نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، ص. ۳۷۴-۳۶۳

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No.4, Winter 2019, P. 363-374

بررسی فعالیت آنزیمی پروتئاز و لیپاز چند گونه قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) و تأثیر آن بر کنترل بیولوژیک نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی (*Meloidogyne javanica*)

مجتبی کواری[۱]- عصمت مهدیخانی مقدم[۲*]- حمید روحانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷

چکیده

نماتدهای ریشه گرهی یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گوجه فرنگی می‌باشند. پوسته‌ی تخم نماتد ریشه گرهی شامل ۵۰ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کیتین و ۲۰ درصد لیپید می‌باشد. گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) با تولید مقادیر قابل توجهی آنزیم‌های هیدرولیتیک، به یکی از عوامل مورد استفاده جهت کنترل بیمارگرهای گیاهی تبدیل شده است. در این پژوهش میزان فعالیت آنزیمی پروتئاز و لیپاز ۱۵ جدایه از چهار گونه تریکودرما (*T. harzianum, T. virens, T. konigii, T. saturnisporum*) در ارتباط با توانایی بیوکنترلی نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های T.BI، T65 و T6 به عنوان مؤثرترین و جدایه‌های T16، T12 و T12N به عنوان کم اثرترین جدایه‌ها در بیوکنترل این نماتد معرفی شدند. همچنین مطابق با نتایج به دست آمده از بررسی میزان همبستگی بین فعالیت آنزیمی پروتئاز و لیپاز و فاکتور تولید مثل نماتد، ضریب همبستگی بین فعالیت آنزیم پروتئاز و فاکتور تولید مثل نماتد (r^2 =0.83) و ضریب همبستگی بین آنزیم لیپاز و فاکتور تولید مثلی نماتد (r^2 =0.42) تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، فعالیت آنزیمی، کنترل بیولوژیک، نماتد ریشه گرهی

مقدمه

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) پارازیت‌های داخلی کم‌تحرکی هستند که به طیف وسیعی از محصولات کشاورزی حمله کرده و باعث خسارت قابل توجهی در آن‌ها می‌گردند (۱۶). با توجه به مشکلات ناشی از کنترل شیمیایی بیمارگرها مانند اثرات زیان‌بار آن‌ها بر سلامت انسان و محیط زیست، استفاده از روش‌های جایگزین دارای اهمیت بالایی می‌باشد. گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) به میزان گسترده‌ای به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک در بیمارگرهای گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است (۴). تاکنون تلاش‌های فراوانی در جهت استفاده از گونه‌های مختلف جنس تریکودرما در کنترل بیولوژیک نماتدهای گیاهی صورت گرفته است. گونه‌ی *T. harzianum* به‌عنوان یک عامل مؤثر در مدیریت نماتد مرکبات گزارش شده است (۲۲). گزارش شده که تیمار خاک با جدایه‌های دو گونه‌ی *T. harzianum* و *T. konigii* سبب کاهش تعداد تخم تولید شده توسط نماتد *Meloidogyne arenaria* می‌گردد (۲۷). مهدیخانی مقدم و همکاران به بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد سیستی چغندر قند (*Heterodera shachtii*) توسط ۱۰ جدایه از دو گونه‌ی *T. harzianum* و *T. virens* در آزمایشگاه و گلخانه پرداخته و دو جدایه‌ی *T. harzianum* BI و *T. virens* VM1 را به عنوان برترین جدایه‌ها معرفی نموده‌اند (۱۴ و ۱۵).

مکانیسم‌های بیوکنترلی متعددی برای قارچ تریکودرما در شرایط طبیعی ذکر شده است، که به صورت: اثر مستقیم روی بیمارگر، افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر و همچنین اثر بر رابطه‌ی متقابل میزبان و بیمارگر می‌باشد. با این حال در استفاده از قارچ تریکودرما تکیه بیشتری بر تأثیر مستقیم قارچ تریکودرما بر بیمارگر است. در این حالت قارچ تریکودرما با تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و ترکیبات سمی و آنتی‌بیوتیک‌ها باعث از بین رفتن میکروارگانیسم هدف قبل از نفوذ به بافت گیاهی می‌گردد. تریکودرما می‌تواند با تولید موادی شبه فیتوهورمونی مانند سیتوکینین، زئاتین، جیبرلین، ایندول استیک اسید، جاسمونیک‌اسید و اتیلن سبب افزایش رشد گیاه و بهبود جذب مواد غذایی در گیاه شود. از طرفی با تحریک مقاومت سیستمیک (Systemic Acquired Resistance و Induced Systemic Resistance) در گیاه سبب کاهش میزان بیماری می‌گردد. تولید آنزیم‌های مختلف و از بین بردن عوامل بیماری‌زا قبل از نفوذ به درون

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و استادان گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mahdikhani-e@ um.ac.ir)
DOI: 10.22067/jpp.v33i4.35150

www.SID.ir

Archive of SID

میزبان جزء مهم‌ترین مکانیسم‌های قارچ تریکودرما می‌باشد. از جمله مهم‌ترین این آنزیم‌ها، کیتینازها، پروتئازها، لیپازها و گلوکانازها می‌باشد که سبب از بین بردن سلول‌های میکروارگانیسم هدف می‌شوند. پوسته‌ی تخم نماتد از مهم‌ترین ساختارهایی است که وظیفه‌ی محافظت از لارو نماتد در داخل تخم را بر عهده دارد. در نماتد ریشه گرهی پوسته‌ی تخم شامل ۵۰ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کیتین و ۲۰ درصد لیپید است (۲). با توجه به ترکیبات موجود در پوسته‌ی تخم این نماتد، آنزیم‌های تجزیه کننده تولید شده توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما مانند کیتیناز، پروتئاز و لیپاز سبب تخریب تخم، کاهش تفریخ تخم و افزایش مرگ و میر لاروهای نماتد می‌گردد (۱۰، ۲۴ و ۲۵). در یک پژوهش تأثیر پروتئاز استخراج شده از *Paecilomyces lilacinus* بر روی تخم‌های نابالغ، میزان تفریخ تخم‌های بالغ و میزان تحرک لاروهای تفریخ شده به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا تأثیر پروتئاز بر روی تخم‌ها پس از سه روز نشان دهنده‌ی تخریب ۷۰ درصدی تخم‌ها در نمونه‌های تیمار شده با پروتئاز در مقایسه با تخریب ۱۰ درصدی تخم‌ها در تیمارهای شاهد بود. پس از ۶ روز تنها تعداد کمی تخم سالم باقی ماند درحالی‌که در نمونه‌های شاهد ۹۰ درصد از تخم‌ها سالم بودند. همچنین مشخص گردید که سن تخم بر میزان نفوذ قارچ و تأثیر پروتئاز تولیدی توسط قارچ بسیار تأثیرگذار است زیرا در تخم‌های جوان هنوز توده ژلاتینی اطراف تخم کاملاً تشکیل نشده است (۳).

در بین قارچ‌های پارازیت نماتدها، پروتئازهای خارج سلولی از مهمترین ترکیبات در تخریب ساختارهای سلولی موجود هدف می‌باشند (۹). در یک پژوهش مشخص گردید طی نفوذ قارچ *Verticilliam suchlasporium* به تخم‌های نماتد سیستی *Heterodera shachtii* مقادیر بالایی از پروتئاز تولید می‌شود (۱۳). نوعی پروتئاز خارج سلولی از قارچ مایکوپارازیت *Trichoderma harzianum* گزارش شده است که می‌تواند به عنوان یک عامل تأثیرگذار بر قدرت بیوکنترل این قارچ مد نظر قرار بگیرد (۸).

هدف از این تحقیق، بررسی رابطه بین میزان تولید آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز در جدایه‌های متعلق به چندین گونه از تریکودرما و تأثیر آن‌ها در کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی *M. javanica* بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های قارچ

پانزده جدایه از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما از کلکسیون بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد (کلکسیون دکتر روحانی) به صورت خالص تهیه و بر روی محیط کشت PDA (Merck®, 39g.l^{-1}) کشت و نگهداری گردید (جدول ۱).

جدول ۱- جدایه‌های مربوط به گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما مورد استفاده در آزمایش

Table 1- Isolates of different *Trichoderma* species used in the experiment

گونه‌ی قارچ *Trichoderma* species	*T. konigii*	*T. virens*	*T. harzianum*	*T. saturnisporum*
جدایه قارچی مورد استفاده *Trichoderma* isolate	T77	T6, T21, T65, T64	T20, T14N, T16, T.BI, T7, T25, T16A, T19	T12, T12N

تهیه مایه تلقیح قارچ

جهت مایه‌زنی جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما به بوته‌های گوجه فرنگی در گلخانه ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم دانه گندم شسته به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر جوشانده شد و سپس ۲ ساعت روی پارچه‌ی تمیزی جهت حذف رطوبت سطحی پخش شدند. پس از آن، گندم‌ها را درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و طی دو روز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سترون گردید. سپس به هر ارلن ده دیسک پنج میلی‌متری از کشت تازه هر کدام از جدایه‌های قارچی افزوده شد و ارلن‌ها به مدت ۱۲ روز جهت رشد قارچ در دمای ۱±۲۸ سانتی‌گراد قرار داده شد. طی این مدت هر دو روز یک بار محتویات هر ارلن به خوبی به هم زده شد و در نهایت با استفاده از سری‌های رقت تهیه شده از هر جدایه، مقدار گندم مورد نیاز جهت افزودن میزان ۱×۱۰^{۷} زادمایه قارچ به هر گرم خاک در هر گلدان تعیین گردید. تیمارهای شاهد فاقد اینوکولوم بودند.

تهیه جمعیت نماتد ریشه گرهی

نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی، گونه‌ی *M. javanica* از بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد (دکتر مهدیخانی) تهیه و برای تکثیر بر روی بوته‌ی گوجه فرنگی رقم موبیل در شرایط گلخانه نگهداری گردید.

آماده‌سازی سوبسترا جهت سنجش فعالیت پروتئاز

جهت القای تولید پروتئاز از محیط کشت TLE (۶) به همراه ۰/۵٪ کازئین استفاده گردید. ۳۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مورد نظر درون بطری‌های شیشه‌ای ۱ لیتری ریخته شد و سپس اتوکلاو گردید. پس از سرد شدن، به هر یک از بطری‌ها ۲×۱۰^{۷} اسپور از هر ایزوله

www.SID.ir

Archive of SID

قارچی مایه‌زنی گردید و در نهایت بطری‌های مورد نظر به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و در دمای ۱±۲۸ قرار داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، محیط کشت مورد نظر به درون لوله‌های سانتریفیوژ سترون منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی را برداشته و با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک صاف شد و از آن جهت استفاده به عنوان محلول آنزیم در سنجش آنزیمی استفاده گردید. محلول آنزیمی تا زمان استفاده جهت سنجش آنزیمی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردد (۶).

سنجش آنزیمی پروتئاز

سنجش آنزیمی پروتئاز بر پایه رنگ‌سنجی و بر اساس روش آنسون صورت پذیرفت. ترکیب واکنش سنجش آنزیمی شامل پنج میلی‌لیتر از محلول ٪۰/۶۵ (وزن به حجم) کازئین در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار به همراه یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی می‌باشد. میزان جذب هر نمونه در طول موج ۶۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جهت رسم منحنی استاندارد این آنزیم از غلظت‌های مختلف اسید آمینه تیروزین ۱/۱ میلی‌مولار استفاده گردید (۱).

بررسی تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده پروتئاز بر میزان تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه

جهت بررسی تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده پروتئاز بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه، ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد تخم نماتد و ۳۵ میلی‌لیتر محلول عصاره محیط کشت حاصل از کشت هر کدام از جدایه‌ها بر روی محیط مایع القا کننده پروتئاز درون یک پتری ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم) قرار داده شد. در نمونه‌های شاهد، از آب مقطر استریل به جای عصاره‌ی آنزیمی استفاده شد (۱۱).

آماده‌سازی سوبسترا جهت سنجش فعالیت لیپاز

به منظور القای تولید آنزیم لیپاز توسط جدایه‌های قارچ تریکودرما، از محیط کشت اصلاح شده ریس (pH=5) استفاده شد. محیط کشت مورد نظر به درون لوله‌های سانتریفیوژ استریل منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. از فاز روئی به عنوان منبع آنزیمی در سنجش آنزیم لیپاز استفاده گردید (۱۹).

سنجش آنزیمی لیپاز

ترکیب واکنش جهت سنجش لیپاز شامل پنج میلی‌لیتر بنزن، یک میلی‌لیتر معرف استات مس ۵٪، ۰/۳ میلی‌لیتر از امولسیون ۵٪ روغن زیتون و تریتون ۱۰۰ در بافر ۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات به همراه یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به دست آمده از مرحله قبل می‌باشد. ترکیب مورد نظر به مدت ۱۰دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت واکنش با سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه متوقف گردید. پس از آن میزان جذب برای هر نمونه در طول موج ۷۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این سنجش، جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف اولئیک اسید استفاده شد (۱۸).

بررسی تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده لیپاز بر میزان تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه

جهت بررسی تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده لیپاز بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه، ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد تخم نماتد و ۳۵ میلی‌لیتر محلول عصاره محیط کشت حاصل از کشت هر کدام از جدایه‌ها بر روی محیط مایع القا کننده لیپاز درون یک پتری ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم) قرار داده شد. در نمونه‌های شاهد، از آب مقطر استریل به جای عصاره‌ی آنزیمی استفاده شد.

بررسی میزان توانایی جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp. در کنترل نماتد ریشه گرهی در گلخانه

برای بررسی میزان تأثیر جدایه‌های قارچ مورد نظر در کنترل این نماتد، ابتدا خاک هر گلدان (یک کیلوگرم خاک سترون و به نسبت‌های: خاک رسی: ۱، خاک‌برگ: ۱، ماسه: ۲) با میزان گندم محاسبه شده جهت هر جدایه قارچی مایه‌زنی و به خوبی مخلوط گردید. سپس یک عدد نشاء گوجه فرنگی رقم موبیل در مرحله‌ی ۴ برگی به هر گلدان منتقل گردید. پس از گذشت ده روز از تاریخ مایه‌زنی قارچ به بوته‌ها، در اطراف طوقه‌ی هر بوته سه سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر ایجاد و به هر گلدان ۲۰۰۰ عدد تخم نماتد اضافه گردید (۲۳). تیمارهای شاهد مثبت شامل گلدان‌های دارای گیاه به همراه نماتد و بدون قارچ و شاهد منفی شامل گلدان‌های دارای گیاه بدون نماتد و قارچ بود. اندازه‌گیری شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد شامل شاخص گال، تعداد کیسه تخم در هر گرم ریشه، تعداد تخم درون هر کیسه تخم، تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه و فاکتور تولید مثل نماتد پس از گذشت ۴۵ روز از مایه‌زنی نماتد به بوته‌های گوجه فرنگی صورت گرفت. در این آزمایش شاخص گال طبق روش تایلور و ساسر تعیین شد که بر طبق این روش شدت گال ریشه (RGS) بر اساس شاخص ۵- ۰ (۰: بدون گال، ۱: ۲-۱ گال، ۲:

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰-۳ گال، ۳: ۳۰-۱۱ گال، ۴: ۱۰۰-۳۱ گال و ۵: بیش از ۱۰۰ گال) ارزیابی گردید (۲۱). همچنین فاکتور تولید مثلی نماتد نیز از نسبت جمعیت نهایی نماتد به جمعیت اولیه نماتد به دست آمد. در طی این مدت، گلدان‌های مذکور در شرایط گلخانه و در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و حداقل هشت ساعت نور در روز قرار گرفتند.

آنالیزهای آماری

این تحقیق شامل دو آزمایش جداگانه در آزمایشگاه و گلخانه بود. در آزمایشگاه آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی ساده و با سه تکرار انجام گرفت. در گلخانه نیز آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس صفات مختلف با استفاده از دستور "Proc GLM" نرم‌افزار SAS V.9.2 انجام پذیرفت. مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف آزمایشی با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح اطمینان ۹۵٪ صورت گرفت.

پیش از انجام تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی، تست نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SigmaPlot V.12.0 انجام شد که در صورت نیاز داده‌ها قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال گردیدند. ارتباط بین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز جدایه‌های مختلف قارچ و مقدار شاخص تولید مثلی نماتد، با استفاده از برازش معادله‌ی خطی درجه‌ی یک و برآورد ضریب تبیین یا همبستگی (r^2) توسط نرم‌افزار SigmaPlot V.12.0 تعیین گردید.

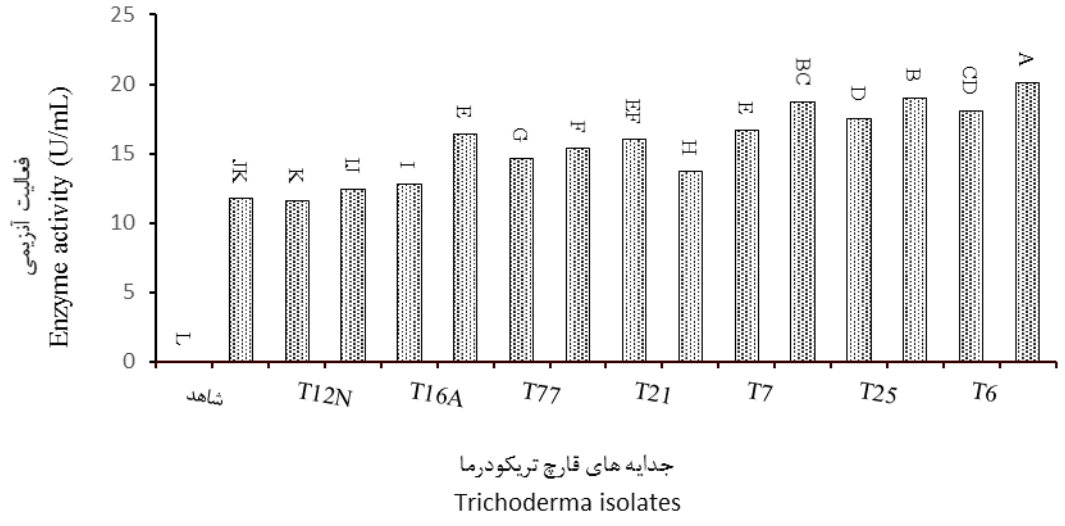
نتایج

سنجش میزان فعالیت آنزیمی

برای این منظور، میزان جذب نوری ترکیب‌های واکنش پس از توقف واکنش در طول موج‌های مربوطه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و با توجه به میزان جذب صورت گرفته در هر تیمار، فعالیت آنزیمی جدایه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با استفاده از غلظت‌های مختلف ترکیب استاندارد مربوطه در هر سنجش محاسبه گردید.

نتایج مربوط به سنجش آنزیمی پروتئاز

نتایج حاصله از سنجش آنزیمی مربوط به آنزیم پروتئاز نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میزان تولید این آنزیم در جدایه‌های T.BI و T65 نسبت به سایر جدایه‌ها می‌باشد. همچنین بر اساس این نتایج، کمترین میزان فعالیت آنزیمی در بین جدایه‌های مورد آزمون، مربوط به جدایه‌های T12N و T12 می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیمی پروتئاز جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp. در آزمایشگاه

جدایه‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ نداشتند.

Figure 1- Protease activity of different isolates of *Trichoderma* spp.

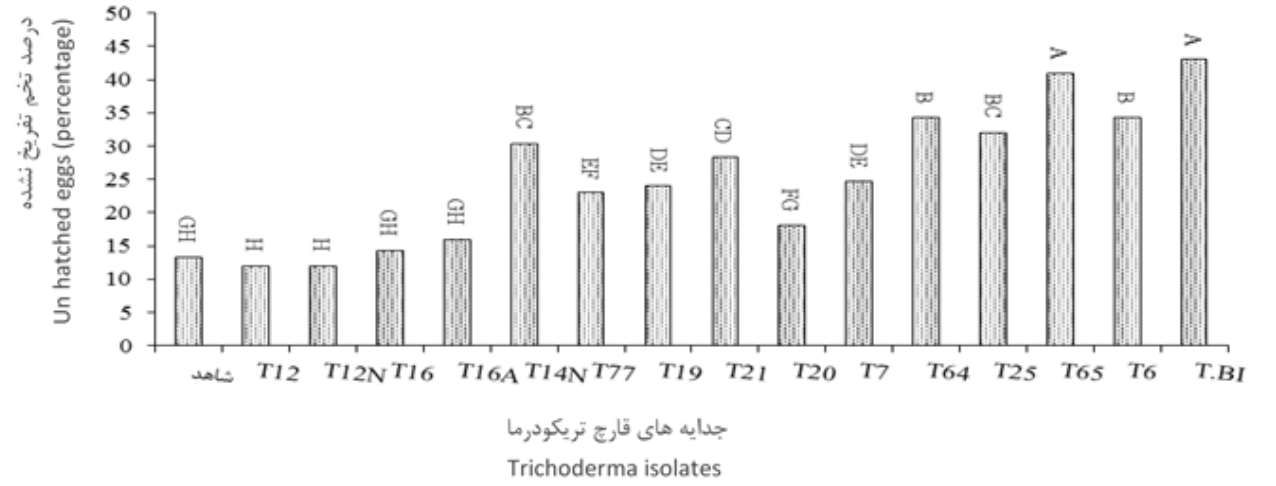
There is no significant difference in isolates with the same letter.

تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده پروتئاز بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین میزان مرگ و میر و کاهش تفریخ تخم نماتد در جدایه‌های T.BI و T.65 مشاهده گردید. همچنین کمترین میزان کاهش در تفریخ تخم نیز در جدایه‌های T.12 و T.12N به ثبت رسید (شکل ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تأثیر منبع آنزیمی پروتئاز جدایه‌های مختلف بر درصد تفریخ تخم نماتد ریشه گرهی در آزمایشگاه

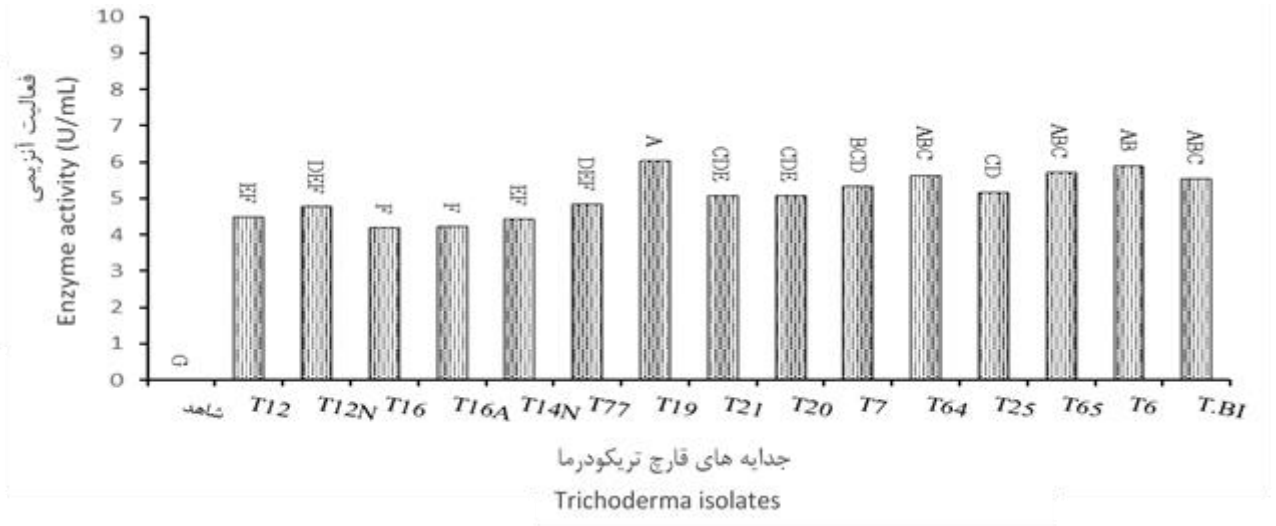
جدایه‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ نداشتند.

Figure 2- The effect of different isolates protease source on the root-knot nematode egg hatch

There is no significant difference in isolates with the same letter.

نتایج مربوط به سنجش آنزیمی لیپاز

نتایج سنجش جدایه‌ها از نظر میزان تولید لیپاز نشان داد تنها در برخی از جدایه‌های مورد سنجش تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تولید این آنزیم وجود دارد با این حال در تمامی جدایه‌ها میزان فعالیت آنزیمی نسبت به تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیمی لیپاز جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp.

جدایه‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نداشتند.

Figure 3- Lipase activity of different isolates of *Trichoderma* spp.

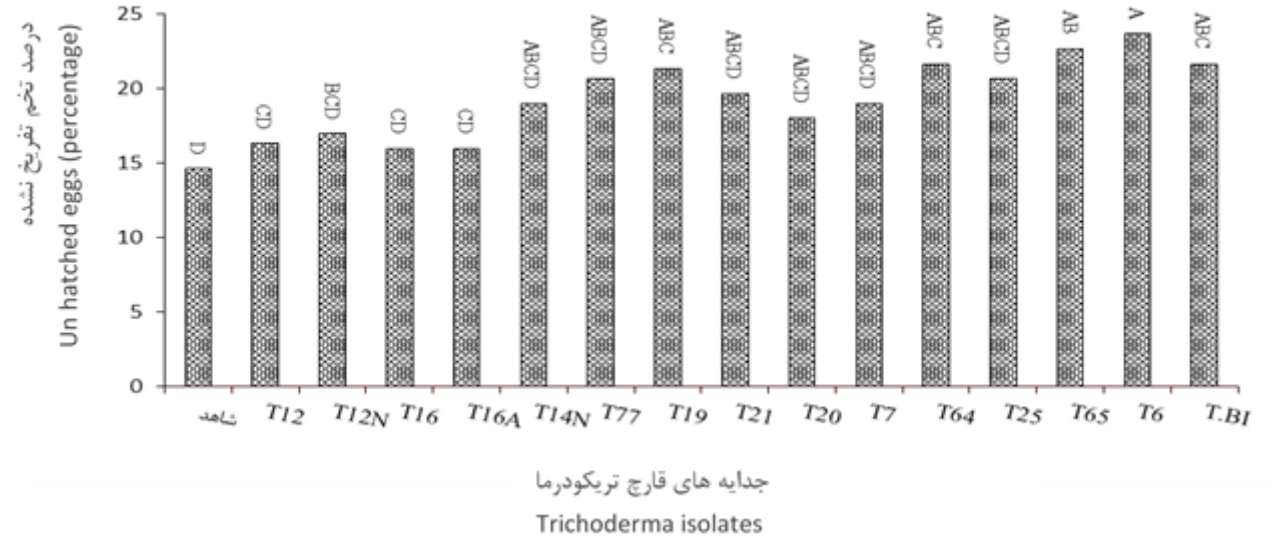
There is no significant difference in isolates with the same letter.

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده لیپاز بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد

نتایج سنجش میزان تأثیر منبع آنزیمی لیپاز بر میزان مرگ و میر تخم نماتدها در آزمایشگاه نشان داد، عصاره آنزیمی مذکور تأثیر چندانی بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد ندارد و میزان تفریخ تخم نماتد در بیشتر جدایه‌ها نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری را دارا نمی‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر منبع آنزیمی لیپاز جدایه‌های مختلف بر درصد تفریخ تخم نماتد ریشه گرهی در آزمایشگاه

جدایه‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ نداشتند.

Figure 4- The effect of different isolates lipase source on the root-knot nematode egg hatch

There is no significant difference in isolates with the same letter.

نتایج گلخانه‌ای

بر اساس نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای جدایه‌های T.BI، T6 و T65 با کاهش فاکتور تولید مثلی نماتد به ترتیب به مقادیر ۸/۶، ۱۰/۰۴ و ۱۱/۹ بیشترین موفقیت را در کنترل بیولوژیک نماتد ریشه‌گرهی در گلخانه به دست آوردند. همچنین جدایه‌های T12N، T12 و T16 به ترتیب با فاکتور تولید مثلی ۲۵/۸، ۲۴/۷ و ۲۱/۳۵ کمترین توانایی را در کاهش شاخص‌های بیماری از خود نشان دادند (شکل‌های ۵ و ۶).

در ارتباط با بررسی همبستگی بین فعالیت آنزیمی جدایه‌های قارچی و میزان توانایی کنترل کنندگی نماتد ریشه‌گرهی توسط هر جدایه بیشترین همبستگی و ارتباط مربوط به آنزیم پروتئاز با ضریب همبستگی $r^2=0.83$ به ثبت رسید (شکل ۷). همچنین میزان همبستگی بین فعالیت آنزیمی لیپاز و فاکتور تولید مثلی نماتد $r^2=0.42$ تعیین شد (شکل ۸).

بحث

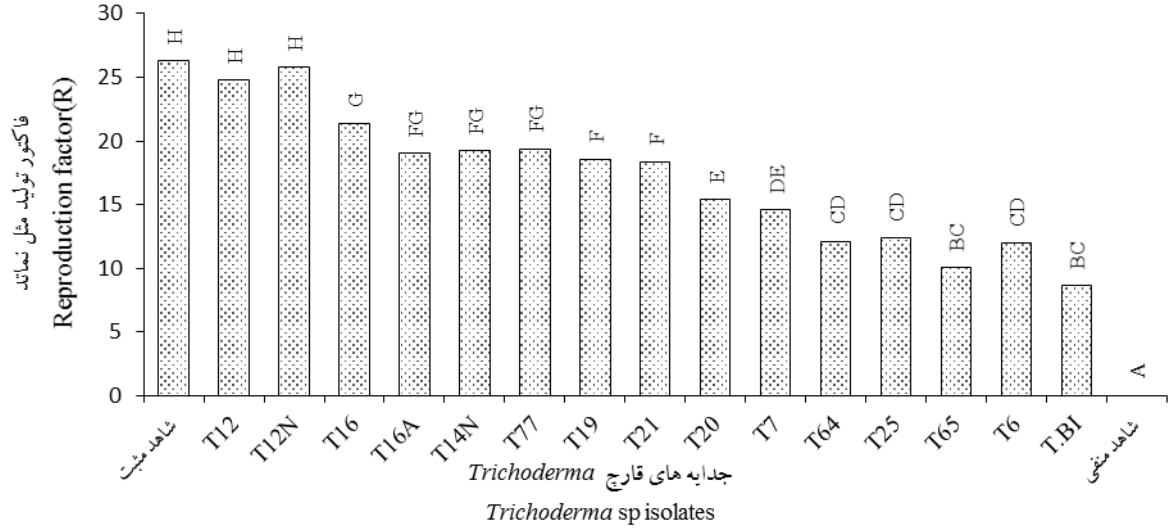
نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گوجه فرنگی می‌باشد. کنترل این نماتد به عنوان انگل داخلی گیاه، به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی و توان تولید مثل بالا دشوار می‌باشد (۱۲). تاکنون تحقیقات زیادی در خصوص استفاده از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما به عنوان عامل کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی صورت پذیرفته است. توانایی تولید مقادیر بالای آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز و گلوکاناز، این قارچ را در زمره‌ی دشمن طبیعی طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی قرار داده است (۲۶). در گذشته تحقیقاتی در خصوص تأثیر این قارچ در کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه صورت گرفته است و به خصوص گونه‌ی *T. harzianum* با تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر کیتیناز و پروتئاز نقش مثبت خود را در بیوکنترل *M. javanica* به اثبات رسانده است (۲۱).

نتایج تحقیقی دیگر بر روی جدایه‌های دستکاری شده ژنتیکی از

www.SID.ir

Archive of SID

نظر تولید میزان پروتئاز نشان دادند که افزایش تعداد کپی‌های قطعه ژنی مربوط به آنزیم پروتئاز، سبب افزایش میزان کنترل کنندگی قارچ *Trichoderma harzianum* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* می‌گردد. همچنین نتایج نشان می‌دهد وجود منبع کربنی مناسب جهت القای تولید آنزیم پروتئاز نیز تأثیر زیادی در میزان پروتئاز تولیدی دارا می‌باشد (۷) که با توجه به وجود مقادیر بالایی از پروتئین در پوسته تخم و کوتیکول لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی، میزان تولید این آنزیم در صورتی که قارچ با لاروها و تخم های این نماتد در ارتباط باشد افزایش پیدا می‌کند.



شکل ۵- فاکتور تولید مثلی نماتد تحت تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما در گلخانه

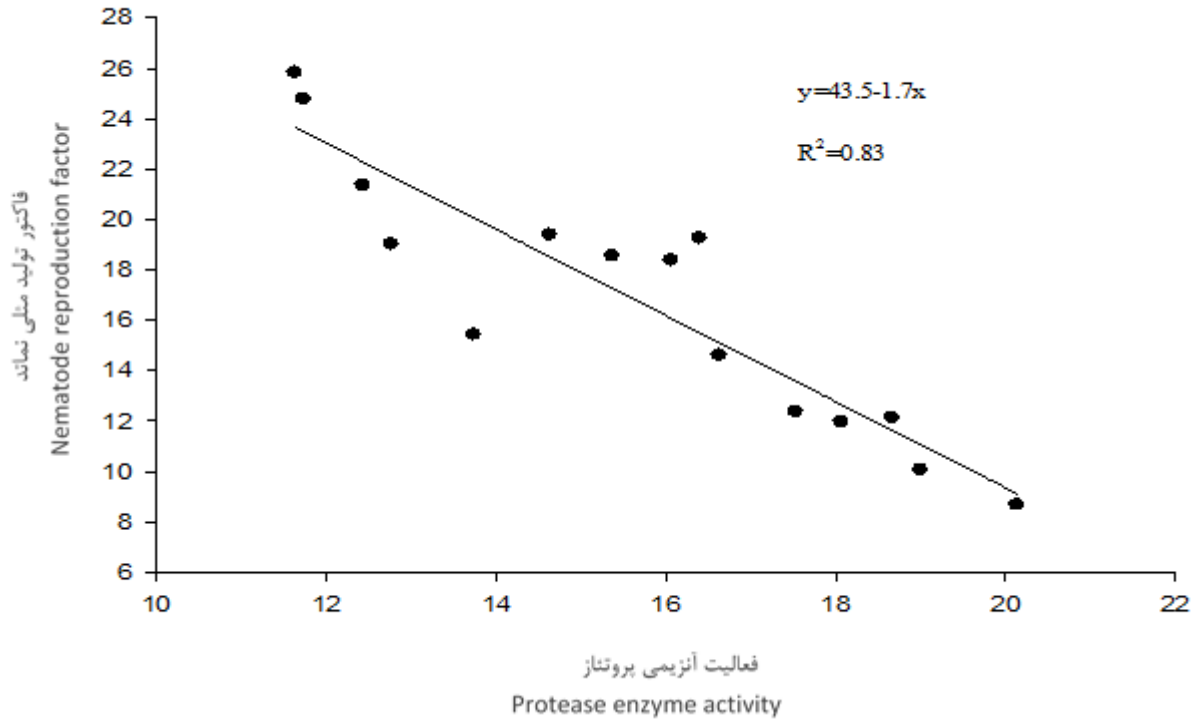
Figure 5- Nematode reproduction factor affected by different *Trichoderma* spp. isolates

شکل ۶- شاخص گال نماتد تحت تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما در گلخانه

Figure 6- Nematode Gall index affected by different *Trichoderma* isolates

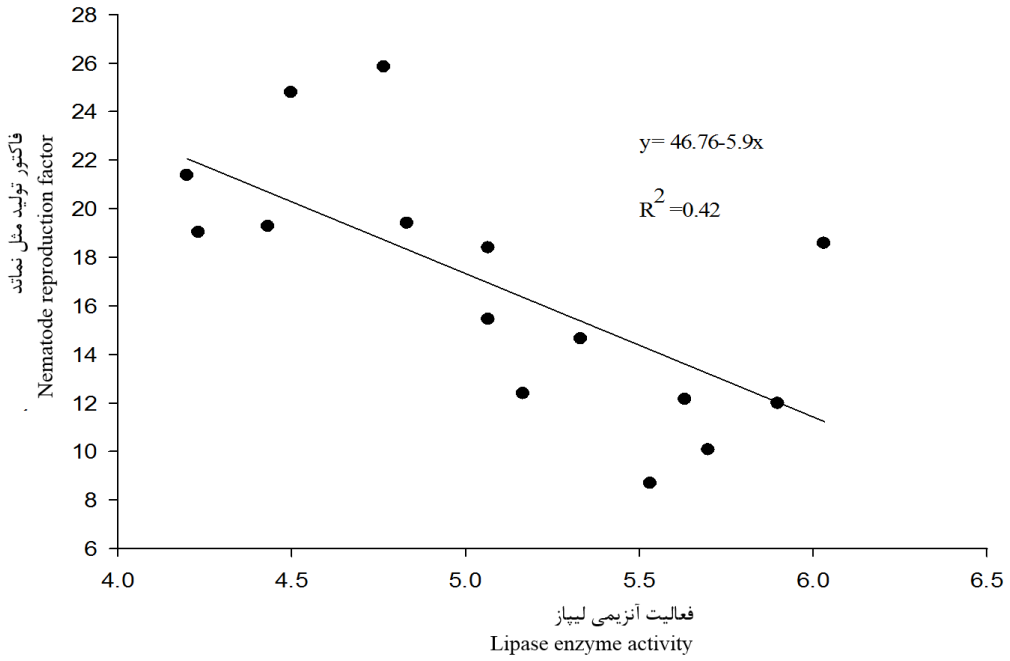
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- رگرسیون میزان فعالیت آنزیمی پروتئاز جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp. با فاکتور تولید مثل نماتد

Figure 7- Regression of the protease activity of *Trichoderma* spp. isolates with the nematode reproduction factor



شکل ۸- رگرسیون میزان فعالیت آنزیمی لیپاز جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp. با فاکتور تولید مثل نماتد

Figure 8- Regression of the lipase activity of *Trichoderma* spp. isolates with the nematode reproduction factor

www.SID.ir

Archive of SID

اگرچه یک گزارش از بی‌تأثیر بودن میزان قدرت تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه‌های قارچ تریکودرما بر توانایی بیوکنترلی این قارچ در دست می‌باشد (۱۷)، اما سایر مطالعات نقطه‌ی مقابل این گزارش را بیان می‌نمایند. به عنوان مثال جدایه‌های دارای چندین نسخه از ژن کد کننده‌ی پروتئاز توانایی بالاتری را از نظر قدرت کنترل کنندگی نماتد *M. javanica* نشان می‌دهند که این امر نشان دهنده‌ی تأثیر پروتئاز قارچ تریکودرما بر فعالیت کنترل کنندگی این قارچ علیه نماتدها می‌باشد (۲۲). کوتیکول لارو سن دوم عمدتاً از پروتئین تشکیل شده است. بنابراین، فرض ما بر این است که بهبود فعالیت پروتئولیتیک یک آنتاگونیست به افزایش توانایی بیوکنترلی آن عامل منجر خواهد شد. در پژوهشی که به منظور بررسی تأثیر فعالیت پروتئولیتیک جدایه‌های قارچ تریکودرما در کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی صورت گرفت، نشان داده شد که نوعی همبستگی بین میزان فعالیت پروتئولیتلیک و میزان کنترل‌کنندگی قارچ تریکودرما علیه لاروهای سن دوم این نماتد وجود دارد. نتایج به دست آمده در آزمون‌های گلخانه‌ای تا حدودی تأیید کننده‌ی نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی می‌باشد. در بررسی میزان تأثیر جدایه‌های قارچ در کنترل بیولوژیک نماتد در گلخانه معیارهایی همچون تعداد توده تخم، تعداد تخم درون هر توده تخم، تعداد گال بر روی ریشه (شاخص گال)، تعداد لارو سن ۲ در ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه و در نهایت فاکتور تولید مثل نماتد مورد استفاده قرار گرفتند (۲۴). بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات گلخانه‌ای، بین بیشتر جدایه‌های قارچ تریکودرما در میزان توانایی کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵٪ وجود دارد. بر اساس این نتایج، موفق‌ترین جدایه‌ها در کنترل بیولوژیک نماتد ریشه‌گرهی جدایه‌های T.BI، T6 و T65 بودند. همچنین جدایه‌های T12، T12N و T16 به عنوان ضعیف‌ترین جدایه‌ها در کاهش خسارت نماتد ریشه‌گرهی به اثبات رسیدند.

از طرفی در آزمون بررسی تأثیر آنزیم‌های استخراج شده بر تخم نماتد در آزمایشگاه مشخص شد که آنزیم پروتئاز تولیدی توسط قارچ تریکودرما دارای توانایی بالایی در تخریب تخم نماتد و کاهش تفریخ تخم نماتد می‌باشد که این امر با توجه به وجود درصد بالای پروتئین در پوسته تخم این نماتد دور از انتظار نمی‌باشد. همچنین در رابطه با بررسی تأثیر آنزیم لیپاز بر تخم نماتد در آزمایشگاه، بی اثر بودن آنزیم لیپاز تولید شده توسط قارچ تریکودرما بر تخریب تخم نماتد ثابت شد که دلیل این امر ممکن است عدم وجود سازگاری بین آنزیم لیپاز تولیدی توسط این قارچ و نوع لیپید موجود در پوسته تخم نماتد باشد. لذا به نظر می‌رسد که آنزیم لیپاز مورد نظر فاقد توانایی نفوذ به درون ساختار لیپیدی پوسته تخم نماتد و تجزیه آن باشد. با توجه به این موارد، می‌توان بالا بودن همبستگی بین میزان آنزیم پروتئاز تولیدی توسط قارچ تریکودرما و توانایی بیوکنترلی این جدایه‌ها در گلخانه و همچنین پایین بودن این همبستگی در رابطه با آنزیم لیپاز را توجیه نمود. از طرفی بارها ثابت شده است که مهم‌ترین مکانیسم بیوکنترلی جدایه‌های قارچ تریکودرما علیه بیمارگرهای گیاهی، تحریک مقاومت القایی سیستمیک و افزایش میزان ترکیبات دفاعی در میزبان می‌باشد. کیتیناز و پروتئاز تولیدی توسط جدایه‌های قارچ تریکودرما می‌توانند به عنوان تحریک کننده‌ی گروهی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-Protein) در گیاه عمل نمایند و در نتیجه سبب فعال کردن مکانیزم‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها و افزایش سطح مقاومت گیاه به بیمارگرها گردند. تا کنون گزارشات زیادی مبنی بر تأثیر آنزیم پروتئاز بر تحریک مقاومت سیستمیک علیه بیمارگرهای گیاهی به ثبت رسیده است. در حالی‌که تا کنون گزارشی مبنی بر تأثیر لیپاز تولید شده توسط قارچ تریکودرما بر تحریک سیستم ایمنی گیاهان به ثبت نرسیده است. در مجموع باید گفت نمی‌توان با اطمینان از موفقیت یا عدم موفقیت یک عامل بیوکنترل در کنترل یک بیمارگر بخصوص صحبت نمود و متغیرهای فراوانی بر میزان موفقیت عوامل بیوکنترل در محیط‌های طبیعی تأثیر گذارند.

منابع

1- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. The Journal of General Physiology 22(1): 79-89.
2- Bird F.A., and McClure M.A. 1976. The Tylenchida (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. Parasitology 72: 19-28.
3- Bonants P.J., Fitters P.F., Thijs H., den Belder E., Waalwijk C., and Henfling J.W.D. 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiology 141(4): 775-784.
4- Cherif M., and Benhamou N. 1990. Cytochemical aspect of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Phytopathology 80: 1406–1414.
5- De Marco J.L., and Felix C.R. 2002. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. BMC biochemistry 3(1): 1-7.
6- De Marco J.L., Lima L.H.C., de Sousa M.V., and Felix C.R. 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys

www.SID.ir

Archive of SID

the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16(4): 383-386.

7- Flores A., Chet I., and Herrera-Estrella A. 1997. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1. Current genetics 31(1): 30-37.
8- Geremia R.A., Goldman G.H., Jacobs D., Ardiles W., Vila S.B., van Montagu M., and Herrera-Estrella A. 1993. Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb I,* related to mycoparasitism by *Trichoderma barrianum.* Molecular Microbiology 8: 603-613.
9- Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C. and Roberts D.W. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarbirium anisopliae* during penetration of host *(Manduca sexta)* cuticle. Journal of Genetic Microbiology 35: 2233-2239.
10- Khan A., Williams K., Molloy M.P., and Nevalainenc H. 2003. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. Protein Expression and Purification 32: 210–220.
11- Khan A., Williams K.L., and Nevalainen H.K. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biological Control 31(3): 346-352.
12- Lopez-Ilorca L.V., Macia-Vicente J.G., and Janssen 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: 51-76.
13- Lopez-Llorca L.V., and Robertson W.M. 1992. Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. Experience Mycology l6*:* 261-267.
14- Mahdikhani Moghadam E., Rouhani H., and Falahati Rastegar M. 2009. Biological control of sugar beet cyst forming nematode with *Trichoderma* under in vitro and green house condition. Journal of Science and Technology Agriculture and Natural Resources 48: 301-312.
15- Mahdikhani-Moghadam E., and Rouhani H. 2012. Effect of isolates of *Trichoderma harzianum*, *T. virens* and *Bacillus subtilis* for controlling *Heterodera schachtii* in field conditions. Journal of Plant Protection 26(1): 75-81.
16- Mai W.F., and Abawi G.S. 1987. Interactions among root-knot nematodes and Fusarium wilt fungi on host plants. Annual Review of Phytopathology 25: 317–338.
17- Mischke S. 1996. Evaluation of chromogenic substrates for measurement of protease production by biocontrol strains of *Trichoderma*. Microbios 87: 175−183.
18- Pinsirodom P., and Parkin K.L. 2001. Lipase Assays. Food Analytical Chemistry C3.1.1-C3.1.13.
19- Rajesh E., Arthe R., Rajendran R., Balakumar C., Pradeepa N., and Anitha S. 2010. Investigation of lipase production by *Trichoderma reesei* and optimization of production parameters. Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry 9(7): 1177-1189.
20- Sahebani N., and Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry 40(8): 2016-2020.
21- Sasser J.N., Carter C.C., and Hartman K.M. 1984. Standardization of host suitability studies and reporting of resistance to root-knot nematodes. Department of Plant Pathology, North Carolina State University: 1-6.
22- Sharon E., Bar-Eyal M., Chet I., Herrera-Estrella A., Kleifeld O., and Spiegel Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91: 687–693.
23- Siddiqui I.A., Amer Zareen M., Javad Zaki M., and Shaukat S.S. 2001. Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javaniva*, Root -knot nematode in the Okra and Mungbean. Pakistan Journal of Biological Sciences 4(7): 846-848.
24- Siddiqui I.A., and Shaukat S.S. 2004. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds in vitro and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology 38(2): 169-175.
25- Suarez B., Rey M., and Castillo P. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin- like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. Applied Microbiology and Biotechnology 65: 46–55.
26- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., and Valero J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical. Enzymology Journal 37: 1-20.
27- Windham G.L., Windham M.T., and Williams W.P. 1986. Effect of *Trichoderma* spp. On maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease Reporter 73: 493–494.

www.SID.ir

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No.4, Winter 2019, P. 363-374

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، ص. ۳۷۴-۳۶۳

Evaluation of some *Trichoderma* spp. Protease and Lipase Activity and Its Effect on Biocontrol of Tomato Root-knot Nematode (*Meloidogyne javanica*)

M. Kavari[1]- E. Mahdikhani-Moghadam[2*]- H. Rouhani[3]

Received: 10-06-2017
Accepted: 28-12-2019

Introduction: Among crop culture, tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) is an important vegetable crop that grown throughout the world in open as well as protected cultivation. Iran ranks sixth among tomato producing countries. One of the biggest challenges in modern agriculture worldwide, is the management of soil-borne plant pathogens, including plant-parasitic nematodes. Among plant parasite nematodes, root-knot nematode genus *Meloidogyne* spp. (RKN) is one of the most important nematodes in a wide spectrum of crops that causes serious damage in most agricultural crops worldwide. The eggshell of root-knot nematode is containing 50% protein, 30% chitin and 20% lipid and Species of *Trichoderma* due to the production of the high level of many hydrolytic enzymes, are used as \ biocontrol agents of plant pathogens.

Material and Methods: In the current study, extracellular protease and lipase activity of 15 isolates of four species of *Trichoderma* spp. including *T. harzianum*, *T. virens*, *T. konigii* and *T. saturnisporum* were investigated to their biocontrol effects on tomato root-knot nematode in the greenhouse. These *Trichoderma* isolates were cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) media for 7 days and were used to prepare inoculation of *Trichoderma*. In order to prepare *Trichoderma* inoculum, we used sterilized wheat as the substrate contains *Trichoderma* fresh culture and after that incubated in 28ºC for 12 days. The *Meloidogyne javanica* pure population was prepared and tomato seedlings were inoculated with 2000 of the fresh egg of nematode and 1×10^7 different *Trichoderma* strain conidia and were kept in greenhouse conditions. The enzyme activity was assessed based on the colorimetric method using a special substrate as the only energy source for *Trichoderma* isolates. We used casein as the substrate for protease and extra-pure olive oil as the substrate for lipase activity assessment.

Result and Discussion: According to the enzyme activity results, the highest protease activity was in the isolates *T. harzianum* BI, *T. virens* T65 and *T. virens* T64 and the lowest protease activity was in isolates *T. harzianum* T16A, *T. saturnisporum* T12 and *T. saturnisporum* T12N, respectively. The highest lipase activity was in *T. harzianum* T19, *T. virens* T6 and *T. virens* T65 and the lowest lipase activity were in *T. harzianum* T14N, *T. harzianum* T16A and *T. harzianum* T16. Based on the greenhouse results, T.BI, T65 and T6 isolates were the highest effective isolates and T12N, T12 and T16 reported as the lowest effective isolates in the biocontrol of root-knot nematode on infected tomato plants. Also, according to the results of correlation between protease and lipase activity and nematode reproduction factor, the correlation coefficient between enzyme activity and nematode reproduction factor for protease activity measured $R^2=0.83$ and for lipase activity measured $R^2=0.42$ which given the constituents of the root-knot eggshell and larvae cuticle that contains high amounts of protein, this is understandable. There are many reports about the effects of protease and chitinase on the induction of resistance against plant pathogens in plants. An investigation on the effect of *Trichoderma* isolates extracellular protease level on the biocontrol ability of these isolates against tomato root-knot nematode showed that the higher number of protease-encoding genes copies increases the biocontrol ability of these isolates.

Conclusion: Root-knot nematode is one of the most important damaging agents on tomato plants. It is difficult to control this endo-parasite nematode because of its wide host range, short life cycle, and high reproductive potential. The activation of the plant's own defense system through biotic and abiotic agents, called elicitors, has been considered as a focus of research only in recent years for the control of plant pathogens. The resulting elevated resistance due to an inducing agent upon infection by a pathogen is called induced systemic resistance (ISR) or systemic acquired resistance (SAR). Several abiotic and biotic agents have been reported to induce resistance against plant-parasitic nematodes. So far, many pieces of research have done on the use of different species of *Trichoderma* as biological control agents of plant pathogens. The ability to produce high amounts of chitinase, protease and glucanase enzymes made this isolates as a biocontrol agent of a wide range of plant pathogens. Overall, there is no sure whether or not a biocontrol agent is successful in controlling a

1, 2 and 3- Ph.D. Student of Plant Pathology and Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mahdikhani-e@um.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

particular pathogen, and many variables influence the success rate of biocontrol agents in natural environments.

Keywords: Enzyme activity, *Trichoderma* spp., Biological control, Root-knot nematode

www.SID.ir