مجله به‌زراعی نهال و بذر
جلد ۲-۲۵ ، شماره ۳، سال ۱۳۸۸

بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه‌فرنگی *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood به وسیله قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در گلخانه و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه

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

حسن ملکی زیارتی[۱]، علی روستایی[۲]، نوازالله صاحبانی[۳]، حسن‌رضا اعتباریان[۴]، حشمت‌الله امینیان[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
۲، ۳ و ۵- استادیار، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران
۴- استاد، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران

تاریخ دریافت: ۸۵/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۷

چکیده

ملکی زیارتی، ح.، روستایی، ع.، صاحبانی، ن.، اعتباریان، ح. ر.، و امینیان، ح. ۱۳۸۸. بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه‌فرنگی *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood به وسیله قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در گلخانه و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه. **مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲-۲۵ (۳):** ۲۷۲ - ۲۵۹.

کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه‌فرنگی *Meloidogyne javanica* به وسیله جدایه BI *Trichoderma harzianum* در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. ریشه‌های گوجه فرنگی با غلظت‌های مختلف قارچ T. harzianum به روش سوسپانسیون اسپور مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها در تشت آلومنیوم محتوی آب ۲۷ درجه سانتی‌گراد فرو برده شد و به گلخانه انتقال داده شدند. در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون قارچ تریکودرما بر قطر گال، میانگین وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی، تعداد توده تخم به ازای هر گیاه و تعداد تخم به ازاء هر توده تخم بررسی گردید. نتایج نشان داد که غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ در مقایسه با غلظت‌های کمتر به طور معنی‌داری موجب کاهش قطر گال، تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم گردید، در حالی که در مقایسه با غلظت‌های بیشتر اختلاف معنی‌دار نداشت ($P\leq0.05$). مایه‌زنی گیاهچه‌ها با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر موجب افزایش مقدار فنل کل در ریشه گیاه گردید و در روز هشتم بعد از مایه‌زنی به حداکثر مقدار رسید. مقدار فنل کل در گیاهچه‌ها در تیمار مایه‌زنی شده با نماتد+ قارچ در مقایسه با گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با نماتد نیز اختلاف معنی‌دار نشان داد ($P\leq0.05$). بر اساس نتایج این بررسی چنین به نظر می‌رسد که قارچ *T. harzianum* می‌تواند است نظام دفاعی گیاه (به ویژه مقدار فنل کل گیاه) را در مقابل نماتد فعال نماید.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، *Meloidogyne javanica*، *Trichoderma harzianum*، کنترل بیولوژیک، فنل کل و القاء مقاومت.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: zia1614@yahoo.com

این مقاله قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

مقدمه

عامل نماتد مولد گره ریشه جنس *Meloidogyne* spp. می‌باشد و دامنه وسیعی از محصولات اعم از سبزیجات، گیاهان زراعی و باغی و علف‌های هرز را آلوده می‌کنند (Jepson, 1987). تا کنون بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی میزبان نماتد شناخته شده‌اند (Pedrosa *et al*., 1996). به دلیل مشکل بودن مدیریت این نماتدها، محققان به دنبال دستیابی به راه‌های مناسب کنترل آنها هستند. در دهه‌های اخیر روش کنترل به وسیله آنتاگونیست‌ها یا کنترل بیولوژیک مطرح شده که فاقد آلودگی زیست محیطی نیز می‌باشند (Jepson, 1987). علیرغم پتانسیل بالای کاربرد این فن‌آوری در کشاورزی و مزایای قابل توجه آن نسبت به برخی روش‌های دیگر مدیریت بیماری‌های گیاهی، کماکان اطلاعات محدودی در این زمینه وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که همواره استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک بومی که قدرت سازگاری با شرایط منطقه را دارا هستند، نتایج بهتری داشته است. گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma*، از جمله قارچ‌هایی هستند که تقریباً در تمام زیستگاه‌های متنوع وجود دارند. قارچ *Trichoderma harzianum* سازوکارهای مختلفی، از جمله تاثیر مستقیم بر نماتد وتخم آنها دارد وعامل مهمی جهت بیوکنترل *M. arenaria* به شمار می‌رود (Windham *et al.*, 1989; Sharon *et al.*, 2001). شارون و همکاران (Sharon *et al*., 2001) نشان دادند گیاهان گوجه فرنگی که با جدایه *T. harzianum* T-203 تیمار شده و در خاک‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه کشت شده بودند، رشدشان افزایش یافته و گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد (بدون قارچ) کاهش یافت. وینندهام و همکاران (Windham *et al*., 1989) گزارش کردند که با تیمار خاک توسط قارچ *T. harzianum* T12 و *T. koningii* تولید توده تخم در نماتد *M. arenaria* کاهش یافت. با بررسی اثر پارازیتیسم مستقیم بین قارچ *T. harzianum* و نماتد مولد سیست طلایی سیب زمینی را در شرایط آزمایشگاهی اثبات و نتیجه گرفتند که قارچ در سیست و تخم داخل آن نفوذ کرده و قادر به از بین بردن لاروهای نماتد می‌باشد (Seiffullah and Thomas, 1996). مطالعه ارتباط متقابل بین میسلیوم قارچ *T. harzianum* و میسلیوم چندین قارچ بیمارگر گیاهی موید قدرت بالای پارازیتیسم قارچ تریکودرما می‌باشد (Elad *et al*., 1980).

مواد فنلی گروهی از ترکیبات با وزن ملکولی پایین می‌باشد که پس از حمله عوامل بیماری‌زا میزان آنها در گیاه افزایش پیدا می‌کند. نقش ترکیبات فنلی از سال‌ها قبل در مقاومت گیاهان به عوامل بیماریزای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است (Kosuge, 1969).

اعتباریان (Etebarian, 1989) تغییرات کمی ترکیبات فنلی در ارقام مختلف جو در خلال رشد قارچ *Puccinia hordei* و ارتباط آنها با مقاومت به بیماری زنگ قهوه‌ای جو را بررسی کرد. نامبرده گزارش نمود که که دو روز بعد از مایه‌زنی با قارچ عامل زنگ قهوه‌ای جو و نگهداری در حرارت ۲۶ درجه سانتی‌گراد، مقدار فنل کل موجود در برگ‌ها در هیچ یک از ارقام با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت. تغییرات ترکیبات فنلی و نقش آنها را در گیاهان آلوده به باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفت و گزارش شده است که تجمع ترکیبات فنلی اغلب در ارتباط با واکنش مقاومت است (Vidhyasekaran, 2002).

بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی روی ارقام مقاوم کاهو (مگنونیت و محلی مراغه) مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی کاهو و رقم حساس آل یبر در ۲۰، ۱۰، ۶، ۳ روز بعد از مایه‌زنی نشان داد که در سه روز بعد از مایه زنی مقدار فنل کل در بافت آلوده در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس افزایش معنی‌دار داشت ($P\leq 0.05$). در صورتی که در سایر مراحل مقدار فنل کل در بافت‌های رقم حساس یک روند افزایش شدیدی در مقایسه با ارقام مقاوم داشت (Dehghani *et al*., 2001).

هدف از اجرای این تحقیق تعیین غلظت مؤثر قارچ *T. harzianum* در کاهش میزان بیماری نماتد ریشه گوجه‌فرنگی *M. javanica* و بررسی تغییرات کمی ترکیبات فنلی در زمانهای مختلف پس از مایه‌زنی در ریشه گوجه فرنگی رقم کینگ استون در آزمایشگاه بود.

مواد و روش‌ها

خالص‌سازی نماتد *M. javanica*

نماتد مولد گره ریشه از بخش نماتدشناسی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شد. با استفاده از مشخصات الگوی انتهای بدن ماده (Pereneal pattern) شناسایی انجام شد. پس از تهیه نمونه گیاهی آلوده به نماتد، با استفاده از روش توده تخم منفرد (Single egg mass) و تکثیرمتوالی آن روی گیاهچه‌های رقم حساس ارلی‌اوربانا (Early urbana) و رماوی‌اف (Roma VF) صورت گرفت. گیاهچه‌ها به مدت ۴۵ الی ۶۰ روز در شرایط مساعد گلخانه نگهداری شدند و پس از تشکیل گال، توده تخم روی ریشه و انتقال مجدد آنها روی گیاهان جدید و چندین دوره متوالی تکثیر روی گوجه‌فرنگی جمعیت کافی نماتد به دست آمد. برای انجام آزمایشات، استخراج تخم و لارو سن دوم با استفاده از روش هوسی و بارکر (Hussay and Barker, 1973) انجام گرفت.

خالص‌سازی قارچ *Trichoderma harzianum*

جدایه قارچ *T. harzianum* Rifai از دکتر روحانی (دانشگاه بوعلی سینا) تهیه و پس از

تـک اسـپور نمـودن روی محـیط سـیب‌زمینـی دکـستروز آگـار تکثیـر شـد و بـا اسـتفاده از لام گلبول‌شمار (هموسیتومتر) غلظت‌های مورد نیـاز در میلی‌لیتر قارچ تهیه شد.

مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما بـر آلـودگی نماتـد *M. javanica* در ریـشه گوجه‌فرنگی در گلخانه

آزمایـشات گلخانـه‌ای تـاثیر غلظـت‌هـای مختلف قارچ تریکودرمـا در قالـب طـرح کـاملاً تـصادفی بـا پـنج تکـرار انجـام شـد. ابتـدا بـذور گوجه‌فرنگی رقم کینـگ استون (King stone) به وسیله وایتکس ۱۰درصد (حاوی پـنج درصـد هیپوکلریـت سـدیم) و بـه مـدت یـک دقیقـه ضدعفونی سطحی شد و پس از شستـشو بـا آب مقطر استریل بذرها در داخل گلدان‌هـای حـاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خـاک مزرعـه و ماسه با نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده در دمای ۸۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه) در اتـوکلاو کـشت گردید. پس از آماده شدن گیاهچه‌ها در مرحلـه چهار برگی از گلدان‌ها با دقت خارج و ریشه‌هـا چنـدین بـار بـا آب شستـشو داده شـد و بـا غلظـت‌هـای 10^3، 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و 10^8 اسپور در میلی‌لیترآب مقطر قارچ تریکودرمـا بـه روش سوسپانسیون اسپور (غوطه‌ور کردن ریـشه گیاهچه‌ها در اسپور قـارچ) بـه مـدت پـنج دقیقـه مایه‌زنی شد و برای چسبیدن بهتر اسـپور از مـاده کربوکسی متیل سـلولز بـه میـزان یـک گـرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانـسیون اسـپور اسـتفاده شـد. سپس در گلدان‌های مخـصوص (ظـروف یکبـار مـصرف) بـه ازای هـر گلـدان یـک بوتـه گوجه‌فرنگـی کاشـته و نماتـد بـا جمعیـت ۲۰۰۰ لارو سن دوم به ازاء هر گیاه مایه‌زنـی شـد (سـه حفـره در اطـراف ریـشه گیـاه ایجـاد شـده و سوسپانسیون نماتد به خاک اضافه شد). گلدان‌ها در تـشت بـزرگ حـاوی آب ۱±۲۷درجـه سانتی‌گراد قرار گرفتند و دمای آب داخل تشت توسط هیتر آکواریـومی تنظیم شـد. میـزان آب داخل تشت به اندازه‌ای بـود کـه وارد گلـدان‌هـا نـشود. میـزان آبـدهی بـه گیاهچـه‌هـای مـورد آزمایش به اندازه مصرف روزانه هر گیاهچه بود (Sahebani, 2003). چهـل و پـنج روز پـس از مایه‌زنی نماتد و قارچ، ارزیابی بیماری بر اسـاس معیارهای زیر صورت گرفت:

۱) میانگین قطر گـال‌هـا: تعـداد بیـست عـدد گال از هر گیاه به طور تصادفی انتخـاب گردیـد و قطر آنها به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد.

۲) میانگین وزن تر ریشه و اندام‌های هـوایی: ریشه و اندام‌های هـوایی گیاهـان آلـوده پـس از شستـشو نمونـه‌هـا روی دسـتمال کاغـذی و در هوای معمـولی آزمایـشگاه خـشک و بـه وسـیله ترازو در آزمایشگاه وزن شد.

۳) میانگین تعداد توده تخم: تعداد توده تخم در ریشه هر گیاه آلوده و در سه تکرار شـمارش ومیانگین‌گیری شد.

۴) میانگین تعداد تخم داخل هر تـوده تخـم: ده عدد توده تخم به ازاء هر گیاه انتخاب و پـس از ضدعفونی سطحی، تخم‌هـا در زیـر بینوکـولر

شمارش گردیدند. شاهد شامل گیاهچه‌هایی هستند که به جای قارچ با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند.

بررسی میزان تغییرات کمی ترکیبات فنلی

بررسی تغییرات فنل کل با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. عامل اول شامل زمان نمونه‌برداری در ده روزمتوالی و عامل دوم شامل نماتد، قارچ و شاهد بود. رسم نمودارها در نرم افزار Excel انجام شد.

ابتدا ریشه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله شش برگی در آب شستشو داده شدند و سپس با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ تریکودرما به روش سوسپانسیون اسپور به مدت پنج دقیقه مایه‌زنی گردیدند و سپس در گلدان (ظروف یکبار مصرف) حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۱:۱:۲) و پاستوریزه (ضدعفونی خاک در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) نشاء گردیدند. گلدان‌ها به تشت حاوی آب با دمای ۱±۲۷درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و به مدت ۱۰روز متوالی و به فاصله ۲۴ ساعت بعد از تیمار گیاهچه‌ها نمونه‌برداری از ریشه انجام شد. در تیمار مایه‌زنی گیاهچه‌ها نماتد با جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دوم به ازای هر گلدان بود. در آزمایش بررسی تغییرات مقدار فنل کل تیمارها به ترتیب عبارتند از ۱-گیاهچه‌های مایه‌زنی با قارچ ۲- گیاهچه‌های مایه‌زنی با نماتد وقارچ در سه تکرار بودند. شاهد به ترتیب ۱- گیاهچه‌های مایه‌زنی با آب مقطر استریل ۲- گیاهچه‌های مایه زنی با نماتد می‌باشند.

استخراج فنل از گیاه

یک گرم بافت ریشه گیاه را در هاون چینی له کرده و ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه کرده و کاملاً مخلوط گردید. عصاره حاصل از دو لایه پارچه ململ عبور داده شدند و در شیشه‌های مک کارتی نگهداری شدند، سپس عصاره به دست آمده در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند و محلول رویی (رونشست) حاصل برای انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان تغییرات مقدار فنل کل

مقدار مواد فنلی موجود در عصاره ریشه‌ها توسط معرف فولین اندازه‌گیری شد (Etebarian, 1989). در لوله آزمایش هفت میلی‌لیتر آب مقطر ریخته، و مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره ریشه به آن اضافه و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد و کاملاً مخلوط گردید. سه دقیقه بعد یک میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع به محتوی لوله اضافه و مجدداً خوب مخلوط گردید. بعد از یک ساعت میزان جذب رنگ در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل اسپکترونیک ۵۰۱ قرائت گردید و برای هر نمونه عصاره میانگین سه جذب نور در

محاسبات منظور گردید (Sahebani, 2003).

تهیه منحنی استاندارد و معادله رگرسیون

ماده کافئیک اسید به عنوان معیار مقایسه مواد فنلی مورد استفاده قرار گرفت (Etebarian, 1989). ده میلی‌گرم کافئیک اسید را در پنج میلی‌لیتر متانول خالص حل کرده و حجم آن با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۸ و ۶،۵،۴،۳،۲،۱،۰,۵، میلی‌لیتر از محلول جداگانه در لوله‌های آزمایش ریخته و حجم آنها با افزودن آب مقطر به ده میلی‌لیتر رسانده شد. به این ترتیب در ۰/۵ میلی‌لیتر از آنها به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم کافئیک اسید وجود داشت. برای صفر کردن دستگاه از محلولی که فاقد کافئیک اسید (Caffeic acid) بود استفاده شد.

نتایج و بحث

مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر آلودگی نماتد مولد گره ریشه

نتایج آزمایش بررسی میزان تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر آلودگی نماتد *M. javanica* نشان داد که غلظت 10^6اسپور در میلی‌لیتر قارچ با اندازه‌گیری گال‌ها توسط کولیس قطر آنها کاهش یافت و میانگین قطر گال‌ها در این غلظت نسبت به غلظت‌های کمتر وشاهد اختلاف معنی‌دار داشت ولی با غلظت‌های بالاتر تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۱). وزن تر ریشه نیز در غلظت 10^6اسپور در میلی‌لیتر قارچ نسبت به غلظت‌های کمتر وشاهد اختلاف معنی‌دار داشت. میانگین توده تخم در هر گیاه و تخم در هر توده تخم در مقایسه با غلظت‌های 10^3، 10^4، 10^5 و شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ولی نسبت به غلظت‌های 10^7و10^8تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل‌های ۱، ۲، ۴ و ۵).

بررسی مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر وزن تر اندام‌های هوایی نشان داد که غلظت 10^6اسپور در میلی‌لیتر قارچ نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (شکل۳).

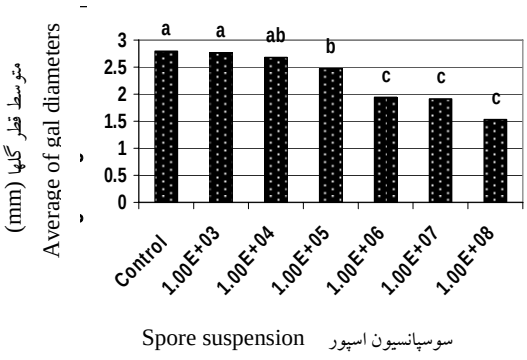
تغییرات مقدار فنل کل

الف – مایه‌زنی گیاه به وسیله قارچ

مقدار فنل کل از روز اول و طی روزهای متوالی در تیمار با شاهد مربوطه اختلاف معنی‌دار داشت و حداکثر میزان آن در روز هشتم بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. در گیاهان شاهد (مایه‌زنی با آب مقطر استریل) تا روز نهم مقدار فنل کل اختلاف معنی‌دار نداشت. ولی در روز دهم اختلاف معنی‌دار بود (شکل۶).

ب- مایه زنی همزمان گیاه با نماتد و قارچ

در تیمار مایه‌زنی گیاه با نماتد+قارچ میزان فنل کل در روزهای اول، دوم، هفتم، هشتم و نهم اختلاف معنی‌دار داشت و در سایر روزها بین شاهد و تیمار اختلاف معنی‌دار نبود. حداکثر میزان آن در روز هشتم بعد از مایه‌زنی مشاهده شد (شکل ۷).



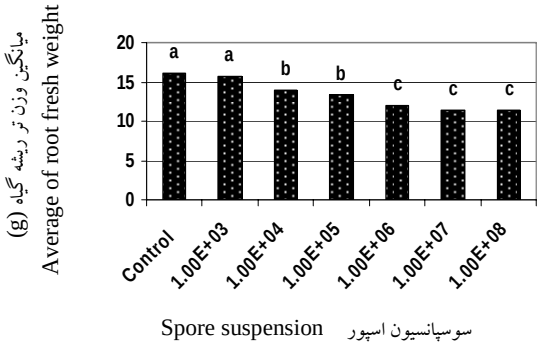
شکل ۱- مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum* بر قطر گال نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی رقم کینگ استون

- ستون‌هایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارد.
- شاهد دراین آزمایش شامل گیاهچه های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به جای قارچ

Fig.1. Comparison of the effects of different concentrations of spore suspension of *Trichoderma harzianum* on average diameter of galls of *Meloidogyne javanica* in tomato cultivar King stone.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

Control treatment : plants inoculated only with double water.



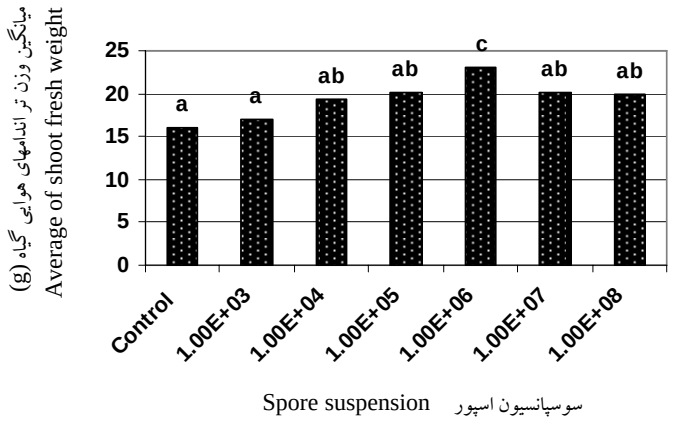
شکل ۲- مقایسه تاثیر غلظت های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum* بر وزن تر ریشه آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی رقم کینگ استون

- ستونهایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارد.
- شاهد دراین آزمایش شامل گیاهچه های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به جای قارچ

Fig.2. Comparison of the effects of different concentrations of spore suspension of *Trichoderma harzianum* on average root fresh weight infected dy *Meloidogyne javanica* in tomato cultivar King stone.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

Control treatment : plants inoculated only with double water.



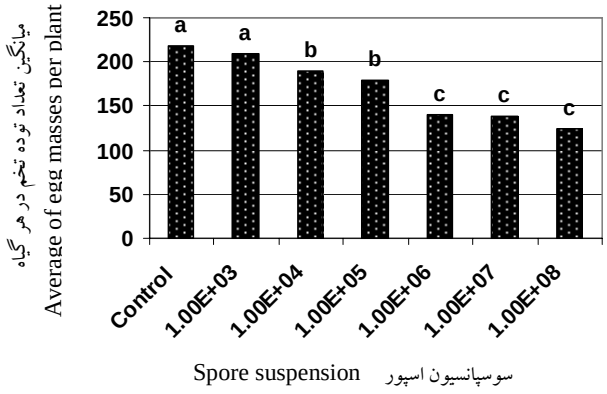
شکل ۳- مقایسه تاثیر غلظت های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum* بر وزن تر اندام های هوایی آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی رقم کینگ استون

- ستون هایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارد.
- شاهد دراین آزمایش شامل گیاهچه های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به جای قارچ

Fig.3. Comparison of the effects of different concentrations of spore suspension of *Trichoderma harzianum* on average shoot weight infection of *Meloidogyne javanica* in tomato cultivar King stone.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

Control treatment: plants inoculated only with double water.



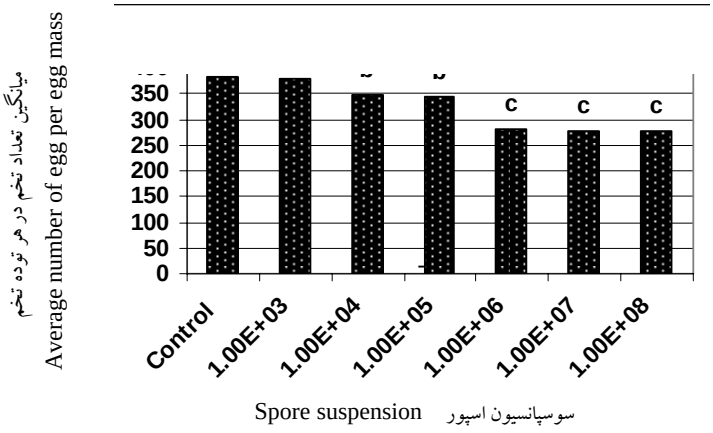
شکل ۴- مقایسه تاثیر غلظت های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum* بر میانگین تعداد توده تخم نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی رقم کینگ استون

- ستون هایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارد.
- شاهد دراین آزمایش شامل گیاهچه های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به جای قارچ

Fig.4. Comparison of the effects of different concentrations of spore suspension of *Trichoderma harzianum* on average number of egg mass *Meloidogyne javanica* in tomato cultivar King stone.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

Control treatment: plants inoculated only with double water.



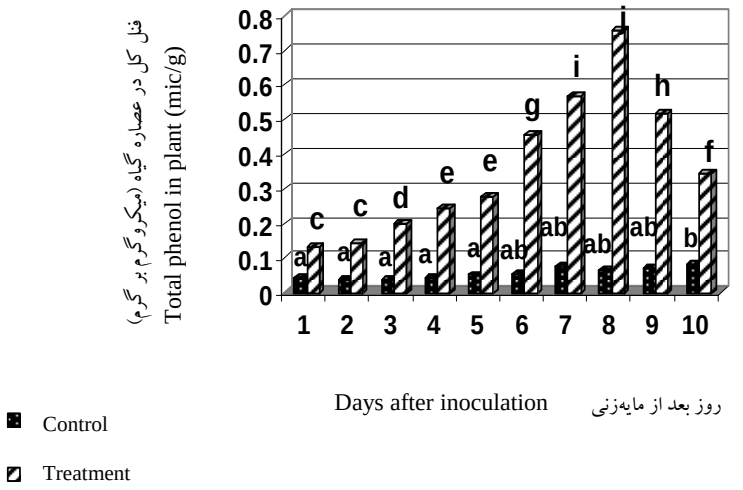
شکل ۵- مقایسه تاثیر غلظت های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum* میانگین تعداد تخم داخل هر توده تخم نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی رقم کینگ استون

- ستون هایی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارد.
- شاهد دراین آزمایش شامل گیاهچه های مایه زنی شده با آب مقطر استریل به جای قارچ

Fig.5. Comparison of the effects different concentrations of spore suspension of *Trichoderma harzianum* on average number of egg per each egg mass *Meloidogyne javanica* in tomato cultivar King stone.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

Control treatment : plants inoculated only with double water.



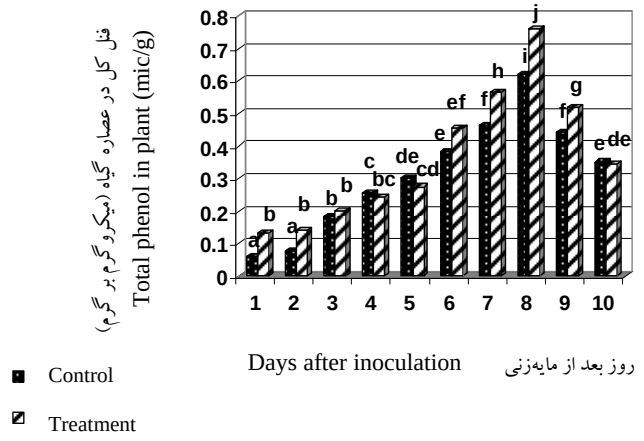
شکل ۶- میزان فنل کل درعصاره گوجه فرنگی رقم کینگ استون مایه زنی شده با قارچ *Trichoderma harzianum*

- اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند.
- شاهد گیاهانی هستند که با آب مقطر استریل مایه زنی شدند.

Fig.6. Total phenol on tomato cultivar King stone inoculated with *Trichoderma harzianum*.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.

Control treatment : plants inoculated only with double water



شکل ۷- میزان فنل کل در عصاره گوجه فرنگی رقم کینگ استون مایه زنی شده با نماتد *Meloidogyne javanica* و قارچ *Trichoderma harzianum*

- اعدادی که با حروف یکسان نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند.
- شاهد گیاهانی هستند که با نماتد مایه زنی شدند.

Fig.7. Total phenol in tomato cultivar King stone inoculated with *Meloidogyne javanica* plus *Trichoderma harzianum*.

Bars with similar letters are not significantly different at the 5% level according to Duncan's Multiple Range Test.
Control treatment: plants inoculated only with nematode.

بررسی نتایج آزمایش میزان تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر نماتد *M. javanica* نشان داد که قارچ تریکودرما قادر است به میزان قابل توجهی بر فعالیت نماتد مولد گره ریشه شامل ایجاد گال روی ریشه‌ها، تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم موثر باشد. با توجه به چگونگی فعالیت قارچ و نماتد و ارتباط متقابل آنها با گیاه، به نظر می‌رسد که قارچ *T. harzianum* به نحوی فعالیت نماتد را در داخل گیاه دچار محدودیت نماید، به طوری که نه تنها میزان ظهور گال روی ریشه کاهش یافت بلکه تعداد توده تخم وتعداد تخم داخل هر توده تخم نیز کاهش یافت. بنابراین این احتمال وجود دارد که قارچ نظام دفاعی گیاه را به نحوی تحریک نماید. میزان کاهش فعالیت نماتد ارتباط مستقیمی با غلظت سوسپانسیون اسپور قارچ دارد. با این وجود تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم در تیمار 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قارچ با اختلاف معنی‌دار نسبت به غلظت‌های کمتر کاهش یافت، ولی غلظت‌های بالاتر بدون اختلاف معنی‌دار بودند (شکل‌های ۴ و ۵).

نتایج تاثیرغلظت‌های متفاوت قارچ تریکودرما بر میانگین قطر گال‌های نماتد نشان داد که در غلظت موثر اندازه قطر گال‌های ریشه در مقایسه با سایر غلظت‌ها و شاهد تفاوت معنی‌دار داشت (شکل ۱) و میزان آنها روی ریشه کاهش یافت. احتمالاً قارچ

تریکودرما با کلونیزاسیون محیط ریزوسفر مانع گسترش نماتد به داخل بافت‌های داخلی ریشه شد که با نتایج سایر محققان (Harman, 2000; Sharon *et al.,* 2001; Harman *et al.,* 2004) مشابهت دارد.

نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما روی وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی نشان‌دهنده آن است که کاهش وزن ریشه در غلظت موثر قارچ، ناشی از کاهش تعداد گال ایجاد شده روی ریشه گوجه‌فرنگی بود که با نتایج آزمایشات انجام شده توسط شارون و همکاران (Sharon *et al.,* 2001) مشابهت دارد. نتایج تاثیر قارچ تریکودرما بر توده تخم و تخم داخل هر توده تخم نشان داد (شکل ۴) که در غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر قارچ قطر گال‌های ریشه کاهش یافت و به نوبه خود تعداد توده تخم ایجاد شده روی این گال‌ها نیز کاهش یافت وبا سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار داشت. به نظر می‌رسد که نماتد وارد ریشه شدند ولی قادر به تولید زیاد توده تخم نبودند (احتمالاً قارچ تریکودرما باعث تحریک و القاء سنتز ترکیبات دفاعی در گیاه شد) (شکل‌های ۶ و ۷). اگر چه چگونگی تاثیر قارچ بر تخم نماتد بررسی نشد ولی براساس کارهای انجام شده توسط شارون و همکاران (Sharon *et al.,* 2001) وجود کیتین در پوسته تخم نماتدسوبسترای آنزیم کیتیناز می‌باشد که توسط قارچ *T. harzianum* ترشح می‌شود. به طوری که تحقیقات نشان داده است که قارچ *T. harzianum* قادر به نفوذ به داخل سیست و پارازیته نمودن تخم‌ها ولاروهای نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی *Globodera rostochiensis* می‌باشد (Seifullah and Thomas, 1996). با توجه به نتایج حاصل می‌توان چنین استنباط کرد که غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر قارچ تریکودرما به عنوان یک غلظت مؤثر در کنترل ومبارزه با نماتد مولد گره ریشه گوجه‌فرنگی در آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شود.

مقدار فنل کل در گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با قارچ در غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر نشان‌دهنده آن است که قارچ تریکودرما باعث افزایش سنتز و القاء ترکیبات فنلی در گیاه شد و حداکثر مقدار فنل در روز هشتم، به مقدار ۰/۷۵۹ میکروگرم بر گرم عصاره گیاه بود (شکل ۶) و چنین به نظر می‌رسد که با نفوذ قارچ به داخل بافت ریشه سنتز مواد فنلی از همان روز اول افزایش یافت. از نتایج مقدار فنل کل در گیاه مایه‌زنی با نماتد + قارچ (به میزان ۰/۷۶ میکروگرم بر گرم عصاره گیاه) چنین استنباط می‌شود که قارچ تریکودرما می‌تواند ترکیبات فنلی را در بافت گیاه القاء نماید و با نفوذ نماتد به داخل بافت گیاه و فعالیت آن به ویژه با شروع تغذیه سنتز ترکیبات فنلی افزایش یافت که با نتایج هارمن (Harman ,2000) همسو می‌باشد.

در ارتباط متقابل نماتد *Rhadopholus similis* غلظت بالای ترکیبات

فنلی از جمله ۳ـ هیدروکسی تیرامین (dopamine) قبل از مایه‌زنی در ریشه گیاهان سالم وجود داشته‌اند ولی با مایه‌زنی نماتد میزان آنها افزایش می‌یابد (Valette *et al*., 1998). این محققین با انجام مطالعات بافت‌شناسی نشان دادند که در ریشه‌های سالم نیز سطح بالایی از لیگنین، فلاونوئیدها، دوپامین، کافییک‌استر، فرولیک اسید در ارتباط با نفوذ نماتد به ریشه گیاه در ارقام مقاوم موز تجمع می‌یابند (Valette *et al*., 1998). وقوع پدیده ایجاد مقاومت القایی سیستمیک و القاء ترکیبات فنلی در گیاهان توتون و گوجه‌فرنگی بر اساس تحقیقات انجام شده نشان داد که این سازوکارها وابسته به تولید پروتئین‌های اختصاصی هستند که در ارتباط با پدیده بیماریزایی و سیستمیک شدن در گیاه تشکیل می‌شوند (Vanloon and Vanstrien, 1999). از طرفی برخی محققین پدیده مقاومت القایی سیستمیک را به سایر عوامل ارتباط داده‌اند که در برخی فرایندهای اثر متقابل بیمارگر×میزبان به وجود این ترکیبات مانند اسید جاسمونیک، اتیلن و اسید سالیسیلیک پی بردند (Vanloon and Vanstrien, 1999). عکس‌العمل بافت گیاه در مقابل حمله بیمارگرها که منجر به افزایش مقدار مواد فنلی می‌شود به موازات افزایش تنفس و پروتئین در گیاه صورت می‌گیرد که این افزایش سنتز فنل در نتیجه فعالیت غیرعادی بافت‌های مورد حمله گیاه در برابر بیماری می‌باشد (Vidhyasekaran, 2002).

با توجه به نتایج حاصل چنین پیشنهاد می‌شود که می‌توان از قارچ تریکودرما *T. harzianum* در غلظت موثر 10^6 اسپور در میلی به عنوان عامل کنترل‌کننده نماتد ریشه گوجه‌فرنگی *(Meloidogyne javanica)* در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای استفاده کرد. احتمالا این قارچ به عنوان القاءکننده و سنتز ترکیبات دفاعی از جمله فنل کل عمل می‌کند و موجب تحریک نظام دفاعی گیاه نیز می‌شود.

References

Brants, A., Brown, C. R., and Earle, E. D. 2000. *Trichoderma harzianum* endochitinase does not provide resistance to *Meloidogyne hapla* in transgenic tobacco Journal of Nematology 32: 289-296.

Dehghani, A., Etebarian, H. R. and Alizadeh, A. 2001. Studies on histology and changes in phenolic compounds of lettuce resistance and susceptible varieties during the development of *Fusarium oxysporum.* Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress. Isfahan. Pp. 100.

Elad, I., Chet, I., and PandKatan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biological agent effective against *Sclerotinia rolfsii* and *Rhizoctinia solani.* Phytopathology 70: 119-121.

Etebarian, H. R. 1989. Studies on quantitative changes in phenolic compounds of barley varieties during development of *Puccinia hordei* and the relationship between these substances and brown rust resistance in barley. Iranian Journal of Plant Pathology 24: 61-69.

Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions dervied from research on *Trichoderma harzianum* T–22. Plant Disease 84. 377–393.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma species*-opportunistic, avirulant plant symbionts.Nature Reviews Microbiology 2: 43-56.

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

Hussey, R. S., and Barker, K. R. 1973. A compersion of methods of collecting. inocula of *Meloidogyne* spp. including a new tcchnique .Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.

Jepson, S. B. 1987. Identification of root-knot nematodes *Meloidogyne* species. C. A. B International Wallingford, UK. pp. 265.

Kosuge, T. 1969. The role of phenolics in host response to infection . Annual of Review Plant Pathology 25: 195-221.

Kubicek, C. P. and Harman, G. E. 1998. *Trichoderma and Gliocladium* (Vol. 1, 2). Taylor and Franics Ltd. pp. 654.

Pedrosa, E. M. R., Hussey R. S., and Boerma, H. R. 1996. Cellular responses of resistant and susceptible soybean genotypes infected with *Meloidogyne arenaria* races1and 2. Journal of Nematology 28: 225-232.

Sahebani, N. 2003. Interaction between root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* and study on changes of some biochemical defense mechanisms in tomato. Ph. D. Thesis, the University of Tehran. Pp. 250.

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.

Siffullah, and Thomas, B. J. 1996. Studies on the parasitism of*Globodera rostochiensis* by *Trichoderma harzianum* using low temprature scanning electron microscopy. Asian Journal of Nematology 6: 117-122.

Valette, C., Andary, C., Geiger, J. P., Sarah, J. L., and Nicol, M. 1998. Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Rhadopholus similis*. Phytopathology 89: 1141-1148.

Van loon, L. C., and Vanstrien, E. A. 1999. The families of pathogensis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1type Proteins Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.

Vidhyasekaran, P. 2002. Bacterial Resistance in Plants:Molecular Biology and Biotechnological Applications. Food Products Press. An Imprint of The Haworth Press, Inc. pp. 439.

Windham, G. I., Windham, M. T., and Williams, W. P. 1989. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease 73: 493.