ارزیابی مقاومت ارقام رایج کشت گلخانه‌ای گوجه فرنگی در استان آذربایجانشرقی به بیماری پژمردگی فوزاریومی و بررسی امکان کنترل زیستی این بیماری

رویا منافی[1]، اسدالله بابای اهری[2]، مهدی ارزنلو[2] و مصطفی ولیزاده[3]

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

1- فارغ التحصیل دوره کارشناسی ارشد، رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
2- به ترتیب استاد و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
3- استاد گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه تبریز
* مسئول مکاتبه E-mail: 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. *radicis – lycopersici* از مهم‌ترین بیماریهای این گیاه می‌باشد. به کارگیری ارقام مقاوم و رعایت تناوب چند ساله از روش های 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 گلخانه های 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. *radicis – lycopersici* (C142) و یک جدایه محلی *Fusarium oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین واکنش ارقام با محاسبه درصد علایم بیماری ونیز ارزیابی متغیرهائی مانند وزن تر و خشک اندام‌های هوائی، 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. *radicis – lycopersici* به عنوان بیماریزاترین جدایه مشخص شد. در مرحله بعد کنترل زیستی بیماری با به‌کارگیری حساس ترین رقم و بیماری‌زاترین جدایه در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای با استفاده از میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریائی انجام گرفت. میکروارگانیسم‌های قارچی و باکتریائی به کار گرفته شده در این تحقیق شامل دو جدایه از قارچ *Trichoderma harzianum* T22 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 می دهند. در بررسی های گلخانه‌ای نیز استفاده از جدایه های *T. harzianum* در مقایسه با شاهد بیشترین اثرات کنترلی را در سطح احتمال 1 و 5 درصد نشان دادند، به طوری که این جدایه ها باعث شدند کمترین کاهش وزن تر و خشک اندام‌های هوائی 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*

Archive of SID

www.SID.ir

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

R Manafi Dizaji[1], A Babay ahari[2*], M Arzanlou[2] and M Valizadeh[3]

Received: 22 October 2011 Accepted: 11 April 2012
[1]Graduated MSc Student of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Univ of Tabriz, Iran
[2]Prof and Assist Prof, Dept of Plant Pathology, Plant Protection, Faculty of Agriculture, Univ of Tabriz, Iran
[3]Prof and Assist Prof, Dept of Plant Breeding and Biothecnology, Faculty of Agriculture, Univ of Tabriz, Iran
*Corresponding author: E-mail: 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*

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

دو گونه قارچی *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici* و *Fusarium* oxysporum f.sp. *lycopersici* جزو پاتوژن های خاکزی و عامل بیماری پژمردگی گوجه فرنگی هستند که گاها باعث خسارات شدیدی درمزارع گوجه فرنگی می شوند. مدیریت بیماری پژمردگی گوجه فرنگی عمدتا از طریق ضد عفونی خاک با استفاده از ترکیبات شیمیایی تدخینی (بلانکارد 1993) و یا کاشت ارقام مقاوم صورت می پذیرد (بکمن 1987). با این حال تولید نژاد های جدید در دو گونه قارچی فوق باعث شکسته شدن مقاومت ارقام گوجه فرنگی مقاوم می شوند(رودریقه و همکاران 2003).شاید به همین دلیل امروزه علی رغم تلاش های بسیار زیادی که در تولید واریته های مقاوم از طریق اصلاح صورت پذیرفته، استفاده از روش‌های مدیریتی کنترل زیتی به همراه ایجاد ارقام مقاوم در برنامه های مدیریت این بیماری از اهمیت خاصی برخوردار شده است . در بین میکرواورگانیسم های متعددی که در کنترل پژمردگی فوزاریومی مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به گونه‌های مختلف *Trichoderma* اشاره کرد که از طریق آنتی بیوزیس و پارازیتیسم (هارمن و کوبیچک 1998 و هاول 2003) می‌توانند باعث انهدام قارچ بیمارگر و یا کاهش اثرات آن شوند. همچنین جدایه های مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* می توانند با تولید انواع مختلف آنتی بیوتیک های برون سلولی و سیدروفورها مستقیما بر روی رشد و توسعه ریسه گونه های قارچی عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی اثر بازدارنده داشته باشند (فراول1988، اورسولا وهمکاران2000 و گوپتا و همکاران2001). 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 غذائی، کاهش جوانه زنی کلامیدوسپورها و القائ 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 نیز ریزوباکترها مانند *Azospirillium brasilense* در کنترل زیستی پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی موثر شناخته شده‌اند. تحقیقات کمال و همکاران (2009) نشان داده است که *Azospirillium brasilense* به ترتیب باعث کاهش 75 و52/5 در صدی بیماری در شرایط گلخانه و مزرعه‌ای شده است.

در این تحقیق ضمن ارزیابی میزان مقاومت سه رقم گوجه‌فرنگی 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 جدایه ها، 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 ململ خیسانده شدند و پس از جوانه زنی تعداد 9 بذر جوانه زده به بستر های کشت حاوی خاک علاوه پرلیت به نسبت 1:1 انتقال داده شدند. 20 روز بعد از نگهداری در دمای 25 درجه سانتی گراد 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 جدایه های قارچ بیمارگر، بعد از خالص‌سازی از طریق تک اسپور به

Archive of SID

www.SID.ir

مدت 8 روز بر روی محیط کشت PDA رشد داده شدند سپس به هرکدام از محیط‌های کشت مقدار پنج میلی‌لیتر 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 ریشه های 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 جدایه های 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 جدایه های بیماریزای فوزاریوم بیشترین بیماری زایی را نشان داده بود (خرسندی و همکاران 1388) غوطه ور شدند. سوسپانسیون اسپور از کشت هشت روزه جدایه ها بر روی محیط کشت PDA تهیه گردید. سپس تعداد9گیاهچه 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 ریشه های آن ها 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 جدایه های مورد آزمایش 35 روز بعد از مایه زنی به روش کمال و همکاران (2009) و امینی (2009) و با در نظر گرفتن معیارهای زیرصورت پذیرفت:

الف: علائم اندامهای هوائی: 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 50-26 درصد، 3= ظهور علائم به میزان 75-51 درصد ، 4= ظهور علائم به میزان 100-76 درصد؛ ب: وزن تر اندامهای هوائی؛ ج: وزن تر ریشه؛ د: وزن خشک اندامهای هوائی؛ ه: وزن خشک ریشه؛ ی: ارتفاع بوته

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 کارآئی 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 گیاهپزشگی ایران تهیه شد) ویک جدایه از باکتری *Pseudomonas fluorescence* موسوم به CHA0(دریافتی ازآزمایشگاه 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 ازجدایه-های 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 بازدارنگی جدایه CHA0 یک قرص از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* به قطر 9 میلی متر در یک طرف پتری دیش و1/10 (یک دهم) میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری فوق به غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتربه 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 جدایه های قارچی در روزهای سوم، هفتم و یازدهم ارزیابی و میزان میانگین برای هر کدام از روزهای فوق از رابطه IG=[(C-T)/T]×100 محاسبه گردید. که در این فرمول IG: نشان هنده 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 جدایه های قارچی و جدایه CHA0 ابتدا خاک استریل درون گلدان‌ها با استفاده از بذور گندم آغشته به میسلیوم 21 روزه جدایه *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* به نسبت وزنی 1:10 مخلوط گردید. گلدان‌ها ضمن آبیاری مرتب هردو روز یک بار به مدت 10 روز در شرایط گلخانه‌ای (دمای 25 درجه سانتی گراد و فتو پریود 12ساعت روشنائی) نگهداری شدند تا بیمارگر بتواند در خاک گلدان‌ها توسعه یابد (نیک نژاد و همکاران1378). در مرحله بعد برای ارزیابی قدرت آنتاگونیستی هر کدام از جدایه های قارچ تریکودرما و جدایه CHA0 ریشه گیاهچه‌های 2-4 برگی رقم حساس دانفیلد (تهیه شده به روشی که قبلا مورد اشاره قرار گرفت) درون سوسپانسیون اسپور جدایه های تریکودرما به غلظت 10^7 و یا سوسپانسیون جدایه CHA0 10^9 در میلی لیتر غوطه ورشدند و سپس گیاهچه ها در گلدان‌های حاوی خاک آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* کشت گردیدند. این آزمایش نیز درسه تکرار و در هر تکراراثر بازدارندگی جدایه های قارچی و باکتریائی بر روی سه گیاهچه مورد ارزیابی قرار گرفت. گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های کشت شده در گلخانه با دمای 2±25 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 جدایه های قارچی با استفاده از روش ئیگیت و دیکلی تاش (2007) و با ارزیابی وزن تر و خشک ریشه ،وزن تر وخشک اندام های هوائی و نیز ارتفاع بوته ها 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 میکرواورگانیسم آنتاگونیست بود و گروه دوم حاوی گیاهان مایه زنی شده با قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* ومیکرواورگانیسم 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

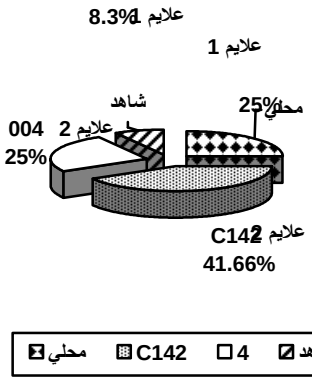
ارزیابی میزان مقاومت ارقام مورد آزمایش

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

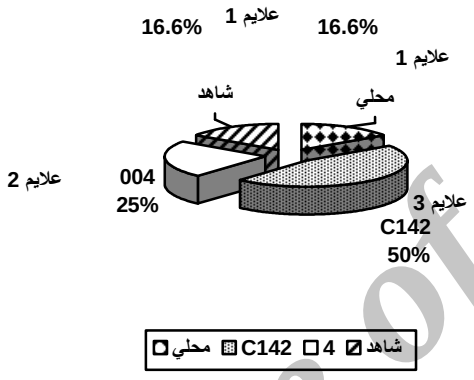
شکل 1،2و3 درصد نسبی علائم بیماری حاصل از جدایه‌ها در سه رقم مورد آزمایش را نشان می دهند که بیشترین درصد علائم بیماری در هر سه رقم مربوط به آلودگی با جدایه C142 می‌باشد. از سوئی همین تصاویرنشان می‌دهند که بیشترین شدت علائم بیماری (مقیاس3) در رقم دانفیلد مشاهده گردیده است. لذا می‌توان نتیجه گرفت که حساسترین 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.

Archive of SID

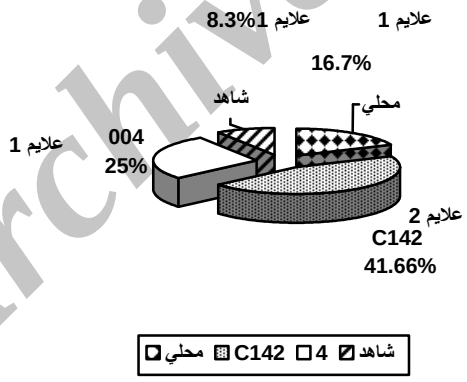
www.SID.ir



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

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

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

از سوئی بررسی اثر متقابل ارقام و جدایه‌ها برای صفات مختلف نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در وزن خشک اندامهای هوائی و ریشه‌ها می‌باشد در حالیکه برای صفات وزن تر اندامهای هوائی، وزن تر ریشه و ارتفاع بوته اثر متقابل معنی دار دیده شد (جدول 1).

Archive of SID

www.SID.ir

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	ارتفاع بوته
رقم	2	11/551^{ns}	9/458*	0/092^{ns}	0/034**	129/521**
جدایه	3	66/28**	32/379**	4/22**	0/061**	216/020**
رقم× جدایه	6	13/797^{+}	9/121**	0/365^{ns}	0/007^{ns}	28/90**
خطا	24	6/708	1/912	0/239	0/007	6/60
ضریب تغییرات(%)	-	25/7	30/5	41	52	14

ns ، + ، * و ** به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی دار و معنی دار در سطح احتمال10درصد، 5 درصد و1 درصد

شکل 4 مقایسه میانگین ترکیبات تیماری ارقام گوجه فرنگی و جدایه ها را برای صفات وزن تر ریشه، وزن تر اندام های هوائی 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 تائیدی است بر اینکه اثر متقابل رقم و جدایه از نوع تغییردر ترتیب است.برای مثال در آلودگی به جدایه محلی بیشترین ارتفاع برای رقم محلی گوجه فرنگی بدست آمده است در حالی که در مقابل جدایه004 بیشترین ارتفاع برای رقم ارگون ودانفیلد مشاهده می‌شود. 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 احتمالا 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 آن‌ها و رقم دانفیلد با احراز مقیاس بیماری 3 یا 50 درصد در تعامل با این جدایه حساس‌ترین رقم در بین ارقام مورد آزمایش بوده است. در مقابل رقم کلوز با احراز مقیاس1 ،2 و1 به ترتیب در تعامل با جدایه‌های محلی، C142و004 مقاومترین رقم در بین ارقام شناخته شد.

در ارزیابی اثر آلودگی بر وزن تر و خشک ریشه وزن تر و خشک اندام های هوائی و ارتفاع گیاهان ارقام مورد آزمایش روشن شد که آلودگی گیاهان ارقام مختلف اثر معنی داری بر روی وزن خشک اندام هوائی و ریشه نداشته ولی توانسته وزن تر ریشه و اندام های هوائی و ارتفاع گیاهان را بطور معنی داربه شرح زیر متاثر سازد:

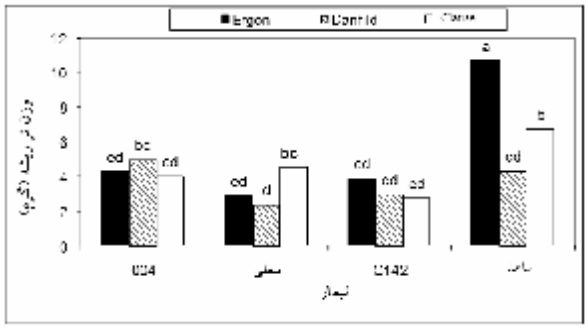
الف -کاهش وزن تر ریشه در هر سه رقم آلوده با هرکدام از جدایه ها معنی دار بوده و بیشترین کاهش در گیاهان رقم دانفیلد آلوده با جدایه محلی مشاهده شد.

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.

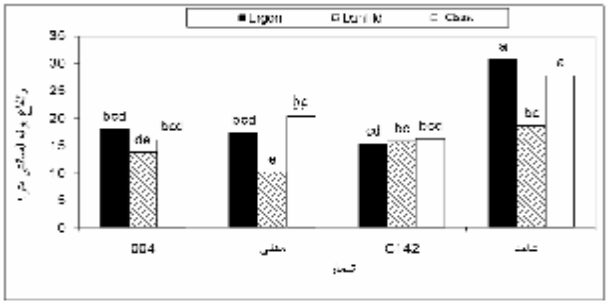
ج- کاهش وزن تر اندام های هوائی باز در گیاهان هر سه رقم گوجه فرنگی آلوده با هرکدام از جدایه ها معنی دار بود و بیشترین کاهش در گیاهان رقم ارگون آلوده به جدایه C142 بود.

Archive of SID

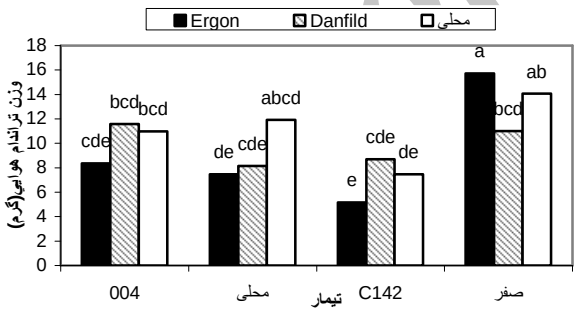
www.SID.ir



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 هوائی

شکل 4-میانگین ترکیبات تیماری ارقام گوجه‌فرنگی و جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (004) و *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis – lycopersici* (C142)
و محلی برای صفات:الف.وزن تر ریشه.ب- وزن تر اندام‌های هوائی و ج- ارتفاع بوته

کنترل زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی

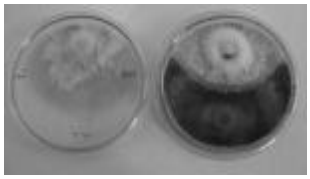
الف- ارزیابی قدرت آنتاگونیستی جدایه های قارچ *Trichoderma* وجدایه CHA0در کشت متقابل

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 و48/42 درصد از رشد ریسه قارچ بیمارگر جلوگیری کردند (شکل‌های 5 و6).

ب) آزمون شاهد

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

www.SID.ir



(ب) (الف)

(1)

(ب) (الف)

(2)

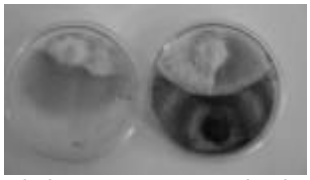
(ب) (الف)

(3)

شکل5- الف) کشت متقابل جدایه T22حاصل از محصول تجاری و *F. o. f. sp. radicis- lycopersici*
در محیط کشت PDA به ترتیب اعداد،7،3و 11 روز بعد از کشت.ب) آزمون شاهد

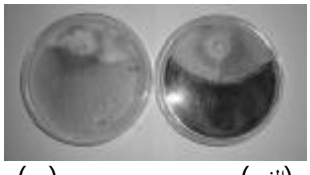
(ب) (الف)

(1)



(ب) (الف)

(2)



(ب) (الف)

(3)

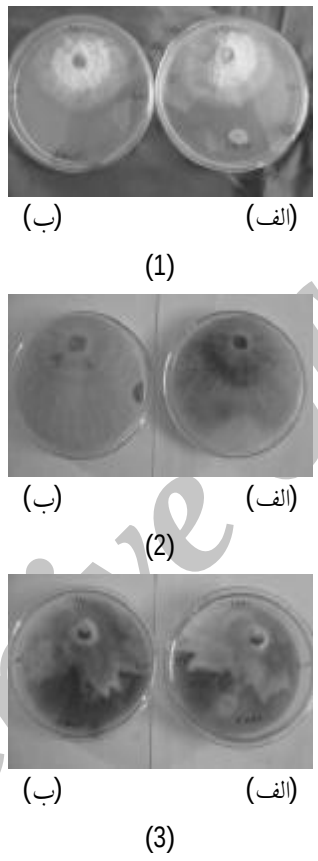
شکل6- الف) کشت متقابل جدایه T22 قارچ *T. harzianum* با *F. o. f. sp. radicis- lycopersici*
در محیط کشت PDA به ترتیب اعداد 1و2و3 ،سه روزه، هفت روزه و 11 روزه

Archive of SID

www.SID.ir

ب- بررسی گلخانه‌ای قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های 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 اندام‌های هوایی ارقام گوجه فرنگی به هنگام آلودگی با جدایه های قارچی و باکتریائی بین جدایه‌های آنتاگونیست به ترتیب در سطح احتمال 5 درصد و 1 درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد ولی در سایر صفات اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (جدول 3).



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

جدول3- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در آزمایش اثر جدایه‌های آنتاگونیست در گلخانه

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

ns و * و ** به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5% و 1% .

Archive of SID

www.SID.ir

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 باکتریائی از قدرت آنتاگونیستی پائین‌تر 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 باکتریائی بر روی صفات وزن خشک اندامهای 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 جدایهٔ 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.

جدول4- جدول مقایسه میانگین صفات مورد بررسی بین جدایه‌ها در گلخانه

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

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

بحث

همچنانکه دربخش 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 می دانند(رودریقه و همکاران 2003 وبکمن 1987). بعضی دیگر راه کار حذف بیمارگر و تحریک رشد گیاه و سیستم دفاعی آنرا جهت ایجاد مقاومت در مقابل این بیماری توصیه کرده‌اند(صیدیقی 2006) و بعضی دیگر استفاده از استرین های 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 میکرواورگانیسم‌های آنتاگونیست را درکنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی مفید دانسته اند(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

Archive of SID

www.SID.ir

روش‌های 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 هوائی 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 جدایه‌های قارچ *T. harzianum* از یک طرف موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی شده و از طرف دیگر باعث افزایش وزن تر و ارتفاع بوته‌های آلوده گیاهان گوجه فرنگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌گردد. هارمن وکوبیکچک (1998) و هاول (2003) در مقالات خود تولید متابولیت‌های مختلف مانند آنزیم های لیز کننده ترکیبات دیواره سلولی و نیز آنتی بیوتیک‌هائی مانند وریدین، تریکودرمین، هارزیانوم A، هارزیانوئید و متابولیت‌های 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-1و3 گلوکاناز و بتا-1و4 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 ریسه های بیمارگرها موجبات انهدام آن ها را از طریق پارازیتیسم فراهم می نمایند.

درتحقیق 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 وخشک اندام های هوائی و بویژه در وزن خشک ریشه نسبت به شاهد گردیده است. بعد از آن جدایه دوم قارچ *T. harzianum* قرارگرفته است(جدول -4).

اما اثرات آنتاگونیستی و کنترلی جدایه CHA0 ناشی از تولید متابولیت های مختلف برون سلولی بویژه آنتی بیوتیک‌ها توسط این جدایه باکتریائی می‌باشد. محققین متعدد از جمله لارکین و فراول (1998) تولید آنتی بیوتیک‌های مختلف مانند دی استیل فلوروگلوسینول، فنازین ها، پیرول 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 گرانوله شدن، تولید انشعابات متعدد و بروز حالت درختچه ای در نوک ریسه های قارچ بیمارگرو همچنین از بین رفتن دیواره سلولی و متورم شدن نوک ریسه ها می گردد (کومارسان و همکاران 2005).اورسولا و همکاران (2000) و دافی و همکارانش(2000) نیز اثرات کنترلی جدایه CHAO را عمدتا ناشی از تولید و رها سازی آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوسینول دانسته اند. گوپتا و همکاران (2001) نیز اثرات نکروتروفیک آنتی بیوتیک های سنتزشده توسط *P. fluorescens* را علیه قارچ *F.oxysporum* گزارش نموده ا ند.

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. *radicis- lycopersici* ممانعت نماید. در شرایط گلخانه‌ای 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 هوائی نشان می دهد اختلاف معنی دار در مقیاس های مورد بررسی در گیاهان آلوده تیمارشده با جدایه باکتریائی نسبت به گیاهان شاهد دیده می‌شود قطعا"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 می‌باشد .

Archive of SID

www.SID.ir

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 آذربایجانشرقی.مجله علوم کشاورزی، شماره 12 ،صفحه های 79تا 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 36-31.

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, Sarı N, Abak MF). Adana, Turkey, Cukurova University.

Duffy B, Gigot-Bonnefo C, Reinmmann 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 salcylate and pyolateorin. 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: 7 19-725.

Fravel D R ,1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. Annu. Re. Phytopathology 26: 75-91.

Fuchs JG, Moenne- Loccozy, and Defago G, 1997. Nonpathogenic *Fusarium oxysporom* 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 paterrn 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.

Archive of SID

www.SID.ir