کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۶ (۳۹-۲۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.62731

شناسایی عوامل قارچی مولد لکه‌برگی گوجه‌فرنگی و کنترل بیولوژیکی آنها توسط آنتاگونیست‌های ناحیه ریزوسفر گوجه‌فرنگی در منطقه سیستان

۱. محمد بیدقی؛ ۲. ناصر پنجه‌که*؛ ۱. راضیه رضایی
۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/٦/۱٤)

چکیده

به منظور شناسایی و کنترل بیولوژیک عوامل قارچی مولد لکه برگی گوجه‌فرنگی در منطقه سیستان، طی سال‌های ۹۳-۹۲ از مزارع و گلخانه‌های مختلف نمونه‌برداری به‌عمل آمد. جداسازی و تشخیص گونه‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد در آزمایشگاه انجام گرفت. در مجموع ۱۰۲ جدایه قارچی به‌دست آمد که بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی در شش گونه *Alternaria alternata*، *A. dumosa*، *A. tenuissima*، *A. mimicula*، *A. tomaticola* و*Cladosporium cladosporiodes* قرار گرفتند. همه قارچ‌های جداسازی شده روی گوجه‌فرنگی بیماریزا بودند. در این پژوهش گونه *C. cladosporiodes* به‌عنوان عامل بیماری روی گوجه‌فرنگی برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. به منظور کنترل بیولوژیک بیمارگرها از مجموع ۲۲۰ جدایه قارچی و باکتریایی جدا شده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی، ۱۰ جدایه به روش کشت متقابل توانایی آنتاگونیستی بالایی در برابر قارچ‌های بیمارگر از خود نشان دادند. این جدایه‌ها شامل *Trichoderma harzianum*، *T. virens* و *B. subtilis* بودند. در بررسی‌های آزمایشگاهی مشخص شد که *T. harzianum*، *T. virens*، BS1 و BS2 دارای اثرات آنتاگونیستی بالاتری بودند که بیشترین اثر بازدارندگی روی *A. alternata* به‌ترتیب ۵۵/٦۷، ۵۲/۸۳، ۵۸/۷۱ و ۵۸/۵۷ درصد داشتند. به همین دلیل این جدایه‌ها جهت آزمایش‌های بیوکنترلی در شرایط گلخانه انتخاب گردیدند. بر اساس نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های آنتاگونیست باعث کاهش شدت بیماریزایی و بهبود عملکرد صفات زراعی شدند. در این میان از قارچ‌های آنتاگونیست گونه *T. harzianum* و از جدایه‌های باکتریایی، جدایه BS1 عملکرد بهتری را نشان داده بودند.

کلیدواژگان: آنتاگونیست، بیوکنترل، لکه برگی گوجه‌فرنگی، *Trichoderma*، *Bacillus*.

Identification fungal causing leaf spot on tomato and biological control by the antagonists isolated from the rhizosphere of tomato in Sistan

Mohammad Beydaghi[1], Naser Panjehkeh[2*] and Raziyeh Rezaei[1]
1, 2. Former M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran
(Received: May 15, 2015 - Accepted: Sep. 4, 2016)

ABSTRACT

In order to identify and biological control of the causal agents of leaf spot on tomato in Sistan area, sampling from different fields and greenhouses have been done during the years of 2013_2014. Isolation and identification of species was achieved by using standard methods in laboratory. Finally, 102 fungi isolates were obtained and placed in 6 species of *Alternaria alternate*, *A. dumosa*, *A. tenuissima*, *A. mimicula*, *A. tomaticola and Cladosporium cladosporiodes* based on morphological characteristics. All of the isolated fungi were pathogenic on tomato. In this study, *C. cladosporiodes* is reported as the factor of disease on tomato for first time in Iran. For the sake of biological control of pathogens, from all 220 isolate of bacteria and fungi isolated from tomato rhizospheres, 10 isolates showed high antagonistic effects against pathogenic fungi using dual- culture tests. These isolates were *Trichoderma harzianum*, *T. virens* and *Bacillus subtilis*. In laboratorial studies, it had been revealed that *T. harzianum*, *T. virens*, BS1 and BS2 had higher antagonistic effects. The highest inhibitory effect on *A. alternata* was 55.67, 52.83, 58.71 and 58.57 percent, respectively. Because of this reason, these isolates were selected for biocontrol experiments in greenhouse conditions. Based on the results of greenhouse experiments, antagonistic isolates caused a decrease in the intensity of pathogenicity and improved the performance of crop characteristics. Among the antagonistic fungi, *T. harzianum*, and among the bacterial isolates, BS1 had shown a better result antifungal activity.

Keywords: Antagonist, biological control, leaf spot of tomato, *Trichoderma*, *Bacillus*.

* Corresponding author E-mail: naserpanjeke@yahoo.com

تازه‌های تحقیق

در این پژوهش برای اولین بار در منطقه سیستان، عوامل قارچی مولد لکه برگی گوجه فرنگی و کنترل بیولوژیک آنها با استفاده از آنتاگونیست‌های ناحیه ریزوسفر مورد بررسی قرار گرفت که در مجموع ۱۰۲ جدایه قارچی به‌دست آمد. بر اساس نتایج حاصله، گونه *C. cladosporiodes* به عنوان عامل بیماریزا روی گوجه فرنگی برای اولین با از ایران گزارش گردید و همچنین مشخص شد که جدایه‌های آنتاگونیست جداسازی شده باعث کاهش شدت بیماریزایی و بهبود عملکرد صفات زراعی گردیدند.

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* Miller یکی از گسترده‌ترین محصولات کشاورزی کشت شده در سطح جهان می‌باشد. از لحاظ سطح زیر کشت مقام دوم را بعد از سیب‌زمینی با تولید جهانی ۱۵۲/۹ میلیون تن در هکتار بر اساس بانک اطلاعاتی FAOSTAT دارد. منشاء آن کشور پرو و سابقه کشت آن در ایران حدود ۱۵۰ سال است (Nicknejad Kazempour *et al.* 1999). ایران از تولیدکنندگان عمده این محصول می‌باشد. طبق آمارنامه کشاورزی در سال ۱۳۸۹ استان سیستان و بلوچستان، ۲۲۹۴ هکتار سطح زیر کشت، ۳۹۳۱۸ تن تولید و ۱۷۱۳۳/۷۹ کیلوگرم عملکرد داشته است.

این گیاه توسط بسیاری از عوامل بیماریزای جدی در شرایط مزرعه و گلخانه مورد حمله قرار می‌گیرد. قارچ‌های حقیقی و Oomycetes از جمله مهمترین عوامل کاهش‌دهنده عملکرد محصول در این گیاه محسوب می‌شوند (Agrios 2005). در این میان بیماری لکه برگی گوجه‌فرنگی از شایع‌ترین آنها می‌باشد که تقریبا در همه قاره‌ها خسارت وارد می‌کند. لکه برگی ممکن است توسط گونه‌هایی از جنس *Alternaria* ایجاد شود. این جنس قارچی از مهمترین عوامل تهدیدکننده کشت این محصول می‌باشد. به‌عنوان مثال بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی با عامل *A. solani* می‌تواند باعث خسارت جدی و از بین رفتن ۸۰-۵۰ درصد عملکرد محصول در ارقام حساس گوجه‌فرنگی شود (Garampalli and Ravikumar 2013). بیماری لکه موجی از اکثر مناطق کشت گوجه‌فرنگی در ایران نیز گزارش شده است (Ershad 2009) که طبق بررسی‌های به‌دست آمده گونه‌های مختلفی از قارچ *Alternaria* در بروز این بیماری در ایران نقش دارند. علاوه بر آن قارچ *Cladosporium cladosporiodes* نیز باعث ایجاد لکه‌برگی می‌شود، لکه‌ها ابتدا در سطح زیرین برگ به رنگ سبز روشن نمایان می‌شوند و به تدریج کپکی به رنگ سبز زیتونی ایجاد می‌کنند (Rivas and Thomas 2005). عامل این بیماری علاوه بر برگ به شکوفه‌ها، میوه‌ها، دمبرگ‌ها، دمگل‌ها و ساقه‌ها نیز حمله می‌کنند (Ogorek *et al*. 2012).

ازآنجایی‌که این بیمارگرهای گیاهی از لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشند، بنابراین ما نیازمند روش‌های مؤثر برای کنترل بیمارگرها می‌باشیم. امروزه استراتژی مبارزه با بیماری‌های گیاهی در بسیاری از موارد شامل استفاده از سموم شیمیایی است که متاسفانه این سموم اثرات سوء و تخریبی بر سلامت انسان و محیط زیست گذاشته و نتایج رضایت بخشی را در پی نداشته‌اند (Fravel 2005). به همین دلیل در دهه‌های گذشته تلاش بر استفاده از روش‌های جایگزین که مقرون به صرفه‌تر، ایمن و سازگار با محیط زیست و سلامت انسان باشند بیش از پیش اهمیت یافته است (Ongena and Jacques 2008). در این میان استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید به‌عنوان عوامل بیوکنترلی یکی از مقبول‌ترین روش‌های کنترل بیماری‌ها در مبارزه تلفیقی بیماری‌های گیاهی است. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند، زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشد (Weller 1988). قارچ‌ها و باکتری‌های ناحیه ریزوسفر عوامل مهم بیوکنترلی هستند که در دو دهه اخیر اهمیت زیادی در کنترل بیماری‌های گیاهی پیدا کرده‌اند (Alwathnani and Perveen 2012). باکتری‌های خاک به ویژه جنس *Bacillus* طیف وسیعی از مولکول‌های بیولوژیکی، با خاصیت بازدارندگی را تولید می‌کنند، بر اساس بررسی‌های صورت گرفته این جنس توانایی تولید ۱۶۷

ترکیب بیولوژیک فعال و مؤثر علیه میکروارگانیسم‌ها را دارد. *B. subtilis* از مهمترین و پرکاربردترین گونه‌های آن می‌باشد (Ongena and Jacques 2008). علاوه بر آن، همچنین برخی از جنس‌های قارچی از جمله گونه‌های جنس *Trichoderma* به خصوص گونه *T. harzianum* به دلیل نرخ تولید مثلی زیاد، توانایی زیاد در استفاده از منابع غذایی مختلف، قدرت تهاجم زیاد، بهره‌گیری از مکانیسم‌های آنتاگونیستی مختلف چون رقابت، پارازیتیسم و آنتی بیوز، توانایی ایجاد تغییر در ریزوسفر، کارایی در تحریک رشد و القای مقاومت در گیاهان امروزه از مهم ترین عوامل بیوکنترلی به شمار می‌آیند (Benitez *et al.* 2004, Burmeister 2008). تا کنون بررسی‌های بسیاری کاهش وقوع بیماری در محصولات مختلف را توسط این عوامل آنتاگونیستی به اثبات رسانده است. بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط قاسمی و همکاران، باکتری *B. sultilis* به میزان ۹۲/۵ درصد و باکتری *P. fluorescens* نیز به میزان ۷۶/۵ درصد از رشد میسلیوم قارچ *A. alternata* و ایجاد پوسیدگی روی گوجه‌فرنگی جلوگیری کرد (Gasemi *et al.* 2013). اخیراً چند تحقیق ثابت کرده که قارچ *Trichoderma* برای کنترل بسیاری از بیمارگرهای قارچی برگی که به پیاز حمله می کنند از جمله *A. porri* (Imtiaj and Lee 2008, Prakasam and Sharma 2012)، *A. palandui* (Karthikeyan *et al.* 2008)، *A. alternata* و *A .tenuissima* (Shahnaz *et al.* 2012) استفاده می شود. در طی مطالعه‌ای دیگر، توانایی آنتاگونیستی قارچ *T. hazianum* در برابر قارچ‌های بیماریزا تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه مشخص شد که در طی سه روز از آزمایشات مهاری رشد میسلیومی بیمارگر ها، این قارچ توانست ۴۱/۶۶ درصد از رشد *Stemphylium botryosum* و ۵۰ درصد از رشد *Cladosporium* sp. و در روز چهارم ۵۶/۵۲ درصد از رشد *Botrytis cinerea* و ۵۷/۱۴ درصد از رشد *Alternaria* sp. در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند (Mokhtar and Dehimat 2012). هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی عوامل مولد لکه برگی گوجه‌فرنگی در سیستان و بررسی تأثیر عوامل بیوکنترل جدا شده از ناحیه ریزوسفر روی این بیمارگرها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی عوامل بیماریزا

نمونه‌برداری از گلخانه و مزارع گوجه‌فرنگی منطقه سیستان از شهریور ۱۳۹۲ تا فروردین ۱۳۹۳ انجام شد. ابتدا بخش‌های آلوده اندام‌های گیاهی به مدت پنج دقیقه زیر جریان ملایم شیرآب شسته شدند. سپس از حد فاصل بافت سالم و آلوده قطعات یک سانتی‌متری برش داده شد و در محلول ۱-۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت یک تا سه دقیقه (بسته به ظرافت یا زمختی بافت) ضدعفونی سطحی شدند و پس از دو تا سه بار شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن در بین دو لایه کاغذ صافی، در هر تشتک محتوی محیط PDA، ۴-۳ قطعه کشت داده شدند. چند روز پس از نگهداری کشت‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، پرگنه‌های قارچ برحسب رنگ پرگنه و ظاهر رشد میسلیوم، به روش نوک ریسه (Idnurm and Howlett 2001) و تک اسپور خالص سازی گردیدند. جهت جدا سازی و بررسی های ریخت شناختی جدایه‌ها از محیط های کشت PDA، PCA، WA بر اساس روش قوستا و همکاران (Ghoosta *et al.* 2003) استفاده شد. شناسایی قارچ‌ها با استفاده از منابع معتبر علمی از جمله سیمونز (Simmons 2007) و واریس (Vries 1952) انجام شد.

اثبات بیماریزایی قارچ‌ها

خاک مورد استفاده برای این آزمایش‌ها شامل خاک مزرعه، ماسه وکودبرگ به نسبت حجمی ۲:۲:۱بود (Gharaei *et al.* 2007). خاک‌ها در سه روز متوالی و هر بار به مدت۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱درجه سلسیوس درون اتوکلاو استریل شدند (Cardona and Rodriguez 2006). بذرهای رقم فلات گوجه‌فرنگی با استفاده ازمحلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳-۲ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس با آب مقطر سترون شستشو داده شدند .آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر واحد آزمایشی یک

گلدان پلاستیکی به حجم ۱/۵کیلوگرم بود. برای اثبات بیماریزایی جدایه‌ها از روش هافمن و همکاران (Hoffman *et al*. 2002) استفاده شد. مایه‌زنی با برداشتن حلقه‌های میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه های هفت روزه گونه‌های مورد نظر و قرار دادن آنها روی زخم‌های ایجاد شده با نوک سوزن روی برگ‌های هم سن (۱۴ روزه) انجام گرفت. به همین ترتیب برای تیمار شاهد حلقه‌های آگار عاری از قارچ روی زخم‌ها قرار داده شد. سپس گیاهچه‌ها زیر کیسه پلاستیکی با رطوبت نسبی ۹۰ درصد و یا بیشتر و دمای ۲۴-۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت یک تا دو هفته برگ‌هایی که بعد از مایه‌زنی، نشانه‌های آلودگی را به صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ در اطراف محل تلقیح بروز دادند، جمع‌آوری و در زیر آب به‌طور کامل شسته و پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. قارچ‌های رشد کرده از آنها مجدداً مورد مطالعه مورفولوژیکی قرار گرفتند. ارزیابی بیماری در بوته‌ها با استفاده از مقیاس نمره‌دهی ۹-۱ انجام شد (Grogan *et al*. 1975).

جداسازی خالص‌سازی و شناسایی عوامل کنترل زیستی

برای جداسازی قارچ‌های آنتاگونیست از کشت سری رقت خاک استفاده شد. ابتدا داخل یک ارلن مایر مقدار۱۰گرم از خاک ناحیه ریزوسفر به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و ۳۰-۲۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. به سوسپانسیون فوق ۱۰۰ میکرولیتر اسید لاکتیک۵۰ درصد برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها اضافه گردید. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل، به ۹میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت یک دقیقه روی ورتکس هم زده شد. این عمل تا کسب رقت مناسب تکرار گردید. صد میکرولیتر از رقت مطلوب، روی سطح محیط کشت انتخابی داوه پخش شد (Davet 1979). تشتک‌های پتری به مدت چند روز درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی قرار گرفتند. جدایه‌های *Trichoderma* رشد یافته در محیط انتخابی، باروش تک اسپور خالص سازی شدند. شناسایی جدایه‌ها با استفاده ازکلید تشخیص جنس*Trichoderma* و با در نظرگرفتن ویژگی‌هایی از قبیل میزان رشد، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها، ریسه‌های هوایی صورت گرفت (Bissett 1991).

جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست

برای جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست، ابتدا ۵۰۰ میلی‌گرم خاک ریزوسفر در۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون درآورده شد. سپس سری رقت‌هایی در ۹ میلی‌لیتر از آب مقطر سترون تهیه شد. از رقت‌های 10^{-3} و 10^{-4} به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به‌طور جداگانه روی محیط آگار غذایی (nutrient agar) پخش شد و محیط‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور نگهداری شدند. تک پرگنه‌های رشد یافته بر اساس تفاوت در رنگ، شکل، اندازه و حاشیه پرگنه انتخاب و روی محیط NA به روش سه بار مخطط کردن خالص‌سازی شدند (Schaad *et al*. 2001).

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از طوقه و ریشه

برای جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست طوقه و ریشه از روش ساباراتنام و تراکوایر (Sabaratnam and Traquair 2002) استفاده شد. ابتدا طوقه و ریشه هر نمونه به صورت جداگانه تکه‌تکه شد و سپس یک گرم از قطعات ریز شده به داخل لوله آزمایش حاوی ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. سری‌های رقت در ۹ میلی‌لیتر از آب مقطر سترون تهیه شد و از رقت‌های مطلوب به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط آگار غذایی ریخته و به شکل L پخش شد. پس از ۴۸ساعت نگهداری محیط‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، تک پرگنه‌های رشد یافته بر اساس تفاوت در رنگ، شکل، اندازه و حاشیه پرگنه، انتخاب و با سه بار مخطط کردن روی محیط NA خالص سازی شدند. به منظور شناسایی باکتری‌ها از روش‌های متداول بیوشیمیایی و مولکولی استفاده شد.

شناسایی بیوشیمیایی

به منظور شناسایی باکتری ها به روش بیوشیمیایی، آزمون های گرم به دو روش حلالیت در پتاس سه درصد و رنگ آمیزی گرم، رشد هوازی و غیر هوازی، استفاده از

سیترات به روش (Schaad *et al*. 2001)، تعیین تحرک باکتری، تجزیه، آزمون استفاده از قندها- الکل‌ها- اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه به روش (Fahy and Persely 1983) و آزمون کاتالاز و اکسیداز مطابق روش (Devos *et al*. 2009) انجام شد.

شناسایی مولکولی

به منظور شناسایی قطعی جدایه‌های باکتریایی از روش شناسایی ژنتیکی 16S rDNA استفاده شد. جهت تکثیر ناحیه 16S rDNA از پرایمر رفت U8-27 (5`-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3`) و برگشت L1494-1414(5`-CTACGGTAC CTTGTTACGAC -3`) استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۴۰ میکرولیتر آب مقطر، ۱/۵ میکرولیر DNA الگو، پنج میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۷ میکرولیتر $Mgcl_2$، یک میکرولیتر از هر پرایمر، یک میکرولیتر dNTP و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی پنج دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Chen *et al*. 2013). در نهایت محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار BLAST نزدیک‌ترین سکانس‌های مشابه به باکتری مشخص و جنس و گونه آن شناسایی گردید.

بررسی اثرات آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی روی قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

به منظور بررسی اثرات آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل قارچی، ابتدا به‌طور جداگانه یک قطعه پنج میلی‌متر از کشت سه روزه هر یک از قارچ‌های بیماریزا در حاشیه یک تشتک قرار داده شد. تشتک‌های پتری دردمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و پس از یک روز، در نقطه‌ی مقابل درحاشیه دیگر تشتک یک قطعه پنج میلی‌متری از کشت سه روزه قارچ *Trichoderma*، گذاشته شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. در تشتک شاهد فقط قطعه میسلیومی بیمارگر قرار داده شد و مجدداً تشتک‌ها در انکوباتور نگهداری شدند. قطر پرگنه قارچ عامل بیماری اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد نسبت به شاهد مقایسه و محاسبه گردید (Dennis and Webster 1971).

به منظور ارزیابی اثرات کنترل زیستی باکتری‌ها، آزمون کشت متقابل (Dual culture) به صورت دونقطه‌ای انجام و فاصله‌ی موجود بین پرگنه باکتری و قارچ (شعاع هاله بازدارندگی) برحسب میلی‌متر به‌عنوان معیاری جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی استرین‌ها اندازه‌گیری و استرین‌هایی که هاله بازدارندگی بیش از پنج میلی‌متر به‌وجود آورده بودند به‌عنوان جدایه برتر انتخاب و در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از انتخاب جدایه‌های برتر، ابتدا محیط کشت NA تهیه و جدایه‌های باکتری روی آن کشت داده شدند. سپس محیط کشتی از مخلوط PDA و NA تهیه و باکتری‌های رشد یافته روی NA به صورت نقطه‌ای در این محیط، کشت داده شدند. در سمت شاهد، فقط نوک لوپ سترون با محیط تماس داده شد. تشتک‌ها در انکوباتور قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت در مرکز هر تشتک پتری بطور جداگانه یک قطعه میسلیومی پنج میلی‌متری از محیط کشت سه روزه هر یک از جدایه‌های قارچ‌های بیماریزا قرار داده شد. محیط کشت‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از رسیدن حاشیه پرگنه قارچ بیماریزا به لبه تشتک پتری در تیمار شاهد، وجود هاله بازدارندگی بدون در نظر گرفتن شعاع آن به‌عنوان واکنش مثبت بازدارندگی از رشد قارچ تلقی شد (Michael and Nelson 1972). داده‌های به‌دست آمده (درصد بازدارندگی) با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید.

جدایه‌هایی که در آزمایشگاه قدرت بازدارندگی بالا از رشد قارچ‌های بیماریزا را داشتند جهت آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر ناحیه رشد بیمارگر در تشتک پتری شاهد} - \text{قطر ناحیه رشد بیمارگر در تشتک پتری تیمار}}{\text{قطر ناحیه رشد بیمارگر در تشتک پتری شاهد}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

بررسی اثرآنتاگونیستی جدایه‌های قارچی و باکتریایی ریزوسفردرشرایط گلخانه

آزمایش‌های گلخانه‌ای به صورت کشت گلدانی در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. خاک مورد استفاده برای این آزمایش‌ها، خاک مزرعه، ماسه و کود برگ به نسبت حجمی ۱:۲:۲بود (Gharaei *et al*. 2007). بذرهای مورد استفاده، گوجه‌فرنگی رقم فلات بود که با استفاده از محلول ۰/۵درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۳-۲ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس با آب مقطر سترون شست‌وشو و در گلدان‌ها کشت داده شدند. در مرحله چهار برگی، به منظور بررسی قدرت آنتاگونیستی قارچ‌ها و باکتری‌ها علیه بیمارگرها، ابتدا روی برگ‌های گوجه‌فرنگی زخم‌هایی توسط سوزن ایجاد شد. جدایه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و تلقیح سوسپانسیون اسپور به گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی صورت گرفت. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت $۱۰^{۸}$ و قارچ با جمعیت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی لیتر روی زخم‌ها قرار گرفت. روی زخم‌های گیاهچه‌های کنترل یا شاهد محیط کشت فاقد باکتری و قارچ آنتاگونیست قرار گرفت. بعد از دو ساعت زخم‌ها با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپورهای بیمارگر با جمعیت ۵×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر آلوده شدند (Ghasemi *et al*. 2013). قطر لکه‌های ایجاد شده روی برگ‌ها ۱۴ روز پس از تلقیح آنها با باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست و قارچ‌های بیمارگر اندازه‌گیری شد. تعیین شدت بیماریزایی به روش حاجی پور جارچلو و همکاران (۱۳۹۱) انجام گردید به اینصورت که قطر لکه‌های ایجاد شده در دو جهت عمود بر هم از زیر سطح برگ و درصد سطح برگ آلوده اندازه‌گیری گردید و مقایسه میانگین داده ها بر اساس آزمون دانکن صورت پذیرفت.

نتایج

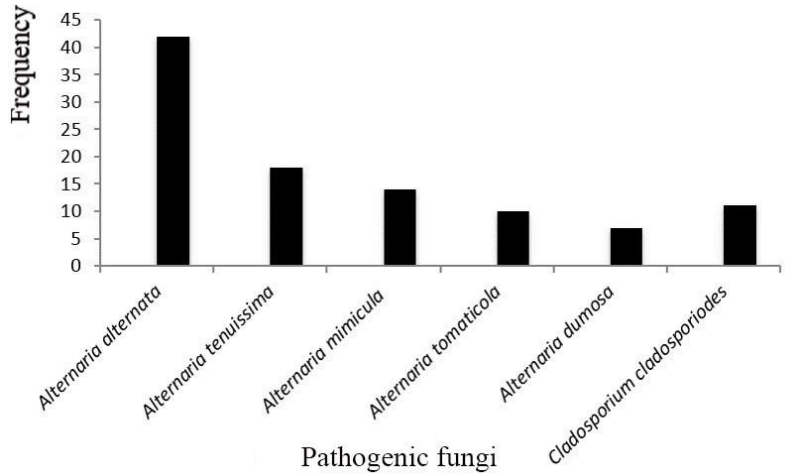
شناسایی بیمارگرها

در این تحقیق ۱۰۲ جدایه قارچی از برگ‌های آلوده جداسازی شد. بر اساس مطالعات مورفولوژیکی، جدایه‌های شناسایی شده متعلق به دو جنس شامل: ۹۱ جدایه از جنس *Alternaria* و ۱۱ جدایه از جنس *Cladosporium* بودند. با استفاده از کلید شناسایی از ۹۱ جدایه خالص‌سازی‌شده *Alternaria* پنج گونه *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. tenuissima*، *A. mimicula* و *A. tomaticola* و از ۱۱ جدایه خالص‌سازی‌شده *Cladosporium* گونه *C. cladosporiodes* شناسایی شدند. در این میان گونه‌های *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. tenuissima*، *A. mimicula* و *A. tomaticola* قبلاً از روی گوجه‌فرنگی گزارش شده بودند و گونه *C. cladosporiodes* برای اولین بار از گوجه‌فرنگی گزارش می‌شود. بیشترین فراوانی مربوط به گونه *A. alternata* با ۴۲ جدایه و کمترین فراوانی مربوط به *A. dumosa* با هفت جدایه بود (شکل ۱).

نتایج آزمون بیماریزایی قارچ‌های به‌دست آمده روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در گلخانه

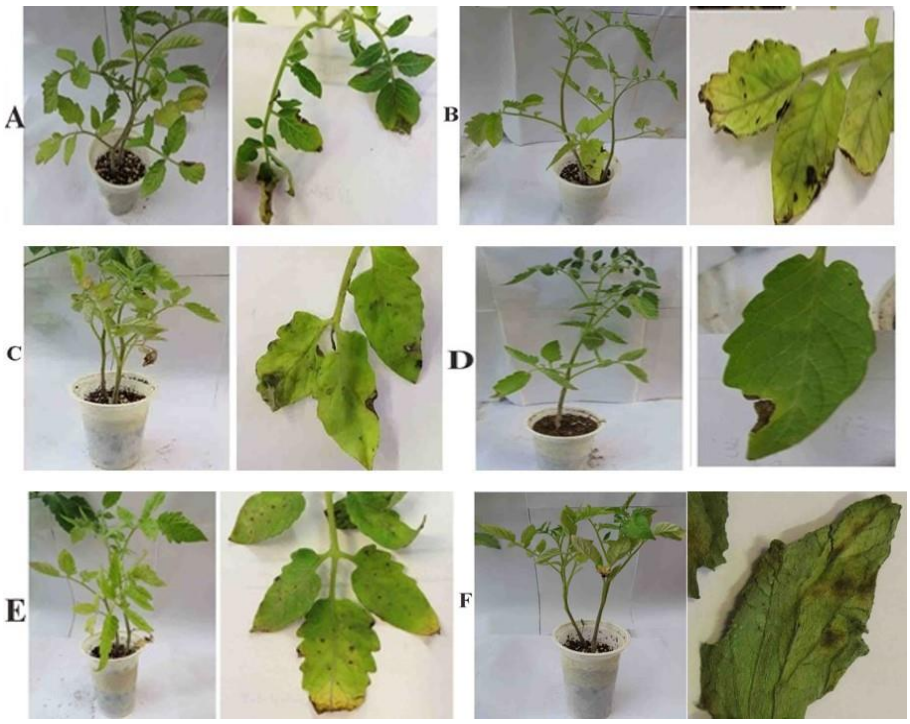
اولین نشانه‌های بیماری دو روز پس از تلقیح به صورت لکه‌های قهوه‌ای و نکروزه در محل تلقیح آشکار شده بودند، که با گذشت زمان این لکه‌ها متمایل به سیاهرنگ و مدور در سطح برگ پیشرفت کردند و آلودگی در سایر برگ‌ها هم گسترش یافت. در دو گونه *A. alternata* و *A. dumosa* لکه‌های قهوه‌ای رنگ همراه با هاله زرد رنگ بروز کرده بودند. زمان ظهور نشانه‌های بیماری در گونه‌های مختلف تفاوت چندانی نداشتند. در صورتیکه در تیمارهای شاهد هیچ نشانه‌ای از وجود لکه‌های قهوه‌ای رنگ در اطراف محل تلقیح مشاهده نگردید. از کشت مجدد بافت‌های بوته‌های بیمار روی محیط PDA عامل بیماری جدا گردید. نتایج حاصل از بررسی‌های شناسایی مجدد نشان داد که هر شش گونه شناسایی‌شده همگی روی برگ‌های گوجه‌فرنگی بیماریزا بودند. در این پژوهش بیماریزا بودن قارچ *C. cladosporiodes* روی گوجه‌فرنگی برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. قطر ناحیه ای قهوه‌ای رنگ اطراف محل تلقیح در جدایه‌های مختلف تفاوت چشمگیری را

نشان داد که این نمایانگر درجات مختلفی از بیماریزایی در گونه‌های شناسایی شده می‌باشد. نتایج حاصله از تعیین شدت بیماریزایی بر حسب اندازه‌گیری قطر لکه‌ها در دو جهت عمود بر هم از زیر سطح برگ و اندازه‌گیری درصد سطح برگ آلوده و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که در میان گونه‌های مورد مطالعه *A. alternata* و *A. tenuissima* بیشترین و *C. cladosporiodes* کمترین درجه بیماریزایی را دارا بودند. درجه بیماریزایی بقیه گونه‌های شناسایی شده در حد واسط این دو گونه قرار داشت (شکل ۲).



شکل ۱. فراوانی قارچ‌های مولد لکه‌برگی جداسازی شده از منطقه سیستان

Figure 1. The frequency of causing leaf spot fungi isolated from Sistan region



شکل ۲. علایم بیماری روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با جدایه A) *Alternaria tomaticola*، b) *Alternaria mimicula*، C) *Alternaria tenuissima*، D) *Alternaria dumosa*، E) *Alternaria alternate*، F) *Cladosporium cladosporioides* در ۱۴روز بعد از مایه‌کوبی

Figure 2. Disease symptoms on tomato seedlings inoculated with isolate A) *Alternaria tomaticola*, B) *Alternaria mimicula*, C) *Alternaria tenuissima*, D) *Alternaria dumosa*, E) *Alternaria alternata*, F) *Cladosporium cladosporioides* in 14 days after inoculation.

شناسایی و انتخاب جدایه‌های برتر باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست

در این بررسی ۷۰ جدایه قارچی و ۱۵۰ جدایه باکتریایی آنتاگونیست از ناحیه ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی جداسازی گردیدند. در بین جدایه‌ها دو جدایه آنتاگونیست قارچی و هشت جدایه آنتاگونیست باکتریایی کنترل مؤثری علیه بیمارگرها داشتند. بر اساس نتایج آزمون‌های بیو شیمیایی (جدول ۱) و تعیین توالی DNA ریبوزومی، جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست با گونه *B. subtilis* مطابقت داشتند. توالی ناحیه 16S rDNA جدایه‌های BS1 وBS2 با جدایه‌های *B. subtilis* CYBS-8 با شماره دسترسی JQ361057.1 و *B. subtilis* CYBS-7 با شماره دسترسی JQ361056.1 ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت را نشان دادند. نتایج بررسی محصولات PCR قطعه 16S rDNA در شکل ۳ و درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از نرم‌افزار Mega 6 به صورت Neighbour Joining -Bootstrap در شکل ۴ نشان داده شده است. قارچ‌های آنتاگونیست جدا سازی شده از ناحیه ریزوسفر بر اساس خصوصیات ریخت شناختی با دو گونه *T. harzianum* و *T. virens* مطابقت داشتند.

شناسایی ملکولی و تعیین توالی DNA جدایه‌های BS1 و BS2 به شرح زیر می‌باشد:

BS1: *Bacillus subtilis*

CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACC
GGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTTGGCTACCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGTGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
TAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGC
AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCG
GGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT
TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGT
GGGACAGATGATTGG

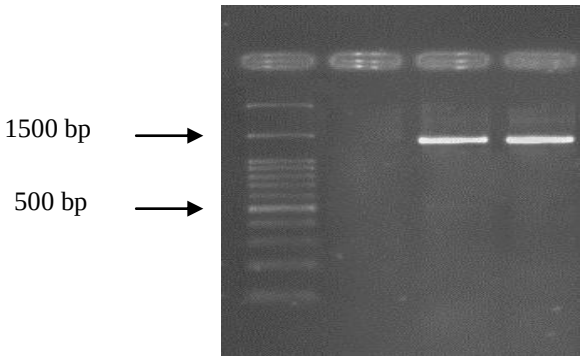
BS2: *Bacillus subtilis*

TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG
GATGGTTTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG
GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAG
GGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCGGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCG
CAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAA
CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTG
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAGCGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
ACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGC
ATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT
CATGCCCCTTATGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAG
GTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGATCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
ACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGAC
AGATGATTGGGGTGAAGTCGTTA

جدول ۱. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *Bacillus*

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of Bacillus isolates

		BS_8	BS_7	BS_6	BS_5	BS_4	BS_3	BS_2	BS_1
	Gram Staining	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore position	Terminal spore								
	Central spore	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at Temperature	5 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
	20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
	60 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in the NaCl	5 %	+	+	+	+	+	+	+	+
	7 %	+	+	+	+	+	+	+	+
	Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction	Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
	Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hydrolysis starch	+	+	+	+	+	+	+	+
	Hydrolysis Gelatin	+	+	+	+	+	+	+	+
	Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	+	+
	Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
	Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+



شکل ۳. نتایج الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های آنتاگونیست روی ژل اگاروز ۱/۲ درصد. از سمت چپ به ترتیب چاهک ۱ مارکر، چاهک ۲ کنترل منفی و چاهک سوم و چهارم نمونه‌های باکتری آنتاگونیست.

Figure 3. The results of electrophoresis of PCR products antagonistic isolates on agarose gel 1.2%. From the left, respectively, 1: Marker, 2: Negative control and 3, 4: Samples of antagonistic bacteria.

شکل ۴. دندروگرام رسم شده توسط نرم‌افزار Mega 6 و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در سایت NCBI

Figure 4. Dendrogram drawn by Mega 6 software and comparison obtained Sequence with Sequence exiet on NCBI site

اثرات بازدارندگی *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma virens* روی بیمارگرها در شرایط آزمایشگاهی

نتایج کشت متقابل قارچ‌های بیمارگر با قارچ‌های آنتاگونیست در آزمایشگاه بررسی و طبق نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که هر دو جدایه قارچی موجب جلوگیری از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی شدند، که در این میان *T. harzianum* بیشترین اثر بازدارندگی را بر *A. alternata* با ۵۵/۶۷ درصد و کمترین اثر بازدارندگی را بر *A. tomaticula* با ۳۹/۱۲ درصد داشته است. گونه *T. virens* بیشترین اثر بازدارندگی را بر *A. alternata* با ۵۲/۸۳ درصد و کمترین اثر بازدارندگی بر *A. tomaticula* با ۳۸/۱۵ درصد داشته است (جدول۲ و شکل ۴). در مجموع گونه *T. harzianum* در بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگرها عملکرد بهتری نسبت به *T. virens* در شرایط آزمایشگاهی داشته است.

اثرات بازدارندگی باکتری‌های آنتاگونیست روی بیمارگرها در شرایط آزمایشگاهی

از ۱۵۰ جدایه باکتری جدا شده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی بر اساس آزمون کشت متقابل و مشاهده هاله بازدارندگی، تعداد هشت جدایه به نسبت‌های مختلف ایجاد هاله بازدارندگی در مقابل قارچ‌های بیمارگر کردند که در این بین دو جدایه BS1 و BS2 بیشترین درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ‌های عامل بیماری را نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند. جدایه BS1 بیشترین تأثیر را با ۵۸/۷۱ درصد بر گونه *A. alternata* وکمترین تأثیر را با ۳۸/۱۱ درصد بر گونه *A. tomaticola* گذاشته است. در جدایه BS2 نیز بیشترین و کمترین تأثیر به ترتیب در مقابل *A. alternate* و *A. tomaticola* با ۵۸/۵۷ و ۴۲/۰۶ درصد مشاهده شد (جدول‌های ۳ و ۴، شکل ۵).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثرات بازدارندگی *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma virens* روی رشد قارچ‌های بیمارگر

Table 2. Analysis of variance inhibitory effects of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* on growth of the fungal pathogen

Source of variation	df	*Trichoderma harzianum*	*Trichoderma virens*
Treatment	5	390.17**	358.32**
Error	12	3.59	3.66
CV (%)	-	4.43	4.45

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

** Significant at probability level of 1%.

جدول ۳. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ‌های بیمارگرنسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با قارچ‌های آنتاگونیست

Table 3. Inhibitory percent of mycelial growth pathogenic fungi compared to control in dual culture with antagonistic fungi

Fungal pathogen	Percent of inhibition *Trichoderma harzianum*	Statistical categories	Percent of inhibition *Trichoderama virens*	Statistical categories
Alternaria mimicula	53.16	a	49.74	a
Alternaria tomaticula	29.12	d	28.15	c
Alternaria alternata	55.67	a	52.83	a
Alternaria dumosa	29.46	d	30.32	c
Alternaria tenuissima	42.75	c	45.49	b
Cladosporium cladosporioides	43.33	b	51.22	a

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

Values of each column followed by the same letter are not significantly different (P≤0.05).

جدول ۴. تجزیه واریانس اثر بازدارندگی هشت باکتری آنتاگونیست از رشد قارچ‌های عامل بیماری

Table 4. Analysis of variance inhibitory effect of eight antagonistis bacterial the growth of pathogenic fungi

Source of Variation	df	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8
Treatment	5	185.41**	96.57**	138.92**	374.63**	164.81**	235.22**	265.64**	331.53**
Error	12	16.79	9.10	2.19	3.53	22.11	21.51	5.42	26.18
CV (%)	-	7.80	6.06	2.97	4.01	11.62	9.65	4.94	10.97

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

** Significant at probability level of 1%.

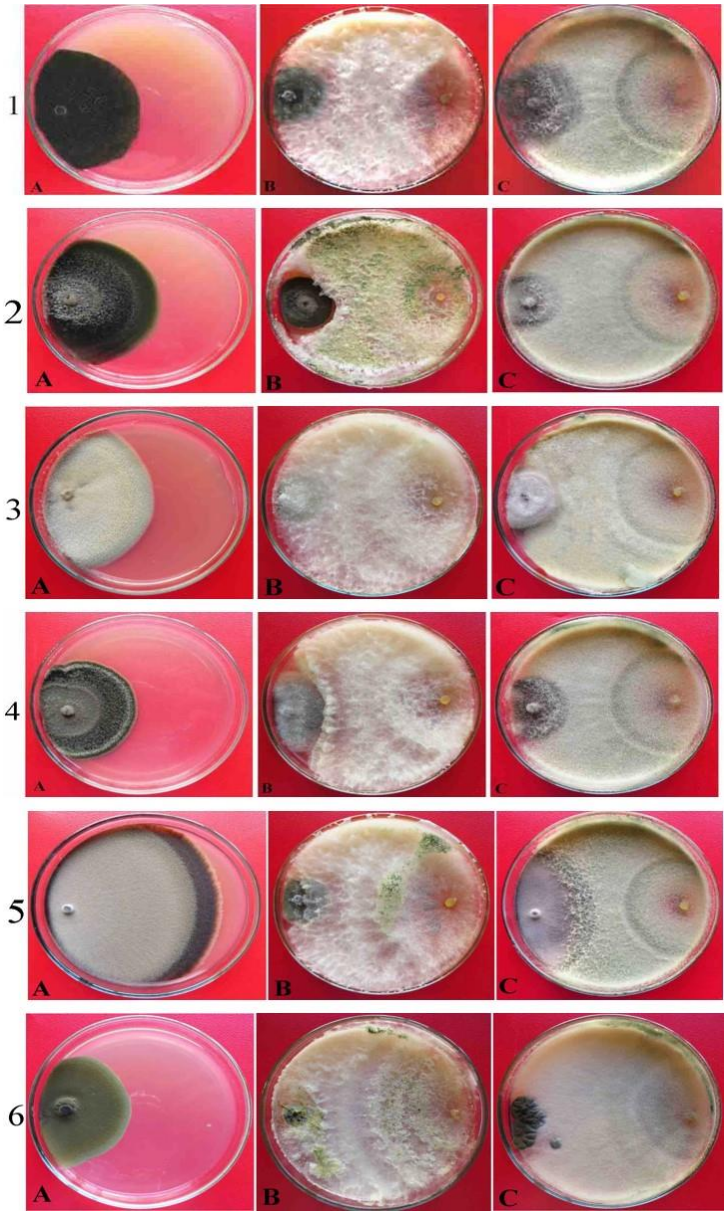
جدول ۵. مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ‌های بیمارگر نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با باکتری‌های آنتاگونیست

Table 5. Mean comparison of inhibitory percent of mycelial growth pathogenic fungi compared to control in dual culture with antagonistic fungi

Fungal pathogen	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	BS6	BS7	BS8
Alternaria mimicula	51.44a	53.23ba	47.49b	50.09b	52.01a	50.54ba	49.71b	52.78ba
Alternaria tomaticula	38.11b	42.06d	42.43c	25.83d	36.27b	33.86c	31.93d	27.28c
Alternaria alternata	58.71a	58.57a	58.11a	55.91a	55.73a	56.49a	56.47a	54.57a
Alternaria dumosa	50.83a	47.49dc	47.09b	48.29cb	48.05a	46.50b	45.60cb	46.76ba
Alternaria tenuissima	57.70a	47.16dc	43.92c	45.20c	44.98ba	43.29b	42.35c	43.57b
Cladosporiom cladosporioides	58.20a	49.99bc	57.93a	56.10a	55.46a	57.45a	56.74a	54.88a

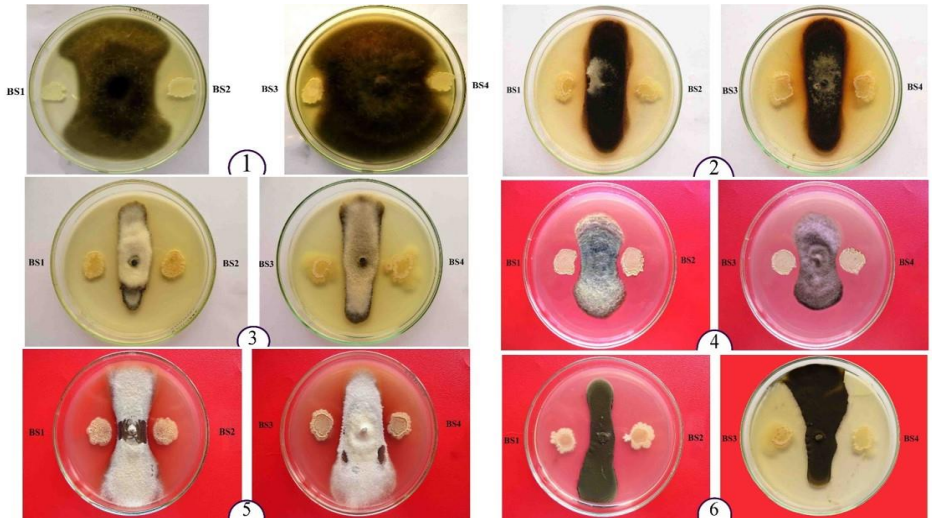
تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح P<۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

Significant differences are denoted by different letters within each column at P<0.05 according to duncan test.



شکل ۵. اثر بازدارندگی گونه‌های *Trichoderma* از رشد. ۱) *Alternaria tomaticola*، ۲) *Alternaria mimicula*، ۳) *Alternaria tenuissima*، ۴) *Alternaria dumosa*، ۵) *Alternaria alternata*، ۶) *Cladosporium cladosporioides*، A) شاهد، B) کنترل با *Trichoderma harzianum*، C) کنترل با *Trichoderma virens*.

Figure 5. Inhibitory effect of Trichoderma species of growth 1) *Alternaria tomaticola*, 2) *Alternaria mimicula*, 3) *Alternaria tenuissima*, 4) *Alternaria dumosa*, 5) *Alternaria alternata*, 6) *Cladosporium cladosporioides*. A) Testate, B) control by *Trichoderma harzianum*, C) control by *Trichoderma virens.*

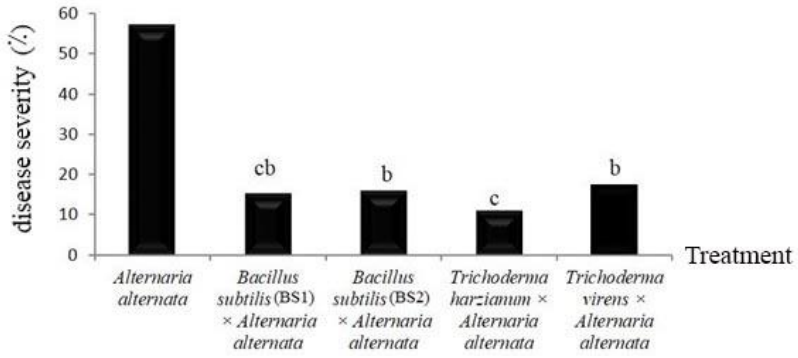


شکل ۶. اثر بازدارندگی جدایه‌های Bacillus روی رشد میسلیوم قارچها ۱) *Alternaria tomaticola*، ۲) *Alternaria mimicula*، ۳) *Alternaria tenuissima*، ۴) *Alternaria dumosa*، ۵) *Alternaria alternata*، ۶) *Cladosporium cladosporioides*.

Figure 6. Inhibitory effect of Bacillus isolates on the growth of fungal mycelium 1) *Alternaria tomaticola*, 2) *Alternaria mimicula*, 3) *Alternaria tenuissima*, 4) *Alternaria dumosa*, 5) *Alternaria alternata*, 6) *Cladosporium cladosporioides*

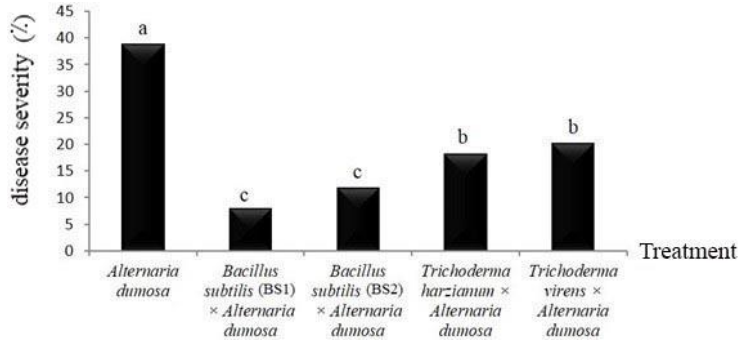
اثرات بازدارندگی قارچها و باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه‌ای

مطالعات گلخانه‌ای به منظور بررسی میزان کنترل بیولوژیک دو گونه قارچی *T. harzianum*، *T. virens* و دو جدایه باکتریایی BS1 و BS2 علیه قارچهای مولد لکه برگی گوجه‌فرنگی صورت گرفت. پس از رشد گیاه در مرحله چهار برگی، بررسی اثر عوامل آنتاگونیستی در گلخانه توسط روش اسپورپاشی اندام‌های هوایی صورت پذیرفت. برای هر آزمایش سه تکرار در نظر گرفته شد و گیاهان در شرایط دمایی، نوری و رطوبتی یکسان رشد داده شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بوته‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با بیمارگرها در گلخانه بدون اعمال عوامل آنتاگونیستی درجات مختلفی از شدت بیماری را نشان دادند. در گلدان‌هایی که بوته‌ها با هر دو عامل بیمارگر و آنتاگونیست تلقیح شده بودند، کاهش شدت بیماری و افزایش عملکرد در صفات زراعی نسبت به شاهد آلوده مشاهده شد. نتایج حاصل از این آزمایش در شکل‌های ۶ تا ۱۱ آمده است. نتایج نشان داد که از میان آنتاگونیست‌های قارچی، گونه *T. harzianum* بیشترین اثر ضدقارچی علیه *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. mimicula*، *A. tenuissima*، *C. cladosporioides* و گونه *T. virens* بیشترین اثر ضد قارچی را در مقابل *A. tomaticola* داشتند و از میان دو جدایه باکتریایی به کار برده شده، در تمامی موارد جدایه BS1 عملکرد بهتری را در کاهش شدت بیماری نسبت به جدایه BS2 نشان داده بود.



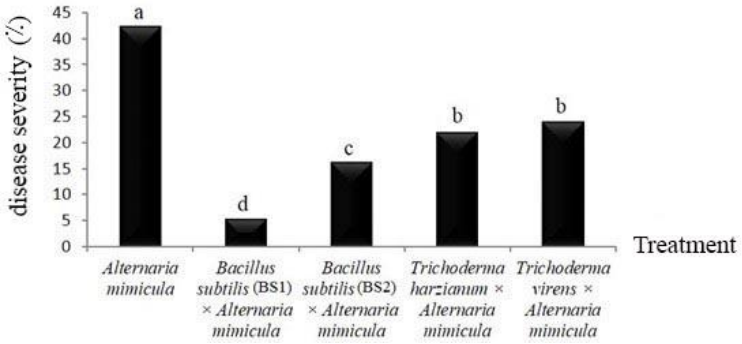
شکل ۷. اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی و باکتریایی در کنترل بیماری ناشی از *Alternaria alternata* در گلخانه

Figure 7. Inhibitory effect of fungal and bacterial isolates antagonist in controlling disease *Alternaria alternata* in greenhouse



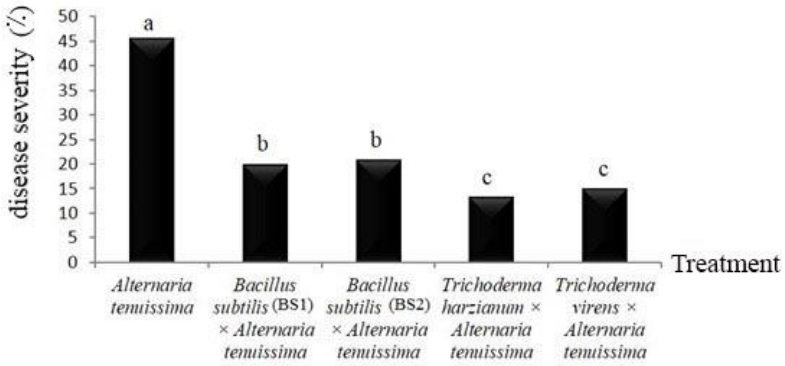
شکل ۸. اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی و باکتریایی در کنترل بیماری ناشی از *Alternaria dumosa* در گلخانه

Figure 8. Inhibitory effect of fungal and bacterial isolates antagonist in controlling disease *Alternaria dumosa* in greenhouse



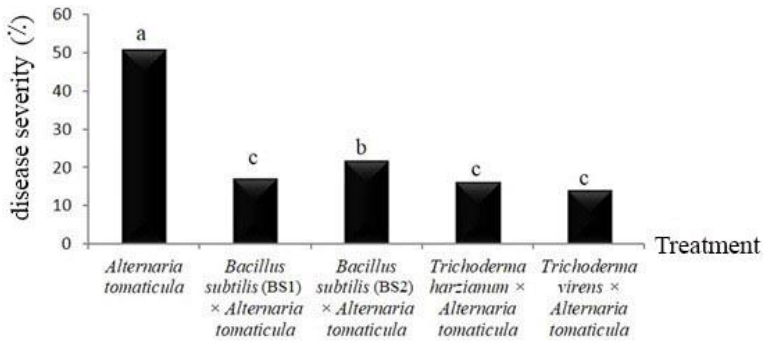
شکل ۹. اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی و باکتریایی در کنترل بیماری ناشی از *Alternaria mimicula* در گلخانه

Figure 9. Inhibitory effect of fungal and bacterial isolates antagonist in controlling disease *Alternaria mimicula* in greenhouse



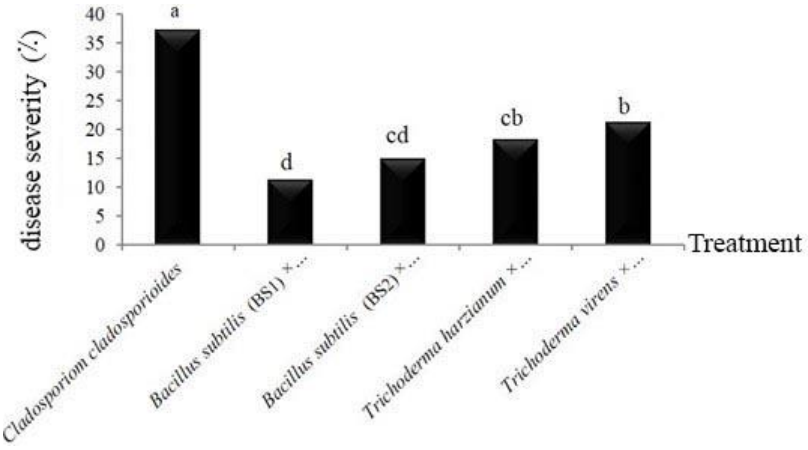
شکل ۱۰. اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی وباکتریایی در کنترل بیماری ناشی از *Alternaria tenuissima* در گلخانه

Figure 10. Inhibitory effect of fungal and bacterial isolates antagonist in controlling disease *Alternaria tenuissima* in greenhouse



شکل ۱۱. اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی باکتریایی در کنترل بیماری ناشی از *Alternaria tomaticula* در گلخانه

Figure 11. Inhibitory effect of fungal and bacterial isolates antagonist in controlling disease *Alternaria tomaticula* in greenhouse



شکل ۱۲. اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی و باکتریایی در کنترل بیماری ناشی از *Cladosporiom cladosporioides* در گلخانه

Figure 12. Inhibitory effect of fungal and bacterial isolates antagonist in controlling disease *Cladosporium cladosporioides* in greenhouse

* در شکل‌های ۶ تا ۱۱، تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح P<0.05 دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

* In figures 6-11, significant difference are denoted by different letters within each column at P<0.05 according to Duncan test.

بحث

گوجه‌فرنگی جزو یکی از محبوب‌ترین سبزی‌ها محسوب می‌گردد وجود حالت تازه‌خوری و قابلیت فراوری این‌محصول، نقش بسزایی در پذیرش سریع و همگانی آن به عنوان یک محصول غذایی مهم، داشته است. محصولات گوجه‌فرنگی در معرض از بین رفتن توسط آفات، بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی، رقابت با علف‌های هرز و شرایط آب‌وهوایی و خاکی نامساعد هستند. یکی از بیماری‌های شایع این محصول، لکه برگی گوجه‌فرنگی می‌باشد. به دلیل بافت تازه این محصول و مصرف تازه‌خوری آن، استفاده از سموم شیمیایی در زمینه کنترل بیماری‌ها، خطرات جدی را به همراه خواهد داشت. از این رو استفاده از روش‌های بیولوژیک و غیر شیمیایی جهت دستیابی به کشاورزی ارگانیک باید در دستورکار محققان قرار گیرد. این تحقیق برای رسیدن به این هدف در این راستا انجام گرفت. در این پژوهش ابتدا از برگ‌های دارای علائم اقدام به جداسازی بیمارگرهای احتمالی عامل آن گردید. در این مرحله قارچ‌های *A. mimicula*، *A. tomaticula*، *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. tenuissima* که قبلاً از روی گوجه‌فرنگی جداسازی گردیده بودند، برای اولین بار به‌عنوان عامل لکه‌برگی گوجه‌فرنگی از منطقه سیستان گزارش شدند و *C. cladosporioides* در این مطالعه برای اولین بار از گوجه‌فرنگی در ایران جداسازی گردید. بیماریزائی جدایه‌های گونه‌های مختلف *Alternaria* و *C. cladosporioides* روی گوجه‌فرنگی رقم فلات به اثبات رسید. نتایج این پژوهش با برخی از پژوهش های پیشین مطابق بود. حاجی‌پورجارچلو و همکاران در بررسی گونه‌های *Alternaria* آلوده کننده گوجه‌فرنگی در استان آذربایجان غربی، شش گونه *A. brassicina*، *A. arborescens*، *A. tenuissima*، *A. tomatophila* و *A. alternata* را از گوجه‌فرنگی جداسازی و بیماریزائی جدایه‌ها را با اجرای اصول کخ روی رقم BSS282 به اثبات رساندند (Hajipour Jarchlou *et al*. 2012). در میان گونه‌های مورد مطالعه *A. alternate* و *A. tenuissima* بیشترین و گونه *C. cladosporioides* کمترین درجه بیماریزائی را دارا بودند. با توجه به خطرات سموم شیمیایی در تحقیق حاضر از دو قارچ خاکزی آنتاگونیست *T. harzianum*، *T. virens* و هشت جدایه از باکتری آنتاگونیست *B. subtills* جدا شده از ناحیه ریزوسفر گوجه‌فرنگی جهت بیوکنترل عوامل ایجادکننده لکه‌برگی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه استفاده گردید. در حال حاضر گونه‌های مختلفی از قارچ *Trichoderma* به صورت موفقیت آمیزی برای کنترل بیمارگرهای مختلف گیاهی استفاده می‌شوند (Bashar and Rai 1994). علاوه بر آن چندین گونه از باکتری *Bacillus* نیز ترکیبات فعال بیولوژیکی را در برابر عوامل بیماریزای خاک برد و

بیمارگرهای پس از برداشت ایجاد می‌کنند (Romero *et al*. 2007). نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که در بررسی‌های آزمایشگاهی عوامل آنتاگونیستی قارچی و باکتریایی جداسازی شده از ناحیه ریزوسفر توانایی مهار رشد قارچ‌های مولد لکه برگی را به نسبت‌های مختلف دارا می‌باشند که در این میان از جدایه‌های باکتریایی دو جدایه BS1 و BS2 هاله بازدارندگی بیشتری را نسبت به سایر جدایه‌ها ایجاد کردند. این جدایه‌ها به‌عنوان جدایه‌های برتر در تست‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز مشخص شد که هر چهار جدایه *T. harzianum*، *T. virens*، BS1، BS2 توانایی کاهش شدت بیماریزایی را به نسبت‌های مختلف دارا می‌باشند. قبلا هم اثر بیوکنترلی این آنتاگونیست‌ها روی تعدادی از بیماری‌ها با موفقیت انجام گرفته بود. در طی مطالعه‌ای قاسمی و همکاران عنوان کردند که باکتری *B. sultilis* می‌تواند ۹۲/۵ درصد از رشد قارچ بیمارگر *A. alternata* روی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه جلوگیری نماید (Ghasemi *et al*. 2013). همچنین باندی در طی مطالعه‌ای اثرات آنتاگونیستی *T. hazianum* و *T. viridae* را علیه قارچ *A. alternata* بیمارگر مخرب فلفل در آزمایشگاه بررسی و نشان داد که قارچ‌های آنتاگونیست به کار برده شده به ترتیب ۶۷ و ۶۶ درصد از رشد بیمارگر جلوگیری کرده‌اند (Pandey 2010). گزارشاتی مبنی بر کارایی گونه‌های *Trichoderma* در برابر بسیاری از بیمارگرهای قارچی برگی که به پیاز حمله می‌کنند از جمله *A. alternata* و *A. tenuissima* نیز به اثبات رسیده است (Shahnaz *et al*. 2012). به‌طور کلی تحقیق حاضر نشان می‌دهد که خاک‌های زراعی زیر کشت گوجه‌فرنگی در سیستان دارای باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیستی هستند که می‌توانند در بازدارندگی و کاهش طبیعی بیمارگرهای قارچی مؤثر باشند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که اسپری برگی با این آنتاگونیست‌ها می‌تواند فعالیت قابل توجهی در برابر عوامل لکه برگی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه داشته باشد. در این میان از قارچ‌های آنتاگونیست گونه *T. harzianum* و از جدایه‌های باکتریایی، جدایه BS1 عملکرد بهتری را نشان داده بودند. از این رو این جدایه‌ها می‌توانند برای آزمایش‌های مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرند. البته باید به این نکته توجه کرد که میزان تأثیر عوامل آنتاگونیستی وابستگی زیادی به شرایط محیطی، گیاه، بیمارگر و آنتاگونیست دارد. بنابراین برای اثبات این پیشنهاد جهت کاربردی نمودن عوامل بیوکنترلی مورد تحقیق، انتخاب و معرفی جدایه‌های مناسب در هر اکوسیستم زراعی، آزمایش‌های بیشتری مورد نیاز هستند.

REFERENCES

Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Ed, New York: Elsevier Academic Press. pp. 237-242.

Alwathnani AH, Perveen k (2012) Biological control of *Fusarium* wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. African Journal of Biotechnology 11(5): 1100-1105.

Baker R, Elad Y, Chet I (1984) The controlled experiment in the scientific methods with emphasis on biological control. Phytopathology 74(9): 1019- 1021.

Bashar MA, Rai B (1994) Antagonistic potential of root region microflora of chickpea against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. Bangladesh Journal Botany 23: 13-19.

Benitez T, Carmen Limon M, Codon AC, Rincon AM (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Journal of Microbiology 7: 249-260.

Bissett J (1991) Arevision of the genus *Trichoderma*. II infragenic classification, Canadian Journal of Botany 69: 2357-2372.

Burmeister L (2008) The antagonistic mechanisms employed by *Trichoderma harzianum* and their impact on the control of the bean rust fungus Uromyces appendiculatus. PhD thesis, Leibniz Universita¨t Hannover.

Cardona R, Rodriguez H (2006) Effects of *Trichoderma harzianum* fungus on the incidence of the charcoal rot disease on sesame. Revista de la Facultad de Agronomia 23: 42-47.

Change Y, Baker C, Klifeld R, Chet I (1986) Increased growth of plants in the presense of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70: 145-148.

Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R, Guo JH (2013) Biocontrol of tomato with disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environ Microbiology 15(3): 848-864.

Davet P (1979) Technique pour lanalyse des population de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. Annuals Phytopathology 11: 529-533.

De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K, Whitman WB (2009) Bergey's manual of systematic bacteriology. 3rd Ed., Springer, 1422p.

Dennis C, Webester j (1971) Antagonist properties of species group of *Trichoderma* 111. Hyphal interaction. Transaction of the British Mycological Society 57: 363-369.

Emmert EAB, Handelsman J (1999) Biocontrol of plant disease. a (Gram-) positive perspective. Fems Microbiology Letters 171: 1-9.

Ershad J (2009) Fungi of Iran. Third edition, Iranian Research Institute of Plant Protection Publishers. PP. 326-342. (in Persian)

Fahy PC, Persley GJ (1983) Plant Bacteria Diseases: A Diagnostic Guide. Australia: Academic Press, 392 P.

Fravel DR (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. Phytopathology 43:337–59.

Garampalli RH, Ravikumar MC (2013) Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46 (16): 1897-1903.

George B, Kaura C, Khurdiya DS, Kapoor HC (2004) Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. Food chemistry 84: 45-51.

Gharaei Z, Roustaei A, Etebarian HR (2007) Evaluation of biological control of charcoal rot melons Tassi (Goid) *Macrophomina phaseolina* by isolates of *Bacillus*, 2nd National Congress of Ecological Agriculture 1847-1872. (In Persian).

Ghasemi S, Ahmadzade M, Torabi S (2013) Biological control of tomato rot by strains of *Pseudomonas fluorescens* UTPF68 and *B. subtilis* UTB96. Iranian Journal of Plant Protection Science 44 (2): 299-305. (In Persian).

Gholi Zade H, Ebad Zade H, Hatami F, Hossin Poor R, Mohiti Z, Rezaei MM, Fazli B, Rafei M (2011) Agricultural statistics. http://amar.maj.ir. (in Persian)

Ghoosta Y, Ershad J, Zare R, mohammadigoltapeh A (2003) taxonomic study *Alternaria* species in Iran. Rostaniha (4): 21. (in Persian)

Hajipour Jarchlou Z, Ghoost Y, Rezaei S (2012) Study of *Alternaria* species of tomato and potato disease in West Azerbaijan province. Iranian Journal Of Plant Protection Science. 44 (1): 155-163. (in Persian)

Hoffman DD, Diers BW, Hartman GL, Nickell CD, Nelson RL, Pedersen WL, Cober ER, Graef GL, Steadman JR, Grau CR, Nelson BD, del Rio LE, Helms T, Anderson T, Poysa V, Rajcan I, Stienstra WC (2002) Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disese 86: 971-980.

Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of Plant diseases. Plant Disease 87(1): 4 -10.

Idnurm A, Howlett BJ (2001) Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. Molecular Plant Pathology 2(4): 241-255.

Imtiaj A, Lee T (2008) Antagonistic effect of three *Trichoderma* species on the *Alternaria porri* pathogen of onion blotch. World Journal Agricalture Science 4: 13-17.

Karthikeyan M, Radhika K, Bhaskaran R, Mathiyazhagan S, Sandosskumar R, Velazhahan R, Alice D (2008) Biological control of onion leaf blight disease by bulb and foliar application of powder formulation of antagonist mixture. Archives Phytopathology and Plant Protection 41(6): 407-417.

Kleifeld O, Chet I (1992) *Trichoderma harzianum* – interaction with plants and effect on growth response. Plant Soil 14(4): 267-272.

Mathur K, Shekhawat KS (1986) Chemical control of early blight in kharif sown tomato. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 16(2): 235-236.

Michael A, Nelson PE (1972) Antagonistic effect of bacteria on *Fusarium roseum* "culmorum" from carnation. Phytopathology 62: 1052-1056.

Mokhtar H, Dehimat A (2012) Antagonism capability in vitro of *Trichoderma harzianum* against some pathogenic fungi. Agriculture and Biology Journal of North American 3(11):452-460.

Nicknejad Kazempour M, Sharifi Tehrani A, okhowah M (1999) Effect of antagonist fungi *Trichoderma* spp. against *Fusarium* wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tomatoes lycopersici* under greenhouse. Journal of Agricultural Science and Technology 2(3): 31-37. (in Persian)

Ogorek R, Lejman A, Pusz W, Mituch A, Miodynska P (2012) Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. Mikologia Lekarska 19(2): 80-85.

Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends In Microbiology 16(3): 115-125.

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

Prakasam V, Sharma P (2012) *Trichoderma harzianum* (Th-3) a potential strain to manage the purple blotch of onion (*Allium cepa* L.) caused by *Alternaria porri* under north Indian plains. Journal of Agriculture Science 4(10): 266-272.

Rivas S, Thomas CM (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. Annual Review of Phytopathology 43: 395-436.

Romero D, Cazorla FM, Perez-Garcia A, De Vicente A, Bloemberg G (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. Journal of Applied Microbiology 5(103): 1950- 1959.

Sabaratnam S, Traquair J (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. Biological control 23(3): 245-253.

Schaad NW, Jones JB, Chum W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edn. APS, St. Paul, Minn.

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

Simmons EG (2007) *Alternaria*: an identification manual. The American Phytopathological Society.pp. 500-510.

Vries GA (1952) Contribution to the knowledge of the genus *Cladosporium*. Link ex Fr. CBS, Baarn.

Weller DM (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizospher with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26: 379-407.

Xu LH, Xie GL, Li B, Zhu B (2008) First report of pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in china. Plant Disease 92(5): 832- 833.