پنجمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، دانشکده کشاورزی
۲۸-۲۷ بهمن ماه ۱۳۸۹

بررسی اثر Trichoderma harzianum BI بر تغییرفعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گوجه فرنگی در تعامل با نماتد مولد گره ریشه M. javanica

فاطمه ناصری نسب*[1]، نوازالله صاحبانی[2]، حسن رضا اعتباریان [3]
گروه حشره شناسی وبیماری شناسی گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
* نویسنده مسئول: فاطمه ناصری نسب
fnaserinasab63@gmail.com ،

چکیده

فعالیت بیوکنترلی جدایه *T. harzianum* BI علیه *M. javanica* و توانایی آن در القاء سیستم دفاعی در گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. ریشه گیاهچه های گوجه فرنگی در مرحله ۶ برگی توسط سوسپانسیون اسپور BI *T. harzianum* با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی گردید میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای اول تا هشتم بعد از مایه زنی نماتد اندازه گیری شد. این جدایه علاوه بر کاهش شدت بیماری در گلخانه، سبب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با شاهد در طی روزهای نمونه برداری شد. نتایج تغییرات در میزان فعالیت آنزیم طی روزهای مختلف پس از مایه زنی نشان داد که امکان تحریک مقاومت القایی در گیاه گوجه فرنگی توسط *T.harzianum* BI علیه *M. javanica* وجود دارد.

واژگان کلیدی: T.harzianum BI، M. javanica ، مقاومت القایی، پراکسیداز.

مقدمه

آنتاگونیست *T. harzianum* در خاک های ایران از بهترین آنتاگونیست ها شناخته شده است که پتانسیل بالایی در کنترل بیماری های خاکزاد، برگی، پس از برداشت و غیره دارد. از مهمترین مکانیسم های این آنتاگونیست در مقابله با نماتد ها می توان به ایجاد متابولیت های ضد نماتدی و کاهش ترشحات ریشه که سبب بازدارندگی از جذب نماتد می شود و همچنین اثر مستقیم قارچ روی تخم و لارو نماتد و القاء مقاومت علیه نماتد اشاره کرد (Sikora et al., 1993). هدف از این تحقیق، بررسی توانایی قارچ BI *T. harzianum* برای کنترل نماتد *M. javanica* عامل گره ریشه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه ای و بررسی میزان تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه گیاه گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y در اثر مایه زنی با نماتد و جدایه *T. harzianum* BI می باشد.

مواد و روش‌ها

عامل بیماری: ریشه های آلوده به نماتد از گلخانه های خیار و گوجه فرنگی منطقه ورامین جمع آوری شد. تکثیر نماتد با روش Single egg mass انجام و شناسایی گونه نماتد مطابق کلید جپسون صورت گرفت(Jepson, 1987). استخراج تخم ولاروسن دو با استفاده از روش Hussay &Barker (۱۹۷۳) انجام شد.

آنتاگونیست : جدایهBI *T .harzianum* از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان به صورت خالص تهیه و تکثیر شد(Booth, 1997). غلظت موثر $۱۰^{٦}$ اسپور در میلی لیتر قارچ جهت استفاده در آزمایشات تهیه شد(Maleki., 2008).

آزمایش اثر BI *T.harzianum* بر میزان بیماری نماتد مولد گره ریشه در شرایط گلخانه: بذور گوجه فرنگی ضد عفونی سطحی شد و در گلدان های حاوی خاک پاستوریزه شده کشت گردید. گیاهچه های گوجه فرنگی در مرحله ٦ برگی توسط مقدار ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ BI *T. harzianum* با غلظت $۱۰^{٦}$ اسپور در میلی لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد به ازاء هر گیاه مایه زنی شدند. تیمار ها شامل: گیاه سالم، گیاه مایه زنی شده با نماتد، گیاه مایه زنی شده با نماتد و عامل آنتاگونیست به روش خیساندن ریشه (Root dip) و گیاه مایه زنی شده با نماتد و عامل آنتاگونیست به روش خیساندن خاک (Soil drench) بودند. گیاهچه ها پس از مایه زنی به مدت ٤٥ روز در شرایط گلخانه نگهداری شد و سپس ریشه ها برای بررسی بیماری به آزمایشگاه منتقل شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ٦ تکرار انجام شد. ارزیابی تغییرات فعالیت پراکسیداز در ریشه گوجه فرنگی مایه زنی شده با نماتد و قارچ BI *T. harzianum*: گیاهچه های گوجه فرنگی مانند آزمایش قبل تهیه، و در مرحله ٦ برگی مایه زنی گردید. به ازاء هر گیاهچه تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد و ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور با غلظت $۱۰^{٦}$ اسپور در میلی لیتر آب مقطر استریل استفاده شد. تیمارها شامل گیاه سالم مایه زنی شده با آب مقطر استریل، گیاه مایه زنی شده با عامل آنتاگونیست، گیاه مایه زنی شده با نماتد و گیاه مایه زنی شده با نماتد و آنتاگونیست، بودند. برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایشات به صورت طرح فاکتوریل ٤× ۸ که فاکتور A شامل ٤ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه برداری۱، ۲، ۳ ، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸ روز بعد از مایه زنی با نماتد بود در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و میزان تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در روزهای اول تاهشتم مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره و سنجش پروتئین استاندارد: به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره و تهیه منحنی پروتئین استاندارد جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

استخراج پروتئین از بافت گیاه : نیم گرم از بافت گیاهی ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع کوبیده و له شد. یک میلی لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مول با pH ٦ به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب های دو میلی لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. مایه رویی برای انجام آزمایش ها جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد(Reuveni, 1995).

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): ارزیابی پرکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company- Unterfoehring –Germany به صورت زیر انجام شد:

دو میلی لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ٤۰ میکروگرم پروتئین باشد، ۲۰ میکرولیتر گوئیکول و مقدار کافی بافر سیترات فسفات ۲٥ میلی مول pH ٥/٤ تا به حجم نهایی ۲ میلی لیتر برسد ، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ٤٧٥ نانومتر صفر گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به این مخلوط اضافه

شد و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه ، به مدت یک دقیقه اندازه گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD /Min./mg. protein) (Reuveni, 1995). تجزیه آماری داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین داده ها با آزمون چند دامنه ای دانکن ($p<0.05$)مقایسه شد .

نتایج و بحث

در آزمایشات گلخانه ای عامل آنتاگونیست توانست تعداد گال و کیسه های تخم ایجاد شده بر روی ریشهٔ گوجه فرنگی را هم به روش خیساندن ریشه (Root dip) و هم به روش خیساندن خاک (Soil drench) کاهش دهد، با وجود معنی دار نبودن اختلاف، تعداد گالهای ایجاد شده در تیمار با آنتاگونیست به روش Soil drench کمتر بود و نیز وضعیت وزن تر ریشه و اندام های هوایی در این تیمار دارای وضعیت بهتری بود و اختلاف معنی دار بین این تیمار با کاربرد قارچ به روش خیساندن ریشه مشاهده شد. در کارمشابهی جدایه Th از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال ها را بر روی ریشه گوجه فرنگی کاهش دهد (Khattak et al., 2008).

جدول ۱- اثر BI *T.harzianum* روی بیماری در شرایط گلخانه بر روی تعداد گال، تعداد egg mass، وزن تر ریشه و اندام های هوایی

تیمار	تعداد گالهای هر گیاه	تعداد egg mass هر گیاه	وزن تر ریشه(گرم)	وزن تر اندام های هوایی(گرم)
* H	۰c	۰c	۹/۲a	٤۰/٥a
* N	۲۷۳a	۱٥٦/٥a	۸/٦a	۳۲/۱c
N+*T(Rd)	٤٦b	۳۳/٥b	٥/۲c	۲۹/٤cd
N+*T(Sd)	٤۲b	۳٤/۱۷b	۷/۳b	۳۸/٦b

هر تیمار دارای ۶ تکرار بوده و میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند با هم اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن ($p<$ ۰/۰۵). T: BI. *T. harzianum* و N: *M. javanica* ، H: *گیاه سالم*، Rd:روش خیساندن ریشه و Sd: روش خیساندن خاک می باشند.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم در گیاه آلوده به نماتد تیمار شده با سالیسیلیک اسید از روز اول تا هشتم پس از مایه زنی تفاوت معنی داری را با شاهد نشان داد و روند افزایشی آن در روز ٤ به بیشترین میزان خود رسید و پس از آن رو به کاهش گذاشت(جدول۲) . در تمام روز های نمونه برداری گیاه گوجه فرنگی آلودهٔ تیمار شده با آنتاگونیست نسبت به شاهد آلوده با نماتد افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان داد. این آنزیم در اثر تیمار گیاه با عوامل آنتاگونیست مانند تریکودرما افزایش پیدا می کند (Depinto & De Gara, 2004).

جدول ۲- مقایسه میانگین تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (ΔOD 475/min/mg) در ریشه گیاه گوجه فرنگی در اثر مایه زنی با نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* ، قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI

	تیمار				روز های بعد از مایه زنی نماتد				
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
T+N	f۳۸/۱۲A	e٥۹/٦۸A	b ۸۸A	a۱۰٦/۰۷A	c۸۰/۳۸A	d٦۸/۰۲A	e٥٦/٤A	f٤۰/۳۷ A
*T	f۳۹/۱A	e٤۷B	e ٦۱B	a۹٥/۲۲B	b٦۸/۲۱B	c٦۰/۱AB	d٥۰/۱۳B	g۳٥/۱۲B
*N	f۲٥/۱ C	d٤۰/۲C	c٥٦/۲٥C	a۹۸/۲۳B	bv۹/٤٦A	c٥٦/٤B	d٤۱/۲٥C	e۳۳/۱۲B
*H	d۲٥/٥ C	c۲۷D	c۲۸/٦٦D	a۳۳/٥۳C	a۳۳/۰۹C	b۳۰/٦۳C	c۲۷/٦D	a۳۲/۷٤B

هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف بزرگ و میانگین هایی که در ردیف با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف کوچک مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) ارائه شده اند.T قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI وN نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* و *H گیاه سالم (شاهد)* می باشند.

نتیجه‌گیری کلی

نظر به کنترل موفق بیماری ریشه گرهی گوجه فرنگی در گلخانه وهمین طور القاء مکانیسم های دفاعی گیاه به وسیلهٔ این عامل آنتاگونیست، این قارچ می تواند به عنوان یک عامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری نماتد مولد گره ریشه به کار گرفته شود.

منابع

1.Booth, C. (1977). *Fusarium* laboratory guide to identification of major species. Common wealth ycological Institue. Kew, Surrey, England, (55pp).
2.Bradford, M.M. (1967). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
3.De Pinto, M. C., and De Gara, L. (2004). Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany* 55: 2559-2569

Induction of peroxidase against Meloidogyne javanica by Trichoderma harzianum in tomato

Fatemeh naserinasab[1*], Navazallah Sahebani[2], Hasan Reza Etebarian[3]
Department of Entomology and Plant Pathology, University College of Aboureihan, The University of Tehran
***fnaserinasab63@gmail.com**

Abstract
The biocontrol activity of *T.harzianum* BI on root-knot nematod caused by *M. javanica* and its ability to induce biochemical defense responses on tomato were investigated. The roots of tomato seedling inoculated with antagonist suspension (10^6 conidia/ ml) and second-stage juvenile (J2).Peroxidase activity was measured on 1 to 8 days after inoculation. In addition of significanced reduction of nematode disease in green house, *T.harzianum* BI caused increase in peroxidase activity that reached maximum level 4 days after nematode inoculation. The ability of *T.harzianum* BI to increase activity of peroxidase and plant defense induction may be one of the mechanism responsible to it's biocontrol activity.

Keywords: T.harzianum BI ، M. javanica, Resistance induction, Peroxidase.