

بررسی عملکرد ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به بیماری پژمردگی باکتریایی (*Ralstonia solanacearum*) و کنترل زیستی این بیماری

حسین میرزایی نجفقلی^۱، سوما نریمانی^۱، میلاد آیینی^۲، سید محسن تقوی^۲، سعید طریقی^۳ و محمد جواهری^۳

۱- دانشگاه لرستان، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی

۲- دانشگاه بوعلی همدان، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی

۳- دانشگاه شیراز، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی

۴- دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی

مسئول مکاتبات: حسین میرزایی نجفقلی، پست الکترونیک: mirzaeih89@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۱/۲۶

۴۷-۵۷ (۲) ۲

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۷

چکیده

یکی از عوامل محدود کننده‌ی تولید گوجه‌فرنگی در دنیا بیماری پژمردگی باکتریایی با عامل *Ralstonia solanacearum* L. می‌باشد. با توجه به اهمیت این بیماری در گوجه‌فرنگی، یافتن ارقام مقاوم و استفاده از عوامل کنترل زیستی می‌تواند یک راهکار مؤثر و بی‌خطر در کاهش خسارت این بیماری می‌باشد. در این پژوهش از ارقام فلات-۱۱۱، سوپر کوین، سوپرسی‌اچ، پتو، فالکاتا، کال جی ان-۳ و ارلی اوربانا استفاده شد. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با یک عامل بیماری در دو سطح (آلودگی و عدم آلودگی) و عامل رقم با هفت سطح در چهار تکرار انجام شد. آنالیز آماری با نرم افزار SAS صورت گرفت. همچنین از عوامل آنتاگونیست *Bacillus subtilis* B7، *Trichoderma harzianum* T.BI و *Pseudomonas fluorescens* CHAO برای ارزیابی تأثیر آن‌ها در فاکتورهای رشدی و کنترل بیماری استفاده شد. در بررسی اثر ضدباکتریایی عوامل آنتاگونیست در محیط کشت، باکتری *B. subtilis* B7 و قارچ *T. harzianum* T.BI به ترتیب هاله‌ی بازدارنده به قطر ۵ و ۳ میلی‌متر ایجاد نمودند، اما باکتری *P. fluorescens* CHAO هیچ هاله‌ای روی محیط کشت ایجاد نکرد. نتایج مقایسه میانگین شاخص‌های عملکردی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نشان داد که از نظر شاخص طول ساقه رقم سوپر کوین کمترین کاهش و رقم ارلی اوربانا بیشترین کاهش طول ساقه را در تیمار آلوده نشان داد. در شاخص وزن تر اندام‌های هوایی ارقام، رقم سوپر کوین کمترین و ارقام سوپرسی‌اچ، فلات و فال کاتا بیشترین کاهش وزن تر را نشان دادند. همچنین کمترین کاهش وزن خشک اندام هوایی در تیمار آلوده رقم سوپر کوین بود. نتایج استفاده از عوامل آنتاگونیست نشان داد، که قارچ *T. harzianum* T.BI و باکتری *B. subtilis* B7 از نظر شاخص‌های طول ساقه، وزن تر اندام هوایی و ریشه و وزن خشک اندام هوایی و ریشه بهترین گزینه برای کنترل پژمردگی باکتریایی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: فاکتور رشدی، *Ralstonia solanacearum* ارقام مقاوم، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

بیماری‌ها، مقاومت به تنش‌های محیطی، تولید در واحد سطح، سازگاری به شرایط محیط کشت (فضای آزاد یا گلخانه) و خصوصیات ظاهری با هم متفاوت هستند. عوامل متعددی مانند آفات، بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی، علف‌های هرز و شرایط آب و هوایی و خاکی نامساعد سبب کاهش بازدهی در تولید گوجه‌فرنگی

گوجه‌فرنگی گیاهی است چند ساله که اغلب به صورت یک ساله کشت می‌شود. این گیاه یکی از اعضای خانواده‌ی بادمجانیان Solanaceae و جنس *Lycopersicon* است، که شامل چندین گونه می‌باشد (Gheshm, & Kafi, 2009; Khodaei et al., 2009). ارقام مختلف گوجه‌فرنگی موجود از نظر طول دوره‌ی رسیدن، مقاومت به آفات و

مختلف در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشت (Azadvar et al., 2008).

نگوین و راماناخراچی نشان دادند که سه آنتاگونیست *Enterobacter cloacae*، *Bacillus megaterium* و *Candida ethanolica* جدا شده از خاک و *Pichia guillermondii* پتانسیل بالایی برای سرکوب کردن بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی و افزایش وزن میوه، بیومس و ارتفاع گیاه دارند. در پژوهشی دیگر چن و همکاران برای کنترل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی ۶۰ جدایه *Bacillus subtilis* از نقاط مختلف چین جمع‌آوری نمودند که در بین این جدایه‌ها، شش جدایه اثر کنترلی بالاتر از ۵۰ درصد از خود نشان دادند (Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010). با توجه به اهمیت این بیماری و ضرورت کنترل آن به روش غیر شیمیایی و سازگار با محیط زیست، هدف از این پژوهش، استفاده از ارقام مقاوم و عوامل آنتاگونیست *Trichoderma pseudomonas* و *Bacillus subtilis harzianum* T.BI *fluorescens* CHAO در کنترل این بیماری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش باکتری‌های *R. solanacearum* و *P. fluorescens* CHAO از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی شیراز و قارچ *T. harzianum* T.BI و *B. subtilis* B7 از بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی مشهد تهیه گردید. همچنین از ارقام رایج گوجه‌فرنگی شامل فلات-۱۱۱، سوپر کوین، سوپرسی‌اچ، پتو، فالکاتا، کال-جی‌ان، ارلی اوربانا و موویل استفاده گردید.

تهیه سوسپانسیون باکتری

برای تهیه سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست و بیمارگر از کشت تازه (۲۴ ساعته) باکتری استفاده شد. ابتدا باکتری روی محیط کشت NA کشت گردید. پس از رشد پرگنه‌های باکتری، چند پرگنه برداشته و در آب مقطر استریل سوسپانسیون گردید. در نهایت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سوسپانسیون 10^{10} CFU/ml باکتری تهیه شد (Kim et al., 1997).

می‌شوند. بیماری پژمردگی باکتریایی (Bacterial Wilt) که توسط باکتری *Ralstonia solanacearum* ایجاد می‌شود، یکی از عوامل محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی در دنیاست که اولین بار در سال ۱۸۸۲ در ایتالیا در گوجه‌فرنگی مشاهده شده است. این باکتری دارای دامنه‌ی میزبانی وسیعی است و تاکنون در بیش از ۴۵۰ گونه گیاهی به‌عنوان بیمارگر گزارش شده است (Hayward et al., Kelman, 1953). علائم این بیماری ابتدا در برگ‌های جوان ظاهر و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی، کل گیاه دچار پژمردگی می‌شود (Agrios, 2005). برای کنترل این بیماری می‌توان از روش‌های زراعی، شیمیایی، آفتاب‌دهی، مدیریت تلفیقی و کنترل زیستی استفاده کرد (Elphinstone, 2005). با توجه به مشکلات استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل بیمارگرها، جستجو برای یافتن روش‌های ایمن برای کنترل بیماری‌های گیاهی ضروری به‌نظر می‌رسد. در بین روش‌های کنترلی موجود، استفاده از ارقام مقاوم و روش کنترل زیستی جزو روش‌های ایمن و مؤثر در کنترل این بیماری است. عوامل کنترل زیستی با استفاده از سازوکارهای پادزیستی (antibiosis)، رقابت (competition)، پارازیتیسم (parasitism) و القای مقاومت سیستمیک (induced systemic resistance) می‌توانند از بیماری‌های گیاهی ممانعت کنند (Chet & Inbar, 1994; Handelsman & Stabb, 1996). گریمالت و پریور، بیماری‌زایی باکتری *R. solanacearum* را در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی بررسی و نتیجه گرفتند، که ارقام مختلف از نظر میزان شدت پژمردگی اختلاف معنی‌داری با هم دارند. در این بررسی شدت بیماری در ارقام *FLORDEL*، *FMTT3* و *CLN657* بالا و در ارقام *CRA66* و *Caralbo* کم بود. همچنین رقم *Hawai 7996* هیچ‌گونه علائم ظاهری را از خود نشان نداد (Grimault & Prior, 1994). آزادوار و همکاران تحمل یازده رقم تجاری سیب‌زمینی را در برابر جدایه‌ی GD بایووار A2، نژاد سه باکتری *R. solanacearum* با مایه‌زنی به ساقه و ریشه مورد ارزیابی قرار دادند. واکنش ارقام با محاسبه شاخص شدت بیماری (DSI) و درصد وقوع بیماری (DI) ارزیابی شد. در مایه‌زنی به ریشه، شدت بیماری ارقام

بررسی مقاومت ارقام مختلف گوجه‌فرنگی

برای بررسی مقاومت ارقام مختلف گوجه‌فرنگی، از نشاهای گوجه‌فرنگی در مرحله‌ی ۴-۵ برگ‌گی استفاده شد. نشاها به گلدان‌های حاوی خاک سترون به‌نسبت ۱:۱ (خاک و ماسه) منتقل گردیدند. به‌منظور جذب بهتر سوسپانسیون باکتری، نشاها تحت تنش خشکی قرار داده شدند. سپس با سوزن، قسمت انتهایی ساقه نشاهای گوجه‌فرنگی زخم و یک قطره از سوسپانسیون 10^6 CFU/ml روی آن قرار داده شد. بعد از مایه‌زنی، گلدان‌ها آبیاری و به‌مدت ۳۰ روز داخل گلخانه در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری طبیعی (۱۰ ساعت) نگهداری شدند. این آزمون در چهار تکرار حاوی گلدان‌های سالم و مایه‌زنی شده انجام شد و بعد از ۳۰ روز گلدان‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی مقاومت معیارهایی نظیر طول ساقه، وزن تر و خشک قسمت‌های هوایی اندازه‌گیری گردید.

طرح آزمایشی در قالب فاکتوریل کاملاً تصادفی با یک عامل بیماری در دو سطح آلودگی و عدم آلودگی و عامل رقم با هفت سطح در چهار تکرار و در مجموع ۵۶ گلدان انجام شد و آنالیز آماری با نرم افزار SAS صورت گرفت.

بررسی اثر ضدباکتریایی عوامل آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

به‌منظور بررسی اثر ضدباکتری عوامل باکتریایی از روش اصلاح شده نگوین و راماناخراچی استفاده شد (Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010). ابتدا سوسپانسیون 10^6 سلول باکتری در میلی‌لیتر *R. solanacearum* با محیط کشت M9 مخلوط و در تشتک‌های پتری ریخته شد. پس از جامد شدن محیط کشت، باکتری‌های آنتاگونیست به‌صورت نقطه‌ای کشت گردیدند. همچنین به‌منظور بررسی اثر ضدباکتری قارچ *T. harzianum* T.BI به‌روش واتس و همکاران (Watts et al., 1988) انجام شد. ابتدا قارچ *T. harzianum* T.BI در محیط کشت PDB کشت گردید و به‌مدت هفت روز روی شیکر قرار داده شد. سپس باکتری به‌صورت چمنی روی محیط کشت NA کشت گردید، و 10^6 میکرولیتر از رانشین ترشحات قارچ تریکودرما به

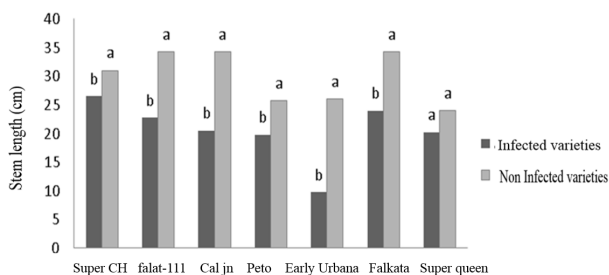
چاهک درون محیط کشت اضافه شد. اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها باکتریایی و قارچ *T. harzianum* T.BI با وجود یا عدم وجود هاله بازدارنده و اندازه‌گیری آن بررسی شد.

تهیه‌ی مایه تلقیح تریکودرما

برای تهیه‌ی مایع تلقیح قارچ *T. harzianum* T.BI از روش محمدی و همکاران استفاده گردید (Mohammadi et al., 2010). ابتدا میزان ۱۰۰ گرم از دانه‌های گندم با ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر در سه روز متوالی سترون شد. سپس پنج دیسک ۱۰ میلی‌متری از کشت چند روزه تریکودرما به درون شیشه‌های ارلن مایر اضافه گردید. ظروف ارلن در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد تا قارچ کل سطح دانه‌های گندم را کلونیزه کند.

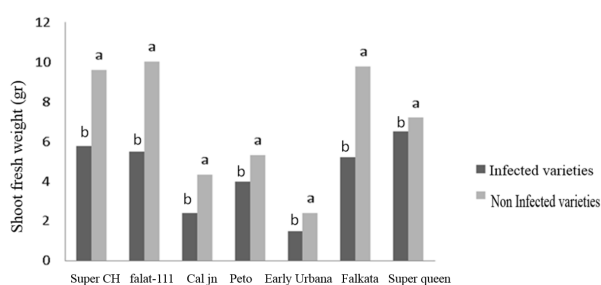
بررسی اثر کنترلی عوامل آنتاگونیست در شرایط گلخانه

به‌منظور بررسی اثر کنترلی عوامل آنتاگونیست در شرایط گلخانه از نشاهای گوجه‌فرنگی رقم مویبل در مرحله‌ی چهار برگ‌گی و به‌روش زخم ریشه استفاده شد. در این تحقیق یک سوم حجم گلدان‌ها (۱/۵ کیلوگرم) با خاک مورد نظر (خاک مزرعه+ماسه+کوکوپیت) به‌نسبت حجمی ۱:۱:۱ پر شد، سپس به‌صورت جداگانه ۱۵ گرم مایه‌ی تلقیح قارچ 10^6 spore/ml *T. harzianum* T.BI و 10^6 CFU/ml *B. subtilis* B7 و 10^6 CFU/ml *P. fluorescens* CHAO با دو سوم دیگر خاک گلدان ترکیب و نشاها در آن کشت گردیدند. در نهایت غلظت مایه‌ی تلقیح قارچ *T. harzianum* T.BI در خاک 10^6 spore/ml و سوسپانسیون 10^8 CFU/ml باکتری‌های *B. subtilis* B7 و *P. fluorescens* CHAO استفاده شد. یک هفته بعد ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 CFU/ml باکتری *R. solanacearum* به هر گلدان اضافه شد (Zhou et al., 2012, Mohammadi et al., 2010; Siddiqui & Shaukat, 2004). سپس گلدان‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار درون گلخانه به‌مدت ۶۰ روز نگهداری شدند. در این طرح دو شاهد، یکی شاهد با



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل رقم و بیماری بر طول ساقه در حالت بیماری و سالم.

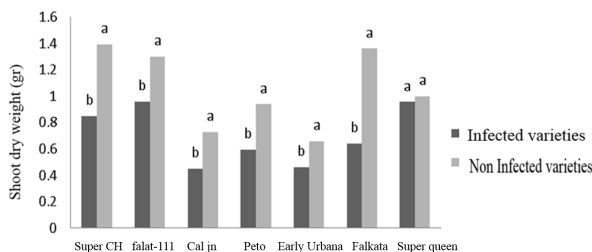
Fig. 1- Mean comparison of variety and disease interaction on stem length in diseased and healthy conditions.



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل رقم و بیماری بر وزن تر اندام هوایی در حالت بیماری و سالم.

Fig. 2- Mean comparison of variety and disease interaction on wet weight of aerial parts in diseased and healthy conditions.

برای صفت وزن خشک اندام هوایی رقم سوپر کوین اختلاف معنی‌داری با حالت شاهد نداشت و کمترین کاهش را از نظر این صفت در مقایسه با ارقام دیگر نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین اثر متقابل رقم و بیماری بر وزن خشک اندام هوایی در حالت بیماری و سالم.

Fig 3- Mean comparison of variety and disease interaction on dry weight of aerial parts in diseased and healthy conditions.

عامل بیماری و دیگری شاهد سالم تیمار نشده در نظر گرفته شد. پس از این مدت، بوته‌ها برداشت شده و شاخه‌های طول، وزن تر و خشک ریشه و ساقه اندازه‌گیری و توسط نرم افزار SAS ver.9 نتایج مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج تجزیه‌ی واریانس صفات اندازه‌گیری شده برای تیمارهای رقم و بیماری در جدول ۱ آمده است. با توجه به مقایسه‌ی میانگین انجام شده برای مقایسه‌ی ارقام در حالت بیماری و سالم، در بین ارقام مورد استفاده تنها رقم سوپر کوین برای صفت طول ساقه اختلاف معنی‌داری با حالت سالم نداشت ولی تمامی ارقام دیگر از نظر این صفت اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد با حالت سالم داشتند، علاوه بر این بیشترین کاهش طول ساقه در نتیجه‌ی بیماری نیز مربوط به رقم ارلی اوربانا بود (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه‌ی واریانس صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای رقم و بیماری.

Table 1- Analysis of variance for measured parameters in variety and diseased treatments.

Sources of variation	DF	Mean square		
		Stem length (cm)	Shoot fresh weight (gr)	Shoot dry weight (gr)
varieties	6	161.41**	43.85**	0.5441**
Disease	1	1244.57**	85.61**	1.5913*
Varieties × Disease	6	40.61**	6.6512**	0.1155 ^{ns}
Error	42	3.0357	1.9	0.0606
CV		6.88	24.49	28

**significant at $P < 0.01$ and ns: not significant at $P < 0.05$

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار

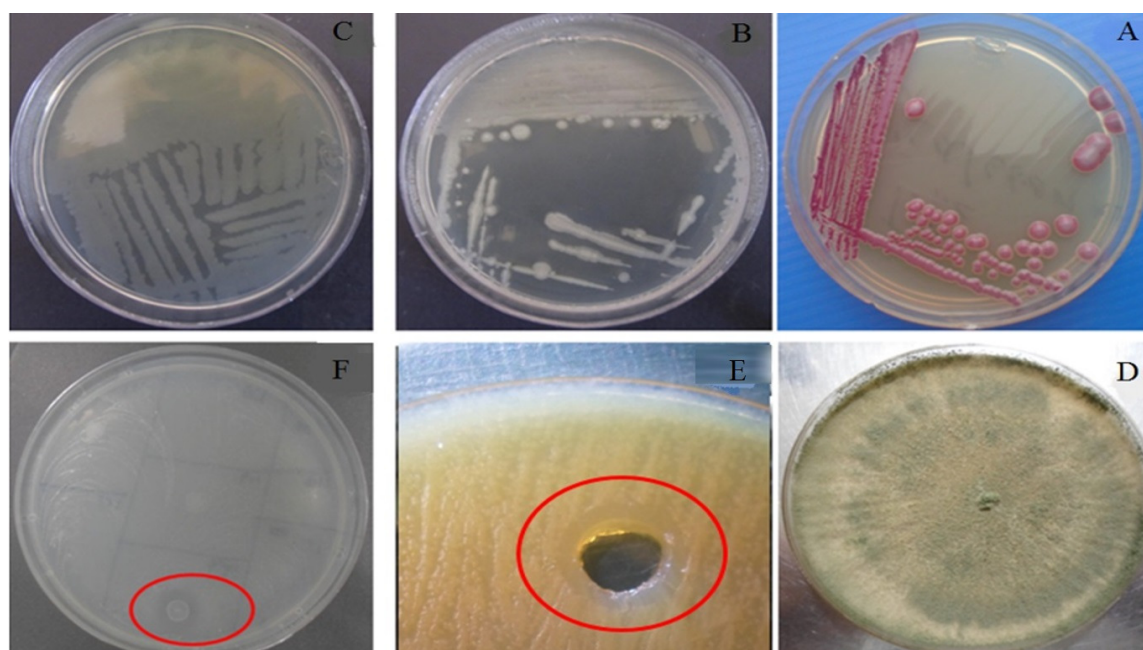
در مورد صفت وزن تر اندام هوایی رقم‌های سوپر کوین، ارلی اوربانا، پی‌تی‌او و کال جی ان-۳ در تیمار بیماری اختلاف معنی‌داری با حالت سالم نداشتند و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲).

نتایج تجزیه‌ی واریانس آزمایش کنترل زیستی بیماری با استفاده از عوامل آنتاگونیست

نتایج تجزیه‌ی واریانس آزمایش کنترل زیستی بیماری با استفاده از عوامل آنتاگونیست نشان داد که تأثیر تیمارهای مختلف بر صفات وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۱ درصد و بر صفت طول ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود، این در حالیست که تیمارهای مختلف بر صفت طول ساقه تأثیر معنی‌دار نداشتند (جدول ۲).

نتایج اثر ضدباکتریایی عوامل آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

در بررسی اثر ضدباکتریایی عوامل آنتاگونیست در محیط کشت، باکتری *B. subtilis* B7 و قارچ *T. harzianum* T.BI به ترتیب هاله‌ی بازدارنده به قطر ۵ و ۳ میلی‌متر ایجاد نمودند، اما باکتری *P. fluorescens* CHAO هیچ هاله‌ای روی محیط کشت ایجاد نکرد (شکل ۴).



شکل ۴- A. پرگنه‌های قرمز با حاشیه‌ی سفید باکتری *Ralstonia solanacearum* روی محیط کشت GPG-TTC؛ B و C. به ترتیب پرگنه‌های باکتری *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* روی محیط کشت NA، D. پرگنه‌های قارچ *Trichoderma harzianum* T.BI روی محیط کشت PDA؛ E. ایجاد هاله‌ی بازدارنده توسط ترشحات فیلتر شده قارچ *Trichoderma harzianum* T.BI؛ F. هاله‌ی بازدارنده توسط باکتری *Bacillus subtilis*.

Fig. 4- Red colonies with white margins of *Ralstonia solanacearum* on GPG-TTC medium .B and J Colonies of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on NA medium.D: Colonies of *Trichoderma harzianum* on PDA Medium. H: Inhibition zone of filtrated-paper of *Trichoderma harzianum* V: Inhibition zone of *Bacillus subtilis*.

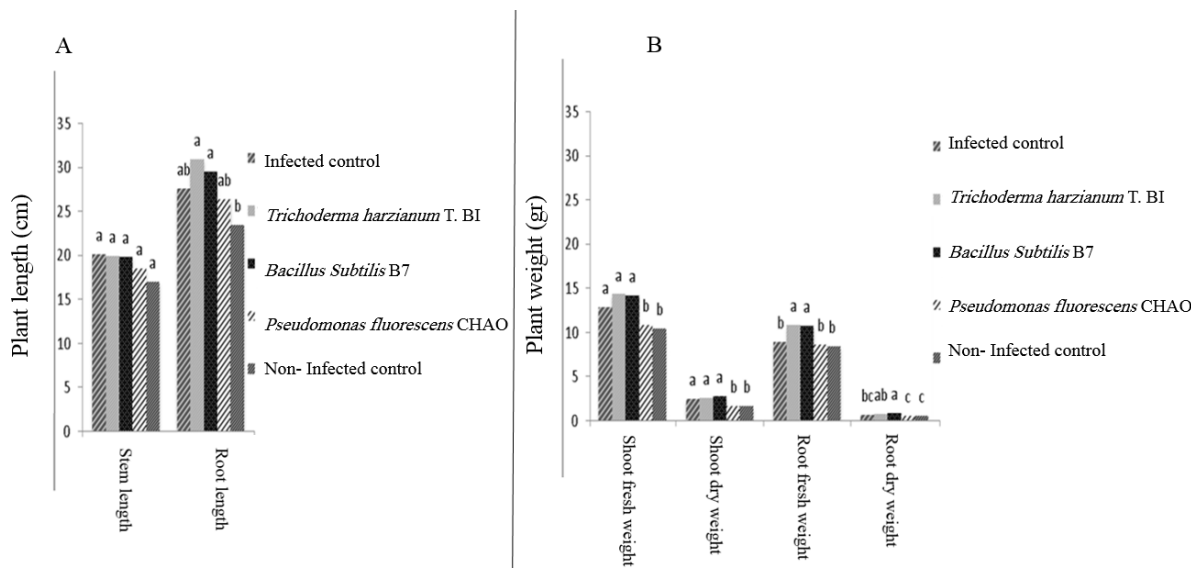
جدول ۲- تجزیه‌ی واریانس صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف.

Table 2- Analysis of variance results in different treatments.

Sources of variation	DF	Mean square					
		Stem length (cm)	Shoot fresh weight (gr)	Shoot dry weight (gr)	Root length (cm)	Root fresh weight (gr)	Root dry weight (gr)
Treatments	4	7.58 ^{ns}	13.41 ^{**}	1.01 ^{**}	33.48 ^{**}	5.55 ^{**}	0.099 ^{**}
Error	15	6.23	0.96	0.063	10.025	0.80	0.016
CV		13.03	7.8	11	11.4	9.4	18.6

**significant at P < 0.01, *Significant at P < 0.05 and ns: not significant at P < 0.05

* ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار



شکل ۵- A. مقایسه‌ی میانگین طول ریشه و ساقه در تیمار با گونه‌های *Bacillus subtilis* B7، *Trichoderma harzianum* T. BI و *Pseudomonas fluorescens* CHAO در مقایسه با تیمار سالم و بیمار. B. مقایسه‌ی میانگین وزن تر و خشک ریشه و ساقه در تیمار با گونه‌های *Bacillus subtilis* B7، *Trichoderma harzianum* T. BI و *Pseudomonas fluorescens* CHAO در مقایسه با تیمار سالم و بیمار.

Fig.5- A. Mean comparison of root and stem length in treatment with *Trichoderma harzianum* T, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* CHAO in comparison to healthy and diseased treatment. B: Mean comparison of wet and dry weight of root and stem in treatment with *Trichoderma harzianum* T. BI, *Bacillus subtilis* B7 and *Pseudomonas fluorescens* CHAO species in comparison to healthy and diseased treatment.

وزن خشک ساقه مربوط به تیمارهای گیاه آلوده و وزن خشک ساقه در تیمارهای *T. harzianum* T. BI و *P. fluorescens* CHAO، در حالیکه بالاترین وزن خشک ساقه در تیمارهای *T. harzianum* T. BI و *B. subtilis* B7 حاصل شد، با این وجود میان این تیمارها و تیمار شاهد سالم (تیمار نشده) اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. ولی با تیمارهای *P. fluorescens* CHAO و شاهد آلوده اختلاف معنی‌دار ایجاد کرد (شکل ۵). مقایسه‌ی میانگین مربوط به صفت وزن تر ریشه حاکی از آن بود که در میان تیمارهای مختلف، *T. harzianum* T. BI و *B. subtilis* B7 بیشترین اثر را بر افزایش این صفت داشتند و اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها نشان دادند (شکل ۵). نتایج مقایسه‌ی میانگین اثر تیمارهای مختلف بر وزن خشک ریشه نشان داد که تیمار *T. harzianum* T. BI و *B. subtilis* B7 بیشترین اثر را بر صفت مذکور داشت، با این حال اختلاف معنی‌دار میان آن‌ها مشاهده نشد، اما با

نتایج مقایسه‌ی میانگین تأثیر تیمارهای عوامل آنتاگونیست بر صفات عملکردی گوجه‌فرنگی

نتایج مربوط به مقایسه‌ی میانگین تأثیر تیمارهای مختلف بر صفات مورد مطالعه، در شکل ۵، به نمایش درآمده است. بر این اساس، مقایسه‌ی میانگین برای صفت طول ساقه نشان داد که بین تیمارهای مختلف با شاهد سالم و آلوده اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. اما بیشترین میانگین طول ساقه مربوط به تیمار *T. harzianum* T. BI و *B. subtilis* B7 بود (شکل ۵). با توجه به نتایج مقایسه‌ی میانگین مربوط به وزن تر ساقه، تیمار *T. harzianum* T. BI بیشترین اثر را بر روی این صفت داشت، با این حال میان این تیمار با تیمار شاهد سالم (تیمار نشده) و *B. subtilis* B7 اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد، ولی با تیمار *P. fluorescens* CHAO و گیاه شاهد آلوده اختلاف معنی‌دار نشان داد (شکل ۵). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین کاهش

ساقه با وزن خشک ساقه ($r = 0.96^{**}$) و وزن خشک ساقه با وزن تر ریشه ($r = 0.83^{**}$) می‌باشد. همچنین صفات وزن خشک ساقه با وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه با طول ریشه و طول ریشه با وزن تر ساقه رابطه مثبت معنی‌داری نشان دادند. اما طول ساقه فقط با وزن تر ساقه همبستگی مثبتی در سطح احتمال ۵ درصد داشت ولی با بقیه‌ی صفات همبستگی نشان نداد.

این موضوع نشان دهنده‌ی آن است که صفات دارای همبستگی قوی ارتباط نزدیکی با هم دارند و تغییر یک عامل چه به صورت مثبت و چه به صورت منفی بر صفت متناظر آن اثر می‌گذارد و در نهایت برآیند تمامی این اثرات متقابل عملکرد گیاه را تعیین می‌کند.

تیمارهای گیاه آلوده و *P. fluorescens* CHAO اختلاف معنی‌دار نشان دادند (شکل ۵). نتایج مقایسه‌ی میانگین مربوط به اثر تیمارهای مختلف بر صفت طول ریشه نشان داد که تیمار *B. subtilis* B7 و *T. harzianum* T. BI بیشترین تأثیر را بر صفت مذکور داشتند و بالاترین میانگین طول ریشه در این تیمارها مشاهده شد. با این وجود، میان این تیمارها با تیمار شاهد سالم و *P. fluorescens* CHAO اختلاف معنی‌دار وجود نداشت اما با تیمار آلوده اختلاف معنی‌دار نشان دادند (شکل ۵).

تجزیه‌ی همبستگی ساده صفات

بررسی ضرایب همبستگی بین صفات در تیمارهای مختلف نشان داد (جدول ۳) که در میان کلیه‌ی ضرایب، بالاترین ضریب همبستگی مربوط به همبستگی میان وزن تر

جدول ۳- همبستگی صفات مختلف با هم در تیمارهای مختلف.

Table 3- Correlation values among different parameters in different treatments

Plant traits	Stem length (cm)	Shoot fresh weight (gr)	Shoot dry weight (gr)	Root fresh weight (gr)	Root dry weight (gr)
Shoot fresh weight (gr)	0.44 *				
Shoot dry weight (gr)	0.358 ^{ns}	0.96 **			
Root fresh weight (gr)	0.225 ^{ns}	0.60 **	0.54 *		
Shoot dry weight (gr)	0.154 ^{ns}	0.65 **	0.67 **	0.83 **	
Root length (cm)	0.124 ^{ns}	0.61 **	0.57 **	0.62 **	0.63 **

**significant at $P < 0.01$, *Significant at $P < 0.05$ and ns: not significant at $P < 0.05$

بحث

مورد نیاز است کاشت گیاهان مقاوم مؤثرترین و ساده‌ترین روش برای کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی است (Bajpai et al., 2011; Wang et al., 1998). بنابراین در این پژوهش عملکرد ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی و سه آنتاگونیست *B. subtilis* B7، *P. fluorescens* CHAO و *T. harzianum* T. BI در برابر این بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی مقاومت ارقام موجود در برابر بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی مشخص شد، که اثر بیماری بر ارقام موجود گوجه‌فرنگی به جز صفت وزن خشک اندام هوایی، در مابقی صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. در بین ارقام موجود رقم

بیماری پژمردگی باکتریایی از مهم‌ترین بیماری‌های محدود کننده‌ی تولید گوجه‌فرنگی بوده، که سالانه خسارت زیادی در سراسر دنیا ایجاد می‌کند. کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی به علت خاک زاد بودن و دامنه‌ی میزبانی وسیع بیمارگر دشوار است. تاکنون برای کنترل این بیماری از روش‌های زراعی، شیمیایی و زیستی استفاده شده است. اما امروزه به دلیل افزایش نگرانی‌های عمومی در زمینه‌ی سلامتی انسان و آلودگی‌های محیطی، استفاده از سموم شیمیایی کاهش یافته است. از این رو استفاده از روش‌های جایگزین سموم شیمیایی برای کنترل بیماری‌های محصولات کشاورزی و کاهش ضایعات غذایی شدیداً

بیمارگر *R. solanacearum* مؤثرند، این نتایج با پژوهش چن و همکاران (Chen *et al.*, 2012) و داس و بورا (Das & Bora, 2000) مطابقت داشت، اما آنتاگونیست *P. fluorescens* CHAO نسبت به گیاه آلوده تفاوت معنی‌دار نشان نداد. اثر بیوکنترلی باکتری باسیلوس احتمالاً به علت استفاده از مکانیسم‌هایی نظیر تولید آنتی‌بیوتیک، افزایش رشد گیاه و مقاومت القایی نسبت داد، به طوری که اثبات شده که این باکتری با تولید هورمون‌های اکسین و اتیلن سبب افزایش رشد سیستم ریشه‌ای گیاه می‌شود (Kilian *et al.*, 2000; Yao, 2008). همچنین اثر بیوکنترلی قارچ تریکودرما را می‌توان به مکانیسم‌های مختلفی مانند رقابت، تحریک رشد گیاه، آنتی‌بیوز، فعال کردن واکنش‌های دفاعی گیاه، تنظیم و القای فاکتورهای رشدی گیاه مانند اکسین، سیتوکینین و اتیلن نسبت داد (Chet *et al.*, 1997; Howell, 2003). همچنین مؤثر نبودن استفاده از آنتاگونیست *P. fluorescens* CHAO احتمالاً به دلیل ناتوانی استرین مورد نظر در تولید متابولیت‌های ضدباکتریایی، موفق نبودن در رقابت و محدود کردن باکتری عامل بیماری نسبت داد.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان رقم سوپر کوین را به‌عنوان رقم تقریباً مقاوم و عوامل میکروبی *B. subtilis* و *T. harzianum* T.BI را به‌عنوان عوامل کنترل زیستی مؤثر در برابر بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی معرفی کرد.

سوپر کوین حساسیت کمتری نسبت به بیماری داشت و کمترین کاهش عملکرد در بین ارقام مربوط به این رقم می‌باشد. این نتایج با پژوهش‌های گریمالت و پریور و آزادوار و همکاران مطابقت داشت. به طوری که مشخص شد ارقام مختلف گوجه‌فرنگی درجات مختلفی از حساسیت نسبت به بیماری مزبور از خود نشان می‌دهند.

نتایج اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی و قارچی نشان داد که باکتری *B. subtilis* B7 و قارچ *T. harzianum* T.BI قادر به ایجاد هاله‌ی بازدارنده در آزمون، روی تشک پتری بودند. اثر بازدارندگی باکتری *B. subtilis* B7 را می‌توان به تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی لیپوپتیدی و پلی‌کتیدی مانند ایتورین (Iturin)، سورفاکتین (Surfactin) فنگایسین (Fengycin)، باسیلین (Bacilin)، دیفیسیدین (Deffcidin) و ماکرولاکتین (Macrolactin) نسبت داد (Raaijmakers & Mazzola, 2012). همچنین اثر ضدباکتریایی گونه‌ی *T. harzianum* T.BI را می‌توان به تولید آنتی‌بیوتیک ویریدین (Viridin)، ویریدیوفانجین (Viridifungins)، هپتلیدیک اسید (Heptelidic acid) و ترکیباتی مانند اسید هارزیانیک (Harzianins HC) و پتیبول‌ها (Peptaibols) نسبت داد (Reino *et al.*, 2008).

در این بررسی با اندازه‌گیری شاخص‌هایی از جمله طول، وزن تر و خشک ساقه و طول، وزن تر و خشک ریشه مشخص شد که آنتاگونیست‌های *T. harzianum* T.B و *B. subtilis* B7 تقریباً به یک اندازه در کنترل زیستی

Reference

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th. Edited by New York. Elsevier, 647-648.
- Azadvar, M. & Rahimian, H. H. 2008. Study on tolerance ratio of 11 commercial potato varieties to bacterial wilt agent in root and stem inoculation methods. Iranian Journal of Plant Pathology. 44 (2): 184-190.
- Bajpai, V.K. Kang, S.Xu, H. Lee, S.G. Baek, K.H. & Kang, S.C. 2011. Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* Species: A Review. The Plant Pathology Journal, 27(3): 207-224.
- Chen, Y. Yan, F. Chai, Y. Liu, H. Kolter, R. Losick, R. & Guo, J.H. 2012. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology, 15 (3): 848-864.
- Chet, I. & Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology, 48(1): 37-43.

- Chet, I., Inbar, J. & Hadar, Y. 1997.** Fungal antagonists and mycoparasites. 165–184. In: Wicklow D. T. & Soderstrom B. E. (eds.), *The Mycota, IV*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Das, M. & Bora, L. 2000.** Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Journal of the Agricultural Science Society of North-East India*, 13 (1):52-55.
- Elphinstone J. G. 2005.** The current bacterial wilt situation: a global overview. pp. 9–28. In: Allen C., Prior P. & Haywar A. C., (eds.), *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. APS Press, St. Paul, MN.
- Gheshm, R. & Kafi, M. 2009.** *Industrial Tomato from Cultivation to Harvesting*. Secondary publication; Mashhad Jihad Daneshgahi Publications. (In Persian).
- Grimault, V. & Prior, P. 1994.** Invasiveness of *Pseudomonas solanacearum* in tomato, eggplant and pepper: A comparative study. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 259-267.
- Handelsman, J. & Stabb, E.V. 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, 8 (10): 1855.
- Hayward, A.C. 1991.** Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 65–87.
- Howell, C. & Stipanovic, R. 1995.** Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology*, 85(4): 469-472.
- 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.
- Kelman, A. 1953.** The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station*, 99.
- Khodaei Arbat, A., Taheri, A.H. Pahlevani, M.H. & Niknam, G.H. R. 2009.** Evaluation of tomato cultivars resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949). *Journal of Plant Production*, 16 (1): 45-55.
- Kilian, M. Steiner, V. Krebs, B. Junge, H. Schmiedeknecht, G. & Hain, R. 2000.** *Bacillus subtilis*- Fz bz4 mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 1(1): 72-93.
- Kim, D.S. Cook, R.J. & Weller, D.M. 1997.** *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87: 551-558.
- Mohammadi, N. 2010.** Studies on pathogenicity and genetic diversity of the some Iranian isolates *Fusarium oxysporum* f.sp *lentis* and determination of resistant lentil cultivars. M. SC. Thesis, University of Tarbiat Modares, Iran: 134.
- Nguyen, M. & Ranamukhaarachchi, S. 2010.** Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology*, 92 (2): 395-406.
- Raaijmakers, J. M. & Mazzola, M. 2012.** Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50: 403-424.
- Reino, J.L. Guerrero, R. F. Hernandez-Galan, R. & Collado, I.G. 2008.** Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemical Review*, 7 (1): 89-123.

- Siddiqui, A. & Shaukat, S. 2004.** Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Phytopathology*, 152: 48-54.
- Wang, J.F. Hanson, P. & Barnes, J. 1998.** Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. Pp. 269-275. In: Prior, P. Allen, C. & Elphinstone, J. (eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Springer, Verlag, Berlin, Germany.
- Watts, R. Dahiya, J. Chaudhary, K. & Tauro, P. 1988.** Isolation and Characterization of a New Antifungal Metabolite of *Trichoderma reesei*. *Plant and Soil*, 107: 81-84.
- Yao, V. 2008.** *Bacillus subtilis* and its metabolites as induced resistance agent against aphids feeding on broad bean (*Vicia faba*) and Summer wheat (*Triticum aestivum*). Dissertation zur Erlangerung des akademischen Grades, Doctor Agriculturarum.
- Zhou, T. Chen, D. Li, C. Sun, Q. Li, L. Liu, F. Shen, Q. & Shen, B. 2012.** Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological Research*, 167 (7): 388-394.

Investigation the performance and biological control of the various tomato cultivars against the bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*)

Hossein Mirzaei Najafgholi¹, Soma Narimani¹, Milad Aeini², Seyed Mohsen Taghavi³, Saeid Tarighi⁴
and Mohammad Javaheri³

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, khoramabad, Iran.

2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran

3- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

4- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Corresponding author: Hossein Mirzaei, email: Mirzaeih89@gmail.com

Received: Feb., 26, 2014

2 (2) 47-57

Accepted: April. 15, 2015

Abstract

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive disease which negatively affects the tomato production worldwide. Considering the importance of the disease, searching for resistant varieties and using biological control agents could be effective approaches in reducing the damage of the pathogen. In this study, the cultivars including Super CH, falat-111, Peto, Falkata, Queen and Early Urbana were studied. The experiments were conducted with completely randomized factorial design with a disease factor in two levels as inoculated and not inoculated. Seven cultivars (treatments) with four replicates were evaluated. Statistical analysis were performed using SAS software. The antagonistic strains of *Bacillus subtilis* B7, *Pseudomonas fluorescens* CHAO and *Trichoderma harzianum* T.BI and mobil cultivar were utilized. In vitro anti-bacterial evaluations were conducted and *T. harzianum* T.BI and *B. subtilis* B7 showed 3 and 5 mean distance of inhibition zone respectively but *P. fluorescens* CHAO showed no inhibition effects. The results of means comparison showed that the stem length of cultivar Queen had the lowest reduction while the highest reduction in stem length was related to the cultivar early urbana. Regarding the fresh weight, the minimum reduction was related to cv Queen while the maximum ones were relevant to cvs Super CH, falat and Falkata cultivars. Moreover, the minimum decrease of dry weight was associated with the Queen cultivar. The results of using antagonists showed that *T. harzianum* T.BI and *B. subtilis* B7 regarding index of stem length, shoot and root fresh weight, dry weight of roots and shoots are the best options to control bacterial wilt.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, Resistant varieties, Growth factors, Biocontrol.
