بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۸ / شماره ۲ / سال ۱۴۰۱: ۹۵-۷۷ DOI: 10.22034/ijpp.2023.1989251.400

CC BY

مقاله پژوهشی

بررسی اثر متقابل برخی جدایه‌های جهش یافته تریکودرما و قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر کاهش پژمردگی فوزاریومی خیار در گلخانه

آزاد لاوا[۱]، ولی اله بابایی زاد[۲]، محمد علی تاجیک قنبری[۳] و سمیرا شهبازی[۴]**

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۸)

چکیده

هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثرمتقابل موتانت‌هایی از دو گونه *Trichoderma koningii* و*T. Virens* وقارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر خیار آلوده به بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) و ارزیابی تاثیر متقابل آنها بر شاخص‌های رشدی در گیاه خیار است. جدایه‌های والد تریکودرمای برتر با آزمون کشت متقابل (*T.koningii* NAS-108 با ٪۵۰ و *T.virens* NAS-115 با ۳۳٪ ممانعت از رشد بیمارگر) انتخاب شده و سوسپانسیون اسپور آنها با غلظت 10^6 (اسپور در میلی لیتر) در دامنه دز ۲۵۰ گری با پرتوگاما پرتوتابی شد. موتانت‌های NARS-TKM101 با ٪ ۲۰ و NARS-TviM112 با ٪۱۰۰ افزایش قدرت آنتاگونیستی نسبت به والد خود، بالاترین توانایی آنتاگونیستی را از خود نشان دادند. این موتانت‌ها، به همراه جدایه‌های والدشان برای ارزیابی‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. تیمار های توام دو قارچ *تریکودرما* (والد و موتانت) و *P. indica* بهترین کارایی را بر روی شاخص‌های طول و وزن خشک (اندام هوایی و ریشه) گیاهچه‌ها داشته و تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ با گیاهان شاهد نشان دادند. اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ بین جدایه‌های موتانت وجدایه_های والد در کاهش شاخص وقوع بیماری مشاهده نشد اما تیمارهای توام دو قارچ تریکودرما (والد و موتانت) و *P. indica*، منجر به کاهش معنی‌دار شاخص شدت بیماری در سطح ۵٪ در گیاهان آلوده به *Forc* در مقایسه با قارچ‌کش کاربندازیم شد.

واژه های کلیدی: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ، **آنتاگونیست، اندوفیت، کنترل زیستی، پرتوگاما، جهش یافته.**

---

* این مقاله بخشی از تز دکتری تخصصی نویسنده اول است.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: samira.shahbazi.aeoi@gmail.com

۱دانش آموخته دکتری تخصصی بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

۲دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

۳دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

۴دانشیار گروه گیاهپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کرج، ایران.

DOI: 10.22034/ijpp.2023.1989251.400

Research Article

Investigating the interaction of some mutated strains of Trichoderma species and Piriformospora indica on Fusarium wilt of Cucumber in greenhouse

A. Lava[1] , V. Babaeizad [2], M. A. Tajik Ghanbari[3], S. Shahbazi[4]**

(Received: 19.02.2023; Accepted: 8.5.2023)

Abstract

The aim of this study was to investigate the interaction effects of two *Trichoderma* spices (*T.koningii* and T. *virens*) mutants and the fungal endophyte *Piriformospora indica* on infected cucumber plants caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (Forc) and evaluating their mutual influence on growth factors in cucumber plants.The efficient wild-type Trichoderma isolates were selected by dual-culture test (*T.koningii* NAS-108 with 50% and *T.virens* NAS-115 with 33% inhibition of pathogen growth) and their spore suspension at concentration of 10^6 (spore/ml) was irradiated in a dose range of 250 Gy with gamma rays. NARS-TKM101 and NARS-TviM112 mutants showed highest antagonistic activity by 20% and 100% increase compared to their wild-type strains and were then used for greenhouse evaluations together with their wild-type strains,. The combined treatments of *Trichoderama* (total wild types and total mutants) with *P. indica* showed the most positive effects on length and dry weight of seedlings of (stem and root). No significant difference was observed between un-irradiated and mutant strains of *Trichoderma* in reducing disease index, ($p \leq 5\%$), but the combined treatments of *Trichoderma* (total mixed *Trichoderama* wild types and total mutants) with *P. indica* led to significant reduction of disease index ($p \leq 5\%$) in the plants infected with *Forc* compared with carbendazim fungicide.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, Antagonist, Endophyte, Biologic control, Gamma ray, Mutant.

*This article is a part of the PhD thesis of the first author.

**Corresponding Author, Email: samira.shahbazi.aeoi@gmail.com
1 Plant Protection Department, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, Iran
2 Plant Protection Department, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, Iran
3 Plant Protection Department, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, Iran
4 Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Alborz, Iran.

مقدمه

قارچ *Fusarium oxysporum* یک قارچ خاکزاد با پراکنش جهانی می‌باشد. برخی از جدایه‌های این قارچ بیماری‌زا و برخی دیگر از آنها برای گیاهان مفید می باشند(Di pietro, 2003). پوسیدگی ریشه و ساقه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) از جمله عوامل بیمارگر محدود کننده تولید خیار در کشور است. در ایران در سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ این بیماری در گلخانه‌های جیرفت، یزد و ورامین مشاهده و گزارش شد و اکنون به عنوان مهم‌ترین بیماری خیار گلخانه‌ای در کشورشناخته می‌شود. بر اساس مشاهدات و بررسی‌های انجام شده در کشور میزان آلودگی در برخی گلخانه‌ها تا حدود صد درصد روی ارقام حساس دیده شده است ولی به طور معمول میزان آلودگی بین ۲۰ تا ۶۰ درصد است (Shahriari and Zare, 2006). با توجه به اینکه قارچ *F. oxysporum* ماهیت خاکزاد دارد و حتی در غیاب میزبان نیز قادر به بقا برای مدتی طولانی می باشد، کنترل این عامل بیمارگر همواره با مشکل مواجه بوده است. برای مقابله با این مشکل معمولا از روش‌های تلفیقی از عملیات زراعی، استفاده از ارقام مقاوم به بیماری، استفاده از قارچ‌کش های شیمیایی و ترکیبات زیستی برای کنترل این بیماری استفاده می شود (Cohen *et al.*, 2015). از بین عوامل پرکاربرد در کنترل زیستی *فوزاریوم*، گونه‌های *تریکودرما* از مهمترین قارچهای خاکزی هستند، که به دلیل توانایی آنتاگونیستی علیه دامنه وسیعی از بیمارگرهای گیاهی خاکزاد (قارچی، باکتریایی و نماتدی) (Feyisa *et al.*, 2015) و بیماریهای هوازاد (Woo *et al.*, 2014) و بذرزاد (Tapwal *et al.*, 2015) مورد توجه هستند. گزارشات مختلفی مبنی بر توانایی گونه‌های مختلف *تریکودرما* در ممانعت از رشد فرم‌های اختصاصی *F. oxysporum* که باعث پوسیدگی ریشه و طوقه در محصولات مختلف می شود ارایه شده است (Awad, 2004 ; Ercol and Gennari, 1993). ردا و همکاران با گردآوری ۹۰ جدایه از گونه‌های مختلف قارچ *تریکودرما* از مناطق مختلف کشور چین، نشان دادند که تمامی جدایه‌ها، منجر به کاهش خسارت قارچ *Forc* روی خیار گلخانه‌ای گردید و همچنین این جدایه‌ها منجر به بهبود پارامترهای رشدی این گیاه شدند(Redda *et al.*, 2018). اما استفاده از عوامل زیستی به دلیل پایین بودن کارایی آن در مزارع و گلخانه‌ها همواره با تردید از طرف تولید کنندگان مواجه شده است. یکی از راهکارهای فائق آمدن بر این چالش می‌تواند استفاده توام از عوامل آنتاگونیست و اندوفیت موثر در افزایش رشد گیاه و مقاومت عمومی باشد که کارایی عامل زیستی را بالا ببرد.

قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* متعلق به شاخه Basidiomycota می باشد و اغلب به عنوان شبه آربسکولار میکوریز از آن نام برده می شود. این قارچ بر خلاف قارچ های آربسکولار میکوریز قادر است بر روی محیط کشت خالص و بدون حضور میزبان رشد نماید و می‌تواند ریشه گیاه میزبان را کلنیزه نماید در حالی که قارچ های آربسکولار میکوریز فاقد این توانایی هستند(Deshmukh, 2006). این قارچ با کلنیزه کردن ریشه گیاهان منجر به بهبود خصوصیات رشدی، افزایش مقاومت گیاه به بیماری و استرس‌های محیطی می‌گردد(Harman, 2011) . استفاده از تیمار همزمان دو میکروارگانیسم مفید برای مقابله با عوامل بیمارگر گیاهی خاکزاد، یک جایگزین مناسب برای ترکیبات شیمیایی است که استفاده بی‌رویه از آنها منجر به آلودگی‌های زیستی محیطی گردیده است. قارچ‌های تریکودرما و *P. indica* با ایجاد تعامل با ریشه گیاهان، منجر به افزایش پتانسیل رشدی گیاه، افزایش مقاومت گیاه نسبت به بیماری‌ها و شوک‌های غیر زیستی می شوند(Van wees *et al.*, 2008). آنیت و همکاران گزارش کردند که کاربرد توام *T. harzianum* و *P. indica nv* درصورت استفاده از *P. indica* ابتدا بر روی ریشه فلفل و سپس تیمار با تریکودرما باعث افزایش رشد

ریشه ای در گیاه بیشتر از تیمار جداگانه هر یک از این دو قارچ همزیست می شود (Anith *et al* 2011). گزارشی از بررسی تیمار همزمان این دو قارچ در کنترل زیستی فوزاریوم خیار منتشر نشده است. یکی دیگر از راهکارهای افزایش کارایی عامل زیستی ارتقای فعالیت آنتاگونیستی آن است. با وجود اینکه گونه‌های مختلف *تریکودرما* عامل بیوکنترل کاملا موفقی هستند، اما مطالعات مختلفی نیز در زمینه افزایش پتانسیل آنتاگونیستی این قارچ با استفاده از روشهای مهندسی ژنتیک و ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ (با استفاده از مواد شیمیایی جهش زا و اشعه فرابنفش و گاما) صورت گرفته است (Afify *et al*., 2012; Haggag and Mohamed, 2002; Mukherjee *et al*., 1999). گزارش‌های متعددی درباره افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در جدایه های تریکودرمای جهش یافته با پرتوگاما (Wagh *et al*., 2015; Goharzad *et al*., 2019) که منجر به افزایش ممانعت از رشد بیمارگرهای خاکزاد مهم مانند Rhizoctonia *solani* *F. solani* و *Macrophomina phaseolina* می گردند، منتشر شده است (Abbasi *et al*., 2016; Mohamadi *et al*., 2014; Moradi *et al*., 2015; Baharvand *et al*., 2014).

این مطالعه بخشی از یک پروژه تحقیقاتی است که به دنبال دست یابی به مواد زیستی موثر برای کنترل تلفیقی بیمارگر Forc گزارش شده روی خیار در کشور است. هدف اصلی اجرای این تحقیق بررسی توانایی ممانعت از رشد چند گونه *تریکودرما* علیه بیمارگر Forc و انتخاب گونه‌هایی با توانایی جلوگیری از رشد میسلیومی بیمارگر، بررسی امکان استفاده از روش القای جهش تصادفی در ژنوم *تریکودرما* به منظور دست یابی به جدایه های موتانت با قدرت ممانعت کنندگی بیشتر از رشد میسلیومی *Forc* و بررسی عدم تاثیر نامطلوب جدایه های موتانت *تریکودرما* بر گیاه میزبان، بررسی امکان کاربرد توام گونه‌های *تریکودرما* به جای یک گونه و بررسی تاثیر کاربرد توام چند گونه *تریکودرما* و قارچ اندوفیت *P. indica* بر گیاه خیار علیه بیمارگر Forc بوده است.

مواد و روش ها

جدایه های آنتاگونیست، بیمارگر و اندوفیت مورد مطالعه

جدایه پرآزار *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) جداشده از محصول خیار، از کلکسیون قارچی مرکز تحقیقات کشاورزی استان یزد تهیه گردید. از بین گونه‌های *Trichoderma* spp. موجود در کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پنج جدایه تریکودرمای والدی که شناسایی و تعیین هویت گونه های تریکودرمای والد در قالب پروژه PRC-A3-96-002 در آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای قبلا انجام شده بود، شامل *T. harzianum* NAS-101 با شماره دسترسی MW718882.1 ، *T.virens* NAS-115 با شماره دسترسی MW719876.1، *T. aeroviride* NAS-106 با شماره دسترسی MW719569.1، *T.koningii* NAS-108 با شماره دسترسی MW719590.1 و جدایه *T. atroviride* NAS-112 با شماره دسترسی MW719255.1 به منظور انتخاب جدایه با قدرت بالاتر آنتاگونیستی علیه بیمارگر Forc انتخاب شدند. قارچ اندوفیت *P. indica* از انستیتو بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه گیسن به امانت گرفته شد.

انتخاب گونه های *Trichoderma* spp. برای القای جهش با استفاده از پرتودهی و غربالگری موتانت‌ها

با استفاده از آزمون کشت متقابل گونه‌های *تریکودرما* با بالاترین قدرت ممانعت از رشد بیمارگر *Forc* انتخاب شدند. در یک طرف ظرف پتری به فاصله یک سانتی متر از لبه تشتک پتری یک دیسک پنج میلی متری از کشت سه روزه قارچ بیمارگر و در طرف مقابل یک دیسک پنج میلی متری از حاشیه کشت سه روزه هر کدام از جدایه‌های *تریکودرما*

کشت گردید. در تیمارهای شاهد نیز از کشت جدایه بیمارگر با یک دیسک پنج میلی متری از محیط کشت فاقد قارچ آنتاگونیست استفاده شد. ظروف پتری پس از کشت در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در تاریکی نگهداری شدند. اندازه‌گیری رشد شعاعی قارچ بیمارگر در زمانهای ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد در دو زمان متفاوت یادداشت شد. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد(Mishra 2010).

$$IG = [(C-T)/C] \times 100$$

IG: درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیماریزا، C: قطر پرگنه قارچ بیمارگر در شاهد، T: قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار

با هدف ارتقای توانایی ممانعت از رشد بیمارگر از روش القای جهش در گونه‌های *تریکودرما* استفاده شد. دو گونه *T.koningii* NAS-108و *T.virens* NAS-115 که بالاترین توانایی ممانعت از رشد بیمارگر را دارا بودند برای القای جهش با استفاده از پرتوتابی با پرتو گاما انتخاب شدند. سوسپانیون اسپور تازه با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر از هریک از گونه‌ها تهیه و با استفاده از دستگاه گاماسل مدل Issoledovatle Gamma cell PX-30 با چشمه کبالت۶۰، اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۱۸ گری در ثانیه، تحت پرتوتابی با پرتوگاما در محدوده دامنه دز ۲۵۰ گری قرار گرفت. برای القای بیشترین جهش تصادفی در ژنوم قارچ *تریکودرما*، از شاخص حفظ توانایی جوانه زنی ۵۰٪ اسپورهای پرتودیده استفاده شد (Abbasi *et al.*, 2016) و با توجه به نتایج بررسی درصد جوانه زنی اسپور *تریکودرما*، در دامنه دز جذبی ۲۵۰ گری٪ ۴۳/۴ از اسپورهای پرتودیده جوانه زده و ریسه نرمال با سرعت رشد مشابه یا بالاتر از اسپور پرتوندیده را تولید کرده بودند، لذا اسپورهای تیمار شده با این دامنه دز برای ایجاد موتانتها انتخاب شد. جداسازی اسپورهای جهش یافته، با استفاده از روش سریال رقت انجام شد. سوسپانسیون‌های اسپور با رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6} از سوسپانسیون اسپورهای پرتوتابی شده و به صورت تکرارهای سه‌تایی روی محیط کشت PDA ، کشت داده شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰) اسپورهای جوانه‌زده، جداسازی و به محیط کشت تازه PDA انتقال داده شدند و در مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. واکشت، تا هفت مرتبه برای اطمینان از ثبات ویژگی‌های ریخت‌شناسی ادامه یافت. شکل و رنگ جدایه‌های پرتودیده، سرعت رشد و تعداد اسپور در جدایه‌های آنتاگونیست برتر و جدایه‌های جهش یافته آنها، در محیط PDA اندازه گیری و ثبت گردید. ابعاد ۳۰ اسپور از هر کلنی خالص موتانت با میکروسکوپ نوری (۴۰x) اندازه گیری شد. با استفاده از آزمون کشت متقابل، قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته *تریکودرما* علیه *Forc* بررسی گردید و جدایه‌های جهش یافته‌ای که دارای بالاترین میزان ممانعت از رشد بیمارگر بودند انتخاب شدند.

بررسی تاثیر قارچهای آنتاگونیست و اندوفیت بر گیاهچه های خیار

پس از انتخاب جدایه‌های جهش یافته با توانایی بازدارندگی بیشتر نسبت به جدایه والد از طریق آزمون کشت متقابل، تاثیر جدایه های *تریکودرما* (والد و موتانت منتخب) و *P. indica* بر شاخص‌های رشد گیاهچه‌های خیار اندازه گیری شد. برای تهیه زادمایه لازم جهت مایه زنی گیاهچه‌ها ابتدا کشت *تریکودرما* در بستر جامد کشت[1] به روش زیر تهیه شد. ۱۵۰ گرم گندم پس از یک شب خیس خوردن در دو روز متوالی در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت در داخل شیشه مربا سترون و سپس با چهار قطعه به ابعاد ۲ میلی لیتر از کشت هفت روزه قارچ *تریکودرما* تلقیح گردید. بسترها به مدت ۲

[1] SSF: Solid State Fermentation

هفته در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی گراد با دوره نوری ۱۲ساعت نگهداری شدند.سپس اسپور *تریکودرما* با آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۲ درصد توین ۸۰ شستشو و سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور/–میلی لیتر با استفاده از لام گلبول شمار تهیه شد. چهار روز قبل از کشت خیار ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون به هر گلدان اضافه و با استفاده از پوشش پلاستیکی رطوبت سطحی گلدان حفظ شد تا اسپورهای *تریکودرما* جوانه بزنند (Abbasi et al., 2014). پرگنه *P. indica* نیز مانند *تریکودرما* بر روی بستر گندم تکثیر شد. با توجه به رشد کندتر این قارچ، تشتک‌های کشت *P. indica* دردمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت چهار هفته نگهداری شد و رطوبت مورد نیاز نیز با اضافه کردن پنج میلی لیتر محیط TCM[2] (Shahbazi et al., 2016) اتوکلاو شده به بستر تامین گردید. بذور خیار رقم NICI F1 (ENZAN-ZADEN TM) ، قبل از کاشت در محلول هیپوکلریت سدیم ٪۲ به مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و سه بار با آب مقطر استریل، هر بار به مدت دو دقیقه شستشو شدند و در هرگلدان چهار بذر کشت شد. گلدانهای پلاستیکی چهار کیلوگرمی محتوای خاک مزرعه (شنی – لومی) و پیت ماس با نسبت ۱:۱ پر شدند و به منظور حذف فاکتورهای ارگانیک در کلیه ارزیابی_ها، خاک گلدان_ها با استفاده از اتوکلاو استریل شد. شدت روشنایی گلخانه ۲۰۰۰۰ لوکس و درجه حرارت گلخانه ۲ ± ۲۸ سانتی گراد با رطوبت نسبی ۶۵ درصد تنظیم گردید. آبیاری تا زمان ظهور گیاهچه‌ها یک روز در میان و پس از آن دوبار در هفته انجام شد. اندازه‌گیری طول اندام هوایی با استفاده از خط‌کش بر روی گیاهچه‌هایی که کاملا از خاک خارج و شستشو داده شده بودند انجام شد. اندام هوایی و ریشه جداشده از هر گیاهچه در فویل آلومینیوم مجزا برای هر تکرار در هر تیمار بسته بندی و در آون (درمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۸ ساعت) خشک شدند و با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن خشک کلیه تیمارها و گیاهچه‌های کنترل تعیین گردید. به منظور بررسی تاثیر متقابل گونه‌های *تریکودرما* و *P. indica* تیمارهایی با استفاده از هریک از گونه‌های *تریکودرما* با *P. indica* نیز در نظر گرفته شد. همچنین مخلوط مساوی از سوسپانسیون اسپور دو گونه *T.koningii* NAS-108 و*T.virens* NAS-115 با غلظت 10^6 و مخلوط مساوی از سوسپانسیون اسپور موتانت های NARS-TKM101و NARS-TviM112 با غلظت 10^6 نیز در تیمارها گنجانده شدند تا امکان استفاده از مخلوط دو گونه *تریکودرما* بر رشد گیاهچه خیار نیز مشخص شود. برای بررسی تاثیر متقابل استفاده همزمان از دو قارچ، تیمارهای NARS-TKM101 به همراه *P. indica* (با غلظت 10^6اسپور در میلی لیتر) و NARS-TviM112 به علاوه *P. indica* (با همان غلظت) و مخلوط جدایه های موتانت با *P. indica* ، اجرا و داده برداری ۱۴ روز پس از مایه زنی انجام شد.

ارزیابی کنترل بیماری توسط جدایه های جهش یافته منتخب در شرایط گلخانه

ارزیابی کنترل بیماری در شرایط گلخانه با استفاده از تیمارهایی که در جدول ۱ ارائه شده است، انجام شد. کشت *تریکودرما* (والد و موتانت) در بستر کشت جامد مانند روش مایه زنی اشاره شده در آزمایشات قبلی تهیه شد و سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^6 اسپور/میلی لیتر استفاده از لام گلبول شمار تهیه گردید. ۴ روز قبل از کشت خیار ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور تریکودرما به هر گلدان اضافه و با استفاده از پوشش پلاستیکی رطوبت سطحی گلدان حفظ شد تا اسپورهای تریکودرما جوانه بزنند (Abbasi *et al*., 2014).

[2] TCM: *Trichoderma* Complete Medium

جدول ۱. تیمارهای استفاده شده در ارزیابی‌های گلخانه‌ای

Table 1- Treatments used in greenhouse evaluations

Abbreviation	Treatment	Abbreviation	Treatment
Pathogen	*F. oxysporum*	Control	water
Total wild + *P. indica*	*T.koningii* NAS-108 + *T.virens* NAS-115 + *P. indica*	Total wild	*T.koningii* NAS-108 + *T.virens* NAS-115
Total Mutants + *P. indica*	NAS-108TKM1 + NAS-115-TviM12 + *P. indica*	Total Mutants	NAS-108TKM1 + NAS-115-TviM12
Total wild + *P. indica* + Pathogen	*T.koningii* NAS-108 + *T.virens* NAS-115 + *P. indica* + *F.oxysporum*	Total wild + Pathogen	*T.koningii* NAS-108 + *T.virens* NAS-115 + *F.oxysporum*
Total Mutants + *P. indica* + Pathogen	NAS-108-TKM1 + NAS-115-TviM12 + *P. indica* + *F. oxysporum*	Total Mutants + Pathogen	NARS-TKM101 + *F.oxysporum* + NAS-115-TviM12
–	–	Chemical + Pathogen	*F. oxysporum* + کاربندازیم WP 60%

زادمایه قارچ اندوفیت نیز بر روی بستر جامد تهیه و برای جبران سرعت رشد پایین تر این قارچ نسبت به *تریکودرما* از پنج میلی لیتر محیط مایع TCM برای تامین رطوبت بستر استفاده شد. مایه زنی با *P. indica* (با غلظت 10^6اسپور در میلی لیتر)، همزمان با تیمار *تریکودرما* در عمق یک سانتی متری سطح خاک گلدان انجام شد.از روش بستر جامد مشابه به منظور تهیه زادمایه از قارچ بیمارگر (به جای گندم از شلتوک برنج دوبار اتوکلاو شده به عنوان سوبسترا) استفاده شد و تلقیح بیمارگر چهار روز قبل از کشت بذر با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر در خاک گلدان انجام شد. تیمار شیمیایی با قارچکش کاربندازیم (پودر وتابل٪ ۶۰) بر اساس توصیه شرکت سازنده –سمیران– همزمان با کشت بذر انجام شد. کلیه تیمارها در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با ده تیمار (جدول ۱) و با سه تکرار اجرا شدند. ارزیابی شدت بروز بیماری بر اساس روش Liu و همکاران (۱۹۹۵) (۵: مرگ کامل گیاهچه، ۴: بروز علایم در ۷۶–۱۰۰ درصد برگها، ۳:بروز علایم در ۵۱–۷۵ درصد برگها، ۲: بروز علایم در ۵۰–۲۵ درصد برگها،۱: بروز علایم در کمتر از ۲۵درصد برگها، صفر: بدون بروز علایم) بر روی گیاهچه‌های خیار در همه تیمارها ۴۵ روز بعد از ظهور گیاهچه انجام شد. شاخص شدت بیماری بر اساس روشLiu و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$DI = [\sum (DS*PN)/T*5] \times 100$$

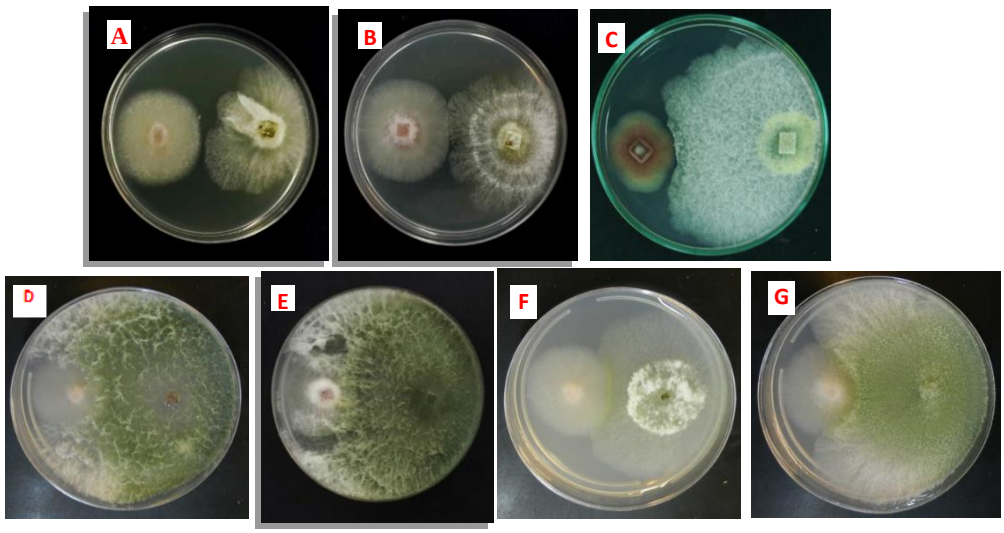
DI: شاخص بیماری، DS: شدت بروز علایم، PN: تعداد گیاهان دارای علایم، T: تعداد کل گیاهان

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS Ver.13 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

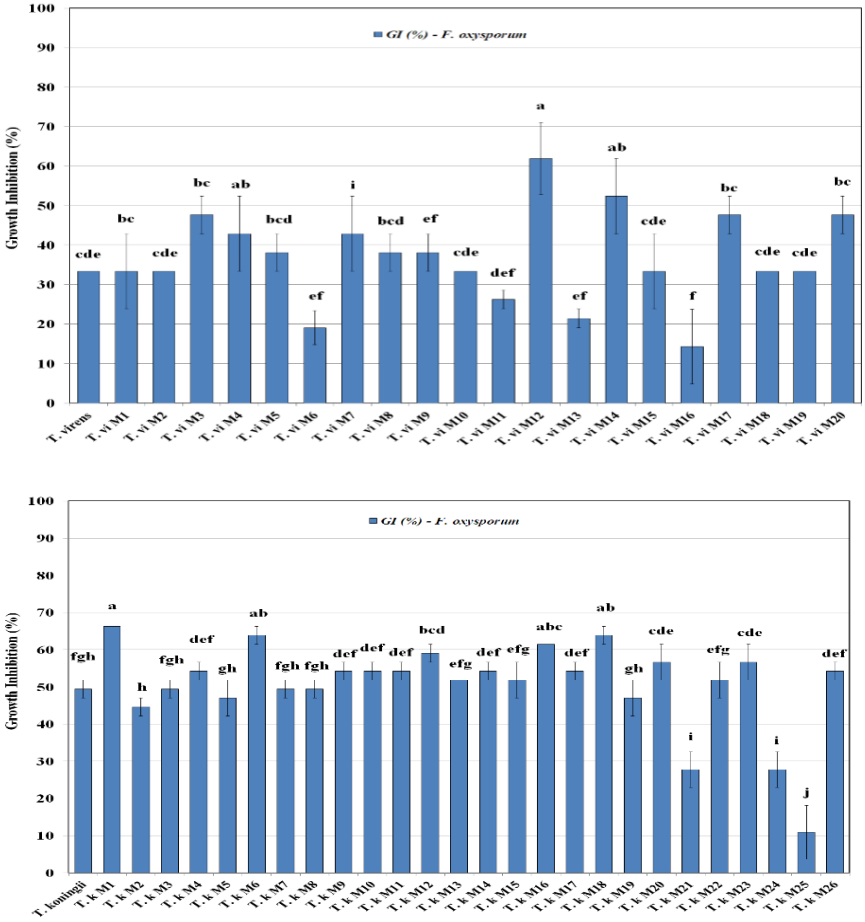
نتایج آزمون کشت متقابل نشان داد، بین میزان ممانعت از رشد گونه های *تریکودرما* در برابر قارچ *F. oxysporum* تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۱). جدایه *T.koningii* NAS-108 با ۵۰٪ جلوگیری از رشد میسلیومی، بالاترین توانایی ممانعت از رشد ریسه *F. oxysporum* را در کشت متقابل از خود نشان داد و جدایه*T.virens* NAS-115 با ۳۳٪ در رتبه دوم قرار گرفت. جدایه *T. harzianum NAS-101* با۳۰٪ بازدارندگی تفاوت معنی داری با *T.virens* NAS-115 نداشت. ضعیف ترین گونه ها با ۱۸٪ ممانعت کنندگی گونه های *T. aeroviride* و*T. atroviride* بودند. هدف از این تحقیق بهبود توانایی *تریکودرما* به منظور دستیابی به جدایه هایی با قدرت ممانعت از رشد بیمارگر و توانایی کلونیزاسیون سریع تر بود، لذا دو گونه *T.koningii* NAS-108 و*T.virens* NAS-115برای القای جهش تصادفی و دستیابی به موتانتی با توانایی ممانعت بالاتر از رشد بیمارگر و سرعت رشد ریسه‌ای بالاتر از والد خود انتخاب شدند. نصرتی و همکاران (۱۳۹۷) پس از بررسی ۲۰ جدایه *تریکودرما* در های آزمون های کشت متقابل و تولید متابولیت‌های فرار نتیجه گرفتند که جدایه‌های متعلق به گونه *T. harzianum*بیشترین درصد بازدارندگی را در مقایسه با جدایه های متعالق به گونه *T. atroviride (Ta8)* از خود نشان دادند. اخلاقی و همکاران (۱۳۹۵) سه جدایه تجاری *T. harzianum* (بکار رفته در محصولات تریانوم پی، تریکومیکس و تریکوفانگ اس) و ۱۵ جدایه بومی که شامل ۱۲ جدایه بومی از *T. harzianum* ، یک جدایه از گونه *T. saturnisporum* ، یک جدایه از گونه *T.virens* و یک جدایه از *T.koningii* بودند را در مقایسه با غلظت‌های مختلف قارچکش ایپرودیون–کاربندازیم، مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آزمایش کشت متقابل و ترکیبات فرار نشان داد جدایه های بومی Th72، Th49 ، Th30و Th16 به ترتیب با ۵۵/۷، ۵۴/۱، ۵۲/۶ و ۵۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیماریزا، موثرترین جدایه‌ها و تریکوفانگ اس، تریکومیکس، *T.virens*و *T.koningii*بترتیب با ۲۴، ۲۵/۸

۳۴، و ۳۶/۱ درصد بازدارندگی، کم اثرترین جدایه‌ها بودند. نتایج آن پژوهش نشان داده بود که اغلب جدایه های بومی مربوط به گونه *T. harzianum* نسبت به سایر گونه‌های *تریکودرما* مورد آزمایش در این تحقیق عملکرد مطلوب‌تری دارند. نتایج بررسی های درون شیشه‌ای در آزمون کشت متقابل نشان داد که دو جدایه بومی *T.virens* NAS-115 و *T.koningii* NAS-108 توانایی آنتاگونیستی بالاتری از سایر جدایه‌های دارند اما برای افزایش این توانایی ممانعت از رشد ریسه‌ای برای القای جهش و غربالگری بر اساس افزایش قدرت آنتاگونیستی انتخاب شدند. بر اساس داده‌های مورفولوژیک از بین ۲۷۰ موتانت به دست آمده از هر گونه، ۲۰ موتانت با توانایی تولید اسپور و سرعت رشد ریسه‌ای بالاتر انتخاب شدند. نتایج حاصل از آزمون کشت متقابل، نشان داد که قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته *تریکودرما* علیه Forc در سطح ۵٪ از نظر آماری متفاوت هستند. از بین جدایه‌های جهش یافته حاصل از پرتودهی گونه *T.koningii NAS-108*، موتانت *NARS-TKM101* و گونه *T.virens* NAS-115 موتانت *NARS-TviM112* بالاترین توانایی آنتاگونیستی را از خود نشان دادند (شکل ۲). در جدایه موتانت *NARS-TKM101* قدرت آنتاگونیستی ۲۰٪ بالاتر از والد بود سرعت رشد و تولید اسپور قابل رقابت با جدایه‌های دیگر داشت. در گونه *T.virens* NAS-115 جدایه موتانت NARS-TviM112 دو برابر جدایه والد خود قدرت آنتاگونیستی داشت (شکل ۲). حقاق و محمد با پرتوتابی گونه‌های *T. harzianum* و *T. viride* توسط اشعه گاما، گزارش نمودند که موتانت‌های گونه‌های مذکور نسبت به گونه‌های والد، اثرات کنترلی به مراتب بهتری بر روی شیوع بیماری پوسیدگی سفید پیاز با عامل *Sclerotium cepivorum* دارند(Haggag and Mohamed, 2002). سهام پور و همکاران ۲۰۲۰ گزارش نمودند که موتانتهای *T. harzianum* (پرتوتابی شده با اشعه گاما) کارایی بالاتری در کنترل قارچ Forc نسبت به جدایه های والد دارا هستند(Sahampour *et al*., 2020).



شکل ۱. آزمون بازداری از رشد گونه‌های تریکودرما روی قارچ *F. oxysporum* با کشت متقابل ۷۲ ساعت پس از کشت روی محیط PDA، A: *T. atroviride*(18%) :B، *T. atroviride*(18%) :C، *T. harzianum* (30%) :D، *T. virens*(33%) :E، *T.viM12* (60%) و F: *T.honingii*(50%) :G *T KM1* (65%)

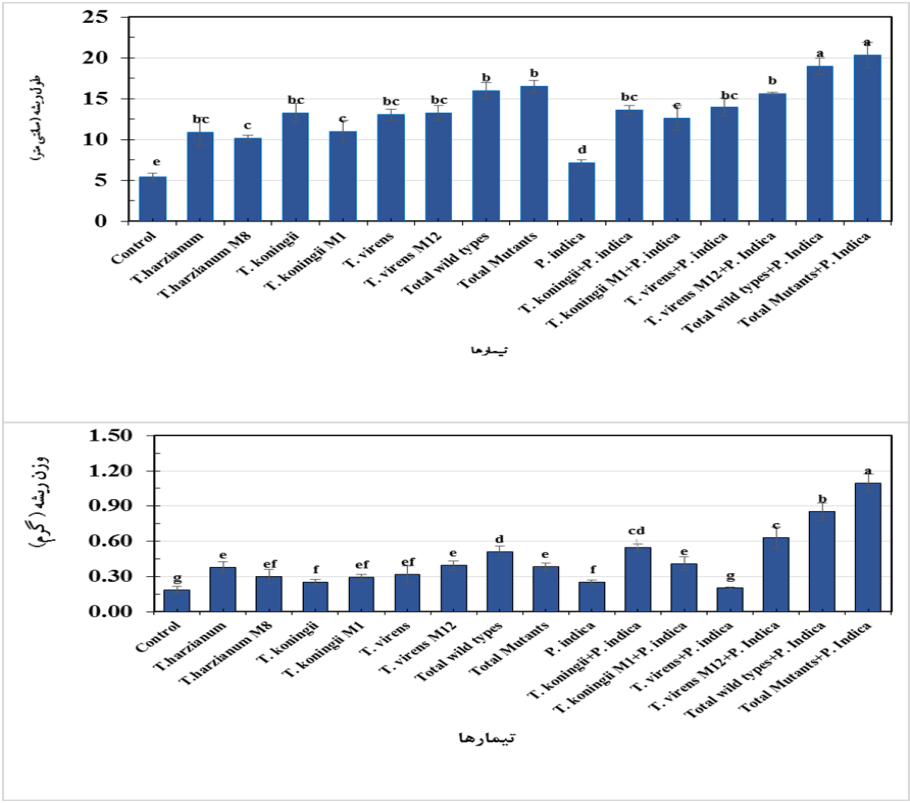
Fig. 1. *Trichoderma* species growth inhibition test on *F. oxysporum*, 72 hours after culturing on PDA medium, by dual culture method. *A:* *T. atroviride* (18%), B: *T. atroviride* (18%), C: *T. harzianum* (30%), D: *T.virens* (33%), E: *T viM12* (60%), *F: T.koningii* (50%) and G: *T KM1* (65%).



شکل ۲. مقایسه تاثیر آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته منتخب از دو گونه *T.virens* NAS-115 و *T.koningii* NAS-108 در برابر قارچ بیمارگر *Forc* با استفاده از آزمون کشت متقابل. *T.virens* (گونه والد *T.virens* NAS-115) ، *Tvi*M1-20: جدایه های جهش یافته حاصل از پرتودهی با پرتو گاما در *T.virens* NAS-115 ، *T.koningii*:(گونه والد *T.koningii* NAS-108) ، *T. k*M1-26: جدایه های جهش یافته حاصل از پرتودهی با پرتو گاما در *T.koningii* NAS-108
(حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشد).

Fig. 2. The comparison of antagonistic effect of *T.koningii* NAS-108 and NAS-115 *T.virens* mutants against *Forc* by dual culture. *T.virens:* wild type isolate of NAS-115 *T.virens*, *T.koningii* : wild type isolate of *T.koningii* NAS-108, *Tvi*M1-20: mutant isolates of NAS-115 *T.virens* via gamma irradiation, *T. k*M1-26: mutant isolates of *T.koningii* NAS-108 via gamma irradiation, (The different letters in each column are significantly difference at the level of 5%).

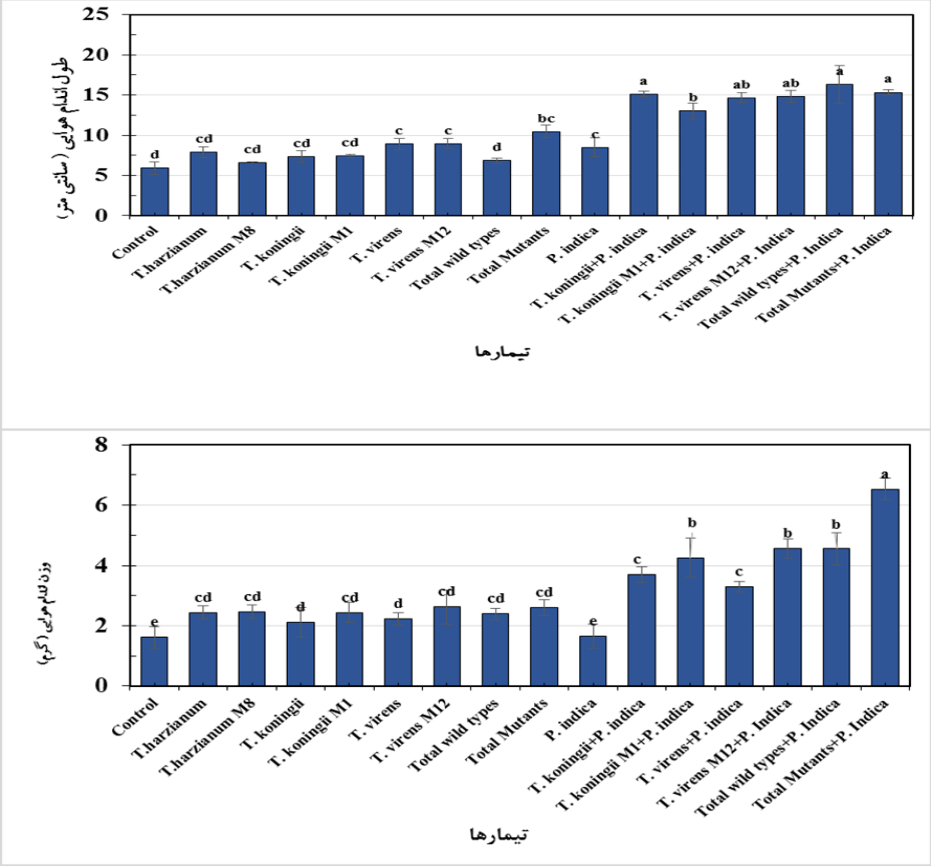
برای انتخاب جدایه موتانت مناسب بر روی گیاه میزبان، ابتدا تاثیر متقابل جدایه‌های *تریکودرما* (والد و موتانت) و قارچ *P. indica* بررشد گیاهچه‌های خیار تا مرحله پیش از گل‌دهی بررسی شد. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو گونه *T.virens* NAS-115 و *T.koningii* NAS-108 و جدایه‌های موتانت آنها در افزایش طول و وزن خشک اندام هوایی دیده نشد، اما در همه فاکتورهای مورد ارزیابی کارایی *تریکودرما* بر بهبود شاخص‌های رشد گیاهچه بالاتر از قارچ *P. indica* بود(شکل ۴). همچنین هیچ موردی از تاثیر نامطلوب در اثر استفاده از جدایه های موتانت بر روی ویژگی‌های رشد گیاه دیده نشد و همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود، میانگین وزن خشک (هم در ریشه و هم در اندام هوایی) در گیاهان تحت تیمار با گونه‌های *تریکودرما* موتانت بالاتر از جدایه والد همان گونه بود.



شکل ۳. نتایج بررسی تاثیر متقابل قارچ ***P. indica*** و جدایه‌های تریکودرما(والد و جهش یافته) بر شاخص‌های رشد ریشه گیاهچه‌های خیار. **Control**: گیاه شاهد، ***T. harzianum*** ،***T. harzianum*** **M8**: گیاه تیمار شده با جدایه والد ***T. harzianum*** موتانت **M8**، ***T. koningii***: گیاه تیمار شده با جدایه والد، ***T.koningii M1*** ،***T.koningii***: گیاه تیمار شده با ***T.koningii*** ، ***T.virens M1***: گیاه تیمار شده با جدایه والد ***T.virens*** **M12**، ***T.virens*** **M12** : گیاه تیمار شده با جدایه موتانت **Total wild type**: گیاه تیمارشده با مخلوط اسپور جدایه های والد تریکودرما، **Total Mutants**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور جدایه های موتانت، ***P. indica*** گیاه تیمار شده با قارچ اندوفیت، ***T.koningii_P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط قارچ اندوفیت و جدایه والد ***T.koningii***، ***T.koningii M1+ P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور قارچ اندوفیت و جدایه موتانت ***T.koningii M1+ P.indica*** ، ***T.virens+ P. indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط قارچ اندوفیت و جدایه والد ***T. virens*** ، ***T.virensM12+ P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط قارچ اندوفیت و جدایه موتانت ***T. virens M12*** ، **Total wild type+*P.indica***: گیاه تیمارشده با مخلوط اسپور قارچ اندوفیت و جدایه های والد تریکودرما، **Total Mutants+*P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور قارچ اندوفیت و جدایه های موتانت.

Trichoderma **species growth inhibition test on *F. oxysporum*, 72 hours after culturing on PDA medium, by dual culture method. *A: T. atroviride* (18%), B: *T. atroviride* (18%), C: *T. harzianum* (30%), D: *T.virens* (33%), E: *T viM12* (60%), *F: T.koningii* (50%) and G: *T KM1* (65%).**

Fig. 3. The results of co-cultivation of *P. indica* and *Trichoderma* (wild type and mutant) isolates on the growth of the roots of cucumber seedlings. Control :No treated plants ،*T. harzianum:* plants treated with *T. harzianum* ،*T. harzianum* M8: plants treated with *T. harzianum* M8،*T.koningii:* plants treated with *T.koningi* ،*T.koningii M1*: plants treated with *T.koningii M1* ،*T.virens:* plants treated with *T.virens*، *T.virens*M12: plants treated with *T.virens*M12 ،Total wild type: plants treated with mixed wild type spores, Total Mutants :plants treated with mixed mutant isoltes spores ، *P. indica* .plants treated with endophyte fungi ، *T.koningii+P.indica:* plants treated with endophyte fungi and *T.koningi* ، *T.koningii M1+ P.indica*: plants treated with endophyte fungi and *T.koningii M1*، *T.virens+ P. indica* .plants treated with endophyte fungi and *T. virens* ،*T.virensM12+ P.indica* plants treated with endophyte fungi and *T. virens M12* ،Total wild type +*P. indica* :plants treated with endophyte fungi and mixed wild type spores, Total Mutants +*P. indica* :mixed wild type spores and mixed mutant isoltes spores.



شکل ۴. نتایج بررسی تاثیر متقابل قارچ ***P. indica*** و جدایه‌های *تریکودرما*(والد و جهش یافته) بر شاخص‌های رشد ساقه گیاهچه‌های خیار.**Control** : گیاه شاهد، ***T. harzianum***: گیاه تیمار شده با جدایه والد ***T. harzianum***، ***T. harzianum M8***: گیاه تیمار شده با جدایه موتانت **M8** ***T. harzianum***،***T.koningii***: گیاه تیمار شده با جدایه والد،***T.koningii M1***: گیاه تیمار شده با ***T.koningii M1***، ***T.virens***: گیاه تیمار شده با جدایه والد ***T.virens***، ***T.virensM12***: گیاه تیمار شده با جدایه موتانت ***T.virens***M12، **Total wild type**: گیاه تیمارشده با مخلوط اسپور جدایه های والد تریکودرما، **Total Mutants**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور جدایه های موتانت، ***P. indica***: گیاه تیمار شده با قارچ اندوفیت، ***T.koningii_P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط قارچ اندوفیت و جدایه والد ***T.koningi***، ***T.koningii M1+ P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور قارچ اندوفیت و جدایه موتانت ***T.koningii M1 + P.indica***، ***T.virens + P. indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط قارچ اندوفیت و جدایه والد ***T. virens***، ***T.virens***M12 + ***P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط قارچ اندوفیت و جدایه موتانت ***T. virens*** M12، **Total wild type** ***P.indica***+: گیاه تیمارشده با مخلوط اسپور قارچ اندوفیت و جدایه های والد تریکودرما، **Total Mutants** + ***P.indica***: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور قارچ اندوفیت و جدایه های موتانت.

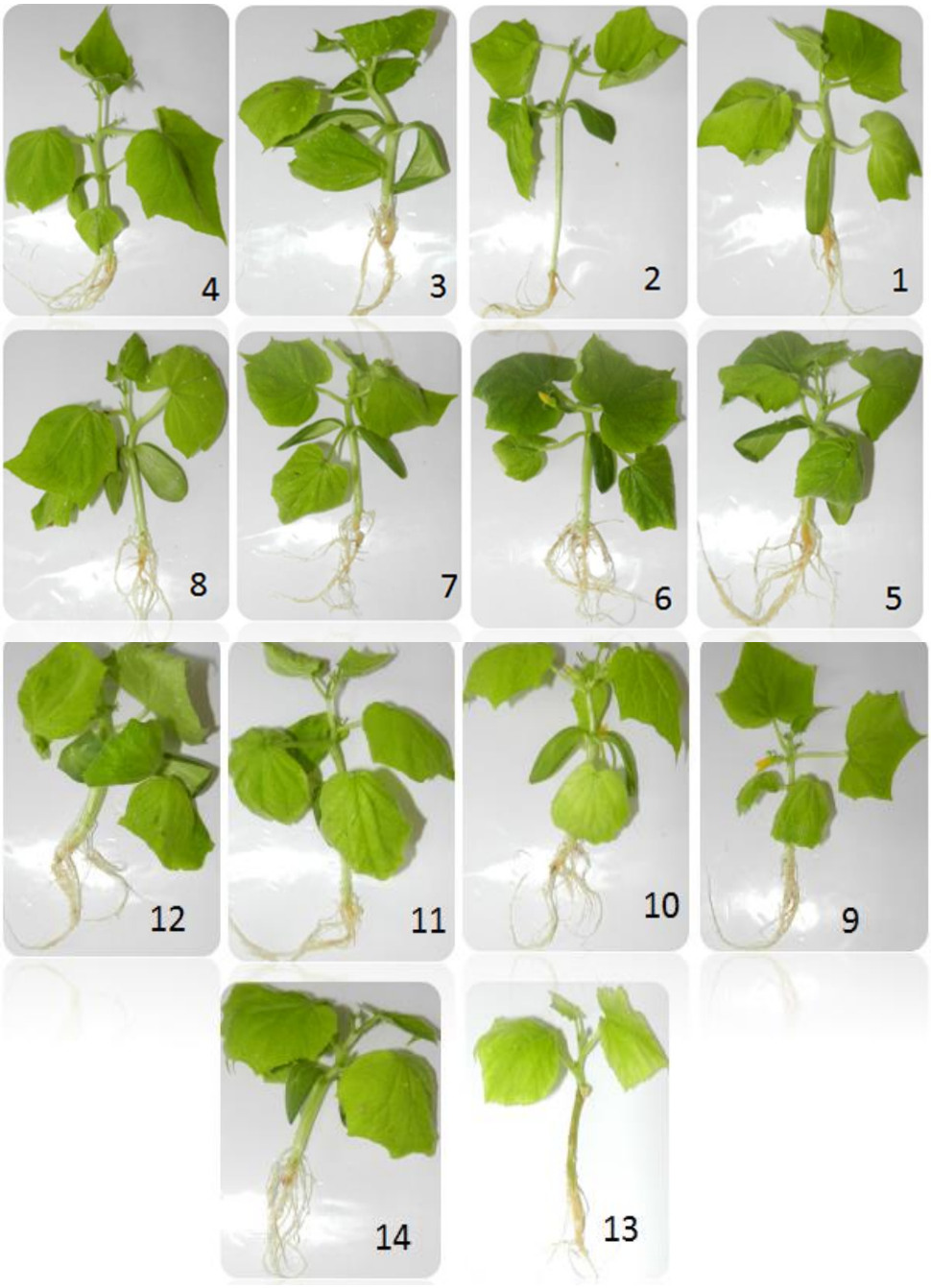
Fig. 4. The results of co-cultivation of *P. indica* and *Trichoderma* (wild type and mutant) isolates on the growth of the stem of cucumber seedlings. Control :No treated plants ،*T. harzianum:* plants treated with *T. harzianum* ،*T. harzianum* M8: plants treated with *T. harzianum* M8،*T.koningii:* plants treated with *T.koningi*،*T.koningii M1*: plants treated with *T.koningii M1* ،*T.virens:* plants treated with *T.virens*، *T.*virensM12: plants treated with *T.virens*M12 ،Total wild type: plants treated with mixed wild type spores, Total Mutants :plants treated with mixed mutant isoltes spores ، *P. indica* .plants treated with endophyte fungi ، *T.koningii+P.indica:* plants treated with endophyte fungi and *T.koningi* ، *T.koningii M1 + P.indica*: plants treated with endophyte fungi and *T.koningii M1*، *T.virens + P. indica* .plants treated with endophyte fungi and *T. virens* ،*T.virensM12+ P.indica* plants treated with endophyte fungi and *T. virens M12* ،Total wild type + *P. indica* :plants treated with endophyte fungi and mixed wild type spores, Total Mutants + *P. indica* :mixed wild type spores and mixed mutant isoltes spores.

نتایج نشان داد استفاده توام دو قارچ *تریکودرما* و *P. indica* در فاکتورهایی مانند ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی و طول و وزن خشک ریشه تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ با گیاهان شاهد آلوده (بدون تیمار) ایجاد می نمایند (شکل۴ و۳). از مقایسه میانگین داده–های به دست آمده می توان جمع بندی نمود که احتمالا دو گونه قارچ *تریکودرما* و *P. indica* بر روی القای رشد و بهبود جذب مواد معدنی توسط ریشه و توسعه سیستم ریشه‌ای در گیاه خیار اثر هم‌افزایی دارند. در این ارزیابی ها از مخلوط مساوی سوسپانسیون اسپور دو گونه والد (Total wild) و جهش یافته (Total Mutant) به طور جداگانه نیز استفاده شد.

در کلیه شاخص‌های مورفولوژیک بررسی شده استفاده از مخلوط قارچ–های اندوفیت و آنتاگونیست به طور معنی‌داری باعث افزایش رشد گیاهچه ها شد و کاربرد توام مخلوط *تریکودرما* و *P. indica* بهترین کارایی را بر روی گیاهچه‌ها نشان داد(شکل ۳و ۴و۵). بر اساس نتایج این آزمایش و مشاهده تاثیر هم افزایی بین دو قارچ *تریکودرما* و *P. indica* بر روی رشد خیار و عدم بروز هیچ گونه تاثیر نامطلوب در گیاهچه‌های خیار تحت تیمار با تریکودرمای موتانت (شکل ۵)، یادیدا و همکاران ۲۰۰۱ نشان دادند، تیمار کردن خاک با زادمایه *T. harzianum* باعث افزایش درصد جوانه زنی بذور خیار، افزایش وزن خشک به میزان ۸۰٪، افزایش طول ساقه به میزان ۴۰٪، افزایش سطح برگ به میزان ۸۰٪ و همینطور افزایش غلظت فسفر و آهن به ترتیب به میزان ۳۰٪ و ۹۰٪ گردید(Yadida *et al.*, 2001). وارما و همکاران ۱۹۹۹ تاثیر مثبت قارچ *P. indica* بر فاکتورهای رشدی گیاهان ذرت، تنباکو، جعفری ودرخت سپیدار را گزارش نمودند(Varma *et al.*, 1999). نتایج تحقیقات سپهری و همکاران ۲۰۰۹ نشان داد تلقیح ریشه گیاه جو با قارچ *P. indica* سبب افزایش مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه به ترتیب به میزان ۳۷٪ و ۹۷٪ می گردد(Sepehri *et al.*, 2009).محمدی کشکا و همکاران (۱۳۹۶) مشاهده کردند که استفاده توام از دو قارچ اندوفیت و آنتاگونیست *P. indica*و *T. virens* بر عملکرد گیاه برنج و صفات ریخت شناسی آن تاثیر مثبت معنی‌داری داشته است و به عنوان کود میکروبی برای این محصول قابل استفاده است (Mohammadi Kashka *et al* 2015). در مطالعه دیگری نیز تاثیر هم‌افزایی *P. indica* و *T. virens*در تیمار همزمان و همچنین در تیمار با باکتری انتروباکتر توانسته بود علاوه بر عملکرد و کلیه صفات ریخت شناسی و شاخص‌های رشد باعث افزایش میزان تجمع کلروفیل و کارتنوئید در محصول فلفل شود (Mohammadi Kashka *et al* 2016).

ارزیابی‌های گلخانه‌ای کنترل Forc با استفاده از مخلوط قارچ‌های آنتاگونیست و اندوفیت انجام شد. ارزیابی‌های گلخانه‌ای نشان داد که بیمارگر فعال و بیماری زا بوده و بالاترین شدت بیماری (نکروز کامل و مرگ بوته) را بر روی گیاه ایجاد کرد(شکل ۶).

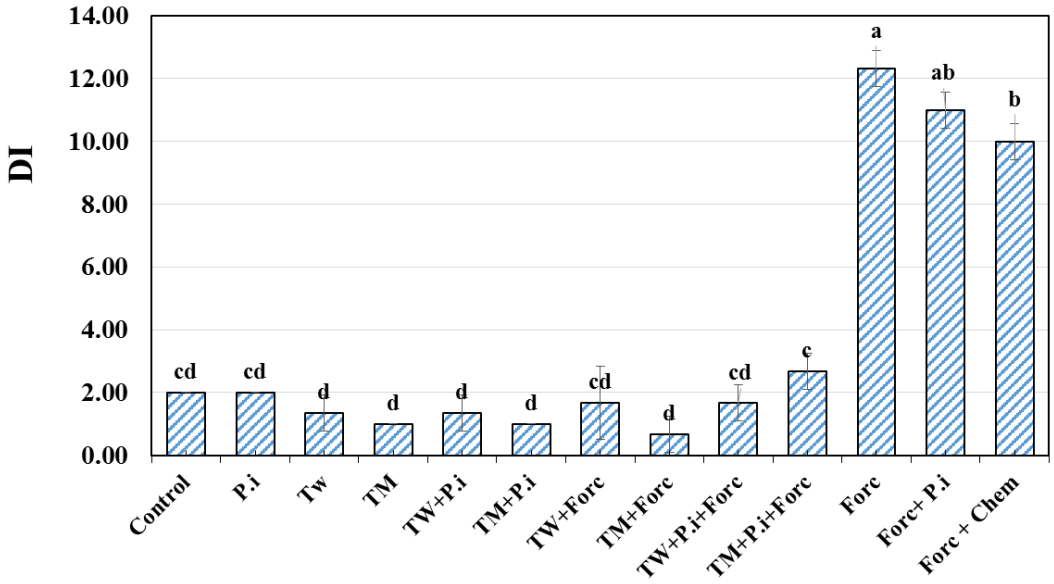
در گیاهان شاهد و کلیه گیاهان تحت تیمار با قارچ *تریکودرما* (والد و موتانت) شامل تیمارهای مخلوط جدایه‌های *تریکودرما* (والد و موتانت) به همراه یا بدون قارچ اندوفیت هیچ علایمی مشاهده نشد که عدم بروز تاثیر نامطلوب در خیار در اثر تیمار با موتانت‌های تریکودرما را نشان داد (شکل ۵). تیمار با قارچ اندوفیت *P. indica* منجر به ایجاد کلروز در تعدادی از برگ‌های خیار شد اما شدت بروز بیماری از نظر آماری با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. مقایسه میانگین شدت بیماری اندازه گیری شده در گیاهچه‌های خیار تحت تیمار با قارچ اندوفیت *P. indica* نشان داد که این قارچ توانایی کاهش بروز بیماری کمتری از تریکودرما داشته است، اما تیمار شیمیایی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار با قارچ اندوفیت *P. indica* نشان نداد (شکل ۶). ازنظر شاخص بروز بیماری جدایه‌های موتانت تریکودرما با جدایه‌های



شکل ۵. گیاهچه‌های خیار تیمار شده با تریکودرما (والد و موتانت) و اندوفیت(۱: ***T.koningii*** **NAS-108** ، ۲: ***T.virens*** **NAS-115**، ۳: ***T.koningii*** **NAS-108** و ***P. indica***، ۴: ***T.virens*** **NAS-115** و ***P. indica***، ۵: مخلوط *تریکودرمای* والد و ***P. indica*** ، ۶: مخلـوط *تریکودرمای* موتانت و ***P. indica***، ۷: مخلوط *تریکودرمای* والد، ۸: مخلـوط *تریکودرمـای* موتانـت،۹: **NARS-TKM101** ، ۱۰: **NARS-TviM112**، ۱۱: **NARS-TKM101** و ***P. indica***،۱۲: **NARS-TviM112** و ***P. indica***، ۱۳: شاهد و ۱۴: ***P. indica***.

Fig 5. Effect of *Trichoderma* (wild type and mutant) and endophyte treatments on the growth of cucumber seedlings (1: *T.koningii* NAS-108, 2: NAS-115 *T.virens*, 3: *T.koningii* NAS-108 with *P. indica*

, 4: NAS-115 *T.virens*+ *P. indica*, 5: Total wihd type *Trichoderma* with *P. indica*, 6: Total Mutant *Trichoderma* with *P. indica*, 7: Total wihd type *Trichoderma*, *8:* Total Mutant *Trichoderma*, *9:* NARS-TKM101, 10: NARS-TviM112, 11: NARS-TKM101 with *P. indica*, *12:* NARS-TviM112 with *P. indica*, *13:* Control, 14: P. *indica*,.



شکل ۶. تاثیر متقابل قارچ ***P. indica*** و مخلوط جدایه-های منتخب(والد و جهش یافته) بر شاخص بروز بیماری در خیار (حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی-دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشد).**Control** : شاهد، **P.i**: گیاه تیمار شده با قارچ اندوفیت، **TW**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های والد تریکودرما، **TM**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های موتانت تریکودرما، **TW+P.i**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های والد تریکودرما و قارچ اندوفیت، **TM+ P. i**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های موتانت تریکودرما و قارچ اندوفیت، **TW+ Forc**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های والد تریکودرما و بیمارگر، **TM + Forc**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های موتانت تریکودرما و بیمارگر، **TW+ P.i +Forc**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های والد تریکودرما و قارچ اندوفیت و بیمارگر، **TM + P.i+ Forc**: گیاه تیمار شده با مخلوط اسپور ایزوله های موتانت تریکودرما و قارچ اندوفیت و بیمارگر،**Forc** : گیاه تیمار شده با بیمارگر،**Forc +P.i**: گیاه تیمار شده با بیمارگر و قارچ اندوفیت، **Forc+ Chem**: گیاه تیمار شده با بیمارگر و قارچ کش کاربندازیم (پودر وتابل ۶۰٪)

Fig.6. Co-treatment of P. indica and Trichoderma isolates in disease index on cucumber, Control :No treated plants, P.i: P. indica :plants treated with endophyte fungi, TW: plants treated with mixed wild type spores, TM: plants treated with mixed mutant isoltes spores، TW+P.i: plants treated with endophyte fungi and mixed wild type spores, TM+ P. i: plants treated with mixed mutant isoltes spores، TW+ Forc: plants treated with Forc and mixed wild type spores, TM + Forc: plants treated with Forc and mixed wild type spores, TW+ P.i +Forc: plants treated with endophyte fungi and Forc and mixed wild type spores, TM + P.i+ Forc: plants treated with endophyte fungi and Forc and mixed wild type spores, Forc: plants treated with Forc, Forc +P.i: plants treated with Forc and endophyte fungi , Forc+ Chem: plants treated with Forc and Carbendazim 60% WP . (The different letters in each column are significantly difference at the 5% level).

والد خود تفاوت معنی‌داری نداشتند. در تیمارهمزمان *تریکودرمای* والد و قارچ اندوفیت *P. indica* شاخص بروز بیماری تفاوت معنی‌داری با تیمار با مخلوط دو گونه والد آنتاگونیست نشان نداد، اما شاخص بروز بیماری *تریکودرمای* موتانت و قارچ اندوفیت *P. indica* بطور معنی‌داری بالاتر از تیمار با مخلوط دو موتانت *تریکودرما* بود(شکل ۴). در مجموع تیمار با مخلوط موتانت‌های *تریکودرما* بهترین عملکرد را در کاهش شاخص شدت بیماری در بین کلیه گیاهان تلقیح شده با عامل Forc نشان داد و با وجود معنی‌دار نشدن این کنترل بیماری در مقایسه با تیمار مخلوط دو گونه والد *تریکودرما* و تیمار مخلوط دو گونه والد و قارچ اندوفیت *P. indica*، با در نظر گرفتن افزایش شاخص‌های رشد (ریشه و اندام هوایی) در تیمار با مخلوط موتانت‌های تریکودرما می‌توان این تیمار را به عنوان موثرترین تیمار برگزید.

نتایج همچنین نشان دادند که تاثیر تیمار شیمیایی با قارچ‌کش کاربندازیم و تیمار با قارچ اندوفیت *P. indica* بر کاهش شاخص بروز بیماری کمتر از قارچ آنتاگونیست (والد و موتانت) موثراست، هرچند در شرایط درون شیشه‌ای این قارچکش قادر به ممانعت از رشد فوزاریوم است در شرایط گلخانه ای بطور معنی‌داری کارایی پایین تری را نشان داد. البته با توجه به کیفیت متفاوت سموم عرضه شده در بازار تکرار چنین ارزیابی هایی برای اطمینان از کارایی روشهای بیوکنترل در مقایسه با روش شیمیایی ضروری است.

شکل ۷. تصاویر ارزیابی گلخانه‌ای بررسی تاثیر متقابل قارچ *P. indica* و مخلوط جدایه‌های منتخب(والد و جهش یافته) بر شدت بیماری در خیار: ۱: مقایسه کاهش شدت بیماری در اثر تیمار توام با موتانت *تریکودرما* و *P. indica* در مقایسه با شاهد سالم و بیمار، ۲: مقایسه کاهش شدت بیماری در اثر تیمار توام با والد *تریکودرما* و *P. indica* در مقایسه با شاهد (سالم و بیمار).

Fig. 7. Greenhouse evaluation of the interaction effect of *P. indica* and *Trichoderma* (wild type and mutant) on the disease index in cucumber plants: 1: Comparison of the reduction of disease index due to the combined treatment with the mixed mutant *Trichoderma* and *P. indica* compared to controls (un-inoculated and inoculated plants), 4: comparing the reduction of disease index due to combined treatment with mixed wild type *Trichoderma* and *P. indica* compared to healthy controls (un-inoculated and inoculated plants).

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از مخلوط چند گونه *تریکودرما*باعث بهبود کارایی آن در کاهش بروز بیماری شده است (شکل۷). القای جهش در ژنوم *تریکودرما* با افزایش قدرت ممانعت کنندگی آن علیه بیمارگر، منجر به کاهش بروز شدت بیماری بود. مطالعه اکرمی در سال ۲۰۱۵ نیز نشان داد که در صورت استفاده توام از چند گونه *تریکودرما* اثرات هم افزایی قابل توجهی در کنترل انواع پوسیدگی‌های فوزاریومی در خیار به دست می آید (Akrami, 2015). سهام پور و همکاران (۲۰۲۰) گزارش دادند که استفاده از موتانت‌هایی از ***T. harzianum*** که با استفاده از پرتوتابی با پرتوگاما تولید شده بودند در کاهش بیماری ناشی از ***F. oxysporum*** f. sp. ***radicis-cucumerinum*** بر روی گیاه خیار موثر تر از جدایه والد خود عمل کرده اند. مطالعات مشابهی از افزایش کارایی موتانتهای تریکودرمای پرتوتابی شده با پرتو گاما در ممانعت از رشد ریسه‌ای ***M. phaseolina*** و کاهش پوسیدگی زغالی ناشی از آن بر روی سویا منتشر شده است(Goharzad *et al.*, 2019).

بر اساس نتایج حاصل از اجرای این تحقیق، ترکیب جدایه های *تریکودرما* جهش یافته با قدرت ممانعت کنندگی بالاتر در برابر Forc به همراه قارچ ***P. indica*** پس از ارزیابی کارایی بیشتر به عنوان ماده موثره در تهیه قارچ‌کش های زیستی با کارایی بالاتر قابل پیشنهاد است.همچنین بررسی دقیق توالی ژنتیکی موتانت‌های منتخب این مطالعه در مقایسه با جدایه های والد به منظور تعیین ماهیت جهش های ایجاد شده در ژنوم موتانتهای مذکور می‌تواند گام‌های پژوهشی بعدی این مطالعه باشد. ارزیابی عملکرد گیاهان تحت تیمار با مخلوط *تریکودرما* و ***P. indica*** در گلخانه در گام‌های بعدی همین تحقیق در حال اجرا می باشد. البته ضروری است مکانیسم‌های تاثیر جدایه های *تریکودرما* و ***P. indica*** در شرایط استفاده توام بر روی خیار، از طریق بررسی پروتئوم و سایر فاکتورهای بیوشیمیایی شاخص در پاتوسیستم خیار و Forc ، تحت تیمار با مخلوط *تریکودرما* و ***P. indica*** در شرایط وجود بیمارگر در مطالعات آینده بررسی شوند. همچنین مطالعه بر همکنش مستقیم بین ریسه دو قارچ *تریکودرما* و ***P. indica*** برای تعیین نوع کنش متقابل آنها می-تواند در روشن شدن نحوه هم افزایی این دو قارچ و تاثیر متقابل آنها بررسی شود. با وجود نتایج حاصل از این بررسی، پیش از توصیه و کاربرد هر نوع عامل زیستی (قارچی یا باکتریایی) اعم از بومی یا وارداتی، والد یا جهش یافته بررسی دقیق اثرات اکوتوکسیکولوژی آنها بر اساس آئین نامه های رسمی مراجع ذیصلاح کشور باید انجام شود. به ویژه برای توصیه و کاربرد هرنوع عامل زیستی (آنتاگونیست یا اندوفیت) دستورزی شده پیش از کاربرد در سطح تجاری، اخذ مجوز لازم از سازمان ها و مراجع قانونی کشور ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکتری است که به صورت مشترک بین گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و گروه گیاهپزشکی- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای؛ انجام شده است. نویسندگان از جناب آقای دکتر رضا فانی - مرکز تحقیقات کشاورزی استان یزد - بخاطر در اختیار قراردادن جدایه پرآزار ***F. oxysporum*** f. sp. ***radicis-cucumerinum*** (***Forc***) و شناسایی و انجام آزمون بیماری زایی بر روی محصول خیار و پروفسور کوگل- انستیتو بیماری شناسی گیاهی دانشگاه گیسن آلمان- برای در اختیار گذاشتن قارچ اندوفیت ***P. indica*** تشکر و قدردانی می نمایند.

Refrences

منابع

ABBASI, S., N. SAFAIE and M. SHAMSBAKHSH, 2014. Evaluation of gamma-induced mutants of *Trichoderma harzianum* for biological control of charcoal rot of melon. (*Macrophomina phaseolina*) in laboratory and greenhouse conditions. Journal of Crop Protection 3, 4: 509-521.

ABBASI, S., N. SAFAIE and M. SHAMSBAKHSH and SHAHBAZI, S., 2016. Bio control activities of gamma induced mutants of *Trichoderma harzianum* against some soil borne fungal pathogens and their DNA fingerprinting. Iranian journal of biotechnology, 14(4), p.260.

ABDEL-LATEIF, K.S, 2017. *Trichoderma* as biological control weapon against soil borne plant pathogens. African Journal of Biotechnology, 50: 2299-2306.

AFIFY, A.E.M.R., A.A.E. MOHAMED, M.I. GHADA and W.K. BASSAM, 2013. Exposing of *Trichoderma* spp. to Gamma Radiation for Stimulating Pesticide Biodegradation Activity. J. Plant Pathol. Microb, 4(9) : 1-5. ISSN:2157-7471.

AKHLIKY M. R., MORADZADEH ESKANDARI M., ROUHANI H. and MAHDIKHANI MOGHADAM, I., Investigating the efficiency of commercial and native *Trichoderma* isolates in controlling *Fusarium* wilt disease of cucumber, The 22nd Iranian Plant Pathology Congress, 2015 in persian.

AKRAMI, M, 2015. Effects of Trichoderma spp. in bio-controlling *Fusarium solani* and F. *oxysporum* of cucumber (Cucumissativus). *J*ournal of Applied Environmental and Biological Sciences, 4(3): 241-245.

ANITH, K. N., FASEEELA, K. M., ARCHANA, P. A., & PRETHAPAN, K. D.. Compatibility of *Piriformospora indica* and *Trichoderma harzianum* as dual inoculants in black pepper (*Piper nigrum* L.). 2011. Symbiosis, 55, 11-17.

AWAD, H. M, 2004. Studies on Root Rot Diseases of Pea. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture, Minufiya University.

BAHARVAND, A., S. SHAHBAZI, H. AFSHARMANESH and M. ALI, 2014. Investigation of gamma irradiation on morphological characteristics and antagonist potential of *Trichoderma viride* against *M. phaseolina*. International Journal of Farming and Allied Sciences, 3(11): 1157-1164.

COHEN, R., ORGIL G., BURGER, Y., SAAR, U., ELKABETZ, M. and Tadmor Y, 2015. Differences in the responses of melon accessions to *Fusarium* root and stem rot and their colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radiciscucumerinum.* Plant Pathology 64:655–663.

DESHMUKH, S, 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 18450-18457.

DI PIETRO, A., M.P. MADRID, Z. CARACUEL, J DELGADO-JARANA and M.I.G. RONCERO, 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular Plant Pathology: 4: 315–325.

ERCOLE, N. and S. GENNARI, 1993. Biological Control of *Fusarium* Wilt of Melon by Seed Coating with *Trichoderma harzianum*. Rifai Culture Protecte, 22: 4-73.

FEYSIA, B., A. LENCHO., T. SELVARAJ and G. GETANEH, 2015. Evaluation of some botanicals and *Trichoderma harzianum* for the management of tomato root-knot nematode (Meloidogyne incognita (Kofoid and White) Chit Wood). Advances in Crop Science and Technology, 4(1): 2-10.

GAMS, W. and J. BISSET, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma* and *Gliocladium.* Vol. 1.Basic Biology, Taxonomy and Genetics (C. P. Kubicek & G. E. Harman, eds): 3–34. Taylor & Francis, London.

GOHARZAD, F., T. GHANBARY, S. SHAHBAZI and H. ASKARI, 2019. Two–dimensional and chitinase activity analysis of a novel mutant of *Trichoderma koningii* for biodegradation of *Macrophomina phaseolina* cell walls. *Mycologia Iranica*, 6(2): 73-87.

HAGGAG, W.M. and H.A.A., MOAHAMED, 2002. Enhancement of antifungal metabolite production from gamma-ray induced mutants of some *Trichoderma* species for control onion white disease. Plant Pathology Bulletin, 11: 45-56.

HARMAN, G. E, 2011. Multifunctional fungal plant symbiont: new tools to enhance plant growth and productivity. New Phytol, 189: 647–649.

LIU, L., J.W. KLOEPPER and S. TUZUN, 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85(6): 695-698.

MISHRA, V.K, 2010. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against. *Pythium aphanidermatum*. J. Phytol, 2: 28–35.

MOHAMADI, A. S., S. SHAHBAZI and H. ASKARI, 2014. Investigation of γ-radiation on morphological characteristics and antagonist potential of *Trichoderma viride* against *Rhizoctonia solani*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 8, 3: 329-336.

MOHAMMADI KASHKA F., PIRDASHTI H., YAGHOUBIAN Y., BAHARI SARAVI S.H., Effect of *Trichoderma virens* and *Piriformospora indica* coexistence with Enterobacter sp. on the growth and photosynthetic pigments of pepper (Capsicum annuum L.) plant, 2015, Plant Ecophysiology, Vol 8, No 6, in persian.

MORADI, R., S. SHAHBAZI, and H. ASKARI, 2015. The impact of γ-radiation on morphological characteristics and antagonist potential of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium solani*. Journal homepage: www. Isi journal. Info, (4): 7.

MUKHERJEE, P.K., P. D. SHERKHANE and N.B. MUTHY, 1999. Induction of stable Benomyl-tolerant phenotypic mutants of *Trichoderma pseudokoningii* MTCC 3011, and their evaluation for antagonistic and bio control potential. Indian J. Exp. Biol. 37: 710-712 .

MUKHERJEE, M., B. A. HORWITZ, P.D. SHERKHANE, R. HADAR and P.K. MUKHERJEE, 2006. A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens*: evidence from analysis of genes under expressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic production. Current genetics 50, 3: 193-202.

REDDA, E. T., J. MA, J. MEI, M. LI, B. Y. WU and X. JIANG, 2018. Biological Control of Soilborne Pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) of Cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. Journal of Life Sciences, 12: 1-12.

SAHAMPOUR, L., F. ZAKER TAVALLAIE, S. R. FANI and S. SHAHBAZI, 2020. In vitro efficiency of *Trichoderma harzianum* mutants in biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*. Journal of Crop Protection. 9(2): 285-300.

SEPEHRI, M., N. SALEH RASTIN, GH. HOSSEINI SALKADEH and M. KHAYAM NEKOUEI, 2009. Effect of endophytic fungi, *Piriformospora indica*, on growth and resistance of Hordeum Vulgarei. to salinity stress. *Rangeland*, 3(3): 508-518. (Persian with English summary).

SHAHBAZI, S., H. ASKARI and S. MOJERLOU, 2016. The impact of different physicochemical parameters of fermentation on extracellular cellulolytic enzyme production by *Trichoderma harzianum*. 5(3): 397-412.

SHAHRIARI, D. and R. ZARE, 2006. *Fusarium* stem and root rot of greenhouse cucumber. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran (in Persian).

TAPWAL, A., G. THAKUR, S. CHANDRA and A. TYAGI, 2015. In-vitro evaluation of *Trichoderma* species against seed borne pathogens. Int J Biol Chem Sci, 1(10): 14-19.

VAN WEES, S. C. M., S. VAN DER ENT and C. M. J PIETERSE, 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Curr Opin Plant Biol. 11: 443–448.

VARMA, A., S. VERMA, S. N. SUDAH, P. Franken, 1999 *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. Appl Environ Microbiol 65: 2741–2744.

WAGH, S., S.T. INGLE, S. DANDALE and S.S. MANE, 2015. Improvement in bio control ability of *Trichoderma viride* through gamma irradiation. *Trends in Biosciences*, 8(20): 5622-5626.

WOO, S.L., M. RUOCCO, F. VINALE, M. NIGRO, R. MARRA, N. LOMBARDI, A. PASCALE, S. LANZUISE, G. MANGANIELLO and M. LORITO, 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. The Open Mycology Journal, 8(1): 71-126.

YADIDIA, I., A.K. SRIVASTVA, Y. KAPULNIK and I. CHET, 2001. Effect of *Trichoderma harizanum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil, 235: 235-242.