https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 2322-5173
12rd Year, Vol. 12, No. 47, Autumn 2023 pp. 97-116
Received: 14.08.2023 Accepted: 30.10.2023

(Research Paper)

Morphological and Molecular Investigation of Fusarium Wilt of *Lemon Verbena* and its Biological Control by *Trichoderma Harzianum* in Khorramabad County *

Armaghan Pouladvand
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
armaghanpouladvand@gmail.com
Mostafa Darvishnia*
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
darvishnia.m@lu.ac.ir
Samira Pakbaz
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
pakbaz.s@lu.ac.ir
Eidi Bazgir
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
bazgir.ei@lu.ac.ir

Abstract

Introduction: Biological control is an efficient method in the management of plant diseases, which has a lower risk for human health and the environment. In this research, the biocontrol fungus *Trichoderma harangue* was used to control Fusarium wilt disease to lemon verbena with the scientific name *Lippiacitridora* Kunth (a medicinal plant from the Verbenaceae family). Fusarium wilt disease of lemon verbena is considered one of the most important plant diseases in the world and it reduces the quantity, quality, and nutritional value of the product. Symptoms of the disease first appear on the lower leaves and usually after the appearance of flowers and fruit formation. As a result of the activity of the fungus *F. oxysporum*, brown and blocked wood vessels and symptoms of yellowing and wilting similar to water deficiency are observed in the plant. *Fusariumredolens* species is mostly observed with root rot of different plant species in warm and temperate regions. Like *F. oxysporum*, this species has a special form that host specificity. *Trichoderma* spp. species are mainly soil-borne and exert biological control against plant pathogens indirectly through competition for food and space, changing environmental conditions,

* Corresponding Author
2322-5181/ © 2023 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)
Pouladvand A., Darvishnia M., Pakbaz S and Bazgir E. Morphological and Molecular Investigation of Fusarium Wilt of *Lemon Verbena* and its Biological Control by *Trichoderma Harzianum* in Khorramabad County. *Journal of Microbial Biology*, 2023; 12 (47): 97-116.
http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557

or promoting plant growth and plant defense mechanisms and antibiotics or they do it directly through mechanisms such as mycoparasitism.

Materials and Methods: Samples of pathogenic fungi were collected from the fields, isolated, purified and identified, and the sample of antagonistic fungus was prepared in pure from the fungi collection of the Mycology Laboratory of Faculty Agriculture, Lorestan University under the access code OQ702632 and cultivated on PDA culture medium.

Molecular identification of fungal isolates: Genomic DNA extraction of the fungi was done using the Zhang and Stephenson method with some modifications. For this purpose, the mycelium mass was used of five to seven-day-old fungi. The PCR test was performed in a final volume of 25 microliters with the help of a pair of specific reverse primers related to the TEF-1α gene region and using the PCR Master Mix kit of the British PCR Bio System company and according to the company's instructions. In the negative control sample, sterile distilled water was added instead of DNA.

Pathogenic interactions and biocontrol by Dual-culture method: The biocontrol effect of *Trichoderma* on the *Fusarium* pathogen was carried out using the dual-culture method in 9 cm Petri plates containing PDA in the form of a completely randomized design and in three replications. In order to investigate the cause of *Lemon verbena* wilting and its biological control, samples were taken from Khorramabad county and 45 samples were transferred to the laboratory for isolation and identification. The antagonist isolate of *T. harzianum* against pathogenic fungi was used in laboratory conditions as dual-culture and the effect of volatile substances and in greenhouse conditions in the form of a completely randomized design and in three replications.

Inhibitory effect of *Trichoderma* isolate on Fusarium wilt disease of lemon verbena under greenhouse conditions: The Mohammadi method was used in order to observe the effect of the antagonist fungus *T. harzianum* on the plant growth indicators of lemon verbena (height, fresh, and dry weight) in infected and non-infected conditions with the pathogenic fungus and in comparison with the infected and non-infected control, and to prepare the inoculum for *Trichoderma* isolates. After planting the lemon verbena and applying the treatments, the greenhouse was visited daily and the health and disease status of the plants were examined including yellowing, drying, and wilting of the plants. At the end of the experiment, 30 to 40 days after inoculation, plant parameters were recorded such as wet and dry weight and plant height.

Research Findings: Based on the morphological and molecular characteristics, *Fusarium* isolates were separated and classified into two species: *F. oxysporum* and *F. redolens*. In the laboratory, the isolation of *T. harzianum* inhibited the mycelium growth of *F. oxysporum* and *F. redolens* pathogens, but it had the most inhibitory effect on the pathogenic species of *F. oxysporum*, and in cross-culture methods and the effect of volatile compounds, respectively. It controlled this pathogen by 71.5 and 61.5%. While the control of *F. redolens* was 56.5% and 50.5% in the two methods. The results of greenhouse experiments showed that *T. harzianum* biocontrol, in addition to increasing the growth factors of the plant, reduced the disease indicators and controlled the disease. The effect of biological agent *T. harzianum* on the severity of *F. oxysporum* after 30 days was equal to 73.86% and in *F. redolens* was 74.16%. In terms of growth factors, *T. harzianum* treatment had the highest and *F. redolens* treatment had the lowest growth indicators.

http://dx.doi.org/10.22108/bjm.2023.138766.1557

Discussion of Results and Conclusions: Both species of *Fusariumoxysporum* and *F. redolens* were used in the test to prove pathogenicity in the greenhouse by impregnating the roots of the seedlings in the spore suspension of the fungi causing the disease, and both caused damage and were pathogenic. In the macroscopic examination of *Trichoderma* isolates and *Fusarium* species using dual culture, it was observed that *T. harzianum* isolates limited the growth of both pathogenic fungi *F. oxysporum* and *F. redolens*. The highest percentage of growth inhibition was 71.5% in the simultaneous confrontation of *T. harzianum* isolates with pathogenic agent *F.oxysporum* and the lowest growth inhibition percentage of 56.5 was observed in the simultaneous confrontation of *T. harzianum* isolate with the pathogenic agent *F. redolens*. It was found that the biocontrol fungus *T. harzianum* controlled the pathogenic fungus *F. oxysporum* better than *F. redolens* and further hindered its growth. In the present study, it was found that adding *T. harzianum* isolates to the soil around seedlings in greenhouse conditions increases the growth indicators (height, fresh weight, and dry weight of shoots and roots) and also reduces the severity of the disease and symptoms of yellowing and wilting in lemon verbena seedlings. It is infected with *F. oxysporum* and *F. redolens*.

Keywords: Biological control, Fusarium wilt, *Lemon verbena, Trichoderma harzianum*

http://dx.doi.org/10.22108/bjm.2023.138766.1557

زیست‌شناسی میکروبی
سال دوازدهم، شماره ۴۷، پاییز ۱۴۰۲، صفحه ۹۷- ۱۱۶
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۸

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی عوامل پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو و کنترل بیولوژیکی آن توسط قارچ *Trichoderma harzianum* در شهرستان خرم‌آباد*

ارمغان پولادوند: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، armaghanpouladvand@gmail.com
مصطفی درویش‌نیا*: استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، darvishnia.m@lu.ac.ir
سمیرا پاکباز: استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، pakbaz.s@lu.ac.ir
عیدی بازگیر: استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران، bazgir.ei@lu.ac.ir

چکیده

مقدمه: مهار زیستی از روش‌های مؤثر وکارامد در مدیریت بیماری‌های گیاهی است که خطر کمتری برای سلامت انسان و محیط زیست دارد. در این پژوهش به‌منظور مهار زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی از قارچ بیوکنترل *Trichoderma harzianum* استفاده شد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی عامل پژمردگی به‌لیمو و کنترل بیولوژیکی آن از شهرستان خرم‌آباد نمونه‌برداری شد و تعداد ۴۵ نمونه برای جداسازی و شناسایی به آزمایشگاه منتقل شدند. از جدایهٔ بیوکنترل *T. harzianum* علیه قارچ‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاه به‌صورت کشت متقابل و تأثیر مواد فرار و در شرایط گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار استفاده شد.

نتایج: براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی جدایه‌های *Fusarium* از هم تفکیک شدند و در دو گونهٔ *F. oxysporum* و *F. redolens* قرار گرفتند. در آزمایشگاه جدایهٔ *T. harzianum* از رشد میسلیوم بیمارگرهای *F. oxysporum* و *F. redolens* ممانعت کرد؛ اما بیشترین اثر بازدارندگی را بر گونهٔ بیمارگر *F. oxysporum* داشت و در روش‌های کشت متقابل و اثر ترکیبات فرار به‌ترتیب این بیمارگر را به میزان ۷۱/۵ و ۶۱/۵ درصد کنترل کرد؛ درحالی‌که کنترل *F. redolens* در دو روش به‌میزان ۵۶/۵ و ۵۰/۵ درصد بود. نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان دادند بیوکنترل *T. harzianum* علاوه بر افزایش فاکتورهای رشدی گیاه، شاخص‌های بیماری را کاهش داد و بیماری را کنترل کرد. تأثیر عامل زیستی *T. harzianum* بر شدت بیماری *F. oxysporum* پس از ۳۰ روز برابر با ۷۳/۸۶ درصد و در *F. redolens* برابر با ۷۴/۱۶ درصد بود. ازنظر فاکتورهای رشدی تیمار *T. harzianum*، بیشترین و تیمار *F. redolens* کمترین شاخص‌های رشدی را داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از عامل بیوکنترل *T. harzianum* تأثیر معنی‌داری در جلوگیری از رشد عوامل بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* دارد؛ بنابراین، به‌عنوان یک عامل کاربردی در کنترل زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی برای افزایش بهره‌وری و تولید محصول ایمن می‌تواند استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: به‌لیمو، پژمردگی فوزاریومی، کنترل بیولوژیک، *Trichoderma harzianum*

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2023 The Authors

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

پولادوند، ا.؛ درویش‌نیا، م.؛ پاکباز، س و بازگیر، ع. جداسازی و شناسایی عوامل پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو و کنترل بیولوژیکی آن توسط قارچ *Trichoderma harzianum* در شهرستان خرم‌آباد. *زیست‌شناسی میکروبی* ۱۴۰۲، ۱۲ (۴۷): ۹۷-۱۱۶
http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557.

مقدمه

به‌لیمو با نام علمی *Lippia citridora* Kunth. گیاهی دارویی از خانواده شاه‌پسندیان (*Verbenaceae*)، در اصل بومی آمریکای جنوبی است و درختچه‌ای چندساله است که در مناطق گرمسیر همیشه‌سبز است (۱). بیماری پژمردگی فوزاریومی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گیاهی در جهان است و موجب کاهش کمیت، کیفیت و ارزش غذایی محصول می‌شود. علائم بیماری ابتدا در برگ‌های پایینی و معمولاً بعد از ظهور گل و تشکیل میوه ظاهر می‌شود. بر اثر فعالیت قارچ خاکزاد *F. oxysporum* آوندهای چوبی قهوه‌ای و مسدودشده و علائم زردی و پژمردگی مشابه کمبود آب در گیاه مشاهده می‌شود (۲). گونهٔ *F. redolens* بیشتر همراه با پوسیدگی ریشه گونه‌های مختلف گیاهی در مناطق معتدل و گرم مشاهده می‌شود. این گونه نیز همانند *F. oxysporum* دارای فرم خاص است که اختصاصیت میزبانی دارند (۳،۴). کنترل بیولوژیک ازجمله روش‌های طبیعی مهار عوامل بیماری‌زای گیاهی و کاهش خسارت ناشی از آنها است. کنترل بیولوژیک عبارت است از کاهش اولیه بیماری یا کاهش فعالیت‌های منجر به ایجاد بیماری ازطریق به‌کارگیری یک یا چند موجود زنده به‌غیر از انسان (۵).

گونه‌های *Trichoderma* spp. عمدتاً خاکزاد هستند و کنترل زیستی را علیه بیمارگرهای گیاهی به‌صورت غیرمستقیم ازطریق رقابت برای مواد غذایی و مکان، تغییر شرایط محیطی یا ارتقای رشد گیاه و مکانیسم‌های دفاعی گیاه و آنتی بیوز اعمال می‌کنند یا به‌صورت مستقیم با مکانیسم‌هایی از قبیل مایکوپارازیتیسم این کار را انجام می‌دهند (۶). در میان گونه‌های *Trichoderma*، گونهٔ *T. harzianum* به‌دلیل رشد سریع، قدرت تکثیر بالا، تحمل به شرایط نامطلوب، توانایی رشد و کلونی‌شدن در ارتباط با ریشه گیاه و القای رشد گیاه به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۷). *T. harzianum* یکی از عوامل بیوکنترل مؤثر بوده است که در زمان حاضر به‌صورت تجاری برای کنترل چندین قارچ بیمارگر خاکزاد به‌صورت موفق به کار می‌رود (۸).

محمد و بنهمو درزمینهٔ مبارزه بیولوژیک با قارچ *F. oxysporum* بررسی‌هایی انجام داده‌اند که نشان می‌دهد قارچ *T. harzianum* قادر به ایجاد ترکیبات فرار و ترشحات سلولی بوده است و باعث جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری و دیگر بیمارگرهای خاکزی می‌شود (۹). الاد و همکاران دربارهٔ بررسی مکانیزم و نحوه تأثیر قارچ بیوکنترل *T. harzianum* بر قارچ‌های بیماری‌زای *Rhizoctonia* sp. و *Sclorotinia* sp. تحقیقاتی انجام دادند (۱۰). سیوان و همکاران اثر کنترل‌کنندگی قارچ *T. harzianum* بر پژمردگی فوزاریومی طوقه گوجه‌فرنگی و برخی از قارچ‌های بیماری‌زای خاکزی را در شرایط مزرعه بررسی کردند (۱۱). اکرمی و همکاران در یک پژوهش، تأثیر چند جدایهٔ *T. harzianum* و *T. asperellum* را به‌طور جداگانه و مخلوط با هم علیه عامل بیماری فوزاریومی لوبیا در شرایط گلخانه مقایسه کردند و در این بررسی از مخلوط چند جدایه با هم نتایج خوبی به دست آمد (۱۲).

با توجه به اهمیت گیاه به‌لیمو به‌عنوان یک گیاه دارویی که سطح زیرکشت حدود ۱۰۰ هکتار را در استان لرستان و حدود ۶ هزار هکتار را در کشور به خود اختصاص داده است و نقش مهمی در صادرات غیرنفتی دارد و عوامل بیماری‌زا نیز خسارت چشمگیری به این محصول می‌توانند وارد کنند، پژوهش حاضر به‌منظور جداسازی و شناسایی عوامل پژمردگی فوزاریومی در

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557

به‌لیمو و تأثیر عوامل بیوکنترل در جلوگیری از خسارت بیماری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی نمونه‌ها: در طول پاییز ۱۴۰۰، تعداد ۴۵ نمونه از مزارع بخش رباط نمکی شهرستان خرم‌آباد از قسمت‌های ریشه، طوقه و ساقه گیاهان به‌لیمو دارای علائم بیماری مانند پژمردگی و زردی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها برای جداسازی و خالص‌سازی به آزمایشگاه، منتقل و در یخچال نگهداری شدند. پس از شستشوی بخش‌های آلودهٔ اندام‌های گیاهی با جریان ملایم آب، با استفاده از اسکالپل سترون از حد واسط بافت آلوده و سالم برش داده شد و قطعات در محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم[1] به مدت یک تا سه دقیقه ضدعفونی سطحی و سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس سه تا چهار قطعه از هر نمونه به تشتک حاوی محیط کشت PDA برای جداسازی و رشد و تکثیر قارچ، منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شدند (۱۳). پس از هفت روز نگهداری تشتک‌ها در انکوباتور و رشد پرگنه قارچی دارای ویژگی فوزاریوم، به روش تک اسپور و نوک ریسه کردن روی محیط WA (آب-آگار) خالص شدند (۱۴). جدایه‌های خالص‌سازی‌شده روی محیط SNA در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. شناسایی جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ساختاری غیرجنسی، مانند رنگ پرگنه، نرخ رشد، میسلیوم هوایی، وجود یا عدم وجود رنگدانه از روی و از پشت تشتک محیط کشت PDA و شکل ماکرو و میکروکنیدیوم‌ها، فیالیدها، کلامیدوسپور روی محیط کشت PDA، CLA (برگ میخک-آگار) و SNA و در شرایط نوری و دمایی توصیه‌شده در منابع معتبر انجام گرفت (۱۵- ۱۷).

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی: این بخش از پژوهش با هدف تأیید و تکمیل شناسایی ریخت‌شناختی و با استفاده از روش‌های تکثیر و توالی‌یابی ناحیه ژنی *TEF-1α* انجام شد. استخراج DNAژنومی قارچ با استفاده از روش ژانگ و استفنسون با اعمال اندکی تغییرات انجام گرفت و بدین منظور از توده میسلیومی پنج تا هفت روزه قارچ استفاده شد (۱۸). آزمون PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به کمک یک جفت آغازگر اختصاصی رفت و برگشت مربوط به ناحیه ژنی *TEF-1α* (۱۹) و با استفاده از کیت PCR Master Mix شرکت PCR Bio System انگلیس و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. در نمونه شاهد منفی به‌جای DNA، آب مقطر استریل اضافه شد. برنامهٔ حرارتی به‌منظور تکثیر ناحیه ژنی مذکور به‌صورت زیر انجام شد؛ یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و درنهایت، واکنش بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

به‌منظور ارزیابی کیفیت و کمیت، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و ارزیابی شدند. برای خالص‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی، نمونه‌ها به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, South Korea) ارسال شدند. سپس ترادف‌های به‌دست‌آمده در پایگاه NCBI با کمک ابزار بلاست با ترادف‌های

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557

موجود مربوط به همین ناحیه ژنی مقایسه شدند. درخت فیلوژنتیکی این جدایه‌ها به کمک نرم‌افزار MEGA 11.0 و با روش Neighbor-Joining و براساس ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی رسم شد (۲۰،۲۱).

بررسی تعاملات بیمارگر و بیوکنترل به روش کشت متقابل در شرایط آزمایشگاهی: قارچ بیوکنترل *T. harzianum* از کلکسیون قارچ آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه لرستان به کد دسترسی OQ702632 به‌صورت خالص، تهیه و روی محیط کشت PDA کشت شد. اثر بیوکنترل *Trichoderma* روی عامل بیماری‌زای *Fusarium* با استفاده از روش کشت متقابل همزمان دنیس و وبستر (۲۲) در تشتک‌های ۹ سانتی‌متری حاوی PDA در قالب طرح کامل تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. تشتک‌ها روزانه بررسی شدند و با ثبت مشخصات ماکروسکوپی پرگنه قارچ‌های بیوکنترل و بیمارگر و اسپورزایی قارچ بیوکنترل روی پرگنه قارچ بیمارگر با مشاهدات میکروسکوپی، قدرت آنتاگونیستی جدایه‌ها ارزیابی و مقایسه شد. در ادامه، داده‌ها تجزیه و تحلیل آماری شدند و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (۲۳).

$$\text{درصد بازدارندگی بیوکنترل از رشد قارچ بیمارگر} = \frac{\text{قطر ناحیه رشدی در تیمار} - \text{قطر ناحیه رشدی در شاهد}}{\text{قطر ناحیه رشدی در شاهد}} \times 100 \quad (۱)$$

بررسی اثر متابولیت های فرار قارچ *Trichoderma* بر رشد قارچ بیمارگر به روش ساندویچ در شرایط آزمایشگاهی: ارزیابی بازدارندگی از رشد قارچ بیوکنترل علیه قارچ بیمارگر به‌وسیلهٔ تولید متابولیت‌های فرار با استفاده از روش دنیس و وبستر (۲۲) در تشتک‌های ۹ سانتی‌متری حاوی PDA در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار طراحی شد و به‌صورت روزانه قطر پرگنه عامل بیماری و قارچ بیوکنترل اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر بر اثر متابولیت‌های فرار با استفاده از رابطه (۲) به دست آمد. که در این فرمول IP نشان دهنده درصد بازدارندگی، C و T به ترتیب قطر پرگنه‌ی بیمارگر در شاهد و تیمار است.

$$IP = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (۲)$$

بررسی اثر بازدارندگی جدایهٔ *Trichoderma* بر بیماری پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو در شرایط گلخانه: به‌منظور مشاهدهٔ اثر قارچ بیوکنترل *T. harzianum* بر شاخص‌های رشدی گیاه به‌لیمو (ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک) در شرایط آلوده و غیرآلوده به قارچ عامل بیمارگر و در مقایسه با شاهد آلوده و غیرآلوده و همچنین برای تهیه مایه تلقیح جدایهٔ *Trichoderma* از روش محمدی (۱۳۸۹) (۲۴) استفاده شد. پس از سترون‌کردن مقدار خاک مزرعه مورد نیاز برای کشت نهایی از گلدان‌های سه کیلوگرمی استفاده شد. سپس ریشه نهال‌های به‌لیمو با محلول سم زینب و آب مقطر سترون شدند و برای کشت به گلدان‌ها، منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در گلخانه نگهداری شدند. بعد از خشک‌شدن بوته‌ها و جوانه‌زنی مجدد آنها، زمانی که به‌لیموها در مرحله رشدی مشخصی قرار گرفتند، مایه تلقیح *Trichoderma* پودری تهیه‌شده به میزان ۱۰ گرم در هر کیلوگرم به خاک اضافه شد و همزمان سوسپانسیون قارچ بیمارگر به روش پاستور-کرل

و همکاران (۲۵) با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر آب، تهیه و با استفاده از روش فروبردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ مایه‌زنی انجام شد. همچنین در این بررسی برای کنترل عامل بیماری از روش شیمیایی استفاده شد و مقدار ۰/۵ گرم قارچ‌کش متیل تیوفانات[۶] در ۰/۵ لیتر آب مقطر، حل و این محلول به تیمار عامل بیمارگر اسپری‌پاشی شد. در شاهد سالم قارچ بیمارگر و در شاهد بیمار بیوکنترل مایه‌زنی انجام نشد. بعد از کشت به‌لیموها و اعمال تیمارها، روزانه از گلخانه بازدید شد و سلامت و بیماربودن گیاهان ازجمله زرد و خشک شدن و پژمردگی بوته‌ها بررسی شدند. در پایان آزمایش، ۳۰ تا ۴۰ روز پس از تلقیح، شاخص‌های گیاهی ازجمله وزن تر و خشک و ارتفاع گیاه یادداشت‌برداری شدند و برای تمام تیمارها، محاسبه و به‌طور آماری آنالیز شدند (۲۶).

برای تعیین وقوع بیماری و شدت بیماری در بوته‌های آلوده از رابطه (۳) و (۴) استفاده می‌شود (۲۷،۲۸).

$$DI = \frac{\sum Xini}{N} \times ۱۰۰ \quad \text{(درصد بیماری)} \qquad (۳)$$

در این رابطه DI بیان کنندهٔ میزان وقوع بیماری، X تعداد بوته‌های بیمار و N تعداد کل بوته‌های ارزیابی‌شده است. داده‌های مربوط به بروز بیماری (DI) (درصد بوته پوسیده) و شدت بیمار (DS) (قطر ناحیه آلوده) در اطراف زخم‌ها به عنوان میانگین هر تکرار محاسبه می‌شوند (۲۹).

$$DS \text{ (درصد شدت بیماری)} = \frac{\Sigma[(A\times0)+(B\times1)+(C\times2)+(D\times3)+(E\times4)]}{\Sigma(A+B+C+D+E)} \times ۱۰۰ \qquad (۴)$$

A: تعداد بوته‌های بدون علامت بیماری، B: تعداد بوته‌های آلوده در مقیاس ۱، C: تعداد بوته‌های آلوده در مقیاس ۲، D: تعداد بوته‌های آلوده در مقیاس ۳، E: تعداد بوته‌های آلوده در مقیاس ۴

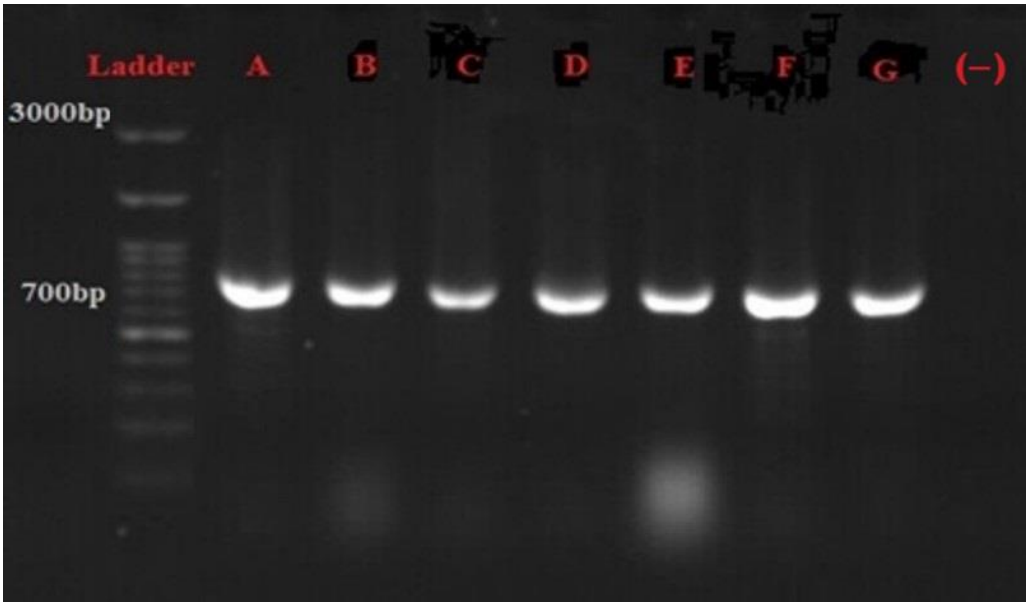
تجزیه و تحلیل داده‌های آماری: تمام آزمایش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SAS ver 9.1 انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey (در سطح احتمال ۵ درصد) و از نرم‌افزار Excel برای مرتب‌کردن داده‌ها و رسم نمودار استفاده شد.

نتایج

نتایج جداسازی و شناسایی جدایه‌ها:

درمجموع، ۳۰ جدایهٔ *Fusarium* از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده جداسازی شدند. جدایه‌ها پس از شناسایی براساس مشخصات مورفولوژیکی، در دو گونهٔ *F. oxysporum* و *F. redolens* به‌ترتیب با فراوانی ۵۶/۷ و ۴۳/۳ قرار گرفتند (شکل ۱) و از ۷ جدایهٔ مشکوک بررسی‌شده در مطالعات مولکولی، ۴ جدایهٔ *F. oxysporum* و ۳ جدایهٔ *F. redolens* شناسایی شدند.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557

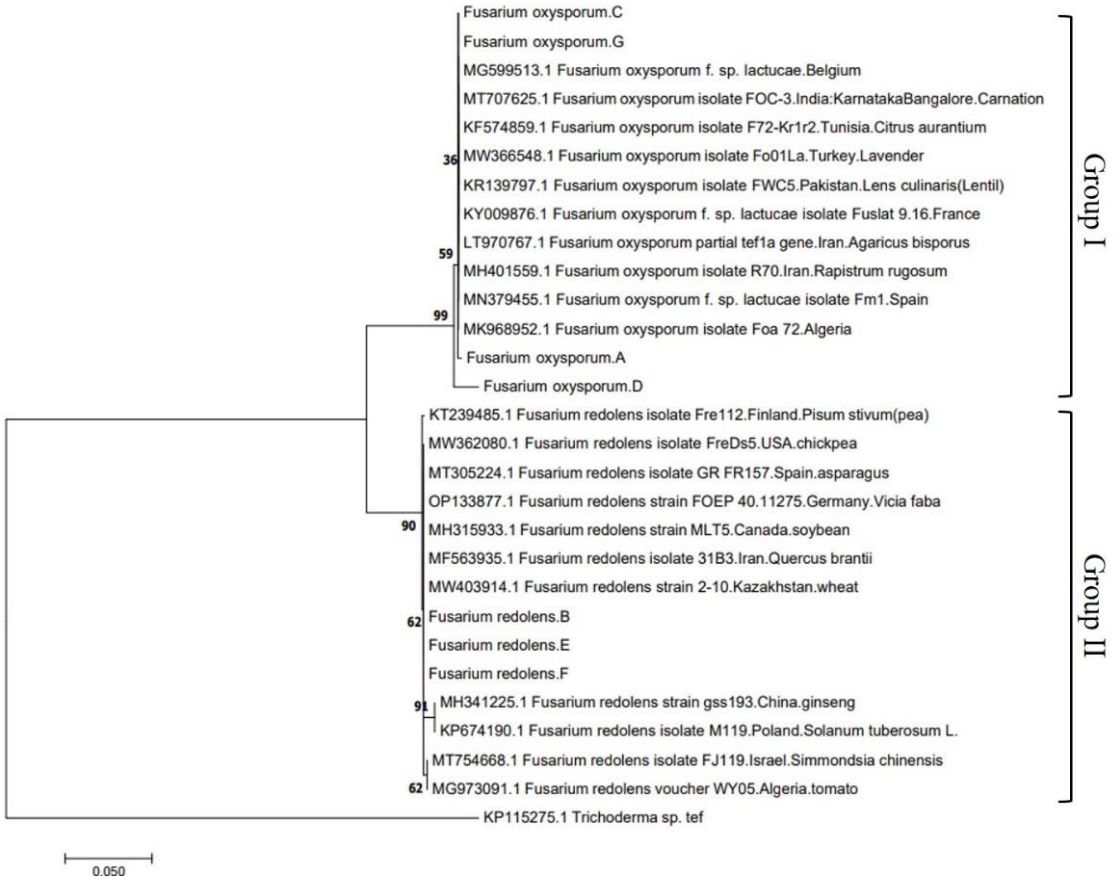


شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR به اندازه تقریبی ۷۰۰ جفت‌باز از ناحیه ژن *TEF* در ۷ جدایهٔ *Fusarium* از به‌لیمو (چاهک اول از سمت چپ مارکر مولکولی 100-3000bp مربوط به شرکت پیشگام، چاهک‌های A-G: قطعات تکثیرشده مربوط به ناحیه ژنی *TEF* از نمونه‌های آلوده به *Fusarium* و چاهک آخر: شاهد منفی)

Fig 1 – Electrophoresis of PCR products approximately 700 bp from the TEF gene region in seven *Fusarium* isolates from lemon verena (the first well from the left side of the 100-3000bp molecular marker belonging to Pishgam company, wells A-G: amplified fragments related to the TEF gene region from the samples *Fusarium*-infected plants and the last well: negative control)

توالی‌های ژن *TEF* جدایه‌های فوزاریوم برای رسم درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل شدند. در درخت رسم‌شده، جدایه‌های فوزاریوم به دو گروه کلی تقسیم شدند: گروه اول شامل جدایه‌های A، C، D و G به‌دست آمده در تحقیق حاضر و گونه‌های *F.oxysporum* سایر توالی‌های موجود در بانک ژن بود و گروه دوم شامل جدایه‌های B، E و F و نیز گونه‌های *F.redolens* دیگر توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن بود. این توالی‌ها از کشورهایی نظیر اسپانیا، آلمان، فنلاند، ایران و سایر کشورها از روی محصولات مختلف شامل کاهو، باقلا، اسطوخودوس، گندم و سایر محصولات، جداسازی و در پایگاه داده‌ای NCBI ثبت شده بودند؛ بنابراین، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی قادر به تمایز گونه‌های فوزاریوم براساس ژن *TEF* بود. در رسم درخت از *Trichoderma* sp. به‌عنوان گروه خارجی با خویشاوندی نزدیک استفاده شد (شکل ۲).

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557



شکل ۲- درخت تبارزایی رسم‌شده با استفاده از روش NJ (Neighbor-joining) با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی در نرم‌افزار MEGA 11.0 براساس توالی نوکلئوتیدی ژن *TEF-1α* برای ۷ جدایهٔ *Fusarium* از به‌لیمو (A-G). جدایه‌ای از گونهٔ *Trichoderma* sp. به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است.

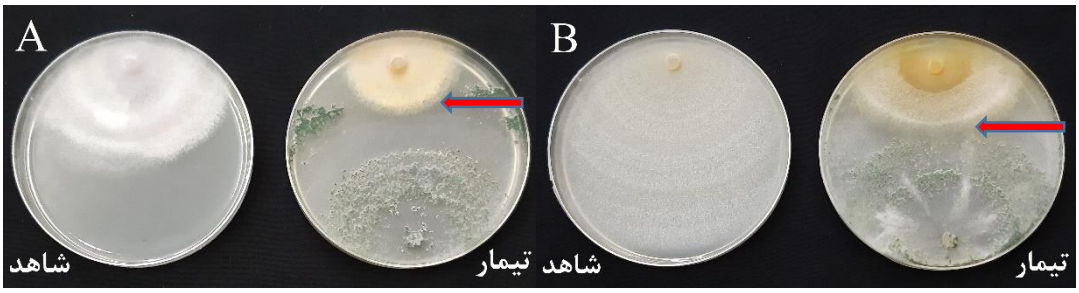
Fig 2 – Genealogical tree drawn using NJ (Neighbor-joining) method with 1000 repetitions in evaluation in MEGA 11.0 software based on nucleotide sequence of TEF-1α gene for seven isolates of *Fusarium* from lemon verena (A-G). An isolate of *Trichoderma* sp. it is considered as an out group.

نتایج آزمون اثبات بیماری‌زایی: به‌منظور انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه، هر دو گونه به روش آغشته‌سازی ریشهٔ نهال‌ها در سوسپانسیون اسپور بوته‌ها مایه‌زنی شدند. علائم بیماری ۱۴ روز پس از مایه‌زنی در اندام‌های هوایی نهال‌های به‌لیمو به‌صورت زردی، پژمردگی و خشکی برگ‌ها همراه با تیره‌شدن ساقه گیاه از نزدیک طوقه به سمت بالا ظاهر شد. چهار هفته پس از تلقیح، علائم بیماری در بافت آوندی ریشه و طوقه، پدیدار و به‌صورت پوسیدگی قهوه‌ای نمایان شد و برگ‌های اولیه خشک شدند و ریزش کردند و درنهایت، سبز خشکی و بوته‌میری عارض شد. پس از برآورد نمونه‌های گلخانه‌ای، هر دو گونه بیماری‌زا بودند؛ اما گونهٔ *F. oxysporum* بیشتر در ساقه و گونهٔ *F. redolens* بیشتر روی ریشه ایجاد بیماری کرده بود و شدت بیماری‌زایی گونهٔ *F. redolens* (۷۸ درصد) نسبت به گونهٔ *F. oxysporum* (۵۵ درصد) بیشتر بود (شکل ۳).

شکل ۳- شدت بیماری‌زایی چهار هفته پس از مایه‌زنی قارچ‌های A) *F. redolens* و B) *F. oxysporum* به نهال‌های به‌لیمو در گلخانه

Fig 3 – Pathogenic severity four weeks after inoculation of fungi (A *Fusarium redolens* and B *F. oxysporum*) to lemon verbena seedlings in the greenhouse.

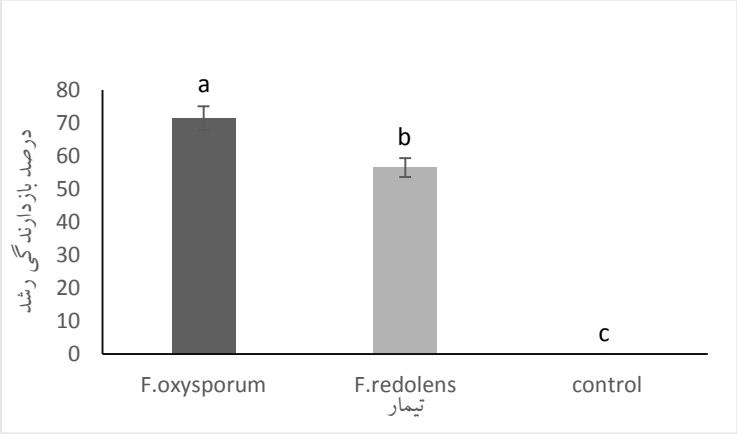
بررسی تأثیر بیوکنترل بر بیمارگرها به روش کشت متقابل: در این پژوهش قارچ بیوکنترل *T. harzianum*، قادر به ممانعت از رشد رویشی قارچ‌های بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* به درجات مختلف بود؛ درنتیجه، پیشروی قارچ عامل مهار زیستی روی پرگنه قارچ عامل بیمارگر *F. redolens* مشاهده شد. در محل برخورد جدایهٔ تریکودرما و عوامل بیماری‌زا رشد میسلیوم‌های آنها بسیار اندک و کم‌تراکم شده بود. همچنین، در این محل میزان اسپور عوامل بیماری‌زا کاهش یافته بود. براساس نتایج مقایسه میانگین، ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی، جدایهٔ *T. harzianum* ازنظر بازدارندگی رشد قارچ‌های عامل بیماری، در سطح احتمال ۵ درصد با همدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند و قارچ‌های عامل بیماری نسبت به شاهد به‌ترتیب در *F. oxysporum*، ۷۱/۵ درصد و در *F. redolens*، ۵۶/۵ درصد کاهش رشد نشان دادند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمون کشت متقابل نشان دادند جدایهٔ *Trichoderma* در برابر رشد قارچ‌های بیمارگر مؤثر بوده است و این عامل بیولوژی در سطح احتمال ۵ درصد، از رشد میسلیوم بیمارگرها ممانعت کرد و دارای اختلاف معنی‌داری است. با توجه به نتایج مقایسه‌های میانگین و درصد بازدارندگی می‌توان گفت قارچ بیوکنترل *T. harzianum*، قارچ بیمارگر *F. oxysporum* را نسبت به *F. redolens* بهتر کنترل می‌کند و بیشتر مانع رشد آن می‌شود (شکل ۴ و ۵).



شکل ۴- تقابل ماکروسکوپی قارچ بیوکنترل *T. harzianum* و بیمارگرهای (A) *F. oxysporum* و (B) *F. redolens* در مقایسه با شاهد بیمارگر به روش Dual culture

Fig 4 – Macroscopic comparison of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* and pathogens (A) *Fusarium oxysporum* and (B) *F. redolens* compared to the pathogen control by Dual culture method.

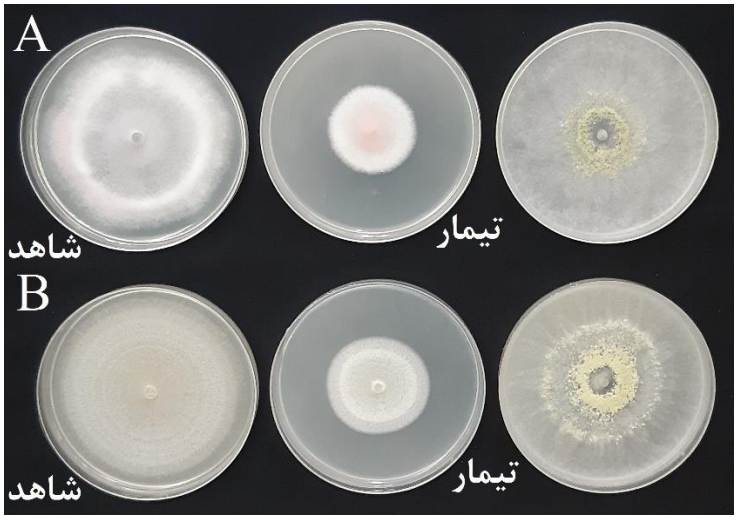
http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557



شکل ۵- مقایسه درصد بازدارندگی جدایهٔ *T. harzianum* از رشد میسلیوم قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. redolens* در کشت متقابل همزمان به روش Dual culture

Fig 5 – Comparison of the inhibition percentage of *Trichoderma harzianum* isolates against the mycelium growth of *Fusarium oxysporum* and *F. redolens* in simultaneous mutual cultivation by dual culture method.

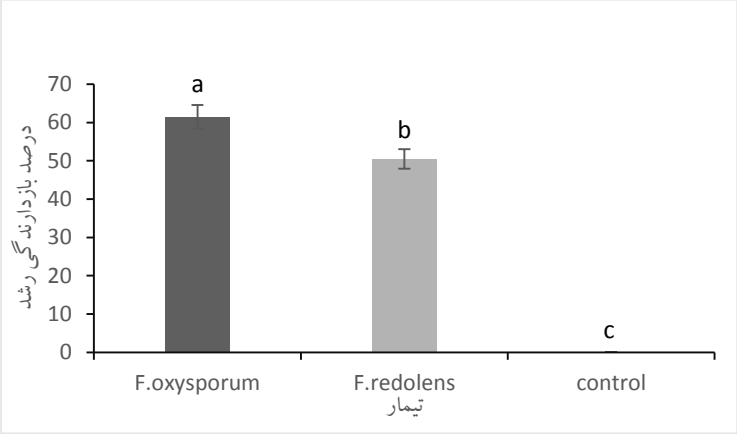
بررسی اثر متابولیت‌های فرار قارچ *Trichoderma* بر رشد بیمارگرها به روش ساندویچ: ازنظر ترکیبات فرار نیز نتایج مقایسه‌های میانگین نشان می‌دهند جدایهٔ *T. harzianum* قادر به کاهش رشد قارچ‌های بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* بوده است. در این مقایسه، ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی، عامل بیوکنترل *T. harzianum* توانست از رشد میسلیوم‌های عوامل بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* به‌ترتیب ۶۱/۵ و ۵۰/۵ درصد، جلوگیری و آنها را نیز کنترل کند (شکل ۶ و ۷).



شکل ۶- تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های فرار *T. harzianum* بر رشد بیمارگرهای *F. oxysporum* (ردیف A) و *F. redolens* (ردیف B) نسبت به شاهد بیمارگر به روش Exposure

Fig 6 – The inhibitory effect of volatile metabolites of *Trichoderma harzianum* on the growth of pathogens *Fusarium oxysporum* (row A) and *F. redolens* (row B) compared to the pathogen control by exposure method.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557



شکل ۷- مقایسه درصد بازدارندگی جدایهٔ *T. harzianum* از رشد میسلیوم قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. redolens* به روش Exposure

Fig 7 – Comparison of inhibition percentage of *Trichoderma harzianum* isolate from the mycelium growth of *Fsariumoxysporum* and *F. redolens* by exposure method.

نتایج مطالعات مهار زیستی در محیط گلخانه:

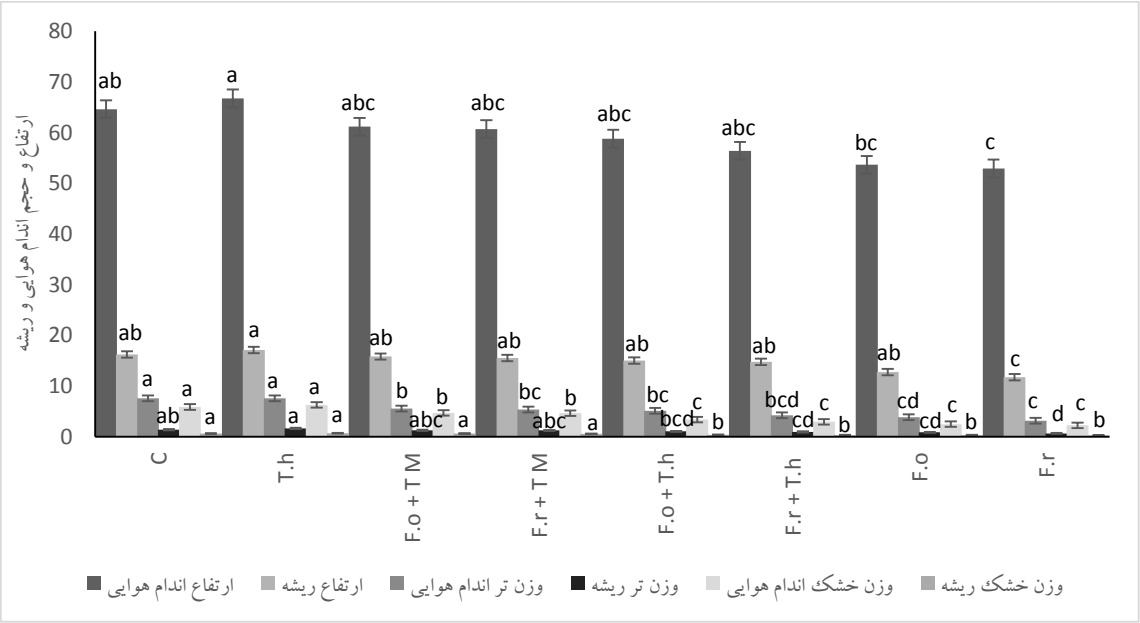
در آزمایش‌های گلخانه‌ای با مایه تلقیح اسپور قارچ‌های عامل بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* در غلظت تعیین‌شده، نتایج نشان دادند حجم و ارتفاع ریشه و اندام‌های هوایی تیمار *T. harzianum* نسبت به شاهد افزایش داشته است؛ بنابراین، افزایش فاکتورهای رشدی تیمارهای تلقیح‌شده با *T. harzianum* نسبت به بیمارگرهای *F. oxysporum* و *F. redolens* دیده شد. کاهش بیماری توسط جدایهٔ *T. harzianum* در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۸).

شکل ۸- مقایسه ریشه تیمارهای بررسی‌شده A) به‌ترتیب از چپ به راست شامل عامل بیوکنترل *T. harzianum*، شاهد سالم، عامل بیوکنترل به‌همراه عامل بیمارگر *F. oxysporum*، شاهد آلوده *F. oxysporum* و B) به‌ترتیب از چپ به راست عامل بیوکنترل *T. harzianum*، شاهد سالم، عامل بیوکنترل به‌همراه عامل بیمارگر *F. redolens*، شاهد آلوده *F. redolens*

Fig 8 – Comparison of the root of the investigated treatments: A) from left to right including biocontrol agent *Trichoderma harzianum*, healthy control, biocontrol agent along with pathogenic agent *Fusarium oxysporum*, infected control *F. oxysporum* and B) from left to right, biocontrol agent *T. harzianum*, healthy control, biocontrol agent with *F. redolens* pathogenic agent, *F. redolens* infected control.

http://dx.doi.org/ 10.22108/bjm.2023.138766.1557

بررسی تأثیر تیمارها بر ارتفاع، وزن تر و وزن خشک نهال‌های به‌لیمو: در این آزمایش، *T. harzianum* با میانگین چهار تکرار و سه زیرتکرار، ۶۶/۷۵ و ۱۷/۱۲ بلندترین ارتفاع اندام هوایی و ریشه را به خود اختصاص داده و پس از آن، *F. redolens* با میانگین چهار تکرار و سه زیرتکرار، ۵۲/۹۱ و ۱۱/۷۸ سانتی‌متر ارتفاع را به‌عنوان کمترین تیمار داشته است. همچنین، بیشترین وزن تر اندام هوایی و ریشه نسبت به شاهد در جدایهٔ *T. harzianum* به‌ترتیب به میزان ۷/۵۷ و ۱/۶۴ گرم افزایش داشته است و بیشترین وزن خشک اندام هوایی و ریشه نیز در جدایهٔ *T. harzianum* به میزان ۶/۲۷ و ۰/۶۸ گرم نسبت به شاهد افزایش یافته است که با کمک آزمون توکی در سطح ۵ درصد با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی در گیاهان سالم تیمارشده با عامل مهار زیستی نشان داد همه تیمارها نسبت به شاهد سالم باعث افزایش شاخص‌های رشدی شده‌اند و همچنین شاهد آلوده تیمارشده با قارچ‌کش متیل تیوفانات و عامل بیوکنترل بر فاکتورهای رشدی تأثیرگذار بوده و باعث ازدیاد آنها شده‌اند (شکل ۹).

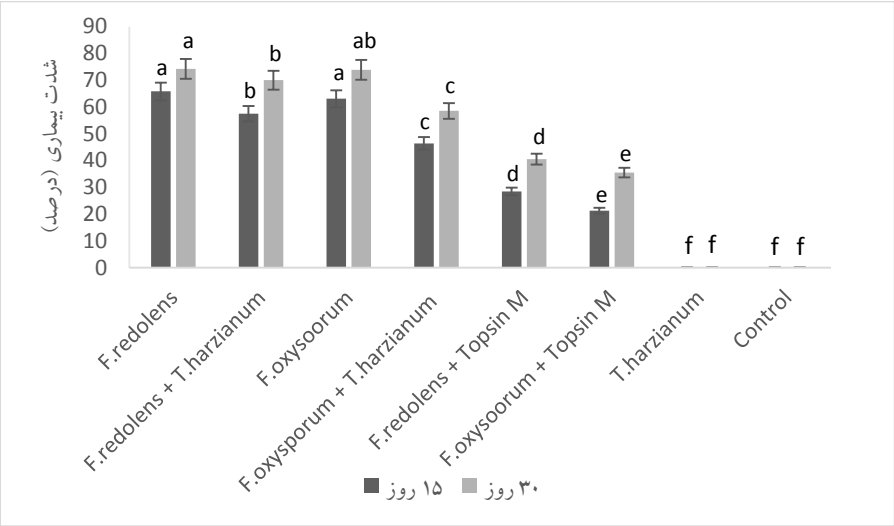


شکل ۹- تأثیر تیمارها بر شاخص‌های رشدی اندام هوایی و ریشه نهال‌های به‌لیمو ۳۰ روز پس از کاشت در شرایط آلوده و غیرآلوده

Fig 9 – The effect of treatments on growth indices of shoots and roots of lemon verbena seedlings 30 days after planting in infected and non-infected conditions.

تأثیر عامل مهار زیستی بر شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو: در این بررسی مشاهده شد قارچ بیوکنترل *T. harzianum* و قارچ‌کش متیل تیوفانات[۲] تأثیر به‌سزایی بر شدت بیماری قارچ‌های بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* نشان دادند. مؤثرترین تیمار در کاهش شدت بیماری *F.o*+T M است. گیاه آلوده بر اثر این عامل شیمیایی به‌طور میانگین، ۲۵ درصد نشانه‌ها را نشان داد. این تیمار باعث

کاهش ۶۴/۵ درصدی شدت نشانه‌ها شد؛ بنابراین، کنترل بیماری به روش استفاده از عامل شیمیایی تأثیرگذارتر از استفاده از عامل بیوکنترل بوده است. تیمارهای *F.r*+T M، *F.o+T.h* و *F.s+T.h* به‌ترتیب با میانگین ۵۹/۵، ۴۱/۵ و ۳۰ درصد کاهش شدت بیماری در رتبه‌های بعدی قرار دارند. این ۴ تیمار با تیمارهای شاهد آلوده (C+*F.r*, C+*F.o*) و تیمار شاهد غیرآلوده (C) ازنظر شدت بیماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- تأثیر عوامل کنترل بیولوژیک بر شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو ۱۵ روز و ۳۰ روز پس از کاشت

Fig 10 –10- The effect of biological control agents on the severity of fusarium wilt disease in lemon verbena 15 days and 30 days after planting.

بحث و نتیجه‌گیری

پس از نمونه‌برداری گیاهان دارای علائم بیماری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های عامل بیماری، شناسایی ۳۰ جدایه با خصوصیات مورفولوژیکی انجام و مشخص شد که ۱۳ جدایه متعلق به *F. oxysporum* و ۱۰ جدایه متعلق به *F. redolens* هستند و ۷ جدایه مشکوک به گونهٔ جدید و مجتمع ازنظر مولکولی بررسی شدند و در نهایت، ۴ جدایه در گونهٔ *F. oxysporum* و ۳ جدایه در گونهٔ *F. redolens* طبقه بندی شدند. در مطالعات کوی کو و همکاران (۳۰) نیز گونهٔ *F. oxysporum* از داخل رویان بذر پیاز جداسازی و شناسایی شده است. در گذشته نیز *F. redolens* و *F. oxysporum* از علف‌های هرز *Coix lacrymajobi* (۳۱) و علف‌باغ *Dactylis glomerata* (L.) D.C. (۳۲) جداسازی و شناسایی شده‌اند که این گونه‌ها متعلق به تیره گندمیان هستند. جدایه‌های هر دو گونه با توصیف‌های صارمی (۱۳۷۷) (۳۳) منطبق بودند. مشخصات قارچ *F. redolens* جداشده از گیاه دارویی به‌لیمو از لحاظ رنگ پرگنه، اندازه و شکل فیالید، ماکروکنیدیوم، میکروکنیدیوم با مشخصات ذکرشده توسط خداپرست و هجاروده (۱۳۷۵) (۳۴) و کلیدهای (۳۵) مشابه بود. همچنین، مشخصات قارچ *F. oxysporum* با مشخصات مشاهده‌شده در تحقیق فریدی و کاوسی (۱۳۹۱) (۳۶) مطابقت داشت. هر دو

گونه در آزمون اثبات بیماری‌زایی در گلخانه به روش آغشته‌سازی ریشه نهال‌ها در سوسپانسیون اسپور قارچ‌های عامل بیماری به کار گرفته شدند و هر دو خسارت وارد کردند و بیماری‌زا بودند. در تحقیقات قبل، گزارش زیادی از *F. oxysporum* به‌عنوان بیمارگر در گیاهان مختلف گزارش شده است. همچنین، در ایران گونهٔ *F. oxysporum* به‌عنوان عامل بیماری‌زا در گیاهان دارویی اسطوخودوس و رزماری گزارش شده است (۳۷). اثبات بیماری‌زایی *F. redolens* روی گیاه دارویی به‌لیمو با نتایج اوجی اردبیلی و همکاران (۳۸) روی گیاه دارویی رزماری در سمنان مطابقت داشت.

جدایهٔ *T. harzianum* برای اثبات فعالیت آنتاگونیستی در برابر بیمارگرهای *F. oxysporum* و *F. redolens* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. در بررسی ماکروسکوپی تقابل جدایهٔ قارچ *Trichoderma* با گونه‌های قارچ فوزاریوم با استفاده از روش کشت متقابل همزمان (Dual culture) مشاهده شد که جدایهٔ *T. harzianum* رشد هر دو قارچ بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* را محدود کرده است؛ بنابراین، پیشروی (نفوذ و پیچیدگی) قارچ عامل بیوکنترل روی پرگنه قارچ عامل بیمارگر *F. redolens* مشاهده شد؛ اما جدایهٔ *T. harzianum* قادر به پیشروی روی پرگنه عامل بیمارگر *F. oxysporum* نبود و فقط از رشد میسلیوم ممانعت کرد. اشرفی‌زاده و همکاران (۱۳۸۳) نشان دادند *Trichoderma* sp. جدایهٔ ۹۶ مانع از رشد قارچ عامل بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *melonis* شدمی‌شود؛ اما روی پرگنه عامل بیماری پیشروی نمی‌کند (۳۹). بیشترین درصد بازدارندگی از رشد به میزان ۷۱/۵ درصد در تقابل همزمان جدایهٔ *T. harzianum* با عامل بیمارگر *F. oxysporum* و کمترین درصد بازدارندگی از رشد به میزان ۵۶/۵ در تقابل همزمان جدایهٔ *T. harzianum* با عامل بیمارگر *F. redolens* مشاهده و مشخص شد که قارچ بیوکنترل *T. harzianum*، قارچ بیمارگر *F. oxysporum* را نسبت به *F. redolens* بهتر کنترل می‌کند و بیشتر مانع رشد آن می‌شود. نتایج بررسی اعتباریان و همکاران (۱۳۷۸) نشان‌دهندهٔ قدرت تغذیه‌ای بالای *Trichoderma* است (۴۰). در بررسی اثر متابولیت‌های فرار (گازی) حاصل از جدایهٔ تریکودرما با روش ساندویچ مشخص شد جدایهٔ تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ‌های عامل بیماری مؤثر است. ترکیبات فرار جدایهٔ *T. harzianum* با ۶۱/۵ درصد بازداری از قارچ بیمارگر *F. oxysporum* و ۵۰/۵ درصد بازداری از قارچ بیمارگر *F. redolens* به‌ترتیب بیشترین و کمترین اثر را در جلوگیری از رشد و گسترش بیماری داشتند. درصد بازداری از رشد قارچ‌های عامل بیماری بر اثر این ترکیبات با گذشت زمان، افزایش و یک روند صعودی نسبت به زمان داشت که ممکن است به‌دلیل تجمع بیشتر ترکیبات فرار طی گذشت زمان در محیط بسته داخل تشتک باشد؛ چنین نتایجی با گزارش‌های دیگر محققان تطابق دارد (۴۱). طبق مطالعات مختلف موجود، مشخص شده است گونه‌های تریکودرما با تولید متابولیت‌های فرار، رشد بیمارگر را مختل می‌کنند (۴۲).

در پژوهش حاضر مشخص شد اضافه‌کردن جدایهٔ *T. harzianum* در شرایط گلخانه به خاک اطراف نهال، موجب افزایش شاخص‌های رشدی (ارتفاع، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و ریشه) و نیز کاهش شدت بیماری و علائم زردی و پژمردگی در نهال‌های به‌لیمو آلوده به قارچ *F. oxysporum* و *F. redolens* می‌شود؛ اما تأثیر قارچ‌کش متیل تیوفانات به‌دلیل شیمیایی‌بودن

به‌مراتب بیشتر از جدایهٔ *Trichoderma* بود. این موفقیت جدایهٔ *Trichoderma* می‌تواند حاصل استقرار سریع این جدایه روی ریشه و خاک اطراف آن باشد که اجازهٔ استقرار را به قارچ‌های بیمارگر نداده است و درنتیجه، موجب کاهش بیماری شده‌اند. آزمون بیماری‌زایی در این تحقیق نشان داد قارچ بیوکنترل *T. harzianum* توانایی بازدارندگی از رشد هر دو بیمارگر را دارد؛ اما قارچ *F. oxysporum* در ایجاد بیماری نسبت به قارچ *F. redolens* از توسعه و شدت کمتری برخوردار است. نتایج نشان دادند داده‌ها اختلاف معنی‌داری در ارتفاع ساقه و طول ریشه، وزن تر و خشک ساقه و همچنین وزن تر و خشک ریشه در نهال‌های به‌لیمو نسبت به شاهد آلوده داشتند. با توجه به تحقیقات انجام‌شده، استفاده از عوامل مهار زیستی به‌ویژه گونه‌های *Trichoderma* در کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی فوزاریومی بسیار مؤثر است. در پژوهشی استفاده از دو جدایهٔ *T. harzianum* T22 و *T. harzianum* P1 باعث افزایش معناداری در وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، طول گیاه، تعداد برگ و میوه گوجه فرنگی شدند (۴۳). تأثیر گونه‌های جنس *Trichoderma* بر قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی توسط نیک‌نژاد و همکاران (۴۴) بررسی شد و نتیجه گرفته‌اند که در شرایط گلخانه‌ای جدایهٔ کرج *T. harzianum* به میزان ۶۸ درصد، جدایهٔ اهواز *T. harzianum* به میزان ۶۳ درصد، جدایهٔ شهریار *T. viride* به میزان ۶۰ درصد و جدایهٔ *T. viride* مؤسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی به میزان ۵۷ درصد باعث کاهش میزان پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی شده است (۴۴).

آگاهی و شناخت کافی از عوامل تأثیرگذار در بهبود عملکرد عوامل زیستی تأثیر به‌سزایی دارد. بهترین روش در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو استفاده از سموم شیمیایی است؛ اما به دلایلی مانند افزایش مقاومت بیمارگر و حضور نژادهای جدید از بیمارگر، مقرون‌به‌صرفه نبودن روش شیمیایی و باقی‌ماندن سم در محیط زیست، استفاده از روش شیمیایی به تنهایی در کنترل بیماری مؤثر نیست. با استفاده از عوامل کنترل زیستی به‌منظور رفع کمبود و خطرات ناشی از سموم شیمیایی در طبیعت، برای مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی به‌لیمو می‌توان اقدام کرد. نتایج نشان می‌دهند بیوکنترل قارچی *T. harzianum* پتانسیل رشد و جلوگیری از پیشرفت بیماری را در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شرایط گلخانه افزایش می‌دهد. قارچ *T. harzianum* از عوامل بیوکنترل، صفات محرک رشد گیاه و پتانسیل کنترل زیستی را در برابر قارچ‌های بیمارگر *F. oxysporum* و *F. redolens* افزایش داد. چنین عامل محرکی علاوه بر بهبود رشد گیاه و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه باعث کنترل بیمارگر نیز می‌شود؛ بنابراین، قارچ بیوکنترل *Trichoderma* می‌تواند به‌عنوان یک جزء در مدیریت کنترل زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی برای افزایش بهره‌وری محصول و برای تولید محصول ایمن و سازگار با محیط زیست استفاده شود.

References

(1) Suna, SE, Incedayi Bİ, Tamer CE, Ozcan-Sinir GÜ, Copur ÖU. *Lemon verbena* (*Lippia citriodora* Kunth) beverages: Physicochemical properties, contents of total phenolics and minerals, and bioaccessibility of antioxidants. Italian Journal of Food science. 2019; 31: 40-57. https://doi.org/10.14674/IJFS-1161

(2) Filion, M, St-Arnaud M, Jabaji-Hare SH. Quantification of Fusarium solani f. sp. phaseoli in mycorrhizal bean plants and

Phytopathology. 2003 Feb;93(2):229-35. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.2.229

(3) Booth, C. The Genus *Fusarium*. Common Wealth Mycological Institute. Kew, UK, Commonwealth Mycological Institute.; 1971. p. 237. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19721603830

(4) Gerlach, W. The present concept of *Fusarium* classification. In: P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook. editor. Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy. University Park, PA, USA, Pennsylvania State University Press; 1981: 413-426.

(5) Lahlali, R, Ezrari S, Radouane N, Kenfaoui J, Esmaeel Q, El Hamss H, Belabess Z, Barka EA. Biological control of plant pathogens: A global perspective. Microorganisms. 2022 Mar 9;10(3):596. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030646

(6) Benitez, T, Rincón AM, Limón MC, Codon AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International microbiology. 2004 Dec;7(4):249-60. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15666245/

(7) Kaewchai, S. Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal Divers. 2009; 38:25-50. https://cir.nii.ac.jp/crid/1572261549925129216

(8) Howell, CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant disease. 2003 Jan; 87(1):4-10. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4

(9) Cherif M, Benhamou N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology. 1990 Dec 1; 80(12):1406-14. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1990Articles/Phyto80n12_1406.pdf

(10) Elad, Y, Chet I, Katan J. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology. 1980 Jan 1; 70(2): 119-21. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n02_119.PDF

(11) Sivan, A, Ucko O, Chet I. Biological control of Fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. Plant Disease. 1987; 71(7): 587-92. 10.1094/PD-71-0587

(12) Akrami, M, Ibrahimov AS, Zafari DM, Valizadeh E. Control Fusarium rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. Agricultural Journal. 2009; 4(3): 121-3. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20093217809

(13) Barari, H. Biocontrol of tomato Fusarium wilt by *Trichoderma* species under invitro and in vivo conditions. Cercetări Agronomice în Moldova. 2016;49(1):91- 98. https://doi.org/10.1515/cerce-2016-0008

(14) Pratt, RG. Variation in occurrence of dematiaceous hyphomycetes on forage bermudagrass over years, sampling times, and locations. Phytopathology. 2005 Oct; 95(10):1183-90. https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1183

(15) Leslie, JF, Summerell BA. The Fusarium laboratory manual. John Wiley & Sons; 2008 Feb 28.

(16) Nelson, PE., Toussoun, TA., Marasas, WFO. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. University Park: *Fusarium* species. 1983: 157-168.

(17) Crous, PW, Lombard L, Sandoval-Denis M, Seifert KA, Schroers HJ, Chaverri P, Gené J, Guarro J, Hirooka Y, Bensch K, Kema GH. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. Studies in mycology. 2021 Mar 1; 98:100116. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116

(18) Zhong, S, Steffenson BJ. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology. 2001 May; 91(5): 469-76. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.5.469

(19) O'Donnell, K, Al-Hatmi AM, Aoki T, Brankovics B, Cano-Lira JF, Coleman JJ, De Hoog GS, Di Pietro A, Frandsen RJ, Geiser surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media.

DM, Gibas CF. No to *Neocosmospora*: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. Msphere. 2020 Oct 28; 5(5): 10-128. https://doi.org/10.1128/mSphere.00810-20

(20) Tamura, K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 2013 Dec 1; 30(12): 2725-9. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197

(21) Shahbazi, S, Zaker Tavallaie F, Daroodi Z. Morphological and molecular identification of *Fusarium* spp. associated with carnation *Dianthus caryophyllus* in Mahallat, Iran. Journal of Crop Protection. 2021 Jun 10; 10(3): 461-71. https://doi.org/20.1001.1.22519041.2021.10.3.7.5

(22) Dennis, C., Webster, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans Brit Mycol Soc. 1971; 57:41-8. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5

(23) Mohammadi, S. Investigating the population structure and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *sesame*, the causative agent of sesame yellowing and wilting disease in Fars province using vegetative compatibility groups and molecular methods. PhD [Dissertation]. Tehran: Islamic Azad University, Science and Research Unit; 2009. [In Persian].

(24) Mohammadi, N. Studies on pathogenecity and genetic diversity of some Iranian isolates *Fusarium oxysporum* f. sp *lentis* and determination of resistant lentil cultivars. M. SC. [Dissertation]. Tehran: University of Tarbiat Modares; 2010. [In Persian].

(25) Pastore-Corrales, MA, Abawi GS. Reactions of selected bean germ plasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Plant disease. 1987; 71(11): 990-3. 10.1094/PD-71-0990

(26) Kari-Dolatabadi, H, Mohammadi Goltapeh E. In vivo biological activity of *Piriformospora indica*, *Sebacina vermifera* and *Trichoderma* spp. against *Fusarium* wilt of lentil. Plant Protection Journal. 2010; 2(2): 127-43. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133113071 [In Persian].

(27) Ristaino, JB. Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. Phytopathology. 1990; 80(11): 1253-9. http://doi.org/10.1094/Phyto-80-1253

(28) Tomah, AA, Abd Alamer IS, Li B, Zhang JZ. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: A new observation in enhancing biocontrol potential of T. *virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. Biological Control. 2020 Jun 1; 145: 104261. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104261

(29) Cardoso, JE, Santos AA, Rossetti AG, Vidal JC. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. Plant Pathology. 2004 Jun; 53(3): 363-7. https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01007.x

(30) Koyku, ND, Özer N. Determination of seedborne fungi in onion and their transmission to onion sets. Phytoparasitica. 1997 Mar; 25: 25-31. https://doi.org/10.1007/BF02981476

(31) Jia, M, Ming QL, Zhang QY, Chen Y, Cheng N, Wu WW, Han T, Qin LP. *Gibberella moniliformis* AH13 with antitumor activity, an endophytic fungus strain producing triolein isolated from adlay (*Coix lacryma-jobi*: Poaceae). Current microbiology. 2014 Sep; 69: 381-7. https://doi.org/10.1007/s00284-014-0590-z

(32) Sanchez Márquez, S., Bills, GF., Zabalgogeazcoa, I. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Divers. 2007; 27: 171-195. http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/27_11

(33) Saremi, H. Ecology and Taxonomy of *Fusarium* Species. [Dissertation]. Holy War University of Mashhad; 1998. [In Persian].

(34) Khodaparast, AS., Hejaroude, GH. Fungal pathogens of tea in northern Iran. J. Plant Path. 1996; 32: 233-43. [In Persian].

(35) Barnet, HL., Hunter, BB. Illustrared Genera of Imperfect Fungi. 1988(4th ed). APS Press.

(36) Faridi, F., Cavusi, MR. Identification and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* species causing wilting of tall mazu seedlings

chestnut- leaves oak (*Quercus castaneifolia*) in Golestan province. Journal of Wood and Forest Science and Technology. 2012; 19(3): 189-200. https://doi.org/20.1001.1.23222077.1391.19.3.12.7 [In Persian].

(37) Ashrafi, SJ, Rastegar MF, Saremi H. Rosemary wilting disease and its management by soil solarization technique in Iran. African Journal of Biotechnology. 2010;9(42):7048-57. https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/130300

(38) Oji-ardebili, MM., Ahmadzadeh, M., Sharifi-tehrani, A., Javan-khah, M. Tree species of *Fusarium* isolated from rot and crown of rosmary medicinal plant in Semnan. Iranian Journal of Plant Pathology. 2008; 44: 68-69.

(39) Ashrafizadeh, A., Etebarian, HR., Zamanizadeh, HR. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of Fusarium wilt of melon. Iranian Journal of Plant Pathology. 2005; 41: 39-57. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20073009210 [In Persian].

(40) Etebarian, HR, Scott ES, Wicks TJ. *Trichoderma harzianum* T39 and T. *virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. European Journal of Plant Pathology. 2000 May; 106: 329-37. https://doi.org/10.1023/A:1008736727259

(41) Chavan, SC, Hegde YR, Prashanthi SK. Management of wilt of patchouli caused by *Fusarium solani*. Journal of Mycology and Plant Pathology. 2009; 39(1): 32-4.

(42) Abbaszadeh, F., Mohammadi-goltape, A., Pourjam, A., Khorasani, A., Rezaei-danesh, Y., Verma, A. Investigating the antagonistic ability of root endophyte fungus and *Trichoderma* species on *Macrophomina phaseolina* fungus in laboratory conditions. Journal of Plant Disease Research. 2011; 1: 1-15.

(43) Vinale, F, D'Ambrosio G, Abadi K, Scala F, Marra R, Woo SL, Ciliento R, Lorito M. Application of *Trichoderma harzianum* (T 22) and *Trichoderma atroviride* (P 1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. Journal of Plant Pathology. 2004 Dec; 86(4): 336. https://www.zjujournals.com/agr/CN/Y2004/V30/I4/425

(44) Niknejad-kazempour, M., Sharifi-tehrani, A., Akhovat, M. Investigating the effect of antagonistic fungi *Trichoderma* spp. against fusarium wilt disease of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* under greenhouse conditions. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 1999; 31(1): 31-37.

[1] NaClO

[2] Topsin M