مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۱، ۱۳۹۱ (۱۳۱-۱۲۱)

کنترل بیولوژیک نماتود مولد گره ریشه گوجه فرنگی (*Meloidogyne javanica*) توسط تلفیق جدایه *Trichoderma harzianum* BI و اسید سالیسیلیک در گلخانه و بررسی اثر آنها بر القاء فنل کل و فلاونوئید کل در میزبان

فاطمه ناصری نسب[1*]، نوازالله صاحبانی[2] و حسن رضا اعتباریان[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۷ – تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۱۵)

چکیده

گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی توسط جدایهٔ آنتاگونیست *T. harzianum* BI با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر و اسید سالیسیلیک به عنوان محرک شیمیایی با غلظت پنج میلی مولار به صورت جداگانه و ترکیبی در شرایط گلخانه مایه زنی شدند. ابتدا اثر اسید سالیسیلیک بر رشد جدایه آنتاگونیست بررسی شد و نتایج نشان داد که تمامی غلظت های مورد استفاده اسید سالیسیلیک باعث کاهش معنی دار رشد پرگنه جدایه *T. harzianum* BI در مقایسه با شاهد شدند. در بررسی اثر اسید سالیسیلیک و جدایه آنتاگونیست بر فاکتورهای بیماریزایی در گیاهان آلوده با نماتود، تیمار با جدایه آنتاگونیست به روش خیساندن خاک به همراه اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگ ها باعث ۹۲٪ کاهش در تعداد گال، ۶۵٪ کاهش در تعداد تودهٔ تخم به ازاء هر گیاه و ۹۵٪ کاهش در متوسط تعداد تخم های درون هر کیسه تخم در مقایسه با شاهد شد و بهترین اثر را بر کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه نشان داد. در قسمت دوم تحقیق توانایی آنتاگونیست و اسید سالیسیلیک در القاء فنل‌کل و فلاونوئیدکل در بافت گیاه گوجه فرنگی بررسی شد. میزان فنل‌کل و فلاونوئیدکل از روز اول تا هشتم پس از مایه زنی با نماتود اندازه‌گیری شد. میزان فنل کل در تیمار اسید سالیسیلیک و قارچ آنتاگونیست با گیاه آلوده به نماتود از روز اول پس از مایه زنی تا روز چهارم افزایش یافت و در این روز به بیشترین مقدار خود یعنی ۰/۸۵ میلی گرم در یک گرم بافت ریشه رسید و پس از آن رو به کاهش گذاشت. این تیمار در روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم دارای بیشترین مقدار و دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود. .در روز چهارم میزان فلاونوئید کل در تیمار تلفیقی آنتاگونیست، اسید سالیسیلیک با گیاه آلوده با نماتود در تمامی روزهای نمونه برداری، به جز آخرین روز اختلاف معنی داری با شاهد داشت و مقدار آن در روز سوم به بیشترین حد خود یعنی ۷/۵ میکرو گرم بر گرم بافت ریشه رسید و پس از آن به تدریج کاهش یافت. نتایج حاصل نشان می دهد که استفاده همزمان از *T. harzianum* BI و اسید سالیسیلیک سبب القاء ترکیبات دفاعی گیاه و در نتیجه افزایش قابل توجه توان کنترل کنندگی آنها در مقایسه با استفاده مجزای این عوامل شد.

واژه های کلیدی: القاء مقاومت، آنتاگونیست، محرک شیمیایی، فنل کل، فلاونوئیدکل.

* نویسنده مسئول: فاطمه ناصری نسب تلفن: ۰۹۱۹۷۰۴۲۹۴۱ E-mail: fnaserinasab63@gmail.com

مقدمه

نماتودهای مولد گره ریشه از جنس *Meloidogyne*، پارازیت اجباری و از بیمارگرهای مهم گیاهی، دارای انتشار جهانی هستند. کنترل نماتود مولد گره ریشه به دلیل دامنهٔ وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولید مثل زیاد، و انگل داخلی بودن آن دشوار می باشد (Trudgill and Blok, 2001; Manzanilla-Lopez *et al*. 2004). امروزه دلایلی از جمله هزینه بالا و خطرات و مشکلات مختلف زیست محیطی، استفاده از نماتودکش‌های شیمیایی را محدود یا ممنوع ساخته است (Whitehead, 1997). در سال‌های اخیر روش‌های ایمن و در بعضی از موارد دارای کارایی بیشتر از جمله کنترل بیولوژیک و القاء مقاومت برای کنترل این نماتود مطرح شده است. اولین قدم در انجام کنترل بیولوژیک انتخاب جدایه‌هایی است که در شرایط طبیعی دارای بالاترین میزان کارایی باشند. در واقع آنتاگونیست باید با شرایط فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منطقهٔ مورد استفاده سازگاری داشته باشد به طوری که بتواند در آنجا تثبیت شده و تکثیر یابد، و همچنین دارای قدرت رقابت بالا با میکروفلور منطقه به خصوص با عوامل بیماریزا باشد (آهون منش،۱۳۷۹). شبه گونه های جنس *Trichoderma* جزء قارچ های معمول در طبیعت هستند و در دامنه وسیعی از آب و هوا از توندرا تا مناطق گرمسیری وجود دارند (Harman *et al*., 2004).

القاء مقاومت، تولید متابولیت های ضد نماتودی و پارازیتیسم مستقیم از مکانیسم‌های آنتاگونیستی *Trichoderma harzianum* علیه نماتود مولد گره ریشه می‌باشد (Sharon *et al*., 2001).

ناندی و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که کاربرد اسید سالیسیلیک بر علیه نماتود های *Globodera rostochiensis* و *G. pallida* موجب القاء سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی می شود (Nandi *et al*., 2003). کمستر و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که مقاومت علیه نماتود مولد سیست (*Heterodera trifolli*) در گیاهان شبدر با کاربرد اسید سالیسیلیک القاء میشود (Kampster *et al*., 2001).

در سال ۱۳۸۶ مختاری و همکاران بررسی کنترل بیولوژیک نماتود مولد غده *Meloidogyne javanica* توسط دو عامل بیوکنترل *Pseudomonas flourescens* و *Trichoderma harzianum* انجام دادند و نتایج قابل قبولی به دست آوردند (مختاری،۱۳۸۶).

گیاهان استراتژی های متعددی برای دفاع از خود دارند که شامل عملکردهایی از قبیل موانع فیزیکی یا ترکیبات شیمیایی می باشند. سه گروه ترکیبات ثانویه در این فرایند ها نقش دارند؛ ترپنها، ترکیبات فنلی و ترکیبات حاوی نیتروژن، که به احتمال قوی ترکیبات فنلی رایج ترین ترکیبات و وسیع ترین گروه بررسی شده در دفاع گیاه می باشند (Ruuhola& Yang, 2005).

فلاونوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات فنلی با وزن ملکولی پائین می باشند که اسکلت پایه ساختار آنها از ۳ حلقه بنزنی و یک گروه هیدروکسیل تشکیل شده است. تحقیقات اخیر نشان میدهند که فلاونوئیدها ملکول‌های چند نقشی (Multifunction) می‌باشند و صفات مفید زیادی را برای سازگاری به گیاه تولید کننده آن‌ها می بخشند.

از نقش‌های فلاونوئیدها و پلی‌فنل‌های وابسته نقش آنها در حفاظت گیاهان علیه تهاجم میکروبی است و این تنها به دلیل نقش ساختمانی آن‌ها در گیاهان نیست بلکه فلاونوئیدها نیز مانند فیتوالکسین‌ها در پاسخ به حمله میکروبی در گیاه تجمع می‌یابند (Grayer and Harborne 1994, Harborn 1999).

هدف از انجام تحقیق حاضر استفاده توأم از *T. harzianum* BI و اسید سالیسیلیک به منظور به کار گیری تلفیقی از یک عامل آنتاگونیست و یک محرک شیمیایی در جهت افزایش توان کنترل کنندگی آنها علیه نماتود مولد گره ریشه بود.

مواد و روش ها

عامل بیماری

ریشه‌های آلوده به نماتود مولد گره ریشه از گلخانه-های گوجه فرنگی منطقه پیشوای ورامین جمع آوری شد. تکثیر نماتود با روش Single egg mass روی گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا Y انجام و شناسایی گونه نماتود مطابق کلید جپسون صورت گرفت (Jepson, 1987).

پس از شناسایی گونه و چندین دوره تکثیر متوالی، جمعیت کافی نماتود خالص *M. javanica* ایجاد شد. در این تحقیق از لارو سن دوم این نماتود استفاده شد (Hussy & Barker 1973).

جدایه آنتاگونیست

جدایه *T. harzianum* BI به صورت خالص از آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دریافت، و پس از انتقال به لوله‌های حاوی محیط PDA در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این جدایه قبلاً در این آزمایشگاه به عنوان عامل بیوکنترل علیه نماتود مولد گره ریشه به کار گرفته شده بود و خواص آنتاگونیستی بالایی دارد (مختاری، ۱۳۸۶). اسپورهای این قارچ از کشت ۱۰ روزه روی محیط کشت PDA تهیه شد. غلظت مورد نیازکه 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل است، که با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به دست آمد (Batta, 1999).

محرک شیمیایی

از اسید سالیسیلیک (ساخت شرکت Merck آلمان) با غلظت ۵ میلی مولار استفاده شد (Katoch *et al.*, 2005).

آزمون اثر غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک بر رشد *T. harzianum* BI به روش محیط کشت مخلوط با غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک

غلظت‌های ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ میلی مولار اسید سالیسیلیک به صورت مخلوط با محیط کشت PDA تهیه شد. در وسط هرتشتک پتری یک دیسک میسلیومی ۰/۵ سانتی متری از کشت سه روزه *T. harzianum* BI قرار داده شد. این تشتک ها را در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز قرار دادیم.

پس از پوشیده شدن تشتک‌های پتری شاهد توسط ریسه های قارچ، میزان رشد قارچ در ظروف کشت تیمارهای مورد نظر اندازه گیری شد. برای اندازه گیری رشد قارچ چون پرگنه‌ها به صورت دایره‌ای رشد کرده بودند ابتدا شعاع آنها محاسبه و سپس مساحت پرگنه به دست آمد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۵ تکرار انجام شد (Etebarian *et al.*, 2005).

آزمون اثر مایه زنی با *T. harzianum* BI و اسید سالیسیلیک بر بیماری در گلخانه

بذور گوجه فرنگی ضدعفونی شده با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در گلدانهای استریل حاوی خاک سترون شامل خاک، ماسه، کود برگ (۲:۱:۱) و مقداری پیت و پرلیت (یک پنجم هر گلدان) کشت گردید. گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله ۶-۴ برگی توسط قارچ آنتاگونیست و اسید سالیسیلیک به شرح زیر مایه زنی گردید. ۲۴ ساعت بعد هر گیاهچه توسط تعداد ۲۰۰۰ لارو فعال سن دوم نماتود *M. javanica* مایه کوبی شد. گیاهچه ها پس از مایه زنی به مدت ۴۵ روز در شرایط مساعد گلخانه برای رشد گیاه گوجه فرنگی (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند و پس از آن گیاهچه ها برای سنجش فاکتورهای مورد نظر به آزمایشگاه منتقل شدند. آزمایش با ۹ تیمار، ۶ تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

تیمار های زیر اعمال شد (هر تکرار به ازاء یک گیاهچه می باشد):

۱) سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش خیساندن خاک[1] به مقدار ۲۰ میلی لیتر + نماتود (Tsd+ N).

۲) سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش غوطه ور کردن ریشه در سوسپانسیون[2] اسپور به مدت ۵ دقیقه + نماتود (Trd+N).

۳) غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش خیساندن خاک به مقدار ۲۵ میلی لیتر به ازاء هر گیاه + نماتود (SAsd+N).

۴) غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگها + نماتود (SAsp+N).

۵) ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش خیساندن خاک + ۲۵ میلی لیترغلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش خیساندن خاک + نماتود (Tsd+ SAsd+ N).

1. Soil drench(sd)
2. Root dip(rd)

۶) ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش خیساندن خاک + غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگها + نماتود (Tsd+ SAsp+ N).

۷) سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی-لیتر) به روش غوطه ور کردن ریشه + ۲۵ میلی لیتر غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش خیساندن خاک + نماتود (Trd+ SAsd+ N).

۸) سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش غوطه ور کردن ریشه + غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگها + نماتود (Trd+SAsp+ N).

۹) نماتود تنها (شاهد)

در مورد همهٔ تیمارها، ریشه‌ها از خاک به طور کامل خارج شدند، در مورد تیمارهای ۲ و ۸ در سوسپانسیون اسپور و نماتود، تیمار ۷ درسوسپانسیون اسپور + اسید سالیسیلیک و نماتود، و بقیه تیمارها در آب سترون غوطه ور شدند و دوباره به گلدان های مورد نظر برگردانده شدند، تا شرایط برای همهٔ تیمارها یکسان باشد.

بررسی تغییرات برخی ترکیبات دفاعی بیوشیمیایی گیاه

گیاهچه‌های گوجه فرنگی مانند آزمایش قبل تهیه و در مرحله ۶ برگی توسط سوسپانسیون اسپور قارچ آنتاگونیست مورد نظر و اسید سالیسیلیک مایه‌زنی گردید.

تیمار تلفیقی شماره ۳ در این آزمایش (بهترین تیمار از آزمایش قبل) برای انجام بررسی تغییرات میزان فنل و فلاونوئید کل در ریشه گیاه انتخاب شد. تیمارها در این بررسی شامل موارد زیر می باشند:

تیمار شاهد (بدون تلقیح نماتود، آنتاگونیست و اسید سالیسیلیک)، تیمار آنتاگونیست + نماتود، تیمار اسید سالیسیلیک + نماتود، تیمار اسید سالیسیلیک + آنتاگونیست + نماتود که این تیمارها به صورت زیر اعمال شدند:

۱) سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش خیساندن خاک به مقدار ۲۰ میلی لیتر به ازاء هر گیاهچه + نماتود (Tsd+ N).

۲) غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگها + نماتود (SAsp+N).

۳) ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به روش خیساندن خاک + غلظت ۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک به روش اسپری روی برگها + نماتود (Tsd+ SAsp+ N).

۴) گیاه سالم تیمار شده با آب مقطر استریل.

۵) گیاه مایه زنی شده با نماتود تنها.

برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش به صورت طرح فاکتوریل ۵ × ۸ بر پایه کاملاً تصادفی انجام شد. فاکتور A شامل ۵ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل ۸ زمان نمونه برداری۱، ۲، ۳ ، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ روز بعد از مایه زنی بود. تغییرات میزان فنل کل و فلاونوئید کل در ریشه گوجه فرنگی در روزهای اول تا هشتم مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی میزان فنل کل

تهیه محلول پایه غلظت های فنل استاندارد

۱۰ میلی گرم اسیدکافئیک (Fluka, Germany) در پنج میلی لیتر متانول خالص حل شده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس مقادیر ۰/۵ ، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ میلی لیتر از این محلول را جداگانه در لوله های آزمایش ریخته و حجم هر لوله با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد (Seevers *et al*.,1971).

تهیه منحنی استاندارد

مقدار ۰/۵ میلی لیتر از هر یک از غلظت های مختلف اسید کافئیک را در هفت میلی لیتر آب مقطر ریخته و سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. سه دقیقه بعد از افزودن معرف فولین یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی محلول با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از گذشت یک ساعت میزان جذب نور در λ max = ۷۲۵ nm اندازه گیری شد.

این مراحل به طور جداگانه برای هر کدام از غلظت های مختلف اسید کافئیک انجام شد. برای صفر کردن اسپکتروفتومتر از محلول فاقد اسیدکافئیک استفاده شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. جهت تعیین فنل کل عصاره به دست آمده همانند روش

تهیه منحنی استاندارد عمل شد. تنها تفاوت در این بود که از ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده گیاه استفاده شد (Seevers *et al*.,1971).

استخراج فنل گیاه

جهت استخراج ترکیبات فنلی یک گرم بافت ریشه گوجه فرنگی وزن شد درون هاون چینی و در درون نیتروژن مایع عصاره گیری شد. بعد بافت خرد شده را به ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد منتقل کرده و عصاره حاصل در g ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله ها حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله های درب دار ۱۰ میلی لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Seevers *et al*., 1971).

بررسی تغییرات میزان فلاونوئید کل

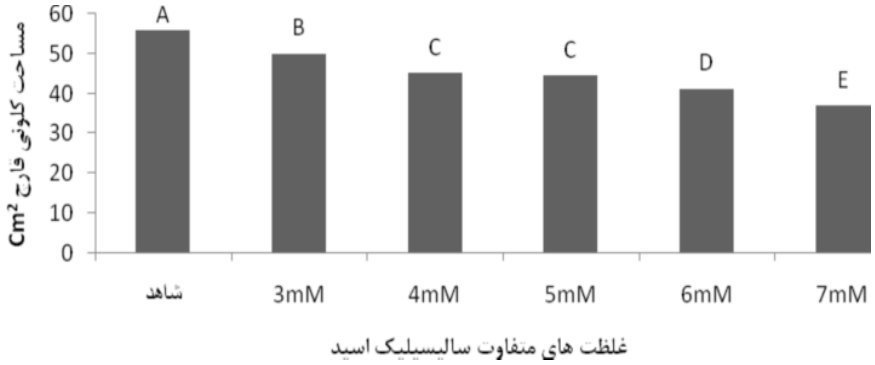
فلاونوئید کل به روش سیدهوراج و بکر استخراج شد (Siddhuraju & Becker, 2003). جهت تعیین مقدار فلاونوئید کل برای هر نمونه، میزان جذب هر نمونه در طول موج nm ۵۱۰ تعیین شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد و سپس میانگین جذب هر نمونه محاسبه شد. در نهایت مقدار فلاونوئید کل بر اساس استاندارد میکرو گرم بر گرم Rutin (Sigma) معادل بیان شد (Zishen *et al*., 1999).

آنالیز آماری داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و میانگین ها با آزمون چند دامنه دانکن ($p \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

بررسی اثر غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک بر رشد *T. harzianum* BI به روش مخلوط با محیط کشت

نتایج این آزمایش نشان داد که تمامی تیمارهای مورد آزمایش سبب کاهش معنی دار رشد پرگنه جدایه *T. harzianum* BI در مقایسه با شاهد شدند (شکل۱).



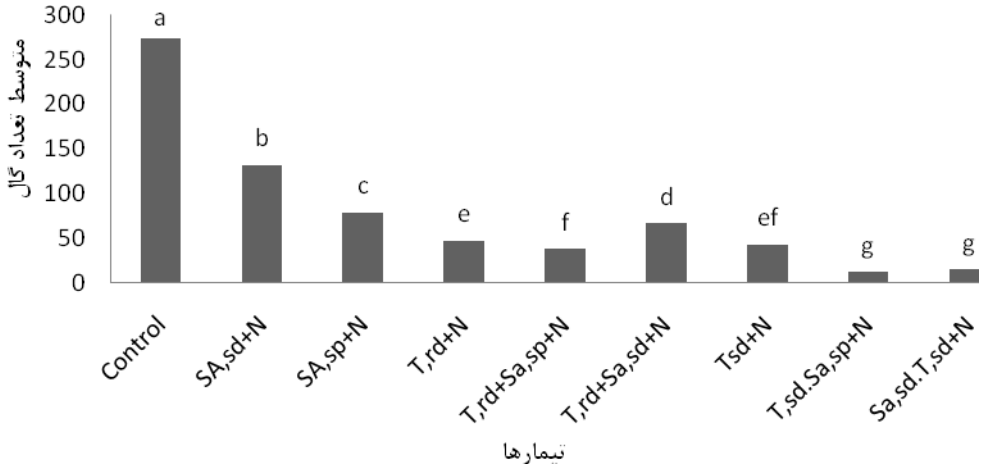
شکل۱- اثر غلظت های مختلف اسید سالیسیلیک بر رشد *T. harzianum* BI. هر تیمار دارای ۴ تکرار بوده و ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن(سطح احتمال ۵٪) دارای اختلاف معنی دار می باشند.

در بررسی‌های گلخانه‌ای با وجود مشاهده اثر سوء اسید سالیسیلیک بر رشد پرگنه قارچ آنتاگونیست ولی در استفاده توأم اسید سالیسیلیک و *T. hazrzianum* BI، کنترل کنندگی مؤثر بیماری توسط این تیمار مشاهده گردید. احتمال این موضوع هم وجود دارد که در گلدان و در شرایط ریزوسفر اسید سالیسیلیک اثری بر روی رشد قارچ آنتاگونیست هم نداشته باشد. دایف و همکاران (Daayf *et al*., 2003) بیان کردند که بین آزمایشات گلخانه ای و آزمایشات *in-vitro* همبستگی وجود ندارد.

بررسی اثر مایه زنی با *T .harzianum* BI و اسید سالیسیلیک بر بیماری در گلخانه

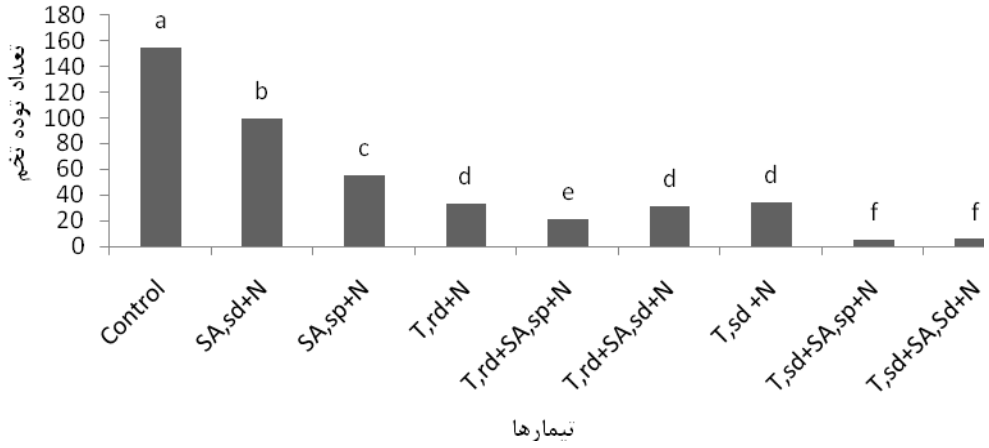
متوسط تعداد گال به ازاء هر گیاه در تمامی تیمارهای اعمال شده موجب کاهش معنی دار متوسط تعداد گال در مقایسه با شاهد شدند. تیمارهای Tsd+ SAsp+ N و Tsd+ SAsd+ N به میزان بیشتری موجب

کاهش گال های ایجاد شده در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها شدند (شکل ۲).



شکل۲- اثر تیمار با اسید سالیسیلیک و *T. harzianum* BI بر تعداد گال. ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن(در سطح ۵٪) دارای اختلاف معنی دار می باشند. هر تیمار دارای ۶ تکرار می باشد. Control: شاهد(نماتود تنها)، SA: اسید سالیسیلیک (۵ mM)، T: *T. harzianum* BI ، N: *M. javanica* ، sd: Soil dreanch، rd: Root dip، sp : Spray.

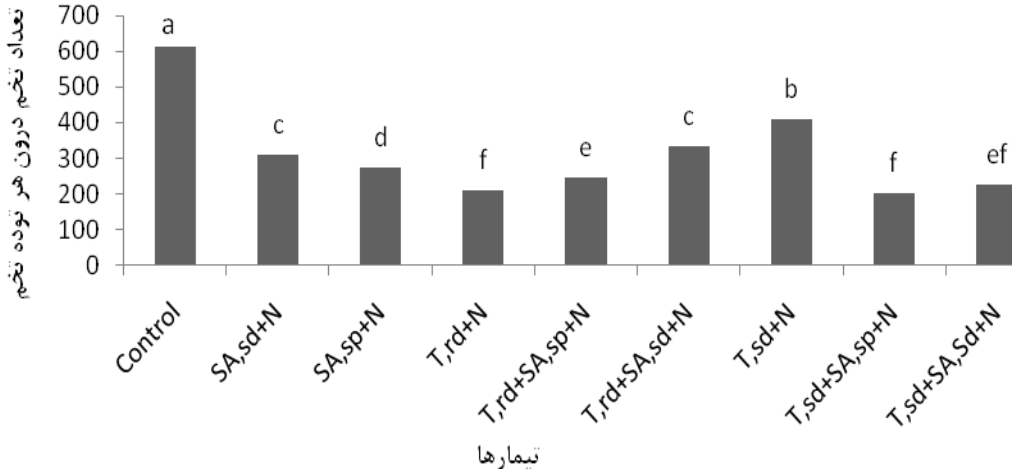
متوسط تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه در تمامی تیمارهای اعمال شده سبب کاهش تعداد توده های تخم ایجاد شده در مقایسه با شاهد شدند. تیمارهای Tsd+ SAsd+ N و Tsd+ SAsp+ N به میزان بیشتری در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها سبب کاهش تعداد توده های تخم ایجاد شده شدند (شکل ۳).



شکل ۳- اثر تیمار با اسید سالیسیلیک و *T. harzianum* BI بر تعداد توده تخم. ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن(در سطح ۵٪) دارای اختلاف معنی دار می باشند. هر تیمار دارای ۶ تکرار می باشد. Control: شاهد(نماتود تنها)، SA: اسید سالیسیلیک(۵ mM)، T: *T. harzianum* BI ، N: *M. javanica* ، sd: Soil dreanch، rd: Root dip، sp : Spray.

متوسط تعداد تخم به ازاء هر توده تخم

تمامی تیمارهای اعمال شده سبب کاهش معنی دار تعداد تخم های درون توده های تخم شدند. تیمارهای Tsd+ SAsp+ N و Tsd+ SAsd+ N و Trd+ SAsp+ N و Trd+ N به میزان بیشتری سبب کاهش متوسط تعداد تخم گردیدند (شکل۴).



شکل ۴- اثر تیمار با اسید سالیسیلیک و *T. harzianum* BI بر تعداد تخم درون هر توده تخم. ستون هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند بر اساس آزمون دانکن (در سطح ۵٪) دارای اختلاف معنی دار می باشند. هر تیمار دارای ۶ تکرار می باشد.
Control: شاهد (نماتود تنها)، SA: اسید سالیسیلیک (۵ mM)، T: *T. harzianum* BI ، N: *M. javanica* ، sd: Soil dreanch، rd: Root dip، sp : Spray.

در بررسی‌های گلخانه‌ای تیمارهای تلفیقی که قارچ به صورت خیساندن خاک استفاده شد اثر بهتری بر کاهش میزان بیماری داشتند. به نظر می‌رسد در روش خیساندن خاک چون عامل آنتاگونیست در ریزوسفر و سطحی فراتر از آن حضور دارد، می‌تواند به طور موثرتری سبب جلوگیری از پیش روی نماتود شود. مصرف اسید سالیسیلیک به صورت محلول پاشی نتایج بهتری را نسبت به حالت خاک کاربرد در تیمارهای تلفیقی و به صورت تنها نشان داد.

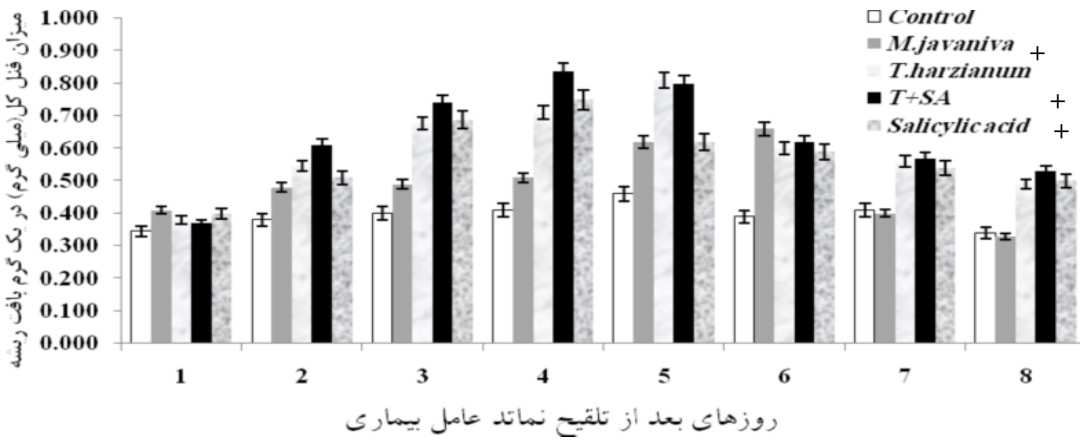
مختاری در بررسی اثر تلفیق دو عامل بیوکنترل *T.harzianum* BI و *Pseudomonas fluorescens* علیه نماتود *M.javanica* حالتی که از قارچ به روش خیساندن خاک + باکتری به صورت اسپری روی برگ های گیاه گوجه فرنگی استفاده شد را به عنوان بهترین تیمار معرفی کرد، این تیمار علاوه بر کاهش بیماری در گلخانه، سبب افزایش وزن تر ریشه و قسمت های هوایی شد. در استفاده دو عامل به صورت خیساندن خاک کاهش بیماری به طور مؤثر مشاهده شد، اما این تیمار در افزایش وزن تر ریشه و اندام های هوایی نسبت به شاهد موثر نبود (مختاری، ۱۳۸۶).

در تحقیق دیگری استفاده از تلفیق دو عامل *T. harzianum* و *Pseudomonas fluorescens* به شکل B.sd + F.sd (قارچ به روش خیساندن خاک+ باکتری به روش خیساندن خاک) علیه نماتود مولد گره ریشه گوجه فرنگی، جمعیت نماتود را به میزان معنی داری نسبت به شاهد کاهش داد (Siddiqui & Shaukat, 2004).

بررسی تغییرات میزان فنل کل

میزان فنل کل در تیمار با اسید سالیسیلیک و قارچ آنتاگونیست با گیاه آلوده، از دومین روز پس از مایه زنی تا روز چهارم افزایش یافت و پس از آن با شیب ملایمی رو به کاهش گذاشت.

جز روز اول در تمام روزهای نمونه برداری اختلاف با شاهد معنی دار بود. در روز ششم اختلاف در میزان فنل کل جز با شاهد، با هیچ یک از تیمارهای دیگر معنی دار نبود. در تیمار گیاه آلوده با قارچ آنتاگونیست به صورت تنها میزان فنل کل تا روز پنجم دارای روند افزایشی بود، جز روز اول در روزهای بعد اختلاف با شاهد معنی دار بود. میزان فنل کل در تیمار گیاه آلوده با اسید سالیسیلیک جز روز اول در تمام روزهای بعدی با شاهد دارای اختلاف معنی دار بود و بیشترین میزان آن در روز چهارم بود و در روزهای بعدی روند کاهشی داشت. در تیمار با نماتود بیشترین میزان فنل کل در روز ششم مشاهده شد (شکل ۵).



شکل۵- تغییرات میزان فنل کل در ریشه گوجه فرنگی مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک SA، *T. harzianum* BI (T) و *M. javanica* (M) به تنهایی و توامـاً، اعـداد مربوط به نمـودار، میانگین چهـار تکـرار می باشند و بار روی ستون ها خطای استـاندارد (±SE) می باشد.

در ارتباط میزبان و عامل بیماریزا، وقتی که ارقام مقاوم و حساس با هم مقایسه می شوند، در بیشتر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی بعد از ابتلا به بیماری در رقم مقاوم زیادتر از رقم حساس است و یک رابطه خطی مثبت بین مقدار ترکیبات فنلی و مقاومت گیاه وجود دارد (Goodman *et al*., 1986).

ترکیبات فنلی نقش‌های مهمی در مقاومت دارند، به‌خصوص با ساختن موانع غیر قابل نفوذ مهمی که از انتشار بیمارگر و اثرات آنزیمی آن ممانعت می نمایند.

مشتقات فنلی می توانند اکسید شوند و با پروتئین‌ها واکنش نشان دهند، و باعث ایجاد اختلال در کار آنزیم شوند و از این طریق زنده مانی مهاجم را محدود کنند یا می توانند در دیواره سلولی ته نشین شوند و به عنوان یکی از اولین سدها در دفاع گیاه بر علیه آلودگی عمل نمایند (غلام نژاد و همکاران، ۱۳۸۸).

استرس‌های شیمیایی، مکانیکی یا بیولوژیکی در متابولیسم فنلی گیاه تغییراتی ایجاد می کنند. این تغییرات در سطح میزان فنل می تواند در حفاظت گیاه بر علیه استرس نقش داشته باشد (Mayr *et al*., 1994).

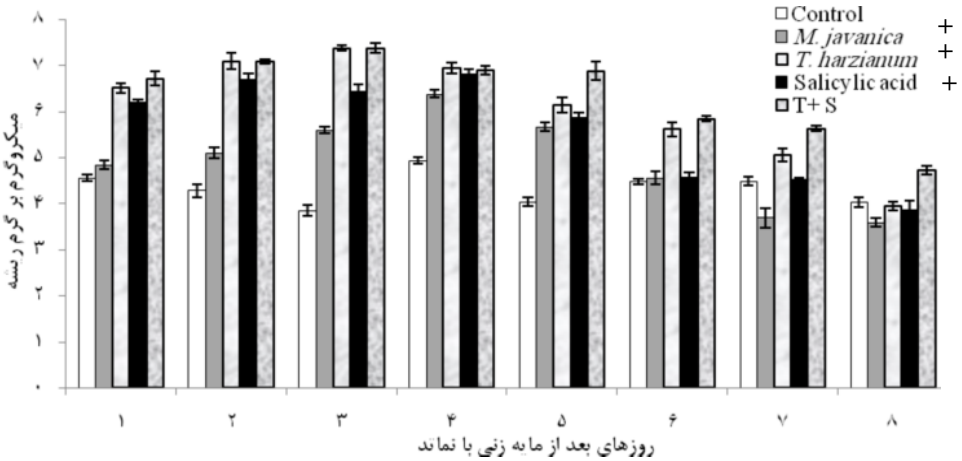
ملکی زیارتی (۱۳۸۵) نشان داد که میزان فنل کل گوجه فرنگی رقم مقاوم King stone پس از تیمار با قارچ *Trichoderma harzianum* BI به تنهایی و بدون حضور نماتود از روز اول پس از مایه زنی و طی روز های متوالی با شاهد اختلاف معنی دار داشته و حداکثر میزان آن در روز هشتم بوده، سپس در روز نهم کاهش سریع صورت گرفت. سرافراز نیکو در سال ۱۳۸۷ نشان داد که میزان فنل کل در گیاه گوجه فرنگی پس از تیمار اسید سالیسیلیک به تنهایی و بدون حضور نماتود در بعضی از روزهای نمونه برداری در مقایسه با شاهد اختلاف معنی دار دارد (سرافراز نیکو، ۱۳۸۷). در این تحقیق، در تیمار مایه زنی شده همزمان قارچ تریکودرما و نماتود *M. javanica* نیز میزان فنل کل در روز هشتم بعد از مایه کوبی به حداکثر رسید و سپس به تدریج کاهش یافته است.

از نتایج آزمایش مربوط به میزان ترکیبات فنل در میوهٔ گوجه‌فرنگی‌های مایه زنی شده با آنتاگونیست و اسید سالیسیلیک چنین استنباط می‌شود که این دو عامل باعث افزایش القا و سنتز ترکیبات فنلی گیاه گوجه فرنگی شده و مقدار مواد فنلی در روز های متوالی نمونه برداری به صورت نسبتاً سریعی افزایش یافته وحداکثر میزان آن در روز چهارم مشاهده شده است.

بررسی تغییرات میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل در تیمار تلفیقی در تمامی روزهای نمونه برداری، به‌جز آخرین روز نمونه برداری دارای اختلاف معنی دار با شاهد بود. در هیچ یک از روزهای نمونه برداری اختلاف با تیمار قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* BI و نماتود معنی دار نبود. در روزهای اول، دوم و چهارم اختلاف معنی داری با تیمار اسید سالیسیلیک + نماتود مشاهده نشد. همچنین اختلاف با

تیمار نماتود تنها در روز چهارم معنی دار نبود. مقدار عددی فلاونوئید کل در روز سوم به بیشترین حد خود رسید و پس از آن به تدریج کاهش یافت. میزان فلاونوئید کل در این تیمار در روزهای اول تا پنجم تغییر معنی داری از نظر مقدار عددی نشان نداد. میزان فلاونوئید کل در تیمار با قارچ آنتاگونیست در روزهای هفتم و هشتم اختلاف معنی داری با شاهد نداشت. در سایر روزها اختلاف با شاهد معنی دار بود. بیشترین مقدار فلاونوئید کل در روز سوم مشاهده شد و پس از آن به تدریج کاهش یافت. در تیمار با اسید سالیسیلیک بیشترین مقدار فلاونوئید کل در روز دوم مشاهده گردید. مقدار فلاونوئید کل در بین روزهای نمونه برداری، از روز اول تا چهارم تغییر معنی‌داری نشان نداد. در روزهای ششم، هفتم و هشتم تفاوت معنی داری با شاهد مشاهده نشد. در تیمار با نماتود تنها در روز اول اختلاف معنی داری با شاهد مشاهده نشد. بیشترین مقدار فلاونوئید کل در روز چهارم به بیشترین میزان خود رسید و پس از آن کاهش یافت. در روزهای ششم و هشتم نیز اختلاف با شاهد معنی دار نبود (شکل۶).



شکل۶- تغییرات میزان فلاونوئید کل در ریشه گوجه فرنگی مایه زنی شده با اسید سالیسیلیک SA، BI *T. harzianum* (T) و (M) *M. javanica*. اعداد مربوط به نمودار، میانگین چهار تکرار می باشند و بار روی ستون ها خطای استاندارد (±SE) می باشد.

در بررسی تغییرات میزان فلاونوئید کل در ریشه گوجه فرنگی، تیمار تلفیقی عامل آنتاگونیست و اسید سالیسیلیک و نماتود (Tsd+ SAsp+ N) و تیمار با قارچ آنتاگونیست و نماتود (Tsd+ N) سبب افزایش معنی دار میزان فلاونوئید کل در تمامی روزهای نمونه برداری در مقایسه با شاهد شدند. در تیمار تلفیقی گیاهچه ها علاوه بر قارچ آنتاگونیست، با اسید سالیسیلیک نیز مایه‌زنی گردیده، اما اختلاف معنی‌داری با گیاهچه های تیمار شده با آنتاگونیست تنها مشاهده نشده است. می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از اسید سالیسیلیک در این تیمار بر افزایش میزان فلاونوئیدکل در ریشه گوجه فرنگی در حضور قارچ آنتاگونیست مؤثر نبوده است.

در مقایسه میزان فلاونوئید کل در دو تیمار Tsd+ N و SAsp + N، تیمار با قارچ آنتاگونیست سبب افزایس مؤثرتر و پایدارتری در مقایسه با تیمار با اسید سالیسیلیک شده است، به نظر میرسد این اثر به دلیل رشد و توسعهٔ قارچ آنتاگونیست در سطح ریشه و منطقه ریزوسفر و در نتیجه پایداری اثر آن در مقایسه با اسید سالیسیلیک می باشد. علاوه بر این قارچ آنتاگونیست مستقیماً در منطقه ریشه استفاده شده است، که این نکته نیز می‌تواند در تفسیر نتایج حاصل مورد توجه قرار گیرد. پاتوژن‌ها و نیز استرین‌های غیر بیماریزا سبب القاء متابولیت‌های مرتبط با مقاومت می شوند و متابولیت های ثانویه را القاء می‌کنند (Yamamoto *et al*. 2000). عصاره یک گیاه با نام تجاری Milsana سبب القاء سنتز فلاونوئیدها در سایت آلودگی برگ های خیار و کاهش انتشار سفیدک پودری شده است (Fofana *et al*, 2002; Mcnally *et al*. 2003). همانطور که ذکر شد مقدار عددی فلاونوئید کل در روز سوم به بیشترین حد خود رسید، پس می توان نتیجه گرفت که فلاونوئید کل

نسبت به فنل کل زودتر القا می شوند و ژنهای کنترل کننده آنها زودتر بیان می شوند.

نتیجه گیری کلی

یکی از بزرگترین مشکلات معرفی روشهای مختلف بیوکنترل برای بیماریهای گیاهی این است که معمولاً آنتاگونیست ها در مزرعه و در شرایط طبیعی سریعاً خواص حیاتی خود را از دست می دهند. نتایج آزمایشگاهی با نتایجی که در گلخانه و یا شرایط طبیعی حاصل می‌شود، الزاماً همبستگی مثبت ندارند زیرا در شرایط آزمایشگاهی شرایط کاملاً کنترل شده می‌باشد و تنها اثر یک عامل مورد بررسی قرار می‌گیرد، در حالی که در شرایط گلخانه عوامل متعددی اثر گذار خواهند بود. در گلخانه افزایش غلظت اسید سالیسیلیک سبب توقف رشد جدایه نشد و تنها سرعت رشد را کاهش داد. این نشان می‌دهد که اسید سالیسیلیک بر روی مکانیسم‌های آنتاگونیستی پاتوژن اثر نمی گذارد. نظر به اینکه بسیاری از عوامل زراعی نظیر تناوب، افزایش مواد اصلاح کننده خاک، تغییرات اسیدیته محیط و تغییر بافت خاک و شرایطی دیگر می تواند در استقرار آنتاگونیست ها موثر باشد و اثر آنها را افزایش دهد، بررسی اثر آنتاگونیستهای مورد نظر در شرایط مزرعه ای و خاک غیراستریل برای شناسایی شرایط ایده آل در جهت بالا بردن کارایی عوامل بیوکنترل و روشهای به کار گرفته شده ضروری می باشد.

با وجود این که نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده همزمان از آنتاگونیست *T. harzianum* BI و اسید سالیسیلیک سبب افزایش معنی‌دار ترکیبات دفاعی گیاه و در نتیجه کنترل بیماری می‌شوند، موفقیت در کنترل بیولوژیک این نماتود (*M. javanica*) نیازمند مطالعات طولانی و بویژه بررسی در شرایط طبیعی است. این روش می‌تواند به عنوان یک روش تکمیلی مطرح شود و در کنار سایر روش‌های کنترل نماتود انجام شود. به عنوان مثال یکی از روشها برای افزایش فعالیت بیوکنترلی عوامل آنتاگونیست، می‌توان این عوامل را با دیگر عواملی که کمتر تحت تأثیر عوامل خارجی قرار می گیرند مانند قارچ کش های شیمیایی با ایمنی زیستی بالا با هم به کار برد.

با توجه به اینکه آنتاگونیست‌ها بیشتر خاصیت پیشگیری کننده دارند تا خاصیت کنترل کنندگی، لذا تلفیق عوامل آنتاگونیستی قارچی با سایر روش‌های کنترل مانند استفاده از محرک های شیمیایی که اثر سوء بر عامل آنتاگونیست ندارند و در عین حال سبب افزایش اثر آنتاگونیستی می‌شوند می‌تواند مؤثر واقع شود.

REFERENCES

1. Ahoon manesh, A. (2000). *Principles of combating plant diseases*. Esfahan University of Technology Press. 342pp.(In Farsi).
2. Batta, Y. A. (2004). Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifia formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue A4ld. *Journal of Food Microbiology*, 96, 281– 288.
3. Daayf, F., Adam, L. & Fernando, W. G. D. (2003). Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using *in vitro*, detached-leaves, and whole-plant testing systems. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, 276-284.
4. Etebarian, H. R., Sholberg, P. L., Eastwell, K. C., and Sayler, R. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 591-598.
5. Fofana, B., McNally, D. J., Labb´e, C., Boulanger, R., Benhamou, N., S´eguin, A., B´elanger, R. R. (2002). Milsana-induced resistance in powdery mildew-infected cucumber plants correlates with the induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61,121–132.
6. Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Sheikh Beig, M. A., Nemati, A., Naseri, F. (2009). Biological control of apples blue mold by two isolates of *Saccharomyces cervisiae* in order to reduce the environmental pollution. *Journal of Medicine Science*, 3, 182-189.(In Farsi).
7. Goodman, R. N., Kiraly Z., and Wood K. P. 1986. *Biochemical and physiological aspects of plant disease*. University of Missouri Press. 433 pp.
8. Grayer, R. J., Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Journal of Phytochemistry*, 37, 19–42.
9. Harborne, J. B. (1999). Plant polyphenols and their role in plant defence mechanisms. In: Brouillard, R. M. Scalbert A. (Eds), Polyphenols, Vol. 94(pp 19–26) INRA Editions.

10. Harman, G. E. Hayes, C. K., and Ondik , K. L. (1998). Asexual genetics in Trichodrma and Gliocladium. Vol1 (eds Kubicek, C. P., and Harman, G. E.). 243-270. Taylor and Francis, London.
11. Hussey, R. S. and Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique, *Plant Disease Reporter*, 57, 1025-1028.
12. Jepson, S. B. (1987). *Identification of root – knot nematodes*. CAB International.
13. Katoch, R., Mann, A. P. S., Sohal, B. S. (2005). Enhanced enzyme activities and induction of acquired resistance in pea with elicitors. *Journal of vegetable science*, 11, 67-83.
14. Kempster, V.N., Davies, K. A. & Scott, E. S. (2001). Chemical and biologycal induction of resistance to the clover cyst nematode(*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). *Journal of Nematology*, 3, 35 – 43.
15. Malekiziarati, H. (2007). *Biological control of root knot nematode Meloidogyne javanica by Trichoderma harzianum and investigation of some biochemical defense mechanisms in tomato*. MSc thesis, University of Tehran. (In Farsi).
16. Manzanilla-Lopez, R. H., Kenneth, E. & Bridge, J. (2004). Plant diseases caused by nematodes. In Z. X. Chen, S. Y. Chen & D. W. Dickson (Eds.), *Nematology—advances and perspectives*. Volume II: Nematode management and utilization (pp. 637–716). Cambridge, MA: CABI Publishing.
17. McNally, D. J., Wurms, K.V., Labb´e, C., B´elanger, R. R. (2003). Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. PMPP, 63, 293–303.
18. Mokhtari, S. (2007). *Biological control of root knot nematode- Meloidogyne javanica by Pseudomonas flourescens and Trichoderma harzianum*. MS thesis, University of Tehran. (In Farsi).
19. Nandi, B., Kundu, K. Banerjee, N. & Babu, S. P. S. (2003). Salicylic acid induced suppression of *Meloidogyne incognita* infestation of okra and cowpea. *Journal of Nematology*, 5, 747 – 752.
20. Ruuhola, T., Yang, S. (2005). Wound- induced oxidative responses in mountain birch leaves. *Annals of Botany*, 97, 29–37.
21. Sarafraz Nikoo, F. (2009). *Resistance induction against Meloidogyne javanica by chemical and microbial elicitors in tomato plant and investigation of some reactive oxygen species(ROS) and the relative enzyms*. MS thesis, University of Tehran. (In Farsi).
22. Seevers D. M., Daly J. M., and Catedral F. F. (1971). The role of peroxidase isozyme in resistance to wheat stem rust disease. *Journal of Plant Physiology*, 48, 353-360.
23. Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Esterella, A., Keleifeld O., and Spiegel, Y. (2001). Biological control of the root_knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology*, 91, 687-693.
24. Siddhuraju, P. & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of Drumstick tree (Moringa oleiferea Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2144–2155.
25. Siddiqiui, I. A., and Shaukat, S. S. (2004). *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds *in vitro* and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescence* in tomato. *Letters in Applied Microbiology*. 38, 169-176.
26. 26.Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 53–77.
27. Whithead, A.G. (1997). *Plant nematode control*. CAB International Ltd. 348pp.
28. 28.Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Journal of Food Chemistry*, 64, 555–559.