فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
۱۳۹۶- ۹ : ۸۷-۱۰۲

ارزیابی توانایی کنترل بیولوژیکی پژمردگی فوزاریومی خربزه توسط *Trichoderma* spp. و *Bacillus* spp.

زین العابدین نوروزی[۱]، کامران رهنما[۱]، حجت اله ربانی نسب[۲*]، میثم تقی نسب[۱]
۱-دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

چکیده
برای بررسی امکان کنترل بیولوژیکی *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه سه گونه *Trichoderma* و دو سویه باکتری *Bacillus* sp. در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آزمون کشت متقابل هم زمان جدایه *T. harzianum* 6 با قارچ عامل بیماریزا۷۰ درصد و در کشت غیر هم زمان با عامل بیماری‌زا جدایه *T. viride* 10 با ۵۲/۵۹ درصد باعث بیشترین بازداری از رشد میسلیوم‌های عامل بیماری‌زا گردید. در آزمون ترکیبات فرار ضد قارچی جدایه *T. harzianum* 6 با ۳۱/۵ درصد مانع از رشد میسلیوم‌های عامل بیماری‌زا گردید. در کشت متقابل باسیلوس‌ها با عامل بیماری‌زا سویه *Bacillus* sp. 62 با ۳۰/۵ درصد بیشترین درصد بازداری از رشد میسلیوم عامل بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاه گردید. همچنین در ترکیبات فرار سویه *Bacillus* sp.15 با ۱۲/۳۷ بیشترین درصد بازداری از رشد میسلیوم‌های عامل بیماریزا گردید. در تست مواد مایع خارج سلولی قابل نفوذ در آگار تمام استرین‌ها مانع از رشد میسلیوم عامل بیماری‌زا گردید. اثر سویه *Bacillus* sp.62 و مخلوط هر دو گونه‌ی *T. viride* و*T. longibrachiatum* به ترتیب ۸۴/۹۳ و ۸۴/۵۳ بیشترین تاثیر بر افزایش رشد طولی ساقه گیاه مشاهده گردید اما بیشترین تاثیر بر افزایش وزن قسمت‌های هوایی مخلوط گونه تریکودرما *T. longibrachiatum* و باکتری*Bacillus* sp.15 مشاهده گردید. بیشترین تاثیر بر افزایش وزن تر ریشه با گونه *T. harzianum* مشاهده شد. بیشترین تاثیر بر وزن خشک ساقه مخلوط دو گونه تریکودرما *T. viride* و *T. harzianum* دیده شد. بیشترین تاثیر بر اقزایش وزن خشک ریشه توسط باکتری *Bacillus* sp.15 و قارچ *T. harzianum* مشاهده گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده آزمون LSD انجام گردید.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، کنترل بیولوژیک، خربزه، *Trichoderma* spp.، *Bacillus* spp.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.rabbani@areeo.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۰

مقدمه

بیماری پژمردگی و زردی خربزه ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) در غالب کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عامل بیماری مختص ارقام *Cucumis melo* از جمله خربزه، طالبی، گرمک، خیار چنبر و دستنبو است و در سایر جنس‌ها و گونه‌های کدوئیان بیماری‌زا نیست (Jacobson & Gordon., 1990). تا سال ۱۹۶۵ اطلاعات چندانی در خصوص وجود نژادهای فیزیولوژیکی FOM در دسترس نبود، با استفاده از اقام افتراقی خربزه سه نژاد ۲،۱ و۳ از فرانسه گزارش کردند که نژاد ۳ شامل دو پاتوتیپ زردی و پژمردگی بود (Banihashemi, 2010). بنی هاشمی ضمن مقایسه جدایه‌های FOM از استان خراسان رضوی، شمال آمریکا و جنوب کانادا با استفاده از ارقام افتراقی، جدایه‌های استان خراسان را متعلق به نژاد۲و جدایه‌های آمریکا شمالی نژاد ۴ معرفی نمود (Banihashemi, 2010). بر اساس ژن‌های شناخته شده مقاومت ارقام، نژادهای صفر،۱و۲و۲،۱را گزارش نمود، بر این اساس نژادهای ۳،۲،۱و۴ قبلی، به ترتیب به نژادهای صفر، ۱، ۲ و ۲،۱ تغیر یافت. در ایران نژاد ۱ از مشهد و گرمسار و نژاد ۲،۱ از استان فارس، اصفهان و جدیداً از کاشان گزارش شده است (Banihashemi, 2010). آثار سوء اکثر قارچ کش ها در کشاورزی موجب شده است که بیشتر به کنترل کننده های بیولوِژیک توجه شود که در این راستا از قارچ آنتاگونیست از جمله *Trichoderma* spp. استفاده گردیده است (Zitter *et al*., 1998).

مطالعات کمی درباره القاء مقاومت توسط گونه‌های تریکودرما در مقایسه با ریزوباکترها صورت گرفته است ، شاید به این دلیل که بیشتر جنبه اثرات مستقیم روی پاتوژنهای گیاهی به ویژه از لحاظ مایکو پارازیتی و آنتی بیوز مورد توجه قرار گرفته است، شاید اولین گزارش القاء مقاومت به وسیله تریکودرما در سال ۲۰۰۲ گزارش شده است، که با تیمار ریشه‌ها با استرین T-39 *Trichoderma harzianum*، برگ‌ها در برابر قارچ‌هایی مانند *Botrytis cinerea* و *Colletotrichum lindemuthianum* مقاومت نشان دادند (Bigirimana *et al*., 1997). ایجاد مقاومت القائی توسط گونه‌های تریکودرما به وسیله القا کننده‌های جاسمونات و سالسیلات طی فرآیند تولید پروتئین‌های وابسته به بیماری‌زایی شناسائی گردیده اند. این القا کننده‌ها شامل کتینازهای ضدقارچی، گلوکانازها، آنزیم‌های اکسیداتیو از جمله پراکسیدازها، پلی فنول اکسیدازها و لیپوکسی ژنازها هستند. البته ترکیباتی با وزن مولکولی کم با خصوصیات میکروبی (فیتوآلکسین‌ها) در فرآیند ایجاد مقاومت القائی حضور دارند. القاکننده‌های جاسمونات و سالسیلات باعث ایجاد مقاومت سیتمیک نسبت به انواعی از بیماری‌های گیاهی می‌شوند (Harman *et al*., 2004).

Iraqi *et al*. (2009) گزارش کردند که ترشحات خارج سلولی گونه‌های باسیلوس خاصیت پادزیستی داشته و از جوانه زنی و رشد میسلیومی کنیدیومهای فوزاریوم جلوگیری می‌کنند.

همچنین در پژوهش دیگری نشان داده شد که استرین‌هایی از *Bacillus subtilis* در حفاظت محصول در برابر فوزاریوم و رایزوکتونیا بسیار موثر بوده و به میزان زیادی رشد گیاه را افزایش داده‌اند (Schisler *et al*., 2004). باکتری گونه *B. subtillis* خاصیت قارچ کشی دارد که از این باکتری می‌توان به عنوان پوشش بذری بر علیه پوسیدگی‌های ریشه بر اثر عوامل بیماری‌زا استفاده کرد (Zhang *et al*., 2009).

هدف از این تحقیق بررسی توانائی بیوکنترلی آنتاگونیست های جدا شده از خاک اطراف ریشه خربزه در کنترل قارچ FOM می باشد.

مواد و روش ها

جدا سازی و شناسائی FOM

بدین منظور از نمونه های که از گیاه خربزه واقع در منطقه تربت جام جمع آوری شده بود و بر اساس روش (Seifrt, 1996) جدا سازی و شناسائی گردیدند مورد استفاده قرار گرفت.

جدا سازی و شناسائی عوامل قارچی آنتاگونیست Trichoderma spp.

به این منظور از نمونه های خاک اطراف ریشه گیاه خربزه که از منطقه تربت جام جمع آوری گردیده بود و بر اساس روش (Samuel *et al*., 2011) جدا سازی و شناسائی شدند مورد استفاده قرار گرفت.

جدا سازی و شناسائی عوامل باکتریای آنتاگونیست Bacillus spp.

جهت جدا سازی و شناسائی عوامل باکتریای آنتاگونیست از نمونه های خاک اطراف ریشه گیاه خربزه که از منطقه تربت جام جمع آوری شده بود و بر اساس روش (Shoda, 2000) جدا سازی و شناسائی شدند مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما در شرایط آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل

در این بررسی از ۱۰ جدایه تریکودرما استفاده شد. آزمایش در دو مرحله صورت گرفت: در مرحله اول کشت همزمان و در مرحله دوم ۲۴ ساعت بعد از کشت عامل بیماری‌زا، جدایه‌های تریکودرما کشت داده شدند. برای انجام آزمایش از تشتک‌های پتری ۱۰ سانتی متری که حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) بود استفاده شد. در یک طرف تشتک پتری به فاصله یک سانتی متری لبه آن یک قطعه پنج میلیمتری ازکشت پنج روزه عامل بیماری‌زا و در سمت مقابل قطعه‌ای از کشت جوان جدایه تریکودرما قرار داده شد (Ashrafizadeh *et al*., 2005). برای شاهد یک قطعه محیط کشت PDA به جای تریکودرما قرار داده شد. تشتک‌های

پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور به مدت هفت روز نگهداری شد. مساحت رشد پرگنه عامل بیماری‌زا هر روز اندازه گیری و سپس درصد باز دارندگی از رشد با مقایسه با شاهد محاسبه گردید. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار صورت گرفت. برای مقایسه میانگین ها از آزمون LSD در سطح یک درصد استفاده شد.

بررسی متابولیت‌های فرار تریکودرما

در این آزمایش نیز از ۱۰ جدایه تریکودرما استفاده شد. برای انجام این آزمایش ابتدا قطعه‌ای به قطر پنج میلی متر از کشت جوان تریکودرما را در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس بعد از گذشت ۲۴ ساعت از حاشیه کشت پنج روزه قارچ عامل بیماری‌زا یک قطعه ۵ میلی متری در وسط یک تشتک پتری دیگری قرار داده شد. با رعایت شرایط سترون درب تشک پتری حاوی قارچ آنتاگونیست و بیماری برداشته و تشتک پتری قارچ عامل بیماری‌زا به صورت وارونه روی تشتک پتری حاوی آنتاگونیست قرار داده شد (Ashrafizadeh *et al*., 2005). سپس فاصله بین دو تشتک پتری با نوار پارافیلم مسدود و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه به مدت هفت روز نگهداری شد. اندازه گیری پرگنه عامل بیماری زا به صورت روزانه صورت گرفت. و درصد بازدارندگی از رشد با مقایسه با شاهد محاسبه گردید. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار صورت گرفت. برای مقایسه میانگین ها از آزمون LSD در سطح یک درصد استفاده شد.

بررسی اثرات آنتاگونیستی سویه های باکتری باسیلوس در شرایط آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل

در این مرحله نمونه‌های بدست آمده از مرحله غربال گری، در روی محیط PDA به صورت چهار نقطه‌ای کشت و یک قرص پنج میلی متری از کشت پنج روزه عامل بیماری در وسط تشتک گذاشته شد. در تشتک شاهد به جای باکتری یک قطره آب مقطر سترون قرارداده شد. کشت‌های فوق به مدت ۱۰ روزدر دمای ۲۵درجه سانتی گراد نگهداری شدند. این آزمون در طرح کاملًا تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. میزان بازدارندگی نمونه‌های باکتری از رشد پرگنه‌های بیمارگر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Hagedorn *et al*., 1989).

$$\text{بازداری درصد} = \frac{\text{قطر رشد پرگنه بیمارگر در تشتک شاهد} - \text{قطر رشد پرگنه بیمارگر در هر تیمار}}{\text{قطر رشد پرگنه بیمارگر در تشتک شاهد}} * ۱۰۰$$

آزمون نشت در آگار

ابتدا سوسپانسیونی کدر از کشت جوان جدایه‌ای باکتری در آب مقطر سترون تهیه و سپس غلظت آن برابر $۱x۱۰^{۷}$ سلول باکتری در هرمیلی لیتر تنظیم شد. با استفاده از سمپلر ۲۰۰

میکرولیتر از این سوسپانسیون، روی محیط کشت PDA مایه زنی و به وسیله پپت پاستور پخش گردید و به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده گردید. بعد از این مدت پرگنه‌های باکتری از روی سطح محیط با آب مقطر سترون شسته سپس یک قطعه پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون درب تشتک گذاشته و تشتک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و پس از آن پنبه برداشته و یک قرص به قطر پنج میلی متری از حاشیه کشت جوان قارچ عامل بیماری در وسط قرار داده شد. تشتک‌ها به مدت ۱۰روز در دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند (Kraus & Loper, 1992). پس از این مدت درصد بازداری طبق فرمول بالا محاسبه شد. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت.

بررسی ترکیبات فرار ضد قارچی

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیونی به غلظت $1x10^{7}$ از کشت جوان باکتری در آب مقطر سترون روی محیط کشت آگار مغذی حاوی دو درصد گلوکز (NGA) پخش و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس از حاشیه کشت پنج روزه عامل بیماری در وسط تشتک محیط PDA قرار داده شد. در شرایط سترون، درب محیط های کشت باکتری و عامل بیماری برداشته و دو تشتتک باکتری و عامل بیماری روی هم قرار داده و با نوار پارافیلم فاصله بین دو تشتک گرفته شد. در تیمار شاهد به جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک های پتری به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه نگهداری شدند(Fiddaman & Rossall, 1993) سپس درصد باز داری از رشد محاسبه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار صورت گرفت.

بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما بر روی بیمارگر در شرایط گلخانه

از ۱۰ جدایه تریکودرما سه جدایه پس از انجام مراحل آزمایشگاهی جهت استفاده در گلخانه انتخاب گردیدند برای تهیه مایه تلقیح *Trichoderma* spp. به صورت پودر ابتدا محیط کشت PGB (Potato Glucose Broth) تهیه گردید. پس از اتوکلاو کردن این محیط کشت یک دیسک به قطر پنج میلی متر از کشت سه روزه حاوی تریکودرما در شرایط استریل به ۱۵۰میلی لیتر از این محیط کشت اضافه گردید، سپس در شرایط ۱۲ ساعت روشنائی در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۱ روز نگهداری گردید، پس‌ازگذشت این مدت اسپورزائی به اندازه مناسب صورت می گیرد (Harman, 2000). با استفاده از دستگاه فریزدرایر محیط کشت PGB حاوی تریکودرمای رشد یافته به پودر تبدیل گردید، برای بدست آوردن CFU هر تیمار یک گرم از بذر های تلقیح شده

را وزن کرده و در دمای محیط خشک شده و با۱۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط گردید. سپس در لوله‌های آزمایش ریخته و به مدت یک دقیقه در روی شیکر قرار داده شده سپس سوسپانسیونی به رقت $۱۰^{-۴}$ تهیه می‌گردد. از این سوسپانسیون یک میلی لیتر برداشته و روی محیط کشت انتخابی تریکودرما استفاده گردید (Howell, 2003). تشتک ها را در دمای ۲۵ درجه تا ظهور پرگنه‌ها قرارداده شد، پس از ظاهر شدن پرگنه‌های آنها را شمارش و CFU آن را در هر گرم از مایه تلقیح محاسبه گردید (Etebarian *et al*., 2000). از این پودر به میزان ۱/۵گرم دریک کیلوگرم با بذر بصورت بذرمال استفاده گردید. گلدانها از خاک مزرعه که دو بار به فاصله زمانی ۲۴ ساعت از هم در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شده بود پر شدند. جهت سبک تر شدن این خاک به ازای هر ۱۰ کیلو گرم خاک اتوکلاو شده یک کیلو گرم کوکوپیت و یک کیلو گرم پرلیت اضافه گردید (کوکوپیت ۲۴ ساعت قبل از استفاده در داخل آب قرار داده شد). در هر گلدان یک عدد بذر قرار داده شد و داخل دستگاه ژرمیناتور در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی بادمای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. گلدانها به مدت ۷۰ روز در این شرایط نگهداری شدند. درصد بیماری‌زائی پس از گذشت ۵۰ روز محاسبه گردید. طول ساقه از محل طوقه تا محل آخرین دمبرگ اندازه گیری شد. برای بدست آوردن وزن تر و خشک ساقه ابتدا ساقه‌ها از محل طوقه بریده شده و با استفاده از ترازو وزن گردید. سپس هر بوته را به طور جدا گانه در داخل پاکت‌های کاغذی قرار دادهو در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک و سپس وزن شد. برای بدست آوردن وزن تر ریشه ابتدا ریشه‌ها را همراه با خاک اطرف آنها از خاک بیرون آورده به وسیله جریان آب به آرامی شسته و روی حوله کاغذی قرار داده شد تا آب اضافی خود را از دست داده سپس وزن گردید. وزن خشک نیز مانند ساقه ها اندازه گیری گردید.

بررسی تاثیر جدایه‌های باکتری بر روی بیمارگر در شرایط گلخانه

از پنج سویه باکتری، دو سویه پس از مراحل آزمایشگاهی جهت استفاده در آزمایش های گلخانه انتخاب گردید. برای تهیه مایه باکتری ابتدا ۱۰۰میکرولیتر از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته نمونه، در محیط NBY (Nutrient booth Yeast Extract) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ سانتی گراد درجه نگهداری گردید (Kim *et al*., 1997). برای بدست آوردن CFU در هر تیمار یک گرم از بذر را پس از تلقیح در دمای محیط خشک شده و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط گردید. سپس به مدت یک دقیقه در روی شیکر قرار داده و سپس سوسپانسیونی به رقت $۱۰^{-۷}$ تهیه گردید. از این سوسپانسیون یک میلی لیتر برداشته و روی محیط کشت NA (Nutrient agar) پخش نموده و تشتک ها تا ظهور پرگنه‌ها در دمای ۲۵

درجه سانتی گراد قرارداده شد. سپس پرگنه‌های ظاهر شده شمارش و CFU آن در هر گرم از مایه تلقیح محاسبه شد (Lumsden *et al*., 1989; Chang, 1986).

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰ تیمار در چهار تکرار در نظر گرفته شد. در هر گلدان یک عدد بذر قرار داده شد.

نتایج

اثر گونه‌های تریکودرما روی رشد قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه

جدایه‌های مورد بررسی با توجه به رشد سریعی که داشتند مانع رشد عامل بیماری‌زا شدند. از بین جدایه های تریکودرما مورد بررسی، تنها جدایه‌های *T. viride* 2 و *T. viride* 10 روی پرگنه عامل بیماری‌زا پیشروی کردند در محل برخورد جدایه‌های تریکودرما و عامل بیماری‌زا رشد میسلیوم‌های عامل بیماری زا بسیار کم و اندک شده و به صورت یک لایه نازک مشاهده گردید همچنین در این محل میزان تولید اسپور عامل بیماری‌زا کاهش پیدا کرده بود. در کشت همزمان عامل بیماری‌زا و گونه‌های تریکودرما به غیر از گونه *T. asperell um* 5 دیگر گونه‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی داری در باز داری از رشد پرگنه عامل بیماری زا مشاهده گردید. گونه *T. harzianum* 6 با ۷۰ درصد و *T. asperellum* 5 با ۷/۸ درصد به ترتیب موجب بیشترین و کمترین درصد کاهش رشد عامل بیماری‌زا شدند. در کشت غیر همزمان با عامل بیماری‌زا ، در تمام گونه‌ها تریکودرما موجب کاهش معنی دار رشد بیمارگر در مقایسه با شاهد گردیدند. گونه *T. viride* 10 با ۵۲/۵۹ درصد باعث کاهش رشد عامل بیماری‌زا گردید (جدول ۱).

بررسی متابولیت‌های فرار در جلوگیری از رشد میسلیوم عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه

در این بررسی گونه *T. konnjgii* 4 با شاهد اختلاف معنی داری نداشت ولی سایر جدایه‌های تریکودرما با شاهد در سطح یک درصد اختلاف معنی داری داشتند و باعث کاهش رشد مسلیوم عامل بیماری‌زا شدند. گونه *T. harzianum* 6 با ۵/۳۱ درصد باعث بیشترین کاهش رشد عامل بیماری‌زا شد (جدول ۱).

اثر استرین‌های باسیلوس روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه با روش کشت متقابل

از میان ۱۵۶ استرین باکتری جدا شده از فرا ریشه خربزه، بر اساس آزمون کشت متقابل و مشاهده هاله بازدارندگی، تعداد پنج استرین نسبت به FOM خاصیت بازدارندگی نشان دادند. استرین های *Bacillus* sp.1، *Bacillus* sp.2 و *Bacillus* sp.3 به ترتیب با ۶۱/۸۷، ۶۲/۲۵ و ۶۲/۸۷ با تفاوت معنی داری بیشترین درصد کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری باعث شدند،

و در استرین‌های *Bacillus* sp.4 و *Bacillus* sp.5 به ترتیب با ۵۱/۲۵ و ۵۵/۲۵ درصد، کمترین میزان کاهش رشد پرگنه عامل بیماری مشاهده گردید (جدول۲).

اثر ترکیبات فرار تولید شده به وسیله استرین‌های باکتریایی

استرین‌های *Bacillus* sp.3، *Bacillus* sp.4 و *Bacillus* sp.5 به ترتیب با ۳۶/۸۷، ۳۷ و ۳۶/۱۲ درصد باعث کاهش رشد عامل بیماری زا گردیدند و اختلاف معنی داری با شاهد داشتند ولی در مورد دیگر استرین‌های بکار برده شده اختلاف معنی داری با شاهد مشاهده نگردید (جدول۲).

ترکیبات قابل نفوذ در آگار

متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار تمام استرین‌ها مانع از رشد عامل بیماری‌زا نسبت به شاهد شدند. در تمام موارد عامل بیماری‌زا قادر به رشد نبود و زمانی که قطعه اولیه آگار حاوی قارچ به محیط جدیدی انتقال داده شد رشدی صورت نگرفت که می توان نتیجه گرفت احتمالا این استرین‌ها خاصیت قارچ کشی دارند (جدول۲).

جدول ۱- درصد بازداری از رشد مسیلیوم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* نسبت به شاهد با آنتاگونیست ها در محیط PDA پس از ۱۶۸ ساعت.

Table 1. Percent growth reduction of *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* in by antagonistic *Trichoderma* species after seven days inoculation on PDA.

Species Trichoderma	Volatile compounds	Dual culture un simultaneous	Dual culture simultaneous
T. longibrachiatum1+	25.00de	44.82cd	59.22c
T. viride2	27.40def	48.27ed	57.28c
T. stromacium3	23.55d	43.96cd	61.16cd
T. konnjgii4	5.36ab	45.68cd	60.19cd
T. asperllum5	11.05bc	10.34b	7.76ab
T. harzianum6	31.50f	43.24cd	70.00d
T. longibrachiatum7	26.92def	43.24cd	60.19cd
T. harzianum8	26.92def	47.41cde	60.19cd
T. asperellum9	14.42c	10.34b	11.65b
T. viride10	30.76ef	52.29e	59.22c

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون LSD در سطح P< 0.01 دارای اختلاف معنی داری دارند.

اعداد میانگین چهار تکرار هستند.

+ شماره ایزوله مورد استفاده شده می باشد.

Significant differences are denoted by different letters within each column at p<0.01 according to LSD test

Data are means of 4 replicates

+The number is used to isolate

جدول ۲- نتایج بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی استرین‌های مختلف *Bacillus* spp. علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* در شرایط درون شیشه‌ای.

Table 2. Results of *in vitro* examination of different antagonistic mechanisms of *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis*.

Treatment	Metabolites were able to influence into agar	Volatile compounds	Dual culture
Bacillus. 1®	100b	8.28ab	16.10a
Bacillus. 2	100b	8.87ab	15.59a
Bacillus.3	100b	12.73b	14.75a
Bacillus.4	100b	12.42b	30.50b
Bacillus.5	100b	14.50b	28.08b

* تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون LSD در سطح P< 0.01 دارای اختلاف معنی داری دارند.

اعداد جدول میانگین ۴ تکرار می‌باشد.

® شماره ایزوله مورد استفاده شده

Significant differences are denoted by different letters within each column at p<0.01 according to LSD test.
Data are means of 4 replicates
The number is used to isolate

تاثیر گونه‌های بومی تریکودرما و استرین‌های باسیلوس در کاهش علائم بیماری در شرایط گلخانه

همان گونه که نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد بین تیمار های مختلف با استفاده از سوسپانسیون باکتری و تریکودرما در سطح احتمال ۹۹ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد. نتایج آنالیز رشد گیاه خربزه نشان می‌دهد که استرین *Bacillus* sp.62 و مخلوط هر دو گونه‌ی *T. viride* و*T. longibrachiatum* به ترتیب با ۸۴/۹۳ و ۸۴/۵۳ درصد، بیشترین تاثیر بر افزایش رشد طولی ساقه گیاه مشاهده گردید. در این آزمایش بیشترین تاثیر بر افزایش وزن قسمت‌های هوایی توسط مخلوط گونه تریکودرما *T. longibrachiatum* و باکتری *Bacillus* sp.15 دیده شد. بیشترین تاثیر بر افزایش وزن تر ریشه گونه *T. harzianum* در مقایسه با سایر تیمارها بصورت معنی‌داری بدست آمد. بیشترین تاثیر بر وزن خشک ساقه مربوط به مخلوط دو گونه تریکودرما *T. viride* و *T. harzianum*دیده شد. بیشترین تاثیر بر اقزایش وزن خشک ریشه توسط باکتری *Bacillus* sp.15 و تریکودرما *T. harzianum* در مقایسه با سایر تیمارها مشاهده گردید. اما تفاوت بین تیمارهای باکتری *Bacillus* sp.15 و گونه *T. harzianum* در افزایش وزن تر و وزن خشک ریشه خربزه تفاوت معنی داری از نظر آماری در سطح پنج درصد و جود نداشت. بین تیمارهای سموم به کاربرده شده در این آزمایش با شاهد در سطح پنج درصد از نظری آماری اختلاف معنی‌داری در بین گروهای تیماری مختلف دیده نشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین های داده های حاصل از تاثیر گونه های *Trichoderma* spp. و استرین های *Bacillus* spp. علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* در آزمون گلخانه ای پس از ۷۰ روز.

Table 3. Comparison of mean of as influenced by *Trichoderma* spp and *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* in greenhouse condition after 70 days

Treatments	Root dry weight(gr)	Shoot dry weight(gr)	Root fresh weight(gr)	Shoot fresh weight(gr)	Length(cm)
Infected control*	00b	0.32abc	00b	1.23e	62.25abc
Non Infected control+	0.04ab	0.46ab	0.455b	5.89a	62.55abc
Benomyl	0.01ab	0.23abc	0.19b	2.34bcde	50.95abc
Mancozeb	0.023ab	0.16c	0.25b	1.87cde	47.05abc
Bacillus spp.15®	0.05a	0.36abc	0.47b	3.31bcde	55.48abc
Bacillus spp.62	0.03ab	0.31abc	0.37b	3.37abcde	84.93a
T. viride	0.01ab	0.22abc	0.19b	2.38bcde	46.53abc
T. harzianum	0.05a	0.28abc	0.97a	3.11bcde	72.33abc
T. longibrachiatum	0.02ab	0.29abc	0.36b	2.81bcde	50.05abc
Bacillus spp.15, *Bacillus* spp.62	0.02ab	0.33abc	0.21b	2.64bcde	53.28abc
Bacillus spp.15, *T. viride*	0.02ab	0.22abc	0.23b	2.33bcde	56.35abc
Bacillus spp.15. *T. harzianum*	0.02ab	0.22bc	0.23b	2.07bcde	43.65bc
Bacillus spp.15, *T. longibrachiatum*	0.03ab	0.50ab	0.31b	4.70a	74.08abc
Bacillus spp.62, *T. viride10*	0.02ab	0.11c	0.09b	1.18e	39.63c
Bacillus spp.62, *T. harzianum*	0.01ab	0.38abc	0.17b	3.41abcde	80.38ab
Bacillus spp.62, *T. longibrachiatum*	0.02ab	0.37abc	0.28b	4.09abc	72.33abc
T. viride, *T. harzianum*	0.03ab	0.52a	0.26b	3.95abcd	57.13abc
T. viride, *T. longibrachiatum*	0.03ab	0.32abc	0.29b	3.54abcde	84.53a
T. harzianum. *T. longibrachiatum*	0.02ab	0.24abc	0.39b	2.43bcde	58.00abc
Bacillus spp.15, *Bacillus* spp.62, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*	0.01ab	0.28abc	0.13b	2.56bcde	67.58abc

اعداد جدول میانگین چهار تکرار است.

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون LSD در سطح $P< 0.05$ دارای اختلاف معنی داری دارند.

*خاک آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* که فاقد سایر آنتاگونیست‌ها است.

+فقط خاک سترون شده است.

® شماره ایزوله مورد استفاده شده می باشد.

Data are means of 4 replicates

Significant differences are denoted by different letters within each column at p<0.01 according to LSD test.

*Soil with *Fusarium oxusoprum* f.sp *melonis* and no antagonist

+Just sterilized soil

® The number is used to isolate

تعیین جمعیت عامل بیماری در مایه خاک

در مایه قارچ عامل بیماری‌زا CFU ۷x۱۰^۵ در هر گرم از ماده تلقیح تعیین شد. برای تعین جمعیت عامل بیماری‌زا در خاک پس از پایان دوره آزمایش مقدار یک گرم از خاک را وزن نموده و با استفاده از سری رقت‌ها مقدار مایه عامل بیماری‌زا CFU ۴x۱۰^۴در هر گرم خاک مشخص گردید.

تعیین جمعیت .Trichoderma sp در پایان دوره آزمایش

در ابتدای دوره مایه تریکودرما برای *T. harzianum*، *T viride*، *T. longibrachiatum* به ترتیب CFU۱۰^۴× ۵، ۱۰^۴×۶ و ۱۰^۴×۵ در یک گرم بذر انتخابی تعین گردید. برای تعیین جمعیت گونه‌های تریکودرما در پایان دوره از هر تیمار مقدار یک گرم وزن نموده و با استفاده از سری رقت‌ها به ترتیب CFU۱۰^۴× ۲، ۱۰^۴×۳و ۱۰^۴×۳ تعیین گردید.

بحث

مکانسیم‌های آزمایشگاهی تریکودرما

در بررسی‌های ماکروسکوپی مشاهده گردید که جدایه های قارچ تریکودرما نسبت به عامل بیماری‌زا FOM رشد بیشتری دارند و مانع از رشد عامل بیماری‌زا گردیده اند. در کشت متقابل جدایه‌های تریکودرما و عامل بیماری‌زا مشاهده گردید که گونه‌های *T.viride* 2 و *T.viride* 10 باعث پیشروی بر روی کلنی عامل بیماری‌زا شدند. ولی سایر گونه‌ها بر روی کلنی عامل بیماری‌زا رشد نکردند. گونه *T. Harzianum* 6 با ۷۰درصد بیشترین میزان بازداری از رشد عامل بیماری‌زا گردید. تمام گونه‌ها مورد بررسی باعث پیچش و تغییر شکل در مسلیوم‌های عامل بیماری‌زا گردیدند همچنین ریسه آن ها به داخل مسلیوم عامل بیماری‌زا نفوذ کرده و باعث پارازیته شدن و ممانعت از رشد و پیشروی عامل بیماری‌زا گردیده است. می‌توان نتیجه گرفت که گونه‌های به کار برده شده تولید ترکیبات خارج سلولی نموده که این ترکیبات خاصیت آنتی‌بیوتیکی داشته و از رشد و فعالیت قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خریزه جلوگیری می‌کند.

در بررسی‌های ماکروسکوپی تقابل استرین‌های باکتری با استفاده از کشت متقابل، مشاهده شد که استرین‌های باسیلوس‌های جداسازی شده از ریشه گیاه خربزه رشد FOM را محدود ساخته ولی قادر به پیشروی روی میسلیوم‌های عامل بیماری‌زا نبود. به نظر می‌رسد استرین‌های مزبور قادر به تولید ترکیبات خارج سلولی بوده که از رشد میسلیوم‌های جدایه‌های قارچی جلوگیری می‌کند. استرین‌های مورد استفاده باعث تغییرشکل، پیچش و مضمحل شدن میسلیوم عامل بیماری‌زا شدند. ترکیبات خارج سلولی تولید شده توسط استرین‌های باسیلوس خاصیت آنتی-

بیوتیکی داشته و باعث جلوگیری از رشد ریسه‌های قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گردیده است. تمام استرین‌ها با تولید متابولیت‌های خارج سلولی قابل نفوذ در آگار نسبت به شاهد روی عامل بیماری‌زا تاثیر گذاشته و باعث عدم رشد عامل بیماری‌زا شدند. تحقیقات زیادی در مورد ترکیبات خارج سلولی موجود در ترشحات مایع برون سلولی سویه های *Bacillus* sp. صورت گرفته است که مشخص شده که یکی از مهمترین ترکیبات آنها آنتی بیوتیک‌ها است. که می-توان گفت که این مواد مایع قابل نفوذ در آگار خاصیت قارچ کشی داشته و مانع از رشد قارچ پژمردگی فوزاریومی خربزه گردیده است. ترکیبات فرار تمام ایزوله‌ها اختلاف معنی داری با شاهد داشتند. نحوه بازداری از رشد پرگنه قارچ‌ها توسط ایزوله‌های *Bacillus* sp. علاوه بر تولید آنتی بیوتیک مکانیسم دیگری را تحت عنوان ترکیبات فرار ضد قارچی مطرح شده که قدرت ساختن ترکیبات فرار ضد قارچی توسط گلوکز اداره می‌شود و چنین قندهایی بیان ژنی را که دارای خواص ضد قارچی است افزایش می‌دهند (Fiddaman & Rossall, 1993).

بررسی اثرات گلخانه‌ای

نتایج آنالیز داده‌ها (جدول۳) نشان داد که کاربرد آنتاگونیست‌های باکتریای و قارچی باعث تولید متابولیت‌های خارج سلولی گردیده این متابولیت‌ها به صورت مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش رشد گیاهان شد که می‌توان نتیجه اثرات متقابل با گیاه را مطرح کرد. به این صورت که آنتاگونیست‌ها باعث جذب بهتر آب و عناصر غذائی توسط گیاه می‌شوند. همچنین اینها باعث افزایش سیستم ریشه گردیده و باعث جلوگیری از رشد و استقرار عامل بیماری‌زا روی ریشه و مانع نفوذ عامل بیماری‌زا به داخل گیاه می‌شوند، به طوری که این عوامل آنتاگونیست از مواد روی ریشه که توسط گیاه ترشح می‌شود استفاده می‌کنند که این خود مانع از مصرف مواد ترشح شده ریشه توسط عامل بیماری‌زا می‌گردد. در نتیجه گیاه زمانی که از وضعیت بهتری در جذب آب و مواد غذایی برخوردار باشد باعث افزایش عملکرد در ارگانهای تکثیری می‌شود. در تیمارهایی که از سوسپانسیون باکتری به همراه تریکودرمای تولید شده بر روی سبوس گندم استفاده شد، در تیمارهایی که از سموم شیمیایی استفاده گردید باعث کاهش بیماری گردید ولی هیچ کدام باعث افزایش رشد طولی ساقه و وزن تر خشک اندامهای هوایی و ریشه گیاه خربزه نگردیدند. با توجه به آنالیز داده‌های بدست آمده از آزمایش گلخانه استنباط می‌شود که باکتری‌ها و گونه‌های قارچ تریکودرمای به کاربرده شده یک ارتباط مستقیم با گیاه دارند.

در ایران تاثیر گونه‌های جنس *Trichoderma* روی قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه توسط (Ashrafizadeh *et al*., 2005) مورد بررسی قرار گرفت که در شرایط گلخانه جدایه *T. harzianum* T39 به میزان ۸۳/۶۵ درصد، جدایه *T. viride* به میزان ۸۱/۷۳ درصد باعث کاهش میزان پژمردگی فوزاریومی خربزه شده است. در این بررسی اثر آغشتن بذر به

آنتاگونیست تریکودرما تاثیری بیشتری در کنترل بیماری نسبت به افزودن مایه آنتاگونیست به خاک داشت. در یک بررسی توسط (Sivan & Chet, 1989) نشان داده شد که دو استرین *T. harzianum* پس از ۱۶۰ ساعت پرگنه FOM را در محیط کشت PDA کلونیزه نموده است. آن ها دیسک‌های FOM را برای ۱۶ روز توسط کنیدی‌های *T-35* و *T-203* تیمار نمودند و پس از گذشت این مدت هیف‌های عامل بیماری‌زا به ترتیب ۱۰۰ و ۷۵ درصد از بین رفتند (Sivan & Chet., 1989). در تحقیق دیگری به منظور کنترل پوسیدگی بذر گیاه سویا فعالیت آنتاگونیستی *T. viride* بر روی پوسیدگی بذر سویا با عامل *F. o.* sp. *adzuki* بررسی شد. نتایج نشان داد که باعث کاهش آلودگی در مقایسه با شاهد گردیده است.کاربرد تریکودرما در خاک باعث افزایش جوانه‌زنی بذور سویا با میزان ۱۰۰-۹۰ درصد در مقایسه با خاکی که حاوی فقط عامل بیماری‌زا بوده داشت (John *et al*., 2010). در یک بررسی اثرات آنتاگونیستی فارچهای مختلف برای کنترل عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه ارزیابی شد در بین قارچهای تریکودرما، آسپرژیلوس و پنسیلیوم، قارچ تریکودرما باعث افزایش گلدهی به میزان ۴۳ درصد در مقایسه با سایر تیمارها گردید و اختلاف معنی داری با آنها نشان داد، و همچنین باعث افزایش و بهبود وزن گیاه خریزه گردید (Krishi *et al*., 2011). در یک تحقیق توسط (Zhao *et al*., 2011) نشان داده شد که کاربرد بیوکنترل‌ها در کنترل پژمردگی فوزاریومی خربزه زمانی که دوباره در مرحله دو برگی به کار بردند بیشترین تاثیر را داشته و زمانی که با عامل بیماری‌زا به صورت مخلوط به کار برده شد کمترین اثر را داشته است. بیو کنترل‌هایی که دو بار مورد استفاده قرار گرفتند باعث افزایش ۸۰ درصدی وزن تر اندامهای هوای گیاه شده است.

منابع

Ashrafizadeh, A., Etebarian, H. R., & Zamanizadeh, H. R. 2005. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 41(1):39-57.

Banihashemi, Z. 2010. Reaction of *Cucumis melo* cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46(1): 5-7.

Bigirimana, J., De Meyer, G., Poppe, J., Elad, Y., & Hofte, M. 1997. Induction of systemic resistance on been *Trichoderma harzianum*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*, 62:1001-1007

Chang, Y. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, 70:145-148.

Etebarian, H. R., Scott, E. S., & Wicks, T. J. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology*, 106(4): 329-337.

Fiddaman, P. J., & Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2): 119-126.

Hagedorn, C., Gould, W. D., & Bardinelli, T. R. 1989. *Rhizobacteria* of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11): 2793-2797.

Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzinum* T-22. *Plant Disease*, 84(4): 377-393.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1): 43-56.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1): 4-10.

Iraqi, M.M., Rahnama. K., & Taghinasab, M. 2009. Asurvey on biocontrol of *Rhizoctoia solani Kuhn* damping-off of tomato with *Bacillus subtili*. *Journal of Plant Production*, 16 (3):186-191.

Jacobson, D. J., & Gordon, T. R. 1990. Variability of mitochondrial DNA as an indicator of relationships between populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Mycological Research*, 94(6): 734-744.

John, R. P., Tyagi, R. D., Prévost, D., Brar, S. K., Pouleur, S., & Surampalli, R. Y. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium* oxysporum f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection*, 29 (12): 1452-1459.

Kim, D. S., Weller, D. M., & Cook, R. J. 1997. Population dynamics of Bacillus sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the *rhizosphere* of wheat. *Phytopathology*, 87(5): 559-564.

Kraus, J., & Loper, J. E. 1992. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology*, 82(3): 264-271.

Krishi, V., Kendra, S., & Khadigram, J. 2011. Effect of Bio-control Agents on Muskmelon Wilt (*Fusarium oxysporum*) Ranjan Kumar Singh and R N Singh. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 2(2): 272-275.

Lumsden, R. D., & Locke, J. C. 1989. Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocladium virens* in soilless mix. *Phytopathology*, 79(3): 361-366.

Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D, F., & McCray, E, B. 2011. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Schisler, D. A., Slininger, P. J., Behle, R. W., & Jackson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 94(11): 1267-1271.

Seifert, K., 1996. *Fuskey: Fusarium Interactive Key* (No. 632.4/S459). Agriculture and Agri-Food, Canada.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6): 515-521.

Sivan, A., & Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 135(3): 675-682.

Zhang, J. X., Xue, A. G., & Tambong, J. T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease*, 93(12): 1317-1323.

Zitter, T. A., Hopkins, D. L., & Thomas, C. E. 1996. *Compendium of cucurbit diseases* (No. 635.62 C737). American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. (EUA).

Zhao, Q., Dong, C., Yang, X., Mei, X., Ran, W., Shen, Q., & Xu, Y. 2011. Biocontrol of Fusarium wilt disease for *Cucumis melo* melon using bio-organic fertilizer. *Applied Soil Ecology*, 47(1): 67-75.

Plant Protection Journal
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2017 - 9 : 87-102

Evaluation of biocontrol potential of some *Trichoderma* and *Bacillus* species against the causal agent of Fusarium wilt of melons

Zaynolabedin NUROZEI[1], Kamran RAHNAMA[1], Hojjattalah RABBANI NASAB[2*], Misam TAQI NASAB[1]
1. Department of Plant Protection, College of Crop Sciences, University of Gorgan, Iran
2. Research Center of Agricultural and Natural Resources of Golstan, Gorgan, Iran
[*](Corresponding author: h.rabbani@areeo.ac.ir)

Abstract
Three isolates of *Trichoderma* spp. and two isolates of bacillus bacterial were evaluated in biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* the laboratory and greenhouse condition. Dual culture, antimicrobial metabolites, and volatile metabolites were in invitro assay. Fungal pathogen colony area was recorded, compared with control and induced inhibition of growth was determined. The experiment displayed the antagonistic ability using dual culture simultaneous and dual culture un-simultaneous assays against fungal pathogen. Results showed that *Trichoderma harzianum* 6 whit 70% and *T. viride*10 whit 52.9 highest percentage of growth inhibition. Results of dual culture highest percentage of growth inhibition about 30.5 percent of isolates whit the *Bacillus* spp 62 percent growth inhibit the growth factor. The volatile compounds *Bacillus spp15* whit 12.37 percent of the precipitation was prevented from growing. In the treatment *Bacillus spp62* and mixed two spice tin treatments at *Trichoderma* 14g1 respectively 84.93 and 84.95 were showed most effects on length growth of stem but most effects of increased fresh weight from up ground organ of plant, was mixed treatment as spices *T. longibrachiatum* and bacteria *Bacillus* spp.15. Most effects on root fresh weight were showed by *Trichoderma harzianum*. Most effect on stem dry weight *T. viridae* with *T. harzianum.* Most effects on increased dry weight were showed by *Bacillus* spp.15 and *T. harzianum*. Results of the experiment show treatments have significantly different activity pathogen. Test average correspond were meant significant at 1% level by LSD test.

Keywords: Fusarium wilt, biocontrol, melon, *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp.