مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۵، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵
صفحه ۸۹-۷۷

ارزیابی کارآیی قارچ *Beauveria bassiana* برای مهار زیستی گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی گیاه پنبه

نرگس آزادی[۱]، اکبر شیرزاد[۲*]، حمید محمدی[۳]

Evaluation of the *Beauveria bassiana* fungus efficiency on biological control of Rhizoctonia damping-off disease in cotton plants

Narges Azadi [1], Akbar Shirzad [2*] and Hamid Mohammadi [3]

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، ۲-دانشیار گروه گیاهپزشکی،
۳- استادیار گروه زراعت واصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز. ایران

1. MSc of Plant Pathology, Department of Plant Protection,
2. Associated Prof. Department of Plant Protection,
3. Assistant Prof. Department of agronomy and plant breeding,
College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashirzad@azaruniv.edu

(تاریخ دریافت: ۲۴/ ۹۵/۶- تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۶)

چکیده

گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌هایی است که به‌وسیله‌ی *Rhizoctonia solani* در سراسر جهان ایجاد می‌شود. با وجود تاثیر نسبی برخی از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، به نظر می‌رسد که کنترل بیولوژیک یکی از روش‌های مناسب برای حفاظت گیاهان در برابر این بیمارگر باشد. قارچ اندوفیت *Beauveria bassiana*، علاوه بر پارازیته کردن حشرات، می‌تواند به‌صورت سیستمیک دامنه وسیعی از گیاهان را کلنیزه کرده و مقاومت آن‌ها را افزایش دهد. در این پژوهش، توانایی سه جدایه از قارچ *B. bassiana* جهت کنترل گیاهچه‌میری پنبه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که جدایه‌های به‌کار رفته، ضمن فعالیت اندوفیتی در گیاه، می‌توانند به طور قابل توجهی از شدت بیماری بکاهند. با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای و اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل گیاه، جدایه KJ24 با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر، به‌عنوان مناسب‌ترین تیمار در کنترل این بیماری شناخته شد. به نظر می‌رسد این امر ناشی از خاصیت تحریک‌کنندگی رشد گیاه باشد. غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر دو جدایه TS7 و TS12 نیز توانستند در حد قابل توجهی از شدت بیماری بکاهند. با توجه به افزایش پروتئین کل در گیاهان تیمار شده با این استرین‌ها، این کاهش بیماری می‌تواند ناشی از تحریک مقاومت گیاه توسط جدایه‌های مورد نظر باشد.

واژه‌های کلیدی

آنزیم پراکسیداز
اندوفیت
بیوکنترل
B. bassiana
Rhizoctonia solani

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

مقدمه

یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای قارچی خاکزاد *Rhizoctonia solani* در سراسر جهان است که باعث ایجاد بیماری‌های مهم اقتصادی، در انواع محصولات کشاورزی از جمله پنبه می‌شود (Muriungi *et al*. 2014). با وجود تاثیر نسبی برخی از مواد شیمیایی در کنترل این بیماری، استفاده از این روش کنترل شیمیایی نتیجه رضایت-بخشی نداشته و آلودگی‌های زیست‌محیطی نیز در پی دارد. از طرفی، امروزه در سراسر جهان، مصرف‌کنندگان بر این باورند که استفاده از سموم شیمیایی در تولید محصولات کشاورزی، باید به-طور قابل توجهی کاهش یابد (Butt *et al*. 2001). طبق بررسی-های دانشمندان، کنترل بیولوژیک می‌تواند یک راه‌حل سازگار با محیط‌زیست، برای حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهای خاکزاد باشد (Weller *et al*. 2002). امروزه بهره‌برداری از میکروارگانیسم‌های طبیعی مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها، جهت کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز بسیار قابل توجه بوده و در میان آن‌ها استفاده از قارچ‌های بیوکنترل در حال توسعه است (Butt *et al*. 2001). تاثیر بیوکنترلی قارچ‌های آنتاگونیست، نتیجه‌ی مجموعه‌ای از سازوکارهای مختلفی است. در برخی از این سازوکارها از جمله آنتی‌بیوز، رقابت و پارازیتیسم، نقش قارچ بیوکنترل مستقیم بوده و در برخی دیگر از جمله القای مقاومت گیاه، کلنیزه کردن اندوفیتی گیاه و تحریک رشد گیاه، نقش غیرمستقیمی دارند (Ownley *et al*. 2010). برخی از قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله *B. bassiana*، به عنوان اندوفیت، از طریق کلنیزه کردن سیستمیکی گیاه، می‌توانند موجب حفاظت آن در برابر بیمارگرهای گیاهی شوند (Ownley *et al*. 2010). فعالیت اندوفیتی جدایه‌هایی از *B. bassiana* در تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله گوجه‌فرنگی، پنبه، لوبیاسبز، سویا، ذرت، تاتوره، سیب‌زمینی و گیاهچه کاکائو گزارش شده است (Ownley *et al* 2008 and 2010). هم‌چنین توانایی آنتاگونیستی *B. bassiana* علیه بیمارگرهای مختلفی از قبیل *Fusarium oxysporum*، *Armillaria mellea*، *Rosellinia necatrix*، *R. solani* و *Pythium myriotylum* به اثبات رسیده است (Griffin 2007). کاربرد جدایه‌ی ۹۸-۱۱ قارچ *B. bassiana* در بذور گوجه‌فرنگی نشان داده است که *B. bassiana* می‌تواند گیاهچه‌ها را به‌صورت اندوفیتی و اپی‌فیتی کلنیزه کند و باعث حفاظت آن‌ها در برابر گیاهچه‌میری شود (Ownley *et al*. 2008). استفاده از همین جدایه در بذور پنبه، علاوه بر کاهش گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی، توانسته است مقاومت سیستمیک القایی را فعال کند (Griffin 2007). در بررسی‌های آزادی و همکاران، سه جدایه از قارچ *B. bassiana*، از طریق تحریک رشد گیاه و القای مقاومت سیستمیکی، به طور چشمگیری بیماری گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی را در گیاهان گوجه‌فرنگی کاهش دادند. هم‌چنین این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، با تولید ترکیبات فرار و غیر فرار به‌طور معنی‌داری باعث کاهش رشد بیمارگر شدند (Azadi *et al*. 2015b). بنابراین به نظر می‌رسد که قارچ اندوفیت *B. bassiana* بتواند به‌عنوان یک عامل بیوکنترل، با استفاده از سازوکارهای مختلفی موجب کاهش بیماری‌های گیاهی شود. به همین منظور در پژوهش حاضر، کارایی و تاثیر سه جدایه از قارچ *B. bassiana* در کنترل بیماری رایزوکتونیایی پنبه و کاهش شدت بیماری، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه بیمارگر *R. solani* و جدایه‌های قارچ آنتاگونیست

جدایه‌های TS7، KJ24 و TS12 قارچ آنتاگونیست *B. bassiana* از آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و بیمارگر *R. solani* با گروه آناستوموزی AG-4 از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جدایه‌های قارچ آنتاگونیست در محیط Sabouraud Dextrose Agar (Senthamizhlselvan *et al*. 2010) و *R. solani* در محیط Potato Dextrose Agar کشت داده شدند.

بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر آنتاگونیست برروی *R. solani*

به‌منظور مشاهده نحوه ارتباط بین هیف‌های جدایه‌های *B. bassiana* و قارچ بیمارگر، بررسی‌های میکروسکوپی با استفاده از

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

روش سو و همکاران انجام شد (Su *et al*.2012) و اسلایدهای تهیه شده با بزرگ‌نمایی ×۴۰، مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی تولید توکسین توسط جدایه‌های آنتاگونیست

جهت انجام این آزمایش، از روش تغییر یافته‌ی پارون و بگوم استفاده شد (Parveen and Begum 2010). به این ترتیب که قطعات ۵ میلی متری از جدایه‌های قارچ آنتاگونیست تهیه و در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط متیل بلو آگار (Methylene Blue Agar) با (pH ۴/۷) کشت شد. پس از ده روز، تشتک‌های پتری از نظر وجود هاله‌ی شفاف اطراف پرگنه‌ی قارچی بررسی شدند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و در چهار تکرار انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز آنتاگونیست

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز جدایه‌های *B. bassiana*، ابتدا با استفاده از روش چان و تیان، دیواره‌ی سلولی رایزوکتونیا تهیه شد (Chan and Tian 2005) و به‌عنوان تنها منبع کربن به محیط لیلی بارنت اضافه شد. سپس با استفاده از این محیط آنزیم کیتیناز جدایه‌های *B. bassiana* استخراج و با کاغذ واتمن صاف شده و در نهایت عصاره آنزیمی کیتیناز جدایه‌های *B. bassiana* به دست آمد (Chan and Tian 2005). پس از تهیه عصاره آنزیمی، مخلوط واکنش شامل ۵۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی، ۳۰۰ میکرولیتر کیتین (شرکت Titrachem) ۰/۵ درصد و ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۲ مولار و pH=4) تهیه شد. این محلول به مدت ۲ ساعت در دمای ۲ ± ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس ۲ میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالسیلیک (DNS) به آن اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفت. میزان آنزیم کیتیناز در طول موج ۵۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Kang *et al*. 1999). با استفاده از داده‌های حاصل در طی ۸ روز، منحنی فعالیت آنزیم کیتیناز برای هر جدایه از آنتاگونیست رسم شد.

بررسی تاثیر آنتاگونیستی جدایه‌های *B. bassiana* در جلوگیری از مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای

ابتدا سوسپانسیون اسپوری جدایه‌های قارچ آنتاگونیست در غلظت‌های $۱۰^{۵}$،$۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد و سپس بذور استریل شده پنبه (رقم ورامین)، به‌طور جداگانه با هر غلظت تیمار شدند. جهت تهیه‌ی مایه تلقیح بیمارگر، از بذور گندم استفاده شد (Tseng *et al*. 2008) و با نسبت ۳ درصد حجمی با خاک گلدانی مخلوط شد. سپس بذور تلقیح شده با سوسپانسیون-های آنتاگونیست، در گلدان‌ها کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه تحت تناوب نوری ۱۶ساعت روشنائی و دمای ۲ ± ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۳۰ درصد نگهداری شدند. این آزمایش در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۰تکرار (گلدان) و ۱۱ تیمار انجام شد. تیمارها شامل شاهد آلوده، شاهد غیر آلوده و نه تیمار شامل بذور پنبه آغشته شده با غلظت‌های $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۷}$ و $۱۰^{۹}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌های TS7، KJ24 و TS12 آنتاگونیست بودند. در پایان هفته دوم پس از کاشت، با ظهور علایم گیاهچه‌میری، گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند و میزان ضایعه حاصل از بیمارگر روی آن‌ها، مطابق روش کارلینگ و همکاران در پنج شاخص متفاوت شامل صفر (هیچ گونه آلودگی)، یک (آلودگی جزیی با ایجاد یک شانکر در طوقه)، دو (آلودگی متوسط با تیره شدن کامل بافت ریشه قبل از پوسیدگی)، سه (آلودگی بالا با پوسیدگی کامل ریشه)، چهار (آلودگی بالا با پوسیدگی کامل ریشه به‌همراه ایجاد لکه‌های برگی) و پنج (از بین رفتن کل گیاه) اندازه‌گیری شد (Carling and Leiner 1990). هم‌چنین فاکتورهای رشدی شامل وزن تر و خشک و طول گیاهان اندازه‌گیری شدند. درصد گیاهچه‌میری بوته‌ها نیز طبق رابطه‌ی (۱) محاسبه شد.

$$1)\ D = A1 - A2 / A1 \times 100$$

D :درصد گیاهچه‌میری، A1: تعداد بوته‌های سالم موجود در شاهد غیرآلوده و A2: تعداد بوته‌های سالم موجود در هر تیمار.

بررسی اندوفیت بودن *B. bassiana* در گیاه پنبه

جهت اثبات فعالیت اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* در بافت-های برگی و ساقه‌ی گیاهان پنبه، نمونه‌هایی از اندام‌های هوائی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

گیاهان تیمار شده در گلخانه به‌طور تصادفی انتخاب شدند و قطعات ۱–۲ سانتی‌متری از آن‌ها تهیه شد و پس از استریل سطحی در محیط SDA کشت داده شدند. ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ‌های جداسازی شده با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین برای بررسی دقیق‌تر قارچ‌های جداسازی شده، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. بدین منظور از آغازگرهای Bbchit1-1 CGGAATTCATGGCTCCTTTTCTTCAAACCAG و Bbchit1-2 CGCCCGGGTTACGCAGTCCCCAAAGTCCC که اختصاصی ژن کیتیناز (*Chit1*) *B. bassiana* می‌باشند استفاده شد (Fang *et al*. 2005). جهت استخراج DNA از روش ژئو و همکاران استفاده شد (Zhu *et al*. 1993). برنامه حرارتی مطابق برنامه پیشنهادی فانگ و همکاران تنظیم شد (Fang *et al*.2005). محصول PCR در ژل آگارز ۱درصد الکتروفورز شد و نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل Bio Doc Analyze بررسی و برای تخمین اندازه‌ی فرآورده‌ی تکثیر شده از نشانگر ژنومی یک کیلو جفت‌بازی Vivantis استفاده شد.

تهیه عصاره آنزیمی گیاهان جهت بررسی تاثیر *B. bassiana* در القای مقاومت سیستمیکی گیاهان

جهت اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و میزان پروتئین گیاهی، از ساقه و برگ گیاهان تیمار شده استفاده شد. بدین منظور، عصاره‌ی آنزیمی گیاهان با استفاده از روش تغییر یافته‌ی ابوالیوسر و همکاران استخراج و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰– نگهداری شد (Abo-Elyosr *et al*. 1976).

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز

برای سنجش میزان این آنزیم، از روش اوربانک و همکاران استفاده شد. محلول واکنش شامل ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۳۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۳۵۰ میکرولیتر پیروگالول ۱۰ میلی‌مولار و ۱ میلی‌لیترH_2O_2 ۷۰ میلی‌مولار بود. میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومترساخت شرکت pg instrument مدل T80 ثبت شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت میکرومول H_2O_2 تجزیه‌شده در میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد (Urbanek *et al*. 1991).

اندازه‌گیری مقدار کل پروتئین عصاره استخراج شده

به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش و تهیه منحنی پروتئین استاندارد، از روش برادفورد استفاده شد (Bradford 1976). میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد، و با استفاده از منحنی استاندارد و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، مقدار کل پروتئین محلول در هر نمونه‌ی گیاهی به‌صورت میکروگرم پروتئین درهر گرم بافت تازه گیاه محاسبه شد.

بررسی آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS (ویرایش ۹/۲) و مقایسه میانگین به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار MSTATC (ویرایش ۲/۱۰) انجام شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

بررسی نحوه ارتباط بین هیف‌های آنتاگونیست و *R. solani*

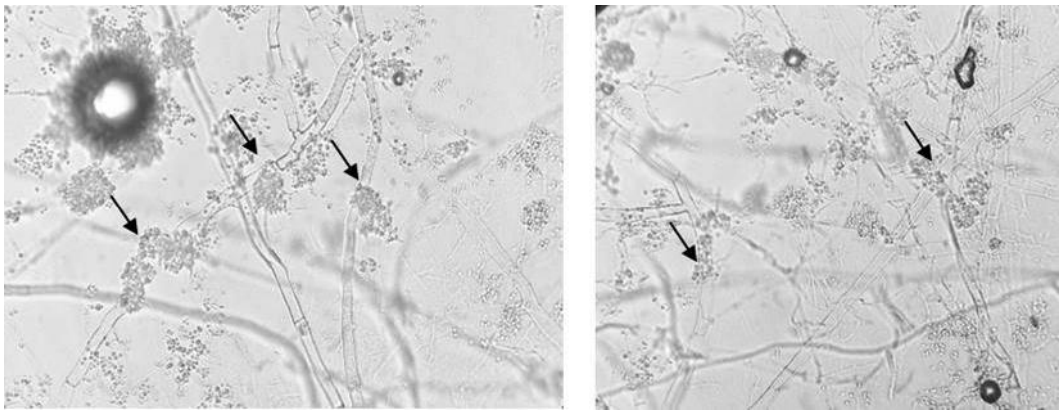
پس از بررسی اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از نحوه ارتباط بین هیف‌های جدایه‌های *B. bassiana* و قارچ عامل بیماری، مشاهده شد که جدایه‌های *B. bassiana*، قادر به پارازیته کردن و یا ایجاد بدشکلی و تجزیه‌ی دیواره‌ی قارچ رایزوکتونیا نمی‌باشند (شکل ۱).

بررسی تولید توکسین توسط جدایه‌های آنتاگونیست

ده روز پس از رشد جدایه‌های آنتاگونیست در محیط کشت متیل-بلوآگار، ناحیه‌ی شفافی در اطراف پرگنه‌ی جدایه‌های TS12 و TS7 مشاهده شد (شکل۲). اگرچه قطر این هاله‌ها اندک بود، ولی تولید توکسین‌های ضدقارچی را توسط این دو جدایه اثبات کرد. در جدایهKJ24، تغییری در محیط مشاهده نشد (شکل ۲).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]



شکل ۱- بررسی میکروسکوپی ارتباط هیفی بین آنتاگونیست و بیمارگر. فلش‌ها نشان‌دهنده‌ی کنیدی‌های *B. bassiana* می‌باشند که با وجود احاطه میسلیوم‌های *R. solani* سبب بدشکلی یا تغییر در آن نشده‌اند.

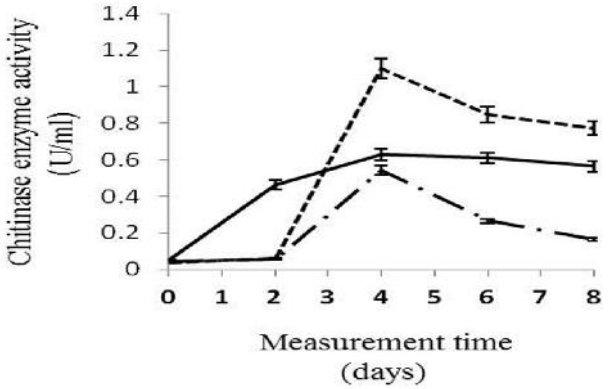
Figure 1. Microscopic examination of the relationship between the antagonist and the pathogen hyphae. The arrows indicate that despite surrounded the *R. solani* mycelia by conidia of *B. bassiana*, not cause deformity or change it.

شکل ۲- بررسی تولید توکسین توسط جدایه‌های قارچ *B. bassiana* در محیط متیل‌بلوآگار. A) عدم وجود منطقه شفاف در اطراف پرگنه‌ی KJ24، B) وجود هاله شفاف در اطراف پرگنه‌های TS12 (راست) و TS7 (چپ).

Figure 2. Study Toxin production by isolates of *B. bassiana* in the methylene blue agar medium. A) absence a clear zone around the colony of KJ24, B) existence a clear zone around the colonies TS12 (right) and TS7 (left).

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز قارچ *B. bassiana*

پس از تهیه عصاره آنزیمی جدایه‌های آنتاگونیست و سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از معرف دی‌نیتروسالسیلیک اسید، منحنی تغییرات آنزیمی در طی هشت روز برای هر جدایه از آنتاگونیست رسم شد؛ نتایج نشان داد که با گذشت زمان میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در هر سه جدایه افزایش یافته است به‌طوری‌که در روز چهارم بیشترین مقدار آنزیمی توسط هر سه جدایه تولید شده است ولی پس از آن میزان تولید این آنزیم کاهش یافته است. بیشترین و کمترین میزان آنزیم تولید شده به ترتیب در جدایه‌ی KJ 24 و TS7 مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- فعالیت آنزیم کیتیناز تولید شده توسط جدایه‌های TS12 (خط)، TS7 (خط تیره و نقطه) و KJ24 (خط تیره) قارچ *B. bassiana* در طول هشت روز رشد در دمای ۱ ± ۲۶ درجه سانتی‌گراد. هر عدد میانگین سه تکرار بوده و میله خطا (Error bar) نشان‌دهنده‌ی انحراف معیار استاندارد می‌باشد.

Figure 3. Chitinase enzyme activity produced by isolates of TS12 (line), TS7 (Dots and dashes) and KJ24 (Dash line) of *B. bassiana* during the eight days of growth at a temperature of 26 ± 1°C .Vertical bars represent ± S.E. of means (n=3).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

بررسی تاثیر جدایه‌های *B. bassiana* در جلوگیری از گیاهچه‌میری پنبه در شرایط گلخانه‌ای : در پایان هفته دوم پس از کاشت بذور تیمار شده، با ظهور علائم گیاهچه‌میری، درصد گیاهچه‌میری، شاخص شدت بیماری و فاکتورهای رشدی محاسبه شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که تیمارها از نظر درصد گیاهچه‌میری و شاخص شدت بیماری در سطح احتمال ۱درصد و از نظر طول گیاه در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز نشان داد که غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی KJ24 با ۵۷/۱۴۳ درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری ۰/۴ دارای بیشترین اثر کنترل‌کنندگی است. هم‌چنین بیشترین طول گیاه در بین تیمارها برابر با ۲۸/۶۶۷ سانتی‌متر بود که در این تیمار مشاهده شد. در حالیکه گیاهان شاهد آلوده دارای ۸۵/۷۱۴ درصد گیاهچه‌میری و ۳/۵ شاخص شدت بیماری بودند. کم‌ترین اثر کنترل‌کنندگی در غلظت $۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی TS7 با ۸۵/۷۱۴ درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری ۱/۰۰ مشاهده شد. هم‌چنین این تیمار دارای کم‌ترین طول ساقه نیز بود. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌ها، غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی KJ24 با نشان دادن کمترین درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری و هم‌چنین بهترین اثر روی طول گیاه، به عنوان بهترین غلظت و جدایه برای کنترل گیاهچه‌میری پنبه تعیین شد. سایر فاکتورهای رشدی شامل وزن تر و خشک گیاه دارای اختلاف معنی‌داری نبودند (جدول ۱).

جدول ۱– مقایسه میانگین درصد گیاهچه‌میری، شاخص شدت بیماری و طول گیاه، در بررسی‌های گلخانه‌ای.

Table 1. Mean comparison of percentage damping-off, disease severity and plant length in the greenhouse experiment.

Treatment	Percentage damping-off		disease severity		Plant length (cm)	
TS7 (10^5 cell/ml)	85.714	d	1	f	12.167	d*
TS7 (10^7 cell/ml)	71.429	c	1	f	23	abcd
TS7 (10^9 cell/ml)	71.429	c	1.1	g	18.833	bcd
TS12 (10^5 cell/ml	85.714	d	0.5	c	23.333	abcd
TS12 (10^7 cell/ml)	71.429	c	0.5	c	24.833	abcd
TS12 (10^9 cell/ml)	85.714	d	0.8	e	21.333	abcd
KJ24 (10^5 cell/ml)	71.429	c	1.2	h	26	abc
KJ24 (10^7 cell/ml)	57.143	b	0.4	b	28.667	ab
KJ24 (10^9 cell/ml)	71.429	c	0.6	d	15.667	cd
Non-infected	0	a	0	a	33.333	a
infected	85.714	d	3.5	i	23.667	abcd

هر عدد میانگین سه تکرار بوده و حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌گر اختلاف آماری در سطح احتمال ۱درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند. *حروف متفاوت، نشان‌گر اختلاف آماری در سطح احتمال ۵ درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

Values followed by the same letter were not significantly different at 1%, as determined by variance analysis followed by Duncan's Multiple Range Test.
*Values followed by the same letter were not significantly different at 5%, as determined by variance analysis followed by Duncan's Multiple Range Test.

بررسی اندوفیت بودن *B. bassiana* در گیاه پنبه

با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ‌های جداسازی شده از گیاهان تیمار شده در گلخانه، مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به وجود دیواره عرضی هیف‌ها، اسپورهای تک‌سلولی کروی یا بیضی شکل، رشد سیمپودیال هیف‌ها و سلولهای کنیدی‌زای فیالیدی شکل (شکل۴)، قارچ‌های جداسازی شده *B. bassiana* تشخیص داده شدند (Griffin 2007) و مشخص شد که تمام تیمارها قادر به کلنیزه کردن گیاهان و فعالیت اندوفیتی هستند.

هم‌چنین تکثیر قطعه‌ی DNA به طول ۱۰۰۰ جفت‌باز از دسته ژن‌های کیتیناز با استفاده از تکنیک PCR و با کمک دو آغازگر Bbchit1-1 و Bbchit1-2 نشان داد که قارچ جداسازی شده از

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

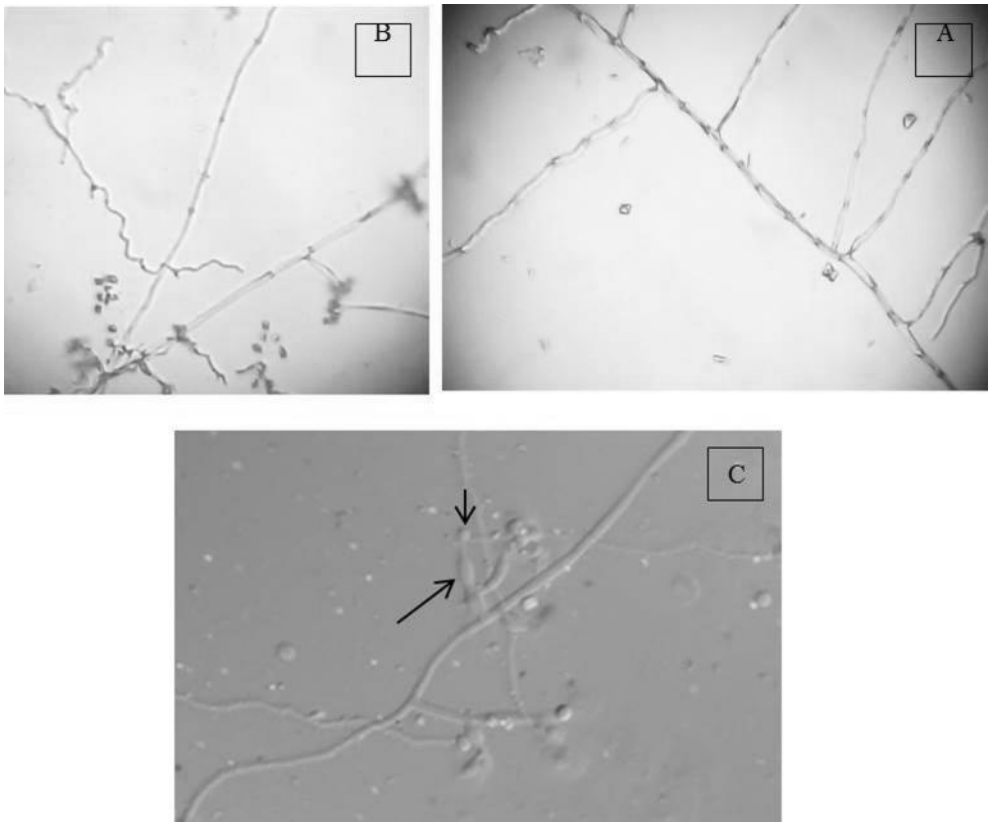
تیمار KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر که دارای بیشترین درصد کنترل‌کنندگی بود، *B. bassiana* است (شکل ۵).

تهیه عصاره آنزیمی گیاهان جهت بررسی تاثیر *B. bassiana* در القای مقاومت سیستمیک در گیاه

با توجه به نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای سه جدایه‌ی KJ24، TS7 و TS12، با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر که دارای کمترین درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری بودند، برای اندازه‌گیری‌های آنزیمی و بررسی سازوکار االقای مقاومت گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز و میزان پروتئین کل گیاه

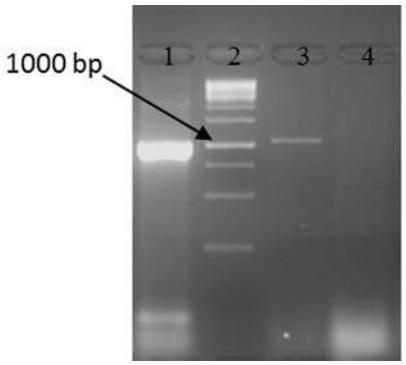
آنالیز داده‌های حاصل نشان داد که تیمارها از نظر میزان تولید آنزیم پراکسیداز و میزان پروتئین گیاهی در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار هستند. با توجه به مقایسه میانگین داده-های حاصل از اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز، جدایه‌ی KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر با ۱/۶۵۲واحد، در مقایسه با شاهد آلوده با ۰/۳۳۹ واحد، به عنوان بیشترین تولیدکننده‌ی آنزیمی مشخص شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان پروتئین کل گیاهی نیز نشان داد که جدایه‌های TS7 و TS12با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر، به ترتیب با ۱۳/۰۴۶ و ۸/۵۴۶ واحد نسبت به جدایه‌ی KJ24 با غلظت $۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر با۴/۰۵۰ واحد و شاهد آلوده با۳/۷۸۰ واحد، دارای بیشترین مقدار پروتئین هستند (جدول ۲).



شکل ۴- ویژگی‌های مورفولوژیکی *B. bassiana*. A) دیواره عرضی هیف‌ها، B) رشد سیمپودیال هیف‌ها، C) اسپورهای تک‌سلولی کروی یا بیضی شکل، و سلولهای کنیدی‌زای فیالیدی.

Figure 4. Morphological characteristics of *B. bassiana*. A) septate hyphae, B) sympodial conidiogenesis, C) conidia globose to oval and single celled, and phialidic conidiogenesis cells.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]



شکل ۵- ردیابی DNA قارچ استخراج شده از گیاه پنبه تیمار شده با جدایه KJ24 با استفاده از پرایمرهای Bbchit1-1 و Bbchit1-2. ۱) جدایه KJ24، ۲) مارکر Vivantis، ۳) قارچ استخراج شده از گیاه پنبه تیمار شده با جدایه KJ24، و ۴) کنترل منفی PCR.

Figure 5. Detection of DNA extracted from cotton plants treatment with KJ24, using Bbchit1-2 and Bbchit1-1 primers. Lane 1: KJ24 isolate, Lane 2: ladder, Lane 3: fungal extracted from cotton plants treatment with KJ24 isolate, and Lane 4: no DNA control.

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل گیاه.

Table 2. Mean comparison of peroxidase enzyme activity and total protein in plants

Treatment	peroxidase enzyme µMol H_2O_2 decomposed per mg protein per minute		Total protein µg protein per g fresh tissue weight	
TS7 (107cell/ml)	0.4995	c	13.0465	a
TS12 (107 cell/ml)	0.7715	bc	8.5465	b
KJ24 (107cell/ml)	1.6525	b	4.0500	c
Non-infected	4.9035	a	3.7100	c
Infected	0.33975	c	3.7800	c

هر عدد میانگین سه تکرار بوده و حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌گر اختلاف آماری در سطح احتمال ۱درصد در آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Values followed by the same letter were not significantly different at 1%, as determined by variance analysis followed by Duncan's Multiple Range Test.

بحث

تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی ضدقارچی و ضدباکتریایی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سازوکارهای بیوکنترلی *B. bassiana* گزارش شده است (Ownley *et al*. 2010). با توجه به توانایی تولید آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز و لیپاز توسط *B. bassiana* جهت تجزیه کوتیکول حشرات و نفوذ به درون آن‌ها (Griffing 2007) و از طرفی شباهت ژن کیتیناز *B. bassiana* به ژن کیتیناز *Trichoderma harzianum* (Carolina Sánchez-Pérez *et al.* 2014)، به نظر می‌رسد که تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده از جمله کیتیناز نیز از دیگر سازوکارهای بیوکنترلی *B. bassiana* باشد. آنزیم‌های تجزیه‌کننده و متابولیت‌های ثانویه سمی می‌توانند باعث از بین رفتن عوامل بیماری‌زا قبل از نفوذ به میزبان شوند (Agrios 2005). در جدایه‌ای از *B. bassiana* که از ریزوسفر گیاه گندم جداسازی شده است، خاصیت بازدارندگی از رشد و تولید آنزیم-های کیتیناز و بتاگلوکاناز علیه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* گزارش شده است (Renwick *et al*. 1991). نتایج این بررسی نشان داد که با وجود تولید آنزیم کیتیناز توسط هرسه جدایه KJ24، TS7 و TS12 قارچ *B. bassiana*، در محیط لیلی-بارنت، در بررسی میکروسکوپی قادر به پارازیته کردن و تجزیه دیواره سلولی *R. solani* نیستند. گریفین و اونلی ثابت کردند که جدایه‌ی ۱۱-۹۸ قارچ *B. bassiana* اگرچه می‌تواند هیف‌های *Pythium myriotylum* را پارازیته کند ولی قادر به پارازیته کردن میسلیوم‌های *R. solani* نیست (Griffin 2007, Ownley 2008).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

در بررسی‌های آزادی و همکاران نیز مشخص شد که جدایه‌های TS7، TS12 و KJ24 قارچ *B. bassiana* در آزمون کشت متقابل قادر به بازداری از رشد *R. solani* نیستند (Azadi *et al.* 2015b). پارازیته نشدن میسلیوم‌های *R. solani* شاید به این‌دلیل است که قسمت بیشتر دیواره‌ی سلولی *R. solani* از گلوکان تشکیل شده است (Hadar 1979) و میزان کیتین قابل دسترس برای قارچ *B. bassiana* کم بوده و در نتیجه منجر به کاهش تولید این آنزیم در حضور هیف‌های *R. solani* گشته است. در حالی که در محیط لیلی- بارنت، به دلیل وجود دیواره سلولی *R. solani* به‌عنوان تنها منبع کربن و از طرفی به‌دلیل هوادهی مناسب، ترشح این آنزیم توسط جدایه‌های *B. bassiana* فعال شده و در روز چهارم به بیشترین مقدار خود رسیده است. این نتایج با گزارش‌های موجود مبنی بر موثر بودن نقش هوادهی در میزان تولید آنزیم کیتیناز، مطابقت دارد (De Marco 2000). نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز در این پژوهش نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم با گذشت زمان افزایش یافته بطوری‌که در روز چهارم به بیشترین میزان رسیده است. مصطفی و کائور نیز در بررسی‌های خود نشان دادند که میزان تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های مختف *B. bassiana* در روزهای چهارم و ششم بعد از تلقیح افزایش می‌یابد (Mustafa and Kaur 2010). در بررسی‌های دیگری نیز افزایش تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های مختف *B. bassiana* در روزسوم بعد از تلقیح ثابت شده است (Petlamul1 and Prasertsan 2012). با توجه به فعالیت اندوفیتی قارچ *B. bassiana*، به نظر می‌رسد که علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه Azadi *et al.* (2015a) و تولید آنزیم کیتیناز، سازوکارهای دیگری نیز در کاهش بیماری گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی پنبه نقش داشته باشند.

بررسی‌های گلخانه‌ای نشان دادند که تمام تیمارهای به‌کار رفته توانسته‌اند شدت بیماری را به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. در بین تیمارها، تیمار مربوط به جدایه‌ی KJ24 با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر با شاخص بیماری ۰/۴ وهمین جدایه با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر با شاخص ۱/۲ به‌ترتیب دارای کمترین و بیشترین شاخص شدت بیماری بود. در حالی که شاخص شدت بیماری در گیاهان آلوده برابر با ۳/۵ محاسبه شد. هم‌چنین مشاهده شد که جدایه‌ی KJ24 با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر، دارای بیشترین طول ساقه و کمترین درصد گیاهچه‌میری در بین سایر تیمارها است. در بررسی‌های اونلی و همکاران مشخص شد که تیمار گیاهان با جدایه‌ی ۹۸-۱۱ قارچ *B. bassiana*، علاوه بر کاهش گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی، باعث افزایش رشد گیاهان نیز می‌شود (Ownley *et al.* 2004). گریفین نیز نشان داد که کاربرد جدایه‌ی فوق می‌تواند گیاهچه‌میری گوجه‌فرنگی را کاهش دهد (Griffin 2007). هم‌چنین باتسون و همکاران طی بررسی‌هایی ثابت کردند که تیمار بذور پنبه با *B. bassiana* می‌تواند باعث بهبود حفاظت گیاه در برابر *R. solani* شود (Batson *et al.* 2000). در بررسی‌های آزادی و همکاران نیز توانایی جدایه‌هایی از *B. bassiana* در کاهش گیاهچه‌میری رایزوکتونیایی گوجه‌فرنگی به اثبات رسید (Azadi *et al.* 2015b). این درحالی است که در بررسی تولید توکسین، جدایه‌های TS7 و TS12، که در مقایسه با جدایهKJ24 قدرت کنترل‌کنندگی کمتری داشتند، قادر به تولید توکسین بودند، در حالی‌که جدایه KJ24 نتوانست توکسین تولید کند. با توجه به نتایج آزمایشگاهی مشخص شد که جدایه‌های *B. bassiana* به صورت مستقیم قادر به کنترل بیمارگر نیستند بنابراین با توجه به نتایج مثبت بررسی‌های گلخانه‌ای، و نیز اندوفیت بودن این جدایه‌ها، احتمال دارد که کاهش بیماری در گیاهان پنبه ناشی از فعالیت اندوفیتی *B. bassiana*، و القای مقاومت در گیاهان باشد. چرا که قارچ‌های اندوفیت موجب تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه شده و باعث مقاومت گیاه نسبت به طیف وسیعی از حشرات و بیماری‌ها می‌شوند(Zabalgogeazcoa 2008). هم‌چنین آن‌ها می‌توانند تاثیر مثبتی روی رشد گیاه داشته باشند (Ownley *et al.*, 2010). فعالیت اندوفیتی تیمارهای به‌کار رفته، با جداسازی قارچ از گیاهان تیمار و نیز از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ثابت شد و مشخص شد که آن‌ها قادر به کلنیزه کردن گیاه به‌صورت اندوفیت می‌باشند. گریفین نیز با استفاده از PCR فعالیت اندوفیتی جدایه‌ی ۹۸-۱۱ قارچ *B. bassiana* را در گیاه پنبه ثابت کرد. وی هم‌چنین بیان کرد که این جدایه قادر به فعال کردن مقاومت القایی سیستمیک در گیاه است (Griffin 2007). کنرات و همکاران نیز با اثبات فعالیت اندوفیتی *B. bassiana*، بیان کردند که اندوفیت‌ها، نقش مهمی در تحریک سیستم مقاومتی گیاه دارند

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

(Conrath *et al.* 2006). آزادی و همکاران نیز علاوه بر اثبات فعالیت اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* در گیاه گوجه‌فرنگی، نشان دادند که کنترل گیاهچه‌میری توسط این جدایه‌ها احتمالا ناشی از تحریک رشد گیاه و القای مقاومت سیستمیکی در آن‌ها بوده است (Azadi *et al.* 2015a).

طی بررسی‌های انجام شده توسط پژوهشگران، مشخص شده است که آنزیم‌های زیادی با القای مقاومت گیاهان در ارتباط هستند؛ از جمله آنزیم پراکسیداز (Alves Silva *et al.* 2004). طبق بررسی‌های مختلف، پژوهشگران فعالیت آنزیم پراکسیداز را به‌عنوان مارکر بیوشیمیایی جهت پیش‌بینی مقاومت معرفی کرده‌اند، که ممکن است به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم در سازوکارهای دفاعی نقش داشته باشد. به‌عنوان مثال، نقش مستقیم آن در واکنش‌های دفاعی واریته‌های مقاوم گیاهان به اثبات رسیده است (Lehrer 1969). هم‌چنین طی بررسی‌هایی نشان داده شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز با فعال شدن مقاومت القایی سیستمیک در ارتباط است (Hammerschmidt and Kuc 1982). پراکسیداز ها اثر مستقیم در مقاومت دارند و از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسید هیدروژن، که برای بعضی بیمارگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می‌شوند (Liu and Ekramoddoullah 2006). این آنزیم علاوه بر سازوکارهای دفاعی، در تنظیم هورمونی، بیوسنتز لیگنین، تجزیه اکسین و برخی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی دیگر گیاهان نیز نقش دارد. برخی از پروتئین‌ها مرتبط با بیماری‌زایی بوده و پس از حمله میزبان در گیاه فعال شده و یا افزایش می‌یابند (Tsai 2011). در بررسی‌های صورت گرفته در این پژوهش نیز مشخص شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با جدایه KJ24 با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر که بیشترین تاثیر کنترل‌کنندگی را داشت، بیش از شاهد آلوده و سایر تیمارها بود. از طرفی طول گیاه نیز در این تیمار دارای افزایش معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها و شاهد منفی بود. با توجه به نقش پراکسیداز در مراحل مختلف رشدی گیاه و بیوسنتز لیگنین و با توجه به نتایج حاصل و همچنین عدم افزایش پروتئین کل گیاهی، چنین به نظر می‌رسد که این تیمار با تحریک رشد گیاه و لیگنینی شدن دیواره سلول‌ها و احتمالا افزایش رشد ریشه‌ها و طول گیاه باعث عبور گیاه از مرحله حساس رشدی شده و در نتیجه بیماری کاهش یافته است. لیگنینی شدن دیواره و تقویت آن در مراحل اولیه رشد، توسط H_2O_2 انجام می‌شود (Yang *et al.* 2014). با توجه به نقش آنزیم پراکسیداز در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله H_2O_2، افزایش تولید H_2O_2 با افزایش آنزیم پراکسیداز همراه است. پس از طی مرحله بلوغ و کاهش H_2O_2، میزان آنزیم پراکسیداز نیز کاهش می‌یابد. بنابراین در گیاهان شاهد غیرآلوده نیز میزان آنزیم پراکسیداز افزایش می‌یابد.

وجود خاصیت تحریک‌کنندگی رشد گیاه توسط آنتاگونیست‌ها، نقش مهمی در متحمل کردن گیاه به بیماری‌های ریشه دارد. با تحریک رشد گیاه ریشه‌های آلوده به سرعت توسط ریشه‌های جدید جایگزین می‌شوند و باعث عبور گیاهچه از مرحله‌ی حساس شده و در نتیجه خسارت بیماری را کاهش می‌دهند. هارمون و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که وجود چنین فعالیتی توسط قارچ‌های بیمارگر حشرات، مشابه فعالیت ریزوباکترهای محرک رشد گیاه است.

دو تیمار TS7 و TS12 با غلظت 10^7 اسپور که از نظر کنترل‌کنندگی تاثیر کمتری در مقایسه با جدایه KJ24 با غلظت 10^7 اسپور داشتند، از لحاظ تولید آنزیم پراکسیداز برخلاف جدایه KJ24 با غلظت 10^7 اسپور، با شاهد آلوده تفاوتی نداشتند. نتایج این پژوهش با مطالعات هاول و همکاران مطابقت دارد (Howell et al. 2000). آن‌ها بیان داشتند که یکی ازعوامل مهم کنترل بیولوژیک بیماری مرگ گیاهچه در اثر *R.solani*، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های پنبه تیمار شده با *T. virens*، است. مرتضی نیا و همکاران نیز نشان دادند که مقاومت در گیاهچه‌های خیار تیمار شده با *Trichoderma harzianum* Bi علیه *Pythium aphanidermatum* با افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ارتباط است .(Mortezaia et al. 2010)

میزان پروتئین کل گیاه در این دو تیمار(TS7 و TS12 با غلظت 10^7) نسبت به شاهد آلوده دارای افزایش قابل توجهی است. با توجه به نقش پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در القای مقاومت گیاه و کاهش بیماری‌ها، احتمال دارد که دو تیمار فوق نیز با القای مقاومت گیاه و فعال شدن سازوکارهای بیوکنترلی باعث کاهش

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

بیماری شده‌اند. به‌طوری‌که اشری و موهامد نشان دادند که در رقم‌های مقاوم گیاه کتان به کپک پودری، میزان پروتئین کل گیاه افزایش می‌یابد (Ashry and Mohamed 2011). هم‌چنین در مطالعات چان و تیان در میوه‌های گیلاس که با مخمر و اسید سالسیلیک مصنوعی علیه کپک آبی تیمار شده بودند، پروتئین‌های خاصی افزایش می‌یابند که احتمال داارد با مقاومت آن‌ها در ارتباط باشند (Chan and Tian 2006). در مطالعه‌ای دیگر نیز ثابت شد که حضور و افزایش پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در بافت‌های آلوده به بیمارگر، با مقاومت گیاهان ارتباط مثبتی دارد (Agnieszka and Iwona 2003). با توجه به اینکه آنزیم‌ها و ترکیبات دفاعی مختلفی در القای مقاومت گیاه نقش دارند بنابراین آنزیم پراکسیداز و پروتئین کل گیاهی به تنهایی نمی‌توانند بیانگر فعال شدن سیستم مقاومتی گیاه باشند، ولی با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات آزادی و همکاران مبنی بر تحریک رشد و القای مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی توسط جدایه‌های *B. bassiana* و کاهش بیماری (Azadi *et al*. 2015a)، احتمال وجود چنین پدیده‌ای در قارچ اندوفیت *B. bassiana*، بسیار زیاد بوده و نیازمند بررسی‌های بیشتری است. با توجه به درصد گیاهچه‌میری و شاخص بیماری، به نظر می‌رسد که غلظت و تراکم کنیدی‌ها نیز درکلنیزه کردن گیاه و فعالیت اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* و در نتیجه کنترل بیماری نقش داشته باشد، به طوری که در بین غلظت‌های به کار رفته غلظت 10^{7} اسپور در میلی‌لیتر در هر سه جدایه توان کنترلی بالایی را داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که در غلظت 10^{5} اسپور در میلی‌لیتر به دلیل کاهش کنیدی‌های موجود در واحد سطح و در غلظت 10^{9} اسپور در میلی‌لیتر به دلیل ازدحام کنیدی‌ها و کاهش سطح تماس، احتمال نفوذ قارچ به درون گیاه کاهش یافته‌است. ولی غلظت 10^{7} اسپور در میلی‌لیتر برای نفوذ کنیدی‌های قارچ *B. bassiana* مناسب بوده است. نتایج حاصل با بررسی‌های اونلی (۲۰۰۸) مطابقت دارد. وی نیز نشان داد که غلظت‌های 10^{7} تا 10^{6} اسپور در میلی‌لیتر جدایه‌ی ۹۸-۱۱ *B.bassiana*، در بذور گوجه‌فرنگی و غلظت‌های 10^{7} تا 10^{9} اسپور در میلی‌لیتر بذور پنبه، بهترین تاثیر محافظت‌کنندگی را علیه بیمارگرها دارند. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد که تولید آنزیم کیتیناز ومتابولیت‌های ثانویه از یک سو مانع نفوذ بیمارگر به بافت گیاهی میزبان شده و از سوی دیگر القای مقاومت و تحریک رشد گیاه، موجب کاهش شدت بیماری و در نتیجه کنترل گیاهچه‌میری پنبه شده است.

منابع

Abo-Elyosr K AM, Hussein M AM, Allam A DA, Hassan M H. 2009. Salicylic acid induced systemic resistance on onion plants against *Stemphylium vesicarium*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42 (11): 1042-1050.

Agnieszka P, Iwona Z. 2003. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Science 164: 1019-1028.

Agrios GN. 2005. Plant pathology. Dana Dreibelbis, Fifth Edition. 922pp.

Alves Silva HS, Silva Romeiro R, Macagnan D, Halfeld-Vieira BA, Baracat Pereira MC, Mounteer A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. Biological Control 29: 288–295.

Ashry NA, Mohamed HI. 2011. Impact of Secondary Metabolites and Related Enzymes in Flax Resistance and or Susceptibility to Powdery Mildew. World Journal of Agricultural Sciences 7 (1): 78-85.

Azadi N, Shirzad A, Mohammadi H. 2015a. Study some of biocontrol mechanisms *Beauveria bassiana* against Rhizoctonia disease in tomato. MSc Thesis. Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. (In Persian with English abstract).

Azadi N, Shirzad A, Mohammadi H. 2015b. Study of biological control of tomato Damping-off disease by some isolates of *Beauveria bassiana*. In: First National Conference on Agriculture, Environment and Food Security. Iran, University of Jiroft. http://www.civilica.com/Paper-AEFSJ01-AEFSJ01_262.html. (In Persian with English abstract).

Bradfor, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Fungal as biocontrol agents Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, UK.

Carling DE, Leiner RH. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on Potato. Phytopathology 80: 930-934.

Carolina Sánchez-Pérez LD, Barranco-Florido JE, Rodríguez-Navarro S, Cervantes Mayagoitia JF, Ramos-López MA. 2014. Enzymes of Entomopathogenic Fungi,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

Advances and Insights. Advances in Enzyme Research 2: 65-76.

Chan Z, Tian S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. Post harvest Biology and Technology 36: 215–223.

Conrath U, Beckers GJM, Flors B, Garcı´a-Agustı´n P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B. 2006. Priming: getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 19: 1062–1071.

De Marco JL, Lima LHC, De Sousa MV, Felix CR. 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathoge *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World journal of Microbiology and Biotechnology 16: 383-386.

Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1*, Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. Applied Environmental Microbiology 71(1): 363–370.

Griffin MR. 2007. *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. PhD Thesis.University of Tennessee, Knoxville.

Hadar Y, Chet I, Henis Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64–68.

Haggag WM. 2010. Role of Entophytic Microorganisms in Biocontrol of Plant Diseases. Life Science Journal 7(2): 57-62.

Hammerschmidt R, Kuc J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiological and Molecular Plant Pathology 20: 61–71.

Harmon GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. Trichoderma species–opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Rev Microbiol 2: 43–56.

Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS. 2000. Induction of terpenoid synthesisin cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens.* Phytopathology 90: 284-252.

Kang SC, Park S, Lee DG. 1999. Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 73: 276–281.

Lehrer RI. 1969. Antifungal Effects of Peroxidase Systems. Bacteriology 99 (2): 361–365.

Liu J, Ekramoddoullah AKM. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology 68: 3–13.

Magasanik B. 1961. Catabolite Repression. Cild spring harbob symposia on quantithtive biology 26: 249-256.

Mortezaia H, Rouhani H, Sahebani N. 2010. Study of peroxidase enzyme activity induced by *Trichoderma harzianum* Bi in cucumber seedling and its effect in the control of root and foot rot. Journal of Plant Protection 24 (3): 258-268.

Mostafa M, Sharifnabi B, Esmaeili A, Safaie N. 2010. Study of role of *AbreAtr1* gene in protective mechanism and pathogenicity of *Alternaria brassicae*, the causal agent of leaf spot in canola, using real time PCR. Iranian iournal of plant pathology 46(4):283-292. (In Persian with English abstract)

Muriungi SJ, Mutitu EW, Muthomi JW. 2014. Efficacy of culture methods in the control of *Rhizoctonia solani* strains causing tomato damping off in Kenya. african journal of food agriculture nutrition and development 14(2): 8776-8790.

Mustafa U, Kaur G .2010. Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. International Journal of Biotechnology & Biochemistry 6 (5): 701-713.

Ownley BH, Griffin M R, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology 98:267–270.

Ownley BH, Gwinng KD, Vega FE. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. BioControl 55: 113–128.

Pancher M, Ceol M, Corneo PE, Oliveira Longa CM, Yousaf S, Pertot L, Campisano C. 2014. Crop Management Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. Applied Environmental Microbiology 78(12): 4308–4317.

Parveen RM, Begum JA. 2010. Production and effect of killer toxin by Saccharomyces cerevisiae on sensitive yeast and fungal pathogens. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 3(1): 127-129.

Petlamul W, Prasertsan P. 2012. Evaluation of Strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against Spodoptera litura on the Basis of Their Virulence, Germination Rate, Conidia Production, Radial Growth and Enzyme Activity. Mycobiology 40(2): 111-116.

Renwick A, Campbell R, Coe S . 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. Plant Pathology 40:5 24–532.

Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ . 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 29:319–343.

Senthamizhlselvan P, Sujeetha JARP, Jeyalakshmi C. 2010. Growth, sporulation and biomass production of native entomopathogenic fungal isolates on a suitable medium. Journal of Biopesticides 3(2): 466 – 469.

Su YY, Qi YL, Cai L. 2012. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. Mycology 3 (3): 195–200.

Tsai YH. 2011. Involvment of salicylic acid in the resistance responses of different wheat cultivars to two Russian wheat aphid biotypes. MSC Thesis. University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.

Tseng SC, Liu SY, Yang HH, Lo CT, Peng KC. 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* T323 in response to *Rhizoctonia solani*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 6914-6922.

Urbanek H, Kuzniak-Gebarowska E, Herka H. 1991. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]

cinerea Polygalacturonase. Acta Physiologiae Plantarum 13:43–50.

Vesely D, Koubova D. 1994. In vitro effect of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *B. brongniartii* (Sacc.) Petch on phytopathogenic fungi. Ochr Rostl 30: 113–120.

Walters D, Newton A, Lyon G. 2007. Induced resistance for plant defence, Blackwell Publishing, UK.

Yang Y, Shah J,. Klessig DF. 2014. Signal perception , transduction in plant defense responses. Genes & Development 11: 1621-163.

Zabalgogeazcoa I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. Spanish Journal of Agricultural Research 6: 138-146.

Zhu H, Qu F, Zhu LH. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. Nucleic Acids Research 21(22): 5279-5280.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1395.5.2.4.1]