تأثیر بسترهای غذایی جامد بر میزان اسپورزایی و تولید کیتیناز *Trichoderma harzianum* Tr6 و کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی

نیلوفر محمدی فشارکی، کیوان بهبودی، رامین حیدری

گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

مسئول مکاتبات: کیوان بهبودی، پست الکترونیک: behbodi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰ ۶(۱) ۱۹-۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۶

چکیده

گونه‌های جنس *Trichoderma* از جمله عواملی به‌شمار می‌روند که می‌توانند با پارازیته کردن تخم و لارو نماتدهای انگل گیاهی، *Meloidogyne* spp. و همچنین القاء مقاومت گیاه در مقابل نماتد، منجر به کاهش خسارت آن‌ها شوند. در این تحقیق تأثیر بسترهای غذایی جامد (دانه ارزن، دانه گندم و سبوس گندم) بر توان اسپورزایی *Trichoderma harzianum* Tr6، میزان تولید آنزیم کیتیناز و توانایی کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* توسط آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد بسترهای غذایی اثر متفاوتی بر اسپوردهی و کنترل نماتد داشتند. سبوس گندم بهترین بستر غذایی بوده که باعث تولید اسپور به میزان $۱/۵\times۱۰^{۱۱}$ در هرگرم محیط کشت، ۸۷/۶۶ درصد مرگ لارو سن دوم نماتد و کاهش تفریخ تخم به میزان ۱۳/۶۶درصد در شرایط آزمایشگاه شد. سنجش آنزیمی کیتیناز نشان داد که *Trichoderma* کشت شده در سبوس گندم باعث تولید یک U/min در هر میلی لیتر میزان آنزیم شد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که قارچی که روی سبوس گندم کشت شده نسبت به سایر بسترهای جامد کارایی بیشتری در کنترل نماتد درشرایط گلخانه داشته و شاخص گال در این تیمار ۰/۶ بود.

واژه‌های کلیدی: دانه ارزن، دانه گندم، سبوس گندم، *Meloidogyne javanica*، سنجش آنزیمی

مقدمه

نماتدهای ریشه گرهی *Meloidogyne* spp. یکی از انگل‌های مهم ریشه می‌باشند که به عنوان انگل اجباری بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی مطرح بوده و اغلب ارتباط پیچیده و اختصاصی با میزبان خود برقرار می‌کنند (Hussey & Janssen, 2002). دامنه وسیع میزبانی، تعداد فراوان گونه، انتشار گسترده، توانایی زیاد بیماری‌زایی و برهمکنش با دیگر عوامل بیماری‌زای گیاهی، آن‌ها را به عنوان انگل‌های مهم گیاهی در زنجیره غذایی قرار می‌دهد (Hugall *et al*., 1999).

در چند دهه اخیر، استفاده از ترکیبات شیمیایی نماتدکش مهم‌ترین روش کاهش خسارت نماتدهای انگل گیاهی محسوب می‌شد ولی در حال حاضر کاربرد بسیاری از این ترکیبات به‌دلیل اثرات مخربی که بر محیط زیست و سلامت انسان داشتند، محدود شده‌است (Oka & Yermiahu, 2002). یکی از روش‌های جایگزین آن کنترل بیولوژیک است که شامل استفاده از عوامل زنده در کاهش جمعیت نماتدها می‌باشد. در بین عوامل مختلفی که قادر به کاهش جمعیت نماتدهای گیاهی می‌شوند، قارچ‌ها اهمیت بیش‌تری داشته و بعضی از آن‌ها پتانسیل بالایی در کنترل بیولوژیک نماتدها داشته‌اند (Sikora *et al*., 2003).

گونه‌های قارچی متعلق به جنس *Trichoderma* از جمله عواملی به شمار می‌روند که بالقوه به عنوان مناسب‌ترین عوامل کنترل بیولوژیک مطرح می‌باشند (El-Katatny *et al*., 2000)؛ این عوامل، می‌توانند با پارازیته کردن تخم، لارو و ماده‌ی بالغ نماتدهای *Meloidogyne* spp. جمعیت آن‌ها را کاهش دهند. این قارچ‌ها همچنین قادر به القای مقاومت در گیاهان در مقابل

Archive of SID

www.SID.ir

نماتدها و کاهش خسارت می‌باشند (Van Loon & Vanstrien, 1998).

بررسی تأثیر جدایه‌ی *T. harzianum* BI بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد *Meloidogyne javanica* نشان داد که میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز قارچ با میزان کاهش تفریخ تخم‌های نماتد ارتباط مستقیم دارد (Sahebani & Hadavi, 2008). با توجه به ترکیب پوستهٔ تخم نماتد که بخش زیادی از آن را کیتین تشکیل می‌دهد، بالا بودن میزان فعالیت آنزیمی کیتیناز افزایش میزان تخریب و پارازیته شدن تخم‌ها توسط جدایه‌های مختلف قارچ را در پی دارد (Bonants *et al.*, 1995). جدایه *T. harzianum* Tr6 با تولید آنزیم کیتیناز باعث کنترل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucmerinum* در گیاه خیار شد (Alizadeh, 2013).

توجه به محیط رشد و منبع غذایی *Trichoderma* برای بهبود کارایی بیوکنترل آن و تولید زیست تودهٔ آنتاگونیست با کیفیت و کمیت مطلوب ضروری به نظر می‌رسد. به طورکلی، فرمنتاسیون جامد و فرمنتاسیون مایع دو روش عمده تولید اینوکلوم جدایه‌های *Trichoderma* هستند. در فرمنتاسیون جامد، قارچ روی انواع دانه‌های غلات، حبوبات و پسماندهای جامد کشاورزی رشد می‌کند. محصول نهایی این سیستم بیشتر به‌صورت مستقیم در گلخانه یا مزرعه برای کاهش و جلوگیری از رشد اینوکلوم بیمارگرهای خاکزاد به‌کار می‌رود. (Ramanujam *et al.*, 2010). در پژوهشی که توسط دلخواه و بهبودی (۲۰۱۳) انجام گرفت نشان داده شد که نوع محیط کشت بر کارایی کنترل مرگ گیاهچه ناشی از *Phytophthora drechsleri* توسط *T. harzianum* Tr6 و رشد خیار اثر مثبت دارد.

هدف از این تحقیق بررسی اثر جدایه *Trichoderma harzianum* Tr6 بر کنترل نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و یافتن بستر غذایی جامد مناسب بودکه باعث حداکثر میزان تولید اسپور، تولید آنزیم کیتیناز و همچنین حداکثر کارایی در کنترل نماتد ریشه گرهی *M. javanica* می‌شود.

مواد و روش ها

شناسایی و تکثیر نماتد

جمعیت نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* از یک مزرعه آلوده در کاشان به دست آمد. با استفاده از مشخصات ظاهری الگوی انتهای بدن ماده و مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی لاروهای سن دوم (Sasser & Carter, 1985) شناسایی گونه نماتد انجام شد. پس از تهیه نمونه گیاهی آلوده به نماتد، با استفاده از روش توده تخم منفرد (single egg mass) و تکثیر متوالی آن روی گیاهچه های رقم حساس ارلی اوربانا جمعیت مورد نیاز آزمایش‌ها کسب شد . گیاهچه‌ها به مدت ۴۵ الی ۶۰ روز در دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰-۶۵ درصد گلخانه نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌ها، استخراج تخم و لارو سن دوم با استفاده از روش هوسی و بارکر انجام گرفت (Hussey & Barker, 1973).

تهیه و تکثیر ***Trichoderma harzianum*Tr6**

جدایه قارچ *T. harzianum* Tr6 از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران اخذ شد (Alizadeh *et al.*, 2013). پس از تک اسپور نمودن روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳-۶ روز تکثیر شد (Fradkin *et al.*, 1987).

اثر جدایه قارچ ***Trichoderma harzianum* Tr6 روی مرگ و میر لارو سن دوم و تفریخ تخم نماتد *Meloidogyne javanica***

برای جدا سازی تخم، ریشه آلوده به نماتد به قطعات دو الی سه سانتی متری خرد شده و سپس در ۲۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد قرار داده شده و به مدت یک الی دو دقیقه به شدت تکان داده شد. پس از آن روی الک ۵۰۰ مش ریخته شد و با آب مقطر سترون شستشو داده شد (Hussey & Barker, 1973). جدا سازی لارو سن دوم، به‌روش بارکر (Barker, 1985) انجام شد. لاروها روزانه پس از تفریخ تخم به‌وسیله الک ۵۰۰ مش جدا سازی شد. برای انجام آزمایش به چاهک‌های ظروف کشت بافت ۲۴ خانه‌ای، پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد لارو

Archive of SID

www.SID.ir

نماتد اضافه شده و سپس پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* Tr6 به غلظت $۴/۵\times۱۰^{۶}$ (spore/ml) اضافه شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای نمونه شاهد پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. آزمایش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. مرگ و میر لارو سن دوم پس از ۷۲ ساعت شمارش شد. بررسی اثر جدایه قارچ بر میزان تفریخ تخم نماتد با سه تکرار برای هر تیمار پس از ۷۲ ساعت به روش مایر و همکاران (Mayer *et al.*, 2004) انجام شد.

تهیه بستر جامد و مایه‌زنی جدایه‌ی *Trichoderma harzianum* Tr6

فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ گرم از سه بستر کشت جامد سبوس گندم یا دانه‌ی گندم و یا بذر ارزن آماده شد و به هر یک ۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. فلاسک های ارلن مایر حاوی محیط کشت در دو روز متوالی به فاصله ۲۴ ساعت و به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شدند. برای مایه زنی بسترها از محیط کشت حاوی قارچ *T. harzianum* با سوسپانسیون اسپور $۴/۵\times۱۰^{۷}$ (spore/ml) تهیه شد و به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به هر یک از فلاسک های ارلن مایر حاوی محیط کشت اضافه شد. سپس فلاسک های ارلن مایر به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۲ ساعت روشنایی قرارگرفت (Zhang *et al.*, 2014).

تعیین جمعیت اسپور تولیدی جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 در بسترهای جامد

یک گرم از هر بستر را داخل لوله فالکون سترون ریخته و سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به لوله فالکون اضافه کرده و به‌مدت سه دقیقه روی ورتکس با دور بالا قرار داده شد. سپس سوسپانسیون اسپورهای حاوی محیط کشت از پارچه ململ عبور داده شد. اسپورهای هر بستر به وسیله لام هماسیتومتر با سه بار تکرار شمارش شد (Sargin, *et al.*, 2013).

اثر بسترهای کشت مختلف روی مرگ و میر لارو سن دوم و تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*

در فلاسک های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری مانند روش‌های قبل به‌میزان پنج گرم بسترهای کشت جامد مختلف تهیه شد. پس از تکثیر *T. harzianum* Tr6، ۱۰ برابر وزن محیط‌ها (۵۰ میلی لیتر)، به هر محیط آب مقطرسترون اضافه شده سپس فلاسک‌ها با دور ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه تکان داده و پس از آن محلول حاوی سوسپانسیون اسپور حاوی محیط کشت از پارچه ململ عبور داده شد تا تنها سوسپانسیون اسپور باقی بماند. به منظور بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف بر میزان مرگ ومیر لارو سن دوم و تفریخ تخم نماتد، از روش مایر و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد و درصد مرگ و میر لارو سن دوم و در صد تفریخ تخم نماتد پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت محاسبه شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

اثر بسترهای کشت مختلف بر میزان تولید کیتیناز

همانند روش‌های قبل به میزان هفت گرم بسترهای کشت جامد مختلف در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد (Zhang *et al.*, 2014). سنجش آنزیم کیتیناز براساس روش میلر (۱۹۵۹) انجام شد. در این آزمایش از تخم نماتد به عنوان منبع کیتین استفاده شد. برای انجام آزمایش به چاهک‌های ظروف کشت بافت ۲۴ خانه‌ای، پنج میلی لیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ تخم نماتد اضافه شد. برای هر تیمار شش تکرار در نظر گرفته شد. به هر خانه پلیت پنج میلی لیتر سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست به غلظت $۴/۵\times۱۰^{۶}$ (spore/ml) اضافه شد. آزمایش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. پس از ۲۴ ساعت محتویات ظروف از کاغذ صافی و سپس فیلتر ۰/۲۲ میلی متر عبور داده، سپس جذب نوری محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش از N-acetylglucosamine به‌عنوان استاندارد استفاده شد. هر فعالیت آنزیمی عبارت است از مقدار آنزیمی که می‌تواند در طول یک دقیقه، یک میکرومول از N-acetylglucosamine را آزاد کند. میزان تولید آنزیم طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی میزان توانایی جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* در گلخانه

برای بررسی میزان تأثیر جدایه قارچ *T. harzianum* Tr6 در کنترل نماتد از روش صدیقی و همکاران (Siddiqui *et al.*, 2001) استفاده شد. ابتدا ۱۰ گرم بسترهای غذایی همراه با اسپور آنتاگونیست به‌غلظت $۴/۵\times۱۰^{۶}$ (spore/g) با خاک لومی-شنی سترون مخلوط شده و به گلدان‌هایی به حجم یک کیلوگرم اضافه شد. سپس یک عدد نشاء گوجه‌فرنگی در مرحله‌ی چهار برگی به هر گلدان منتقل شد. پس از گذشت یک هفته از تاریخ مایه‌زنی بوته‌ها، در اطراف طوقه‌ی هر بوته سه سوراخ به عمق پنج سانتی‌متر ایجاد و به هر گلدان ۲۰۰۰ عدد لارو سن دوم اضافه شد. تیمارها در دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰-۶۵ درصد نگه داشته شدند. ۴۵ روز بعد از مایه زنی نماتد، تمام بوته‌های گوجه‌فرنگی از ریشه بطور کامل درآمدند. ریشه‌ها توسط جریان آب با دقت شسته شد، شاخه‌ها از ریشه‌ها جدا شد، وزن‌تر ریشه و بوته و طول آن‌ها اندازه‌گیری شد. قبل از خشک کردن ریشه‌ها تعداد گال‌های تولید شده بر روی تمام سیستم ریشه‌ای شمارش شد. به منظور تعیین تعداد لارو در خاک، ۲۰۰ گرم خاک هر گلدان جدا شده و لاروهای سن دوم به روش بارکر (۱۹۸۵) جداسازی و شمارش شدند. محاسبه فاکتور تولید مثل براساس تقسیم جمعیت نهایی به جمعیت اولیه تعیین شد. همچنین شاخص گال به‌روش (Hussey & Janssen, 2002) تعیین شد. هر تیمار دارای پنج تکرار بوده و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد.

آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (16.0) و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

نتایج

اثر جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 روی مرگ و میر لارو سن دوم و تفریخ نماتد *Meloidogyne javanica*

نتایج آزمایش نشان داد که جدایه قارچ باعث مرگ و میر لارو سن دوم بعد از ۷۲ ساعت به میزان ۷۰/۳۳ درصد و کاهش درصد تفریخ تخم نماتد به میزان ۲۳ درصد شد که نسبت به شاهد در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- اثر سوسپانسیون اسپور *Trichoderma harzianum* Tr6 بر کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه.

Table 1. The effect of spore suspension of *Trichoderma harzianum* Tr6 on *Meloidogyne javanica in vitro.*

Treatment	Egg hatch (%)	J2 mortality (%)
Trichoderma harzianum Tr6	23 b	71/33a
Control	83 a	11/6b

تعیین جمعیت اسپور *T. harzianum*Tr6 در بسترهای جامد

میزان اسپوردهی *T. harzianum* Tr6 در محیط کشت‌های مختلف در (شکل ۱) نشان داده شد. بررسی میزان اسپوردهی *T. harzianum* Tr6 نشان داد که بیش‌ترین اسپوردهی مربوط به محیط کشت حاوی دانه ارزن با میزان ($۸/۲\times۱۰^{۱۱}$ spore/g) است. پس از آن به‌ترتیب دانه گندم و سبوس گندم با میزان اسپور $۳/۴\times۱۰^{۱۱}$ و $۱/۵\times۱۰^{۱۱}$ (spore/g) قرار دارند. بین تمامی بسترهای کشت و نمونه شاهد (PDA) در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

اثر بسترهای غذایی مختلف روی مرگ و میر لارو سن دوم و تفریخ تخم نماتد *Meloidogyne javanica*

نتایج حاصل از تأثیر بسترهای غذایی مختلف حاوی *T. harzianum*Tr6 روی درصد مرگ و میر لاروهای نماتد، نشان داد که بیش ترین مرگ ومیر لارو سن دوم پس از ۷۲ ساعت با میزان ۸۷/۶ درصد مربوط به بستر غذایی سبوس گندم همراه با *T. harzianum*Tr6 است. همچنین بررسی‌ها نشان داده که اختلاف معنی‌داری بین تمامی محیط کشت‌ها با نمونه شاهد پس از ۷۲ ساعت وجود داشته است.

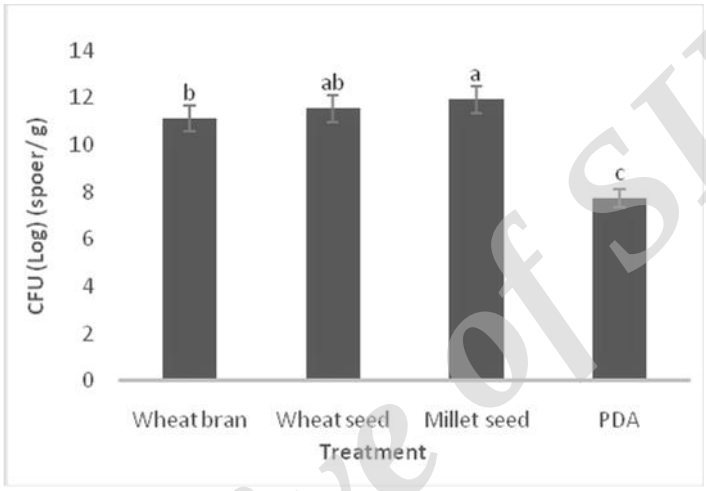
Archive of SID

www.SID.ir

پس از سبوس گندم دانه ارزن و دانه گندم به‌ترتیب به میزان ۸۱/۳ و ۷۵/۶ درصد باعث مرگ و میر لارو سن دوم شده‌اند (جدول۲). نتایج حاصل از تأثیر بسترهای غذایی مختلف حاوی *T. harzianum* Tr6 روی درصد تفریخ تخم نماتد، نشان داده که کم ترین تفریخ تخم پس از ۷۲ ساعت با میزان ۱۳/۶۶ درصد توسط محیط کشت حاوی سبوس گندم است همچنین اختلاف معنی‌داری بین تمامی محیط کشت ها با نمونه شاهد پس از ۷۲ ساعت وجود داشته است. دانه ارزن و دانه گندم با میزان ۱۹ درصد باعث کاهش تفریخ تخم نماتد شده‌اند (جدول ۲).

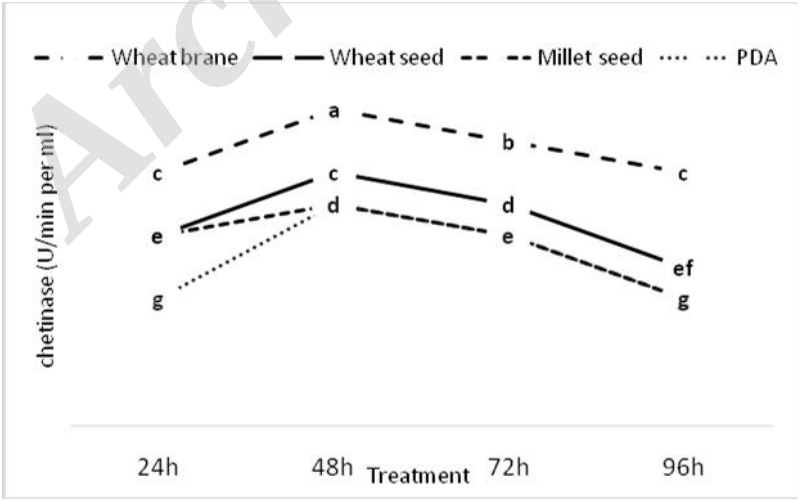
اثر بسترهای غذایی مختلف بر میزان تولید کیتیناز

نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید آنزیم ۴۸ ساعت پس از اثر آنتاگونیست بر تخم نماتد مشاهده شد و پس از آن میزان تولید آنزیم کاهش یافته است. نتایج نشان داد که بسترهای جامد بر میزان تولید آنزیم اثر داشته است. بیش‌ترین آنزیم مربوط به تیمار سبوس گندم تریکودرما بوده که پس از ۴۸ ساعت، سنجش فعالیت آنزیمی نشان داد مقدار آنزیمی که می‌تواند در طول یک دقیقه، یک میکرومول از N-acetylglucosamine را آزاد کند حدود ۱ U/min در هر میلی لیتر است (شکل ۲).



شکل۱- اثر بسترهای جامد غذایی مختلف بر میزان تولید اسپور *Trichoderma harzianum* Tr6 در سطح یک درصد.

Figure 1. The effect of different substrates on the sporulation of *Trichoderma harzianum* Tr6 at P=0.01.



شکل۲- اثر بسترهای سبوس گندم، دانه گندم و ارزن حاوی جدایه *Trichoderma harzianum* Tr6 بر میزان تولید آنزیم کیتیناز

Figure 2. The effect of wheat bran, wheat and millet grains containing *Trichoderma harzianum* Tr6 on chitinase enzyme production at $P\leq$ 5%.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- اثر بسترهای جامد غذایی سبوس گندم، دانه گندم و ارزن حاوی جدایه *Trichoderma harzianum* Tr6 بر نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه.

Table 2. The effect of wheat bran, wheat and millet seeds containing *Trichoderma harzianum* Tr6 on *Meloidogyne javanica in vitro*.

Treatment	Egg hatch (%)	J2 mortality (%)
Wheat bran	13/6d	87/6a
Wheat seed	19c	75/6c
Millet seed	18c	81/3b
PDA	23b	71/33d
Control	83a	11/6e

بررسی میزان توانایی جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* و شاخص‌های رشد گوجه فرنگی در گلخانه

نتایج گلخانه‌ای نشان داد کاربرد بسترهای غذایی مختلف باعث کاهش خسارت نماتد ریشه‌گرهی روی گوجه‌فرنگی شد. بررسی‌ها نشان داد تیمار سبوس گندم- تریکودرما اثر بهتری بر روی نماتد در شرایط گلخانه داشت. این تیمار باعث کاهش تعداد تخم و میزان گال روی ریشه نسبت به شاهد شده و باعث کاهش شاخص گال نماتد به‌میزان ۰/۶ نسبت به تیمار شاهد (۲/۶) شده و باعث افزایش شاخص های رشدی (طول و وزن گیاه) گیاه گوجه فرنگی (افزایش رشد قسمت‌های هوایی گیاه و ریشه به ترتیب به میزان ۳۵/۷ و ۱۹/۱ سانتی‌متر نسبت به شاهد ۱۹/۱ و ۸/۲ سانتی‌متر و افزایش وزن قسمت‌های هوایی و ریشه به‌میزان ۷/۳۴ و ۱/۸۴ گرم نسبت به شاهد ۴/۶۲ و ۰/۷۴گرم) شد (جدول ۳).

جدول۳- اثر بسترهای کشت دانه گندم و ارزن و سبوس گندم حاوی جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 بر نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط گلخانه.

Table 3. The effect of wheat bran, wheat and millet grains containing *Trichoderma harzianum* Tr6 on *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions.

Treatment	Larvae population (in 1 kg soil)	The number of egg	Reproduction factor	The number of nematode galls	Gall Index	Root fresh weight (g)	Shoot fresh weight (g)	Root height (cm)	Shoot heigtht (cm)
Wheat bran	6460 d	456 d	3/5 d	5/4 d	0/6 d	1/84 a	7/34 a	19/1 a	35/7a
Wheat seed	6750 d	672 c	3/7 cd	6 c	0/6 d	1/78 b	7/16 bc	18/1 b	32/7 b
Millet seed	7204 c	696 c	3/9 c	5/6d	0/8 c	1/83 a	7/04 cd	17/94 b	32/6b
PDA	8116 b	1128 b	4/6 b	9 b	1/7b	1/44 c	3/8 de	17/1 bc	30/14c
Control	13912 a	3140 a	8/5 a	29/4 a	2/6a	0/74d	4/62f	8/2 d	19/01d

بحث

پژوهش‌های پیشین نشان داد جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 توانایی بالایی در کنترل بیماری‌های گیاهی دارد. در پژوهش دلخواه و بهبودی (۲۰۱۳) کارایی کنترلی *T. harzianum* Tr6 علیه *Phytophthora drechsleri* بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد این جدایه قادر به کنترل بیماری مرگ گیاهچه خیار به میزان ۶۲/۵ درصد می‌باشد. نتایج پژوهشی دیگر نشان داد جدایه قارچ *T. harzianum* Tr6 توانست در گیاه خیار علیه *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucmerinum* مقاومت القایی مؤثری نشان دهد (Alizadeh *et al.*, 2013).

به همین منظور اثر این آنتاگونیست روی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* بررسی شد.

نتایج آزمایش بیوکنترل قارچ *T. harzianum* BI علیه نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه نشان داد که این آنتاگونیست توانایی پارازیته نمودن تخم نماتد و همچنین لاروهای سن دوم در محیط کشت را داراست که این توانایی می‌تواند در اثر تولید آنتی بیوتیک و متابولیت‌های ثانویه و تولید برخی آنزیم ها باشد (Khan & Saxena, 1997). باتوجه به وجود کیتین در لایه‌های میانی پوسته‌ی تخم نماتد با ضخامت ۰/۴ میکرومتر، به‌نظر می‌رسد

Archive of SID

www.SID.ir

T. harzianum BI با تولید آنزیم کیتیناز اثر خود را بر بازدارندگی از تفریخ تخم‌های نماتد اعمال می‌کند (Brants *et al.*, 2000). نتایج این آزمایش با نتایج سایر پژوهش‌ها منطبق می‌باشد. نتایج این آزمایش نشان داد جدایه *T. harzianum* Tr6 در شرایط آزمایشگاه قادر به کاهش جمعیت لارو سن دوم (۷۱/۳۳ درصد) و کاهش تفریخ تخم نماتد (۲۳ درصد) می‌باشد. بنابراین انبوه‌سازی این دو با مواد ارزان قیمت روشی بسیار مناسب و مقرون به‌صرفه است. اسپور قارچ‌های *Trichoderma* spp. را می‌توان در محیط مایع یا جامد تولید کرد. در هر دو محیط نکته کلیدی، هزینه پایین بستر کشت با حداکثر بازدهی است. این مواد می‌توانند از پسماندهای زراعی، فضولات دامی، زباله‌های صنعتی و هر گونه مواد آلی باشد که مقرون به‌صرفه برای تولید این قارچ ها است (Panahian *et al.*, 2010).

سبوس گندم، خارجی‌ترین پوشش دانه گندم است. این ماده غنی از کربوهیدرات ، پروتئین و چربی است. علاوه بر عناصر مهم غذایی، ویژگی های فیزیکی سبوس گندم نیز نقش حیاتی در فرآیند تخمیر بازی می‌کند، که به توانایی سبوس به حفظ رطوبت در محیط کشت جامد برمی گردد. این توانایی سبوس گندم باعث رشد قارچ همانند شرایط طبیعی می شود. سبوس گندم به تنهایی یک بستر مناسب برای رشد قارچ های *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma koningii*، *Trichoderma viride* و *Trichoderma polysporum* در محیط جامد است و هیچ نیاز به مواد مغذی اضافی برای تولید اسپور قارچ *Trichoderma* وجود ندارد (Cavalcante *et al.*, 2008). در این تحقیق توانایی تولید اسپور *T. harzianum* Tr6 بر روی سه بستر غذایی جامد که از مواد ارزان تهیه شده بود بررسی شد. نتایج نشان داد که تمامی بسترها قادر به افزایش تولید اسپور قارچ بودند. بررسی ها نشان داد سبوس گندم، دانه گندم و دانه ارزن با تولید اسپور قارچ به ترتیب با میزان $۱/۵ \times ۱۰^{۱۱}$ ، $۳/۴ \times ۱۰^{۱۱}$ و $۸/۲ \times ۱۰^{۱۱}$ (spore/g) پتانسیل بالایی در تولید اسپور داشتند. سبوس گندم همراه با دانه گندم و دانه ارزن بدون هیچ نیازی به اضافه کردن مواد غذایی بستری مناسب برای رشد تریکودرما است.

ماهیت پیچیده سبوس گندم، در ترکیب مواد مغذی منحصر به فرد آن است. سبوس گندم حاوی نشاسته بالا یعنی ۷۵/۶ درصد در مقایسه با دیگر باقیمانده‌های کشاورزی و صنعتی از قبیل سبوس برنج حاوی ۵۵/۸٪ نشاسته را می توان برای تولید آنزیم استفاده کرد (Ellaiah *et al.*, 2002). سبوس گندم را می‌توان به عنوان القاء برای بسیاری از آنزیم‌ها مانند زایلازیداز، گلوکوزیداز، آمیلاز، پروتئاز، آنزیم پکتولیتیک، گالاکتوزیداز آلفا، لیپاز، انورتاز و فیتاز استفاده کرد (Javid *et al.*, 2011 ؛ Soares *et al.*, 2010). سنجش آنزیمی کیتیناز نشان داد که سبوس گندم و سایر بسترهای جامد استفاده شده در این پژوهش منجر به افزایش تولید آنزیم شده است. سبوس گندم پس از ۴۸ ساعت یک واحد در هر میلی لیتر در دقیقه تولید آنزیم کیتیناز می کند که نسبت به شاهد ۰/۷ واحد در هر میلی لیتر در دقیقه افزایش چشمگیری داشته است.

متابولیت‌های خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتر شده‌ی تریکودرما، توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ و میر لارو سن دوم نماتد شود در آزمایش‌های گلخانه‌ای *T. harzianum* توانست تعداد گال و کیسه‌های تخم ایجاد شده بر روی ریشه‌ی گوجه فرنگی نسبت به تیمار شاهد به‌میزان ۳۰ درصد کاهش دهد (Al-Fattah *et al.*, 2007). در کار مشابه دیگر، جدایه‌ی *T. harzianum* Th توانست تعداد گالها را بر روی ریشه‌ی گوجه فرنگی کاهش دهد (Khattak & Stephen, 2008). در بررسی گلخانه‌ای *T. harzianum* باعث افزایش رشد ریشه می‌شود (Chacon *et al.*, 2007). شارون و همکاران گزارش کردند که تیمار گیاه با *T. harzianum* T-203 باعث افزایش فعالیت آنزیم هایی مثل کیتیناز، پراکسیداز و غیره شد وگیاهان گوجه فرنگی که با این جدایه تیمار شده و در خاک های آلوده به نماتد *M. javanica* کشت شدند، رشدشان افزایش یافته و گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد (بدون قارچ) کاهش یافت (Sharon *et al.*, 2001).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج تحقیق گلخانه ای حاضر نشان داد که *T. harzianum* Tr6 قادر به کاهش گال ریشه گوجه فرنگی و جمعیت لارو سن دوم و در نتیجه کنترل نماتد ریشه گرهی است. که این ممکن است به علت توانایی بالای این قارچ در تولید آنزیم کیتیناز باشد. بررسی اثر بسترهای غذایی بر کنترل نماتد در شرایط گلخانه ای نشان داد که سبوس گندم عملکرد بالاتری در کنترل نماتد داشت که این نتایج با میزان تولید آنزیم قارچی که روی سبوس گندم تلقیح شده هم‌خوانی داشت.

References

Al-Fattah, A., Dababat, A. and Sikora, A. 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3: 297–309.

Alizadeh, H. 2013. Comparative evaluation of induced resistance by *Trichoderma*, and *Pseudomonas fluorescens* their combination against Fusarium stem and root rot of cucumber and expression of some defense genes. Ph.D. thesis, University of Tehran, Iran. (In Persian)

Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays, In: Barker K.R., Carter C.C. and J.N. Sasser (eds), An advance treatise on Meloidogyne, Vol. ii, Methodology. North Carolina State University Graphics, pp. 19–35.

Brants, A., Brrown, C.R., and Earir, E.D. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase does not provide resistance to *Meloidogyne hapla* in tobacco. Journal of Nematology, 32: 289_296.

Cavalcante, R.S., Lima, H.L.S., Pinto, G.A.S., Gava, C.A.T., and Rodrigues, S. 2008. Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid-state fermentation. Food Bioprocess Technology, 1: 100–104.

Chacon, M.R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell. A., and Delgado-Jarana1, J. 2007. Microscopic & transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. International Microbiology, 10: 19–27.

Delkhah, Zh. & Behbudi, K. 2013. Production and application of *Trichoderma harzianum* Tr6 in the control of *Phytophthora drechsleri* and growth enhancement in cucumber. Biological Control of Pest and Plant Diseases, 2: 97–104. (In Persian)

El-Katatny, M.H., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katany, M.S and Gubitz, G.M. 2000. Production of chitinase and beta-1, 3- glucanase by *T. harizianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotinum rolfsii*. Food Technology and Biotechnology, 38: 173–180.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., and Srinivasulu, B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid-state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochemistry, 38: 615–620.

Hussey, R.S. & Barker, K.R. 1973. A comparison of method of collecting inoculation for *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease, 57: 1025–1028.

Archive of SID

www.SID.ir

Hussey, R.S. & Janssen, G.J.W. 2002. Root-Knot Nematodes: *Meloidogyne* species, In: Starr, J.L., Cook, R. and Bridge, J. (eds), Plant resistance to parasitic nematodes. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 43–70.

Khan, T.A. & Saxena, S.K. 1997. Effect of root dip treatment with fungal filtrates on root penetration, development and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. International Journal of Nematology, 7: 85–88.

Khattak, B. & Stephen, S.M. 2008. Effect of some endegenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Sarhad Journal of Agricultural and Crop Protection, 26: 1006–1012.

Kloepper, J., Tuzun, S., Kuc, J. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Journal of Biocontrol Science and Technology, 2 (4): 349–351.

Lopez-IlorcaL,V., Macia-Vicente, J.G., Jansson, H. B. 2008. Mode of action and interaction of nematophagous fungi. In: Ciancio A. and Mukerji K. G (eds) Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, pp. 51–76.

Maleki Ziarati, H., Roustaee, A., Sahebani, N., Etebarian, H.R and 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, 25: 259–272. (In Persian)

Sargin, S., Gezgin, Y., Eltem, R., and Vardar, F. 2013. Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. Turkish Journal of Biology, 37: 139–146.

Ramanujam, B., Prasad, R.D., Sriram, S., Rangeswaran, R. 2010. Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. Journal of Plant Protection Sciences, 2 (2): 1–8.

Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde, K.D and Lumyong, S. 2011. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3- acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27: 1373–1380.

Soares, A.C.F., Sousa, C.S., Garrido, M.S., and Perez, J.O. 2007. Production of *Streptomyces* inoculum in strelized rice. Scientia Agricola, 64: 641–644

Van Loon, L.C. & Vanstrien, E.A. 1998. The families of pathogenesis related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology, 55: 85–97.

Verma, M., Satinder, K.B., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., and Valeró, J.R. 2007. Starch industry waste water as substrate for antagonist, *Trichoderma viride* production. *Bioresource Technology*, 98: 2154–2162

Zhang, S.W., Gan, Y.T., Xu, B.L., Xue, Y.Y. 2015. The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. Biological Control, 72: 1–8.

Zhang, S.W., Gan, Y.T., Xu, B.L. 2014. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. BioControl, 59: 319–33.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of solid food substrates on sporulation and chitinase production of *Trichoderma harzianum* Tr6 in controlling of *Meloidogyne javanica* in tomato

Niloufar Mohammadi Fesharaki, Kivan Behboudi, Ramin Heydari

Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran

Corresponding author: Kivan Behboudi, email: behbodi@ut.ac.ir,

Received: Jan., 20, 2018 6(1) 19-28 Accepted: Jan., 06, 2019

Abstract

Trichoderma spp. can reduce the severity of the disease caused by plant parasitic nematodes by parasitizing the eggs and juveniles and induction of plant resistance responses. The effects of solid nutrient substrates (millet, grain and wheat bran) on the sporulation of *Trichoderma harzianum* Tr6, chitinase enzyme production and the ability to control of *Meloidogyne javanica* were studied. Results showed that the substrates had different effect on sporulation of the fungi and also control of the target nematodeand that the best substrate was wheat bran. Using this substrate, spore production of *T. harzianum* a rate of about 1.5×10^{11} per gram of medium. Furthermore, a great control of the second stage juveniles was observed with 87.66% of mortality of the second stage juveniles and reduction of 13.66% eggs hatching by. Chitinase enzyme assay showed that *Trichoderma* cultured on wheat bran exhibited a U / min per ml enzyme enzyme production. In addition, the antagonistic fungi that is cultured on wheat bran showed a major effect on control of nematode in comparison with other solid substrates and the Gall index in this treatment was 0.6.

Keywords: wheat bran, wheat, millet, *Meloidogyne javanica*, enzyme assay

Archive of SID

www.SID.ir