کنترل بیولوژیک نماتد مولد غده ریشه *M. javanica* در گیاه گوجه فرنگی توسط جدایه *T.harzianum* BI

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

چکیده

فعالیت بیوکنترلی جدایه *T. harzianum* BI علیه *M. javanica* 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 *T. harzianum* BI با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر و ۲۰۰۰ لارو فعال سن دو نماتد مایه زنی گردید. این جدایه علاوه بر کاهش شدت بیماری(تعداد گال و کیسه تخم) در گلخانه، سبب افزایش درصد مرگ و میر لاروها و کاهش درصد تفریخ تخم ها در آزمایشگاه شد، نتایج نشان می دهد که این آنتاگونیست کارایی لازم جهت کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه *M.javanica* را داراست.

واژگان کلیدی: کنترل بیولوژیک، *Meloidogyne javanica*، *T. harzianum* BI، Eggmass

مقدمه

در دهه های اخیر مبارزه بیولوژیک بیماریهای گیاهی با استفاده از میکروارگانیزم ها توجه بسیاری از محققین رابه خود جلب نموده است. تحقیقات نشان داده که معرفی آنتاگونیست های مختلف از جمله تریکودرما به محیط خاک و ریزوسفر می تواند از خسارت بیماری تا زیر آستانه زیان اقتصادی بکاهد (Etebarian et al., 2005; Batta.,2004). کلونیزه شدن سطح ریشه گیاه توسط آنتاگونیست ها و به خصوص *Trichoderma* می تواند منجر به کاهش حمله مستقیم عوامل بیماریزا با تولید مواد آنتی میکروبی و غیره باشد که سبب ایجاد مقاومت القایی سیستمیک می‌شوند (Kloepper et al., 1992). هدف از این تحقیق، بررسی توانایی قارچ *T. harzianum* BI برای کنترل نماتد *M. javanica* عامل گره ریشه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه و آزمایشگاه می باشد.

مواد و روش‌ها

عامل بیماری: ریشه های آلوده به نماتد مولد گره ریشه از گلخانه های منطقه ورامین جمع آوری شد. تکثیر نماتد با روش Single eggmass روی رقم ارلی اوربانا Y انجام و شناسایی گونه نماتد مطابق کلید جپسون صورت گرفت (Jepson, 1987). استخراج تخم ولارو سن دو با استفاده از روش Hussay &Barker (۱۹۷۳) انجام شد.

آنتاگونیست : جدایه*T .harzianum* BI از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران پردیس ابوریحان به صورت خالص تهیه و پس از تک اسپور کردن روی محیط PDA تکثیر شد(Booth, 1997). غلظت موثر 10^6 اسپور در میلی لیتر قارچ جهت استفاده در آزمایشات تهیه شد(ملکی، ۱۳۸۵).

آزمایش اثر مستقیم قارچ *T. harzianum* BI روی تفریخ تخم نماتد *M.javanica* در شرایط آزمایشگاه: پلاک های ۵ میلی متری از کشت ۷ روزهٔ قارچ *T. harzianum* BI در ظروف پتری حاوی آب آگار دو درصد قرار داده شد و پس از پوشیده شدن سطح پتری با قارچ (پس از۱۰ روز)، یک میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی جمعیت ٤٠-٥٠ تخم نماتد استریل به تشتک های پتری اضافه شد. به پتری های شاهد نیز که فاقد قارچ بودند به همان میزان سوسپانسیون تخم اضافه شد. پتری ها به مدت ١٤ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بعد از این زمان تعداد تخم های تفریخ شده در تیمار و شاهد شمارش شد. اآزمایش با ٦ تکرار و در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام شد (Irfan et al., 2005).

آزمایش اثر مستقیم *T. harzianum* BI بر مرگ و میر لارو های سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه: در این آزمایش از کشت ۱۰ روزه قارچ روی محیط آب آگار استفاده شد وسوسپانسیونی از لاروهای تازه تفریخ شده و استریل نماتد با جمعیت حدود ۲۰-۳۰ لارو در یک میلی لیتر آب مقطر استریل به تشتک های پتری اضافه شد و سپس در ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد و پس از گذشت زمان های ٤٨ و ٩٦ ساعت میزان مرگ و میر لارو ها در پتری های تیمار و شاهد شمارش شد. پتری های فاقد قارچ به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش با ٦ تکرار و در قالب طرح کاملا" تصادفی انجام شد (Irfan et al., 2005).

آزمایش اثر *T.harzianum* BI بر میزان بیماری نماتد مولد گره ریشه در شرایط گلخانه: بذور گوجه فرنگی با وایتکس ۱۰ درصد ضد عفونی سطحی شد و در گلدان های حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه، ماسه با نسبت ۲:۱:۱) کشت گردید. گیاهچه ها در مرحله ٦ برگی توسط مقدار ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* BI با غلظت 10^{6} اسپور در میلی لیتر و تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال نماتد 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. 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 ($p<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت .

نتایج و بحث

در آزمایش اثر مستقیم *T. harzianum* BI روی مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه تریکودرما توانست تعداد لاروها را کاهش دهد. درصد مرگ ومیر لاروها بعد از ٤٨ و ٩٦ ساعت اندازه گیری شد. درصد مرگ ومیر لاروها بعد از ٩٦ ساعت توسط تریکودرما ٦٦٪ در مقایسه با شاهد ۲۳ درصدی بود (جدول۱). در آزمایش اثر مستقیم قارچ *T. harzianum* BI روی تفریخ تخم نماتد *M.javanica* در شرایط آزمایشگاه در پتری درصد تخم های تفریخ نشده در اثر تیمار قارچ تریکودرما ٥٨٪ بود که این میزان در مقایسه با شاهد ٢٦٪ بیشتر بود(جدول ۲). نتایج آزمایش بیوکنترلی قارچ *T. harzianum* BI علیه نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه نشان داد که این آنتاگونیست توانایی پارازیته نمودن تخم و لاروهای سن دوم را در در محیط کشت را داراست که می تواند در اثر تولید عوامل آنتی بیوتیک و متابولیت های ثانویه و تولید برخی آنزیم های لیز کننده کوتیکول نماتدها مانند پروتئاز در مقابل لاروهای سن ۲ باشد(Khan & Saxena, 1997). با توجه به وجود کیتین در لایه های میانی پوسته تخم نماتد با ضخامت ٠/٤ میکرومتر، به نظر میرسد *T.harzianum Bi* توسط تولید آنزیم کیتیناز اثر خود را بر بازدارندگی از تفریخ تخم های نماتد اعمال میکند(Brant et al., 2000). در کار مشابهی که توسط الفتاح و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام شد متابولیت های خارج سلولی

در آزمایش محیط کشت فیلتر شدهٔ تریکودرما توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ و میر لارو سن دو نماتد شود (Al-Fattah et al., 2007). در آزمایش اثر *T.harzianum* در آزمایشات گلخانه ای عامل آنتاگونیست توانست تعداد گال و کیسه های تخم ایجاد شده را کاهش دهد(جدول ۲). در تیمار با آنتاگونیست به روش Soil drench وضعیت وزن تر ریشه و اندام های هوایی دارای وضعیت بهتری بود و اختلاف معنی دار بین این تیمار با کاربرد قارچ به روش خیساندن ریشه مشاهده شد. به نظر میرسد چون در وضعیت خیساندن خاک آنتاگونیست محدوده وسیع تری از خاک اطراف ریشه را پوشش میدهد و دامنه فعالیت آن گسترده تر میباشد میتواند اثر بیشتری بر بهبود رشد گیاه و جلوگیری از پیشروی نماتد بگذارد، احتمالا" در روش خیساندن ریشه طی مدتی که ریشه گیاه بیرون از خاک می ماند گیاه دچار تنش شده، که بر رشد گیاه اثر سوء داشته است. در کارمشابهی که توسط خاتک همکاران در سال ۲۰۰۸انجام شد جدایه Th از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال ها را بر روی ریشه گوجه فرنگی کاهش دهد (Khattak et al., 2008).

جدول ۱- درصد مرگ و میر لاروها توسط قارچ تریکودرما در آزمایشگاه

تیمار	درصد لاروهای مرده بعد از ٤٨ ساعت	درصد لاروهای مرده بعد از ٩٦ ساعت
*C	۱۱/۲b	۲۳/۹۱b
*T	٥٦/۲۱a	٦٦/٤a

میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند با هم اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن (p< ۰/۰۵). C: شاهد، T: تیمار با *T.harzianum* BI

جدول۲- اثر *T. harzianum BI* بر درصد تفریخ تخم های *M. javanica*

	درصد تخم های تفریخ نشده پس از ١٤ روز
* C	۳۲ b
* T	٥۸a

میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده اند با هم اختلاف معنی دار دارند (آزمون دانکن (p< ۰/۰۵).C : شاهد، T: تیمار با *T.harzianum* BI.

جدول ۳- اثر *T.harzianum* BI روی بیماری در شرایط گلخانه بر روی تعداد گال، تعداد eggmass، وزن تر ریشه و اندام های هوایی

تیمار	تعداد گال	تعداد eggmass	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

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: *T. harzianum* BI و N: *M. javanica*، H: *گیاه سالم*، Rd:روش خیساندن ریشه و Sd: روش خیساندن خاک می باشند.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به کنترل موفق بیماری ریشه گرهی گوجه فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه توسط T.harzianum BI، این آنتاگونیست می تواند به عنوان یک عامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری های نماتدی ریشه و به خصوص کنترل نماتد مولد گره ریشه به کار گرفته شود.

منابع

3.Brants A, Brrown C R, and Earir E D.2000. Trichoderma Harzianum endochitinase dose not provide resistance to M. hapla in tobacco. Journal of Nematology 32(3): 289-296.
2.Etebarian, H.R., Sholberg, P., Eastwell, K., and Sayler, R. 2005. Biological control of blue A4ld with Pseudomonas fluorescens. Canadian Journal of Microbiol. 51: 591-598.
3.Jepson, S.B. 1987. Identification of Root – Knot nematodes. Cambrian News Ltd.

Biological control of Meloidogyne javanica in tomato with Trichoderma harzianum BI

Fatemeh aserinasab1*, Navazallah Sahebani2, Hasan Reza Etebarian3
Department of Entomology and Plant Pathology, University College of Aboureihan, The University of Tehran
*fnaserinasab63@gmail.com

Abstract
in tomato on root-knot nematod caused by M. javanica BI The biocontrol activity of T.harzianum were investigated . The roots of tomato seedling inoculated with antagonist suspension (106 conidia/ ml) and second-stage juvenile (J2). In addition of significanced reduction of nematode disease in green house and increase in the death persent of second stage juvenile(J2), T. harzianum BI was decreased the persent of egg hatching in laboratory assay. Results indicated that T. harzianum BI can be use as a benefit biocontrol agent in tomato against M. javanica.

Keywords: Biological control, T.harzianum BI, M. javanica, Eggmass