بررسی آزمایشگاهی اثرات ضد قارچی فراورده‌های مایع دو گونه کرم خاکی (*Eisenia foetida,Lumbericus luberus*) بر علیه تعدادی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

مهسا رستمی*[1]، مریم پیرایش[1]، مجید اولیا[1]، مهران عربی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه شهرکرد ۱،۲- استادیار و دانشیار دانشگاه شهرکرد

*Mahsarostami127@gmail.com

چکیده

امروزه کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با هدف کاهش اثرات خطرناک سموم شیمیایی از جمله تهدید سلامت بشر، آلودگی محیط زیست، از بین بردن موجودات غیر هدف و پیدایش عوامل بیماری‌زای مقاوم یک اولویت می‌باشد. در این راستا استفاده از پتانسیل ضد میکروبی فراورده‌های کرم خاکی طی سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه اثرات بازدارندگی سه فراورده‌ی مایع دو گونه کرم خاکی مختلف (*Eisenia foetida, Lumbericus luberus*) شامل ورم‌تی، ورمی‌واش، سلوم بر علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی: *Fusarium spp., Botrytis cinerea, Alternaria alternata, Aspergilus niger, Cladosporium spp., Rhizoctonia solani, Penicilium spp.,Verticillium spp.* در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید. نتایج این آزمون نشان داد که هر سه فراورده‌ی مایع دارای خاصیت بازدارندگی رشد در محیط آزمایشگاهی علیه تمام قارچ‌ها می‌باشد. بر اساس تحلیل آماری تمام فراورده‌های مایع کرم *Lumbericus luberus* ودر مرحله بعدی فراورده‌های کرم *Eisenia foetida* بیشترین اثر را داشتند. نتایج کلی این تحقیق حاکی از پتانسیل بالای فراورده‌های کرم خاکی در کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت ضد قارچی، قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، *Eisenia foetida*، *Lumbericus luberus*، فراورده‌های مایع کرم خاکی

مقدمه

با روند فزاینده‌ی افزایش جمعیت در جهان، تامین امنیت غذایی برای این جمعیت مستلزم توسعه بیشتر در بخش کشاورزی خواهد بود. در این راستا عوامل محدود کننده‌ای وجود دارد. یکی از مهمترین این عوامل، آفات و امراض می‌باشند. استفاده مکرر و بی‌رویه از ترکیبات شیمیایی، علاوه بر آلودگی محیط زیست، موجب بروز پدیده مقاومت در برابر آفت‌کش‌ها شده و در نتیجه پتانسیل خسارت آفرینی عوامل بیماری‌زای گیاهی را به شدت افزایش می‌دهد.

استفاده از فراورده‌های کرم خاکی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی یکی از راههای کاهش مخاطرات زیست محیطی است، در این راستا، پژوهشگران زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و حشره‌کشی این فراورده‌ها پرداخته‌اند.

کرم‌های خاکی با هضم و عبور خاک و مواد آلی از روده خود و دفع آن‌ها باعث افزایش بیوماس و افزایش جمعیت باکتری‌های مفید خاک می‌گردند. در این میان باکتری‌های کیتینولیتیک و تعدادی از استرپتومایسس‌ها و اکتینومیست‌ها، بر روی دیواره‌ی سلولی قارچ-های پاتوژن گیاهی به عنوان کیتیناز و آنتی‌بیوتیک تاثیر می‌گذارد(Yu et al, 2008) . همچنین این باکتری‌ها به عنوان ممانعت کننده از رشد قارچ‌های پاتوژن گیاهی معرفی شده‌اند(Hoster et al, 2005). توانایی کنترل *Botrytis cinerea* توسط عصاره‌ی ورمی کمپوست توسط Mequilkew و همکارانش در سال ۱۹۹۴ گزارش شد. پتانسیل تعداد زیادی از باکتری‌های کیتینولیتیک، برای کنترل بیولوژی بیماری‌های گیاهی با عامل قارچی گزارش شده است که در فراورده‌های کرم خاکی وجود دارد(Hoster et al., 2005). اکثر این باکتری‌های جدا شده مربوط به گونه‌های استرپتومایسس می باشد که توانایی قارچ‌کشی دارند(Kawase et al., 2006). .

این پژوهش با هدف بررسی فعالیت ضد قارچی فراورده‌های مایع دو گونه کرم خاکی (*Eisenia foetida* و *Lumbericus luberus*) شامل ورم‌تی، ورمی‌واش و سلوم بر بازدارندگی رشد تعدادی از قارچ‌های بیماری زای گیاهی در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از هشت جدایه قارچی *Fusarium spp., Botrytis cinerea, Alternaria alternata, Aspergilus niger, Cladosporium spp., Rhizoctonia solani, Penicilium spp., Verticillium spp.* که بیماری‌زایی آن‌ها تایید شده بود، استفاده شد. جدایه ورتیسیلیوم از گیاه پنبه و جدایه فوزاریوم از ریشه نخود جدا سازی شد. سایر جدایه‌ها از آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان دریافت گردید.

۱- جهت تولید فراورده‌های مایع کرم خاکی در ابتدا اقدام به نمونه‌برداری و شناسایی کرم‌های خاکی بر اساس کلید مرفولوژی Key شد. دو کرم خاکی *Eisenia foetia* و *Lumbericus luberus* شناسایی وجهت تولید فراورادهای مایع مورد استفاده قرار گرفت.

۱-۱تهیه ورمی‌واش: برای تهیه آن کرم‌ها را از توده خاک جدا شد. پنجاه گرم کرم را در ششصد میلی‌لیتر آب ریخته و به مدت سه الی پنج دقیقه در سه نوبت به صورت دورانی همزده می‌شود. سپس کرم‌ها جدا و به بستر کشت منتقل می‌گردد. مایع زرد رنگ حاصل تحت عنوان ورمی‌واش مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۱-۲ تهیه ورم‌تی: برای تهیه ورم‌تی یا چای کمپوست دویست گرم ورمی‌کمپوست خشک شده را در یک پارچه ظریف توری مانند در داخل یک لیتر آب قرار داده و این ظرف را به مدت سه الی شش روز در دمای اتاق قرار می‌دهیم، و به منظور فعال سازی جمعیت هوازی میکروبی مفید این ترکیب عملیات هوادهی در مدت یک روز انجام می‌شود.

۱-۳ تهیه سلوم: بعد از جداسازی و شست‌وشوی کرم‌های خاکی، حدود پنجاه گرم از آنها را وزن می‌کنیم. به ازای هر یک گرم از کرم‌های خاکی دو میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی در داخل ظرف ریخته و با استفاده از ابزار شوک الکتریکی ۹ ولتی هفت مرتبه محلول محتوی کرم را به مدت سه ثانیه در هر بار شوک وارد می‌کنیم. حاصل کار محلول زرد رنگ محتوی ترکیبات سیستم گوارشی کرم خاکی است.

۲- بررسی اثر فراورده‌های کرم خاکی در جلوگیری از رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی:

۲-۱ طرح آزمایشی: این سری از آزمایش‌ها به صورت یک طرح کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل با دو فاکتور نوع کود و نوع قارچ با چهار تکرار انجام شد.

۲-۲ آماده کردن محیط‌های کشت حاوی کود: این آزمایش‌ها به روش اختلاط کود با محیط کشت انجام گرفته است. درون هر پتری ده میلی‌لیتر محیط کشت PDA و پنج میلی‌لیتر از کود ریخته شده است. در ابتدا محیط کشت در اتوکلاو به مدت بیست دقیقه قرار می‌دهیم. پیش از مخلوط کردن کود و محیط کشت ابتدا کودها جهت یکنواخت شدن محیط از صافی می‌گذرانیم. به این ترتیب محیط کشت مخلوط که حاوی کود وPDA است تهیه و درون پتری‌های نه سانتی‌متری ریخته شد.

۲-۳ انتقال جدایه‌های قارچی بر روی محیط کشت حاوی کود: جهت بررسی واکنش قارچ در مقابل کود به کمک یک چوب پنبه سوراخ کن دیسک‌های به قطر شش میلی‌متر از حاشیه کلنی‌های در حال رشد قارچ عامل بیماری برداشته و با رعایت شرایط استریل به صورت واژگون در مرکز پتری‌های حاوی محیط کشت واجد کود و نیز پتری شاهد قرار می‌دهیم.

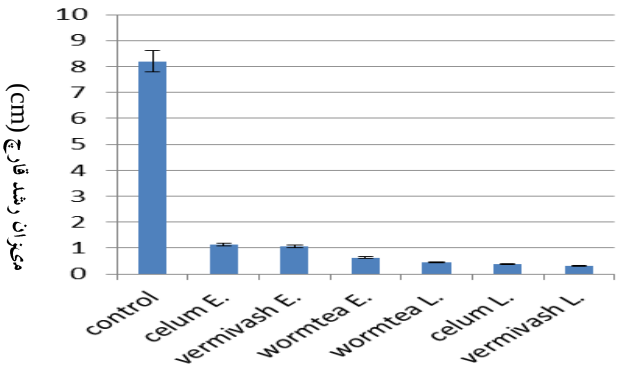
۴-۲اندازه‌گیری قطر کلنی قارچ عامل بیماری بر روی محیط کشت حاوی کود: پس از انتقال قارچ‌های عامل بیماری به محیط کشت مورد بررسی، پتری‌ها در درون انکوباتور با دمای ۱± ۲۶ انتقال یافته و اندازه‌گیری رشد شعاعی قارچ تا زمانیکه نمونه کنترل تمام پتری را پر نماید، صورت می‌پذیرد. پس از آن محاسبه میانگین رشد آزمون LSD در سطح α =1% انجام و طبقه‌بندی تیمارها صورت گرفت.

بحث ونتیجه‌گیری

نتایج بررسی اثر فراورده‌های مایع کرم‌های خاکی نشان داد که هر سه نوع کود مایع حاصل از دو گونه کرم خاکی با نمونه شاهد دارای اختلاف بسیار معنی‌دار می‌باشد. با توجه به مقایسه میانگین‌ها، به ترتیب ورمی‌واش، سلوم و ورم‌تی کرم *Lumbericus luberus* ودر مرحله بعدی ورمی‌واش ،ورم‌تی و سلوم کرم *Eisenia foetida* بیشترین اثر کنترل کنندگی را داشتند. تاثیر ورمی‌کمپوست در کنترل بیماری‌های خاکزاد و آفات گیاهی گزارش شده است. با توجه به گیاهان تیمار شده با ترکیبات ورمی‌کمپوست در خاک، فنولیک اسید که یک ترکیب بیوشیمیایی ، به مقدار کم به طور طبیعی در گیاهان وجود دارد و باعث ایجاد مقاومت می‌شود، افزایش می‌یابد. برخی از فنولیک اسیدها به عنوان ضد قارچ معرفی شده‌اند که باعث از بین رفتن قارچ به طور مستقیم می‌شوند و یا به طور غیر مستقیم باعث تحریک سنتز فنولیک‌ها در گیاه می‌شود. اکثر اکتینومیست‌ها جدا شده از ورمی‌کمپوست مرتبط با گونه‌های استرپتومایسس از توانایی قارچ‌کشی برخوردارند.(Kawase,2006). Ravira و Ryder در سال۱۹۹۳،گزارش کردند که، کرم‌های خاکی باعث پراکندگی وتوزیع *Pseudomonas corrugata* استرین R۲۱۰۴۰ و باعث بیوکنترل محل ریزوسفرریشه گیاهان که آلوده به عامل Take-all در گندم بوده، شده است.

تیمار	اثر بازدارندگی رشد قارچ
شاهد	8.2 [a]
سلوم ***Eisenia foetida***	1.14688[b]
ورم تی ***Eisenia foetida***	1.075[b]
ورمی واش ***Eisenia foetida***	0.63125[c]
ورم تی ***Lumbericus luberus***	0.45156[d]
سلوم ***Lumbericus luberus***	0.38094[ed]
ورمی واش ***Lumbericus luberus***	0.31969[e]
SEM	0.047030

جدول۱.مقایسه میانگین تیمارهای مختلف کود



نمودار۱.مقایسه رشد قارچ‌هادر تیمارهای مختلف

نتیجه گیری کلی

در جهت کاهش مصرف سموم، می‌بایست ترکیباتی برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده گردد که علاوه بر طبیعی بودن باید سازگاری با محیط زیست داشته باشند. در این راستا استفاده از فراورده‌های کرم خاکی بسیار مورد توجه می‌باشد. برای محکم شدن این ادعا نیاز به آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌باشد.

In vitro evaluation of two Erthworm(*Eisenia foetida, Lumbericus luberus*) liquid products against some phytopathogenic fungi

Mahs arostami[1*], Maryam pirayesh[1], Majid olia[1], mehran arabi[2]
Shahrekord University
[*]Mahsarostami127@gmail.com

Abstract
Biocontrol of plant disease agents in order to decrease the hazardous impacts of chemical pesticide application including problems of public health, environmental pollution, toxic effect on non-target organisms and causing resistance disease agents is a priority. In this study, liquid products of 2 erthworms species (*Eisenia foetida*, *Lumbericus luberus*) used for antifungal activity against eight economically important phytopathogenic fungi, *Fusarium spp*., *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Aspergilus niger*, *Cladosporium spp*., *Rhizoctonia solani*, *Penicilium spp.*,*Verticillium spp*.. The results showed that all liquid products inhibited mycelia growth of all fungi. Based on statistical analysis products of *Lumbericus luberus* and then products of *Eisenia foetida* have the greatest effect. It is concluded that earthworm poroducs have a remarkable potential as biocontrol agents against phytopathogenic fungi.

Key Words: Antifungal activity, Phytopathogenic fungi, *Eisenia foetida, Lumbericus luberus,* Liquid produc of earthworm

منابع

1. Hoster F, Schmitz J.E and Daniel R. 2005. Enrichment of chitinolytic microorganisms:isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activityagainst phytopathogenic fungi from a novel Streptomyces strain. Appl.Microbiol. Biotechnol. 66: 434-442.
2. Kawase T, Yokokawa S, Saito A, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K and Watanabe T. 2006. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from S. coelicolor A3(2). Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 988-998.
3. Yu J, Liu Q, Liu X, Sun Q, Yan J, Qi X and Fan S. 2008. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by Streptomyces rimosus MY02. Bioresour. Technol. 99: 2087-2091.
4. Ryder M. H, A. D. Ravira. 1993. Biological control of Take-all in glasshouse-grown wheat using strains of *Pseudomonas corrogata* isolated from wheat field soil. Soil Biol. Biochem. 25: 311-320.