القای مقاومت علیه پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه‌ی خیار بوسیله‌ی جدایه‌های تریکودرما و سودومونادهای فلورسنت جدا شده از ریزوسفر خیار

حمیدرضا علیزاده[1] و خدیجه سالاری[2*]

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه جیرفت.

۲- مربی گروه گیاهپزشکی دانشگاه جیرفت.

*مسئول مکاتبه Khadijeh.salari@ujiroft.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۲

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه‌ی خیار ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* از جمله بیماریهای مهم خیار محسوب می‌شود. القای مقاومت سیستمیک توسط تریکودرما و سودومونادهای فلورسنت یک روش امید بخش برای بیوکنترل این بیماری می‌باشد. در این تحقیق، ده جدایه از تریکودرما و هجده جدایه از سودومونادهای فلورسنت بوسیله محیط کشت‌های اختصاصی از ریزوسفر خیار جداسازی شد. همچنین ده استرین تریکودرما و دو استرین از سودوموناس از منابع مختلف تهیه گردید. سیستم تقسیم ریشه برای غربال جدایه‌ها در القای مقاومت علیه این بیماری مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایش با ٤٢ تیمار شامل کنترل‌های مثبت و منفی و ۹ تکرار اجرا شد. بعد از چهار هفته، بیماری با نمره‌دهی به گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفت و شاخص وقوع بیماری برای هر تیمار محاسبه شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های Ps9، Ps14، Ps12 و Ps6 از سودومونادها و جدایه‌های Tr6 و Tr9 از تریکودرما به ترتیب با شاخص بیماری ٣٤/٤، ٣٤/٤، ٤٣/٨، ٤٦/٩، ١٢/٥ و ١٢/٥درصد بطور معنی‌داری باعث کاهش بیماری نسبت به شاهد شدند. در طی آزمایش بیمارگر و آنتاگونیست از هم جدا بودند و کنترل بیماری ناشی از یک پدیده بواسطه گیاه که همان مقاومت القایی می‌باشد، بود. نتایج نشان دهنده امیدبخش بودن کاربرد این عوامل بیوکنترل جهت کاهش بیماری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه، سیستم تقسیم ریشه‌ها، مقاومت القایی.

مقدمه

فرم اختصاصی *Fusarum oxysporum* f. sp. *radicis- cucumerinum* D.J. Vakalounakis اولین بار در سالهای ۱۹۹۰-۱۹۸۹ در کشت‌های گلخانه‌ای یونان مشاهده و گزارش شد (واکالوناکیس ١٩٩٦). این قارچ از سال ۱۳۸۲ در گلخانه‌های تولید خیار در مناطق جیرفت، یزد و ورامین که از مناطق مهم کشت خیار در ایران می‌باشند، شروع به گسترش نموده است (شهریاری و همکاران ۲۰۱۱). به‌طوری‌که یکی از عوامل محدود کننده کشت این محصول در بسیاری از گلخانه‌های پرورش جالیز در مناطق مختلف ایران می‌باشد. در حال حاضر کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش امیدبخش جایگزین جهت کنترل عوامل بیمارگر گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. ریزوسفر یک زیستگاه غنی از مواد غذایی است که باعث تجمع انواع متنوعی از قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شود. بعضی از این میکروارگانیسم‌ها با مکانیسم‌های مختلفی رشد گیاه را بهبود می‌بخشند (لوتنبرگ و کامیلوا ۲۰۰۹، وان در انت و همکاران ۲۰۰۹). سودومونادهای فلورسنت و قارچ‌های جنس تریکودرما از جمله آنها هستند که از

گیاهان با مکانیسم‌های مختلفی همچون آنتاگونیسم، رقابت، آنتی‌بیوز و القای مقاومت سیستمیک علیه بیمارگرها محافظت می‌کند (کلوپر و شروث ۱۹۸۰، وان لون و همکاران ۱۹۹۸و هارمن و همکاران ۲۰۰٤). مطالعه‌ی اثرات این عوامل در فعال‌سازی سیستم ایمنی گیاهان، شاخه جدیدی از این علم بوده که در سالهای اخیر به آن پرداخته شده است. استفاده از عوامل میکروبی مفید همچون باکتری‌های سودوموناد فلورسنت و قارچ‌های جنس تریکودرما که با کلنیزاسیون ریشه‌های گیاه باعث فعال شدن سیستم دفاعی گیاه و افزایش مقاومت گیاه به این بیمارگر می‌شود، روش مفید و سالمی جهت کاهش خسارت این بیماری می‌باشد. ایجاد بیماری در گیاهان و القای مقاومت علیه آنها تاریخچه‌ای به قدمت گیاهان دارد. تحقیقات مقاومت القایی در گیاهان مربوط به اواخر قرن ۱۹ و اوایل قرن ۲۰ می‌باشد (چستر ۱۹۹۳). لیو و همکاران (۱۹۹۵) استرین‌های 89B-27 از *P. putida* و 90-166 از *Serratia marcescens* را جهت القای مقاومت علیه پژمردگی فوزاریومی خیار ناشی از قارچ آوندی *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* با استفاده از سیستم تقسیم ریشه‌ها[1] مورد بررسی قرار دادند. این استرین‌ها با القای مقاومت باعث تأخیر ایجاد علائم بیماری، کاهش مرگ و میر بوته‌ها و محدود شدن گسترش قارچ بیمارگر در گیاه شدند. دی مایر و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که کاربرد استرین *T. harzianum* T39 در محلی دورتر از بیمارگر باعث کاهش بیماری ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* به‌میزان ۱۰۰-۲۵ درصد می‌شود. یدیدا و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که استرین *T. harzianum* T-203 در اپیدرم و کورتکس ریشه نشاهای خیار نفوذ کرده و باعث فعال شدن واکنش‌های دفاعی همچون نشت کالوز، ضخیم شدن دیواره سلول‌ها و افزایش سیستمیک گذرای PR پروتئین‌ها و پراکسیداز می‌شود. در این پژوهش جدایه‌هایی از تریکودرما و سودوموناد‌های فلورسنت از ریزوسفر خیار جداسازی گردید و برخی سویه‌های شناخته شده از این عوامل بیوکنترل از منابع مختلف تهیه و در القای مقاومت علیه این بیماری مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های ریشه همراه با خاک اطراف آنها از گلخانه‌های خیار مناطق مهم کشت‌های گلخانه‌ای شامل: جیرفت، ورامین، پاکدشت و هشتگرد تهیه و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس تا مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. ۲۰ گرم از بافت ریشه‌ای همراه با خاک ریزوسفر را با هاون خرد و با ۲۰۰ میلی‌لیتر سولفات منیزیوم ۰/۰۱ مولار سترون مخلوط کرده و به مدت دو ساعت روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس از سوسپانسیون حاصله سری رقت تهیه و از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر در سطح تشتک حاوی محیط کشت انتخابی برای قارچ تریکودرما به نام مک فادن و ساتِن[2] پخش گردید. برای تهیه این محیط مقدار یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم، پنج گرم پپتون، ۱۰گرم گلوکز، ۱۷ میلی گرم رز بنگال و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر آماده و پس از سترون کردن، ۳۰ میلی گرم سولفات استرپتومایسین و ۰/۲ میلی لیتر فرمالدهید به آن اضافه شد (داوت و راکسل ۲۰۰۰). بعد از سه تا پنج روز کلونی‌های تریکودرما انتخاب و خالص‌سازی شدند. برای خالص‌سازی جدایه‌های تریکودرما از روش نوک هیف استفاده شد. برای جداسازی باکتری‌های سودوموناد فلورسنت نیز از روش سری رقت با محیط کشت انتخابی S1 حاوی ترکیبات ۱۸

[1]Split root system

[2]McFadden and Sutton's RB-S-F selective medium

گرم آگار، ۱۰ گرم ساکارز، ۱۰ میلی لیتر گلیسرول، پنج گرم کازامینواسید، یک گرم بیکربنات سدیم، یک گرم سولفات منیزیم، ۱/۲ گرم سدیم لوریل سارکوزین، ۲/۳ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، و ۲۰ میلی گرم آنتی بیوتیک تری متوپریم در یک لیتر آب مقطر استریل استفاده شد (گلد و همکاران ۱۹۸۵). تشتک‌های کشت داده شده سپس در انکوباتور تاریک دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از ٤٨ ساعت کلونی‌های باکتریایی با روش تک کلونی خالص گردیدند. کلونی‌های خالص شده جدایه‌های سودوموناس با استفاده از لامپ UV در طول موج ٣٦٠ نانومتر از نظر فلورسنت بودن مورد آزمایش قرار گرفتند.

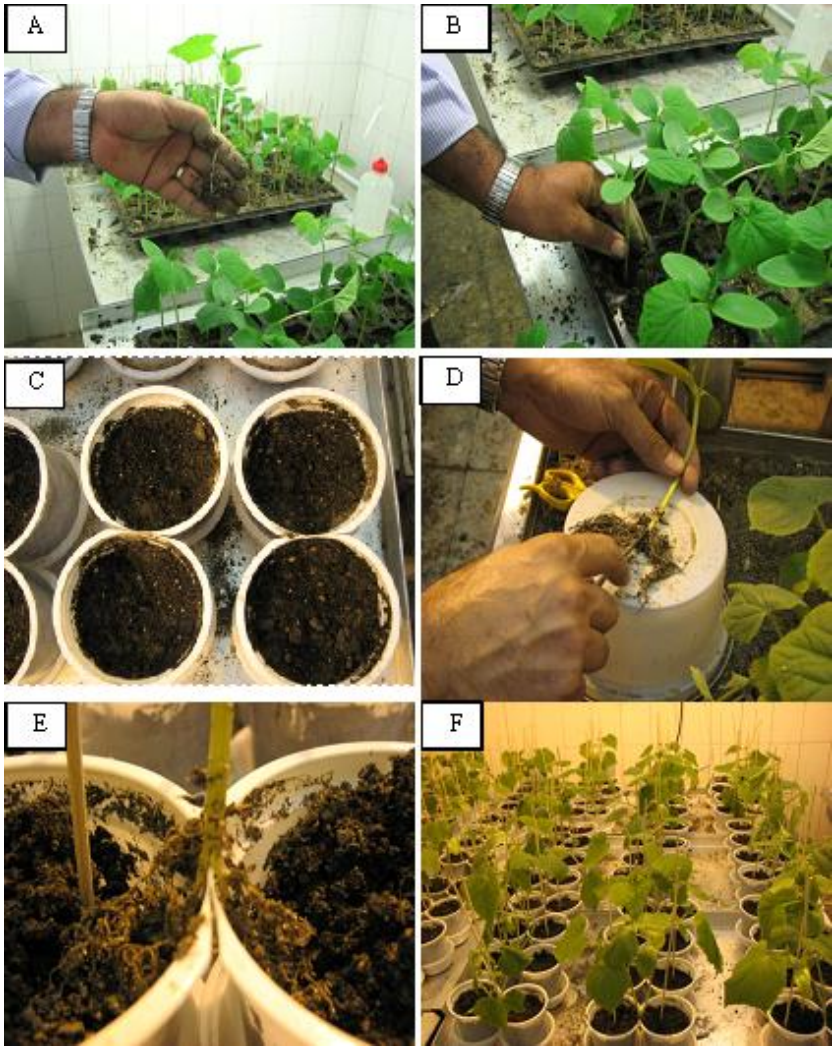
قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 از مرکز تحقیقات کشاورزی جیرفت دریافت شد. بذر خیار هیبرید رقم بارز برای آزمایشات از شرکت کشاورزی هامون تهیه گردید.

برای غربال جدایه‌های تریکودرما و سودوموناس جهت پیدا کردن جدایه‌هایی که قادر به القای مقاومت در گیاه خیار علیه قارچ فوزاریوم استرین F42 می‌باشند، از روش تقسیم ریشه‌ها به شرح زیر استفاده شد. بذور خیار پس از ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار شستشو با آب مقطر سترون، به مدت ٢٤ ساعت برای جوانه‌زنی بین کاغذ صافی مرطوب سترون در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. بذور جوانه زده در گلدان‌های پر شده با ورمیکولیت سترون کشت گردید. یک هفته پس از رویش، نشاها در اتاقک رشد با دمای ٢٤ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و ١٤ ساعت روشنایی، از گلدان خارج و جهت تحریک ریشه‌زایی در قسمت‌های بالای ریشه، انتهای ریشه‌ها با قیچی هرس و سپس مجدداً در گلدان‌های مربوطه کشت شدند. نشاها به مدت یک هفته دیگر به اتاقک رشد منتقل شدند. در مرحله دو برگ حقیقی نشاها از گلدان خارج و با تکان ملایم بستر کشت چسبیده به آنها را جدا کرده، سپس به‌وسیله یک تیغ تیز با ایجاد شکاف طولی در یقه، ریشه‌ها به دو قسمت مساوی تقسیم شدند. در نهایت هر بخش از ریشه‌ها به یکی از دو گلدان چسبیده به هم و پر شده با خاک دو بار سترون منتقل شد (**Error! Reference source not found.**).

خاک گلدان‌ها مخلوطی از پیت موس، شن و خاک رس بود که دو بار به فاصله ٢٤ ساعت سترون شده بود. بعد از سه روز که استرس‌های وارد شده به نشاها برطرف و شروع به رشد نمودند، یک سمت از ریشه‌ها با جدایه‌های انتخابی تریکودرما با تراکم جمعیت $۱۰^{٦}$ اسپور به ازای هر گرم خاک گلدان و سودوموناس با تراکم جمعیت $۱۰^{۷}$ سلول به ازای هرگرم خاک گلدان تلقیح شدند. پس از سه روز، بخش دیگر ریشه‌ها با قارچ بیمارگر با تراکم جمعیت $۱۰^{٥}$ اسپور به ازای هر گرم خاک گلدان تلقیح شد. در تیمار شاهد بجای سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست، سولفات منیزیوم یک صدم مولار اضافه شد. گیاهان در طول دوره با آب مقطر سترون آبیاری شدند. بعد از مدت سه هفته علائم بیماری ظاهر گردید. شدت بیماری با دادن رتبه به هر تکرار برآورد شد. این سیستم شامل چهار رتبه: صفر، برای گیاه سالم؛ یک، برای گیاهان با علائم تغییر رنگ و پوسیدگی ملایم ساقه؛ دو، برای گیاهان با پوسیدگی شدید ساقه و سه، برای گیاهان پژمرده و مرده در نظر گرفته شد. شاخص بیماری[1] طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد شاخص بیماری} = \frac{\Sigma(\text{تعداد گیاه بیمار در هر رتبه} \times \text{رتبه})}{\text{تعداد کل گیاهان بیمار در هر رتبه} \times \text{بالاترین رتبه}} \times ۱۰۰$$

[1]Disease Incidence Index



شکل ۱ -مراحل اجرایی سیستم تقسیم ریشه برای غربال جدایه‌های تریکودرما و سودوموناس جهت مقاومت القایی، A و B : هرس ریشه‌ها یک هفته پس از رویش و کشت مجدد آنها. C: گلدان‌های به‌هم چسبیده. D: هرس ریشه‌ها و تقسیم آنها به دو قسمت مساوی. ، E: کشت هر نشا در دو گلدان به‌هم چسبیده. F: نگهداری گلدان‌ها در اتاقک کشت.

این آزمایش در دو بخش (تریکودرما و سودوموناس) هر بخش شامل ۲۱ تیمار (۲۰ جدایه از سودوموناس یا تریکودرما و شاهد) و هشت تکرار در قالب یک طرح کاملا تصادفی اجراء شد. سپس داده‌های بدست آمده با روش Cox-Box تبدیل و نرمال شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با آزمون تجزیه واریانس انجام و گروه بندی تیمارها با آزمون چند دامنه دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد (لیو و همکاران ۱۹۹۵، خان و همکاران ۲۰۰٤ و سگارا و همکاران ۲۰۰۷). جهت کنترل جدا ماندن آنتاگونیست‌ها و بیمارگر، در پایان آزمایش از ریشه‌ها در سطح محیط کشت PDA و KingB آگار کشت صورت گرفت و رشد فوزاریوم، تریکودرما و سودوموناس‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

تعداد ده جدایه تریکودرما از ریزوسفر خیار جداسازی گردید و ده استرین تریکودرما ازجمله *Trichoderma harzianum* T22 و *T. harzianum* T39 که از استرین‌های جهانی موثر تریکودرما در القای مقاومت می‌باشند، از منابع ذکر شده در جدول یک تهیه گردید (جدول ۱).

۱۸ جدایه از سودوموناس جداسازی گردید و دو جدایه CHA0 و UTPF5 نیز از منابع دیگر تهیه گردید (جدول ۲).

جدول ۱- جدایه‌های انتخابی قارچ تریکودرما جهت غربال برای مقاومت القایی علیه *F. oxysporum* f. sp. *radices-cucumerinum* F42. (حروف داخل پرانتز نام جدایه برای این جدایه‌ها در این تحقیق می‌باشد). ده جدایه اول (Tr1 تا Tr10) در این تحقیق جداسازی و خالص‌سازی گردید و ده جدایه بعدی از منابع مختلف ذکر شده در این جدول تهیه شد).

منبع یا محل جداسازی	جدایه	منبع یا محل جداسازی	جدایه
هشتگرد	Tr1	کلکسیون ابوریحان	*T. harzianum* T39
ورامین	Tr2	کلکسیون ابوریحان	*T. hamatum* T100 (Tr12)
جیرفت	Tr3	کلکسیون ابوریحان	*T. pseuodokoningii* (Tr13)
هشتگرد	Tr4	کلکسیون ابوریحان	*T. hamatum* 10 Bi (Tr14)
هشتگرد	Tr5	دکتر شهرام نعیمی	*T. atroviride* (Tr16)
پاکدشت	Tr6	دکتر شهرام نعیمی	*T. harzianum* (Tr17)
پاکدشت	Tr7	دکتر شهرام نعیمی	*T. harzianum* (Tr20)
ورامین	Tr8	دکتر شهرام نعیمی	*T. virens* (Tr19)
ورامین	Tr9	دکتر اکبر شیرزاد	*T. atroviride* (Tr15)
جیرفت	Tr1	از فرموله تجاری	*T. harzianum* T22
	0	Trianum-p	

جدول ۲ -جدایه‌های انتخابی سودوموناد فلوروسنت جهت غربال برای مقاومت القایی علیه *F. oxysporum* f. sp. *radices-cucumerinum* F42.

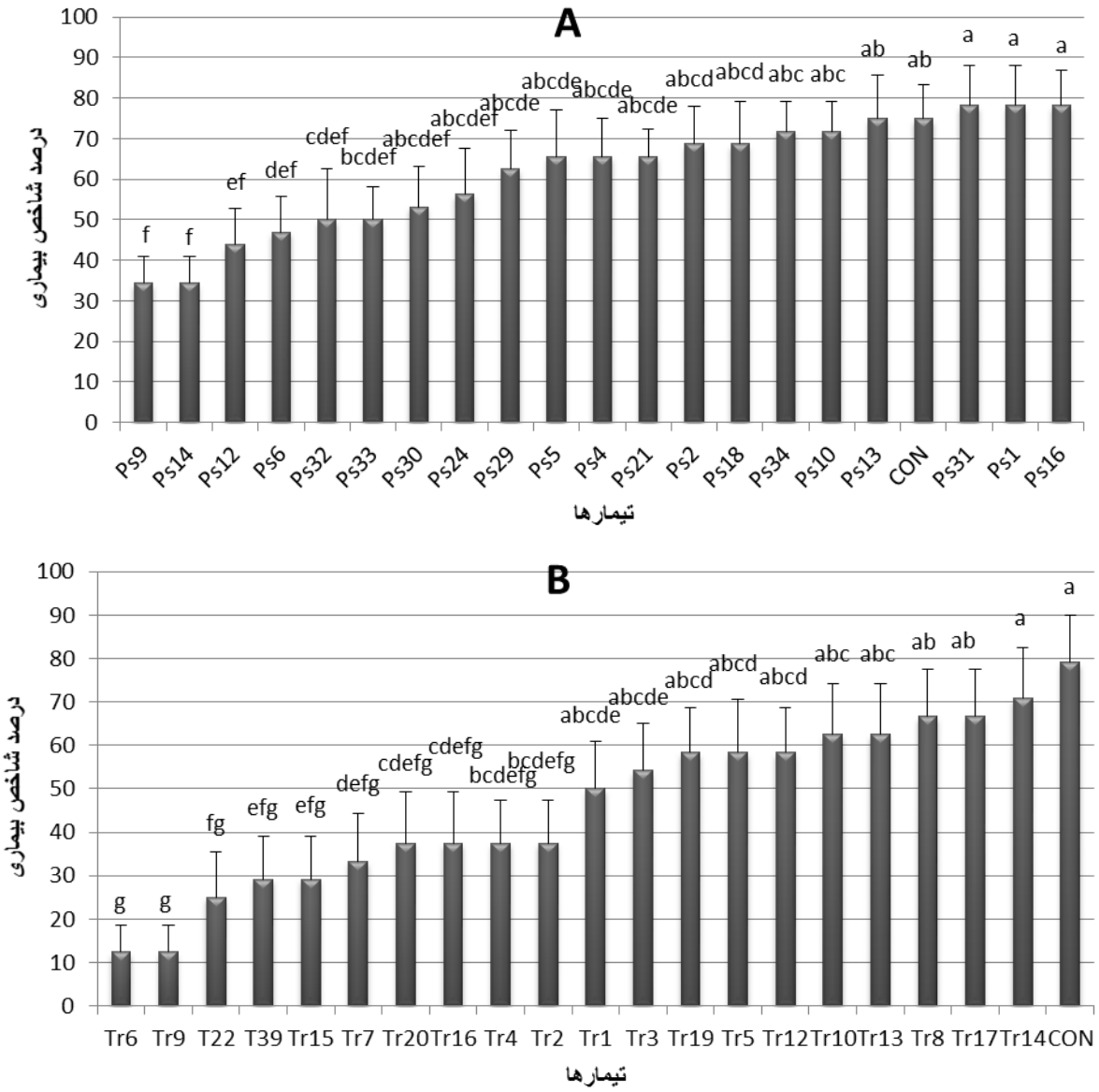
منبع یا محل جداسازی	جدایه	منبع یا محل جداسازی	جدایه
جیرفت	Ps9	جیرفت	Ps5
جیرفت	Ps14	جیرفت	Ps4
جیرفت	Ps12	جیرفت	Ps2
جیرفت	Ps6	جیرفت	Ps18
جیرفت	Ps32	دکتر فاطمه جمالی	CHAO (Ps34)
هشتگرد	Ps33	جیرفت	Ps10
ورامین	Ps30	جیرفت	Ps13
پاکدشت	Ps24	جیرفت	Ps16
ورامین	Ps29	کلکسیون باکتری‌های دانشگاه تهران	UTPF5 (Ps31)
پاکدشت	P21	جیرفت	Ps1

در ریزوسفر گیاهان تنوعی از میکروارگانیسم‌های مفید وجود دارد که با مکانیسم‌های مختلف باعث بهبود رشد گیاهان می‌شوند. برخی از این میکروارگانیسم‌ها با تغییر در فیزیولوژی گیاه باعث القای مقاومت در گیاه و کاهش بیماری‌های مختلف گیاهی می‌شوند. برای شناخت میکروارگانیسم‌های القاکننده مقاومت باید میکروارگانیسم‌های جدا شده از ریزوسفر گیاه با الگویی که بیمارگر و القا کننده مقاومت در بخش‌های مجزا از هم گیاه بکار روند، غربال شوند. در مواردی که بیمارگر و عامل القا کننده خاکزی هستند یکی از روش‌های غربال، روش تقسیم ریشه‌ها است که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج حاصل از این آزمایش با ۲۰ جدایه تریکودرما و ۲۰ جدایه سودوموناد فلورسنت نشان داد که جدایه‌های Tr6 و Tr9 که در این تحقیق از ریزوسفر خیار جداسازی گردیدند بیشترین تاثیر را در کاهش بیماری داشتند و

به ترتیب با شاخص وقوع بیماری ۱۲/۵ و ۱۲/۵ درصد از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند در حالیکه شاخص وقوع بیماری در شاهد ۷۹/۱٦۷ درصد بود (شکل ۲ B). این جدایه‌ها اگرچه از نظر تاثیر در القای مقاومت با استرین‌های T22 و T39 (که از استرین‌های موثر در القای مقاومت گزارش شده‌اند) (دی مایر و همکاران ۱۹۹۸، هارمن و همکاران ۲۰۰٤) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند اما در گروهی مجزا قرار گرفتند و در القای مقاومت علیه این بیماری موثرتر بودند. هر چهار جدایه ذکر شده از نظر آماری با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. جدایه‌های Ps14، Ps9، Ps12 و Ps6 از سودوموناده‌های فلورسنت نیز بیشترین تاثیر را در القای مقاومت علیه این بیماری داشتند و به‌ترتیب با شاخص وقوع بیماری ۳٤/٤، ۳٤/٤، ٤۳/۸ و ٤٦/۹ درصد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشته و با شاهد در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۲A).

در این آزمایش طبق شکل شماره ۲، تعداد یازده جدایه سودوموناس و هفت جدایه تریکودرما تاثیری در کاهش بیماری از طریق القای مقاومت در گیاهان تیمار شده نشان ندادند که بیانگر استرین اختصاصی تریکودرما و سودوموناس در القای مقاومت می باشد. کشت قسمت‌های مختلف ریشه گیاهان تیمار شده با آنتاگونیست و بیمارگر در سطح محیط کشت PDA و King B آگار نشان داد که بیمارگر و آنتاگونیست در طی آزمایش از هم جدا بوده‌اند و کاهش بیماری بدلیل القای مقاومت در گیاه به‌وسیله این آنتاگونیست‌ها می‌باشد. نتایج حاصله بیانگر توانایی جدایه‌های تریکودرما و سودوموناس فلورسنت در القای مقاومت علیه این بیماری می‌باشد که با نتایج حاصله در مورد این عوامل بیوکنترل در القا مقاومت مطابقت می‌نماید (لیو و همکاران ۱۹۹۵، خان و همکاران ۲۰۰٤، هارمن و همکاران ۲۰۰٤، سگارا و همکاران ۲۰۰۷). نتایج همچنین بیانگر استرین اختصاصی تریکودرما و سودوموناس‌ها در القا مقاومت در گیاهان مختلف علیه بیمارگرهای مختلف می‌باشد (هارمن و همکاران ۲۰۰٤). زیرا که استرین‌های CHA0 و UTPF5 که در القای مقاومت موثر گزارش شده‌اند (ایاویکولی و همکاران ۲۰۰۳)، در مورد این سیستم گیاه و بیمارگر تاثیر چندانی در القای مقاومت نداشتند. درصد کاهش شاخص بیماری نسبت به شاهد توسط جدایه‌های جدا شده از ریزوسفر خیار از طریق القای مقاومت در این پژوهش، بیانگر امیدبخش بودن نقش و کاربرد این عوامل بیوکنترل در مدیریت تلفیقی این بیماری می‌باشد (شکل۳). در تحقیقات متعددی مشخص شده است که باکتری های سودوموناس که به ریزوسفر گیاه تلقیح شدند با مکانیسم مقاومت القایی از بیمارگرهای قسمت های هوایی گیاه مانند بیماری های ساقه (ون پییر و همکاران، ۱۹۹۱) و برگ (وی و همکاران، ۱۹۹۱) ممانعت کرده و همچنین در کنترل بیمارگرهای ریشه مفید هستند (لیمن و همکاران، ۱۹۹٦).

در تحقیق حاضرنیز حضور باکتری‌های سودوموناس در ریزوسفر از طریق مکانیسم مقاومت القایی باعث کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی در خیار شده است. مقاومت القایی یک روش محافظت بیولوژیک محسوب میشود که هدف آن محدود کردن بیمارگر نیست؛ بلکه فعال کردن مقاومت در گیاه است. کلنیزه شدن ریشه با بعضی باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه در تحریک مقاومت سیستمیک در برابر عوامل بیماریزای قارچی و حتی باکتریایی، ویروسی و نماتدها مؤثر است (مورثی و همکاران، ۲۰۱٤). برای درک نقش باکتری سودوموناس در ایجاد مقاومت القایی، میزان کلنیزاسیون ریشه و نقش ترشحات ریشه خیار در افزایش فعالیت مفید این باکتری ها نیز نیاز به ارزیابی دارد.

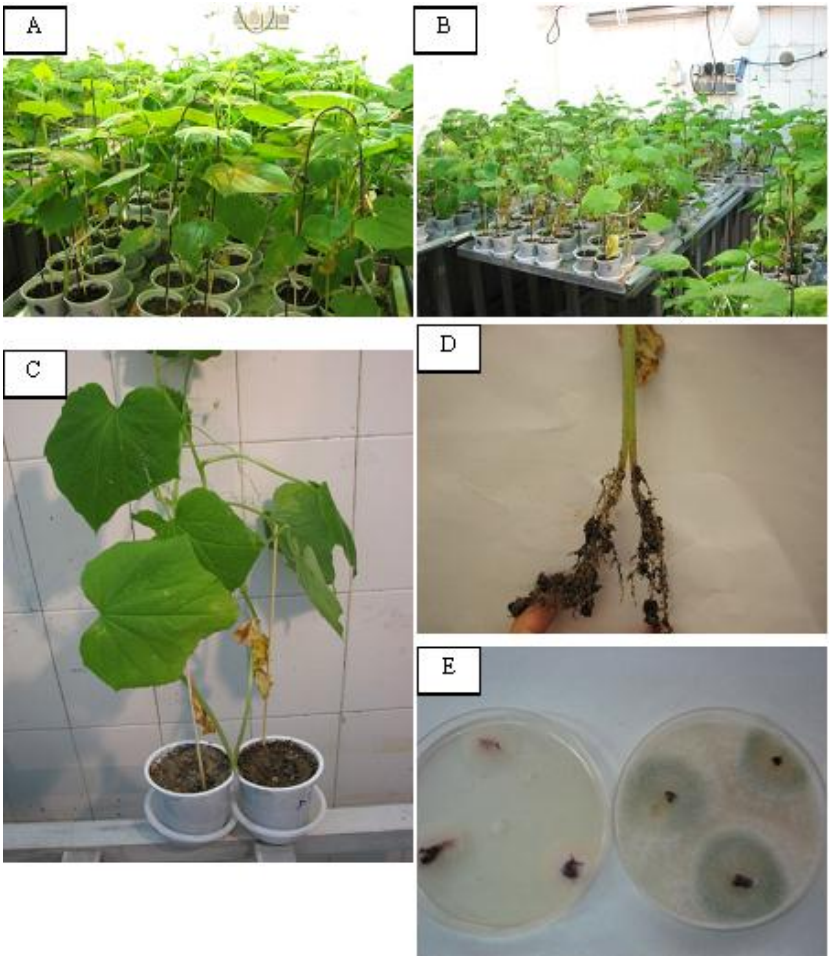


شکل ۲ - غربال جدایه‌های سودوموناد فلورسنت (A) و تریکودرما (B) جهت القای مقاومت علیه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 با روش تقسیم ریشه‌ها. پس از تقسیم ریشه‌ها و کشت آنها در دو گلدان، یک سمت ریشه‌ها با جدایه‌های تریکودرما و سودوموناس و سه روز بعد سمت دیگر با قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42 تلقیح شد. ارزیابی بیماری با رتبه دادن به تیمارها و سپس تبدیل رتبه‌ها به درصد انجام شد. میانگین درصد وقوع بیماری در تیمارهای مختلف پس از تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند ($P<0.05$). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

مهمترین برتری بیوکنترل از طریق مکانیزم القای مقاومت، این است که برخلاف مکانیزمهای دیگر که تنها در حضور آنتاگونیست فعال امکان پذیرند، در این نوع حفاظت پس از القا در گیاه در صورت کاهش جمعیت آنتاگونیست نیز مقاومت پایدار خواهد بود (ون لون و ون استریین، ۱۹۹۹).

با توجه به اینکه در این بررسی سویه‌های بومی از سویه‌های مرجع که گزارشات زیادی از تاثیر آنها موجود هست، موثر تر عمل نموده‌اند، می توان برای کنترل بیولوژیک در هر منطقه جداسازی و غربال

جدایه‌های بومی را توصیه کرد که این نتـایج بـا سـایر تحقیقـات (لاتـا و همکـاران، ۲۰۰۹) نیـز در یـک راسـتا می‌باشد.



شکل ۳ -آزمایشات گلخانه‌ای سیستم تقسیم ریشه گیاه خیار و کشت قسمت‌های مجزا روی محیط کشت جهت کنترل عدم انتقال آنتاگونیست به قسمت تلقیح شده با *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* F42. A گیاهان در حال رشد در اتاقک کشت. B شروع علائم بیماری. C گلدان‌های بهم چسبیده با گیاهان رشد یافته در آنها. D دو قسمت مجزای ریشه‌ها که یک قسمت با بیمارگر و قسمت دیگر با تریکودرما یا سودوموناس تلقیح شده است. E عدم رشد بیمارگر و آنتاگونیست در طرف مقابل ریشه‌ها.

منابع

Chester KS, 1993. The problem of acquired physiological immunity in plants. The Quarterly Review of Biology. 8**:** 275-324.

Davet P and Rouxel F, 2000. Detection and isolation of soil fungi. In: Thanikaimoni K, (ed.), Soil fungi-Laboratory manuals. Science Publishers, USA, 188pp.

De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y and Höfte M, 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104**:** 279-286.

Gould WD, Hagedorn C, Bardinelli TR and Zablotowicz RM, 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. Applied and

Environmental Microbiology 49**:** 28-32.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I and Lorito M, 2004 .*Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews 2**:** 43-56.

Khan J, Ooka JJ, Miller SA, Madden LV and Hoitink HAJ, 2004. Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against *Phytophthora* crown rot and leaf blight. Plant Disease 88**:** 280-286.

Kloepper JW and Schroth MN, 1980. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. Phytopathology 71:642-644.

Iavicoli A, Boutet E, Buchala A and Metraux JP, 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Molecular Plant Microbe Interaction 16**:** 851-858.

Latha P, Anand T, Ragupathi N, Prakasam V and Samiyappan R, 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. Biological Control 50: 85–93.

Leeman M, Den Ouden F M, Van Pelt J A, Dirkx F PM, Steijl H, Bakker PAHM and Schippers B, 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology 86: 149-155.

Liu L, Kloepper JW and Tuzun S, 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 85**:** 695-698.

Lugtenberg B and Kamilova F, 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology 63**:** 541-556.

Marx J, 2004. The roots of plant-microbe collaborations. Science 304**:** 234-236.

Murthy KN, Uzma F and Srinivas CC, 2014. Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. American Journal of Plant Sciences 5: 1799-1811.

Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E and Trillas I, 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. Plant Proteomics 7**:** 3943-3952.

Shahriari D, Molavi E, Aminian H and Etebarian H, 2011. Histopathological response of resistant and susceptible cultivars of cucumber to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of *Fusarium* stem and root rot. Seed and Plant Improvement Journal 27-1(3): 375-391.

Vakalounakis DJ, 1996. Root and Stem Rot of Cucumber Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. Plant Disease 80**:** 313-316.

Van der Ent S, Van Hulten M, Pozo MJ, Czechowski T, Udvardi MK, Pieterse CM and Ton J, 2009. Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and beta-aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. New Phytologist 183**:** 419-431.

Van Loon LC, Bakker PAHM and Pieterse CMJ, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36**:** 453-483.

Van Loon LC and Van Strien EA, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Van Peer R, Niemann GJ and Schippers B, 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. Phytopathology 81:728-734.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo SL and Lorito M, 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40**:** 1-10.

Wei G, Kloepper JW and Tuzun S, 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 81:1508-1512.

Yedidia II, Benhamou N and Chet II, 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) By the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environomental Microbiology 65**:**1061-1070.

Induction of Systemic Resistance (ISR) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* on Cucumber by Isolates of *Trichoderma* and Fluorescent Pseudomonads from Cucumber Rhizosphere

H Alizadeh[1] and Kh Salari[2*]

[1]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft.
[2]Lecturer, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft.
*Corresponding author: Khadijeh.salari@ujiroft.ac.ir

Received: 28 Sep 2015 Accepted: 12 Jun 2016

Abstract

Fusarium stem and root rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* is an important disease in cucumbers. Induced systemic resistance (ISR) by *Trichoderma* and Fluorescent Pseudomonads is a promising method for biocontrol of this disease. Twenty isolates of *Trichoderma* and 20 isolates of fluorescent Pseudomonads were isolated from cucumber rhizosphere by Macfaden-Saten and S1 selective media respectively. Spilt root system was used for screening these isolates for induction of systemic resistance against this disease. The experiment was performed with 42 treatments including positive and negative control and nine replicates. After four weeks, the disease was evaluated by scoring the plants and the disease incidence for each treatment was estimated. The result, showed that Ps9, Ps14, Ps12, and Ps6 isolates of Pseudomonads and Tr6 and Tr9 isolates of *Trichoderma* with disease indices 34.4, 34.4, 43.8, 46.9, 12.5 and 12.5%, respectively, reduced the disease incidence significantly compared with control. During the experiment pathogen and antagonists were separate from each other and the control of the disease was due to a plant mediated phenomena which seems to be induced systemic resistance. The results are promising in applying these biocontrol agents for control of this disease.

Keywords: Induced Resistance, *Fusarium* Stem and Root Rot, Split Root System.