیه های آماری حذف شود احتمالاً اثر متقابل معنی دار نخواهد بود.

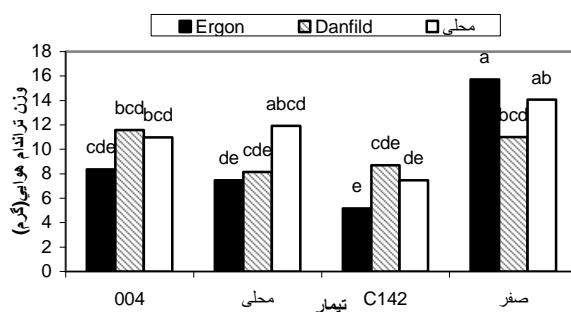
با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین کلیه صفات و نیز ارزیابی اثرات هر کدام از جدایه ها در ارقام مورد آزمایش می توان دریافت که در بین جدایه - های قارچی جدایه C142 بیماریزاترین آن ها و رقم دانفیلد با احراز مقیاس بیماری 3 یا 50 درصد در تعامل با این جدایه حساس ترین رقم در بین ارقام مورد آزمایش بوده است. در مقابل رقم کلوز با احراز



الف - میانگین ترکیب ارقام و جدایه‌ها برای وزن تر ریشه



ب- میانگین ترکیبات تیماری ارقام و جدایه‌ها برای ارتفاع بوته



ج- میانگین ترکیبات تیماری ارقام و جدایه‌ها برای وزن تر اندام‌های هوایی

شکل 4- میانگین ترکیبات تیماری ارقام گوجه‌فرنگی و جدایه‌های (004) *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* و

*Fusarium oxysporum f. sp. Radicis - lycopersici* (C142)

و محلی برای صفات: الف. وزن تر ریشه. ب- وزن تر اندام‌های هوایی و ج- ارتفاع بوته

(ب) آزمون شاهد

بررسی‌ها نشان دادند که جدایه باکتریایی *P. fluorescens* (CHA0) نیز از رشد میسلیمی قارچ عامل بیماری جلوگیری می‌کند. درصد بازدارندگی این جدایه باکتریایی در روز چهارم 33/08 درصد بود. ناحیه بازدارندگی براساس فاصله بین نوک میسلیوم قارچ بیمارگر و حاشیه کلونی باکتری اندازه‌گیری گردید (شکل 7).

کنترل زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی

الف- ارزیابی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچ

*Trichoderma* و جدایه CHA0 در کشت متقابل

ارزیابی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچ

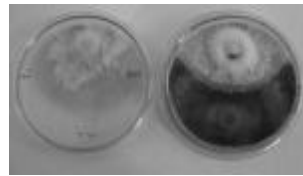
*Trichoderma* نشان داد که جدایه T22 حاصل از فرم

تجارتی و جدایه T22 موسسه گیاهپزشکی کشور در

روز یازدهم به ترتیب 41/21 و 48/42 درصد از رشد

ریسه قارچ بیمارگر جلوگیری کردند (شکل‌های 5 و 6).





(الف) (ب)

(1)



(الف) (ب)

(2)



(الف) (ب)

(3)

شکل 5- الف) کشت متقابل جدایه T22 حاصل از محصول تجاری و *F. o. f. sp. radicis- lycopersici* در محیط کشت PDA به ترتیب اعداد، 3، 7 و 11 روز بعد از کشت (ب) آزمون شاهد



(الف) (ب)

(1)



(الف) (ب)

(2)



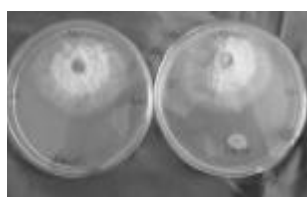
(الف) (ب)

(3)

شکل 6- الف) کشت متقابل جدایه T22 قارچ *T. harzianum* با *F. o. f. sp. radicis- lycopersici* در محیط کشت PDA به ترتیب اعداد 1 و 2 و 3، سه روزه، هفت روزه و 11 روزه

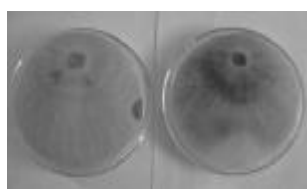
هوایی ارقام گوجه فرنگی به هنگام آلودگی با جدایه های قارچی و باکتریایی بین جدایه های آنتاگونیست به ترتیب در سطح احتمال 5 درصد و 1 درصد اختلاف معنی دار وجود دارد ولی در سایر صفات اختلاف معنی دار مشاهده نشد (جدول 3).

ب- بررسی گلخانه ای قدرت آنتاگونیستی جدایه های قارچی و باکتریایی تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در مطالعه جدایه های قارچ *T. harzianum* و جدایه باکتری *P. fluorescens* نشان داد که وزن تر ریشه و اندام های



(الف) (ب)

(1)



(الف) (ب)

(2)



(الف) (ب)

(3)

شکل 7- الف) کشت متقابل باکتری *P. fluorescens* با قارچ *F. o. f. sp. radices- lycopersici* در محیط کشت PDA به ترتیب اعداد در کشت متقابل یک روزه، دو روزه و چهار روزه (ب) آزمون شاهد.

جدول 3- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در آزمایش اثر جدایه های آنتاگونیست در گلخانه

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن تر اندام هوایی		
0/004 <sup>ns</sup>	0/175 <sup>ns</sup>	0/380*	39/44**	4	جدایه آنتاگونیست
0/013	0/505	0/059	0/414	10	خطا
21/03	27/23	29/91	8/67	-	ضریب تغییرات (%)

ns و \* و \*\* به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی دار و معنی دار در سطح احتمال 5% و 1%.

هوایی و ریشه گوجه فرنگی نیز به طور واضح اختلاف قدرت آنتاگونیستی قابل ملاحظه می‌باشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که جدایه‌های قارچی *T. harzianum* از قدرت آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه باکتری *P. fluorescens* برخوردار می‌باشد.

از سوئی هر دو جدایه قارچ آنتاگونیست تریکودرما در حضور فوزاریوم باعث افزایش رشد وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌های بوته‌های گوجه فرنگی شدند.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نیز نشان می‌دهد که دو جدایه قارچ تریکودرما در صفت وزن تر اندام‌های هوایی نسبت به شاهد نسبتاً یکسان عمل نموده‌اند ولی جدایه باکتریایی از قدرت آنتاگونیستی پایین‌تر نسبت به دو جدایه قارچی برخوردار بوده است. نتایج بدست آمده بر روی صفت وزن تر ریشه نیز نشان دهنده تفاوت قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی و باکتریایی می‌باشد که در این صفت نیز جدایه‌های قارچی نسبت به شاهد بهتر از جدایه باکتری عمل نموده است (جدول 4).

در نتایج حاصل از بررسی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی و باکتریایی بر روی صفات وزن خشک اندام‌های

جدول 4- جدول مقایسه میانگین صفات مورد بررسی بین جدایه‌ها در گلخانه

وزن خشک	وزن خشک	وزن تر	وزن تر	تیمار
ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	
(gr)	(gr)	(gr)	(gr)	
0/14 ab	1/33 b	1/12b	10/79 b	بوته‌های آلوده + <i>T. harzianum</i> (T22)
0/10 b	0/98 c	1/01bc	9/02 bc	بوته‌های آلوده + <i>T. harzianum</i> تجاری
0/092 c	0/53 cd	0/467 c	4/25 c	بوته‌های آلوده + <i>P. fluorescens</i>
0/19a	1/57 a	1/5 a	13/02 a	شاهد سالم
0 d	0 d	0 d	0 d	شاهد بیمار

تیمارهای با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار است ( $P < 5\%$ ).

## بحث

بیماری توصیه کرده‌اند (صیدیقی 2006) و بعضی دیگر استفاده از استرین‌های غیر بیماریزای گونه *Fusarium oxysporum* را که موجب تحریک مقاومت القائی سیستمیک (ISR) در ایجاد مقاومت در مقابل این بیماری می‌شود را مفید دانسته‌اند و بالاخره تعدادی دیگر از محققین روش‌های کنترل بیولوژیکی با استفاده از میکرواورگانیزم‌های آنتاگونیست را در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی مفید دانسته‌اند (الاد و همکاران 1982 و دافی و همکاران 2000). در ارزیابی میزان مقاومت سه رقم گوجه فرنگی رایج کشت در گلخانه-های استان هر چند که رقم کلوز در مقایسه با دو رقم دیگر از مقاومت بیشتری برخوردار بود ولی استفاده از

همچنانکه در بخش نتایج حاصل از این تحقیق مورد اشاره قرار گرفت در بین ارقام مورد آزمایش رقم کلوز نسبت به رقم ارگون مقاوم تر و رقم دانفیلد نیز به عنوان رقم حساس نسبت به سه جدایه قارچی شناخته شد. از سوئی عدم پایداری مقاومت ارقام مختلف گیاهان نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی امری شناخته شده است بطوریکه بعضی ظهور مستمر نژاد های جدید بیماریزای را علت عدم پایداری مقاومت می‌دانند (رودریقه و همکاران 2003 و بکمن 1987). بعضی دیگر راه کار حذف بیمارگر و تحریک رشد گیاه و سیستم دفاعی آنرا جهت ایجاد مقاومت در مقابل این

شاهد گردیده است. بعد از آن جدایه دوم قارچ *T. harzianum* قرار گرفته است (جدول-4).

اما اثرات آنتاگونیستی و کنترلی جدایه CHA0 ناشی از تولید متابولیت های مختلف برون سلولی بویژه آنتی بیوتیک ها توسط این جدایه باکتریائی می باشد. محققین متعدد از جمله لارکین و فراول (1998) تولید آنتی بیوتیک های مختلف مانند دی استیل فلوروگلوکوسینول، فنازین ها، پیروول ها و باکتوبولین ها و نیز تولید سیدروفور ها را گزارش کرده اند. این متابولیت ها در آزمون های کشت متقابل موجب تغییرات عمده از قبیل گرانونه شدن، تولید انشعابات متعدد و بروز حالت درختچه ای در نوک ریشه های قارچ بیمارگرو همچنین از بین رفتن دیواره سلولی و متورم شدن نوک ریشه ها می گردد (کومارسان و همکاران 2005)، اورسولا و همکاران (2000) و دافی و همکارانش (2000) نیز اثرات کنترلی جدایه CHA0 را عمدتاً ناشی از تولید و رها سازی آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوکوسینول دانسته اند. گوپتا و همکاران (2001) نیز اثرات نکروتروفیک آنتی بیوتیک های سنتز شده توسط *P. fluorescens* را علیه قارچ *F. oxysporum* گزارش نموده اند.

نتیجه بررسی حاضر نشان داد که جدایه CHA0 قادر است به میزان 33/08 درصد در شرایط آزمایشگاهی و در کشت متقابل در روی محیط کشت PDA از رشد و توسعه *F. o. f. sp. radialis-lycopersici* ممانعت نماید. در شرایط گلخانه ای نیز هر چند اثرات کنترلی این جدایه باکتریائی نسبت دو جدایه قارچ تریکودرما کمتر بود ولی همچنانکه جدول مقایسه میانگین صفات مورد بررسی مانند وزن تر و خشک ریشه و اندام های هوئی نشان می دهد اختلاف معنی دار در مقیاس های مورد بررسی در گیاهان آلوده تیمار شده با جدایه باکتریائی نسبت به گیاهان شاهد دیده می شود قطعاً "علل این بازدارندگی و کنترل همچنانکه محققین مختلف مورد اشاره قرار داده اند ناشی از سنتز و رها سازی متابولیت های آنتی بیوتیک توسط باکتری مذکور می باشد .

روش های کنترل بیولوژیک ما نند بکارگیری جدایه های تریکودرما و *P. fluorescens* می تواند موجبات کنترل بیشتر بیمارگر در گیاهان آلوده باشد، بطوریکه حتی در رقم حساس دانفیلد افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام های هوئی بوته های گوجه فرنگی در تعامل با قارچ تریکودرما مشاهده گردید که با نتایج حاصل از کار های تحقیقاتی نیک نژاد و همکاران (1378) مطابقت داشت. نامبرده نیز طی آزمایشات خود گزارش کرد که استفاده از جدایه های قارچ *T. harzianum* از یک طرف موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی شده و از طرف دیگر باعث افزایش وزن تر و ارتفاع بوته های آلوده گیاهان گوجه فرنگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی می گردد. هارمن و کوبیکچک (1998) و هاوول (2003) در مقالات خود تولید متابولیت های مختلف مانند آنزیم های لیز کننده ترکیبات دیواره سلولی و نیز آنتی بیوتیک های مانند وریدین، تریکودرمین، هارزینانوم A، هارزینانویید و متابولیت های ثانوی دیگر که همگی در بازدارندگی رشد و توسعه قارچ های عامل پژمردگی فوزاریومی با استفاده از مکانیسم آنتی بیوزیس موثر می باشند را عامل اصلی این کنترل گزارش کرده اند. فوچ و همکاران (1997) ویژگی تولید متابولیت های آنزیمی مانند کیتیناز، بتا-1 و 3 گلوکاناز و بتا-1 و 4 گلوگوزیداز را در بعضی از جدایه های گونه قارچی *F. oxysporum* مانند جدایه F047 را گزارش نموده و ثابت نموده که تولید این متابولیت ها توسط جدایه یاد شده موجب افزایش مقاومت گیاه در مقابل پژمردگی فوزاریومی می گردد. الاد و همکاران (1982) در بررسی اثر آنتاگونیستی گونه های تریکودرما در کنترل بیمارگرها تولید ساختار هائی موسوم به اپروسریوم را گزارش نموده که در اثر نفوذ بدرون ریشه های بیمارگرها موجبات انهدام آن ها را از طریق پارازیتیسم فراهم می نمایند.

در تحقیق حاضر چنان که جدول مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه نشان میدهد جدایه T22 از قارچ *T. harzianum* که از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شده بود بیشترین اثر کنترلی را بر روی بیماری داشته و موجب کمترین کاهش در وزن تر و خشک اندام های هوئی و بویژه در وزن خشک ریشه نسبت به

## منابع مورد استفاده

- خرسندی س، بابای اهری الف، رضائی س و محمدی پور م، 1388. شناسائی عوامل بیماریزائی قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه فرنگی در استان آذربایجان شرقی. مجله علوم کشاورزی، شماره 12، صفحه های 79 تا 93.
- نیک نژاد کاظم پور م، شریفی تهرانی ع و اخوت م، 1378. بررسی تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma* spp. علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در شرایط گلخانه. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد 31، شماره 10، صفحات 31-36.
- Amini K, 2009. Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in Kurdistan Provice of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. *Plantpathology* 8: 68-73.
- Beckman C H, 1987. *The Nature of Wilt Diseases of Plants*. APS Press, St Paul, MN.
- Blancard D ,1993. *Maladies de la tomate (Tomato Diseases, Translators: Abak K, Sari N, Abak MF)*. Adana, Turkey, Cukurova University.
- Duffy B, Gigot-Bonnefo C, Reinmann C, Notz R, Defago G, Haas D and Keet C, 2000. Autoinduction of 2,4-Diacetyl phloroglucinol biosynthesis in biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO and repression by bacteria metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of Bacteriology* 182.( 5):1215-1225.
- Elad Y, Chet I and Henis Y, 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
- Fravel D R ,1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annu. Re. Phytopathology* 26: 75-91.
- Fuchs JG, Moenne- Locozy, and Defago G, 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt in Tomato. *Plant disease* 81(5): 492-496.
- Gupta C P , Dubey R C, Kang S C and Maheshwari D K, 2001. Antibiosis- mediated necrotrophic effect of *pseudomonas* GRC2 against two fungal plant pathogens. *Current. Science* 18: 91-94.
- Harman G E and Kubicek P K, 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological control and commercial applications. Taylor and Francis London pp 1-393.
- Howell C R, 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Kamal A M, Elyousr A and Mohamed H M, 2009. Biological control of Fusarium wilt in tomato by plant Growth-promoting yeast and Rhizobacteria *plant Pathology Journal* 25(2):199-204.
- Kaur R, Kaur J and Singh Rama S , 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control Agent. *Plant Pathology Journal* 9(3):79-91

- Kumaresn K, Subrrmanian, M, Vathianatan S, Sevagaperumal N, Gopal C and Dilantha F, 2005. Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structure of fungal pathogens and root knot nematode. Archives of phytopathology and plant protection 38(1):69-76.
- Larkin R P and Fravel D R, 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Disease 83: 1022-1026.
- Rodriguez-Molina M, Medina L, lorres-vila, L and cuartero J, 2003. Vascular colonization pattern in susceptible and resistant tomato cultivars inoculated with Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici race 0 and 1. Plantpathology 52:199-203
- Siddiqui Z A 2006. PGPR: Prospective biocontrol agent of plant pathogens, in: PGPR: biocontrol and biofertilization, ed. By Z. A. Siddiqui, Pp.111-142 Springer, Dordrecht.
- Ursula SK, Arnaud S, Maurhofer M, Blumer C, Weitang S, Ligang Zh, Cheng Zone Y, Xiaodong C, Liqun ZH and Xili L, 2001. Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection. 23: 243-247.
- Weitang S, Ligang Zh, Cheng Zone Y, Xiaodong C, Liqun ZH and Xili L, 2004. Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection 23:243-247.
- Yigit F and Dikilitas M, 2007. Control of Fusarium wilt of tomato by combination of *fluorescent pseudomonas*, non-pathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T-22 in greenhouse conditions. Plantpathology Journal 6(2): 159-163.