ارزیابی کارآیی جدایه‌های *Trichoderma* و *Bacillus* در کنترل بیولوژیک پژمردگی فوزاریومی خربزه

زین‌العابدین نوروزی[۱]، کامران رهنما[۱]، حجت‌اله ربانی نسب[۲]، میثم تقی نسب[۱]

۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان شمالی، بجنورد

مسئول مکاتبات: زین‌العابدین نوروزی، پست الکترونیکی: sajad.nurozei89@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۴ ۲(۱) ۴۳-۵۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۴/۲۳

چکیده

در این تحقیق، کارآیی سه گونه‌ی *Trichoderma* spp. و دو استرین باکتری *Bacillus* spp. در کنترل بیولوژیک *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرارگرفت. آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد استفاده شد. نتایج بررسی های آزمایشگاهی روی کارآیی عوامل قارچی کنترل بیولوژیک نشان داد که در آزمون کشت متقابل به دو صورت قرارگیری هم‌زمان و غیر هم‌زمان عوامل کنترل بیولوژیک و بیماری‌زا، به‌ترتیب *Trichoderma harzianum* 6 و *T. viride* 10 با ۷۰ و ۵۲/۵۹ درصد بیشترین میزان بازدارندگی را روی رشد پرگنه‌ی عامل بیماری‌زا داشته‌اند. همچنین، آزمون ترکیبات فرار آن‌ها مشخص نمود که بیش‌ترین میزان بازدارندگی رشد پرگنه‌ی عامل بیماری‌زا (۳۱/۵ ٪) به *T. harzianum* 6 اختصاص داشته است. از طرف دیگر، نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی روی کارآیی عوامل باکتریایی کنترل بیولوژیک نشان داد که در آزمون تقابل و تولید ترکیبات فرار، بیش‌ترین میزان درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی عامل بیماری‌زا به‌ترتیب ۳۰/۵ و ۱۲/۳۷ درصد به *Bacillus* spp. 62 و *Bacillus* spp. 15 اختصاص داشته است. در بررسی ترکیبات مایع خارج سلولی قابل نفوذ در آگار، کلیه‌ی استرین‌های باکتری مورد مطالعه، مانع رشد پرگنه‌ی عامل بیماری‌زا گردیدند. در آزمایشات گلخانه‌ای مایه‌زنی گونه‌های تریکودرما و استرین‌های باکتری به‌صورت بذرمال استفاده شد. درصد گیاهان زنده در گلدان‌هایی که از استرین‌های *Bacillus* spp. و مخلوط بین گونه‌های *Trichoderma* spp. تیمار شده بودند و همچنین شاهد بدون عامل بیماری ۱۰۰ درصد بود. اما در سایر تیمارهای مورد استفاده نسبت به شاهد سالم از ۶۵/۲ تا ۷۹/۳۸ درصد متغیر بود.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، کنترل بیولوژیک، خربزه، *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.

مقدمه

بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Leach & Currenu) Snyder & Hansen می‌باشد که اولین‌بار در سال ۱۹۳۰ از ایالت‌های نیویورک و مینه‌سوتا گزارش گردید (Ashrafizadeh *et al.*, 2002). در سال ۱۹۳۸ توصیف و در سال ۱۹۴۰ اختصاصی بودن آن روی گونه‌ی *Cucumis melo* اثبات شد (Banihashemi, 2010). در ایران اولین‌بار در سال ۱۳۴۴ از مزرعه‌ی خربزه در حومه‌ی مشهد در استان خراسان رضوی جداسازی و گزارش شد (Banihashemi, 2010) *F. oxysporum* f. sp. *Melonis* تعداد زیادی از آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره‌ی سلولی را تولید می‌کند که شامل زیلانازها، سلولازها، پروتئازها، پکتات‌لیازها، اگزوپلی گالاکترونازها و اندوپلی گالاکترونازها می‌باشد این آنزیم‌ها مخصوصاً اندوپلی گالاکترونازها نقش مهمی در تجزیه‌ی هموگالاکترونان‌ها دارند که ترکیبات مهمی در دیواره‌ی سلولی گیاه هستند (Hibar *et al.*, 2007). در ارتباط با آنزیم‌های مؤثر در بیماری‌زایی قارچ *F.oxysporum* f. sp. *melonis* یک اگزوپلی گالاکتروناز را توسط روش Sephadex G-200, ion-exchang HPLC شناسایی کردند. این آنزیم دارای مقاومت در برابر دامنه‌ی

اسیدیته ۳/۵ تا ۶/۵ بوده و به شکل قابل توجهی اسید پلی گالاکترونیک را هیدرولیز می‌کند. فعالیت آن به روی پکتین تنها ۵ درصد می‌باشد و روی اندوآنزیم‌ها تأثیری ندارد (Martínez-Medina *et al.*, 2010).

تأثیر میسلیوم خشک (DME) وعصاره‌ی میسلیوم خشک مغذی (NDME) از قارچ *Penicillium chysogenum* را روی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* بررسی کرده و دریافتند که مقاومت القاء شده توسط DME، گیاهان خربزه را نه فقط بر ضد نژاد ۲ و ۱، بلکه بر ضد سه نژاد دیگر بیمارگر نیز محافظت می‌نماید (Covert *et al.*, 2001) مقاومت به پژمردگی فوزاریومی به‌طور معنی‌داری با بالاترین سطح فعالیت پراکسیداز در ارتباط بوده ولی با آزادسازی محتوای L-protein ارتباطی ندارد. بنابراین پراکسیداز ممکن است در مکانیزم دفاعی فعال شده توسط DME و NDME نقش داشته باشد (Burgess *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 2002). ایجاد مقاومت القائی توسط گونه‌های تریکودرما به‌وسیله‌ی القاء کننده‌های جاسمونات و سالسیلات طی فرآیند تولید پروتئین‌های وابسته به‌بیماری‌زایی شناسائی می‌شوند. این القاء کننده‌ها شامل کتینازهای ضدقارچی، گلوکانازها، آنزیم‌های اکسیداتیو از جمله پراکسیدازها، پلی‌فنول اکسیدازها و لیپوکسی ژنازها هستند. البته ترکیباتی با وزن مولکولی کم با خصوصیات میکروبی (فیتوآلکسین‌ها) در فرآیند ایجاد مقاومت القائی حضور دارند. القاءکننده‌های جاسمونات و سالسیلات باعث ایجاد مقاومت سیتمیک نسبت به‌انواعی از بیماری‌های گیاهی می‌شوند (Harman *et al.*, 2004). عراقی و همکاران گزارش کردند که ترشحات خارج سلولی گونه‌های باسیلوس خاصیّت پادزیستی داشته و از جوانه‌زنی و رشد میسلیومی کنیدیوم‌های فوزاریوم جلوگیری می‌کنند (Iraqi *et al.*, 2009). همینطور مشخص شده است که استرین‌هایی از *Bacillus subtilis* در حفاظت محصول در برابر فوزاریوم و رایزوکتونیا بسیار مؤثر بوده و به میزان زیادی رشد گیاه را افزایش داده‌اند (Schisler *et al.*, 2004). به‌گفته‌ی Zhang *et al.* (2009) باکتری گونه‌ی *B. subtillis* خاصیّت قارچ‌کشی دارد و می‌توان به‌عنوان پوشش بذری علیه پوسیدگی‌های ریشه بر اثر عوامل بیماری‌زا استفاده گردد تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر مایکوتوکسین، اتیورین آ، باسیلومایسین، باسلین و سابشپورین توسط گونه‌ی *B. subtilis* عامل اصلی و تعیین‌کننده در کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی توسط این باکتری است (Kim *et al.*, 1997). هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی آنتاگونیست‌های بومی علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

بررسی‌های آزمایشگاهی جداسازی و شناسایی *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*

بدین منظور از نمونه‌هایی که از گیاه خربزه واقع در منطقه‌ی تربت‌جام به‌دست آمده بود، استفاده شد. جداسازی و شناسایی نمونه‌ی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* براساس روش (Seifert, 1996) انجام شد.

جداسازی و شناسایی عوامل قارچی بیولوژیک (*Trichoderma* spp.)

بدین منظور از نمونه‌های خاک اطراف ریشه‌ی گیاه خربزه که از منطقه‌ی تربت‌جام جمع‌آوری شده بود، استفاده شد. جداسازی و شناسایی نمونه‌های *Trichoderma* spp. براساس روش (Samuels *et al.*, 2011) انجام شد.

جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی بیولوژیک (*Bacillus* spp.)

برای جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی بیولوژیک از نمونه‌های خاک اطراف گیاه خربزه که از منطقه‌ی تربت‌جام جمع‌آوری شده بود، استفاده شد. جداسازی و شناسایی نمونه‌های *Bacillus* spp. براساس روش (Shoda, 2000) انجام شد.

تعیین اثرات بازدارندگی *Trichoderma* spp. روی رشد پرگنه‌ی *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*

از آزمون کشت متقابل و بررسی ترکیبات فرار جدایه‌های *Trichoderma* spp. به شرح ذیل استفاده شد.

الف) آزمون کشت متقابل

در این بررسی از ۱۰ جدایه‌ی *Trichoderma* spp. استفاده شد. آزمایش به دو صورت کشت هم‌زمان جدایه‌ی تریکودرما با بیمارگر و کشت جدایه‌ی تریکودرما ۲۴ ساعت بعد از کشت بیمارگر انجام شد. برای انجام آزمایش از تشتک‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) استفاده شد. در یک طرف تشتک پتری به فاصله‌ی یک سانتی‌متری از لبه‌ی آن، یک قطعه‌ی ۵ میلی‌متری ازکشت پنج روزه‌ی بیمارگر و در سمت مقابل آن، قطعه‌ای از کشت دو روزه‌ی جدایه‌ی تریکودرما قرار داده شد (Ashrafizadeh *et al.*, 2002). برای شاهد، به جای قطعه‌ی حاوی جدایه‌ی تریکودرما، یک قطعه‌ی ۵ میلی‌متری محیط کشت PDA قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس داخل اتاقک رشد به‌مدت هفت روز نگهداری شدند. اندازه‌گیری قطر پرگنه‌ی بیمارگر از زمان کشت شروع و تا هفت روز ادامه یافت. سپس درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی بیمارگر توسط هریک از جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{Dt - Dc}{Dc} \times 100$$

که در آن Dt، قطر رشد پرگنه‌ی بیمارگر در هر تیمار و Dc، قطر رشد پرگنه‌ی بیمارگر در تیمار شاهد است.

این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد و برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح یک درصد استفاده شد.

ب) بررسی ترکیبات فرار

در این آزمایش نیز از ۱۰ جدایه‌ی *Trichoderma* spp. استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا قطعه‌ای به‌قطر پنج میلی‌متر از کشت دو روزه‌ی تریکودرما در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از حاشیه‌ی کشت پنج روزه‌ی قارچ عامل بیماری‌زا یک قطعه‌ی پنج میلی‌متری در وسط یک تشتک پتری دیگری قرار داده شد. با رعایت شرایط سترون درپوش تشتک پتری حاوی جدایه‌ی *Trichoderma* spp. و بیماری‌زا برداشته و تشتک پتری قارچ عامل بیماری‌زا به صورت وارونه روی تشتک پتری دیش حاوی آنتاگونیست قرار داده شد (Ashrafizadeh *et al.*, 2002). سپس فاصله‌ی بین دو تشتک پتری با نوار پارافیلم مسدود شد و در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شد. اندازه‌گیری به صورت روزانه انجام و تا هفت روز اینکار ادامه یافت. درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی عامل بیماری‌زا توسط ترکیبات فرار هریک از جدایه‌های تریکودرما مطابق روش شرح داده شده در بند الف محاسبه شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۴ تکرار صورت گرفت. برای مقایسه‌ی میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد استفاده شد.

تعیین اثرات بازدارندگی *Bacillus* spp. روی رشد پرگنه‌ی *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*:

در این مرحله، از آزمون‌های کشت متقابل و نشت در آگار به شرح ذیل استفاده شد.

الف) آزمون کشت متقابل:

در این آزمون، نمونه‌های به‌دست آمده از مرحله‌ی غربال‌گری، روی محیط کشت PDA با کشت چهار نقطه‌ای و قرار دادن یک قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه‌ی عامل بیماری در وسط تشتک استفاده شد. در کشت شاهد به جای باکتری یک قطره‌ی آب مقطر سترون قرارداده شد. کشت‌های یاد شده به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. این آزمون در طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. میزان بازدارندگی نمونه‌های باکتری از رشد پرگنه‌های بیمارگر با استفاده از فرمول درصد بازدارندگی محاسبه شد (Hagedorn *et al.*, 1989).

آزمون نشت در آگار

در این آزمون، ابتدا سوسپانسیون کدری از کشت جوان جدایه‌ی باکتری در آب مقطر سترون تهیه شد و سپس از آن، سوسپانسیونی با غلظت 1×10^{7} سلول باکتری در میلی‌لیتر آماده شد. در مرحله‌ی بعد، ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون روی محیط کشت PDA کشت شد و بعد از

پخش کامل آن به وسیله‌ی پیپت پاستور، به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. بعد از این مدت پرگنه‌های باکتری را از روی سطح پتری با آب مقطر سترون شسته، سپس پنبه‌ی سترون آغشته به کلروفرم را روی درب تشتک گذاشته و تشتک‌ها به مدت ۳۰دقیقه نگهداری شدند. سپس پنبه برداشته شده و یک حلقه به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه‌ی کشت جوان عامل بیماری در وسط آن گذاشته شد. سپس تشتک‌ها به مدت ۱۰روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Kraus & Loper, 1992). این آزمون در طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازدارندگی نمونه‌های باکتری از رشد پرگنه‌های بیمارگر با استفاده از فرمول درصد بازدارندگی محاسبه شد.

آزمون ترکیبات فرار ضد قارچی

ابتدا سوسپانسیونی به غلظت 1×10^{7} سلول باکتری در میلی‌لیتر از کشت جوان باکتری در آب مقطر سترون تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از آن روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آگار غذایی که دارای ۲ درصد گلوکز (NGA) بود، اضافه نموده و پخش شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. سپس از حاشیه‌ی کشت پنج روزه‌ی عامل بیماری، قطعه‌ای به قطر ۵ میلی‌متر در وسط تشتک محیط PDA قرار داده شد. در شرایط سترون، درپوش کشت باکتری و عامل بیماری برداشته شده و دو تشتک حاوی باکتری و عامل بیماری روی هم قرار داده شدند. سپس، با نوار پارافیلم فاصله‌ی بین دو تشتک مسدود شد. در شاهد به جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. کلیه‌ی تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Fiddaman & Rossall, 1993). این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار صورت پذیرفت و درصد بازدارندگی رشد پرگنه‌ی عامل بیماری‌زا محاسبه شد.

تهیه و تکثیر زادمایه جدایه‌های *Trichoderma* spp. و نحوه‌ی افزودن عامل آنتاگونیست به بذر در شرایط گلخانه

از ۱۰ جدایه‌ی تریکودرما، سه جدایه جهت استفاده در گلخانه انتخاب شد. برای تهیه‌ی زادمایه ابتدا مقدار ۱۵۰ گرم سبوس گندم به مدت ۲۴ ساعت در داخل پارچه‌ای ریخته و در داخل آب قرار داده شد. پس از گذشت این زمان داخل هر ارلن ۱۵۰ گرم سبوس ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در داخل اتوکلاو قرار داده شد. پس از سرد شدن ارلن‌ها به داخل هرکدام سه قرص پنج میلی‌متری از کشت سه روزه‌ی تریکودرما در شرایط سترون قرار داده شد و سپس در شرایط ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۲۱ روز قرار گرفت. بعد از این مدت محتویات ارلن‌ها را به داخل پاکت‌های کاغذی سترون منتقل و در دمای اتاق نگهداری،خشک و مقدار ۱۰ گرم از زادمایه‌ی تریکودرما به ازای هر کیلوگرم بذر گیاه خربزه رقم خاتونی اضافه شد. برای بهتر چسبیدن زادمایه تریکودرما به بذر گیاه خربزه مقدار ۴۰ گرم پودر صمغ عربی در یک لیتر آب مقطر استریل حل نموده و بذور گیاه خربزه به مدت چند دقیقه در این محلول غوطه‌ور گردید (Ashrafizadeh *et al*., 2002). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار در چهار تکرار در نظرگرفته شد. گلدان‌های حاوی یک بذر گیاه خربزه رقم خاتونی به داخل دستگاه ژرمیناتور در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی با دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۲ درجه‌ی سلسیوس منتقل شدند. گلدان‌ها به مدت ۷۰ روز در این شرایط نگهداری شدند. درصد بیماری‌زائی پس از گذشت ۵۰ روز محاسبه گردید. برای تعیین طول ساقه، از انتهای طوقه تا گره‌ی مربوط به آخرین دم‌برگ اندازه‌گیری شد. برای به‌دست آوردن وزن‌تر ساقه، ابتدا ساقه‌ها از محل طوقه بریده شده و سپس با استفاده از ترازوی دقیق وزن گردید. برای تعیین وزن خشک ساقه، هر بوته به‌طور جداگانه به داخل پاکت‌های کاغذی منتقل شد و سپس در داخل آون با دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. برای محاسبه‌ی وزن تر ریشه، ریشه‌ها همراه با خاک اطرف آن‌ها از خاک بیرون آورده شد و پس از شست‌وشو با جریان آرام روی حوله کاغذی قرار گرفت. سپس ریشه‌های

هر بوته به‌طور جداگانه در داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شد و در داخل آون با دمای ۷۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند.

تهیه و تکثیر استرین‌های *Bacillus* spp.

از پنج جدایه‌ی باکتری، دو جدایه برای استفاده در گلخانه انتخاب شد. برای تهیه‌ی زادمایه‌ی باکتری آنتاگونیست، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته‌ی نمونه، روی محیط NBY (Nutrient booth Yeast Extract) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد (Kim *et al.*, 1997). برای به‌دست‌آوردن تعداد واحد پرگنه‌ساز (CFU) هرتیمار یک گرم از خاک به‌همراه ریشه‌ی گیاه خربزه وزن کرده و در دمای محیط خشک شده و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط شدند. سپس در لوله‌های آزمایش ریخته و به‌مدت یک دقیقه در روی شیکر قرار داده شده و سپس سوسپانسیونی به‌رقت 10^{-7} تهیه شد. از این سوسپانسیون یک میلی‌لیتر برداشته و روی محیط کشت NA (Nutrient agar) پخش نموده، سپس تشتک‌ها تا ظهور پرگنه‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. سپس پرگنه‌های ظاهر شده را شمارش و CFU آن را در هرگرم از زادمایه محاسبه شد (Lumsden *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1986; Etebarian *et al.*, 2000). این آزمایش با گلدان‌های حاوی یک بذر در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار در چهار تکرار اجرا شد.

تهیه‌ی زادمایه عامل بیماری‌زا و نحوه‌ی افزودن عامل بیماری به خاک در شرایط گلخانه

برای تهیه‌ی زادمایه‌ی قارچ عامل بیماری ابتدا ۱۰۰گرم گندم در داخل فلاسک ارلن‌مایر ریخته و ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. ارلن‌ها طی مدت ۳۰دقیقه در دو روز متوالی سترون شده و پس از سرد شدن ارلن‌ها، در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل به هر کدام از ارلن‌ها شش قرص ۵ میلی‌متری از کشت جوان (سه روزه) قارچ عامل بیماری‌زا روی محیط کشت PDA اضافه شد. فلاکس‌های حاوی زادمایه اینوکلوم‌ها به‌مدت ۴ هفته در دمای ۲۵درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. بعد از این مدت محتویات ارلن‌ها را به داخل پاکت‌های کاغذی سترون منتقل و در دمای اتاق نگهداری، خشک و سپس آسیاب شدند. پودر به‌دست آمده به میزان ۱۵ گرم در یک کیلوگرم به خاک اضافه گردید. برای پر کردن گلدان‌ها از خاک مزرعه‌ی دو بار اتوکلاو شده با فاصله‌ی زمانی ۲۴ ساعت استفاده گردید. جهت سبک‌تر شدن این خاک به ازای هر ۵۰ کیلوگرم خاک اتوکلاو شده، یک بسته‌ی کوکوپیت پنج کیلوگرمی و پنج کیلوگرم پرلیت اضافه شد. در این مرحله، کوکوپیت ۲۴ ساعت قبل از استفاده در داخل آب قرار داده شد (Frommel *et al.*, 1991).

برای تعیین CFU (Cloni form unit) عامل بیماری در تیمارهای انجام شده پس از مایه‌زنی، در فاصله‌ی زمانی ۲۰،۴۰،۷۰ روز بعد از کاشت از هر تیمار یک گرم از خاک را وزن کرده و در دمای محیط خشک شده و با ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط شد. سپس در لوله‌های آزمایش ریخته و مدت یک دقیقه روی شیکر قرار داده شده و سپس سوسپانسیونی به رقت 10^{-4} تهیه‌شد. از این سوسپانسیون یک میلی‌لیتر برداشته و روی محیط کشت PPA پخش شد. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گفته شد. سپس تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس تا ظهور پرگنه‌ها نگهداری شدند. سپس پرگنه‌های ظاهر شده را شمارش و CFU آن را در هرگرم از زادمایه محاسبه گردید (Lumsden *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1986; Etebarian *et al.*, 2000).

نتایج

شناسایی گونه‌ی *Trichoderma viride*

شعاع پرگنه روی محیط کشت PDA بعد از ۶۵ ساعت در شرایط تاریکی در دماهای ۳۰،۲۰ و ۴۰ درجه‌ی سلسیوس به‌ترتیب ۵، ۵ و صفر میلی‌متر تعیین شد. کنیدیوم‌زائی روی محیط کشت PDA در تمام قسمت پرگنه ظاهر شد. کنیدیوم‌زائی در دمای ۳۰-۲۰ درجه‌ی سلسیوس متراکم بود. درحالی که در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس کنیدیوم‌زایی و رشدی صورت نگرفت. رنگ پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA سبز تیره بود. سطح زیرین پرگنه در دمای ۲۰ و ۳۰ درجه‌ی سلسیوس زرد کم رنگ بود.

کنیدیوم‌زائی به‌صورت دوایر متحدالمرکز بود که ابتدا حالت دایره‌ای را تشکیل داده و سپس داخل دایره به‌طور کامل پر می‌شد. کنیدی‌ها حالت برجسته داشتند که ابتدا به‌صورت نقاط سفید رنگ کوچکی ظاهر می‌شدند. سپس به رنگ سبز تیره در آمده و تمام سطح محیط را پوشانده و روی کنیدی‌ها را یک پوشش تارعنکبوت‌مانند می‌پوشاند. کنیدی‌ها دارای دیواره‌ی صاف به شکل گرد به طول و عرض و به ابعاد (۲/۷-۱/۳۵) ۲/۵×(۵/۴-۲/۷) ۳/۸ میکرون بودند. کلامیدوسپور به صورت انتهایی و گرد تشکیل شدند. کنیدیوفورها منشعب و شاخه‌های اصلی به‌صورت راست که انشعابات پیرامونی به‌صورت دوتائی از یک نقطه منشعب می‌شدند. انشعابات با محور اصلی تشکیل زاویه‌ی قائمه می‌داد. بندها در کنیدیوفورها به‌وضوح قابل رویت بودند. فیالیدها در پایه کمی عریض و در نوک کمی خمیده به‌شکل اشکی دیده می شدند. فیالیدها به ابعاد (۲/۷-۴/۰۵)۳/۳×(۱۰/۸-۸/۱)۹/۵ میکرومتر بودند. آن‌ها به‌طور معمول در انتها به‌صورت ۳ تایی ولی روی کنیدیوفور به‌صورت تکی نیز مشاهد شدند. از پرگنه‌ها بوی قارچ خوراکی متصاعد می‌شد. میسلیوم‌ها بی رنگ و هوائی داری دیواره‌ی صاف به عرض (۴/۰۵-۲/۷)۳/۵ میکرومتر بودند. طبق بررسی‌های ظفری و همکاران (۱۳۸۱) این گونه از ایران تا کنون گزارش نشده بود. اما در تحقیقات مختلف از این گونه نام برده شده است (Zafari *et al*., 2002).

گونه‌های *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* با مشخصات توصیف شده توسط ظفری و همکاران (۱۳۸۱) هم‌خوانی داشتند (Zafari *et al*., 2002).

اثر گونه‌های تریکودرما روی رشد *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*

جدایه‌های مورد بررسی با توجه به رشد سریعی که داشتند، مانع رشد عامل بیماری‌زا شدند. به‌جز جدایه‌های 2 *T. viride* و 10 *T. viride* که روی کلنی عامل بیماری‌زا پیشروی کردند. دیگر جدایه‌ها هیچ کدام روی کلنی عامل بیماری‌زا پیشروی نکردند. در محل برخورد جدایه‌های تریکودرما و عامل بیماری‌زا رشد میسلیوم‌های آن‌ها بسیار کم و اندک شده بود و به‌صورت یک لایه‌ی نازک مشاهد شد. همچنین در این محل میزان اسپور عامل بیماری‌زا کاهش پیدا کرده بود. در کشت هم‌زمان عامل بیماری‌زا و گونه‌های تریکودرما به‌غیر از گونه‌ی 5 *T. asperellum* دیگر گونه‌ها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. گونه‌ی 6 *T. harzianum* با ۷۰ درصد و *T. asperellum* با ۷/۸ درصد به‌ترتیب بیشترین و کمترین درصد کاهش رشد عامل بیماری‌زا شدند. در کشت غیرهم‌زمان با عامل بیماری‌زا، کشت ۲۴ ساعت زودتر عامل بیماری‌زا تمام گونه‌های تریکودرما اختلاف معنی‌داری با شاهد مشاهده شد. جدایه‌ی 10 *T. viride* با ۵۲/۵۹ درصد باعث کاهش رشد عامل بیماری‌زا شد (جدول ۱).

بررسی متابولیت‌های فرار گونه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*

در این بررسی گونه‌ی 4 *T. konnjgii* با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت، ولی سایر جدایه‌های تریکودرما با شاهد در سطح یک احتمال درصد اختلاف معنی‌داری داشتند و باعث کاهش رشد مسلیوم عامل بیماری‌زا شدند. گونه‌ی 6 *T. harzianum* با ۵/۳۱ درصد باعث کاهش رشد عامل بیماری‌زا شدند. در هیچ کدام از جدایه‌ها ترکیبات فرار باعث کاهش اسپوردهی در عامل بیماری‌زا نشدند (جدول ۱).

اثر استرین‌های باسیلوس روی *F. oxysporum* f. sp *melonis* با روش کشت متقابل

از ۱۵۶ استرین باکتری جدا شده از فرا ریشه‌ی خربزه براساس آزمون کشت متقابل و مشاهد هاله بازدارندگی، تعداد ۵ استرین نسبت به خاصیت بازدارندگی نشان دادند. در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. استرین *Bacillus*. spp.1، *Bacillus* spp. 2 و *Bacillus* spp. 3 به‌ترتیب با ۶۱/۸۷ ، ۶۲/۲۵ و ۶۲/۸۷ بیشترین درصد کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری باعث شدند، در استرین‌های *Bacillus* spp. 4 و *Bacillus* sp. 5 به‌ترتیب با ۵۱/۲۵ و ۵۵/۲۵ کمترین درصد کاهش رشد پرگنه عامل بیماری مشاهده شد (جدول۲).

جدول ۱- درصد بازداری از رشد مسیلیوم قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* نسبت به شاهد در کشت متقابل با آنتاگونیست‌ها پس از ۱۶۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس.

Table 1– Percentage of growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in dual culture antagonistic after 168h after inoculation at 25ºC.

species *Trichoderma*	volatile compounds	dual culture un simultaneous	dual culture simultaneous
T. longibrachiatum1+	25.00de	44.82cd	59.22c
T. viride2	27.40def	48.27ed	57.28c
T. stromacium3	23.55d	43.96cd	61.16cd
T. konnjgii4	5.36ab	45.68cd	60.19cd
T. asperllum5	11.05bc	10.34b	7.8ab
T. harzianum6	31.50f	43.24cd	70.00d
T. longibrachiatum7	26.92def	43.24cd	60.19cd
T. harzianum8	26.92def	47.41cde	60.19cd
T. asperellum9	14.42c	10.34b	11.65b
T. viride10	30.76ef	52.29e	59.22c

*تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون LSD در سطح $P < 0.01$ دارای اختلاف معنی داری هستند.

+ شماره ایزوله مورد استفاده شده می باشد

*Significant differences are denoted by different letters within each column at p<0.01 according to LSD test

+ The number is used to isolate

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین درصد کاهش رشد *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* بر اثر استرین‌های مختلف *Bacillus* spp. در شرایط آزمایشگاهی.

Table 2- Comparison the effect of different isolates of *Bacillus* spp. on percent of growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis in vitro* condition.

Treatment	metabolites were able to influence into the agar	volatile compounds	dual culture
Bacillus 1+	100b	8.28ab	16.10a
Bacillus 2	100b	8.87ab	15.59a
Bacillus 3	100b	12.73b	14.75a
Bacillus 4	100b	12.42b	30.50b
Bacillus 5	100b	14.50b	28.08b

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون LSD در سطح $P < 0.01$ دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

+ شماره‌ی ایزوله مورد استفاده شده می‌باشد.

*Significant differences are denoted by different letters within each column at p<0.01 according to LSD test.

+ The number is used to isolate

اثر ترکیبات فرار تولید شده به‌وسیله‌ی استرین‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاه

استرین‌های *Bacillus* spp. 3، *Bacillus* spp. 4 و *Bacillus* spp. 5 به‌ترتیب با ۳۶/۸۷، ۳۷ و ۳۶/۱۲ درصد باعث کاهش رشد عامل بیماری‌زا شدند و اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند ولی بین استرین‌های دیگر به‌کار برده شده با عامل بیماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۲).

ترکیبات قابل نفوذ در آگار

متابولیت‌های بازدارنده‌ی خارج سلولی قابل نفوذ در آگار تمام استرین‌ها مانع از رشد عامل بیماری‌زا نسبت به شاهد شدند. در همه‌ی استرین‌ها، عامل بیماری‌زا قادر به رشد نبود و زمانی که قطعه‌ی اولیه به محیط جدیدی انتقال داده شد نیز رشدی صورت نگرفت که احتمالاً این استرین‌ها خاصیت قارچ کشی دارند (جدول ۲).

تأثیر جدایه‌های تریکودرما و باسیلوس به‌صورت جداگانه و توأم روی *F. oxysporum* f.sp *melonis* و برخی صفات رویشی خربزه

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که بین تیمارهای آزمایشی باکتری و تریکودرما با اطمینان ۹۹ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد. در تیمار شاهد آلوده که فقط زادمایه عامل بیماری استفاده گردید، باعث ۱۰۰ درصد مرگ گیاهچه‌های خربزه شد. بیشترین درصد تعداد گیاهان سالم در تیمارهای استرین‌های *Bacillus* spp. و ادغام بین گونه‌های *Trichoderma* spp. مشاهده شد. کمترین درصد تعداد گیاهان سالم در تیمار *Bacillus* spp. 62 به‌همراه *T. harzianum* به میزان ۶۵/۲ درصد مشاهده شد. این نتایج

بیانگر این است که در تیمار مخلوط گونه‌ی *Bacillus*. spp. 15 و گونه‌ی تریکودرما *T. longibrachiatum* به‌کار برده شده بود، با ۸۵/۹۵ درصد بیشترین تأثیر بر افزایش رشد طولی ساقه‌ی گیاه خربزه دارد. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که بیشترین تأثیر بر افزایش وزن قسمت‌های هوایی و همچنین بیشترین تأثیر بر افزایش وزن‌تر ریشه، مربوط به‌مخلوط دو گونه‌ی *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* می‌باشد. بیشترین تأثیر بر وزن خشک ساقه مخلوط دوگونه‌ی *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* و مخلوط سه گونه تریکودرما *T. longibrachiatum,T. harzianum* و *T. viride* و دو گونه‌ی باکتری *Bacillus* spp. 15 و *Bacillus* spp. 62 مشاهده شد. بیشترین تأثیر بر اقزایش وزن خشک ریشه‌ی گیاه توسط باکتری *Bacillus* spp. 15 مشاهده شد. نتایج حاصل نشان می‌دهد با اینکه سموم به کار برده شده باعث کاهش بیماری شده‌اند و با شاهد اختلاف معنی‌داری دارند، ولی در مقایسه با سایر تیمارها تأثیر کمتری بر افزایش رشد طولی ساقه و وزن‌تر و خشک گیاه خربزه داشته‌اند.

جدول ۳- مقایسه‌ی میانگین‌های فاکتورهای مورد ارزیابی در بررسی تأثیر گونه‌های *Trichoderma* spp. و استرین‌های *Bacillus* spp. علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* در آزمون گلخانه‌ای پس از ۷۰ روز.

Table 3- Mean compassion of the evaluated factors in study of the effect of *Trichogramma* spp. and *Bacillus* spp. Against *Fusarium axytsporum f.* sp. *melonis* in greenhouse after 70 days.

Treatments	%healthy plant	Root dry weight (gr)	Shoot dry weight (gr)	Root fresh weight (gr)	Shoot fresh weight (gr)	Length (cm)
Infected control*	00e	00e	0.32abc	00c	1.23e	62.25abcd
Non-Infected control+	100a	0.04bcd	0.46abc	0.45ab	5.89a	62.55abcd
Benomyl	76.25b	0.01cde	0.23bc	0.19abc	2.34cde	50.95bcde
Mancozeb	71.2bcd	0.03cde	0.16bc	0.25abc	1.87de	47.05cde
Bacillus spp. 15□	100a	0.08a	0.55ab	0.34abc	4.57abc	62abcd
Bacillus spp. 62	100a	0.04bcd	0.30abc	0.48ab	3.09bcde	64.70abcd
T. viride,	73.78bcd	0.01cde	0.31abc	0.22abc	3.19bcde	55.13abcde
T. harzianum	65.2cd	0.04bcd	0.33abc	/0.40ab	2.82bcde	53.40abcde
T. longibrachiatum	66.2bcd	0.02cde	0.30abc	0.32abc	2.75bcde	74.05abc
Bacillus spp. 15, *B.* spp. 62	100a	0.03cde	0.42abc	0.26abc	4.00abcd	82.55ab
Bacillus spp. 15, *T. viride*	79.38bc	0.03cde	0.42abc	0.43ab	3.69abcde	49.53bcde
Bacillus spp. 15. *T. harzianum*	74.54bc	0.03cde	0.39abc	0.34abc	3.10bcde	68.70abc
Bacillus spp. 15, *T. longibrachiatum*	100a	0.05abc	0.40abc	0.41ab	4.43abcd	85.95a
Bacillus spp. 62, *T. viride*	71.25bcd	0.01cde	0.34abc	0.35abc	0.29bcde	48.93bcde
Bacillus spp. 62, *T. harzianum*	65.2cd	0.02cde	0.14c	0.17bc	1.30e	23.83e
Bacillus spp. 62, *T. longibrachiatum*	72.46bcd	0.02cde	0.34abc	0.24abc	2.66dce	34.13de
T. viride, T. harzianum,	67.8bcd	0.01cde	0.23bc	0.14bc	2.26cde	61.23abcd
T. viride, T. longibrachiatum	100a	0.02cde	0.37abc	0.24abc	3.23bcde	60.90abcd
T. harzianum, T. longibrachiatum	100a	0.06a	0.63a	0.54a	5.30ab	82.40ab
Bacillus spp. 15, *Bacillus* spp. 62, *T. viride, T. harzianum, T. longibrachiatum*	100a	0.04 bcd	0.58a	0.45ab	4.76abc	63.83abcd

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون LSD در سطح $P < 0.05$ دارای اختلاف معنی داری هستند.

* خاک آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* فاقد سایر آنتاگونیست‌ها است.

+ فقط خاک استریل شده است.

□ شماره ایزوله مورد استفاده شده می باشد

Significant differences are denoted by different letters within each column at p<0.01 according to LSD test.

* Soil whit *Fusarium oxusoprum f.sp melonis* nad nun antagonist

+ Sterile soil nun pathogen and nun antagonist

□ The number is used to isolate

تعیین جمعیّت *Trichoderma* spp. در پایان دوره‌ی آزمایش

در ابتدای دوره‌ی زادمایه‌ی تریکودرما برای *T. viride, T. harzianum* و *T. longibrachiatum* به‌ترتیب ۵×۱۰^{۴}CFU، ۶×۱۰^{۴} و ۵×۱۰^{۴} در ۳ عدد بذر انتخابی تعیین شد. برای تعیین جمعیّت گونه‌های تریکودرما در پایان دوره از هر تیمار مقدار یک گرم وزن نموده و با استفاده از سری رقت‌ها به‌ترتیب ۲×۱۰^{۴} CFU، ۳×۱۰^{۴} و ۳×۱۰^{۴} تعیین شد.

تعیین جمعیّت زادمایه عامل بیماری در خاک

در زادمایه قارچ عامل بیماری‌زا ۷×۱۰^{۵} CFU در هر گرم از ماده تلقیح تعیین شد. برای تعیین جمعیّت عامل بیماری‌زا در خاک پس از پایان دوره‌ی آزمایش مقدار یک گرم از خاک را وزن نموده و با استفاده از سری رقت‌ها مقدار زادمایه عامل بیماری‌زا ۴×۱۰^{۴} CFU در هر گرم خاک مشخص شد.

بحث

در بررسی‌های ماکروسکوپی مشاهده شد، قارچ تریکودرما نسبت به *F oxysporum* f. sp. *melonis* رشد بیشتری دارند و مانع از رشد عامل بیماری‌زا شده است. در کشت متقابل جدایه‌های تریکودرما و عامل بیماری‌زا مشاهده شد که گونه‌های *T. viride* 2 و *T. viride* 10 باعث پیشروی روی کلنی عامل بیماری‌زا شدند. ولی سایر گونه‌ها روی کلنی عامل بیماری‌زا رشد نکردند. گونه‌ی *T. Harzianum* 6 با ۷۰ درصد بیشترین درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری‌زا را داشت. می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌های به‌کار برده شده تولید ترکیبات خارج سلولی نموده که این ترکیبات خاصیت آنتی‌بیوتیکی داشته و از رشد و فعالیت قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه جلوگیری می‌کند.

استرین‌های *Bacillus* spp. به‌کاربرده شده در این تحقیق براساس آزمون کشت متقابل با عامل بیماری‌زا و مشاهده‌ی هاله بازدارندگی انتخاب شدند و از بین ۱۵۶ استرین باکتریائی ۵ استرین جدا سازی شد و همه‌ی آن‌ها گرم مثبت بودند. قابل ذکر است که تمامی استرین‌ها از خاک اطراف ریشه‌ی گیاه خربزه جداسازی شدند.

در آزمون کشت متقابل استرین‌های یاد شده سبب کاهش رشد میسلیوم عامل بیماری‌زا شدند و ایجاد هاله بازدارندگی نمودند. تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. در بررسی‌های ماکروسکوپی تقابل استرین‌های باکتری با استفاده از کشت متقابل مشاهده شد که استرین‌های باسیلوس‌های جداسازی شده از ریشه‌ی گیاه خربزه رشد *F oxysporum* f. sp. *melonis* را محدود ساخته و به‌نظر می‌رسد استرین‌های یاد شده قادر به تولید ترکیبات خارج سلولی بوده و از رشد میسلیوم‌های قارچی جلوگیری می‌کند. ترکیبات خارج سلولی تولید شده توسط استرین‌های باسیلوس خاصیت آنتی‌بیوتیکی داشته و باعث جلوگیری از رشد ریسه‌های قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی شده‌اند. تمام استرین‌ها با تولید متابولیت‌های خارج سلولی قابل نفوذ در آگار نسبت به شاهد روی عامل بیماری‌زا تأثیر گذاشته و از رشد عامل بیماری‌زا جلوگیری کردند. تحقیقات زیادی در مورد ترکیبات خارج سلولی موجود در ترشحات مایع برون سلولی ایزوله‌های *Bacillus* spp. صورت گرفته است که مشخص شده است یکی از مهمترین ترکیبات آن‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (Fiddaman & Rossall, 1993). می‌توان گفت که این مواد مایع قابل نفوذ در آگار خاصیت قارچ‌کشی داشته و مانع از رشد قارچ پژمردگی فوزاریومی خربزه شده‌اند. ترکیبات فرار تمام جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند. بازداری از رشد پرگنه قارچ‌ها توسط جدایه‌های *Bacillus* spp. علاوه بر تولید آنتی بیوتیک، مکانیسم دیگری را تحت عنوان ترکیبات فرار ضد قارچی دارند که سنتز آن‌ها توسط گلوکز اداره می‌شود. چنین قندهایی بیان ژنی را که دارای خواص ضد قارچی هستند، افزایش می‌دهند (Fiddaman & Rossall, 1993).

نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد (جدول۳) که کاربرد آنتاگونیست‌های باکتریای و قارچی سبب تولید متابولیت‌های خارج سلولی گردیده که به صورت مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند. به این

صورت که آنتاگونیست‌ها باعث جذب بهتر آب و عناصر غذائی توسط گیاه می‌شوند. همچنین آن‌ها فضای اطراف ریشه را احاطه کرده و باعث جلوگیری از رشد و استقرار عامل بیماری‌زا روی ریشه و مانع نفوذ عامل بیماری‌زا به داخل گیاه می‌شوند. به‌طوری که این عوامل آنتاگونیست از مواد روی ریشه که توسط گیاه ترشح می‌شود، استفاده می‌کنند که این خود نیز مانع از مصرف مواد ترشح شده ریشه توسط عامل بیماری‌زا می‌گردد. در نتیجه گیاه زمانی که از وضعیت بهتری در جذب آب و مواد غذایی برخوردار باشد، باعث افزایش عملکرد در ارگان‌های تکثیری می‌شود. در تیمارهای به کاربرده شده تیمار *Bacillus* spp. 15 و *T. longibrachiatun* با ۸۵/۹۵ درصد بیشترین اثر در افزایش رشد طولی ساقه‌ی گیاه خربزه داشت. در خصوص افزایش وزن تر اندام‌های هوایی و وزن خشک ریشه‌ی گیاه خربزه تیمار *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* به‌ترتیب با ۵/۳۰ و ۰/۰۶ درصد بیشترین تأثیر را بر افزایش وزن تر اندم‌های هوایی و خشک ریشه گیاه خربزه داشته است. در تیمارهایی که از سموم شیمیایی استفاده شد، باعث کاهش بیماری گردید. ولی هیچ کدام باعث افزایش رشد طولی ساقه و وزن تر خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ی گیاه خربزه نشدند. با توجه به آنالیز داده‌های به‌دست آمده از آزمایش گلخانه‌ای چنین استنباط می‌شود که باکتری‌ها و گونه‌های قارچ تریکودرمای به کاربرده شده یک ارتباط مستقیم با گیاه دارند. این‌ها باعث جذب بهتر آب و عناصری که به‌صورت غیر قابل جذب برای گیاه هستند، می‌شوند و حتی می‌توان اظهار نمود که کنترل بیمارگرهای گیاهی فعالیت ثانویه این آنتاگونیست‌ها در رقابت با آن‌ها است. به نظر می‌رسد به‌دلیل استقرار زودتر عوامل آنتاگونیست و همچنین تولید متابولیت‌های خارج سلولی که خاصیت ضدقارچی دارند، از استقرار عامل بیماری‌زا جلوگیری و باعث جلوگیری از نفوذ به داخل گیاه می‌شوند.

کنترل بیماری‌های گیاهی توسط تریکودرما بر مبنای تعاملات پیچیده بین این عامل بیوکنترل، پاتوژن و گیاه میزبان رخ می‌دهد. این گونه‌ها قادرند از طریق رقابت برای مواد غذایی، ترشح متابولیت‌های ضد قارچی فرار و غیره فرار و ایجاد تغییرات مرفولوژیکی از جمله حلقه‌هایی در اطراف میزبان و تشکیل ساختارهایی شبیه به آپرسوریوم فعالیت بیولوژیکی خود را انجام دهند (Harman *et al.*, 2004). اتصال قارچ تریکودرما به قارچ میزبان از طریق کربوهیدرات‌های موجود در دیواره‌ی سلولی قارچ تریکودرما به لکتین میزبان صورت می‌گیرد. در طی تماس مستقیم تریکودرما با عامل بیماری‌زا لکتین‌های موجود در دیواره‌ی سلولی میزبان (عامل بیماری‌زا) حلقه‌ای شده و این ساختارهای حلقه مانند را در قارچ مایکوپارازیت القاء می‌کنند. بنا براین باعث پیچیده شدن ریسه‌ی قارچ عامل بیوکنترل به دور ریسه‌ی قارچ عامل بیماری‌زا می‌شوند (Harman *et al.*, 2004). در زمان ایجاد آپرسوریوم روی قارچ هدف تریکودرما قادر به نفوذ مستقیم در قسمت تیغه‌ی میانی قارچ عامل بیماری‌زا است. فعالیت میکوپارازیتی این گونه‌ها شامل نفوذ به داخل دیواره‌ی قارچ عامل بیماری‌زا و استفاده از محتویات سلولی آن از طریق تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده از جمله کیتینازها، گلوکانازها و پروتئازها صورت می‌گیرد. ترشح این آنزیم‌های قبل از تماس عامل بیولوژیک با بیماریگر صورت گرفته و در این زمینه نقش مهمی را ایفا می‌کنند. این فعالیت‌های ترکیبی باعث شکسته شدن دیواره‌ی سلولی قارچ هدف و پارازیته شدن آن می‌شود (Howell, 2003).

References

Ashrafizadeh. A., Etebarian, H. & Zamanizadeh, H. 2002. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. Iranian Journal of Plant Pathology, 41(1): 39-57.

Banihashemi, Z. 2010. Reaction of *Cucumis melo* cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* the cause of melon vascular milt. Iranian Journal of Plant Pathology, 46(1): 11-22.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. & Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research. 3rd Edition, Department of Crop Science, University of Sydney/Royal Botanic Gardens.

Chang, Y.C., Chang, Y.C., Baker, R., Kleifeld, O. & Chet, L. 1986. Increased growth of plant in presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease, 70:145-148.

Covert, S.F, Kapoor, P., Lee, M., Briley, A. & Naim, C.J. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. Mycological Research, 105(3): 259-264.

Etebarian, H.R., Scott, E.S. & Wicks, T.J. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for Phytophthora erythrosptica. European Journal of Plant Pathology, 106(4): 329-337.

Fiddaman P.J. & Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, 74(2): 119-126.

Frommel, M.I., Pazos, G.S. & Nowak, J. 1991. Plant-growth stimulation and biocontrol of Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) by inoculation of tomato seeds with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas* sp. Fitopathologia, 26(2): 66-73.

Hagedorn. C., Gould, W.D. & Bardinelli, T.R. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology, 55(11):2793–2797.

Harman, G.E., Howell, C.R., Virerbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2: 43-56.

Hibar, K., Daami-Remadi, M., & El-Mahjoub, M. 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.

Hirai, G., Nakazumi, H., Yagi, R. & Nakano, M. 2002. Fusarium wilt race l,2y resistant melon (*Cucumis melo*) rootstock cultivars 'DODAI No.l' and 'DODAI No.2'. Acta Horticulturae, 588:155-160.

Howell, C.R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of plant Diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87(1): 4-10.

Iraqi, M.M., Rahnama, K. & Taghinasab, M. 2009. A survey on biocontrol of Rhizoctoia solani Kuhn damping-off of tomato with *Bacillus subtili*. Journal of Plant Production, 16(3):186-191.

Kim, D.S, Weller D.M. & Cook, R.J. 1997. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R(12) and *Pseudomonas fluorescens* 2-70RN(10) in the rhizosphere of wheat. Phytopathology, 87(5): 559-564.

Kraus, J. & Loper, J.E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Phytopathology, 82: 264-271.

Lumsden, R.D. & Locke, J.C. 1989. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultuimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. Phytopathology, 79: 361-366.

Martínez-Medina, A., Pascual, J.A., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A. & Roldán, A. 2010. *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. Phytopathology, 100: 682-688.

Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F. & McCray, E.B. 2011. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. From: /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. & Jackson, M.A. 2004. Formulation of Bacillus spp. for biological control of plant diseases. Phytopathology 94:1267-1271.

Seifert, K.A. 1996. Fuskey Fusarium Interactive key Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch, Eastern Cereal and Oilseed Research Centre, Ottawa.

Shoda, M., 2000. Bacterial control of plant disease. Journal of Bioscience and Bioengineering, 89(6): 515-521.

Zafari, D., Ershad, J., Zare, R. & Alizadeh, A. 2002. A contribution to the identification of Trichoderma species in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 38(1-2): 21-45.

Zhang, J.X., Xue, A.G. & Tambong, J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel Bacillus subtilis strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum.* Plant Disease, 93(12):1317-1323.

Evaluation of efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates in biological control of melon fusarium wilt

Sajad Norouzi[1], Kamran Rahnama[1], Hojjatalah Rabbani nasab[2], Misam Taqi nasab[1]

1-Department of plant protection, college of crop sciences, Uni. of Gorgan, Iran

2-Research Center of Agricultural and Natural Resources of Khorasan shomali, Bojnord

Corresponding author: Sajad Norouzi, e-mail: sajad.nurozei89@gmail.com

Received: Jan. 14, 2013 **2 (1) 43-55** **Accepted: July. 14, 2014**

Abstract

Three isolates of *Trichoderma* spp. (*T. harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. viride*) and two isolates of Bacillus bacteria were evaluated in biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *meloni*, the causal agent of Fusarium wilt disease of melon in the laboratory and greenhouse conditions. Dual culture, antimicrobial metabolites, and volatile metabolites were used in *In vitro* assay. Fungal pathogen colony area was recorded, compared with control and induced inhibition of growth was determined. A greenhouse experiments was also performed to test the efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates in biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. This experiment displayed the antagonistic ability using dual culture simultaneous and dual culture non-simultaneous assays against fungal pathogen. Results showed that *Trichoderma harzianum* 6 with 70% and *T. viride*10 with 52.9 reduction in the growth of fungal pathogen were the most efficient isolates respectively in comparison with the control. Results of dual culture assays also indicated that *Bacillus* 62 with 30.5%, in volatile metabolite test, *Bacillus* 15 whit 12.37% and cell free culture test of Bacillus with 100% , were the most efficient in reducing mycelia growth of pathogenic fungus. Percent survival of the melon plants in pots treated with a mixture of both Bacillus, and Trichoderma isolates and healthy control was 100. However, the number of survived plants in other treatments varied from 65.2 to 79.38%. The above results were obtained statistically by mean comparison at 1% probability level using LSD test.

Keyword: Biocontrol, Fusarium Wilt, Melon, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.