Archive of SID

مهار زیستی بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی با استفاده از سویه‌های اپیفیت تریکودرما

مریم حسین‌مردی[۱]، شهرام نعیمی[۲]، سعید رضائی[۱]

۱-گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲-مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: شهرام نعیمی، پست الکترونیک: sh.naeimi@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۵ ۷(۲) ۱-۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۲۰

چکیده

لکه موجی با عامل *Alternaria* spp. یکی از بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی است که سالانه خسارت شدیدی به این محصول وارد می‌کند. کنترل بیولوژیک این بیماری با استفاده از قارچ‌های اپیفیت به‌عنوان میکروارگانیسم‌های سازگار در اندام‌های هوایی می‌تواند جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های خطرناک شیمیایی باشد. جهت جداسازی قارچ‌های اپیفیت، پس از نمونه‌برداری از بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی، قطعاتی از برگ و ساقه در ظروف ارلن حاوی آب مقطر و روی دستگاه تکان‌دهنده قرار گرفت و سوسپانسیون به‌دست آمده کشت داده شد. به‌منظور یافتن سویه‌های بیوکنترل مؤثر، جدایه‌های به‌دست آمده با استفاده از روش‌های کشت متقابل و تأثیر متابولیت‌های فرّار و غیر فرّار علیه قارچ بیمارگر (*Alternaria alternata* SN1–1) در آزمایشگاه، غربال و جدایه‌های مؤثر برای بررسی اثر آن‌ها در کنترل بیماری در شرایط گلخانه انتخاب شدند. در گلخانه، سوسپانسیون کنیدی‌های قارچ‌های اپیفیت در دو مرحله بر روی اندام‌های هوایی گیاه محلولپاشی شد. دو هفته پس از مایه‌زنی بیمارگر، شدت بیماری بر اساس یک مقیاس ۹-۰ ارزیابی شد. نتایج غربالگری در آزمایشگاه نشان داد که قارچ‌های اپیفیت مورد مطالعه با درجات مختلف از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر جلوگیری کردند. حداکثر این بازدارندگی در آزمون‌های کشت متقابل، متابولیت‌های فرّار و متابولیت‌های غیرفرّار به‌ترتیب ۷۰، ۵۳ و ۶۸ درصد بود. در گلخانه، کم‌ترین شاخص درصد بیماری مربوط به جدایه‌های F1–22 و P4–1(۸۱/۴٪ کنترل بیماری) و P1–1 و P2–1 (۷۴/۴٪ کنترل بیماری) بود. جدایه‌های F1–22، P4–1 و P2–1 به گونه*Trichoderma harzianum* و جدایه P1–1 به گونه *Trichoderma longibrachiatum* تعلق داشتند.

واژه‌های کلیدی: آلترناریا، کنترل بیولوژیک، قارچ‌های رورُست، گلخانه

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicom esculantum* Mill.) یک محصول مهم اقتصادی است که به‌صورت خام یا فرآوری شده، بخش مهمی از رژیم غذایی مردم جهان را تشکیل می‌دهد. ایران با حدود شش میلیون تُن، در جایگاه ششم تولیدکنندگان عمده گوجه‌فرنگی در جهان قرار دارد (http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity). گوجه‌فرنگی، دومین محصول مهم گلخانه‌ای در کشور است و بر اساس آخرین آمارنامه کشاورزی ایران (وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۷)، سطح زیر کشت و میزان تولید گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای در ایران در سال ۱۳۹۶، به‌ترتیب ۷۸۳ هکتار و ۲/۲ میلیون تُن بود. پرورش گوجه‌فرنگی در گلخانه فرصت مناسبی را برای کشاورزان جهت تولید محصول بازارپسند در زمان‌های کمبود میزان گوجه‌فرنگی مهیّا می‌کند. اما، بیماری‌های گیاهی یکی از عوامل محدودکننده کشت گوجه‌فرنگی بوده و باعث کاهش کمیّت و کیفیت محصول می‌شوند.

بیماری لکه‌موجی یا سوختگی زود هنگام (early blight) با عامل *Alternaria* spp. از مخرب‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی در دنیا می‌باشد (Lahkar *et al*., 2015) و ممکن است تا ۸۰ درصد به محصول خسارت وارد سازد (Chaerani and Voorrips, 2006). این بیماری در مناطق گرم و مرطوب با باران زیاد و رطوبت نسبی بالا و یا مناطق نیمه خشک با شبنم‌های مکرر و

www.SID.ir

Archive of SID

طولانی مدت، شایع و بسیار پر اهمیت است (Foolad *et al*., 2000; Chaerani *et al*., 2007). این بیمارگر، برگ، ساقه و میوه‌های گوجه‌فرنگی را آلوده می‌سازد و موجب خسارت شدید در همه مراحل رشدی گیاه می‌شود، اما فاز خشکیدگی برگ (leaf blight)، مهمترین فاز بیماری بوده و می‌تواند باعث انهدام کل بوته شود (Nash and Gardner, 1988; Foolad *et al*., 2000). اولین علائم بیماری روی برگ‌های پیر به صورت لکه‌های کوچک و نکروتیک دیده شده و با بزرگ شدن لکه‌ها، دوایر متحدالمرکز با حاشیه زردرنگ ظاهر می‌شود (Sherf & MacNab, 1986).

روش رایج و رضایت‌بخش کنترل بیماری لکه موجی گوجه‌فرنگی استفاده از قارچکش‌های شیمیایی است و قارچکش‌های مؤثر برای لکه موجی (مانند کلرتالونیل) در کشور به ثبت رسیده است. اما استفاده مداوم از مواد شیمیایی علاوه بر هزینه بالا، مشکلاتی نظیر اثر بر روی موجودات غیرهدف و کاهش تنوع زیستی، افزایش و توسعه مقاومت در بیمارگرها و آلودگی محیط زیست و تهدید سلامتی انسان‌ها را به‌همراه خواهد داشت (Latha *et al*., 2009). راهکار مناسب برای حل این مشکلات، جستجو برای یافتن روش‌های جایگزینِ بی‌خطر، دوستدار محیط زیست و در عین حال مؤثر و اقتصادی است. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌ها می‌تواند یک روش جایگزین امیدبخش برای سموم شیمیایی باشد.

قارچ‌های اپیفیت یا رورُست (epiphytic fungi)، گروه‌های قارچی با تنوع زیاد بوده و روی قسمت‌های مختلف گیاه زنده به ویژه برگها یافت می‌شوند (Hongsanan *et al*., 2016). این گروه از قارچ‌ها، سازگار در اندام‌های هوایی گیاهان هستند که می‌توانند به سلامت گیاه کمک کرده و ابزاری برای کنترل بیماری‌های گیاهی و تنش‌های محیطی باشند (Lindow & Brandl, 2003). قارچ‌های اپیفیتی که در شاخ و برگ گیاه گوجه‌فرنگی به‌سر می‌برند، می‌توانند گزینه‌های مناسبی جهت کنترل بیولوژیک بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی به عنوان یک بیماری هوازاد باشند. به‌نظر می‌رسد که قارچ‌های اپیفیت هیچ‌گونه بیماری‌زایی علیه گیاه گوجه‌فرنگی ایجاد نمی‌کنند و بی‌خطر هستند (Andrews, 1992). Monaco *et al*. (1999) توانایی قارچ‌های ساکن در اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی را در کنترل لکه موجی مورد ارزیابی قرار دادند و جدایه‌ای از *Trichoderma polysporum* را به‌عنوان مؤثرترین عامل بیوکنترل بیماری معرفی کردند. Yadav *et al*. (2011) اقدام به غربال‌کردن قارچ‌های ساکن در اندام‌های هوایی کلزا علیه لکه برگی ناشی از *Alternaria brassicae* کردند و *Trichoderma viride* را به عنوان عامل بیوکنترل مؤثر در این زمینه دانستند. Fritz *et al*. (2006) گزارش کردند که کاربرد قارچ‌ریشه *Glomus intraradices* باعث کاهش علائم لکه موجی در بوته‌های گوجه‌فرنگی شد (Varma *et al*., 2008). پس از کاربرد میکروارگانیسم‌های مختلف قارچی و باکتریایی به‌صورت محلولپاشی اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی، نتیجه گرفتند که *T. viride* و *Trichoderma harzianum* مؤثرتر از بقیه باعث کاهش معنی‌دار لکه موجی در گلخانه شدند. Ramanujam *et al*,. 2015 سویه‌های دو گونه *T. harzianum* و *T. viride* را علیه *Alternaria solani*، عامل لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه مورد ارزیابی قرار دادند و کنترل موفقیت‌آمیز بیماری را گزارش کردند. Sain & Pandey, (2016) چندین جدایه *T. harzianum* را برای کنترل بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی از جمله لکه موجی در شرایط گلخانه و مزرعه مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که این جدایه‌ها باعث کاهش معنی‌دار علائم بیماری لکه موجی شدند. Sarkar *et al*. (2016) جدایه‌ای از *T. viride* را برای کنترل لکه موجی گوجه‌فرنگی در شرایط مزرعه بکار بردند و گزارش کردند که این جدایه، بیماری را به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد کنترل نمود.

هدف از انجام این تحقیق جداسازی و شناسایی قارچ‌های اپیفیت از اندام‌های هوایی گیاه گوجه‌فرنگی به‌منظور کنترل بیولوژیک بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه و معرفی سویه‌های امیدبخش بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌های پژوهش

جداسازی و شناسایی بیمارگر

به‌منظور دستیابی به قارچ بیمارگر عامل لکه‌موجی طی بازدید از یک گلخانه گوجه‌فرنگی در شهرستان اصفهان، بوته‌های دارای علائم تیپیک لکه‌موجی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت جداسازی قارچ عامل بیماری از بوته‌های آلوده، ابتدا برگ‌ها زیر جریان ملایم آب شسته شدند. از مرز بین قسمت آلوده و سالم قطعاتی به اندازه تقریبی یک سانتی‌متر مربع جدا و در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی سطحی شدند. سپس، سه تا چهار قطعه در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA=potatoto dextrose agar, Merck, Germany) کشت داده شدند. تشتک‌ها به‌مدت پنج روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی قرار داده شدند. قارچ‌های رشد یافته در اطراف قطعات به روش نوک هیف خالص سازی شدند. اثبات بیماریزایی جدایه به دست آمده با پیروی از اصول کُخ انجام شد. قارچ بیمارگر با کد SN1–1 جهت نگهداری طولانی مدت در تیوب‌های حاوی گلیسرول ۲۰ درصد و در فریزر با دمای ۲۰ – درجه سلسیوس قرار داده شد. جهت شناسایی ریخت‌شناختی جدایه بیمارگر از کلید شناسایی Simmons, (2007) و برای شناسایی مولکولی از توالی ناحیه ITS–rDNA استفاده شد.

جداسازی قارچ‌های اپیفیت

نمونه‌برداری از بوته‌های کاملاً سالم گوجه‌فرنگی واقع در گلخانه‌های استان‌های تهران (ورامین و پاکدشت) و البرز (کرج) به‌صورت تصادفی انجام شد. به منظور جداسازی قارچ‌های اپیفیت، ابتدا برگ‌ها و ساقه‌ها به قطعات یک سانتی‌متری بریده شدند و تعداد ۵۰ عدد از این قطعات درون فلاسک‌های ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر سترون ریخته شدند. سپس فلاسک‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه تکان‌دهنده (shaker) با سرعت rpm ۲۰۰ قرار گرفتند. برای هر نمونه، رقّت‌های 10^{-1}–10^{-4} تهیه شد و برای هر رقّت، سه تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها، آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت اضافه شد. از هر رقّت، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر روی محیط کشت ریخته و با میله شیشه‌ای L شکل پخش شد. تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی منتقل شدند (Junior *et al.*, 2006). برای خالص‌سازی جدایه‌ها از دو روش تک اسپور و نوک هیف استفاده شد. جهت نگهداری طولانی مدت قارچ‌های اپیفیت، جدایه‌های خالص شده درون گلیسرول ۲۰ درصد و در فریزر با دمای ۲۰– درجه سلسیوس قرار داده شدند.

بررسی اثر قارچ های اپیفیت بر روی قارچ *Alternaria alternata* در آزمایشگاه

روش کشت متقابل (dual culture)

قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از قسمت‌های درحال رشد پرگنه قارچ‌های اپیفیت و بیمارگر به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک‌های پتری نُه سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA، روبروی هم قرار داده شدند و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند. در تشتک پتری شاهد، فقط قرص میسلیومی بیمارگر قرار داده شد. پس از گذشت هفت روز، درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر با فرمول GI=[(R1–R2)/R1]×100 محاسبه شد. R1، میانگین رشد قارچ بیمارگر در شاهد و R2، میانگین رشد قارچ بیمارگر در تقابل با قارچ اپیفیت می‌باشد.

بررسی تأثیر متابولیت‌های فرّار قارچ‌های اپیفیت در مهار رشد *A. alternata*

قرصی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت جوان سه روزه قارچ اپیفیت در وسط یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد. سپس قرصی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت جوان سه‌روزه *A. alternata* در وسط یک تشتک پتری دیگر حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد. سپس درهای تشتک‌های پتری مربوط به قارچ‌های اپیفیت و بیمارگر تحت شرایط سترون برداشته و تشتک حاوی *A. alternata* به طور وارونه روی تشتک قارچ اپیفیت قرار گرفت. محل تلاقی دو ظرف با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

نوار چسب و پارافیلم بسته شد تا از خروج گازها ممانعت شود. در تشتک پتری شاهد، قرصی از محیط کشت PDA جایگزین قارچ اپیفیت شد (Dennis & Webster, 1971). پس از هفت روز، درصد ممانعت از رشد بیمارگر توسط قارچ‌های اپیفیت با استفاده از رابطه ذکر شده در مرحله قبل محاسبه شد.

بررسی تأثیر متابولیت‌های غیر فرّار خارج سلولی قارچ‌های اپیفیت در مهار رشد *A. alternata*

برای تهیه ترشحات مایع خارج سلولی (culture filtrate)، قارچ‌های اپیفیت به طور جداگانه در محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز (potato dextrose broth) کشت داده شدند. برای این‌منظور ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت درون فلاسک‌های ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. در هر فلاسک، سه قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه در حال رشد قارچ‌های اپیفیت قرار گرفت. فلاسک‌ها داخل دستگاه شیکرانکوباتور (SL–300RF, HYSC, outh Korea) با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ rpm به مدت هفت روز قرار داده شدند. سپس، به کمک پمپ خلاء (lr37697, Millipore, England) و فیلترهایی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (Millipore, England) عصاره‌گیری به‌عمل آمد و متابولیت های خارج سلولی تهیه شد. لوله‌های آزمایش حاوی ۱۶ میلی‌لیتر محیط کشت PDA اتوکلاو شده در حمام بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس، چهار میلی‌لیتر از عصاره خارج سلولی به دست آمده از هر یک از قارچ‌های اپیفیت به محیط کشت داخل لوله‌ها اضافه شد و محتویات لوله‌ها در داخل تشتک پتری ریخته شد. به این ترتیب تشتک پتری PDA حاوی ۲۰ درصد عصاره خارج سلولی هر جدایه قارچ اپیفیت تهیه شد. در تیمار شاهد از محیط کشت مایع بدون عصاره کشت قارچ اپیفیت استفاده شد. پس از آن، قرصی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت جوان چهار روزه *A. alternata* در وسط هر تشتک پتری، کشت داده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفت. پس از هفت روز، درصد ممانعت از رشد بیمارگر توسط قارچ‌های اپیفیت با استفاده از رابطه ذکر شده در آزمون کشت متقابل به دست آمد.

اثر قارچ‌های اپیفیت در کنترل بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در گلخانه

به منظور پرورش گیاه گوجه‌فرنگی، ابتدا بذرهای گوجه‌فرنگی رقم فلات در سینی‌های نشاء حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۲:۱ کشت شدند و در گلخانه با دمای ۳ ± ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۵ ±۸۰ درصد قرار گرفتند. گیاهچه‌ها پس از ۱۵ روز، به گلدان‌های ۳/۵ لیتری با ابعاد ارتفاع ۱۸/۵ در قطر ۱۶/۵ سانتی‌متر منتقل شدند. ترکیب خاک گلدان‌ها شامل خاک مزرعه، پرلیت و کود حیوانی به نسبت حجمی۱:۲:۲ بود که پس از قرار گرفتن در دستگاه پاستوریزه خاک، مورد استفاده قرار گرفتند. در هر گلدان، یک گیاهچه گوجه‌فرنگی کاشته شد. گلدان‌ها بر روی سکوهای داخل گلخانه شیشه‌ای با دمای ۳۰–۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰–۸۰ درصد نگهداری شدند.

به‌منظور تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ‌های اپیفیت، ابتدا آن‌ها در محیط کشت PDA کشت داده شدند. کنیدی‌های قارچ با کمک اسکالپل سترون در آب مقطر سترون جمع‌آوری شدند و غلظت سوسپانسیون با استفاده از لام هماسیتومتر به تعداد 10^8 اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شد. اولین مرحله محلول‌پاشی سوسپانسیون اسپور قارچ‌های اپیفیت بر روی بوته‌های گوجه‌فرنگی قبل از گلدهی انجام شد. مرحله دوم محلول‌پاشی، یک هفته بعد از مرحله اول تکرار شد. محلول پاشی سوسپانسیون قارچ بیمارگر ۲۴ ساعت پس از دومین مرحله محلولپاشی سوسپانسیون قارچ‌های اپیفیت انجام شد. به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور بیمارگر (*A. alternata* SN1–1)، از کشت ۱۴ روزه قارچ در محیط کشت PDA، با کمک اسکالپل سترون سوسپانسیون اسپور در آب مقطر سترون جمع‌آوری شد. غلظت سوسپانسیون با استفاده از هماسیتومتر به تعداد 10^5 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. جهت چسبیدن بهتر اسپورها به سطح اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی، (Merck, Germany) Tween 20 به میزان ۰/۰۵ درصد به سوسپانسیون اسپورها

www.SID.ir

Archive of SID

اضافه شد. سوسپانسیون کنیدی‌ها پس از عبور از چند لایه پارچه ململ، با استفاده از آبفشان دستی بر روی اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی محلول‌پاشی شدند. تا سه روز پس از محلول‌پاشی جهت حفظ رطوبت،گلدان‌ها توسط کیسه پلاستیکی شفاف از جنس پلی‌اتیلن پوشیده شدند. رطوبت داخل گلخانه توسط مه‌پاش اتوماتیک روی ۹۰–۸۰ درصد تنظیم شد. در تیمار شاهد سالم، به‌جای سوسپانسیون اسپور بیمارگر، آب مقطر سترون روی بوته‌ها پاشیده شد. شدت بیماری لکه موجی، ۱۴ روز پس از مایه‌زنی بیمارگر بر اساس یک مقیاس ۹–۰ (۰= سالم ، ۱= ۵–۱ درصد، ۳ = ۱۰–۶ درصد، ۵= ۲۵–۱۱درصد، ۷= ۵۰–۲۶ درصد و ۹= بیش از ۵۱ درصد آلودگی برگی مشاهده شده در هر بوته) (Ramakrishnan *et al*., 1971) تعیین شد. شاخص درصد بیماری (percent disease index=PDI) با استفاده از فرمول زیر ارزیابی شد (Shanmugam *et al*., 2011).

PDI = (∑(تعداد گیاهان ارزیابی شده × شماره مقیاس) / تعداد کل گیاهان × بالاترین مقیاس) × ۱۰۰

شناسایی قارچ‌های اپیفیت مؤثر

برای شناسایی قارچ‌های اپیفیت مؤثر در سطح گونه از دو روش ریخت‌شناختی و مولکولی استفاده شد. به منظور شناسایی ریخت‌شناختی، جدایه‌های اپیفیت در محیط کشت PDA کشت شدند. کشت‌های قارچ در محیط PDA درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. برای شناسایی جدایه‌ها مشخصات پرگنه شامل رنگ و شکل و سرعت رشد پرگنه به همراه صفات میکروسکوپی شامل شکل، اندازه و سایر مشخصات مربوط به کنیدیوفور، فیالید و کنیدیوم ثبت شد. شناسایی ریخت‌شناختی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر علمی شامل Bissett, (1984; 1991 a–b; 1992)، Gams (1998) & Bissett, انجام شد.

برای شناسایی مولکولی، ابتدا به‌منظور تهیه توده میسلیوم تازه قارچی، سویه‌های اپیفیت در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش Zhong and Steffenson, (2001) استخراج شد. به‌منظور تکثیر ناحیه rDNA–ITS از جفت آغازگر ITS1/ITS4 استفاده شد (White *et al*., 1990). برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از مخلوط آماده PCR (Ampliqon, Denmark) شامل dNTPs، آنزیم *Taq* DNA Polymerase، $MgCl_2$ و بافرPCR، استفاده شد. غلظت و مقادیر حجمی مواد به‌کار رفته در ترکیب مخلوط PCR به صورت آب دیونیزه (۸/۵ میکرولیتر)، $Mgcl_2$ (1.5 mM)، 2X Master Mix Red (۱۲/۵ میکرولیتر)، آغازگرها با غلظت pM ۱۰ (۰/۵ میکرولیتر)، DNA ژنومی الگو با غلظت ng۱۰ (۳ میکرولیتر) بود. حجم نهایی مخلوط واکنش در هر لوله PCR به ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain reaction) در دستگاه ترموسایکلر (Peqstar 2x, Peqlab, Germany) با شرایط زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۹۰ ثانیه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت شش دقیقه (White *et al*., 1990). محصولات تکثیر شده، برای خالص‌سازی و تعیین‌توالی نوکلئوتیدی از طریق شرکت توپازژن به شرکت میکروسینث (Microsynth, Switzerland) ارسال شد. بعد از دریافت فایل قطعات تعیین‌توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارFinch TV نسخه 1.4 مشاهده و ارزیابی شد. بررسی تشابه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) با استفاده از ابزار جستجوی BLAST انجام شد. توالی‌های ITS با نرم‌افزار BankIt در بانک ژن ذخیره شدند و به ازای هر توالی، یک شماره دستیابی (accession number) اخذ شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای نرمال کردن توزیع داده‌ها در موارد لازم، تبدیل اعداد انجام شد. داده‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

توسط نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه شدند.

نتایج

جداسازی قارچ‌های اپیفیت

در مجموع، ۶۱ جدایه قارچ اپیفیت از اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی در گلخانه‌های مختلف به دست آمد. این جدایه‌ها به ۱۵ جنس تعلق داشتند (شکل ۱). در این میان، *Alternaria* با ۲۰/۶۸ درصد فراوانی، جنس غالب بود. پس از آن، جنس‌های *Botrytis*، *Ulocladium* و *Cladosporium* با ۱۳/۷۹، ۱۳/۷۹و ۱۰/۳۴ درصد، بیشترین جمعیت قارچ‌های اپیفیت گوجه‌فرنگی را به خود اختصاص دادند. تعداد ۵۳ جدایه قارچ اپیفیت، برای آزمون‌های غربالگری (screening) در آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفتند.

تأثیر قارچ‌های اپیفیت بر روی رشد میسلیومی قارچ *A. alternata* در آزمایشگاه

روش کشت دوطرفه (dual culture technique)

نتایج تجزیه واریانس صفات مقادیر رشد میسلیومی و درصد ممانعت از رشد بیمارگر نشان داد که اثر تیمار در این آزمون در سطح احتمال یک درصد برای هر دو صفت معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارها در این آزمون از نظر تأثیر بر روی صفات اشاره شده با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۱). جدایه‌های F1–7، F1–22، P1–5، P1–8، P2–1 وP4–1 بر روی پرگنه *A. alternata* رشد کردند (overgrowth) و در آن‌جا به فراوانی تولید اسپور نمودند (شکل ۲). همچنین، جدایه‌های F1–7، P4–1، K1–5 و K1–14 بیش از ۶۰ درصد از رشد میسلیومی بیمارگر جلوگیری به‌عمل آوردند که در این میان، جدایه K1–14 با ۷۰/۴۳ درصد و دو جدایه F1–7 و K1–5 با ۶۶ درصد کنترل، مؤثرترین جدایه‌ها در این آزمون بودند. پس از آن‌ها، ۱۰ جدایه قارچ اپیفیت، بیش از ۵۰ درصد از رشد بیمارگر ممانعت کردند (جدول ۱).

تأثیر متابولیت‌های فرّار قارچ‌های اپیفیت

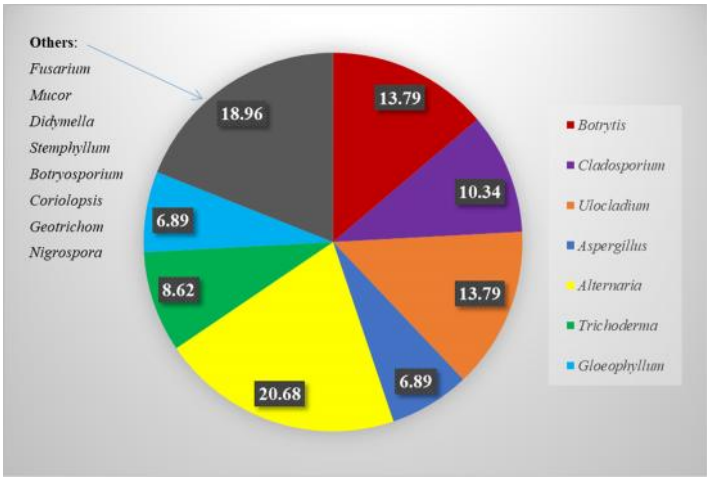
نتایج تجزیه واریانس صفات مقادیر رشد میسلیومی و درصد ممانعت از رشد بیمارگر نشان داد که اثر تیمار در این آزمون در سطح احتمال یک درصد برای هر دو صفت معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارها در این آزمون از نظر تأثیر بر روی صفات اشاره شده با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۱). حداکثر ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر در این آزمون، توسط جدایه P4–1 با ۵۳ درصد کاهش رشد، ایجاد شد. پس از آن، متابولیت‌های فرّار جدایه‌های P1–1 و P1–14 با ۳۹ درصد کاهش رشد میسلیومی بیمارگر، بیشترین تأثیر را نشان دادند (جدول ۱).

تأثیر عصاره خارج سلولی (متابولیت‌های غیر فرّار) قارچ‌های اپیفیت

بر اساس نتایج دو آزمون کشت متقابل و متابولیت های فرّار، تعداد ۱۰ جدایه برای انجام این آزمایش انتخاب شدند. نتایج تجزیه واریانس صفات مقادیر رشد میسلیومی و درصد ممانعت از رشد بیمارگر نشان داد که اثر تیمار در این آزمون در سطح احتمال یک درصد برای هر دو صفت معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارها در این آزمون از نظر تأثیر بر روی صفات اشاره شده با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۲). هفت روز پس از کشت بیمارگر در تشتک‌های پتری حاوی عصاره خارج سلولی جدایه‌های اپیفیت، متابولیت‌های غیر فرّار جدایه P4–1 با ۶۷/۷۸ درصد کاهش رشد میسلیومی، مؤثرترین جدایه اپیفیت بود. پس از آن، جدایه‌های P1–1، P2–1، P3–3، F1–7، F1–22، K1–3 و K1–14 قرار داشتند که بیش از ۵۰ درصد از رشد میسلیومی *A. alternata* ممانعت کردند.

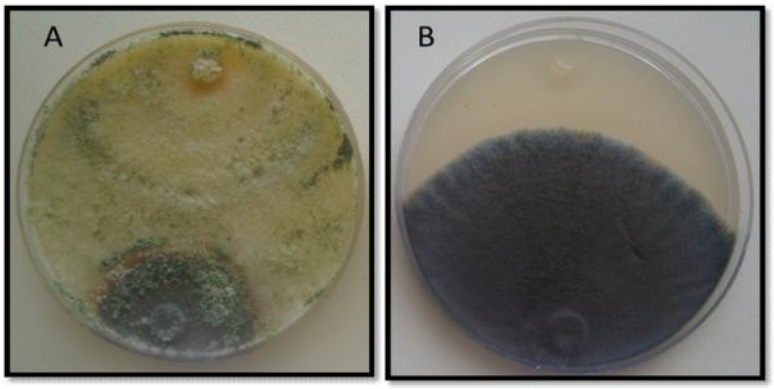
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱– درصد فراوانی جنس‌های قارچی اپیفیت جدا شده از اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی

Fig 1. Frequency of genera of epiphytic fungi isolated from tomato phyllosphere



شکل ۲– A. آزمون کشت متقابل جدایه اپیفیت F1–22 و *Alternaria alternata* در تشتک پتری حاوی PDA پس از هفت روز و B. شاهد (*Alternaria alternata* به تنهایی)

Fig. 2. A. Dual culture of fungal epiphyte isolate F1–22 and *Alternaria alternata* in Petri plate containing PDA after seven days and B. Control (*Alternaria alternata* alone)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱– تأثیر سویه‌های قارچی اپیفیت بر رشد میسلیومی و درصد بازداری از رشد *Alternaria alternata* در آزمون‌های کشت متقابل و متابولیت‌های فرّار

Table 1. Effect of epiphytic fungi on mycelium growth and growth inhibition of *Alternaria alternata* in dual culture and volatile metabolite tests

	Dual culture		Volatile	
Isolate	Growth (mm)	Inhibition (%)	Growth (mm)	Inhibition (%)
SN1–1	38.3 a	N/A	38.33 a	N/A
A2–6	23.6 d–k	38.26 d–k	37.3 a	2.60 jk
AG1–11	21.3 f–n	44.34 c–j	27.3 e–h	15.3 b–f
F1–1	20.6 g–n	46.08 b–i	30 c–f	21.73 b–g
F1–2	21.6 f–n	43.47 c–k	29 d–h	24.34 b–f
F1–6	19.6 i–o	48.69 b–h	30.3 c–f	20.86 b–g
F1–7	13 pq	66.08 ab	36.6 ab	4.34 ijk
F1–8	21 g–n	45.21 b–j	28 f–i	26.95 b–e
F1–10	21.3 f–n	44.34 c–j	30.6 c–f	20 b–g
F1–12	22 e–m	42.60 c–k	37.3 a	2.60 jk
F1–13	23 d–k	40 d–k	37 a	3.47 ijk
F1–15	18.3 k–o	52.17 a–f	31.6 b–f	17.38 d–h
F1–16	18.6 k–o	51.30 a–g	26.3 f–i	31.30 a–d
F1–18	32.3 bc	15.64 l	28.3 fgh	26.08 b–f
F1–19	36.3 ab	5.21 m	28.3 f–i	26.0 b–f
F1–22	16.3 nop	57.39 a–d	28 f–i	26.95 b–e
K1–2	32 bc	14.78 l	31.6 b–f	17.38 d–g
K1–3	26 defg	32.17 h–k	37.3 a	2.60 jk
K1–5	13 pq	66.08 ab	36.3 ab	5.21 ijk
K1–8	28 cd	26.95 k	37.3 a	2.60 jk
K1–9	17.3 l–p	54.78 a–e	34 a–d	11.30 e–j
K1–10	24.3 d–j	36.52 e–k	30.6 c–f	20 b–g
K1–11	25 d–i	34.78 f–k	29.6 c–g	22.60 b–g
K1–13	27.3 de	28.69 jk	34.3 abc	10.43 f–j
K1–14	11.3 q	70.43 a	24 hi	37.39 ab
K1–15	23 d–k	40 d–k	31.6 b–f	17.38 d–g
K1–16	24.3 d–j	36.52 e–k	29 d–h	24.34 b–f
K1–17	23.3 d–k	39.13 d–k	31.6 b–f	17.39 d–g
K1–19	35.3 ab	7.82 m	36.6 ab	4.34 ijk
P1–1	16.6 m–p	56.52 a–e	23.3 i	39.13 ab
P1–4	25.6 d–h	33.04 g–k	37.6 a–d	1.73 e–j
P1–5	21.6 f–n	43.47 c–k	30 c–f	21.73 b–g
P1–6	19 j–o	50.43 a–h	37.3 a	2.60 jk
P1–8	21.6 def	30.43 ijk	36.6 ab	4.34 ijk
P1–19	22 e–m	42.60 c–k	31.3 a	2.60 jk
P1–10	21.6 f–n	43.47 c–k	34.3 abc	10.43 g–k
P1–14	20.3 h–n	46.95 b–i	23.4 a	39.14 k
P1–17	18.6 k–o	51.30 a–g	26.3 f–i	31.30 a–d
P2–1	17.3 l–p	54.78 a–e	27.6 f–i	27.82 b–e
P2–2	22.3 e–l	41.73 c–k	33.6 a–e	12.17 e–i
P2–4	21 g–n	45.21 b–j	30 c–f	21.73 b–g
P2–5	19.6 i–o	48.69 b–h	36.6 ab	4.34 ijk
P2–6	18.3 k–o	52.17 a–f	37.3 a	2.60 jk
P3–1	23.3 d–k	39.13 d–k	36.3 ab	5.21 ijk
P3–3	17.3 l–p	54.78 a–e	28.3 ghi	35.6 abc
P4–1	14.6 opq	61.74 abc	18 j	53.04 a

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌های هر ستون که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Data are the means of three replications. Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$). N/A: not applicable

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲– تأثیر عصاره خارج سلولی قارچ‌های اپیفیت بر روی رشد میسلیومی قارچ *Alternaria alternata*

Table 2. Effect of the extracellular extract of epiphytic fungi on mycelium growth of *Alternaria alternata*

Isolate	Growth (mm)	Inhibition (%)	Isolate	Growth (mm)	Inhibition (%)
SN1–1	38.3 a	N/A	K1–14	18.5 c	51.73 a
AG1–11	29.8 b	22.17 b	P1–1	16.3 cd	57.39 a
F1–7	16.5 cd	56.95 a	P2–1	17.8 c	53.47 a
F1–22	18.8 c	50.87 a	P3–3	18 c	53.04 a
K1–3	18 c	52.60 a	P4–1	13.5 d	64.78 a
K1–5	30.5 b	20.43 b			

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌های هر ستون که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Data are the means of three replications. Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$). N/A: not applicable

بررسی اثر جدایه‌های انتخابی اپیفیت در کنترل بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در گلخانه

نتایج تجزیه واریانس صفت درصد شاخص بیماری لکه موجی در گلخانه نشان داد که اثر تیمار بر روی این صفت معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارها از نظر تأثیر بر روی شدت بیماری در سطح ۱ درصد بایکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول۳). جدایه‌های F1–22 و P4–1 و جدایه‌های P1–1 و P2–1 کمترین شاخص درصد بیماری را سبب شدند و به ترتیب به میزان ۸۲ درصد و ۷۵ درصد بیماری لکه‌موجی را کنترل کردند.

جدول ۳– اثر جدایه‌های منتخب اپیفیت در کنترل بیماری لکه موجی گوجه‌فرنگی در گلخانه

Table 3. Effect of selected epiphytic fungi in controlling early blight disease in greenhouse

Isolate	PDI (%)	Disease control	Isolate	PDI (%)	Disease control
AG1–14	55 ab	45	P1–1	25.6 bc	74.4
F1–7	92.3 a	7.7	P2–1	25.6 bc	74.4
F1–22	18.3 c	81.4	P3–3	33 bc	67
K1–3	77 a	23	P4–1	18.3 c	81.4
K1–5	100 a	0	Inoculated control	100 a	0
K1–14	84.6 a	15.4	Non–inoculated control	0 d	100

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌های هر ستون که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند، در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Data are the means of three replications. Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.01$). N/A: not applicable

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی جدایه‌های برتر قارچ‌های اپیفیت

چهار جدایه برتر که در آزمون گلخانه موجب بیشترین کنترل شدت بیماری لکه موجی شدند، بر اساس روش‌های شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی، به دوگونه *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma longibrachiatum* تعلق داشتند. مکان جداسازی و شماره دستیابی (accession number) دریافت شده از NCBI GenBank مربوط به توالی rDNA–ITS در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴– مؤثرترین سویه‌های اپیفیت قارچی در کنترل بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در گلخانه

Table 4. The most effective epiphytic fungi in controlling tomato early blight in greenhouse

Isolate	Species	Place of collection	Accession number (ITS)
F1–22	*Trichoderma harzianum*	Varamin	MN326702
P1–1	*Trichoderma longibrachiatum*	Pakdasht	MN326705
P2–1	*Trichoderma harzianum*	Pishva	MN326703
P4–1	*Trichoderma harzianum*	Pakdasht	MN326704

بحث و پیشنهادات

مرور منابع علمی نشان می‌دهد که تعداد عوامل بیوکنترل بیماری‌های گیاهی هوازاد در مقایسه با بیماری‌های خاکزاد کمتر است. از دلایل این قضیه، می‌توان شرایط محیطی ناپایدارتر حاکم بر اندام‌های هوایی گیاهان مانند دما و رطوبت، کمبود مواد غذایی و نور ماورای بنفش را برشمرد (Hoopen *et al*., 2003).

بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی یک بیماری هوازاد است و عامل بیماری با استقرار و نفوذ در اندام‌های هوایی علائم بیماری را ایجاد می‌کند. لذا جستجو برای پیدا کردن آنتاگونیست‌های مؤثری که در فیلوسفر حضور داشته و در آن‌جا سازگاری یافته‌اند، در مقایسه با آنتاگونیست‌های موجود در خاک یا محیط فراریشه (ریزوسفر)، از جنبه کنترل عملی و کاربردیِ بیماری در اولویت بالاتری قرار دارد. بنابراین در این تحقیق، جداسازی قارچ‌های اپیفیت مستقر در اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی با هدف کنترل بیماری لکه موجی در دستور کار قرار گرفت.

نتایج آزمون‌های غربالگری در آزمایشگاه نشان داد که قارچ‌های اپیفیت جدا شده از سطح اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی، توانایی مهار رشد *A. alternata*، قارچ مولد لکه‌برگی را با درجات مختلف دارا بودند. در آزمون کشت متقابل، ۱۴ جدایه ۷۰–۵۰ درصد از رشد میسلیومی بیمارگر جلوگیری کردند. اما در آزمون متابولیت‌های فرّار، فقط یک جدایه قادر بود بیش از ۵۰ درصد مانع از رشد قارچ بیمارگر شود و میزان مهارکنندگی بقیه جدایه‌ها، کم‌تر از ۴۰ درصد بود. عصاره کشت هشت قارچ اپیفیت توانستند ۶۵–۵۰ درصد باعث بازدارندگی از رشد *A. alternata* در آزمایشگاه شوند. بر اساس نتایج آزمون‌های غربالگری در آزمایشگاه، ۱۰ جدایه برای آزمون گلخانه انتخاب شدند. چهار جدایه، حدود ۸۲–۷۵ درصد بیماری لکه موجی را کنترل کردند. همگی این چهار جدایه به دو گونه *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* متعلق بودند. بنابراین، بر اساس نتایج این تحقیق، سویه‌های اپیفیت تریکودرما علاوه بر این که در میان قارچ‌های مؤثر در آزمون‌های آنتاگونیسم در آزمایشگاه قرار

www.SID.ir

Archive of SID

داشتند، موفق‌ترین قارچ‌های اپیفیت گوجه‌فرنگی در کنترل مؤثر بیماری لکه موجی در گلخانه بودند.

کارآیی سویه‌های مختلف تریکودرما در کنترل بیولوژیک لکه برگی و بلایت آلترناریایی در میزبان‌های گیاهی مختلف شامل ترب و کلم (Vannacci & Harman, 1987)، لپه (Lal & Upadhyay, 2002)، آفتابگردان (Arzanlou *et al*., 2014)، نخود (Gadhi *et al*., 2018)، فلفل (Pandey *et al*., 2010; Srivastava *et al*., 2012)، خردل (Meena *et al*., 2004)، باقلا (Kumar *et al*., 2006)، پیاز (Shahnaz *et al*., 2012; Abo–Elyousr *et al*., 2014)، سیب‌زمینی (Metz, 2017)، گزارش شده است. تمامی جدایه‌های تریکودرمای مورد تحقیق در مطالعات فوق، از خاک یا محیط فراریشه جداسازی شده بودند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر، سویه‌های تریکودرمای اپیفیت گوجه‌فرنگی توانستند بین ۷۵ تا ۸۲ درصد بیماری لکه موجی را در گلخانه کنترل نمایند. Babu (2000) *et al*., حداکثر میزان کنترل این بیماری توسط جدایه‌های تریکودرمای مورد مطالعه را ۲۲ درصد اعلام کردند. Ramanujam *et al*. (2015) کاهش شدت بیماری توسط سویه های *T. harzianum* و *T. viride* به میزان ۶۲ درصد بیان کردند. Sain & Pandey, (2016) هم مقدار کنترل لکه موجی توسط جدایه‌های *T. harzianum* را در گلخانه و مزرعه به ترتیب ۹۹–۹۰ درصد و ۹۳–۶۸ درصد گزارش کردند.

اعضای جنس *Trichoderma*، مشهورترین و مهم‌ترین عوامل قارچی کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی به‌شمار می‌روند و جدایه‌های مختلف تریکودرما به‌طور مؤثر برای کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی خاکزاد، هوازاد و بذرزاد در گیاهان مختلف به‌کار می‌روند (Harman *et al*., 2004; Kredics *et al*., 2014). موفقیت بالای اعضای این جنس قارچی در این زمینه، مرهون مکانیسم‌های مختلف شامل توان رقابتی بالا با بیمارگرها برای تصاحب جا و غذا، هایپرپارازیتیسم و تولید طیف وسیع و متنوعی از متابولیت‌های فرّار (مانند لاکتون‌ها، الکل‌ها، استالدئیدها مشتقات ترپن، ترکیب کربنیل‌دار و آلفاپیرون) (Cigdem *et al*., 2003; Keswani *et al*., 2014) و غیرفرّار (مانند تریکوتسین، تریکودرمین، ویریدین و پپتایبول‌ها) (Kubicek *et al*., 2007; Reino *et al*., 2008; Mukherjee *et al*., 2012) و نیز آنزیم‌های متعدد (سلولاز، کیتیناز، پکتیناز، پروتئاز و بتا ۱ و ۳–گلوکاناز) (Papavizas, 1985; Benitez *et al*., 2004; Cigdem *et al*., 2004; Lorito *et al*., 2010) می‌باشد. علاوه بر این‌ها، سویه‌های تریکودرما با اصلاح محیط فراریشه و کمک به جذب مواد غذایی توسط گیاهان، باعث افزایش رشد گیاهان شده و نیز با تغییر در میزان آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنول اکسیداز و ترکیبات دیگری مانند فنل و پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR proteins) در گیاه باعث القای مقاومت در گیاهان در برابر بیماری‌های گیاهی می‌شوند (Brunner *et al*., 2005; Harman, 2006; Vinale *et al*., 2012). همچنین، سویه‌های تریکودرما بخاطر توانایی بالای تکثیر و اسپورزایی در بسترهای آلی مختلف و بقاء تحت شرایط نامساعد، از مزیّت بالایی در صنعت تولید آفتکش‌های بیولوژیک برخوردار می‌باشند. به‌دلیل قابلیت‌های بالای سویه‌های تریکودرما که در بالا به آن اشاره شد، مسیر تجاری سازی سویه‌های بیوکنترل این جنس هموار بوده به طوری که سهم بالایی از فرآورده‌های بیولوژیک تجاری را به خود اختصاص داده‌اند (Woo *et al*., 2014).

جدایه‌های تریکودرما ذاتاً از قارچ‌های خاکزی در طبیعت محسوب می‌شوند. اما، نتایج این تحقیق نشان داد که این قارچ‌ها، توانایی ویژه‌ای برای بقاء و استقرار روی اندام‌های هوایی دارند. محققین دیگری هم جدایه‌های تریکودرمای بیوکنترل سازگار در اندام‌های هوایی (phyllosphere competent) را از سیب (Falconi & Mendgen, 1994)، موز

www.SID.ir

Archive of SID

(Alvindia & Natsuaki, 2008) و برنج (Naeimi *et al*., 2010; Khalili *et al*., 2012; Javadi *et al*., 2014) گزارش کردند. به همین دلیل، به جدایه‌های تریکودرمایی که قادرند در اندام‌های هوایی گیاهان، بیمارگرهای گیاهی را مهار کنند، آنتاگونیست خارجی (foreigner antagonist) اطلاق می‌شود (Blakeman & Fokkema, 1982).

با توجه به هوازاد بودن بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی و توانایی بالای آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرمای اپیفیت که سازگاری بالایی در سطح اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی داشته و به خوبی بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی را در گلخانه کنترل کردند، چشم‌انداز امید بخشی در خصوص کاربرد عملی سویه‌های مؤثر و جایگزین کردن روش کنترل بیولوژیک بیماری لکه موجی گوجه‌فرنگی با سموم خطرناک شیمیایی وجود دارد. برای رسیدن به این هدف، انجام مطالعات تکمیلی در زمینه بررسی دینامیک جمعیت سویه‌های مؤثر در سطح اندام‌های هوایی، تهیه فرمولاسیون‌های مناسب، دُز و تعداد کاربرد و نیز تلفیق سویه‌های مؤثر پیشنهاد می‌شود.

References

Abo–Elyousr, K.A.M., Abdel–Hafez, S.I.I. & Abdel–Rahim, I.R. 2014. Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. Journal of Phytopathology, 162: 567–574.

Alvindia, D.G. & Natsuaki, K.T. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. Crop Protection, 27: 1200–1207.

Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology, 30: 630–635.

Arzanlou, M., Khodaei, S., Narmani, A., Babai–Ahari, A. & Motallebi Azar, A. 2014. Inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on growth of *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf spot disease on sunflower, under laboratory conditions. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47: 1592–1599.

Babu, S., Seetharaman, R., Nandakumar, R. & Johnson, I. 2000. Efficacy of fungal antagonists against leaf blight of tomato caused by *Alternaria solani* (Ell. and Mart.). Journal of Biological Control, 14(2): 79–81.

Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. & Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249–260.

Bisset, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany, 62: 924–931.

Bisset, J. 1991 a. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany, 69: 2373–2417.

Bissett, J. 1991 b. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany, 69: 2418–2420.

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

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, L.S., Lorito, M., Kubicek, C.P., & Mach, R.L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Appplied and Environmental Microbiology, 7: 3959–3969.

Chaerani, R. & Voorrips, R.E. 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. Plant Pathology, 72: 335–334.

Chaerani, R., Groenwold, R., Stam, P. & Voorrips, R.E. 2007. Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a droplet inoculation method. Journal of General Plant Pathology, 73: 96–103.

Cigdem, K. & Merhi, K. 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turkish Journal of Boilogy, 28:111–115.

Cigdem, K. & Merhi, K. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological feature, Turkish Journal of Biology, 27: 247–253.

Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species–groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 41–48.

Falconi, C.J. & Mendgen, K. 1994. Epiphytic fungi on apple leaves and their value for control of the postharvest pathogens *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructigena* and *Penicillium expansum.* Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 101: 38–47.

www.SID.ir

Archive of SID

Foolad, M.R. & Lin, G.Y. 2000. Relationship between cold tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato germplasm evaluation. Journal of the American Society Horticultural Science, 125: 679–683.

Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjær, M.F., Thordal–Christensen, H. & Pons–Kühnemann, J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. Mycorrhiza, 16: 413–419.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. Pp. 3–34, *In*: Kubicek, C. P., Harman, G. E. (Eds), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor and Francis Ltd., London.

Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology, 96:190–194.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species– Opportunistic, avrirulent plant symbionts. Nature Review of Microbiology, 2: 43–56.

Hongsanan, S., Sanchez–Ramirez. S., Crous, P.W., Ariyawansa, H.A., Zhao, R.L. & Hyde, K.D. 2016. The evolution of fungal epiphytes. Mycosphere, 11:1690–1712.

Javadi, L. Naeimi, S., Rezaee, S. & Khosravi, V. 2014. Biological control of rice blast disease with native *Trichoderma* isolates in Mazandaran province, Iran. Biocontrol in Plant Protection, 2(1): 1–15. (In Persian with English summary)

Junior, V.L., MaYa, L.A., da Silva Romeiro, R. & Mizubuti, E.S.G. 2006. Biocontrol of tomato late blight with the combination of epiphytic antagonists and rhizobacteria. Biological Control, 38: 331–340.

Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B.K., Singh, S.P. & Singh, H.B. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied Microbiology and Biotechnology, 98:533–544.

Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S. & Khosravi, V. 2012. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. Brazilian Journal of Microbiology, 43: 297–305.

Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. & Druzhinina, I. 2014. Biodiversity of the Genus *Hypocrea*/*Trichoderma* in Different Habitats. In Biotechnology and Biology of *Trichoderma*; Gupta, V.G., Schmoll, M., Herrera–Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M., Eds.; Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3–24.

Kubicek, C.P., Komon–Zelazowska, M., Sandor, E. & Druzhinina, I.S. 2007. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. Chemistry & Biodiversity, 4: 1068–1082.

Kumar, S., Upadhyay, J.P. & Kumar, S. 2006. Biocontrol of *Alternaria* leaf spot of *Vicia fiba* using antagonistic fungi. Journal of Biological Control, 20(2): 247–250.

Lahkar, J., Borah, S.N., Deka, S. & Ahmed, G. 2015. Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organism of early blight of tomato. BioControl, 60(3): 401–414.

Lal, H.C. & Upadhyay, J.P. 2002. Biological control of leaf blight caused by *Alternaria tenuissima* (Kunze ex. Pers.) Wiltshire in pigeonpea. Journal of Biological Control, 16(2): 141–144.

Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V. & Samiyappan, R. 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. Biological Control, 50: 85–93.

Lindow, S.E. & Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology, 69(4): 875–1883.

Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. & Monte, E. 2010. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. Annual Review of Phytopathology, 48(1): 395–417.

Meena, P.D., Meena, R.L., Chattopadhyay, C. & Kumar, A. 2004. Identification of critical stage for disease development and biocontrol of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). Journal of Phytopathology, 152(4): 204–209.

Metz, N. 2017. Biologicals for the control of *Alternaria solani* under greenhouse and field conditions. Sixteenth Euroblight Workshop, Aarhus, Denmark, Special Report No. 18: 85–90.

Monaco, C.I., Nico, A.I., Mitidieri, I. & Alippi, H.E. 1999. Saprobic fungi inhibiting tomato phylloplane as possible antagonists of *Alternaria solani*. Acta Agronomica Hungarica, 47: 397–403.

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A. & Kenerley, M. 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. Microbiology, 158: 35–45.

Gadhi, M.a., Nizamani, Z.A., Jatoi, G.H., Abro, M.A., Keerio, A.U., Poussio, G.B. & Qiu, D. 2018. **In vitro** efficacy of biocontrol agent and essential oils against leaf blight of chickpea caused by *Alternaria alternata*. Acta Ecologica Sinica, (in press) https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.11.002

Naeimi, S., Okhovvat, S.M., Javan–Nikkhah, M., Kredics, L. & Khosravi, V. 2010. Frequency and distribution of *Trichoderma* spp. in the paddy rice fields of Mazandaran province, Iran. Iran Journal of Plant Protection Science, 40: 79–91. (In Persian with English summary)

www.SID.ir

Archive of SID

Nash, A.F. & Gardner, R.G.1988. Tomato early blight resistance in a breeding line derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 126445. Plant Disease, 72: 206–209.

Pandey, A. 2010. Antagonism of two *Trichoderma* Species against *Alternaria alternata* on *Capsicum frutescens*. Journal of Experimental Sciences, 5(1): 18–19.

Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium:* Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23:23–57.

Ramakrishnan, L., Kamalnathan, S. & Krishnamurthy, C.S. 1971. Studies on *Alternaria* leaf spot of tomato. Madras Agricultural Journal, 58(4): 275–280.

Ramanujam, B., Sriram, S., Rangeshwaran, R. & Honnur, B. 2015. Biocontrol efficacy of fungal and bacterial antagonists against early blight of tomato caused by *Alternaria solani.* Indian Journal of Horticulture, 72(1): 147–148.

Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernandez–Galan, R. & Collado, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochem Rev, 7:89–123.

Sain, S.K. & Pandey, A.K. 2016. Biological spectrum of *Trichoderma harzianum* Rifai isolates to control fungal diseases of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 49: 507–521.

Sarkar, S., Beura, S.K., Nandi, A., Das, S., Dash, S.K., Senapati, N., Pandey, G. & Patnaik, A. 2016. Management of early blight of tomato (*Alternaria solani* Ellis and Martin) by chemicals and biocontrol agents under field condition. Journal of Mycopathological Research, 54(1): 81–84.

Shahnaz, E., Razdan, V., Rezwawi, S., Rather, T., Gupta, S. & Andrabi, M. 2012. Integrated disease management of foliar blight disease of onion: a case of application of confounded factorials. Journal of Agriculture Science, 5(1): 17–22.

Shanmugam, V. & Kanoujia, N. 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycospersici* by plant growth–promoting rhizobacterial mixture. Biological Control, 57: 58–93.

Sherf, A.F. & MacNab, A.A.1986. Vegetable Diseases and their Control. Wiley, New York.

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria*: an identification manual. The American Phytopathological Society, Pp 500–510.

Srivastava, A.K., Singh, R.N., Kumar, S., Kashyap, P.L. & Arora, D.K. 2012. Growth promotion and management of *Alternaria* leaf spot in chilli by *Trichoderma harzianum.* International Journal of Innovative Horticulture, 1(2): 158–163.

Vannacci, G. & Harman, G.E. 1987. Biocontrol of seed–borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola.* Canadian Journal of Microbiology, 33: 850–856.

Varma, P.K., Gandhi, S.K. & Singh, S. 2008. Biological control of *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. Journal of Biological Control, 22(1): 67–72.

Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. & Valero, J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37: 1–20.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Ruocco, M., Woo, S. & Lorito, M. 2012. *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. Natural Product Communications, 7(11): 1545–1550.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. *In*: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York.

Woo, S.L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G. & Lorito, M. 2014. *Trichoderma*–based products and their widespread use in agriculture. Open Mycology Journal, 8 (Suppl 1): 71–126 (M4).

Yadav, S.L., Mishra, A.K., Dongre, P.N. & Singh, R. 2011. Assessment of fungitoxicity of phylloplane fungi against *Alternaria brassicae* causing leaf spot of mustard. Journal of Agricultural Technology, 7(6): 1823–1831.

Zhong, S. & Steffenson, B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology, 91(5): 469–476.

www.SID.ir

Archive of SID

Biological control of early blight of tomato with epiphytic strains of *Trichoderma*

Maryam Hosseinmardi[1], Shahram Naeimi[2], Saeed Rezaee[1]
1. Department of Plant Protection, College of Agriculture Sciences and Food Industries , Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Corresponding author: Shahram Naeimi, e–mail: sh.naeimi@areeo.ac.ir

Received: June, 07, 2019 7(2) 1–15 Accepted: Jan., 12, 2020

Abstract

Early blight incited by *Alternaria* spp. is one of the destructive diseases of tomato which causes considerable crop yield losses. Biological control of the disease with epiphytic fungi as phyllosphere competent microorganisms is a suitable alternative to chemical pesticides. In order to isolating the fungi, healthy tomato plants were collected and small pieces of leaves and stems were placed in distilled water on a shaker and the aliquot was cultured. In search for biocontrol strains, isolated fungi were screened against the fungal pathogen (*Alternaria alternata* SN1–1) using dual culture as well as the volatile and non–volatile metabolites tests *in vitro* and effective isolates were selected to study their efficacy on disease control under greenhouse conditions. Conidial suspension of epiphytic fungi was sprayed two times on the aerial parts of the plant in greenhouse. Two weeks after inoculation of the pathogen, the disease severity was evaluated based on a 0–9 scale. Results of screening test showed that epiphytic fungi inhibited the mycelial growth of the pathogen in various degrees. Maximum inhibition in dual culture, volatile and non–volatile metabolites tests were 70%, 53% and 68%, respectively. In greenhouse, the least disease indexes were recorded for the isolates F1–22 and P4—1 (81.4% disease control) together with P1–1 and P2–1 (74.4% disease control). Isolates F1–22, P4–1 and P2–1 identified as *Trichoderma harzianum* and isolate P1–1 identified as *Trichoderma longibrachiatum*.

Keywords: *Alternaria*, biological control, fungal epiphytes, greenhouse

www.SID.ir