

بررسی تاثیر قارچ های آنتاگونیست *Trichoderma spp.* علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* در شرایط گلخانه

مصطفی نیک نژاد کاظم پور، عباس شریفی تهرانی و محمود اخوت
به ترتیب استاد یارگروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و استادان
گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۲۸/۸/۵

خلاصه

در این بررسی تاثیر جدایه هایی از قارچ های آنتاگونیست (*T1, T2*) و *Trichoderma harzianum* (T1, T2) روی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *Fusarium oxysporum* (*T3, T4*) را بررسی کردند. نتایج نشان داد که جدایه های *Trichoderma* مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جدایه های *Trichoderma* مخلوط با خاک آلوده به فوزاریوم (T1)، (T2)، (T3)، (T4) و (T5) درصد ۶۰/۹۸ (T3)، ۶۲/۹۱ (T1)، ۶۸/۱۳ (T2) و ۵۷/۶۹ (T4) درصد گوجه فرنگی رقم Mony meker را کاهش دادند. قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* در حضور فوزاریوم باعث افزایش رشد (وزن تراو ارتفاع) بوته های گوجه فرنگی شده و در محاسبات آماری روی اعداد اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ داشته و گروه بندی ها بر اساس آزمون LSD انجام شد. جدایه *Trichoderma harzianum* به تنهایی و بدون حضور فوزاریوم در خاک اثر مثبت روی ارتفاع بوته ها در مقایسه با شاهد داشت.

واژه های کلیدی: گوجه فرنگی، پژمردگی فوزاریومی، آنتاگونیست، تریکوکورما، گلخانه

یکی از راههای مبارزه با این بیماری استفاده از قارچهای آنتاگونیست یعنی مبارزه بیولوژیکی است.

در زمینه مبارزه بیولوژیک با قارچ عامل بیماری بررسی هایی انجام گرفته، محمد و بنهمو نشان میدهد که قارچ *Trichoderma harzianum* Pers. ex Fr. قادر به ایجاد ترشحات سلولی و ترکیبات فرار بوده که باعث جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری و دیگر پاتوژنهای خاکزی می شود (۱۱).

نیک نژاد و شریفی تهرانی اثر تریکوکورما روی قارچ *F. o. f. sp. lycopersici* را در گوجه فرنگی بررسی و کاهش بیماری را در اثر

مقدمه

گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum* Miller) یک گیاه یکساله بوده متعلق به خانواده Solanaceae می باشد. بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی یکی از بیماریهای مهم این گیاه است که عامل آن *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* می باشد. این بیماری در تمام دنیا وجود دارد و در ایران بخصوص در مزارع گوجه فرنگی خسارت زیادی وارد می کند و یکی از شایع ترین و مخرب ترین بیماریهای گوجه فرنگی منطقه ورامین می باشد. میانگین درصد آلودگی در مزارع گوجه فرنگی در منطقه ورامین حدود ۲۷/۳٪ بوده است.

به منظور اضافه کردن اینوکلوم فوزاریوم به خاک جهت انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای این قارچ را روی مخلوطی از ماسه و آرد ذرت مرطوب (به ترتیب ۹۵ گرم + ۵ گرم + ۵ میلی لیتر آب) که به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۱۲۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱ اتمسفر استریل شده بود تکثیر گردید. برای این کار از کشت ۴ روزه قارچ روی PDA (عصاره سیب زمینی - دکستروزوآگار) استفاده گردید که سوسپانسیون آن با غلظت $10 \times 10^6 / 89$ اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر به وسیله لام گلبلول شمار^۱ تهیه و ۲ میلی لیتر آن به فلاسک حاوی ۱۰۰ گرم ماسه و آرد ذرت افزوده شد. فلاسکها در انکوباتور با دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ روز قرار داده شدند. به تعدادی از فلاسکهای حاوی ۱۰۰ گرم مخلوط ماسه و آرد ذرت استریل فقط ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل به جای سوسپانسیون اسپور به عنوان شاهد افزوده و در انکوباتور نگهداری شدند.

برای تکثیر آنتاگونیستها از سبوس گندم تخمیر شده استفاده گردید. به این ترتیب که سبوس را در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو کرده و سپس به مدت ۱۰ روز در شرایط گلخانه در دمای ۳۰ - ۲۶ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی %۸۰ به طور رو باز قرار داده شد که به وسیله میکروارگانیزم‌های موجود در محیط گلخانه تخمیر گردد. بعد از تخمیر، سبوس‌ها مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شدند. ضمناً قارچهای آنتاگونیست نیز به مدت ۴ روز زیرنور فلورسنت روی محیط PDA رشد داده شد.

اسپورهای هر جدایه در آب مقطر استریل بصورت سوسپانسیون با غلظت ۵ اسپور در هر میلی لیتر به وسیله لام گلبلول شمار تهیه و از هر قارچ یک میلی لیتر به ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و سپس درون کیسه‌های نایلونی محتوى ۲۰۰ گرم سبوس تخمیر شده و استریل ریخته شد و مدت سه هفته در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد زیر نور فلورسنت و در رطوبت %۷۰ نگهداری شدند. در این مدت تریکودرما قادر بود که در تمام قسمتها سبوس رشد کرده و اسپورزایی کند.

۳ - اختلاط اینوکلوم قارچها با خاک و کاشت نشاء گوجه فرنگی
اینوکلوم قارچ یماریزای F. o. f.sp. lycopersici موجود به نسبت ۱۰٪ وزنی با خاک استریل گلدانی مخلوط (۱۰۰ گرم

این آنتاگونیست گزارش کردند (۷).

با زاگیر و اخوت اثر جدایه های Trichoderma Gliocladium را روی بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی بذر و مرگ گیاهچه لوپیابررسی و تاثیر مثبت آنها را در تقلیل بیماری اعلام داشتند (۳).

اخوت و ظفری تاثیر تعدادی از جدایه های این قارچ های آنتاگونیست را روی بیماری خال سیاه سیب زمینی بررسی و نتایج مشابهی را به دست آوردند (۱).

نظری اثر T. harzianum drechsleri Tuker (عامل بوته میری خیار در ایران) بررسی و گزارش نمود که تریکودرما وقوع بیماری را کاهش داده و باعث رشد بیشتر گیاه می شود (۶).

روحانی و همکاران اثر تریکودرما را روی قارچ Rhizoctonia solani kuehn کاهش بیماری را توسط این آنتاگونیست گزارش کردند (۴). سیوان و همکاران نشان دادند که قارچ T. harzianum قادر به کنترل پوسیدگی فوزاریومی طبقه گوجه فرنگی و برخی دیگر از قارچهای یماریزای خاکزی در شرایط مزرعه می باشد (۱۲).

مواد و روشها

۱ - منابع عامل بیماری و آنتاگونیست ها

در این بررسی از قارچ F. o. f. sp. lycopersici جدا شده از ساقه گوجه فرنگی آلوده در مزارع و رامین استفاده شد که قبله یماریزایی آن روی گوجه فرنگی رقم Mony meker توسط نیک نژاد طبق روشهای متداول یماری شناسی گیاهی به اثبات رسیده بود (۷).

جدایه های آنتاگونیستها به نامهای Trichoderma harzianum Rifa (T₁) (از مزارع لوپیای اهواز) T. harzianum (T₂) (جدا شده از مزارع گوجه فرنگی داشکده کشاورزی کرج) T. viride (T₃) (جدا شده از مزارع لوپیای شهریار کرج) و T. viride (T₄) (دریافتی از موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی اوین) مورد استفاده قرار گرفت.

۲ - تکثیر عامل بیماری و آنتاگونیست ها

وزن تر آنها بطور مجزا بوسیله ترازوی دقیق دیجیتال مشخص شد.

۵ - محاسبات

محاسبات آماری بر روی درصد کاهش بیماری و اوزان انجام شد و میانگین گیری و گروه بندی صورت گرفت. درصد کاهش بیماری (DR%)^۱ طبق روش سیوان و همکاران (Sivan and Chet) (DR%) = $\frac{DT}{DC} - 1$ از فرمول (1 - DT/DC) به دست آمد که بیماری در تیمار و DC^۲ بیماری در شاهد^۳ میباشد.

نتایج

در بررسی مربوط به اثر جدایه های *Trichoderma* روی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ملاحظه شد که همه آنها اثر خوبی روی بیماری دارند. درصد کاهش بیماری در اثر تریکوکوردا در حضور قارچ فوزاریوم عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی رقم Mony maker که یکی از ارقام حساس به بیماری تشخیص داده شده بود به ترتیب تیمارهای T4 > T3 > T2 > T1، معنی دار بود (جدول ۱). گرفت و در گروه بندی آماری در سطح ۱٪ معنی دار بود (جدول ۱). در مورد تاثیر تریکوکوردا در افزایش طول بوته ها و وزن تر بونه های گوجه فرنگی نسبت به شاهد آلوده فوزاریوم، تمامی جدایه ها تاثیر متفاوتی روی افزایش طول بوته ها و وزن تر بوته های گوجه فرنگی داشتند و در گروه های مختلف آماری قارچ گرفتند و در سطح ۱٪ با شاهد آلوده اختلاف معنی داری را نشان دادند. جدایه *Trichoderma harzianum* (T2) به تنها بیماری بدون حضور فوزاریوم تاثیر مثبتی روی ارتفاع بوته ها داشته است و محاسبات آماری اختلاف معنی داری را نیز با شاهد سالم نشان داده اند (جدول ۲).

بحث

جدا شدن قارچ *Trichoderma* از خاک و از ریزوسفر گوجه فرنگی توسط نیک نزاد (۸) نشان دهنده وجود این قارچ در خاک مزارع گوجه فرنگی در منطقه کرج میباشد. چنانچه بتوان به نحوی این آنتاگونیست مهم را در خاک افزایش داد قادر به کنترل بسیاری از قارچهای بیماریزای خاکزی می باشد.

قارچ *Trichoderma* در شرایط گلخانه تا حدود بسیار

اینوكلوم + ۹۰۰ گرم خاک) و به یک سوم حجم فوقانی گلدانها اضافه شد. حجم دو سوم زیرین گلدانها به وسیله خاک پاستوریزه پر شده بود.

گلدانها به مدت ۲۵ روز در شرایط گلخانه نگهداری و هر ۳ روز یکبار آبیاری شدند تا قارچ فوزاریوم به خوبی در خاک مستقر گردد. هر کیسه محتوی ۲۰۰ گرم سبوس از اینوكلوم آنتاگونیستها با ۱۸۰۰ گرم خاک قسمت بالای گلدانها که آلوده به قارچ بیماریزابود مخلوط (به نسبت ۱۰٪) شد.

در شاهد سالم فقط شن و آرد ذرت با خاک مخلوط شده و سپس سبوس تخمیر شده افزوده شد. در تیمارهای بدون حضور فوزاریوم از سبوسی که قارچ های آنتاگونیست روی آنها به تنها بی تکثیر شده بود به خاک گلدانها اضافه شد و سپس نشاء ۶ - ۴ برگه گوجه فرنگی رقم Mony maker کشت گردید. در گلدانهای شاهد سالم فقط از سبوس تخمیر شده و به همان نسبت ۱۰٪ استفاده شد. در هر گلدان (تکرار) تعداد ۵ بوته نشاء گوجه فرنگی کشت گردید و پس از نشاء کردن تمام گلدانها در ۲۸ - ۲۵ درجه سانتیگراد در گلخانه به مدت ۶ هفته نگهداری و هر ۲ روز یکبار آبیاری گردید. این آزمایش در ۶ تیمار و در ۴ تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید.

۴ - بررسی بیماری، جداسازی عامل بیماری و توزیع بوته ها پس از ۶ هفته نشاء کاری علایم بیماری در شاهد آلوده کاملاً مشهود شد. با مرطوب کردن گلدانهای بوته های بیماریزابون آورده شد و پس از بررسی وضع ریشه ها از محل قهوه ای شدن آوندهاتا محل ریشه های فرعی از هر تیمار در هر تکرار ۱۰ قطعه (جمعاً ۴۰ قطعه) انتخاب گردید.

پس از ضد عفونی سطحی قطعات با محلول کلورمکوریک یک در هزار و سپس سه بار شستشو (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر استریل اقدام به کشت آنها روی محیط غذایی PDA در پتری شد. در هر پتری ۱۰ قطعه آلوده کشت گردید. پس از ۵ روز در دمای ۲۶ ± ۲ درجه سانتیگراد تعداد قطعاتی که کلی قارچ روی آنها رشد کرده بود شمارش و با مشاهده میکروسکوپی شناسایی شدند. ارتفاع بوته های تیمارهای مختلف (۲۰ بوته در هر تیمار) از محل طوفه بر حسب سانتیمتر اندازگیری و

جدول ۱ - اثر چند جدایه *F.oxysporum* f. sp. *Trichoderma* روی پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر *T. lycopersici*

تیمار	معدل درصد کاهش بیماری (۱)	ارتفاع (cm.)	\pm میانگین (۲) SE (۳)	وزن تر (gr.)
(۴) ICF	.۵d	۱۹±۰/۷f	۱۲/۲±۱/۵e	
T1+ICF	۶۲b	۵۳/۵±۰/۵c	۲۲/۲±۱/۱d	
T2+ICF	۶۸/۱a	۶۱/۷±۰/۸b	۳۹/۵±۱/۱b	
T3+ICF	۶۱bc	۵۱/۲±۱/۴d	۳۵/۰±۱/۸c	
T4+ICF	۵۷/۷c	۴۸±۱/۴e	۳۰/۲±۱/۷d	
(۶) Non.I.C	۱۰۰	۸۰±۰/۷a	۶۱/۵±۱/۱a	
LSD	۵/۶	۲/۴	۲/۴	۲/۴

PDA DR% Disease reduction - ۱

(۱) قطعه در هر پتری (کشت داده شد و سپس قطعات آلوده به قارچ فوزاریوم پس از ۵ روز شمارش گردید).

(۲) خطای استاندارد(Standard Error) ۳ - میانگین ۵ بوته (تکرار) ۴ - شاهد آلوده به فوزاریوم

۵ - تیمارهایی که با یک حرف نشان داده شده اند در سطح ۱٪ اختلاف ندارند ۶ - شاهد غیر آلوده

جدول ۲ - تاثیر چند جدایه *Tricoderma* بر روی رشد بوته های گوجه فرنگی

تیمار	ارتفاع (cm)	\pm میانگین (۱) SE (۲)	وزن تر (gr)
(۴) C	۸۰±۱/۱A	۶۱/۵±۰/۷b ^(۵)	۶۱/۵±۰/۷b
(۴) T1	۷۸±۰/۷B	۶۱/۰±۱/۱b	۶۱/۰±۱/۱b
T2	۸۱/۷±۱/۱A	۶۳/۵±۱/۴a	۶۳/۵±۱/۴a
T3	۷۷/۷±۰/۵B	۶۱/۵±۱/۱b	۶۱/۵±۱/۱b
T4	۶۹/۲±۰/۸C	۶۱/۵±۰/۸b	۶۱/۵±۰/۸b
LSD	۰/۲	۱/۵	۱/۵

۱ - میانگین ۵ بوته ۲ - خطای استاندارد(Standard Error) ۳ - شاهد بدون آلوگی - منحصرا سبوس به نسبت

۱۰٪ وزنی به خاک پاستوریزه اضافه شد ۴ - جدایه ها - در متن توضیح داده شد ۵ - تیمارهایی که با یک حرف

مشخص شده اند در یک گروه آماری قرار دارند

اثر جدایه *T. harzianum* (T2) بر روی درصد کاهش بیماری بیشتر از سایر جدایه ها بود. جدایه های قارچ *Trichoderm* در آزمایشگاه با تاثیر از طریق ترشحات ملایع خارج سلولی و ترکیبات گازی و همچنین با مکانیزمهای

زیادی از بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در اثر قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (که توسط نیک نژاد از مزارع گوجه فرنگی ورامین جدا شده بود) جلوگیری نمود (۷).

عمومی جدایه ها مد نظر قرار می گیرد. با این همه مسلم است که شرایط کلیمایی و همچنین گونه و یارق گیاهی که کنترل بیماری آن مد نظر است از عوامل مهم دیگری بشمار می روند که در موقتی و یا شکست کنترل بیولوژیک بیماری موثر است. در این راه لازم است بررسی های بیشتری در زمینه تهیه جدایه های مناسب تریکودرما بخصوص از نظر سازگاری با شرایط خاکهای ایران صورت گیرد.

سپاسگزاری

در انجام این تحقیق همکاری آقایان دکتر حیارود و دکتر روحانی در خور تقدیر است. هزینه های مربوطه از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران تأمین شده است.

REFERENCES

- ۱ - اخوت ، م . د. ظفری . وع . کریمی . ۱۳۷۳ . بررسی امکان مبارزه بیولوژیکی با بیماری خال سیاه سبب زمینی بوسیله قارچ Trichoderma Pers. ex Fr مجله علوم کشاورزی ایران . جلد ۲۵ . شماره ۳ .
- ۲ - اخوت ، م . و ف . کرمپور . ۱۳۷۵ . تاثیر چند جدا شده از قارچهای آنتاگونیست علیه پوسیدگی سیاه ریشه نخدود در اثر Fusarium solani در شرایط گلخانه مجله علوم کشاورزی ایران . جلد ۲۷ شماره ۲ .
- ۳ - بازگیر . ع . و م . اخوت . ۱۳۷۵ . مبارزه بیولوژیک با جدایه هایی از قارچ های آنتاگونیست علیه Rhizoctonia solani عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه لویا . مجله علوم کشاورزی ایران . جلد ۲۵ . شماره ۳ .
- ۴ - روحانی ، ح . ع . کریمی و ف ، نوع پرست . ۱۳۷۰ . تاثیر چند ایزو له ایرانی Trichoderma در مبارزه بیولوژیک با Rhizoctonia solani در مجله آفات و بیماریهای گیاهی . ۲۸ - ۲۰ (۱۷ و ۱) . موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی .
- ۵ - کرمپور ، ف . و م ، اخوت . ۱۳۷۲ . بررسی اثر چند جدا شده Gliocladium و Trichoderma روی بیماری پوسیدگی سیاه ریشه نخدود در شرایط گلخانه . خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران . دانشگاه گیلان - رشت . صفحه ۱۴۰ .
- ۶ - نظری ، س . ۱۳۷۰ . بررسی اثر قارچکشها و Trichoderma harzianum روی بیماری بوته میری خیار در اثر Phytophthora drechsleri پایان نامه فوق لیسانس دانشکده تهران ، کرج ۹۰ . صفحه .
- ۷ - نیک نژاد ، م . وع ، شریفی تهرانی . ۱۳۷۲ . بررسی تاثیر قارچ آنتاگونیست تریکودرما روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه . خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران - دانشگاه گیلان - رشت . صفحه ۱۶۵ .
- ۸ - نیک نژاد . م . ۱۳۷۱ . بررسی تاثیر چند قارچکش و قارچ تریکودرما روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی Fusarium lycopersici sp. lycopersici پایان نامه فوق لیسانس دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران ، کرج ، ۱۲۹ . صفحه .
- 9 - Baker , K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogen . Ann. Rev. Phytopathology. 25:67-85.
- 10 - Benhamou, N., Domminique M. 1990. Immunocyto - chemical localization of Hydroxy prolin riche

Glycoproteins in tomato root cell in infected by *Fusarium oxysporum f. sp . radis - lycopersici* , study of a compatible interaction. *Phytopathology*. 80:163-173.

- 11- Mohmed , C. Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitine breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp . on *Fusarium oxysporum f . sp . radis - lycopersici*. *Phytopathology*. 80: 1406 - 1414.
- 12 - Papavizas . G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and potential for biological control . *Ann. Rev . Phytopathology* . 23:54 - 64 .
- 13 - Sivan , A. Ucko, O. and Chet, I. 1987. Biological control of Fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field condition . *Plant Disease* . 71: 587 - 595.
- 14 - Sivan , A. Ucko , O. and Chet , I. 1986. *Trchoderma harzianm* and effective biocontrol agent of *Fusarium* spp. *Microbial communities in soil* . 447 pp.

**Effect of Antagonistic fungi *Trichoderma* spp.on the control of fusarium
wilt of tomato caused *Fusarium oxysporum* f. sp . *lycopersici*
under Greenhouse conditions**

M. NIKNEJAD KAZEMPOUR, SHARIFI - TEHRANI A, and

M. OKHOVAT

Assistant professor , Plant Pathology Department, College of Agriculture ,

University of Guilan, Professors respectivly, Plant Pathology Department,

Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted Oct. 27, 1999

SUMMARY

Antagonistic fungi, *Trichoderma harzianum* (T1, from bean field in Ahwaz , T2, from tomato field in Karaj), *T. viridi* (T3, from bean field in Sahriar, T4, from collection of plant pest and Disease Institute . Tehran) were used to control fusarium wilt of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and their effect on weight and height of tomato plants. The experiment was carried out in a completely randomized design in pot under greenhouse conditions. The results showed that the antagonistic fungi decreased wilt fusariomic disease , 69, 91, 68, 13, 60, 98 and 57, 69 % respectively in respect to inoculation control . The antagonistics in order of efficacy were T2> T1, T3>T4>. Effect of the antagonists on the height and fresh - weight of tomato plant was positive . The use of the antagonists in the non - inoculated soil with the pathogen had low positive effect on the growth (heigh) of the tomato plant.

Key Words: Tomato, Fusarium wilt, Antagonist, *Trichoderma*, Greenhouse