

مقاله کوتاه

بیوکنترل بیماری و القا برخی ترکیبات دفاعی در گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتود

Meloidogyne javanica توسط چند جدایه *Trichoderma**

BIOCONTROL OF DISEASE AND INDUCTION OF CERTAIN DEFENCE COMPOUNDS IN TOMATO INFECTED WITH *Meloidogyne javanica* BY SEVERAL *Trichoderma* ISOLATES

حدیث مصطفی نژاد^۱، نوازاله صاحبانی^{۱*}، مریم عبدی^۱، حمید روحانی^۲ و حسن رضا اعتباریان^{۱**}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۷)

چکیده

در این تحقیق بیست جدایه قارچ تریکودرما به عنوان عوامل بیوکنترل نماتود ریشه گرهی مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت مایع حاوی کیتین کلونیدال کشت شدند. سه جدایه ۱۲۵، ۱۲۶ و ۱۰ Bi از قارچ *Trichoderma harzianum* بیشترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را نشان دادند. بررسی شش جدایه از میان قوی‌ترین و ضعیف‌ترین جدایه‌ها از نظر میزان فعالیت کیتیناز در کنترل نماتود در گلخانه نشان داد که همبستگی مثبت بین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز و عملکرد در گلخانه وجود دارد. بررسی اثر *T. harzianum* 125 نیز نشان داد که این جدایه موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیلایز و پراکسیداز در ریشه گیاه گوجه فرنگی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، کیتیناز، فنیل آلانین آمونیلایز، پراکسیداز

*: این تحقیق بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده که در پردیس ابوریحان دانشگاه تهران انجام شده است.

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی n_sahebani@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

مقدمه

خصوصیات مورفولوژیکی و مورفومتریکی مشخص گردید (Eisenback 1985).

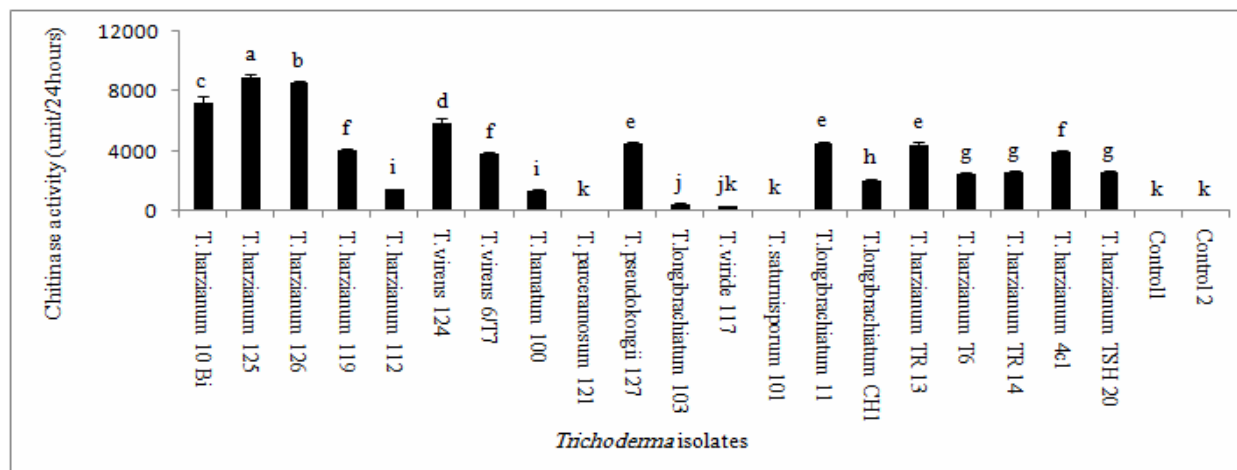
تهیه محیط حداقل القا کننده تریکودرما به تولید کیتیناز و نیز استخراج و بررسی میزان آنزیم تولید شده، طبق روش کاور و همکاران (Kaur et al. 2005) و تهیه کیتین کلوئیدال با استفاده از روش شیماهارا و تاکیگوچی (Shimahara & Takiguchi 1988) صورت گرفت. به منظور اثبات ترشح آنزیم کیتیناز توسط کشت ده روزه جدایه‌های قارچ، مخلوط واکنش طبق روش تیخونوف و همکاران (Tikhonov et al. 2002) تهیه شد. سنجش میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در طول موج ۵۸۲ نانومتر طبق روش میلر (Miller 1959) انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار و ۲۲ تیمار انجام شد.

به منظور انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای، سه جدایه با میزان فعالیت کیتیناز بالا و سه جدایه با میزان فعالیت کیتیناز پایین انتخاب شدند. تهیه اینوکولوم آنتاگونیست با استفاده از روش ماهش و همکاران (Mahesh et al. 2010) در بطری‌های درب دار انجام شد. بذور گوجه فرنگی رقم Calj-N3 در گلدان‌های حاوی خاک سترون، شامل خاک مزرعه، ماسه، کود حیوانی، پیت و پرلیت به نسبت‌های ۱:۱:۲:۱:۱ کاشته شد. در گلدان‌هایی که نیاز به تیمار شدن با قارچ بود، زادمایه قارچ به نسبت ۱۰٪ وزنی با خاک مخلوط شد. پس از ده روز هر گیاهچه در مرحله چهار برگی با حدود ۲۰۰۰ تخم نماتود مایه زنی گردید و در گلدان‌های شاهد تخم نماتود به خاک فاقد قارچ اضافه گردید. پنجاه روز بعد از مایه زنی، ریشه‌ها از خاک خارج شده و متوسط تعداد گال، تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار و هفت تیمار انجام شد.

نماتودهای ریشه گرهی (*Meloidogyne spp.*) از مهم‌ترین آفات محصولات کشاورزی هستند که هر ساله موجب ایجاد خسارت شدیدی در این محصولات می‌شوند. از جمله عوامل بیوکنترل این نماتودها می‌توان به قارچ *Trichoderma Pers.* اشاره کرد. تولید آنزیم‌هایی چون کیتیناز و پروتئاز خارج سلولی از مهم‌ترین مکانیزم‌های این قارچ در مقابله با نماتودها است. ملکی زیارتی و همکاران (۱۳۸۸) نشان دادند که قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai 1969 موجب کنترل نماتود *Meloidogyne javanica* Chitwood 1949 در گیاه گوجه فرنگی گردید. در بررسی‌های متعددی به احتمال دخالت آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) و پراکسیداز (POX) در کاهش بیماری‌ها اشاره شده است (Bera & De Meyer et al. 1999, Purkayastha 1999, Ramanathan et al. 2000). هدف از انجام این تحقیق بررسی میزان آنزیم کیتیناز تولیدی جدایه‌های تریکودرما در محیط حاوی کیتین کلوئیدال، وجود همبستگی بین میزان تولید آنزیم کیتیناز با کنترل بیماری ناشی از نماتود *M. javanica* روی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه و القا آنزیم‌های PAL و POX در ریشه گیاه در حضور برترین جدایه می‌باشد.

روش بررسی

بیست جدایه قارچ *Trichoderma* از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. نمونه آلوده به نماتود از مزارع گوجه فرنگی استان فارس تهیه و پس از تهیه توده تخم منفرد روی گوجه فرنگی رقم Rutgers تکثیر شد. پس از استخراج تخم و تهیه لارو سن دو (Hussey & Barker 1973)، گونه نماتود با استفاده از



شکل ۱. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز خارج سلولی در محیط کشت حاوی کیتین کلوئیدال. ستون‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند و خط‌های عمودی روی ستون‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است. شاهد ۱: محیط فاقد قارچ، شاهد ۲: محیط فاقد کیتین کلوئیدال.

Fig. 1. Extracellular chitinase activity in the culture medium containing colloidal chitin. Columns with different letters show significant difference according to Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). Vertical bars represent standard deviation. Control 1: Culture medium without fungi, Control; 2: Culture medium without colloidal chitin.

نتیجه و بحث

مقایسه تیمارها در محیط حاوی کیتین کلوئیدال نشان داد که جدایه ۱۲۵ *T. harzianum* از نظر میزان تولید آنزیم کیتیناز در رتبه نخست قرار دارد (شکل ۱).

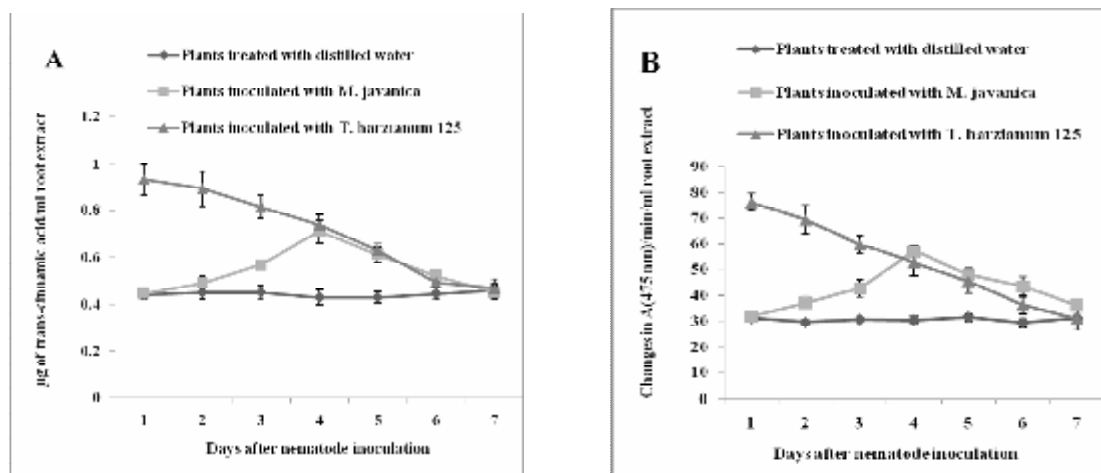
نتایج حاصل از بررسی شش جدایه قارچ در کنترل نماتود در گلخانه نشان داد که تمامی تیمارها از نظر متوسط تعداد گال، تعداد تخم‌های موجود در هر توده تخم و وزن تر قسمت‌های هوایی دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد می‌باشند (جدول ۱). مهدیخانی مقدم و روحانی (۱۳۹۱) اثر محلول بیولوژیک تریکودرمین (ماده موثره *T. harzianum* Bi) و نیز اثر *T. virens* VM1 را در کنترل بیولوژیک نماتود *Heterodera schachtii* schmidt 1871 در چغندر قند بررسی کرده و نشان دادند که پوشش بذر با *T. virens* VM1 و تریکودرمین تجاری موجب کاهش معنی‌دار جمعیت نهایی نماتود و شاخص تولید مثل می‌گردد. صاحبانی و همکاران (۱۳۸۵) نشان دادند که

به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های PAL و POX همانند آزمایش‌های گلخانه‌ای، بذور گوجه فرنگی در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شد و سه روز پس از تیمار گیاهان با جدایه ۱۲۵ *T. harzianum*، مایه زنی با نماتود انجام شد. فعالیت آنزیم‌های PAL و POX، یک روز پس از مایه زنی با نماتود تا هفت روز متوالی به ترتیب بر اساس روش تغییر یافته چن و همکاران (Chen *et al.* 2000) و رُئوونی (Reuveni 1995) انجام شده توسط مصطفی نژاد و همکاران (Mostafanezhad *et al.* 2013) انجام شد و برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد.

محاسبات آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 10.0 انجام شد و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

جدول ۱. اثر شش جدایه قارچ تریکودرما بر نماتود *Meloidogyne javanica* در گیاه گوجه فرنگیTable 1. Effect of six isolates of *Trichoderma* against *Meloidogyne javanica* in tomato plants.

وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر اندام هوایی (گرم)	تعداد تخم در هر توده تخم	تعداد توده تخم در هر گیاه	تعداد گال در هر گیاه	تیمار treatment
Fresh root weight (g)	Fresh foliage weight (g)	Number of egg per egg mass	Number of egg masses per plant	Number of galls per plant	
5.7 a	15.0 a	311.2 e	37.2 f	50.8 f	<i>T. harzianum</i> 125
4.1 c	11.9 b	312.0 e	83.3 d	106.8 d	<i>T. harzianum</i> 126
4.4 b	12.2 b	304.6 f	47.8 e	72.4 e	<i>T. harzianum</i> 10Bi
2.7 f	8.5 e	449.4 b	133.4 a	151.2 b	<i>T. viride</i> 117
3.7 d	10.8 c	418.2 c	123.4 b	142.6 b	<i>T. parceramosum</i>
3.0 e	9.5 d	405.4 d	105.0 c	123.4 c	<i>T. saturnisporum</i> 121
2.6 f	7.9 f	560.0 a	135.0 a	204.0 a	Control (inoculated with nematode)

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون دانکن ($p \leq 0.05$) فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.The treatments with the same letters in each column, have no significant difference according to Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

شکل ۲. تغییرات فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیاز (A) و پراکسیداز (B) در ریشه‌های گوجه فرنگی تیمار شده با *Meloidogyne javanica* و *Trichoderma harzianum* 125. داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفته است.

Fig. 2. Changes in phenylalanine ammonia lyase (A) and peroxidase (B) activities in the roots of tomato inoculated with *Meloidogyne javanica* and *Trichoderma harzianum* 125. The values were significant according to Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

T. harzianum در کنترل بیولوژیک نماتود ریشه گرهی موفق‌تر از سایر گونه‌ها است. هم‌چنین بین میزان کیتیناز تولیدی و توانایی قارچ در کنترل نماتود ارتباط مستقیمی وجود دارد. انجام بررسی‌های تکمیلی روی این جدایه‌ها از نظر تولید سایر متابولیت‌های موثر در کنترل بیولوژیک مانند آنزیم پروتئاز، جهت گزینش بهترین جدایه‌ها به منظور استفاده در مدیریت نماتودها و سایر پاتوژن‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (91-92) متن انگلیسی مراجعه شود.

کاربرد *T. viride* موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال و توده تخم و نیز کاهش تعداد تخم در هر توده تخم *M. javanica* در مقایسه با شاهد می‌شود.

در این تحقیق جدایه 125 *T. harzianum* موجب افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و POX در ریشه گیاهان گوجه فرنگی شد. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های PAL و POX در گیاهان مایه زنی شده با قارچ در روز چهارم نمونه برداری در بیشترین میزان قرار دارد و پس از آن به تدریج از میزان فعالیت آنزیم کاسته می‌شود (شکل ۲). پرماچاندران و داسگوپتا (Premachandran & Dasgupta 1983) گزارش کردند که آنزیم POX در پدیده مقاومت به نماتودهای *Meloidogyne spp.* موثر است. نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای تحقیق حاضر نشان می‌دهد که گونه