

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 پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۶

۶۲-۱۹(۱)

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳۰

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 $1/5 \times 10^{11}$ در هر گرم محیط کشت، ۸۷/۶۶ درصد مرگ لارو سن دوم نماتد و کاهش تفریح تخم به میزان ۱۳/۶۶ درصد 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 در شرایط گلخانه داشته و شاخص گال در این تیمار ۰/۶ بود.

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

مقدمه

(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 به‌شمار 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 قارچ‌ها همچنین قادر به القای مقاومت در گیاهان در مقابل

نماتدهای ریشه‌گرهی *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 به دلیل اثرات مخربی که بر محیط زیست و سلامت انسان داشتند، محدود شده‌است

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 *Trichoderma 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 تفریح 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 میلی لیتر 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، به روش بارکر (Barker, 1985) انجام شد. لاروها روزانه پس از تفریح تخم به وسیله الک ۵۰۰ مش جدا سازی شد. برای انجام آزمایش به چاهکهای ظروف کشت بافت ۲۴ خانه ای، پنج میلی لیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد لارو

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

بررسی تأثیر جدایه ی *T. harzianum* BI بر میزان کاهش تفریح تخم نماتد *Meloidogyne javanica* نشان داد که میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز قارچ با میزان کاهش تفریح تخم های نماتد ارتباط مستقیم دارد (Sahebani & Hadavi, 2008). با توجه به ترکیب پوسته تخم نماتد که بخش زیادی از آن را کیتین تشکیل می دهد، بالا بودن میزان فعالیت آنزیمی کیتیناز افزایش میزان تخریب و پارازیت شدن تخمها توسط جدایه های 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-cucumerinum* در گیاه خیار شد (Alizadeh, 2013).

توجه به محیط رشد و منبع غذایی *Trichoderma* برای بهبود کارایی بیوکنترل آن و تولید زیست توده آنتاگونیست با کیفیت و کمیت مطلوب ضروری به نظر می رسد. به طور کلی، فرمنتاسیون جامد و فرمنتاسیون مایع دو روش عمده تولید اینوکلوم جدایه های *Trichoderma* هستند. در فرمنتاسیون جامد، قارچ روی انواع دانه های غلات، حبوبات و پسماندهای جامد کشاورزی رشد می کند. محصول نهایی این سیستم بیشتر به صورت مستقیم در گلخانه یا مزرعه برای کاهش و جلوگیری از رشد اینوکلوم بیمارگرهای خاکزاد به کار می رود. (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 ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* و یافتن بستر غذایی جامد مناسب بود که باعث حداکثر میزان تولید اسپور، تولید آنزیم کیتیناز و همچنین حداکثر کارایی در کنترل نماتد ریشه گرهی *M. javanica* می شود.

در فلاسک های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری مانند روش-های قبل به میزان 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 مقطر سترون 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 ملامل عبور داده شد تا تنها سوسپانسیون اسپور باقی بماند. به منظور بررسی اثر محیط کشت های مختلف بر میزان مرگ و میر لارو سن دوم و تفریح تخم نماتد، از روش مایر و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد و درصد مرگ و میر لارو سن دوم و در صد تفریح 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 روش های قبل به میزان هفت گرم بسترهای کشت جامد مختلف در فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد (Zhang et al., 2014). سنجش آنزیم کیتیناز بر اساس روش میلر (۱۹۵۹) انجام شد. در این آزمایش از تخم نماتد به عنوان منبع کیتین استفاده شد. برای انجام آزمایش به چاهک های ظروف کشت بافت ۲۴ خانه ای، 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 $4/5 \times 10^6$ (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 به عنوان استاندارد استفاده شد. هر فعالیت آنزیمی عبارت است از مقدار آنزیمی که می تواند در طول یک دقیقه، یک میکرومول از N-acetylglucosamine را آزاد کند. میزان تولید آنزیم طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه گیری شد.

نماتد اضافه شده و سپس پنج میلی لیتر سوسپانسیون اسپور *T. harzianum* Tr6 به غلظت $4/5 \times 10^6$ (spore/ml) اضافه شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای نمونه شاهد پنج میلی لیتر 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 تفریح 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 مایه زنی جدایه *Trichoderma harzianum* Tr6

فلاسک های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ گرم از سه بستر کشت جامد سبوس گندم یا دانه ی 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 $4/5 \times 10^7$ (spore/ml) تهیه شد و به میزان ۱۰ میلی لیتر 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 روشنائی قرار گرفت (Zhang et al., 2014).

تعیین جمعیت اسپور تولیدی جدایه قارچ

Trichoderma harzianum Tr6 در بسترهای جامد

یک گرم از هر بستر را داخل لوله فالدکون سترون ریخته و سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به لوله فالدکون اضافه کرده و به مدت سه دقیقه روی ورتکس با دور بالا قرار داده شد. سپس سوسپانسیون اسپورهای حاوی محیط کشت از پارچه ملامل 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 تفریح تخم نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*

اثر جدایه قارچ *Trichoderma harzianum* Tr6 روی مرگ و میر لارو سن دوم و تفریح 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 تفریح تخم نماتد به میزان ۲۳ درصد شد که نسبت به شاهد در سطح یک درصد تفاوت معنی داری 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 (%) |
|----------------------------------|---------------|------------------|
| <i>Trichoderma harzianum</i> Tr6 | 23 b | 71/33a |
| Control | 83 a | 11/6b |

تعیین جمعیت اسپور *Trichoderma harzianum* Tr6 در بسترهای جامد

میزان اسپوردهی *Trichoderma harzianum* Tr6 در محیط کشت‌های مختلف در (شکل ۱) نشان داده شد. بررسی میزان اسپوردهی *Trichoderma harzianum* Tr6 نشان داد که بیشترین اسپوردهی مربوط به محیط کشت حاوی دانه ارزن با میزان $(8 \times 10^{11} \text{ spore/g})$ است. پس از آن به ترتیب دانه گندم و سبوس گندم با میزان اسپور 3×10^{11} و $1/5 \times 10^{11}$ (spore/g) قرار دارند. بین تمامی بسترهای کشت و نمونه شاهد (PDA) در سطح پنج درصد اختلاف معنی دار وجود دارد.

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

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

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

برای بررسی میزان تأثیر جدایه قارچ *Trichoderma 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 به غلظت $4/5 \times 10^6$ (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، وزن تر 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.

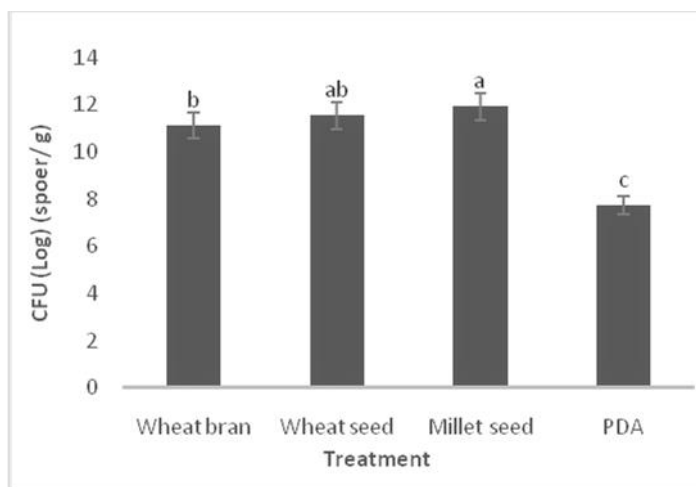
آنالیزهای آماری

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

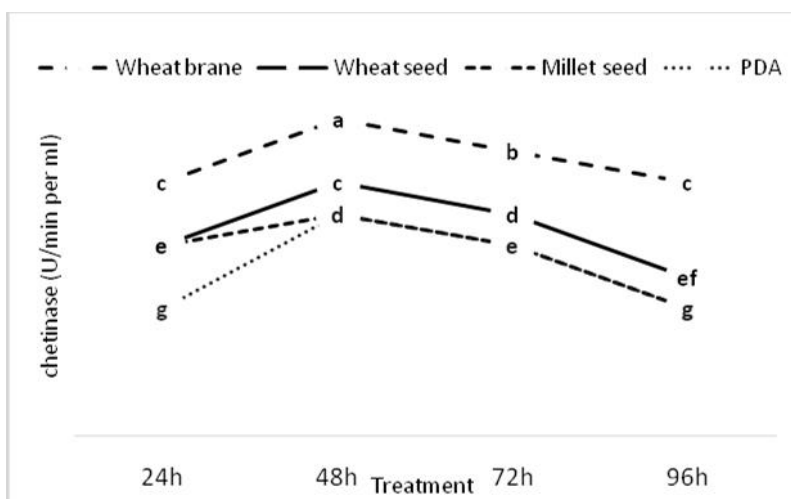
اثر بسترهای غذایی مختلف بر میزان تولید کیتیناز
 نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید آنزیم ۴۸ ساعت پس از اثر آنتاگونیست بر تخم نماتد مشاهده شد و پس از آن میزان تولید آنزیم کاهش یافته است. نتایج نشان داد که بسترهای جامد بر میزان تولید آنزیم اثر داشته است. بیشترین آنزیم مربوط به تیمار سبوس گندم تریکودرما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

پس از سبوس گندم دانه ارزن و دانه گندم به ترتیب به میزان ۸۱/۳ و ۷۵/۶ درصد باعث مرگ و میر لاروسن دوم شده اند (جدول ۲). نتایج حاصل از تأثیر بسترهای غذایی مختلف حاوی *T. harzianum* Tr6 روی درصد تفریح تخم نماتد، نشان داد که کمترین تفریح تخم پس از ۷۲ ساعت با میزان ۱۳/۶۶ درصد توسط محیط کشت حاوی سبوس گندم است همچنین اختلاف معنی داری 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 تفریح تخم نماتد شده اند (جدول ۲).



شکل ۱- 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 $P=0.01$.



شکل ۲- 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 $P = 5\%$.

نتایج گلخانه‌ای نشان داد کاربرد بسترهای غذایی مختلف باعث کاهش خسارت نماتد ریشه‌گرهی روی گوجه‌فرنگی شد. بررسی‌ها نشان داد تیمار سبوس گندم-تريکودرما 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 به میزان ۰/۶ نسبت به تیمار شاهد (۲/۶) شده و باعث افزایش شاخص‌های رشدی (طول و وزن گیاه) گیاه گوجه‌فرنگی (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 به میزان ۷/۳۴ و ۱/۸۴ گرم نسبت به شاهد ۴/۶۲ و ۰/۷۴ گرم) شد (جدول ۳).

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 گوجه‌فرنگی در گلخانه

جدول ۳- 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 height (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 |

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 پارازیت 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 آنزیم‌ها باشد (Khan & Saxena, 1997). با توجه به وجود کیتین در لایه‌های میانی پوسته‌ی تخم نماتد با ضخامت ۰/۴ میکرومتر، به نظر می‌رسد

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-cucumerinum* مقاومت القایی مؤثری نشان دهد (Alizadeh et al., 2013).

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 می‌توان برای تولید آنزیم استفاده کرد (Ellaiah et al., 2002). سبوس گندم را می‌توان به عنوان القاء برای بسیاری از آنزیم‌ها مانند زایلانیداز، گلوکوزیداز، آمیلاز، پروتاز، آنزیم پکتولیتیک، گالاکتوزیداز آلفا، لیپاز، انورتاز و فیتاز استفاده کرد (Soares et al., 2010؛ Javid et al., 2011). 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 می‌کند 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 به میزان 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 آنزیم‌هایی مثل کیتیناز، پراکسیداز و غیره شد و گیاهان گوجه فرنگی که با این جدایه تیمار شده و در خاک‌های 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).

T. harzianum BI با تولید آنزیم کیتیناز اثر خود را بر بازدارندگی از تفریح 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 تفریح تخم نماتد (۲۳ درصد) می‌باشد. بنابراین انبوه‌سازی این دو با مواد ارزان قیمت روشی بسیار مناسب و مقرون به صرفه 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 به صرفه برای تولید این قارچ‌ها 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، ویژگی‌های فیزیکی سبوس گندم نیز نقش حیاتی در فرآیند تخمیر بازی می‌کند، که به توانایی سبوس به حفظ رطوبت در محیط کشت جامد برمی‌گردد. این توانایی سبوس گندم باعث رشد قارچ همانند شرایط طبیعی می‌شود. سبوس گندم به تنهایی یک بستر مناسب برای رشد قارچ‌های *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma koningii* و *Trichoderma viride* 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. بررسی‌ها نشان داد سبوس گندم، دانه گندم و دانه ارزن با تولید اسپور قارچ به ترتیب با میزان $10^{11} \times 1/5$ ، $10^{11} \times 3/4$ و $10^{11} \times 8/2$ (spore/g) پتانسیل بالایی در تولید اسپور داشتند. سبوس گندم همراه با دانه

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.

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

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., Brown, 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-Jarana, 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 Gubitx, G.M. 2000. Production of chitinase and beta-1, 3- glucanase by *T. harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium 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.

- 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 endogenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treb.) 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-Ilorca L.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., Roustaeae, 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 sterilized rice. Scientia Agricola, 64: 641–644
- Van Loon, L.C. & Vanshrien, 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.

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 nematode and 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 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
