آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۵، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۶

کارآیی برخی جدایه‌های بومی تریکودرما در القای مقاومت گوجه‌فرنگی به *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*، عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی

شهناز آل آقائی[۱]، سعید رضائی[۱]✉، مصطفی عبادی[۲] و حمیدرضا زمانی زاده[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ ۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۶)

چکیده

بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)، از بیماری‌های خسارت‌زای گوجه‌فرنگی است. کنترل بیماری از طریق القای مقاومت توسط عوامل بیوکنترلی، یک راهکار مدیریتی در جهت کاهش مصرف سموم شیمیایی می‌باشد. لذا، در این مطالعه کارآیی ده جدایه بومی تریکودرما در القای مقاومت علیه قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی فنوتیپی القای مقاومت در گلخانه توسط جدایه‌های تریکودرما با دو روش زیست‌سنجی تفکیک ریشه و تزریق به ساقه نشان داد که تیمارهای *Trichoderma harzianum* Th-14+Fol و *Trichoderma atroviride* Ta-30+Fol در هر دو آزمون به طور معنی‌داری (p≤۰/۰۵) کم‌ترین شدت و وقوع بیماری را داشتند. نتایج حاصل از بررسی قابلیت کلونیزاسیون ریزوسفر توسط جدایه‌های تریکودرما با روش رقیق‌سازی سریالی نیز بیشترین تراکم جمعیت را در این دو تیمار نشان داد. بین تراکم جمعیت جدایه‌های تریکودرما و شدت بیماری همبستگی منفی مشاهده شد. تیمار گیاهچه‌ها با دو جدایه Th-14 و Ta-30 به طور مجزا و در تلفیق با یکدیگر، فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز را به طور معنی‌داری (p≤۰/۰۵) در مقایسه با تیمار شاهد (Fol) افزایش داد. نتایج این بررسی می‌تواند در مدیریت تلفیقی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پلی فنل اکسیداز، تریکودرما، تزریق به ساقه، تفکیک ریشه، کنترل زیستی، مقاومت سیستمیک القائی.

The efficacy of some native Trichoderma isolates in induction of resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the causal agent of Fusarium wilt disease

SH. ALEAGHAEE[1], S. REZAEE[1] ✉, M. EBADI[2] and H. R. ZAMANIZADEH[1]

1- PhD. Student, Assistant Professor and Professor, Respectively, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Assistant Professor, Department of Biology, College of Basic Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Abstract

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) is one of the most destructive tomato diseases. The disease control through induction of resistance by biocontrol agents is a management strategy to reduce application of chemical fungicides. So, in this study the efficacy of 10 native Trichoderma isolates in induction of resistance against the pathogen was evaluated. In greenhouse, phenotypic evaluation of induction of resistance by Trichoderma isolates with stem-injection and split-root bioassay methods showed the least disease severity and incidence significantly (p≤0.05) in *Trichoderma harzianum* Th-14+Fol and *Trichoderma atroviride* Ta-30+Fol treatments. The results of study of rhizosphere colonization ability of Trichoderma isolates by serial dilution method, revealed maximum population density in these two isolates. The disease severity showed negative correlation with Trichoderma population density. The activity of polyphenol oxidase and peroxidase increased significantly (p≤0.05) in the plants treated with Th-14 and Ta-30 isolates compared to control (Fol). The results of this study can be applied in integrated management of tomato Fusarium wilt.

Key words: Biological control, induced systemic resistance, polyphenol oxidase, split-root, stem-injection, Trichoderma isolates.

✉ **Corresponding author: srezaee@srbiau.ac.ir**

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) از محصولات تجاری مهم در جهان است (Amer *et al*., 2014; Bawa, 2016) که علاوه بر تازه خوری، به دلیل قابلیت فرآوری از نظر صنعتی نیز حائز اهمیت می‌باشد (John Christopher *et al*., 2010; Mwangi *et al*., 2011). طبق آمارها در ایران مساحتی بالغ بر ۱۵۰ هزار هکتار (با متوسط عملکرد ۳۹ تن) به کشت گوجه‌فرنگی اختصاص دارد و کشور ما از نظر میزان تولید در رتبه هفتم جهان جای دارد (Anonymous, 2015). بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder et Hansen به عنوان یکی از عوامل اصلی محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی محسوب می‌گردد (Rajik *et al*., 2012; Juber *et al*., 2014; Bawa, 2016). این بیماری گسترش جهانی دارد و در اغلب کشورهای جهان خسارت ناشی از آن بین ۶۰-۱۰٪ گزارش شده است (Mwangi *et al*., 2011; Amer *et al*., 2014). بیماری پژمردگی فوزاریومی در ایران در اغلب مناطق کاشت گوجه‌فرنگی از جمله گلخانه‌ها و مزارع اصفهان، هرمزگان، ورامین و شهرری خسارت‌زا است و برخی مزارع گوجه‌فرنگی ورامین قبل از برداشت محصول کاملاً از بین می‌روند (Amini, 2009; Etebarian, 2009). علائم این بیماری شامل: زردی برگ‌های پایینی، پژمردگی و ریزش برگ‌ها، نکروز حواشی برگ‌های باقیمانده، قهوه‌ای شدن شدید بافت‌های آوندی در طول ساقه و در نهایت از بین رفتن گیاه می‌باشد (Agrios, 2005).

علی‌رغم کاربرد روش‌های مختلف مدیریتی از جمله استفاده از ارقام مقاوم و اقدامات زراعی، این بیماری هم‌چنان به محصول گوجه‌فرنگی خسارت می‌زند (Amini, 2009; Amer *et al*., 2014). کاربرد قارچ‌کش‌هایی نظیر پروپیکونازول، تیابندازول، کاربندازیم و تیوفانات علاوه بر هزینه بالا، احتمال ظهور مقاومت در جمعیت بیمارگر و از بین رفتن موجودات غیر هدف، بر سلامتی انسان و محیط زیست نیز تأثیر سوء دارد (Vos *et al*., 2014; Naing *et al*., 2015).

استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید به عنوان یک راهکار مکمل و کم هزینه در مدیریت تلفیقی این بیماری محسوب می‌گردد (Sundaramoorthy and Balabaskar, 2013; Farhang Niya *et al*., 2015; Naing *et al*., 2015). عوامل آنتاگونیستی از جمله قارچ‌های جنس تریکودرما، علاوه بر برهمکنش مستقیم با بیمارگرها توسط مکانیسم‌هایی نظیر: مایکوپارازیتیسم، آنتی بیوزیس و رقابت، از طریق القای مقاومت نیز قادر به حفاظت از گیاهان هستند (Ojha and Chatterjee, 2012; Pieterse *et al*., 2014). به دنبال برهمکنش گیاه-آنتاگونیست-بیمارگر تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و ساختمانی در گیاه رخ می‌دهد. از جمله واکنش‌های بیوشیمیایی گیاه، تولید آنزیم‌های دفاعی نظیر کیتیناز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، پراکسیداز و ... است که در سرکوب بیمارگر و حفاظت از گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو نقش دارند. به این ترتیب واکنش مصونیت در تمام بافت‌های گیاه فعال می‌شود و مقاومت القائی سیستمیک[1] در برابر بیمارگرهای مختلف بروز می‌کند (Mathys *et al*., 2012; Mukherjee *et al*., 2012; Nawrocka and Malolepza, 2013). امروزه القای مقاومت توسط عوامل آنتاگونیستی به عنوان یک راهکار مدیریتی امیدبخش برای کنترل بیماری‌های مختلف از جمله پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی، مورد توجه قرار گرفته است (Amer *et al*., 2014; Verma *et al*., 2014). در یک بررسی القای مقاومت توسط جدایه‌ای از *Trichoderma harzianum*، موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و نیز کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی شده است (Ojha and Chatterjee, 2012). همچنین تیمار گیاه گوجه‌فرنگی با *Trichoderma viride* کاهش معنی‌دار وقوع و شدت بیماری را در پی‌داشته و فعالیت برخی آنزیم‌های دفاعی را نیز افزایش داده است (Juber *et al*., 2014). بر اساس نتایج مطالعات Tucci *et al*. (2011) جدایه‌های *Trichoderma atroviride* P1 و *T. harzianum* T22، از طریق

۱- Induced systemic resistance (ISR)

القای مقاومت سیستمیک در گوجه‌فرنگی، در کنترل بیمارگر *Botrytis cinerea* مؤثر بوده‌اند. در ایران نیز پژوهش‌هایی در این زمینه صورت گرفته است. در مطالعه‌ای تأثیر یک جدایه از *T. harzianum* بر مهار مستقیم بیماری مختلط ناشی از نماتود ریشه گرهی و قارچ پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی بررسی و القای فعالیت آنزیم PAL نیز تایید شده است (Pourjam *et al*., 2015). یک جدایه غیر بیماری‌زای فوزاریوم نیز از طریق القای مقاومت تاثیر معنی‌داری بر کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای داشته است (Amini and Dzhalilov, 2010).

نظر به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی برای ایران به خصوص از جنبه صادرات فرآورده‌های این محصول و با توجه به خسارت اقتصادی که بیماری پژمردگی فوزاریومی علی‌رغم کاربرد روش‌های مدیریتی مختلف به تولید گوجه‌فرنگی وارد می‌آورد، ارائه راهکار مکمل یا جایگزین برای کنترل بیماری مذکور ضرورت دارد. لذا این پژوهش با هدف بررسی قابلیت جدایه‌های آنتاگونیست بومی در القای واکنش‌های دفاعی در گوجه‌فرنگی و ارزیابی کاهش شدت و وقوع بیماری پژمردگی فوزاریومی انجام شد. در این مطالعه ارتباط بین تراکم جمعیت عوامل بیوکنترلی در ریزوسفر گوجه‌فرنگی با القای مقاومت علیه قارچ عامل بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین کارآیی جدایه‌های آنتاگونیست موفق به طور مجزا و توأم با یکدیگر، در القای آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز بررسی شد.

روش بررسی

جداسازی بیمارگر، شناسائی و آزمون بیماری‌زائی: نمونه‌برداری از گیاهان آلوده گوجه‌فرنگی با علائم پژمردگی فوزاریومی در طی ماه‌های اردیبهشت تا تیر سال ۱۳۹۴، از مزارع و گلخانه‌های شهرستان‌های ورامین و پیشوا انجام شد. بافت‌های آلوده پس از شستشو، به قطعات نیم سانتی‌متری تقسیم و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شد. قطعات پس از شستشوی مجدد با آب مقطر سترون و خشک شدن رطوبت، به تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA, Merck, Germany) و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل منتقل و به مدت پنج روز در دمای ۲۵±۱°C نگهداری شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها با روش تک اسپور انجام شد (Amer *et al*., 2014). شناسایی براساس مشخصه‌های ریخت‌شناسی، توسط منابع موجود (Nirenberg and O'Donell, 1998; Lesli and Summerell, 2006) انجام شد. پس از شناسایی، جدایه‌های فوزاریوم به لوله حاوی محیط کشت PDA مورب انتقال یافتند و برای انجام مطالعات بعدی در دمای ۴°C نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زائی توسط مایه‌زنی خاک گلدان‌های گیاهچه‌های رقم حساس گوجه‌فرنگی (Early Urbana Y) با سوسپانسیون 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر از جدایه‌ها، در سه تکرار با ۱۵ تیمار (۱۴ تیمار مربوط به جدایه‌های فوزاریوم و یک تیمار شاهد سالم) و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. براساس شدت و وقوع بیماری، قدرت بیماری‌زائی جدایه‌ها ارزیابی شد. برای تعیین اختصاصیت میزبانی، بیماری‌زائی جدایه‌های بیمارگر روی میزبان‌های نخود، خیار، بادمجان، میخک و گوجه‌فرنگی بررسی شد (Hibar *et al*., 2007). به منظور تشخیص فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. از *F. o.* f. sp. *lycopersici* (Fol) *radicis-lycopersici* (Forl)، میزان رشد پرگنه بیمارگر در محیط کشت PDA در دمای ۱۸°C و ۲۸°C بررسی شد. همچنین میزان گسترش علائم تغییر رنگ بافت آوندی درگیاهچه‌ها ارزیابی شد (Menzies *et al*., 1990).

جدایه‌های تریکودرما: خاک ریزوسفر گیاهان سالم از عمق ۵۰-۳۰ سانتی‌متری مناطق کشت گوجه‌فرنگی در شهرستان‌های ورامین و پیشوا جمع‌آوری شد. جداسازی تریکودرما از خاک با روش رقیق‌سازی سریالی و توسط محیط کشت اختصاصی TSM (Trichoderma-selective

(medium) (Elad *et al.*, 1981) انجام شد. برای انتخاب جدایه‌های تریکودرما جهت اجرای مراحل بعدی مطالعه، قدرت بازدارندگی از رشد *F. o.* f. sp. *lycopersici* توسط ۴۷ جدایه قارچ از جنس تریکودرما که از خاک جداسازی شدند، با آزمون کشت متقابل در محیط PDA ارزیابی شد (Juber *et al.*, 2014). شناسایی گونه جدایه‌های منتخب تریکودرما، توسط کلیدهای موجود (Bisset, 1991 a; b; c) صورت گرفت و جدایه‌ها برای تأیید نهائی به بخش قارچ‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا همدان ارسال شد. جدایه‌های Th-12 ، Th-14 و Th-47 از گونه *T. harzianum* و جدایه Ta-58 *T. atroviride* نیز از کلکسیون بخش بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ورامین دریافت گردید. تمامی کشت‌های خالص در دمای ۴°C نگهداری شدند.

آماده‌سازی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی به منظور اجرای آزمون‌های گلخانه‌ای: گوجه‌فرنگی رقم Early Urbana Y که حساس به پژمردگی فوزاریومی می‌باشد برای ارزیابی گلخانه‌ای القای مقاومت توسط عوامل بیوکنترلی استفاده شد. بذرهای گوجه‌فرنگی توسط اتانول مطلق به مدت هفت دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و به دنبال آن با آب مقطر کافی شستشو داده شدند. بذرهای ضدعفونی شده در سینی‌های کشت حاوی کوکوپیت سترون کاشته و در شرایط گلخانه‌ای در دمای ۲۶°C-۲۴ با دوره نوری ۱۲ ساعته نگهداری شدند. دو بار در هفته کود دهی با محلول غذائی N-P-K (۲۰:۲۰:۲۰) انجام شد.

تهیه زادمایه بیمارگر و تریکودرما: به منظور آماده‌سازی زادمایه، از کشت‌های هفت و چهارده روزه جدایه‌های تریکودرما و Fol، در آب مقطر سترون سوسپانسیون اسپور تهیه شد. تراکم اسپورها در زادمایه‌های تریکودرما و Fol، توسط لام گلبول‌شمار به ترتیب در 1×10^{8} اسپور در میلی‌لیتر و 1×10^{6} اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید (Rajik *et al.*, 2012).

ارزیابی فنوتیپی القای مقاومت: در آزمون‌های گلخانه‌ای از گیاهچه‌های پنج هفته‌ای گوجه‌فرنگی استفاده شد. تیمارها در سنجش‌های گلخانه‌ای عبارت بودند از: گروه ۱: تیمار با آنتاگونیست به همراه مایه‌زنی با بیمارگر. گروه ۲: تیمار با آنتاگونیست بدون مایه‌زنی با بیمارگر. گروه ۳: مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری به تنهایی (شاهد آلوده). گروه۴: شاهد سالم که فقط با آب مقطر سترون تیمار شد. در آزمون تزریق به ساقه دو تیمار با تزریق (۵۰ میکرولیتر آب سترون) و بدون تزریق به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد. دو روش زیست‌سنجی به منظور تفکیک فیزیکی جدایه‌های تریکودرما از بیمارگر Fol و ارزیابی قابلیت جدایه‌های بیوکنترلی در القای مقاومت در گوجه‌فرنگی به شرح ذیل اجرا شد:

زیست‌سنجی با روش تفکیک ریشه[۲]: در این روش گیاهچه‌ها توسط اسکالپل سترون از ناحیه طوقه به سمت ریشه‌ها به دو قسمت تقسیم شد. هر نیمه از سیستم ریشه در یک گلدان (به قطر هفت سانتی‌متر) که حاوی مخلوط پیت و پرلیت سترون بود قرار داده شد (Hibar *et al.*, 2007; Akram *et al.*, 2013). دو روز پس از تفکیک ریشه‌ها، یک قسمت از ریشه توسط ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های تریکودرما (1×10^{8} اسپور در میلی‌لیتر) تیمار شد و بخش دیگر پس از یک هفته با سوسپانسیون کنیدی Fol (1×10^{6} اسپور در میلی لیتر) مایه‌زنی گردید. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۲ تیمار (شامل: تیمار با ۱۰ جدایه تریکودرما به همراه مایه‌زنی با جدایه فوزاریوم، تیمار با ۱۰ جدایه تریکودرما بدون مایه‌زنی با فوزاریوم، تیمارهای شاهد سالم و شاهد آلوده) در چهار تکرار اجرا شد.

زیست‌سنجی با روش تزریق به ساقه[۳]: در این آزمون ابتدا مخلوط حاوی ماسه: خاک مزرعه: کوکوپیت (۱:۱:۱) در طی دو روز متوالی و هربار به مدت یک ساعت توسط اتوکلاو سترون و در گلدان‌ها توزیع شد. سه گیاهچه گوجه‌فرنگی به هر یک از گلدان‌ها انتقال یافت و آغشته‌سازی

۲- Split-root system
۳- Stem-injection method

خاک با ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما انجام شد (1×10^8 اسپور در میلی‌لیتر) و یک هفته بعد تزریق به ساقه توسط سرنگ انسولین حاوی ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور Fol (1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر) صورت گرفت (Boyhan *et al*., 2001). آزمون مذکور با ۲۳ تیمار (شامل: تیمار با ۱۰ جدایه تریکودرما به همراه مایه‌زنی با جدایه فوزاریوم، تیمار با ۱۰ جدایه تریکودرما بدون مایه‌زنی با فوزاریوم، دو تیمار شاهد سالم (با تزریق آب و بدون تزریق) و تیمار شاهد آلوده) در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. گیاهچه‌های تیمار شده گوجه‌فرنگی در گلخانه در دمای حدود ۲۵°C نگهداری شدند.

ارزیابی وقوع و شدت بیماری: توسعه علائم بیماری در تیمارها به صورت روزانه بررسی شد. در روزهای ۷، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با بیمارگر، وقوع بیماری و نیز شاخص شدت بیماری (DSI: Disease Severity Index) ارزیابی گردید و میانگین‌گیری از هر تیمار انجام شد. نمره‌دهی علائم بیماری جهت محاسبه شاخص شدت بیماری، براساس مقیاس ۰-۴ (Weitang *et al*., 2004) به شرح زیر انجام شد:

۰: گیاهان کاملاً سالم و فاقد آلودگی

۱: آلودگی خفیف، پژمردگی ۲۵٪ از برگ‌ها و زرد شدن یک یا دو برگ

۲: آلودگی متوسط، زردی دو یا سه برگ و پژمرده شدن ۵۰٪ از برگ‌ها

۳: آلودگی شدید، زرد شدن تمام برگ‌ها و پژمردگی ۷۵٪ از آن‌ها، کاهش رشد گیاه

۴: آلودگی کامل گیاهان، زردی و پژمردگی تمام برگ‌ها و از بین رفتن گیاهان

پس از نمره‌دهی گیاهان، شاخص شدت بیماری توسط رابطه زیر محاسبه شد (Altinok, 2009):

$$DSI\ (\%) = \Sigma\ (i \times P_i)/i_{max}\ P_{total} \times 100$$

در این رابطه، DSI شاخص شدت بیماری (٪)، i درجه آلودگی ($i = 0, 1, \ldots, 4$)، P_i تعداد بوته‌ها با درجه آلودگی، i_{max} بالاترین درجه آلودگی بیماری و P_{total} تعداد کل بوته‌ها بودند. محاسبه درصد وقوع بیماری نیز طبق رابطه: وقوع بیماری (٪) = تعداد گیاهان آلوده در تیمار/تعداد کل گیاهان × ۱۰۰ انجام شد.

کلونیزاسیون ریزوسفر گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌های تریکودرما و رابطه تراکم جمعیت آن‌ها با شدت بیماری: به منظور بررسی قابلیت جدایه‌های تریکودرما در کلونیزاسیون ریزوسفر گوجه‌فرنگی، تراکم جمعیت آن‌ها ۲۸ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر با روش رقیق‌سازی سریالی تعیین شد. سوسپانسیون حاصل از نمونه‌های خاک مربوط به تیمارها در آب مقطر سترون در محیط کشت PDA ریخته شد و بر حسب جدایه، ۵-۲ روز پس از نگهداری در دمای ۲۸°C، تعداد واحد پرگنه‌ساز (Cfu: Colony forming units) شمارش شد. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت تعداد واحد پرگنه‌ساز در هر گرم خاک بیان شد (Alfano *et al*., 2007; Martinez-Medina *et al*., 2013). برای بررسی ارتباط بین تراکم جمعیت جدایه‌های تریکودرما با شدت بیماری ارزیابی رگرسیونی توسط نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) و براساس مدل خطی ساده انجام شد.

ارزیابی تغییرات بیوشیمیایی: بررسی القای تغییرات بیوشیمیایی علیه بیمارگر Fol توسط جدایه‌های Th-14 و Ta-30 (دو جدایه منتخب آزمون‌های گلخانه‌ای)، به صورت کاربرد مجزا و توأم دو جدایه با یکدیگر و براساس چهار گروه تیمار ذکر شده در بندهای قبل انجام شد. این آزمون با روش تزریق به ساقه (به شرحی که قبلاً ذکر شد) و به صورت فاکتوریل ۶×۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی که شامل هشت تیمار و شش روز نمونه‌برداری بود، اجرا شد. لازم به ذکر است که با توجه به عدم مشاهده اختلاف آماری بین تیمارهای شاهد سالم با تزریق آب و بدون تزریق، یک تیمار (با تزریق آب) به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری از تیمارها با چهار تکرار در روزهای ۰، ۷، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با Fol صورت گرفت (Ojha and

Chatterjee, 2012) و ارزیابی آنزیم‌ها به شرح زیر انجام شد:

تهیه عصاره برای بررسی فعالیت آنزیم‌ها: بافت برگ‌های نمونه‌برداری شده (۰/۵ گرم) با استفاده از ازت مایع در هاون چینی سرد به خوبی ساییده شدند، سپس یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷) به آن اضافه و کامل یکنواخت گردید. جهت جلوگیری از ذوب یخ نمونه‌ها، تمام مراحل استخراج روی یخ انجام شد. عصاره حاصل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌متری منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ g به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد. محلول روئی به ویال‌های مشابه منتقل و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد (Madhaiyan *et al*., 2004).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز: ارزیابی پلی فنل اکسیداز با استفاده از پیروکتکول[۴] به عنوان سوبسترا انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۶/۵) و ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیم، در کووت اسپکتروفوتومتر کاملاً ترکیب شدند و دستگاه در طول موج ۴۹۵ نانومتر با این مخلوط صفر شد. در ادامه به مخلوط فوق ۰/۳ میلی‌لیتر پیروکتکول (۰/۵ مولار) افزوده شد و تغییرات جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۴۹۵ نانومتر به مدت سه دقیقه با فاصله ۱۵ ثانیه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم بافت برگ تازه بیان شد (Vance *et al*., 1980).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: ارزیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس روش Mahadevan and Sridhar (1982) همراه با تغییراتی انجام شد. به این ترتیب که، ۲/۷ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۵ مولار با pH برابر شش، پیروگالول[۵] تازه تهیه شده ۰/۵ مولار (۱۰۰ میکرولیتر) و عصاره آنزیمی (۱۰۰ میکرولیتر) به خوبی مخلوط شدند و دستگاه در طول موج ۴۳۰ نانومتر صفر شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱٪ اضافه گردید و با افزودن آن واکنش آغاز شد. تغییرات جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر در فواصل زمانی ۱۵ ثانیه به مدت سه دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم بافت برگ تازه بیان شد.

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

نتیجه و بحث

جدایه‌های بیمارگر و تریکودرما: براساس مشخصه‌های مورد بررسی چهارده جدایه از قارچ‌های به دست آمده از بافت‌های آلوده گوجه‌فرنگی به عنوان *F. oxysporum* شناسایی شدند. در آزمون بیماری‌زائی، برطبق نتایج حاصل از ارزیابی وقوع و شدت بیماری ناشی از جدایه‌های فوزاریوم (جدول ۱)، یک جدایه با قدرت بیماری‌زائی بالا (Fol-112 به اختصار Fol) انتخاب شد و در آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جدایه های فوزاریوم فقط بر روی گوجه‌فرنگی علائم پژمردگی ایجاد کردند. از آن‌جایی که دمای بهینه رشد پرگنه بیمارگر در محیط‌کشت، ۲۸°C بود و در دمای ۱۸°C که دمای بهینه رشد قارچ Forl است رشد چندانی نداشت و با توجه به این که قهوه‌ای شدن آوندها به صورت گسترده رخ داد و عامل بیماری از بافت آوندی بخش‌های هوایی گیاه نیز جداسازی شد، فرم اختصاصی *F. o.* f. sp. *lycopersici* تشخیص داده شد. براساس نتایج آزمون کشت متقابل، از بین ۴۷ جدایه تریکودرما جداسازی شده از خاک، پنج جدایه Ta-30 و Ta-21 (*T. atroviride*)، Tc-57 (*Trichoderma crassum*)، Th-18 (*T. harzianum*) و Tl-50 (*Trichoderma longibrachiatum*) که قدرت بازدارندگی بالاتری (بین

۴- Pyrocatechol
۵- Pyrogallol

٪۶۷/۱۱–٪۵۴/۵۰) در مقابل بیمارگر Fol نشان دادند، به همراه جدایه Tc-31 (*T. crassum*) با کم‌ترین بازدارندگی (٪۲۳/۵۰) از رشد میسلیوم‌های فوزاریوم انتخاب شدند. در نهایت این شش جدایه منتخب به همراه چهار جدایه تهیه شده از منابع دیگر که قبلا ذکر شد، در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱– شاخص شدت و وقوع بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی ناشی از جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) در آزمون اثبات بیماری‌زائی

Table 1. Disease severity index and incidence of tomato Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in pathogenicity test

Fusarium isolates code	Disease incidence (%)	Disease severity (%)
Fol-101	56.60 e*	46.80 c
Fol-102	49.15 g	38.15 e
Fol-103	39.95 ij	27.45 h
Fol-104	69.10 bc	51.25 b
Fol-105	35.00 j	26.25 h
Fol-106	49.10 g	38.70 e
Fol-107	47.55 gh	35.00 ef
Fol-108	55.00 ef	44.55 cd
Fol-109	43.30 i	30.80 g
Fol-110	54.95 ef	41.20 d
Fol-111	62.55 d	49.30 bc
Fol-112	87.40 a	64.15 a
Fol-113	42.50 i	30.85 g
Fol-114	70.25 b	51.20 b

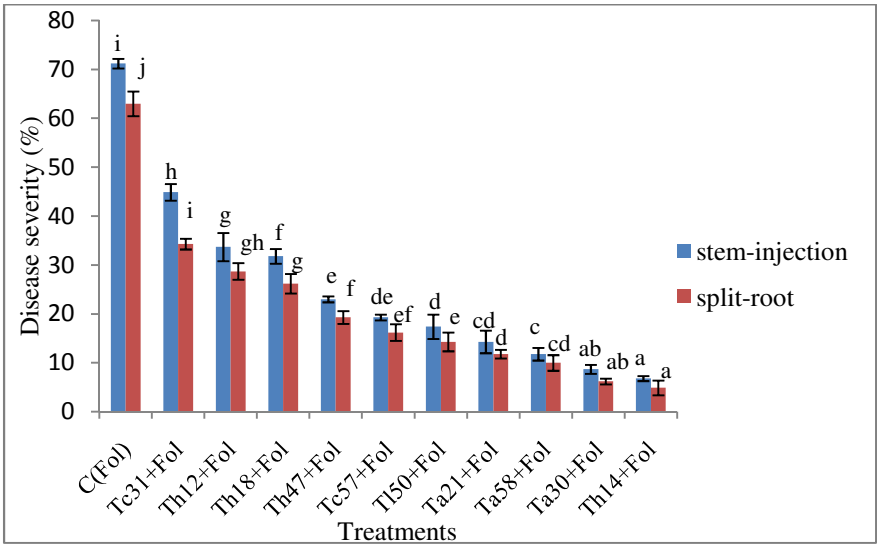
در تیمار شاهد گیاهچه‌ها کاملاً سالم بودند؛ * براساس آزمون چند دامنه دانکن، میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف آماری ($p\leq$ ۰/۰۵) هستند.

In control treatment the seedlings were completely healthy; *The same letter in columns indicates a lack of significant difference at $p\leq0.05$ according to Duncan's Multiple Range Test.

کارآیی جدایه‌های تریکودرما در القای مقاومت علیه بیمارگر Fol در گلخانه: هر دو روش تفکیک ریشه و تزریق به ساقه قابلیت غربال‌گری جدایه‌های تریکودرما، از نظر قدرت القای مقاومت علیه Fol را دارا بودند. تمامی تیمارها از نظر میانگین وقوع و شدت بیماری اختلاف معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۵) با شاهد (Fol) نشان دادند (شکل ۱ و شکل ۲). تیمارهای Th-14+Fol و Ta-30+Fol در هر دو روش زیست‌سنجی به طور معنی‌داری کم‌ترین میانگین شدت و وقوع بیماری را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند (شکل ۱ و شکل ۲). دو القاگر زیستی Th-14 و Ta-30 علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی را نسبت به شاهد (Fol) کاهش دادند (شکل ۳). یافته‌های این تحقیق، با نتایج حاصل از مطالعات صورت گرفته در زمینه کنترل بیماری‌های مختلف گوجه‌فرنگی، از طریق القای مقاومت توسط قارچ تریکودرما مطابقت داشت (Vinale *et al*., 2008; Chowdappa *et al*., 2013). براساس نتایج یک تحقیق پیش‌تیمار گیاه گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌های *T. harzianum* و *T. viride* منجر به القای مقاومت و کاهش معنی‌دار بیماری پژمردگی فوزاریومی شده است (Rajik *et al*., 2012). در میزبان خیار نیز، القای مقاومت توسط سویه‌های *Pseudomonas* sp. Ps14 و *T. harzianum* Tr6 علیه *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* به اثبات رسیده است (Alizadeh *et al*., 2013).

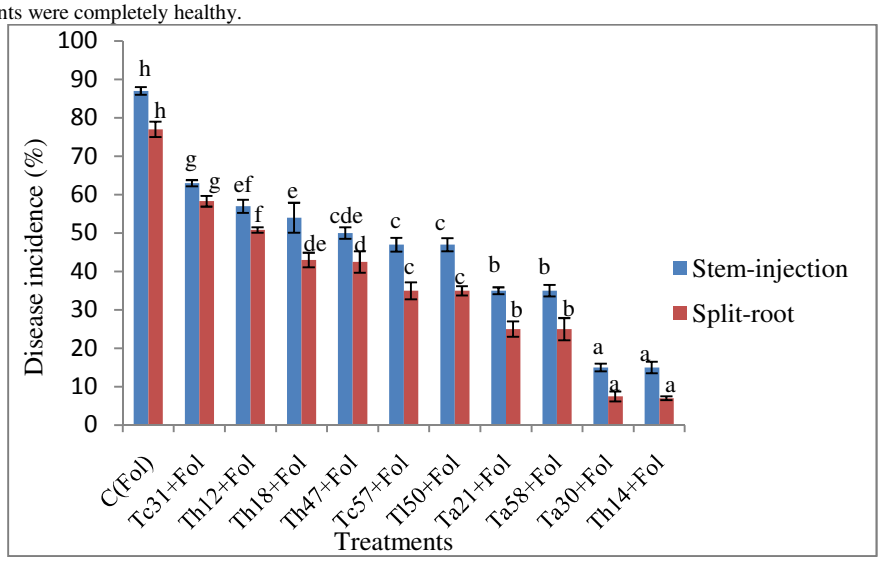
در مطالعه حاضر فاصله زمانی یک هفته بین تیمار با آنتاگونیست و مایه‌زنی با قارچ بیمارگر بر کاهش شدت و وقوع بیماری مؤثر بود که با نتایج بررسی‌های پیشین (Hibar *et al*., 2007; Altinok; 2009; Juber *et al*., 2014) هماهنگی داشت.

تراکم جمعیت جدایه‌های تریکودرما در ریزوسفر و ارتباط آن با شدت بیماری: عوامل آنتاگونیستی ریشه را به صورت سطحی کلونیزه می‌کنند، که نتیجه آن رهاسازی الیسیتورها و راه اندازی آبشارهای انتقال سیگنال و در نهایت افزایش سیستمیک مقاومت است (Alfano *et al*., 2007). بین قابلیت کلونیزه کردن ریشه گیاه توسط عوامل بیوکنترلی و توانایی القای مقاومت ارتباط وجود دارد، که به افزایش الیسیتورهای آنتاگونیست و درک بهتر آن‌ها توسط گیرنده‌های گیاه مربوط می‌شود (Zamioudis and Pieterse, 2012; Pieterse *et al*., 2014; Vos *et al*., 2014).



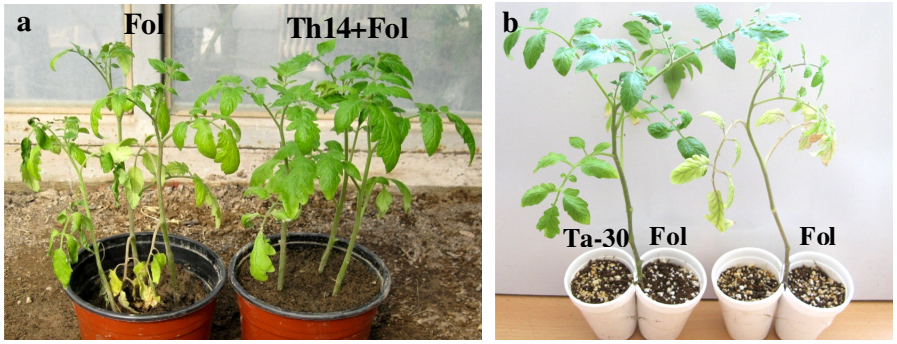
شکل ۱- میانگین شاخص شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) در روش‌های تزریق به ساقه و تفکیک ریشه در تیمارهای مختلف. Th-14، Th-18، Th-47 و Th-12: *Trichoderma harzianum*؛ Tc-57 و Tc-31: *Trichoderma crassum*؛ Ta-21، Ta-30 و Ta-58: *Trichoderma atroviride*؛ Tl-50: *Trichoderma longibrachiatum*. میله‌های عمودی بیان‌گر ± انحراف معیار است. براساس آزمون چند دامنه دانکن میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤۰/۰۵ هستند. در هر دو آزمون گیاهچه‌های تیمار شده با جدایه‌های آنتاگونیست و تیمار شاهد سالم، کاملاً سالم بودند.

Fig. 1. The mean values of severity index of wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in stem-injection and split-root methods in different treatments. Th14, Th-18, Th-47, Th-12: *Trichoderma harzianum*; Tc-57, Tc-31: *Trichoderma crassum*; Ta-21, Ta-30, Ta-58: *Trichoderma atroviride*; Tl-50: *Trichoderma longibrachiatum*. The vertical bars indicate ± standard deviation (SD). Means with same letters are not significantly different at p≤0.05 according to Duncan's Multiple Range Test. In both methods, the seedlings treated with antagonist isolates and healthy control treatments were completely healthy.



شکل ۲- میانگین وقوع بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) در روش‌های تزریق به ساقه و تفکیک ریشه در تیمارهای مختلف. Th-14، Th-18، Th-47 و Th-12: *Trichoderma harzianum*؛ Tc-57 و Tc-31: *Trichoderma crassum*؛ Ta-21، Ta-30 و Ta-58: *Trichoderma atroviride*؛ Tl-50: *Trichoderma longibrachiatum*. میله‌های عمودی بیان‌گر ± انحراف معیار است. براساس آزمون چند دامنه دانکن میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤۰/۰۵ هستند. در هر دو آزمون گیاهچه‌های تیمار شده با جدایه‌های آنتاگونیست و تیمار شاهد سالم، کاملاً سالم بودند.

Fig. 2. The mean values of incidence of wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in stem-injection and split-root methods in different treatments. Th14, Th-18, Th-47, Th-12: *Trichoderma harzianum*; Tc-57, Tc-31: *Trichoderma crassum*; Ta-21, Ta-30, Ta-58: *Trichoderma atroviride*; Tl-50: *Trichoderma longibrachiatum.* The vertical bars indicate ± standard deviation (SD). Means with same letters are not significantly different at p≤0.05 according to Duncan's Multiple Range Test. In both methods, the seedlings treated with antagonist isolates and healthy control treatments were completely healthy.



شکل ۳- کاهش علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در تیمارهای Th-14+Fol و Ta-30+Fol در مقایسه با شاهد (Fol) در روش‌های تزریق به ساقه (a) و تفکیک ریشه (b)، ۲۱ روز پس از مایه‌زنی با بیمارگر

Fig. 3. The reduction of symptom of Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Th-14+Fol and Ta-30+Fol treatments compared with control (Fol) in stem-injection (a) and split-root (b) methods, 21th day after pathogen inoculation

در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از شمارش تعداد واحد پرگنه‌ساز در تشتک‌های پتری مربوط به تیمارها نشان داد دو جدایه موفق Th-14 و Ta-30 در سنجش‌های گلخانه‌ای، به طور معنی‌داری (p≤۰/۰۵) بیشترین قابلیت کلونیزاسیون ریزوسفر را با تراکم جمعیت به ترتیب ۱۵/۷۶×۱۰^۹ و ۱۳/۶۸×۱۰^۹ واحد پرگنه‌ساز در هر گرم خاک در روش تزریق به ساقه و نیز ۱۶/۸۲×۱۰^۹ و ۱۵/۶۵×۱۰^۹ واحد پرگنه‌ساز در هر گرم خاک در آزمون تفکیک ریشه دارا بودند (جدول ۲). در بین جدایه‌های مورد بررسی جدایه Tc-31 که در آزمون‌های گلخانه‌ای کم‌ترین قابلیت کنترل بیماری را نشان داده بود (شکل ۱ و شکل ۲)، به طور معنی‌داری کم‌ترین تراکم جمعیت (۱/۱۳×۱۰^۹ واحد پرگنه‌ساز در هر گرم خاک) را نیز در ریزوسفر گوجه‌فرنگی داشت (جدول ۲). بین تراکم جمعیت جدایه‌های تریکودرما در ریزوسفر گوجه‌فرنگی و شاخص شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی در هر دو روش تزریق به ساقه و تفکیک ریشه همبستگی منفی مشاهده شد (جدول ۳). بنابراین کاهش شدت بیماری با قابلیت جدایه‌های تریکودرما در کلونیزاسیون ریزوسفر، مرتبط بود.

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های دفاعی: سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز نشان داد که در تمامی روزهای نمونه‌برداری، آنزیم‌ها با سطوح مختلفی در همه تیمارها فعال بودند (شکل ۴ و شکل ۵).

جدول ۲- میزان کلونیزاسیون ریزوسفر گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌های تریکودرما، ۲۸ روز پس از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* در آزمون‌های تزریق به ساقه و تفکیک ریشه

Table 2. Population density of antagonist isolates in the rhizospher of tomato plants 28 day after incubation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in stem-injection and split root methods.

Treatment	Mean population density (Cfu/g)	
	Stem-injection method	Split-root system
T. harzianum		
Th-14+Fol	15.76 (±1.54)×10^9 a*	16.82 (±1.41)×10^9 a
Th-18+Fol	2.11 (±1.85)×10^9 f	2.38 (±1.35)×10^9 fg
Th-47+Fol	2.59 (±2.33)×10^9 ef	2.88 (±1.77)×10^9 f
Th-12+Fol	1.48 (±1.60)×10^9 gh	2.01 (±2.84)×10^9 fgh
T. crassum		
Tc-57+Fol	3.00 (±1.91)×10^9 e	3.65 (±2.56)×10^9 e
Tc-31+Fol	1.13 (±1.33)×10^9 h	1.64 (±2.42)×10^9 h
T. atroviride		
Ta-21+Fol	5.13 (±2.08)×10^9 cd	5.92 (±1.36)×10^9 cde
Ta-30+Fol	13.68 (±2.88)×10^9 ab	15.65 (±3.64)×10^9 ab
Ta-58+Fol	5.58 (±2.30)×10^9 c	6.88 (±0.85)×10^9 c
T. longibrachiatum		
Tl-50+Fol	3.73 (±1.31)×10^9 d	5.21 (±2.47)×10^9 de

داده‌ها میانگین (± انحراف معیار) تعداد واحد پرگنه‌ساز در هر گرم خاک است؛ تشتک پتری شاهد (Fol) فاقد پرگنه‌های تریکودرما بود؛ * براساس آزمون چند دامنه دانکن حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤ ۰/۰۵ هستند.

Data represent mean (±standard deviation) of colony forming units per gram soil; Control plate (Fol) had no antagonist colony;

* The same letter in columns indicates a lack of significant difference at p≤0.05 according to Duncan's Multiple Range Test.

بر اساس نتایج این مطالعه پیش‌تیمار گیاهان گوجه‌فرنگی با جدایه‌های آنتاگونیست Th-14 و Ta-30 به طور مجزا و توأم با هم و به دنبال آن مایه‌زنی با بیمارگر Fol القای آنزیم‌های

پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را به طور معنی‌داری (P≤۰/۰۵) در مقایسه با تیمار شاهد (Fol) افزایش داد (شکل ۴؛ شکل ۵).

جدول ۳- ارتباط بین کاهش شاخص شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی و تراکم جمعیت آنتاگونیست‌ها در ریزوسفر گوجه‌فرنگی، در روش‌های تزریق به ساقه و تفکیک ریشه

Table 3. The correlation between reduction of disease severity index and population density of antagonist in tomato rhizospher, in stem-injection and split-root methods

Bioassay methods	Correlation coefficient (r)	Regression equation*	R-square
Stem-injection	-0.697	$\hat{Y}$=29.413-0.153X	0.73
Split-root	-0.708	$\hat{Y}$=24.982-0.127X	0.78

*معادله خطی رگرسیون به صورت $Y=\beta_0+\beta_1\times X$ می‌باشد (β_0: عرض از مبدأ؛ β_1: شیب خط؛Y: متغیر وابسته؛ X: متغیر مستقل).

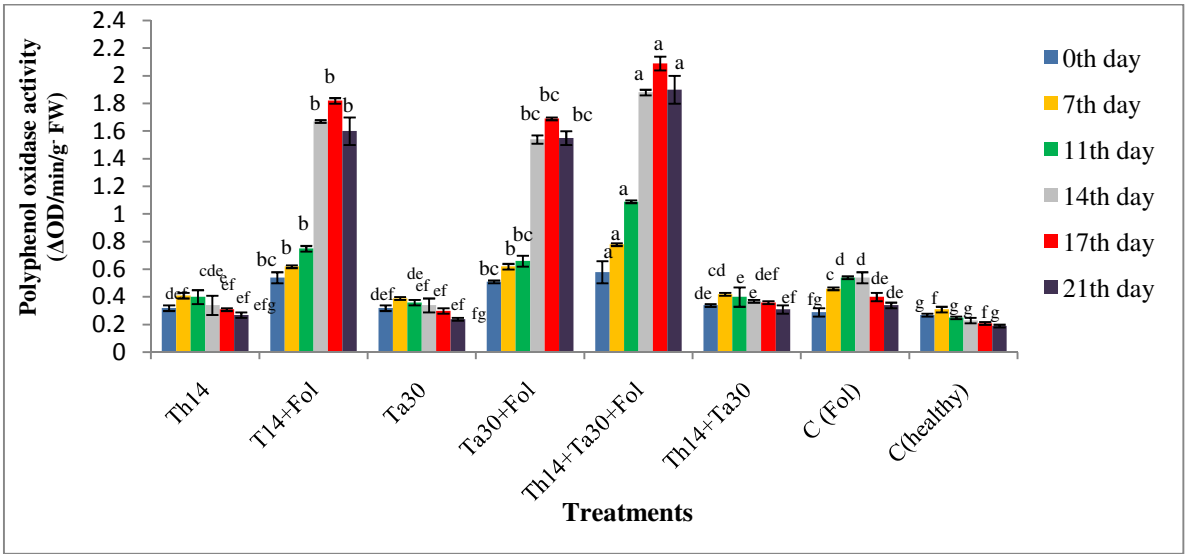
*The equation of linear regression is as follows: $Y=\beta_0+\beta_1\times X$ (β_0: intercept; β_1: slope; Y: dependent variable; X: independent variable).

این نتایج مطابق با یافته‌هایی است که نشان می‌دهد برهمکنش عوامل بیوکنترلی با بیمارگر و میزبان گیاهی، موجب تغییر وضعیت متابولیسم اولیه سلول‌های گیاه شده و مسیرهای دفاعی ثانویه و آنزیم‌های جدید را فعال می‌کند. تغییرات بیوشیمیایی خاصی که بعد از کاربرد عوامل القاگر رخ می‌دهد می‌تواند مارکری برای مقاومت سیستمیک القائی باشد (Harman *et al.* 2012; Hermosa *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای ثابت شده بروز تغییر در فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی توسط برخی عوامل بیوکنترلی، کاهش شدت و وقوع بیماری پژمردگی فوزاریومی را موجب شده است (Amer *et al.*, 2014). کاربرد یک جدایه از *Trichoderma virens* منجر به کاهش معنی‌دار وقوع و شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی و افزایش القای آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیاز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و چند آنزیم دفاعی دیگر شده است (John Christopher *et al.*, 2010). در تحقیق حاضر جدایه‌های منتخب Th-14 و Ta-30 که در آزمون‌های گلخانه‌ای، در کنترل بیماری موفق عمل کردند، سطوح بالاتری از آنزیم‌های دفاعی را نیز در مقایسه با تیمار شاهد (Fol) القا نمودند. این نتایج با یافته‌های ذکر شده در بالا مطابقت داشت. بنابراین به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی، در کاهش شدت و وقوع بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی موثر بوده است.

فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز در تیمار Th-14+Ta-30+Fol، در روزهای ۷، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با Fol در مقایسه با تیمارهای Th-14+Fol و Ta-30+Fol به طور معناداری (p≤۰/۰۵) بیشتر بود (شکل ۴ و شکل ۵). نتایج حاصل بیان‌گر اثر سینرژیستی این دو جدایه بر یکدیگر می‌باشد. براساس مطالعات صورت گرفته، کاربرد تلفیقی عوامل بیوکنترلی با یکدیگر در مقایسه با کاربرد مستقل آن‌ها در القای واکنش‌های دفاعی گیاه موثرتر بوده است (Amer *et al.*, 2014; Juber *et al.*, 2014). کاربرد توأم آنتاگونیست‌ها با یکدیگر خطر تغییرپذیری در جمعیت را کاهش می‌دهد و موجب اطمینان از کنترل موثر بیمارگر می‌شود (Mishra *et al.*, 2011).

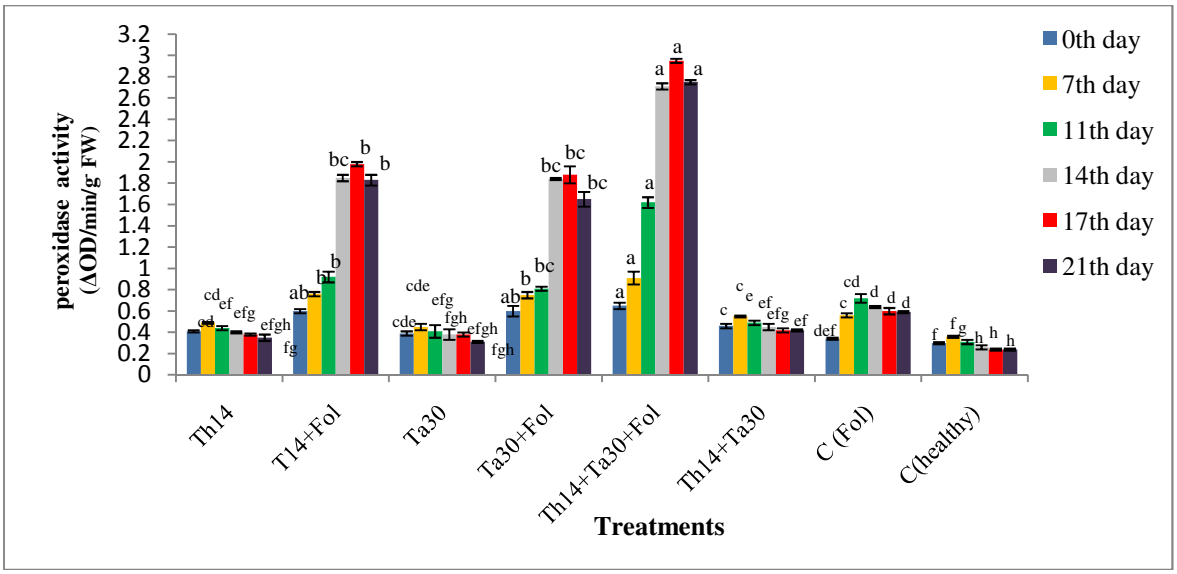
فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در تیمار شاهد (Fol) پس از رسیدن به حداکثر میزان خود در روز یازدهم به تدریج کاهش یافت و یا کم و بیش ثابت باقی‌ماند (شکل ۴ و شکل ۵). در مطالعه‌ای افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی در بافت‌های گیاهی در واکنش به آلودگی ناشی از عامل بیماری‌زا به اثبات رسیده است (Chakraborty and Chatterjee, 2007). متابولیت‌های سمی قارچ‌ها قادرند تولید آنزیم‌های اکسیدکننده فنل را فعال کنند، که گونه‌های فوزاریوم از نظر تولید این متابولیت‌ها که نقش مهمی در قهوه‌ای شدن بافت دارند شناخته شده هستند (Ojha and Chatterjee, 2012). سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، از طریق سرکوب نسبی تولید یا حذف گونه‌های فعال اکسیژن، گیاهان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو حفاظت می‌کند. آنزیم‌های دفاعی نظیر پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در حفاظت از گیاهان در طی آلودگی نقش دارند (Ye *et al.*, 2006).

بر اساس مطالعات Morkunas and Gmerek (2007) آنزیم پراکسیداز به عنوان جزئی از سیستم دفاعی در واکنش به حمله بیمارگرهایی نظیر *F. oxysporum* تولید می‌شود.



شکل ۴- تاثیر تیمار گوجه‌فرنگی با جدایه‌های Th-14 (*T. harzianum*) و Ta-30 (*T. atroviride*) به طور مجزا و در تلفیق با یکدیگر، بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز، در روزهای ۰، ۷، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با بیمارگر Fol (*F. oxysporum*. f. sp. *lycopersici*). میله‌های عمودی بیان‌گر ± انحراف معیار است. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. براساس آزمون چند دامنه دانکن، میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤۰/۰۵ هستند. مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف براساس هر یک از روزهای نمونه‌برداری می‌باشد.

Fig. 4. Effect of tomato treatment with Th-14 (*T. harzianum*) and Ta-30 (*T. atroviride*) isolates on polyphenol oxidase activity, individually and in combination, at 0th, 7th, 11th, 14th, 17th and 21th days after Fol (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) inoculation. The vertical bars indicate ± standard deviation (SD). Each value represents the mean of four replicates. The means with the same letter indicate a lack of significant difference at p≤0.05 according to Duncan's Multiple Range Test. Comparison of means between different treatments is on the basis of each sampling days.



شکل ۵- فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با جدایه‌های Th-14 (*T. harzianum*) و Ta-30 (*T. atroviride*) به طور مجزا و در تلفیق با یکدیگر، در روزهای ۰، ۷، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۱ پس از مایه‌زنی با بیمارگر Fol (*F. oxysporum*. f. sp. *lycopersici*). میله‌های عمودی بیان‌گر ± انحراف معیار است. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. بر اساس آزمون چند دامنه دانکن، میانگین‌ها با حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در p≤۰/۰۵ هستند. مقایسه میانگین‌ها بین تیمارهای مختلف براساس هر یک از روزهای نمونه‌برداری می‌باشد.

Fig. 5. peroxidase activity in tomato seedlins treated with Th-14 (*T. harzianum*) and Ta-30 (*T. atroviride*) isolates, individually and in combination, at 0th, 7th, 11th, 14th, 17th and 21th days after Fol (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) inoculation. The vertical bars indicate ± standard deviation (SD). Each value represents the mean of four replicates. The means with the same letter indicate a lack of significant difference at p≤0.05 according to Duncan's Multiple Range Test. Comparison of means between different treatments is on the basis of each sampling days.

آنزیم‌های اکسیدکننده فنل، موجب تبدیل فنل به کینون می‌شوند که از فنل‌ها فعال‌تر بوده و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها نیز بیشتر است. بنابراین ممکن است این آنزیم‌ها به طور مستقیم در توقف توسعه بیمارگر نقش داشته باشند (Melo *et al.*, 2006) و یا از طریق تسریع مرگ سلولی در سلول‌های نزدیک به محل آلودگی و نیز ایجاد فضای سمی در داخل سلول‌ها از رشد بیمارگر بازدارندگی به عمل آورند (Bi and Felton, 1995). در این مطالعه تیمارهای شاهد سالم (با تزریق آب و بدون تزریق)، از لحاظ سطح فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، لذا داده‌های مربوط به یک تیمار شاهد سالم (با تزریق آب) در نتایج ذکر شد (شکل ۴ و شکل ۵). در تیمارهای مربوط به جدایه‌های تریکودرما (به صورت مجزا و در تلفیق با یکدیگر) و Fol، فعالیت آنزیم‌ها تا روز هفدهم پس از مایه‌زنی به تدریج افزایش نشان داد و پس از آن کاهش یافت (شکل ۴ و شکل ۵). این مطلب احتمالا ناشی از این است که گیاه گوجه‌فرنگی در ابتدای برهمکنش با بیمارگر و آنتاگونیست برای افزایش سطح دفاع، مقادیر بیشتری آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز تولید می‌کند اما در مراحل بعدی، آنتاگونیست خود از فعالیت بیمارگر جلوگیری کرده و فعالیت آنزیم‌ها کاهش می‌یابد.

در مطالعه حاضر در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی که فقط با جدایه‌های آنتاگونیست تیمار شده بودند، در ابتدا افزایش سطح آنزیم‌ها مشاهده شد اما پس از چند روز به تدریج کاهش رخ داد (شکل ۴ و شکل ۵). مطالعات نشان داده است که میکرواگانیسم‌های مفید در ابتدا توسط گیاه به عنوان مهاجمین ریشه شناسایی شده و فعال شدن واکنش‌های دفاعی را موجب می‌گردند (Pieterse *et al.*, 2014; Vos *et al.*, 2014)، سپس برای برقراری ارتباط با گیاه از این واکنش‌ها ممانعت به عمل می‌آورند و میزان ترکیبات دفاعی کاهش می‌یابد (Zamioudis and Pieterse, 2012). از طرف دیگر، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در تیمارهای مذکور پایین‌تر از تیمارهای آنتاگونیست و Fol بود (شکل ۴ و شکل ۵). مشخص شده است عوامل بیوکنترل در غیاب بیمارگر سلول‌های گیاه را برای مقابله با تهاجم آماده می‌کنند و به دنبال حمله بیمارگر واکنش‌های دفاعی گیاه را با سرعت و یا قدرت بیش‌تری فعال می‌سازند. این فرآیند تحت عنوان پرایمینگ (Priming) شناخته می‌شود و نتیجه آن افزایش سطح مقاومت گیاه در حضور بیمارگر است (Pieterse *et al.*, 2014). بنابراین تفاوت فعالیت آنزیم‌ها در تیمارهای ذکر شده در بالا، می‌تواند ناشی از این مطلب باشد.

عوامل آنتاگونیستی مورد بررسی به خصوص دو جدایه Th-14 و Ta-30 عملکرد موفقی در القای واکنش‌های دفاعی گوجه‌فرنگی و کنترل بیماری داشتند. بنابراین جدایه‌های مذکور در جهت اهداف برنامه مدیریت تلفیقی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی امیدبخش می‌باشند. از آن‌جا که ممکن است فراهم آوردن شرایط مساعد برای فعالیت عوامل بیوکنترل در مزرعه مشکلاتی را در پی داشته باشد، لذا یافته‌های این پژوهش می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آتی در مورد شناسایی و استخراج ترکیبات القاگر از جدایه‌های موفق باشد. به علاوه می‌توان از ژن‌های جدایه‌های منتخب به منظور ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری استفاده کرد. مطالعات بیشتر در زمینه بررسی اجزاء مسیرهای درگیر در واکنش‌های دفاعی گیاه و نیز فرمولاسیون جدایه‌ها، به ویژه در سطح تجاری ضرورت دارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نگارندگان از جناب آقای مهندس داریوش شهریاری به جهت در اختیار گذاشتن جدایه‌های تریکودرما و فراهم نمودن امکان استفاده از گلخانه‌های تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ورامین و نیز جناب آقای دکتر دوستمراد ظفری که در شناسایی جدایه‌های تریکودرما همکاری صمیمانه‌ای داشتند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology (5thed). Academic Press, New York.

AKRAM, W., A. MAHBOOB and A. A. JAVED, 2013. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. European Journal of Microbiology and Immunology, 3: 275-280.

ALFANO, G., M. L. LEWIS IVEY, C. CAKIR, J. I. B. BOS, S. A. MILLER, L. V. MADDEN, S. KAMOUN and H. A. J. HOITINK, 2007. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. Phytopathology, 97: 429-437.

ALIZADEH, H., K. BEHBOUDI, M. AHMADZADEH, M. JAVAN-NIKKHAH, CH. ZANIODIS, C. M. PIETERS and P. A. H. M. BAKKER, 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. Biological Control, 65: 14-23.

ALTINOK, H. H. 2009. Activation of systemic resistance by acibenzolar-s-methyl and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum melonis* (FOM) strain against *Fusarium* wilt disease in eggplant seedlings. Journal of Turkish Phytopathology, 38: 21-32.

AMER, M. A., I. A. EL-SAMRA, I. I. ABOU-EL-SEOUD, S. M. EL-ABD and N. K. SHAWERTAMIM, 2014. Induced systemic resistance in tomato plant against *Fusarium* wilt disease using biotic inducers. Middle East Journal of Agriculture Research, 3: 1090-1103.

AMINI, J. 2009. Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Kurdistan province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. Journal of Plant Pathology, 8: 68-73.

AMINI, J. and F. S. DZHALILOVE, 2010. Induction of systemic resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* causal agent of Fusarium wilt by non-pathogenic *F. oxysporum* in greenhouse condition. Applied Entomology and Phytopathology, 78: 15-32.

ANONYMOUS, 2015. Statistics of Agriculture. Ministry of Agriculture Jihad Press, Tehran.

BAWA, I. 2016. Management strategies of *Fusarium* wilt disease of tomato incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (sacc.): a review. International Journal of Advanced Academic Research, 2: 32-42.

BI, J. L. and G. W. FELTON, 1995. Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites and reactive oxygen species as components of induced resistance. Journal of Chemistry and Ecology. 21: 1511-1530.

BISSETT, J. 1991a. A revision of the genus Trichoderma II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, 69: 2357-2372.

BISSETT, J. 1991b. A revision of the genus Trichoderma III. Section Pachybasium .Canadian Journal of Botany, 69: 2373- 2417.

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

BOYHAN, G. E., D. B. LAGSTON, P. M. LEWIS and M. O. LINTON, 2001. Use of insulin syringe for *Fusarium* wilt inoculation of watermelon germplasm. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 24: 49-51.

CHAKRABORTY, M. and N. C. CHATTERJEE, 2007. Interaction of *Trichoderma harzianum* with *Fusarium solani* during its pathogenesis and the associated resistance of the host . Asian journal of Experimental Science, 21: 353-357.

CHOWDAPPA, P., S. P. MOHAN KUMAR, M. JITHI LAKSHMI and K. K. UPRETI, 2013. Growth simulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by Bacillus subtillis or Trichoderma harzianum. Biological control. 65: 109-111.

ELAD, Y., I. CHET and Y. HENIS, 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica, 9: 59-67.

ETEBARIAN, H. R. 2009. Vegetable Diseases and their Control. Tehran University Press, Tehran, Iran.

FARHANG NIYA, S., L. NARAGHI, F. OMMATI and M. PIRNIA, 2015. Evaluation of the efficacy of the biological compound affected by *Talaromyces flavus* in controlling tomato Fusarium wilt disease in the field

conditions. International Journal of Agricultural Science and Research, 5: 153-164.

HARMAN, G. E., A. H. HERRERA-ESTRELLA, B. A. HORVITZ and M. LORITO, 2012. Special issue: Trichoderma- from basic biology to biotechnology. Microbiology, 158: 1-2.

HERMOSA, R., A. VITERBO, I. CHET and E. MONTE, 2012. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. Microbiology, 158: 17-25.

HIBAR, K., M. DAAMI-REMADIS and M. EL MAHJOUB, 2007. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Trichoderma* spp. Tunisian Journal of Plant Protection, 2: 47-58.

JOHN CHRISTOPHER, D., T. SUTHIN RAJ, S. USHA RANI and R. UDHAYAKUMAR, 2010. Rol of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Biopesticide, 3: 158-162.

JUBER, K. S., A. K. HASSAN and Y. N. ALHAMIRI, 2014. Evaluation of biocontrol agents and chemical inducers for managing a vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 4: 335-343.

LESLIE, J. F. and B. A. SUMMERELL, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Press, Manhattan, Kansas.

MADHAIYAN, M., S. POONGUZHALI., M. SENTHILKUMAR, S. SESHADRI, H. CHUNG, J. YANG, S. SUNDARM and T. SA., 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar co-47 by *methylobacterium* spp. Botanical Bulletin Academia Sinica, 45: 315-324.

MAHADEVAN, A. and R. SRIDHAR, 1982. Methods in physiological plant pathology. Sivakam Publishers, Madras.

MARTINEZ-MEDINA, A., I. FERNANDEZ, M. J. SANCHEZ-GUZMAN, S. C. JUNG, J. A. PASCUAL, and M. J. POZO, 2013. Deciphering the hormonal signaling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. Frontiers in Plant Science, 4: 1-12.

MATHYS, J., K. DE CREMER, P. TIMMERMANS, S. VANKERCHHOVE, B. LIEVVENS, M. VANHAECKE, B. P. CAMMUE and B. DE CONICH, 2012. Genome-wide characterization of isr induced in arabidopsis thaliana by trichoderma hamatum t382 against botrytis cinerea infection. frontiers in plant science. 3: 108.

MELO, G. A., M. M. SHIMIZU and P. MAZZAFER, 2006. Polyphenol oxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. Phytochemistry, 67 (3): 277-285.

MENZIES, J. G., C. KOCH and F. SEYWERD, 1990. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant Disease, 74: 569-572.

MISHRA, D. S., A. K. GUPTA, C. R. PRAJAPATI and S. SINGH, 2011. Combination of fungal and bacterial antagonists for management of root and stem rot disease of soybean. Pakistan Journal of Botany, 43: 2569-2574.

MORKUNAS, L. and J. GMEREK, 2007. The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupin embryos axes against *Fusarium oxysporum*. Journal of Plant Physiology, 164: 497-506.

MUKHERJEE, M., P. K. MUKHERJEE, B. A. HORWITZ, C. ZACHOW, G. BERG and S. ZEILINGER, 2012. Trichoderma-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. Indian Journal of Microbiology, 52: 522-529.

MWANGI, M. V., E. O. MONDA, SH. A. OKOTH and J. M. JEFWA, 2011. Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhyzal fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 508-513.

NAING, K. W., X. H. NGUYEN, M. ANEES, Y. S. LEE, Y. CH. KIM, S. J. KIM, M. H. KIM, Y. H. KIM and K. Y. KIM, 2015. Biocontrol of Fusarium wilt disease in tomato by *Paenibacillus ehimensis* KWN38.World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31: 165-174.

NAWROCKA, J. and V. MALOLEPZA, 2013. Diversity

in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. Biological control, doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.07.005.

NIRENBERG, H. I. and K. O'DONNELL, 1998. New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90: 434-458.

OJHA, S. and N. C. CHATTERJEE, 2012. Induction of resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. Journal of Plant Protection Research, 52: 220-225.

PIETERSE, C. M. J., CH. ZAMIOUDIS, R. L. BERENDSEN, D. M. WELLER, S. C. M. VAN WEES and P. A. H. M. BAKKER, 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annual Review of Phytopathology. 52: 16.1-16.29.

POURJAM, E., N. KAMALI and N. SAHEBANI, 2015. Elicitation of defense responses in tomato against *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* wilt complex. Journal of Crop Protection, 4: 29-38.

RAJIK, M., S. K. BISWAS and SH. SHAKTI, 2012. Biochemical basis of defense response in plant against *Fusarium* wilt through bio-agents as an inducer. African Journal of Agriculture Research, 7: 5849-5857.

SUNDARAMORTHY, S. and P. BALABASKAR, 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 1: 36-40.

TUCCI, M., M. RUOCCO, L. DE MASI, M. DE PALMA, and M. LORITO, 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. Molecular Plant Pathology, 12: 341-354

VANCE, C. P., T. K. KIRK and R. T. SHERWOOD, 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 18: 259-288.

VERMA, N., M. AHMED and R. S. UPADHIAY, 2014. Induction of resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* Persian Gulf Crop Protection, 3: 25-36.

VINALE, F., K. SIVASITHAMPARAM, E. L. GHISALBERTI, R. MARRA, M. J. BRABETTI, H. LI, S. L. WOO and M. LORITO, 2008. A novel role for secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology. 72: 80-86.

VOS, C. M., Y. YANG, B. DE CONICK and B. P. A. CAMMUE, 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. Biological Control, doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.04.004.

WEITANG, S., Z. LIGANG, Y. CHENG ZONG, C. XIAODONG, Z. LIQUN and L. XILI, 2004. Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. Crop Protection, 23: 120-123.

YE, S. F., H. Y. ZHOU, Y. SUN, L. Y. ZAOU and J. Q. YU, 2006. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots and promotes incidence of Fusarium wilt. Environmental and Experimental Botany, 56: 255-262.

ZAMIOUDIS, C. and C. M. J. PIETERSE, 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interaction, 25: 139-150.