Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

47(4), Winter, 2025

10.22055/ppr.2024.48075.1764

The ability of some *Trichoderma* isolates and epiphytic bacteria to inhibit the growth of the wheat septoriosis agent

M. Heidarizadi [1], Kh. Abbasi *[2], A. Maarefat [3], J. Ashrafi [4]

1. M.Sc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran (kh.abasi@ilam.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
4. Expert, Department of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research Center of Ilam Province, AREEO, Ilam, Iran

Received: 1 October 2024 Revised: 28 November 2024 Accepted: 7 December 2024

Abstract

Background and Objective

Septoriosis is one of the most important diseases of wheat worldwide, including in Iran. Due to the large cultivated area of wheat and the economic significance of this crop in Ilam province, this study was conducted to investigate the combined effects of *Trichoderma* fungus and epiphytic bacteria in reducing the damage caused by *Zymoseptoria tritici*, on two varieties of wheat, Mehregan and Tajan, both in vitro and under greenhouse conditions.

Materials and Methodscyu dgc

The biocontrol ability against *Z. tritici* by 36 *Trichoderma* isolates and 207 epiphytic bacteria strains was evaluated in vitro by two methods, duel culture and production of volatile metabolites in *Trichoderma* isolates, and three tests including antibiotic, volatile metabolite, and siderophore production in epiphyte bacteria strains.

Trichoderma inoculum was prepared according to the method of Cordo et al. (2020). Fungal suspension was prepared and the concentration of spores in the resulting suspension was determined using a hemocytometer slide, 1×10^8 conidia per ml for each *Trichoderma* isolate. Then, ten milliliters of the suspension prepared from each isolate were mixed with 90 milliliters of 0.25% agar water. The seeds of Tajen and Mehrgan cultivars were added to the above suspension. The seeds coated with *Trichoderma* were dried in the dark at room temperature, and after 24 hours, they were planted in 2 kg sterile pots. 5-7 seeds were used in each pot.

To prepare the inoculum of epiphyte bacteria, the 24-hour culture of bacteria on NA culture medium was used, and a suspension of bacteria was prepared in sterile distilled water, and optical absorption of 0.1 at a wavelength of 600 nm was done using a spectrophotometer. Inoculation of the bacterial inoculum was done using a manual spore sprayer 24 hours before the inoculation of the pathogenic fungus.

After preparing the pathogenic fungus spore suspension, two-leaf seedlings (14 days old) were inoculated. The pots were covered with plastic bags for 72 hours and kept in the dark for 24 hours. During this period, the pots' environment was kept moist using a hand sprinkler. After the mentioned period, the plastic bags were removed from the surface of the pots and kept for another 21 days at a temperature of 23 degrees Celsius and in a humidity condition higher than 70%.

Under greenhouse conditions, growth characteristics of wheat including fresh and dry weight root (g), fresh and dry weight shoot (g), and plant height (cm), were evaluated in the presence

of pathogenic fungus and biocontrol agents. The data analysis ANOVA (Analysis of variance) was conducted using the SAS software version 9.4 as a factorial test in completely randomized design (CRD) with three replicates.

Results

The results showed two fungal isolates, T6 (*T. Longibrachiatum*) and T1 (*T. harzianum*), and three bacterial strains, C1d (*S. saprophyticus*), Dr1b (*P. agglomerans*), B2b (*Entrobacter* sp.) could inhibit of the growth of *Z. tritici* in vitro, which the mentioned isolates were selected for the greenhouse test.

The greenhouse results showed the strong effect of combined treatment of fungus-bacterial T6+C1d (*T. longibrachiatum+S saprophyticus*) in increasing all functional traits of wheat and T1+B2b treatment (*T. harzianum+ Entrobacter* sp.) had the lowest effect on plant functional traits.

The t-test results between Mehregan and Tajan cultivars showed the highest fresh and dry weight root, fresh and dry weight shoot, and plant height were obtained for the Tajen variety. Generally, the results showed the positive effect of various fungal and bacterial isolates in reducing the pathogenicity and damage caused by septoriosis disease.

Discussion

The results of the antagonistic ability of fungal isolates and epiphytic bacteria in vitro and greenhouse showed a good correlation between the two conditions. So, the results showed a positive effect of the fungal and bacteria isolates in reducing *Zymoseptoria* damages. Finally, isolates T6 (*T. Longibrachiatum*) and T1 (*T. harzianum*) and three bacterial strains C1d (*S. saprophyticus*), Dr1b (*P. agglomerans*), B2b (*Entrobacter* sp.) were introduced as the strongest antagonistic agents in control of this fungus. The possible main effects of *T. longibrachiatum* are related to induce resistance in the plant and the production of volatile metabolites and antibiotics, and in bacteria are related to produce of volatile metabolites, antibiotics, and siderophores.

Keywords: Antagonist, Biological Control, Duel Culture, Siderophore

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Heidarizadi, M., Abbasi, Kh., Maarefat, A. & Ashrafi, J. (2025). The ability of some *Trichoderma* isolates and epiphytic bacteria to inhibit the growth of the wheat septoriosis agent. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 47*(4), 45-59. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2024.48075.1764.

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ۴۷، شماره ٤، زمستان ۱٤۰۳

10.22055/ppr.2024.48075.1764

توانایی برخی جدایه‌های *Trichoderma* sp. و باکتری‌های اپی‌فیت در بازدارندگی رشد عامل بیماری سپتوریوز گندم

مریم حیدری زادی [۱]، خدیجه عباسی *[۲]، علیرضا معرفت [۳]، جواد اشرفی [۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- * **نویسنده مسوول**: استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران (kh.abasi@ilam.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

٤- کارشناس، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۷

چکیده

سپتوریوز گندم یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله ایران می‌باشد. با توجه به سطح زیر کشت بالای گندم و خسارت این بیماری در استان ایلام، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر برخی جدایه‌های گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما و سویه‌های باکتری‌های اپی‌فیت در بازدارندگی از رشد قارچ عامل سپتوریوز (*Zymoseptoria tritici*) در شرایط آزمایشگاه و کاهش خسارت بیمارگر در شرایط گلخانه روی دو رقم گندم مهرگان و تجن انجام گرفت. در آزمایشگاه توانایی بازدارندگی ۳٦ جدایه‌ی مختلف قارچ تریکودرما با روش‌های آزمون کشت متقابل و تولید متابولیت‌های فرار، همچنین اثر بازدارندگی ۲۰۷ سویه باکتری اپی‌فیت به‌دست آمده از برگ‌های گندم با آزمون‌های تولید آنتی‌بیوتیک، تولید متابولیت‌های فرار و تولید سیدروفور بررسی گردید. در شرایط گلخانه نیز فاکتورهای رشدی گندم از قبیل ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ریشه و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی در حضور متقابل قارچ بیمارگر و عوامل بیوکنترل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی‌های آزمایشگاهی نشان داد دو جدایه‌ی قارچی T6 (*T. longibrachiatum*) و T1 (*T. harzianum*) و سه سویه‌ی باکتریایی C1d (*Staphylococcus saprophyticus*)، Dr1b (*Pantoea agglomerans*) و B2b (*Entrobacter* sp.) دارای بیشترین قدرت بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری بودند که جدایه‌های مذکور برای آزمون گلخانه انتخاب شدند. نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان دهنده تأثیر قوی تیمار ترکیبی قارچ-باکتری T6+C1d (*T. longibrachiatum+S. saprophyticus*) در افزایش تمام صفات عملکردی گندم بوده و تیمار T1+B2b (*T. harzianum+ Entrobacter* sp.) دارای کمترین اثر در تمام صفات عملکردی گیاه بود. همچنین نتایج حاصل از آزمون t-test بین دو رقم مهرگان و تجن نشان داد به‌طورکلی از نظر فاکتورهای رشدی در حضور عوامل بیوکنترل، بیشترین وزن تر و خشک ریشه، بیشترین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و بیشترین میزان ارتفاع بوته مربوط به رقم تجن به‌دست آمد.

کلیدواژه‌ها: آنتاگونیست، سیدروفور، کشت متقابل، کنترل بیولوژیک

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضائی

مقدمه

گندم به‌عنوان مهم‌ترین و راهبردی‌ترین محصول کشاورزی در ایران و جهان شناخته می‌شود (Bagheri et al., 2019). در ایران در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ بیشترین میزان تولید از بین محصولات زراعی دیم با تولید ۴/۴۷ میلیون تن و سهم ۷۴/۹۸ درصد و از بین محصولات کشت آبی نیز رتبه دوم میزان تولید با تولید حدود ۸/۸۱ میلیون تن مربوط به محصول گندم بوده است. در استان ایلام نیز گندم از بین محصولات زراعی بیشترین سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است. سطح برداشت این محصول در این استان در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ حدود ۱۰۹/۶۵ هزار هکتار و میزان تولید و عملکرد آن به ترتیب ۲۳۸/۴۵۰ هزار تن و ۴۸۹ کیلوگرم در هکتار بوده است (Ahmadi et al., 2023). بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید گندم هستند (Kasa et al., 2015). سپتوریوز یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم می‌باشد که باعث کاهش شدید کیفیت دانه‌ها می‌شود (Fones & Gurr, 2015; Mahmudi et al., 2015). قارچ *Zymoseptoria tritici* در مناطق با میزان بارندگی بالا بیشترین خسارت را ایجاد می‌کند، به دلیل شرایط آب و هوایی مساعد برای بیمارگر در شهرستان‌های مهران و دهلران استان ایلام خسارت بیمارگر بالا می‌باشد، به طوری که در بعضی از مزارع خسارت ناشی از بیمارگر بیش از ۳۰ درصد گزارش شده است. با توجه به سطح زیر کشت بالای گندم به عنوان کشت اصلی در این مناطق و وجود کانون‌های آلودگی، گاهی میزان خسارت بسته به شرایط آب‌وهوایی تا ۱۰۰ درصد هم می‌رسد که از لحاظ اقتصادی خسارت جبران‌ناپذیری به کشاورزان منطقه وارد می‌سازد. با توجه به خسارت‌زا بودن بیماری سپتوریوز در بسیاری از استان‌های کشور، اتخاذ راهبردهای مناسب برای مدیریت بیماری ضروری به‌نظر می‌رسد (Nourollahi, 2017). کنترل سپتوریوز بیشتر از طریق استفاده از قارچ‌کش‌ها و کاربرد ارقام مقاوم انجام می‌شود. با توجه به مضرات استفاده از قارچ-کش‌های شیمیایی از قبیل اثرات مخرب آن‌ها روی انسان و محیط زیست، استفاده از روش‌های مهار زیستی می‌تواند به عنوان روش جایگزین مناسب برای کنترل این بیماری در نظر گرفته شود (Abasi Manesh et al., 2019). ویژگی‌های متنوعی از قبیل رشد سریع، تکثیر راحت، قابلیت استفاده از بسترهای متنوع، مقاومت در برابر مواد شیمیایی مضر، سازگاری رشد در اکوسیستم‌های مختلف، القای مقاومت در گیاه و تولید متابولیت‌های متنوع، قارچ *Trichoderma* را قادر می‌سازند به عنوان یک عامل مهار زیستی کارآمد مورد استفاده قرار گیرد (Sun et al., 2010; Kamala et al., 2015). همچنین باکتری‌های اپی‌فیت، ضمن افزایش شاخص‌های رشدی گیاه و القای مقاومت سیستمیک، فعالیت خود را از طریق تولید آنزیم‌های کشنده، تولید آنتی‌بیوتیک، رقابت بر سر مواد غذایی و فضا، حذف آلاینده‌ها و تولید متابولیت‌های فرار اعمال می‌کنند و به عنوان عوامل مهم در مهار بیمارگرهای گیاهی مطرح می‌باشند (Vos et al., 2014; Omidinasab & Khodakaramian, 2017). با توجه به سطح زیر کشت بالای گندم و اهمیت اقتصادی این محصول در استان ایلام و خسارت بالای قارچ عامل بیماری سپتوریوز گندم، انجام پژوهش حاضر با هدف معرفی جدایه‌های موفق قارچ تریکودرما و باکتری‌های اپی‌فیت گندم با قابلیت بیوکنترلی بالا جهت کاهش خسارت قارچ بیمارگر ضروری به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی قارچ عامل بیماری سپتوریوز

نمونه‌برداری در اسفند ماه سال ۱۳۹۹ از مزارع آلوده گندم آبی شهرستان‌های مهران و دهلران (استان ایلام) صورت گرفت. گیاهان آلوده دارای برگ‌هایی با لکه‌های قهوه‌ای رنگ بودند که در مرکز آن‌ها نقاط سیاه‌رنگی شامل پیکنیدهای قارچ عامل بیماری وجود داشت. به منظور جداسازی قارچ عامل بیماری از برگ‌های آلوده، حدفاصل بافت سالم و آلوده برش داده شد و سه تا چهار قطعه‌ی برگی پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در تشتک پتری حاوی آب‌آگار قرار داده شدند. پس از ۴۸-۲۴ ساعت قطعات برگی در زیر استریومیکروسکوپ بررسی شدند، از محل خروج توده کنیدی‌ها از دهانه پیکنیدها با استفاده از سوزن سترون، پیکنیدیوسپورهای قارچ به محیط

کشت مالت‌آگار حاوی مخمر (YMDA[1]) (۴ گرم مخمر، ۴ گرم عصاره مالت، ۴ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب‌مقطر) منتقل گردیدند (Nourollahi, 2017). پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت خالص‌سازی قارچ عامل بیماری به روش برداشتن نوک هیف انجام شد. شناسایی قارچ عامل بیماری با استفاده از کلیدهای شناسایی Shoemaker & Bobcock (1989) و Cunfer & Ueng (1999) صورت گرفت و به منظور بررسی مولکولی جدایه¬های قارچی منتخب، ناحیه ژنی بتاتوبولین[2] با استفاده از آغازگرهای bt2a و bt2b تکثیر و توالی‌یابی شد. اثبات بیماری‌زایی نیز بر اساس اصول کخ با مشاهده مجدد علایم بیماری و جداسازی دوباره قارچ عامل بیماری تأیید گردید.

جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی *Trichoderma* sp.

در مهر ماه سال ۱۴۰۰ به طور تصادفی نمونه‌برداری از خاک مزارع گندم آبی تمام شهرستان‌های استان ایلام صورت گرفت. در مناطق مورد نمونه‌برداری از عمق ۳۰-۵ سانتی‌متری خاک زراعی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده با هم ترکیب شده و به آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام منتقل گردیدند. جداسازی جدایه‌های *Trichoderma* از خاک، طبق روش (Mirzaeipour et al., 2023) با استفاده از محیط کشت انتخابی شامل: یک گرم آمونیوم نیترات، ۰/۲ گرم منیزیوم سولفات، ۰/۹ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۱۵ گرم پتاسیم کلرید، ۳ گرم گلوکز، ۲۰ گرم آگار، ۰/۱۵ گرم رزبنگال، ۰/۲۵ گرم کلرامفنیکل، ۰/۲ گرم کاپتان در یک لیتر آب‌مقطر انجام شد. به این‌منظور، ابتدا سوسپانسیونی به مقدار ده میلی‌لیتر از نمونه‌های خاک به روش رقیق کردن متوالی تهیه و یک میلی‌لیتر از آن روی محیط کشت پخش گردید. سپس در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Barahoei et al., 2023). پرگنه‌های رشدیافته *Trichoderma* روی محیط کشت مذکور، به محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA[3]) منتقل شدند و در نهایت خالص‌سازی به روش برداشتن نوک هیف صورت پذیرفت. شناسایی جدایه‌های قارچی به کمک کلید شناسایی Gams & Bissett (2002) انجام شد و به منظور بررسی مولکولی جدایه‌های قارچی منتخب، ژن کدکننده فاکتور افزایش طول ترجمه[4] با استفاده از آغازگرهای EF1-983F و EF1-1567R تکثیر و توالی‌یابی شد.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت

به منظور نمونه‌برداری در فروردین و اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۰ طی دو مرحله نمونه‌هایی به صورت تصادفی از برگ‌های سالم گندم مزارع آبی تمام شهرستان‌های استان ایلام جمع‌آوری و جهت بررسی به آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام منتقل گردیدند. از هر کدام از نمونه‌ها چهار گرم برگ گندم خرد شده در ۲۵ میلی‌لیتر آب‌مقطر سترون به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر به صورت دورانی با سرعت ۹۰ دور در دقیقه و دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس تکان داده شد، سپس از محلول رویی، حدود یک میلی‌لیتر با استفاده از لوپ سترون روی محیط کشت نوترینت-آگار (NA[5]) به صورت مخطط کشت گردید. تشتک پتری‌ها به مدت ۵-۳ روز در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس بر اساس شکل ظاهری، رنگ و اندازه، تک کلنی‌هایی انتخاب و خالص‌سازی شدند. به منظور خالص‌سازی با استفاده از لوپ سترون اقدام به کشت به روش لکه‌ای روی محیط کشت نوترینت‌آگار گردید. شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، آزمون گرم، واکنش¬های کاتالاز و اکسیداز و هیدرولیز نشاسته و همچنین بررسی‌های مولکولی با استفاده تکثیر ناحیه ۱۶S rRNA انجام گرفت.

بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ *Trichoderma* علیه قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

اثر آنتاگونیستی قارچ *Trichoderma* علیه قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه به دو روش آزمون کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار بررسی گردید.

1- Yeast Malt Extract Agar
2- β-tubulin
3- Potato Dextrose Agar
4- *tef*
5- Nutrient Agar

در آزمون کشت متقابل، جدایه‌های *Trichoderma* و قارچ بیمارگر به‌صورت هم‌زمان و روبه‌روی هم کشت شدند. به این صورت که در تشتک پتری ده سانتی‌متری حاوی محیط کشت V8PDA (۲۵ گرم جعفری، ۲۵ گرم کاهو، ۲۵ گرم چغندرقند، ۲۵ گرم اسفناج، ۲۵ گرم هویج، ۲۵ گرم گوجه‌فرنگی، ۲۵ گرم شاهی، ۲۵ گرم کرفس در یک لیتر آب‌مقطر)، در یک طرف پلاگ یک سانتی‌متری از حاشیه فعال کشت هفت روزه قارچ بیمارگر و در طرف دیگر تشتک پلاگ یک سانتی‌متری از حاشیه فعال کشت سه روزه قارچ *Trichoderma* کشت گردید و در تشتک شاهد به جای پلاگ قارچ *Trichoderma* یک قطره آب‌مقطر سترون قرار گرفت. تشتک‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس رشد شعاعی عامل بیماری در مقایسه با تشتک شاهد اندازه‌گیری شد (Safari Motlagh & Abolghasemi, 2019).

در روش تولید ترکیبات فرار نیز جدایه‌های *Trichoderma* و قارچ بیمارگر به‌صورت هم‌زمان و در تشتک‌های مجزا کشت شدند. در این بررسی یک پلاگ یک سانتی‌متری از حاشیه فعال کشت سه روزه *Trichoderma* در وسط تشتک پتری ده سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس از حاشیه فعال کشت هفت روزه قارچ بیمارگر یک پلاگ یک سانتی‌متری در وسط تشتک حاوی محیط کشت V8PDA قرار داده شد. درب تشتک‌های حاوی قارچ *Trichoderma* و قارچ بیمارگر در شرایط سترون برداشته و تشتک‌های حاوی قارچ بیمارگر و قارچ بیوکنترل به صورت وارونه روی هم گذاشته و لبه‌های تشتک‌ها با نوار پارافیلم مسدود گردید. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. بعد از گذشت مدت زمان یک هفته اندازه‌گیری پرگنه‌ی قارچ *Trichoderma* و قارچ بیمارگر نسبت به تشتک شاهد صورت گرفت (Sain & Pandey, 2016).

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت علیه قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت علیه قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه به سه روش تولید ترکیبات بازدارنده خارج¬سلولی قابل نفوذ در آگار، تولید ترکیبات فرار و تولید سیدروفور بررسی گردید.

در روش تولید ترکیبات بازدارنده خارج¬سلولی قابل نفوذ در آگار، ابتدا پنج چاهک یک سانتی‌متری در هر تشتک ده سانتی‌متری حاوی محیط کشت V8PDA ایجاد شد. سپس سوسپانسیونی از کشت چهار روزه جدایه‌های مختلف باکتری به مقدار ۲۵ میکرولیتر درون چاهک‌ها تزریق و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. سپس یک پلاگ یک سانتی‌متری از حاشیه فعال کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز تشتک قرار گرفت، در تشتک شاهد نیز در چاهک‌ها به جای باکتری، آب‌مقطر سترون ریخته شد. تشتک‌های فوق در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری و بعد ازگذشت یک هفته قطر هاله بازدارنده در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. این آزمون برای ۲۰۷ جدایه باکتری انجام گرفت (Suarez-Fernandez & De Francesco, 2024).

در روش تولید ترکیبات فرار، پلاگ یک سانتی‌متری از حاشیه فعال کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در وسط تشتک پتری ده سانتی‌متری حاوی محیط کشت V8PDA قرار گرفت. در شرایط سترون و زیر هود بیولوژیک، درب تشتک‌های دارای سویه‌های باکتری و قارچ بیمارگر برداشته شد و به گونه‌ای روی هم قرار گرفتند که تشتک قارچ بیمارگر در بالا قرار گیرد، سپس لبه‌های تشتک‌ها با نوار پارافیلم مسدود گردید و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند، سپس مقایسه بین تشتک‌های قارچ-باکتری نسبت به شاهد صورت گرفت. در تشتک شاهد به جای باکتری، یک قطره آب‌مقطر سترون استفاده شد. در این روش نیز تعداد ۲۰۷ جدایه باکتری مورد بررسی قرار گرفت (Suarez-Fernandez & De Francesco, 2024).

بررسی تولید سیدروفور توسط باکتری‌های اپی‌فیت برای تعداد ۲۰۷ جدایه باکتری مورد بررسی در محیط کشت کینگ بی آگار (KB)[1] صورت گرفت. به این صورت‌که ابتدا سویه‌های باکتری به صورت لکه‌ای کشت شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس پلاگ یک سانتی‌متری از حاشیه فعال کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مقابل کشت لکه‌ای باکتری قرار گرفت و مجدد در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. در تیمار شاهد به جای باکتری یک قطره آب‌مقطر سترون قرار گرفت. بعد از یک هفته تیمارها در قیاس با شاهد بررسی شدند (Suarez-Fernandez & De Francesco, 2024).

بررسی اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های *Trichoderma* و باکتری‌های اپی‌فیت علیه قارچ بیمارگر در شرایط گلخانه

جدایه‌های بیوکنترل قارچی و باکتریایی که در آزمون‌های مختلف آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاه به صورت موفق عمل کرده بودند جهت تأیید بررسی‌های آزمایشگاهی، در شرایط گلخانه‌ای نیز مورد بررسی قرار گرفتند.

در آزمایش گلخانه، از بذور گندم رقم تجن به عنوان رقم حساس و رقم مهرگان به عنوان رقم غالب مورد کشت در استان ایلام استفاده گردید. بذور مورد نظر از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام تهیه شدند.

به‌منظور تهیه زادمایه قارچ *Trichoderma* و پوشش‌دهی بذور با این قارچ، از روش Cordo et al., (2020) استفاده شد. به این‌صورت که، ابتدا جدایه‌های قارچ مذکور روی محیط PDA کشت داده شده و به مدت یک تا دو هفته در انکوباتور با دمای ۲±۲۳ درجه سلسیوس در شرایط دوره نوری ۱۲ ساعت نگهداری شدند. اسپورهای هر جدایه با غرقابی کردن کشت‌ها با استفاده از آب‌مقطر سترون و سپس مالش سطح کشت با میله شیشه‌ای سترون برداشته و از پارچه پنیر دولایه رد شدند. غلظت اسپورها در سوسپانسیون حاصل با استفاده از لام هموسیتومتر، ۱×۱۰^{۸} اسپور در میلی‌لیتر برای هر جدایه *Trichoderma* تعیین گردید. به سوسپانسیون تهیه شده یک قطره توئین ۲۰، ۰/۰۵ اضافه و مخلوط حاصل با استفاده از هم‌زن مغناطیسی تکان داده شد تا یکنواخت گردد. سپس ده میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هر جدایه با ۹۰ میلی‌لیتر آب‌آگار ۰/۲۵ درصد (جهت چسبیدن به بذر) ترکیب گردید از بذور هر رقم تجن و مهرگان، مقدار ۵۰ گرم به‌طور جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر از مخلوط فوق اضافه و بذور گندم پوشش داده شدند. بذرهای پوشش داده شده با زادمایه *Trichoderma* در شرایط تاریکی و در دمای اتاق به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت خشک شدند سپس در گلدان‌های دو کیلویی سترون حاوی خاک زراعی و ماسه به نسبت ۲ : ۱ کاشت شدند. در هر گلدان تعداد ۷-۵ بذر استفاده شد.

جهت تهیه زادمایه باکتری‌های اپی‌فیت، از کشت ۴۸ تا ۷۲ ساعته باکتری روی محیط کشت NA استفاده و سوسپانسیونی از سویه‌های باکتریایی در آب‌مقطر سترون تهیه و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر نزدیک به ۰/۱ واحد به طور تقریبی معادل ۱×۱۰^{۷} سلول باکتری (CFU[2]) در میلی‌لیتر تنظیم گردید. مایه‌زنی با استفاده از آب‌پاش دستی و ۲۴ ساعت قبل از مایه‌زنی قارچ بیمارگر صورت گرفت (Montakhabi et al., 2011).

پس از گذشت سه هفته از رشد، گیاهان با سوسپانسیون اسپور به غلظت ۱×۱۰^{۶} دریک میلی‌لیتر از جدایه‌های قارچ بیمارگر اسپورپاشی شدند. برای حفظ رطوبت، گلدان‌ها به مدت ۷۲ ساعت با کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. طی این مدت با استفاده از آب‌پاش دستی محیط گلدان‌ها مرطوب نگه داشته شد (Nourollahi, 2017).

در نهایت بعد از گذشت ۲۱ روز پس از مایه‌زنی عامل بیمارگر و عوامل آنتاگونیست، صفات عملکردی گیاه شامل ارتفاع بوته، وزن تر و وزن خشک ریشه و وزن تر و وزن خشک اندام‌های هوایی در حضور متقابل قارچ بیمارگر و عوامل آنتاگونیست ارزیابی گردید. آزمایش گلخانه‌ای جهت بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی و باکتریایی موفق و منتخب به صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح

1- King’s B Agar

2- Colony Forming Unit

کاملاً تصادفی با هشت تیمار (شش تیمار ترکیبی باکتری + قارچ و دو شاهد گیاه سالم و گیاه آلوده به سپتوریوز) در سه تکرار برای دو رقم تجن و مهرگان صورت پذیرفت. همچنین مقایسه بین دو رقم تجن و مهرگان از نظر صفات عملکردی گندم تحت تأثیر تیمارهای آنتاگونیست با استفاده از آزمون t-test انجام شد. داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS 9.4 TS1M8مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

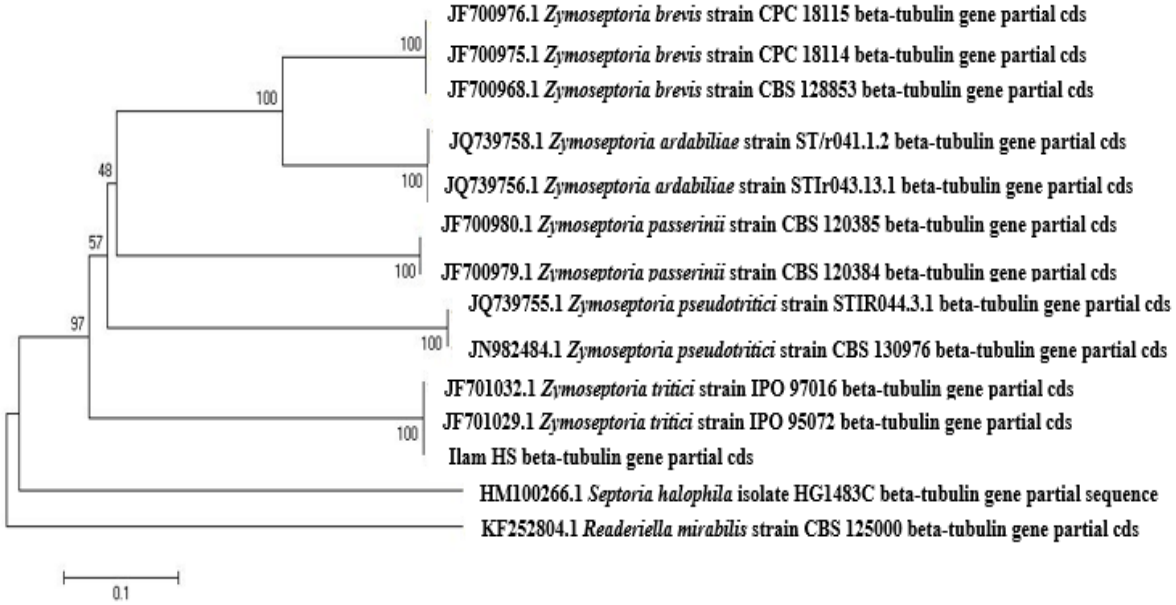
نتایج

شناسایی جدایه‌های قارچی و باکتریایی

جهت شناسایی قارچ عامل بیماری سپتوریوز گندم، ویژگی‌های ریخت‌شناسی مهم از قبیل شکل و اندازه پیکنید، شکل و اندازه پیکنیدیوسپور و نحوه رشد و رنگ پرگنه در تعداد ۷۰ جدایه قارچی به‌دست‌آمده مورد بررسی قرار گرفتند که بر اساس کلیدهای شناسایی Cunfer & Ueng (1999) و Shoemaker & Bobcock (1989)، گونه *Zymoseptoria tritici* به‌عنوان قارچ عامل بیماری شناسایی شد و بررسی‌های مولکولی با استفاده از تکثیر بخش‌هایی از ژن β-tubulin نیز شناسایی ریختی را تأیید کرد (شکل ۱).

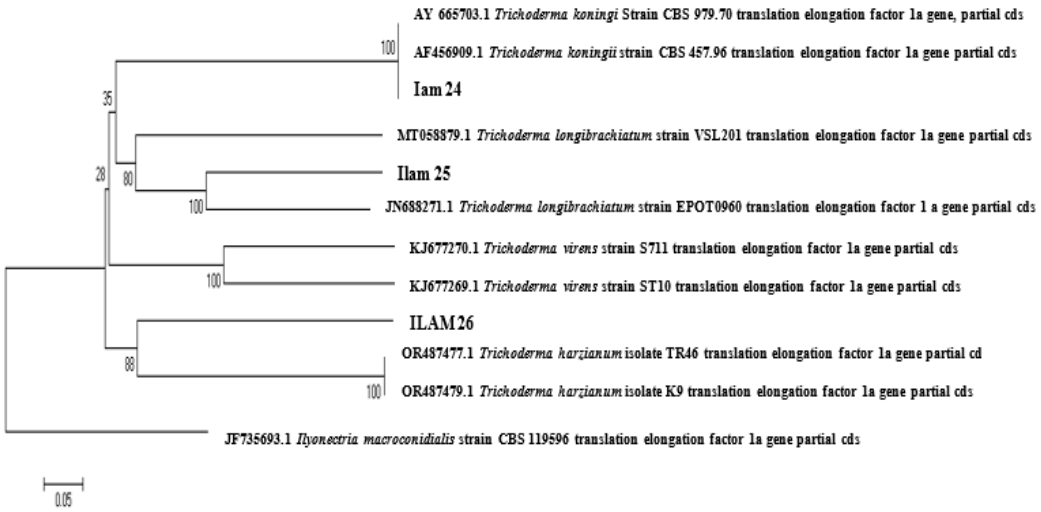
شناسایی ریختی گونه‌های قارچ تریکودرما براساس صفاتی از قبیل ویژگی‌های پرگنه، اندازه، شکل و ویژگی‌های کنیدی، اندازه، شکل و انشعابات کنیدیفورها با استفاده از کلید شناسایی Gams and Bissett (2002) انجام شد که نتایج بررسی‌ها نشان داد ۳۶ جدایه‌ی به‌دست آمده متعلق به سه گونه‌ی *Trichoderma longibrachiatum* (۱۲ جدایه)، *T. harzianum* (۱۵ جدایه) و *T. koningii* (۹ جدایه) بودند که با بررسی‌های مولکولی بر اساس تکثیر بخش¬هایی از ژن *tef* نیز تأیید شدند (شکل ۲).

تعداد ۲۰۷ سویه باکتری اپی‌فیت از برگ‌های سالم گندم جداسازی شد که به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، آزمون گرم، واکنش‌های کاتالاز و اکسیداز و هیدرولیز نشاسته و بررسی‌های مولکولی بر اساس تکثیر ناحیه ۱۶S rRNA جدایه‌ها شناسایی شدند که متعلق به جنس‌های *Entrobacter* (۶۱ سویه)، *Staphylococcus* (۷۰ سویه) و *Pantoeae* (۷۶ سویه) بودند. سه سویه موفق آزمایشگاهی که برای آزمون گلخانه انتخاب شدند در گونه‌های B2b (*Entrobacter* sp.)، Dr1b (*P. agglomerans*) و C1d (*S. saprophyticus*) قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ۴).

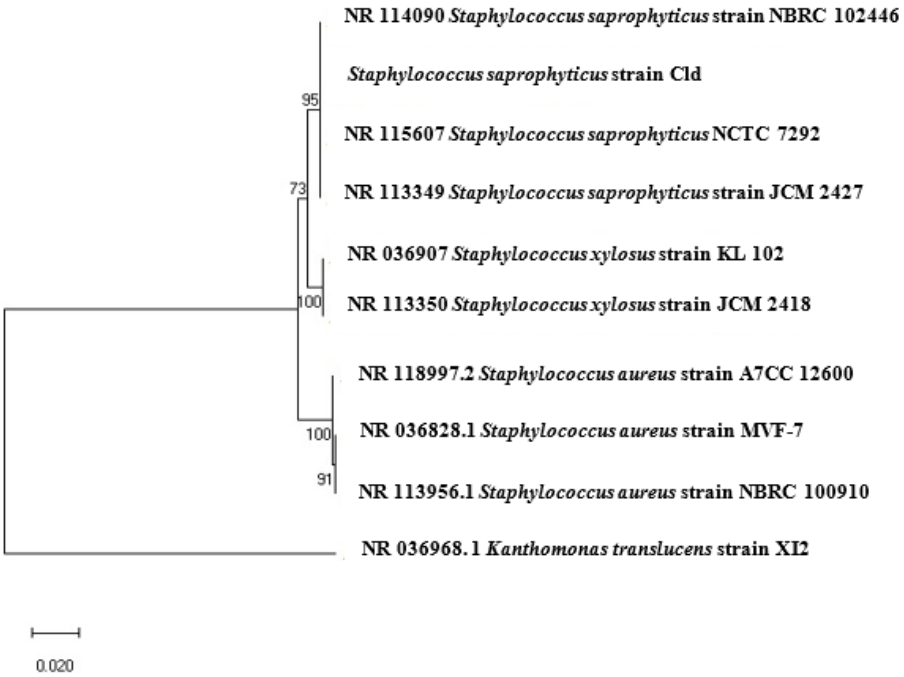


شکل ۱- درخت تبارزایی گونه‌ی *Zymoseptoria tritici* بر اساس توالی ژن β-tubulin

Figure 1. Phylogeny tree of *Zymoseptoria tritici* based on β-tubulin gene



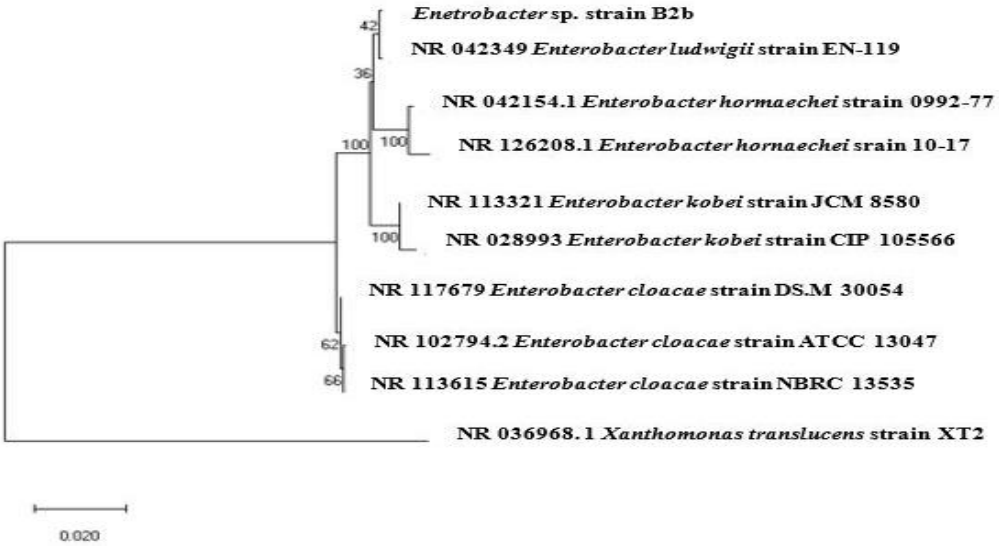
شکل ۲- درخت تبارزایی گونه‌های *Trichoderma* بر اساس توالی ژن *tef*
Figure 2. Phylogeny tree of *Trichoderma* species based on *tef* gene



شکل ۳- درخت تبارزایی گونه‌ی *Staphylococcus saprophyticus* بر اساس توالی ژن 16S rRNA
Figure 3. Phylogeny tree of *Staphylococcus saprophyticus* based on 16S rRNA gene

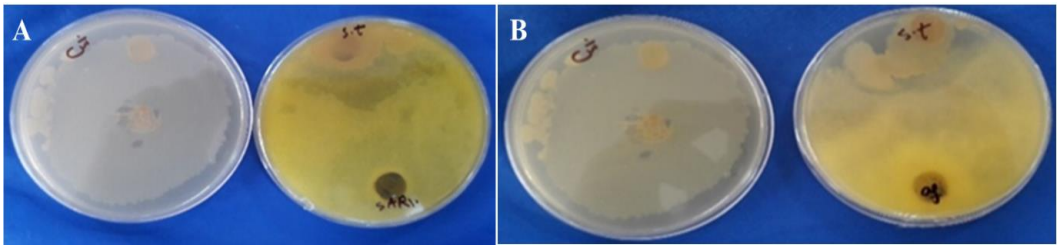
بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ *Trichoderma* علیه قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

نتایج حاصل از بررسی اثر جدایه‌های *Trichoderma* روی قارچ *Z. tritici* در شرایط آزمایشگاه به دو روش آزمون کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای از لحاظ اثر بازدارندگی در بین ۳۶ جدایه‌ی مورد بررسی وجود دارد و همه جدایه‌های *Trichoderma* دارای قدرت آنتاگونیستی بودند. تمام جدایه‌های متعلق به گونه *T. koningii* دارای قدرت آنتاگونیستی متوسط بودند. از بین ۳۶ جدایه‌ی مورد بررسی، جدایه‌ی T1 (*T. harzianum*) و جدایه T6 (*T. longibrachiatum*) دارای بیشترین اثر بازدارندگی در هر دو آزمون کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار بودند (شکل ۵) و دو جدایه‌ی مذکور به عنوان جدایه‌های بومی موفق در کنترل قارچ *Z. tritici* معرفی می‌گردند و این دو جدایه جهت بررسی‌های بیشتر در شرایط گلخانه انتخاب شدند.



شکل ٤- درخت تبارزایی جنس *Enterobacter* sp. بر اساس توالی ژن 16S rRNA

Figure 4. Phylogeny tree of *Enterobacter* sp. based on 16S rRNA gene



شکل ٥- A: اثر آنتاگونیستی جدایه T1 (*Trichoderma harzianum*) علیه *Zymoseptoria tritici* در آزمون کشت متقابل B: اثر آنتاگونیستی جدایه T6 (*Trichoderma longibrachiatum*) علیه *Zymoseptoria tritici* در آزمون تولید ترکیبات فرار.

Figure 5. A: Antagonistic effect of the T1 isolate (*Trichoderma harzianum*) against the *Zymoseptoria tritici* in duel culture, B: Antagonistic effect of the T6 isolate (*Trichoderma longibrachiatum*) against the *Zymoseptoria tritici* in volatile metabolites.

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت علیه قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

نتایج حاصل از ارزیابی تولید ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار، تولید مواد فرار و تولید سیدروفور حاکی از آن بود که از ۲۰۷ جدایه باکتری اپی‌فیت، ۷۰ جدایه دارای قدرت آنتاگونیستی بودند که از بین ۷۰ جدایه‌ی مذکور سه جدایه‌ی B2b (*Enterobacter* sp.)، Dr1b (*P. agglomerans*)، و C1d (*S. saprophyticus*) در هر سه آزمون ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار، تولید مواد فرار و تولید سیدروفور دارای بیشترین مقدار بودند (شکل ۶) که این سه سویه باکتری اپی‌فیت به عنوان جدایه‌های بومی موفق معرفی می‌شوند و سه جدایه‌ی مذکور برای بررسی در آزمون گلخانه انتخاب شدند.

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اپی‌فیت علیه قارچ بیمارگر در شرایط گلخانه

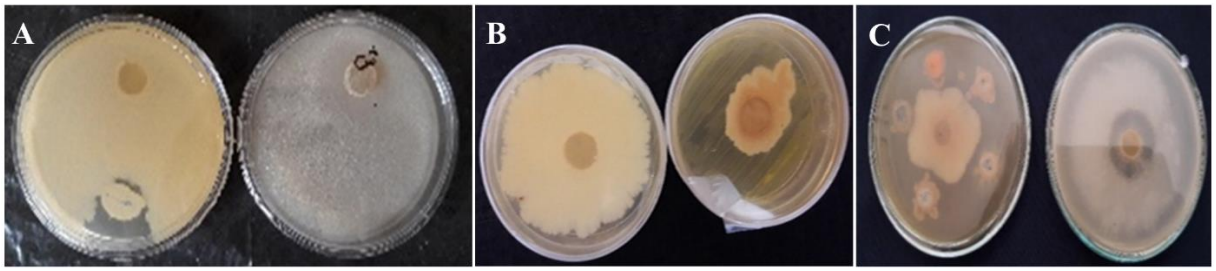
نتایج ارزیابی‌های گلخانه‌ای نشان داد در رقم مهرگان و تجن تیمار ترکیبی T6+C1d در تمام صفات عملکردی گیاه دارای بالاترین مقدار بود و بیشترین توانایی را در افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ریشه و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی نشان داد، همچنین در دو رقم مهرگان و تجن تیمار ترکیبی T1+B2b دارای کمترین مقادیر بود وکمترین توانایی را در افزایش تمام صفات عملکردی گیاه از قبیل ارتفاع، وزن تر و خشک ریشه و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی دارا بود (جدول‌های ۱ و ۲). لازم به ذکر است که تمام صفات عملکردی هم در رقم مهرگان و هم در رقم تجن در حضور عوامل آنتاگونیست نسبت به شاهد آلوده افزایش داشتند. در رقم

مهرگان نتایج به این صورت بود که صفات ارتفاع بوته، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، وزن تر اندام‌های هوایی و وزن خشک اندام‌های هوایی در تیمار آلوده به قارچ در مقایسه با تیمار شاهد گیاه سالم به ترتیب ۴۰/۴۳، ۸۶/۲۳، ۸۴/۵۱، ۸۷/۱۸ و ۹۵ درصد کاهش داشتند. در حالی‌که با کاربرد تیمار **T6+C1d (*T. longibrachiatum+ S. saprophyticus*)** در صفات مذکور به‌ترتیب ۱۰، ۱۴/۹۷، ۳۸/۰۲، ۲۲/۸۲ و ۴۸ درصد کاهش مشاهده شد. در رقم تجن نیز صفات ارتفاع بوته، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، وزن تر اندام‌های هوایی و وزن خشک اندام‌های هوایی در تیمار آلوده به قارچ در مقایسه با تیمار شاهد گیاه سالم به ترتیب ۶۲/۷۹، ۸۸/۲۹، ۸۸/۴۱، ۷۷/۴۶ و ۹۶/۳۲ درصد کاهش داشتند. در حالی‌که با کاربرد تیمار **T6+C1d (*T. longibrachiatum+ S. saprophyticus*)** در صفات مذکور به‌ترتیب ۱۷/۰۷، ۲۵/۶۱، ۲۳/۱۹، ۲/۳۱ و ۵۸/۴۲ درصد کاهش مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین بین دو رقم مهرگان و تجن با استفاده از آزمون t-test نشان داد که از نظر فاکتورهای عملکردی گندم در حضور عوامل بیوکنترل، به طور کلی بیشترین وزن تر و خشک ریشه، بیشترین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و بیشترین میزان ارتفاع بوته مربوط به رقم تجن به¬دست آمد (جدول ۳).

بحث

در پژوهش حاضر دو جدایه قارچ T6 (*T. longibrachiatum*) و T1 (*T. harzianum*) قابلیت مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه و افزایش شاخص‌های رشدی و کاهش شدت بیماری‌زایی در شرایط گلخانه را از خود نشان دادند. این نتایج با بررسی‌های Sood et al. (2020) مطابقت داشت که در بررسی‌های ایشان نیز قارچ‌های *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* با تولید آنتی‌بیوتیک تریکولانگین BI و BII، فنل و سایر متابولیت‌های ضد قارچی مانند کانینگین‌ها، ویریدین، تریکوویریدین، درمادین، لیگنورن و اسید کونینگیک، اثر آنتاگونیستی موفقی را روی قارچ‌های مختلف از جمله *Z. tritici* نشان دادند. در مطالعه‌ی Cordo et al., (2020)، استفاده از *T. harzianum* به‌عنوان یک عامل مهار زیستی علیه *Z. tritici* پیشنهاد شده و عنوان داشتند که *T. harzianum* موجب حفاظت در برابر بیماری سپتوریوز گندم می‌شود. Stocco et al., (2016) ضمن تأکید بر نقش محرک قارچ *T. harzianum* در افزایش شاخص‌های رشدی گیاه، آن را مهم‌ترین عامل مهار زیستی در بیمارگرهای گیاهی محصولات مختلف مانند گندم، پنبه، ذرت، تنباکو، گوجه فرنگی، خیار و لوبیا عنوان کردند. بررسی‌های Perello et al., (2009)، مبنی بر مهار زیستی *Z. tritici* با استفاده از *T. harzianum*، درکاهش بروز بیماری و لکه‌زایی در برگ با استفاده از پوشش بذر نسبت به تیمار شاهد، تأیید پژوهش حاضر را نشان می‌دهد.

در اغلب سیستم‌های بیمارگر–میزبان، سازوکار اولیه مهار زیستی بیمارگر توسط باکتری‌ها سازوکار آنتی‌بیوز است. آنتی‌بیوتیک‌ها با تأثیر روی بیمارگر و مختل ساختن اعمال حیاتی آن، از جمله سازوکارهای مهم در کنترل زیستی محسوب می‌شوند (Pas et al., 2020).



شکل ٦- A: تولید ترکیبات بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار توسط سویه (*Enterobacter* sp.) B2b، B: تولید ترکیبات فرار توسط سویه Dr1b (*Pantoea agglomerans*)، C: تولیدسیدروفور توسط سویه C1d (*Staphylococcus saprophyticus*).

Figure 6. A: Production of extracellular inhibitory compounds in agar by B2b (*Enterobacter* sp.)، B: Production of volatile metabolites by Dr1b strain (*Pantoea agglomerans*)، C: Siderophore production by C1d strain (*Staphylococcus saprophyticus*).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آنتاگونیست روی صفات عملکردی گندم در رقم مهرگان.

Table 1. Mean comparison of effect of antagonistic treatments on functional traits in Mehregan cultivar.

Treatments	Plant height (Cm)	Fresh weight root (g plant^{-1})	Dry weight root (g plant^{-1})	Fresh weight shoot (g plant^{-1})	Dry weight shoot (g plant^{-1})
T1+C1d (*T. harzianum+ S. saprophyticus*)	28^{c}± 1	1.03^{d}± 0.009	0.41^{b}± 0.003	0.82^{e}± 0.021	0.25^{e}± 0.019
T1+B2b (*T. harzianum+ Entrobacter* sp.)	25^{c}± 1.15	0.88^{d}± 0.023	0.25^{d}± 0.019	0.82^{e}± 0.030	0.21^{e}± 0.012
T1+Dr1b (*T. longibrachiatum+ P. agglomerans*)	27.66^{c}± 1.76	1.41^{c}± 0.069	0.33^{c}± 0.013	0.88^{e}± 0.029	0.21^{e}± 0.032
T6+C1d (*T. longibrachiatum+ S. saprophyticus*)	36^{b}± 0.88	4.26^{b}± 0.273	0.44^{b}± 0.024	3.01^{b}± 0.058	1.04^{b}± 0.048
T6+B2b (*T. longibrachiatum+ Entrobacter* sp.)	28.3^{c}± 1.20	1.02^{d}± 0.075	0.28^{cd}± 0.015	1.9^{c}± 0.084	0.8^{c}± 0.070
T6+Dr1b (*T. longibrachiatum+ P. agglomerans*)	27.32^{c}± 1.20	0.88^{d}± 0.038	0.32^{c}± 0.012	1.48^{d}± 0.195	0.61^{d}± 0.023
Control 1 (healthy plant)	40^{a}± 0.88	5.01^{a}± 0.015	0.71^{a}± 0.020	3.9^{a}± 0.019	2^{a}± 0.007
Control 2 (infected plant without antagonist agents)	23.83^{d}± 2.08	0.69^{f}± 0.009	0.11^{e}± 0.008	0.50^{f} ± 0.023	0.1^{f}± 0.012
Error mean square	4.333	0.043	0.0007	0.025	0.004

*The number in each column that have a same letter do not have significant difference in 5% level.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آنتاگونیست روی صفات عملکردی گندم در رقم تجن.

Table 2. Mean comparison of effect of antagonistic treatments on functional traits in Tajan cultivar.

Treatments	Plant height (Cm)	Fresh weight root (g plant^{-1})	Dry weight root (g plant^{-1})	Fresh weight shoot (g plant^{-1})	Dry weight shoot (g plant^{-1})
T1+C1d (*T. harzianum+ S. saprophyticus*)	32^{bc}± 1	2.45^{c}± 0.225	0.33^{c}± 0.009	1.36^{c}± 0.087	0.44^{c}± 0.029
T1+B2b (*T. harzianum+ Entrobacter* sp.)	28.66^{c}± 0.88	2.08^{c}± 0.043	0.23^{d}± 0.022	1.19^{d}± 0.062	0.33^{d}± 0.027
T1+Dr1b (*T. longibrachiatum+ P. agglomerans*)	32.3^{bc}± 1.20	2.45^{c}± 0.203	0.23^{d}± 0.012	0.9^{e}± 0.045	0.22^{e}± 0.020
T6+C1d (*T. longibrachiatum+ S. saprophyticus*)	35.66^{b}± 1.45	3.05^{b}± 0.029	0.53^{b}± 0.022	1.69^{b}± 0.041	0.79^{b}± 0.012
T6+B2b (*T. longibrachiatum+ Entrobacter* sp.)	33.3^{bc}± 1.45	2.6b^{c}± 0.247	0.33^{c}± 0.026	1.53^{b}± 0.043	0.57^{b}± 0.020
T6+Dr1b (*T. longibrachiatum+ P. agglomerans*)	33^{bc}± 2.08	2.3^{c}± 0.160	0.35^{c}± 0.035	1.14^{d}± 0.015	0.38^{cd}± 0.015
Control 1 (healthy plant)	43^{a}± 0.88	4.1^{a}± 0.111	0.69^{a}± 0.022	1.73^{a}± 0.046	1.9^{a}± 0.018
Control 2 (infected plant without antagonist agents)	16^{d}± 2.85	0.48^{d}± 0.091	0.08^{e}± 0.030	0.39^{f}± 0.017	0.07^{f}± 0.024
Error mean square	5.888	0.090	0.001	0.008	0.001

*The number in each column that have a same letter do not have significant difference in 5% level.

جدول ۳- مقایسه صفات عملکردی گندم تحت تأثیر تیمارهای آنتاگونیست بین دو رقم تجن و مهرگان.

Table 3. The t-test between Mehregan and Tajan cultivars based on functional traits.

	Plant height (Cm)	Fresh weight root (g plant^{-1})	Dry weight root (g plant^{-1})	Fresh weight shoot (g plant^{-1})	Dry weight shoot (g plant^{-1})
Tajan	31.82± 0.52	2.33± 0.06	0.29± 0.02	1.29± 0.04	0.46± 0.03
Mehregan	27.05± 0.68	1.24± 0.15	0.27± 0.02	1.08± 0.11	0.41± 0.04
t-test	5.55**	6.94**	0.71^{ns}	1.85^{ns}	1.15^{ns}

شواهد ژنتیکی و شیمیایی قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا و افزایش رشد گیاه ناشی از حضور سیدروفورها است. کاربرد سویه‌های تولیدکننده سیدروفور در مقایسه با شاهد باعث افزایش معنادار میزان جذب آهن، میزان کلروفیل و همچنین وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی شده است (Vatandoost, 2017). در پژوهش حاضر سه باکتری اپی‌فیت C1d (*S. saprophyticus*)، B2b (*Entrobacter* sp.) و Dr1b (*P. agglomerans*) قابلیت مهار زیستی بالایی را در شرایط آزمایشگاه نشان دادند. ارزیابی تأثیر ترکیبات خارج‌سلولی باکتریایی در بازدارندگی رشد پرگنه قارچ *Z. tritici*، حاکی از آن بود که باکتری‌های *P. agglomerans* و *Entrobacter* sp. از نظر توانایی تولید آنتی‌بیوتیک تقریباً یکسان و هر دو جدایه از همین نظر با باکتری *S. saprophyticus* متفاوت بوده به‌طوری که باکتری *Entrobacter* sp. توانایی بیشتری در تولید آنتی‌بیوتیک داشت. جدایه‌های باکتریایی توانایی تولید متابولیت‌های فرار ضد قارچی را نیز دارا هستند که در پژوهش حاضر جدایه‌های باکتریایی *P. agglomerans* و از نظر تولید متابولیت‌های فرار یکسان و هردو جدایه توانایی بیشتری نسبت به دو باکتری دیگر دارا بودند و در تولید سیدروفور جدایه باکتریایی *S. saprophyticus* با توانایی بیشتری ظاهر گشت. همچنین در شرایط گلخانه بیشترین اثربخشی در افزایش شاخص‌های رشدی گیاه مربوط به تیمار ترکیبی قارچ-باکتری T6+C1d (*T. longibrachiatum*+*S. saprophyticus*) بود. در مطالعات Kildea et al., (2008)، پتانسیل مجموعه‌ای از باکتری‌های منشأ گرفته از ریزوسفر گندم در مهار زیستی *Z. tritici* مورد ارزیابی قرار گرفت که در مجموع هفت باکتری تا ۹۲ درصد از توسعه بیماری در شرایط آزمایشگاه جلوگیری کردند و دو باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus megaterium* هم در شرایط آزمایشگاه و هم شرایط گلخانه به طور مداوم رشد *Z. tritici* را به تأخیر انداختند. در مطالعات Lynch et al., (2016) در مهار زیستی *Z. tritici* با استفاده از سویه‌های *Lactobacillus* باکتری‌های *L. brevis* و *L. reuteri* به طور قابل توجهی باعث مهار *Z. tritici* در شرایط آزمایشگاه شدند.

نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر نتایج به دست آمده از ارزیابی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای تا حدود زیادی همبستگی داشتند و نتایج گلخانه مؤید نتایج آزمایشگاهی بوده و نشان دهنده اثر مثبت جدایه‌های قارچی و باکتریایی در کاهش شدت بیماری سپتوریوز و افزایش شاخص‌های رشدی گندم در مقایسه با شاهد آلوده بود که این امر قدرت جدایه‌های مذکور را جهت کنترل بیولوژیک با استفاده از چندین مکانیسم را بالا می‌برد. نتایج حاصل از مقایسه بین دو رقم مهرگان و تجن نشان داد که در حضور عوامل بیوکنترل، بیشترین وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و میزان ارتفاع بوته مربوط به رقم تجن به‌دست آمد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از جناب آقای دکتر یحیی محمدی عضو هیئت علمی گروه علوم دام دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام و جناب آقای مهندس طیب سیفی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

Abasi Manesh, Ak., Fazeli, A., & Beigi, S. (2018). The effect of Marjrom medicinal herb extract on the expression of some genes involve in resistance to *Septoria tritici* leaf blotch in two wheat Chamran and Yavarous cultivars. *Journal of plant biology of Iran*, *10*(4), 21–34. (In Farsi whith English summary)

Ahmadi, K., Ebadzadeh, H., Hatami, F., Mohammad nia, S., Esfandiaripour, E., & Abas taghani, R. (2023). Report on the level, production and yield of crops in the crop year 2019-2020 (First). *Ministry of Jihad and Agriculture of Iran*. (In Farsi)

Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., & Salehi Jouzani, G. (2019). Interaction of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Azospirillum oryzae* on wheat growth promotion and *Fusarium graminearum* disease inhibition. *Scientific journal of crop plant biotechnology*, *9*(25), 19–33. (In Farsi whith English summary)

Barahoei, N., Alaei, H., Sedaghati, E., Saberi Riseh, R., & Abbaszadeh, P. (2023). Screening of *Trichoderma* strains by optimized conditions in test plate media for siderophore production and measuring of cellulytic enzyme. *Agricultural Biotechnology Journal*, *15*(3), 115-140. (In Farsi whith English summary)

Cordo, C., Altamirano, R., Simón, M. R., Stocco, M., Lampugnani, G., Abramoff, C., Kripelz, N., & Mónaco, C. (2020). Biocontrol strategies to reduce the impact of *Septoria tritici* blotch in wheat. *Revista de La Facultad de Agronomía*, *119*(2), 060.

Cunfer, B., & Ueng, P. (1999). Taxonomy and Identification of *Septoria* and *Stagonospora* Species on Small-Grain Cereals. *Annual Review of Phytopathology*, *(37)*, 267-284.

Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 3–7.

Gams, W., & Bissett, J. (2002). Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics, Kubicek, C.P. & Harman, G.E,pp. 3-34, Taylor & Francis Ltd., ISBN 978-0-7484-0572-5, London, UK. 3–34.

Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C., & Kennedy, K. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma Biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *BioMed Research International*,

Kasa, D., Hundia, B., & Dembel, W. (2015). Distribution and occurrence of wheat rusts and *Septoria* leaf blotch in Bale and Arsi Zones , 2014 Belg season. *Global Journal of Pests, Diseases and Crop Protection Full*, *3*(4), 124–130.

Kildea, S., Ransbotyn, V., Khan, M. R., Fagan, B., Leonard, G., Mullins, E., & Doohan, F. M. (2008). Bacillus megaterium shows potential for the biocontrol of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Biological Control*, *47*(1).

Lynch, K. M., Zannini, E., Guo, J., Axel, C., Arendt, E. K., Kildea, S., & Coffey, A. (2016). Control of *Zymoseptoria tritici* cause of *Septoria tritici* blotch of wheat using antifungal *Lactobacillus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(2), 485–494.

Mahmudi, E., Aghamolai, A., Kia, S., & Nasrolahnejad, S. (2015). Reaction to *Septoria* leaf blotch in a number of elite genotypes of bread wheat. *Plant Production Research*, *22*(3), 329–335. (In Farsi whith English summary)

Mirzaeipour, Z., Bazgir, E., Zafari, D., & Darvishnia, M. (2023). Isolation and identification of Harzianum clade species of *Trichoderma* from Khorramabad County. *Mycologia Iranica*, *10*(2), 67-78.

Montakhabi, M K., Rahimian, H., Falahati Rastegar, M., & Jafarpour, B. (2011). In vitro investigation on biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cause of citrus bacterial canker by citrus antagonistic bacteria. *Journal of Plant Protection 24*(4): 368-376.

Nourollahi, K. (2017). Study of genetic diversity of *Septoria tritici* isolates from wheat fields in Ilam province using SSR marker. *Cellular and molecular researches (Iranian Journal of Biology), 29*(4), 433–451. (In Farsi whith English summary)

Omidinasab, M., & Khodakaramian, G. (2017). The inhibitory effect of alfalfa epiphytic bacteria on *Clavibacter* as the causal agent of wilt disease. *The scientific research quarterly of the world of microbes*, *10*(30), 59–68. (In Farsi whith English summary)

Pas, M., Shahbazi, H., & Ebrahimi, L. (2020). The biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against Macrophomina phaseolina and estimating the total phenol compounds of bean roots. *Nova Biologica Reperta*, *7*(1), 64–75. (In Farsi whith English summary)

Perelló, A. E., Moreno, M. V., Mónaco, C., Simón, M. R., & Cordo, C. (2009). Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. *BioControl*, *54*(1), 113–122.

Safari Motlagh, M. R., & Abolghasemi, M. (2019). Biological control of crown rot disease of canola by isolates of *Trichoderma* in vitro and under greenhouse conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 42*(2), 1-18. (In Farsi whith English summary)

Sain, S. K., & Pandey, A. K. (2016). Efficacy of three isolates of *Trichoderma harzianum* Rifai against major fungal pathogens of tomato. *Indian Phytopathology, 69*(4s), 586-589.

Shoemaker, R. A., & Babcock, C. E. (1989). Phaeosphaeria. *Canadian Journal of Botany*, *67*(5), 1500–1599.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. In *Plants 9*(6): 1–25.

Stocco, M. C., Mónaco, C. I., Abramoff, C., Lampugnani, G., Salerno, G., Kripelz, N., ... & Consolo, V. F. (2016). Selection and characterization of Argentine isolates of *Trichoderma harzianum* for effective biocontrol of *Septoria* leaf blotch of wheat. *World journal of Microbiology and Biotechnology, 32*, 1-10.

Suarez-Fernandez, M., & De Francesco, A. (2024). Embracing Biological Control of *Septoria tritici* Blotch for Sustainable Wheat Protection. *Journal of Phytopathology, 172*(5), e13395.

Sun, Y. M., Horng, C. Y., Chang, F. L., Cheng, L. C., & Tian, W. X. (2010). Biosorption of lead, mercury, and cadmium ions by Aspergillus terreus immobilized in a natural matrix. *Polish Journal of Microbiology*, *59*(1), 37–44.

Vatandoost, J. (2017). Molecular assessment of siderophore production ability in *Pseudomonas fluorescent* strains, as a control agent of root rots in sugar beet. *Cellular and Molecular Research* (*Iranian Journal of Biology*), *29*(4), 452-462. (In Farsi whith English summary)

Vos, C. M., Yang, Y., De Coninck, B., & Cammue, B. P. A. (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological control*, *74*, 65-81.

© 2025 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.