

مه‌ار زیستی نماتد ریشه‌گرهی، *Meloidogyne javanica* در گوجه‌فرنگی با استفاده از قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *Talaromyces flavus* در شرایط گلخانه

المیرا ابوترابی، لاله نراقی

موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: المیرا ابوترابی، پست الکترونیک: enrb@iripp.ir

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۲۵

۴(۲)۱-۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۶

چکیده

در ارزیابی اثر آنتاگونیستی *Talaromyces flavus* و *Trichoderma harzianum* در کنترل نماتد مولد گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) روی گیاه گوجه‌فرنگی که طی دو سال متوالی (۹۳-۱۳۹۲) صورت گرفت، هشت تیمار شامل تیمارهای آلوده به نماتد و فاقد نماتد همراه با قارچ‌های آنتاگونیست در پنج تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت گلدانی در شرایط گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. جدایه‌های *T. harzianum* و *T. flavus* از خاک اطراف ریشه‌ی گوجه‌فرنگی در مزرعه جداسازی و پس از تکثیر به میزان 2×10^7 اسپور به‌ازای هر گرم خاک از زادمایه قارچ‌های آنتاگونیست در گلدان‌های حاوی سه کیلوگرم خاک سترون در نظر گرفته شد. پس از انتقال نشاهای چهار برگی گوجه‌فرنگی به گلدان‌ها، اینو کولوم نماتد به تعداد پنج عدد تخم و لارو در هر گرم خاک اضافه شد. تیمارهای بدون نماتد، فقط محتوی خاک سترون مخلوط با قارچ آنتاگونیست بودند. برای تیمار شاهد غیر آلوده، گلدان‌های عاری از نماتد و قارچ‌های آنتاگونیست در نظر گرفته شد. دو ماه پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، صفات رویشی شامل، طول اندام هوایی، وزن ریشه، تعداد گره روی ریشه و همچنین صفات مربوط به جمعیت نماتد شامل تعداد گال ایجاد شده روی ریشه، تعداد توده تخم، جمعیت نهایی و فاکتور تولید مثل ارزیابی و داده‌ها به تفکیک هر سال تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که بین تیمارهای آزمایشی، کمترین تعداد تخم و جمعیت نماتد متعلق به بوته‌های تیمار شده با ترکیب دو گونه قارچ آنتاگونیست بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده در سطح احتمال ۵٪ نشان داد و به‌طور میانگین، جمعیت نماتد را تا ۸۰٪ کاهش داد. در بررسی نقش هر یک از قارچ‌ها به‌تنهایی، *T. harzianum* و *T. flavus* به‌ترتیب، باعث ۷۸ و ۶۷ درصد کاهش جمعیت نماتد شدند. تیمار *T. harzianum* نسبت به تیمار *T. flavus* تأثیر بیشتری در افزایش رشد رویشی و کاهش جمعیت نماتد داشت، با این حال اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود. در بین تیمارهای مورد بررسی، تیمار آلوده به نماتد همراه با تلفیق دو گونه قارچ بیشترین تأثیر را در افزایش صفات رویشی گیاه و همچنین کنترل جمعیت نماتد از جمله کاهش تعداد گره و فاکتور تولید مثل نشان داد.

واژه‌های کلیدی: قارچ آنتاگونیست، کنترل بیولوژیک، گوجه‌فرنگی، نماتد گره ریشه، *Talaromyces flavus*

Meloidogyne javanica, *Trichoderma harzianum*

مقدمه

گیاهان به‌ندرت ممکن است تحت تأثیر یک بیمارگر قرار گیرند. نماتدهای مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp. دامنه‌ی وسیعی از محصولات اعم از سبزیجات، گیاهان زراعی و باغی را آلوده می‌کنند و در دهه‌های اخیر روش کنترل به‌وسیله آنتاگونیست‌ها یا کنترل بیولوژیک مطرح شده که فاقد آلودگی زیست محیطی می‌باشند

اگرچه مبارزه شیمیایی هنوز یک روش معمول در کاهش جمعیت نماتدهای انگل گیاهی است، اما فشار افکار عمومی برای محدود کردن و حتی ممنوعیت مصرف نماتد کش‌ها وجود دارد. ریشه‌ی گیاهان در معرض بسیاری از میکروارگانیزم‌های خاکزی مفید قرار دارد در این شرایط،

فعالیت آنزیم پراکسیداز که در دیواره سلولی گیاه وجود دارد و باعث لیگنینی شدن سلول‌ها می‌شود، در حضور قارچ *T. harzianum* تشدید شده و به دلیل دارا بودن خاصیت کاتالیز کنندگی که در فرایند اکسیداسیون فنل‌ها نقش دارد باعث ایجاد مقاومت گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا می‌شود (Mohammadi et al., 2002; Silva et al., 2004). نتایج یک بررسی نشان داده است که آنزیم اندوکیتیناز مترشحه توسط قارچ *T. harzianum* در گیاهان ترانس‌ژنیک‌توتون آلوده به *M. hapla* باعث اختلال در ایجاد کیتین پوسته تخم شده و اثر کنترل کنندگی بالایی روی تفریح تخم داشته است (Brants et al., 2000).

در آزمایش انجام شده توسط ملکی زیارتی و همکاران (۱۳۸۸)، استفاده از قارچ *T. harzianum* با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ، موجب کاهش معنی‌داری در تعداد توده تخم *M. javanica* و تعداد تخم در هر توده شد (Maleki ziyarati et al., 2009).

در بررسی به‌عمل‌آمده توسط Ashraf & Khan (2007)، از تأثیر قارچ‌های *T. harzianum* و *T. flavus* همراه با عصاره‌های گیاهی، قارچ‌های مذکور به‌تنهایی و به‌همراه عصاره‌ی گیاهان بادام زمینی، کرچک و چریش روی گیاه بادمجان آلوده به *M. javanica* باعث کاهش تکثیر نماتد و ایجاد گره در ریشه شدند و رشد گیاه نیز افزایش یافت. گیاهی که تنها با *T. harzianum* تیمار شده بود تأثیر بیشتری در مقایسه با گیاه تیمار شده با *T. flavus* به‌تنهایی در کاهش جمعیت نماتد داشت (Ashraf & Khan, 2007).

هدف از این تحقیق بررسی اثر کنترل کنندگی قارچ‌های آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. flavus* روی نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) در گوجه‌فرنگی همچنین اثر کاربرد هم‌زمان آن‌ها روی صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی زادمایه *M. javanica*

(Jepson, 1987) و بنابر پتانسیل بالای کاربرد آن‌ها در کشاورزی و مزایای قابل توجه آن نسبت به برخی روش‌های دیگر مدیریت بیماری‌های گیاهی، مطالعات وسیعی در این زمینه صورت گرفته است.

قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* (Rifai, 1969) و *Talaromyces flavus* (Stolk & Samson, 1972) تقریباً در تمام خاک‌ها وجود دارند به‌طوری‌که این قارچ‌ها به‌صورت فعال در ریزوسفر (اطراف ریشه) اغلب گیاهان حضور دارند. البته در مورد *T. flavus*، اشغال ریزوسفر بیشتر برای گیاهانی نظیر پنبه، سیب زمینی، گوجه‌فرنگی، بادنجان و خیار گلخانه‌ای گزارش شده است (Naraghi et al., 2010; Rahman et al., 2011). قارچ *T. flavus* در ایران برای اولین بار از خاک اطراف ریشه گیاه پنبه واقع در مزرعه‌ای در ایستگاه تحقیقاتی کارکنه استان گلستان جداسازی و شناسایی شد (Naraghi et al., 2000). براساس نتایج پژوهش‌های انجام شده، هنگامی که این قارچ‌ها در تماس با ریشه قرار گیرند سطح ریشه را اشغال می‌نمایند و با ایجاد یک حفاظ فیزیکی و رقابت با قارچ‌های بیماری‌زا مانع از آلوده شدن ریشه به قارچ‌های بیماری‌زا می‌شوند. علاوه بر اشغال سطح ریشه، به قارچ‌های بیماری‌زای دیگر نیز حمله کرده و انرژی مورد نیاز خود را از این قارچ‌ها تامین می‌کنند (Amaeze et al., 2010; Schuster & Schmolli, 2010).

قارچ *T. harzianum* ساز و کارهای مختلفی، از جمله تأثیر مستقیم بر نماتد و تخم آن‌ها دارد و عامل مهمی برای بیوکنترل نماتد *M. arenaria* به‌شمار می‌آید. انجام یک کار پژوهشی مشخص نمود که رشد بوته‌های گوجه‌فرنگی که با جدایه T-203 *T. harzianum* تیمار شده و در خاک‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه کشت شده بودند، افزایش یافته و از تعداد گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد، کاسته می‌شود (Sharon et al., 2001). بررسی اثر پارازیتسم مستقیم بین قارچ *T. harzianum* و نماتد مولد سیست‌طلایی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی، قارچ در سیست و تخم داخل آن نفوذ کرده و قادر به از بین بردن لاروهای نماتد شده است (Seifullah & Thomas, 1996).

روزه جدایه مربوطه در کیسه‌های سلوفان ریخته شد. برای رشد جدایه‌ها، کیسه‌های سلوفان در انکوباتور 30°C به مدت ۱/۵ تا دو ماه قرار گرفته و پس از آن محتویات داخل هر یک از کیسه‌های سلوفان برای خشک شدن روی کاغذهای صافی گسترده شد تا به عنوان زادمایه مصرفی مورد استفاده قرار گیرند.

آزمایش گلخانه‌ای

بررسی تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست *Talaromyces flavus* و *Trichoderma harzianum* در کنترل نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) طی دو سال (۹۳-۱۳۹۲) در شرایط گلخانه با هشت تیمار صورت گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل:

۱- *Meloidogyne javanica* (شاهد آلوده)

۲- *Talaromyces flavus*

۳- *T. flavus* + *M. javanica*

۴- *Trichoderma harzianum*

۵- *T. harzianum* + *M. javanica*

۶- *T. flavus* + *T. harzianum* + *M. javanica*

۷- *T. flavus* + *T. harzianum*

۸- تیمار بدون قارچ و نماتد (شاهد غیر آلوده)

برای آماده سازی گلخانه‌های آزمایشی، پس از سترون نمودن خاک، به ازاء هر گلخانه سه کیلوگرم خاک در نظر گرفته شد. افزودن زادمایه قارچ به خاک برای هر تیمار، بر مبنای تعداد 2×10^7 اسپور در گرم خاک تعیین (Aziz et al., 1997) و به هر گلخانه به میزان ۲۵۰ گرم زادمایه اضافه شد. سپس سوسپانسیونی با غلظت یک گرم زادمایه در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه و با محاسبه‌ی تعداد اسپور در یک میلی لیتر از این سوسپانسیون، تعداد اسپورها در یک گرم زادمایه مشخص شد. بدین ترتیب که تعداد اسپور موجود در خاک گلخانه معادل $6 \times 10^{11} = 2 \times 10^7 \times 30000$ و تعداد اسپور موجود در زادمایه اضافه شده به هر گلخانه، معادل $24 \times 10^7 = 250 / (6 \times 10^{11})$ تعیین شد.

پس از مخلوط نمودن کامل خاک سترون درون هر گلخانه (حاوی ۳ کیلوگرم خاک) با میزان مورد نظر از زادمایه قارچ‌های آنتاگونیست، نشاهای گوجه‌فرنگی رقم

برای این منظور تک توده‌ی تخم نماتد مولد گره ریشه گونه‌ی *M. javanica* از سطح ریشه خیار آلوده جدا و به گلخانه حاوی خاک سترون (به نسبت ۱:۱:۲ خاک، ماسه، خاک برگ و کود حیوانی پوسیده) و نشاء گوجه‌فرنگی (رقم Rutgers) اضافه شد. پس از سه ماه نگهداری در گلخانه و مشاهده‌ی توده‌های تخم روی ریشه، خاک گلخانه حاوی ریشه‌ها در چند گلخانه دیگر تقسیم و مجدداً نشاکاری شد. این عمل چندبار تکرار شد تا جمعیت نماتد به حد مورد نیاز برسد. برای استخراج تخم و لارو از ریشه‌های آلوده، پس از خارج نمودن ریشه‌ها و شستشو با آب، ریشه‌ها خرد شده و با استفاده از محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم جداسازی شدند (Hussey & Barker, 1973). سوسپانسیون حاصل در دمای یخچال نگهداری شد.

تهیه‌ی زادمایه‌ی قارچ‌های آنتاگونیست

در این بررسی، از جدایه‌های قارچ‌های *T. harzianum* و *T. flavus* که از خاک اطراف ریشه‌ی گوجه‌فرنگی در مزارع شهرستان ورامین جدا سازی شده بود و با شماره‌های TH-To-V-1 و TF-To-V-29 در آزمایشگاه بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، نگهداری می‌شوند، استفاده شد. برای آماده سازی زادمایه‌های مورد استفاده از جدایه‌های مربوطه، مقداری سبوس برنج به مدت ۲۴ ساعت در آبی با دمای $(35^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C})$ خیسانده شد، سپس آنها را روی کاغذهای صافی بزرگ گسترانیده تا خشک شوند. در مرحله‌ی بعد ۲۰۰ گرم از سبوس برنج و ۵۰ گرم خاک پیت شسته شده در کیسه‌های سلوفان در اتوکلاو (فشار یک اتمسفر، دمای 120°C درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) سترون شد. علت انتخاب سبوس برنج، به دلیل سرشار بودن آن از ترکیبات قندی و ضرورت آن برای فعالیت قارچ‌های آنتاگونیست می‌باشد. از طرف دیگر چون زادمایه آنتاگونیست برای یک محصول گلخانه‌ای با خاک سبک به کار گرفته می‌شود، لذا برای تطبیق بستر زادمایه با بافت خاک مورد استفاده، نسبت ۱ به ۴ از بستر، خاک پیت منظور شد. برای تهیه‌ی زادمایه هر یک از جدایه‌ها، سوسپانسیونی محتوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون و چهار قطعه یک سانتی متری از محیط کشت ۱۰

نتیجه و بحث

در بررسی اثر قارچ‌های آنتاگونیست *T. flavus* و *T. harzianum* در کنترل نماتد مولد گره ریشه، داده‌ها به تفکیک هر سال مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مشاهدات حاصل از ارزیابی صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی، بیانگر اثر معنی‌دار قارچ‌های آنتاگونیست روی رشد طولی ساقه در بوته‌های تیمار شده با قارچ به‌خصوص در بوته‌هایی که با هر دو قارچ به‌طور هم‌زمان تیمار شده‌اند، بود.

مقایسه‌ی میانگین طول اندام‌های هوایی بوته‌های تیمار شده با ترکیب دو قارچ با داشتن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ در مقایسه با تیمار شاهد آلوده، رشد مطلوب‌تری را نشان داد. در مقایسه‌ی تاثیر هر یک از قارچ‌ها به تنهایی، اختلاف معنی‌داری در رشد رویشی گیاه مشاهده نشد (جدول ۱).

در بررسی میانگین وزن تر ریشه در بوته‌های سالم (بدون نماتد) تیمار شده با ترکیب دو قارچ، وزن ریشه به‌طور معنی‌داری در مقایسه با وزن ریشه‌ی شاهد غیر آلوده (بدون قارچ و نماتد)، افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ را نشان می‌دهد. حضور هر یک از قارچ‌ها به‌تنهایی نیز، افزایش وزن ریشه را نشان داد اما تفاوت

Rutgers که از قبل درون گلدان پرورش یافته و به مرحله چهار برگی رسیده بودند، به گلدان‌های آزمایشی منتقل شدند. برای آلوده‌سازی گلدان‌ها با نماتد گره ریشه، تعداد ۱۵۰۰۰ تخم و لارو به ازای هر گلدان، در اطراف ریشه هر گیاهچه اضافه شد. برای هر تیمار، تعداد پنج تکرار در نظر گرفته شد. دو ماه پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، گیاه از گلدان خارج شد و پس از اندازه‌گیری صفات رویشی (طول اندام هوایی و وزن تر ریشه)، برای بررسی متغیرهای وابسته به جمعیت نماتد، ریشه‌های خارج شده، شستشو داده شدند سپس به قطعه‌های دو سانتی‌متری بریده و به‌طور تصادفی میزان ۵ گرم از ریشه‌های آلوده جدا شد. تعداد گره‌ها و تخم در ۵ گرم ریشه توسط استریومیکروسکوپ شمارش شد و تعداد به‌دست آمده در کل وزن ریشه‌ها، تعمیم داده شد. برای جداسازی لارو و توده تخم‌های ایجاد شده در روی ریشه، طبق روش Hussey & Barker (1973) انجام شد. تخم و لارو به دست آمده، شمارش شد. در انتهای آزمایش برای استخراج نماتد از خاک، طبق روش Jenkins (1964) عمل شد. فاکتور تولید مثل (R/f) نسبت جمعیت نهایی به جمعیت اولیه (Pf/Pi) تعیین شد. تجزیه‌ی داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS صورت گرفت و گروه‌بندی میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ارزیابی شد.

جدول ۱- مقایسه‌ی میانگین‌های طول اندام‌های هوایی و وزن ریشه‌ی گوجه‌فرنگی در آزمایش اثر قارچ‌های *T. flavus* و *T. harzianum* روی نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲.

Table 1. The average comparison of *T. harzianum* and *T. flavus* treatments effect on root knot nematode and tomato plant growth factors in greenhouse conditions (2013-2014).

Treatments	Aerial length (cm)		Root weight (g)	
	2013	2014	2013	2014
<i>T. harzianum</i> + <i>M. javanica</i>	66.2 ^{abc}	53.2 ^{ab}	30.2 ^{bc}	24.4 ^{bc}
<i>T. flavus</i> + <i>M. javanica</i>	67 ^{adc}	54.2 ^{ad}	38.2 ^d	29.6 ^{abc}
<i>T. harzianum</i> + <i>T. flavus</i> + <i>M. javanica</i>	77.2 ^a	59 ^{ad}	23.4 ^c	16.6 ^c
Infected control to <i>M. javanica</i>	58.4 ^c	46.2 ^c	51.2 ^a	42.4 ^a
<i>T. harzianum</i>	70.6 ^{ad}	64 ^a	36.8 ^{bc}	31 ^{abc}
<i>T. flavus</i>	68.2 ^{abc}	61.4 ^a	31.8 ^{bc}	23.2 ^{bc}
<i>T. harzianum</i> + <i>T. flavus</i>	73.8 ^a	64.8 ^a	38.8 ^{ad}	23.6 ^{ad}
Uninfected control	59.6 ^{bc}	55.4 ^{ab}	25 ^{bc}	18 ^c

$Pi= 15000 j/3$ kg soil. Treatments marked by the same letter are not significantly different ($\alpha=0.05$).

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

در بررسی صفات وابسته به جمعیت نماتد در تیمارهای آزمایشی (جدول ۲)، نتایج نشان داد که توده تخم و جمعیت نهایی حاصل از بوته‌های شاهد آلوده با داشتن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ نسبت به سایر تیمارها از جمعیت بالایی برخوردار بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها طی دو سال بررسی نشان داد که در بوته‌های آلوده‌ی تیمار شده با ترکیب دو قارچ، این تعداد از کمترین میزان برخوردار است و به‌طور معنی‌داری با تیمار شاهد، اختلاف نشان می‌دهد (سال اول: $P=0.356$; $F(3,16)=1.16$ ؛ سال دوم: $F(3,16)=18.2$; $P=0.0001$).

در ارزیابی فاکتور تولید مثل، بالاترین میزان مربوط به بوته‌های شاهد آلوده با داشتن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ نسبت به سایر تیمارها و کمترین تعداد مربوط به بوته‌های تیمار شده با ترکیب هر دو قارچ بود (سال اول: $F(3,16)=1.94$ ؛ سال دوم: $F(3,16)=1.17$; $P=0.351$; $P=0.164$). این مقایسه بین سایر تیمارها، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۲).

معنی‌داری با شاهد نداشتند. در حالی که در بوته‌های آلوده به نماتد، ارزیابی وزن ریشه نشان داد که تیمار شاهد آلوده (بدون قارچ آنتاگونیست) به‌دلیل حضور گره‌های فراوان در سطح ریشه در مقایسه‌ی بوته‌های آلوده تیمار شده با قارچ، با داشتن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ از وزن بالایی برخوردار بود (جدول ۱).

در ارزیابی تعداد گره روی سطح ریشه، تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بوته‌های آلوده تیمار شده با ترکیب دو قارچ، از کمترین تعداد گره برخوردارند و اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۵٪ نسبت به تیمار شاهد آلوده با داشتن بیشترین تعداد گره در سطح ریشه نشان می‌دهد (سال اول: $F(3,16)=13.7$; $P=0.0001$ ؛ سال دوم: $F(3,16)=7.6$; $P=0.002$). این مقایسه بین تیمار شاهد آلوده با بوته‌های آلوده تیمار شده با هر یک از قارچ‌ها نیز، اختلاف معنی‌داری را نشان داد. بین بوته‌های تیمار شده با ترکیب دو قارچ که تعداد گره‌های کمتری در مقایسه با بوته‌های تیمار شده با قارچ *T. flavus* دارند، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. از تاثیر هر یک از قارچ‌ها به تنهایی، اختلاف معنی‌داری در تعداد گره بین آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین‌های صفات وابسته به جمعیت نماتد *M. javanica* در تیمارهای آزمایشی بررسی اثر قارچ‌های *T. harzianum* و *T. flavus* در شرایط گلخانه طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲.

Table 2. The average comparison of *T. harzianum* and *T. flavus* treatments effect on root knot nematode population dependent factors in greenhouse conditions (2013-2014).

Treatments	2013				2014			
	Gall/ Total root	Egg/ Total root	Pf	Rf	Gall/ Total root	Egg/ Total root	Pf	Rf
<i>T. harzianum</i> + <i>M. javanica</i>	18.3 ^{bc}	8823 ^a	8823 ^a	0.4 ^a	14.6 ^{bc}	4552 ^c	4960 ^a	0.2 ^a
<i>T. flavus</i> + <i>M. javanica</i>	28.3 ^b	12410 ^a	12410 ^a	0.6 ^a	17.7 ^b	9827 ^b	10480 ^a	0.5 ^a
<i>T. harzianum</i> + <i>T. flavus</i> + <i>M. javanica</i>	12.1 ^c	6646 ^{ac}	6646 ^{ac}	0.3 ^a	9.9 ^c	7564 ^{bc}	7840 ^a	0.3 ^a
Infected control to <i>M. javanica</i>	47.1 ^a	27265 ^b	27265 ^b	1.4 ^b	25.4 ^a	19426 ^a	54240 ^b	2.7 ^b

Pi: Initial population = 15000 j₂/3 kg soil

Pf: Final population

Rf: Reproduction factor

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

Treatments marked by the same letter are not significantly different ($\alpha=0.05$).

قارچ‌های آنتاگونیست به نسبت‌های متفاوت باعث کنترل جمعیت نماتد مولد گره ریشه شده‌اند. (2008) Sahebani & Hadavi در بررسی اثر قارچ *T. harzianum* در کنترل *M. javanica* اظهار نمودند که در حضور قارچ، تحریک ترشح آنزیم پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل آلانین در گیاه آلوده افزایش یافته و سبب القاء مکانیسم دفاعی در گیاه می‌شوند، در نتیجه از نفوذ نماتد به داخل گیاه ممانعت به عمل خواهد آمد. براساس گزارش Sharon *et al.* (2001) وجود کیتین در پوسته تخم نماتد، سوسترای آنزیم کیتیناز می‌باشد که توسط قارچ *T. harzianum* ترشح می‌شود، به طوری که تحقیقات نشان داده است، این قارچ قادر به نفوذ به داخل سیست و پارازیت نمودن تخم و لاروهای نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) می‌باشد (Seifullah & Brants, 1996). در بررسی که توسط (2000) صورت گرفت، اثر ترشحات آنزیم اندوکیتیناز از قارچ *T. harzianum* سبب اختلال در ایجاد کیتین پوسته تخم و در نتیجه کنترل تفریح آن در گونه‌ی *M. hapla* شد. (2008) Khattak *et al.* از تأثیر غلظت‌های مختلف جدایه‌های قارچ *T. harzianum* جمع‌آوری شده از مناطق روستایی کشور پاکستان، دریافتند که میزان تفریح تخم *M. javanica* در بیشترین غلظت قارچ ۱۰/۶۶٪ و در کمترین غلظت ۸۰/۳۶٪ است. در بررسی حاضر با استناد به منابع و طبق مشاهدات به عمل آمده، جمعیت نماتد کاهش یافته که احتمالاً می‌توان به اثر مهارکنندگی آنزیم‌های دفاعی گیاه در حضور قارچ *T. harzianum* نسبت داد.

بالا بودن جمعیت نماتد در تیمار شاهد، باعث افزایش نسبت جمعیت نهایی به جمعیت اولیه و در نتیجه افزایش فاکتور تولید مثل شده است که دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر تیمارها می‌باشد. بوته‌های تیمار شده با ترکیب دو قارچ، با داشتن حداقل جمعیت نماتد، از کمترین تعداد فاکتور تولید مثل برخوردارند که این بیانگر تعامل دو قارچ آنتاگونیست در کنترل جمعیت نماتد مولد گره ریشه است.

نتایج حاصل از این بررسی، بیان‌گر نقش مؤثر و معنی‌دار قارچ‌های آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. flavus* در افزایش رشد رویشی گیاه و کنترل جمعیت نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) در گیاه گوجه‌فرنگی است. در این تحقیق، ملاحظه می‌شود که ریشه‌ی بوته‌های سالم (بدون نماتد) تیمار شده با قارچ، نسبت به تیمار شاهد، از وزن بیشتری برخوردار بوده و این افزایش وزن ریشه به دلیل تأثیر معنی‌دار قارچ‌های آنتاگونیست روی رشد رویشی گیاه است. از طرفی، مقایسه‌ی تیمارهای آلوده به نماتد همراه با قارچ، نشان می‌دهد که گیاه شاهد به دلیل حضور بیشترین تعداد گره روی سطح ریشه دارای وزن بیشتری در مقایسه با گیاه آلوده همراه با قارچ‌های مورد بررسی است و ملاحظه می‌گردد، زمانی که هر دو قارچ به طور هم‌زمان با هم روی گیاه اثر داده می‌شوند، تعداد گره در سطح ریشه به طور معنی‌داری، نسبت به شاهد، کاهش می‌یابد. نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از آزمایش‌های Ashraf & Khan (2005) مبنی بر اثر مثبت دو گونه قارچ *T. harzianum* و *T. flavus* روی رشد رویشی گیاه بادمجان آلوده به *M. javanica* مطابقت دارد. همچنین، نتایج ارائه شده از مطالعات (2001) Zareen *et al.* که اشاره به نقش حضور قارچ *T. harzianum*، *T. flavus* و *Paecilomyces lilacinus* در کاهش تعداد گره روی ریشه‌ی گیاه بامیه آلوده به *M. javanica* و افزایش رشد رویشی گیاه دارد، موید نتایج برگرفته از بررسی حاضر است که نشان می‌دهد دو قارچ آنتاگونیست مورد بررسی به خصوص زمانی که به صورت ترکیب با هم به کار برده می‌شوند، نقش بسیار مطلوبی در کاهش تعداد گره روی ریشه و افزایش رشد رویشی گیاه دارند.

بین تیمارهای آزمایشی، کمترین تعداد تخم و جمعیت نماتد متعلق به بوته‌های گوجه‌فرنگی تیمار شده با ترکیب دو قارچ است که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان می‌دهد و به طور میانگین، جمعیت نماتد را تا ۸۰٪ تقلیل داده است. قارچ *T. harzianum* و *T. flavus* به ترتیب، باعث کاهش ۷۸٪ و ۶۷٪ جمعیت نماتد شده است. به این معنا که

را در کنترل جمعیت نماتد داشته است که با نتایج برگرفته از بررسی حاضر مطابقت دارد.

بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از این بررسی و با استناد به گزارش‌های ارائه شده توسط سایر محققین، می‌توان اظهار نمود، هر دو قارچ *T. flavus* و *T. harzianum* نقش موثری در افزایش رشد رویشی گیاه داشته و با حضور آنها، جمعیت نماتد به خوبی قابل کنترل است با تاکید بر این نکته که قارچ *T. harzianum* نسبت به قارچ *T. flavus* از اثر مطلوب‌تری در کنترل جمعیت نماتد برخوردار است. ترشحات آنزیمی حاصل از قارچ‌های آنتاگونیست باعث ایجاد اختلال در ساخت کیتین دیواره تخم نماتد شده و مانع تفریح تخم می‌شود. زمانی که تلفیق دو قارچ مورد استفاده قرار گیرد، ضمن اعمال اثرات کنترل کنندگی قارچ‌ها روی عامل بیمارگر، مقاومت گیاه در برابر نماتد افزایش یافته و موثرتر از زمانی است که قارچ‌ها به تنهایی روی گیاه اثر داده شوند.

براساس گزارش نراقی و همکاران (۲۰۱۰) در ارتباط با اثر قارچ *T. flavus* در افزایش صفات رویشی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی آلوده به پژمردگی ورتیسلیومی، و گزارش ملکی زیارتی و همکاران (۱۳۸۸) مبنی بر اثر بسیار معنی‌دار قارچ *T. harzianum* در کنترل نماتد *M. javanica*، در این بررسی، با توجه به این که قارچ‌های مذکور نقش مؤثری در تقویت صفات رویشی گیاه و همچنین کاهش جمعیت نماتد داشته اند، ملاحظه می‌گردد که قارچ *T. harzianum* نقش موثرتری در مقایسه با قارچ *T. flavus* روی صفات مورد بررسی داشته است و زمانی که این دو قارچ به صورت ترکیب، در تعامل با هم قرار می‌گیرند، مقاومت گیاه را در برابر نماتد افزایش داده و نقش بیشتری نسبت به اثر آنها به تنهایی روی گیاه دارد. لذا طبق نتایج برگرفته از آزمایش‌های (Ashraf & Khan 2007) از تأثیر دو قارچ مذکور به همراه عصاره‌های گیاهی در کنترل جمعیت *M. javanica* روی بادمجان، در بین تیمارهای آزمایشی، ترکیب دو قارچ *T. harzianum* و *T. flavus* بیشترین تأثیر

References

- Amazez, N.J., Ugwuanyi, J. & Nobeta, J.A. 2010. Studies of heat resistant fungi in the soil: *Talaromyces flavus* isolated in Nigerian soils. *New York Science Journal*, 3(12): 8-14.
- Ashraf. M S, & Khan, T.A. 2005. Effect of fungal filtrates of some opportunistic fungi on hatching and mortality of root knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Indian Journal of Nematology*. 35(2): 141.
- Ashraf. M.S. & Khan, T.A. 2007. Efficacy of *Gliocladium virens* and *Talaromyces flavus* with and without organic amendments against *Meloidogyne javanica* infecting eggplant. *Asian Journal of Plant Pathology*, 1 (1): 18-21.
- Aziz, N.H., EL-Fouly, M.Z., EL- Essawy, A.A., & Khalaf, M.A. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. *Botany Bulletin Academic Science*, 38: 33-39.
- Brants, A., Brown, C.R. & Earir, E.D. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase does not provide resistance to *Meloidogyne hapla* in transgenic tobacco. *Journal of Nematology*, 32(3): 289-296.
- Hussey R.S. & Barker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Report*, 48(9): 692.
- Khattak, B., Stephen, S & Stephen, M. 2008. Effect of some indigenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) Chitwood. *Sarhad Journal Agriculture*, 24(2): 285-288.

- Maleki ziyarati, H., Roostaie, A., Sahebani, N., Etebariyan, H. & Aminian, H. 2009. Study of biological control of root knot nematode *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood, in tomato by *Trichoderma harzianum* Rifai in greenhouse and quantitative changes of phenolic compounds in plant. Seed and Plant Production Journal, Vol 25, (2): 259-272.
- Mohammadi, M & Kazemi, H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science, 162: 491-498.
- Naraghi, L, Heydari, A, Karimi Roozbehani, A & Ershad, J. 2000. Isolation of *Talaromyces flavus* from cotton fields in Gorgan area and investigation of its antagonistic effects against *Verticillium dahlia* causal agent of cotton wilt. Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection Congress, 275p.
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S., Razavi, M., & Afshari-Azad, H. 2010. Biological control of greenhouse cucumber *Verticillium* wilt disease by *Talaromyces flavus*. Phytopathologia Mediterranea, 49(3): 321-329.
- Rahman, A., Begum, M.F., Rahman, M., Bari, M.A., Ilias, G.N.M., & Alam, M.F. 2011. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. Turkish Journal of Biology, 35: 183-194.
- Sahebani, N. & Hadavi, N. 2008. Biological control of the root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by *Trichoderma harzianum*. Soil biology and biochemistry, 40(8): 2016-2020.
- Schuster, A. & Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(3):787-799.
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Keleifeld, O. & Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 91: 687-693.
- Seifullah, B. & Tomas, J. 1996. Studies on the parasitism of *Globodera rostochiensis* by *Trichoderma harzianum* using low temperature scanning electron microscopy. Afro-Asian Journal of Nematology, 6: 117-122.
- Silva, H.S.A., Romeiro, R.S., Macagnan, D., Ahalfeld vieria, B., Rereira, M.C.B. & Mountreer, A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non- specific protection and increase in enzymes activity. Biological Control, 29: 288-295.
- Zareen, A., Jamil khan, N. & Zaki, M.J. 2001. Biological control of *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood, root knot nematodes of okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4(8): 990-994.

Biological control of tomato root knot nematode, *Meloidogyne javanica* by *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* in the greenhouse conditions

Elmira Abootorabi, Laleh Naraghi

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization , AREEO, Tehran, Iran

Corresponding author: Elmira Abootorabi, email: ernb@iripp.ir

Received: Jan., 06, 2016

4 (2) 1-10

Accepted: Nov., 15, 2016

Abstract

To study the antagonistic effects of two antagonistic fungi, *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* in the control of root knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato, experiments were carried out in two years (2013-2014). The experiments were conducted and executed with eight treatments and five replications using pots with a completely randomized design under greenhouse conditions. To prepare treatments, 2×10^7 spores of *T. flavus* and *T. harzianum* (originally isolated from tomato roots) per gram soil, were added to the pots containing 3 kg pasteurized soil. After transplanting four leaves seedlings of tomato, pots were inoculated with 15000 eggs and juveniles of the nematode per pot. The uninfected control pots contained only pasteurized soil without root knot nematode and antagonistic fungi. Two months after inoculation of the nematode, the growth parameters of the plants including foliar height, root weight, and some nematode-related parameters including the number of galls and egg mass, final population and reproduction factor were measured. In the combined statistical analysis, the differences were observed in data and analysis was performed separately for two years. The results showed that the antagonistic fungi were effective in increasing the plant growth and there was significant nematode population decrease up to 80% in comparison with the infected control ($P = 0.05$). According to the results, *T. harzianum* was more effective than *T. flavus* in increasing plant growth and decreasing the population of the nematode (78 and 67%, respectively), but differences were not significant. Furthermore, the combination of two fungi was more effective than other treatments in increasing plant growth characteristics and controlling the root knot nematode such as reduction of the galls and reproduction factor.

Keywords: antagonistic fungi, biological control, *Meloidogyne javanica*, root knot nematode, *Talaromyces flavus*, tomato, *Trichoderma harzianum*