مهار زیستی نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* توسط *Trichoderma harzianum* i25 و بررسی تغییرات ترکیبات دفاعی در گیاه گوجه فرنگی*

عفت عابدی[۱]، مجید اولیا[۱]** و لیلا شبانی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۱)

چکیده

در این بررسی اثر همستیزی جدایه *Trichoderma harzianum* i25 بر مهار نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای و نیز توانایی جدایه قارچی در القا آنزیم‌های دفاعی پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و فنل کل در گوجه فرنگی مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا با استفاده از روشهای ریختی و ملکولی نماتود ریشه گرهی و با استفاده از روش ریختی جدایه قارچی، مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس در شرایط آزمایشگاهی اثر عصاره کشت جدایه i25 بر مرگ و میر لارو سن دو (J_2)،جلوگیری از تخم تفریخ و توانایی جدایه در انگلی نمودن تخم‌های موجود در توده‌ی تخم نماتود ریشه گرهی مورد آزمون قرار گرفت. در بخش گلخانه نیز تاثیر جدایه مورد نظر روی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی و جمعیت نماتود ریشه گرهی بررسی شد. همچنین در بررسی دیگری ریشه گیاهچه‌های گوجه فرنگی در مرحله ٦ برگی توسط سوسپانسیون اسپور جدایه i25 و نماتود مایه‌زنی شد و میزان فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و فنل کل در روز اول تا هشتم بعد از مایه‌زنی، اندازه‌گیری گردید. این جدایه علاوه بر ممانعت از تفریخ تخم و افزایش مرگ‌ومیر لاروها، باعث انگلی شدن تخم‌های موجود در کیسه تخم نماتود در شرایط آزمایشگاه شد. در شرایط گلخانه‌ای نیز جدایه قارچی باعث کاهش شدت بیماری شده و ۸۵٪ جمعیت نماتود را کاهش داد و نیز باعث افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه میزبان شد. میزان فعالیت آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز نیز افزایش یافت که این افزایش در روز چهارم و پنجم پس از مایه‌زنی به حداکثر میزان خود در تیمار آلوده مایه‌زنی‌شده با قارچ رسید. مایه‌زنی گیاهچه‌ها باعث افزایش مقدار فنل کل در برگ گیاه شد که بیشترین میزان آن در گیاه آلوده تیمارشده با جدایه قارچی در روز هشتم بعداز مایه‌زنی مشاهده شد. نتایج حاصله نشان از توانایی جدایه i25 در مهار زیستی نماتود ریشه گرهی و نیز امکان تحریک مقاومت القایی در گیاه گوجه فرنگی علیه این نماتود دارد.

کلیدواژه: عصاره کشت قارچ، پلی فنل اکسیداز ، پراکسیداز،فنل کل

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول،ارائه شده به دانشکده کشاورزی ، دانشگاه شهرکرد

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: olia100@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاهپزشکی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه شهرکرد

Biological Control of Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica*, using *Trichoderma harzianum* i25 and investigation on the plant defense compounds flactuations on tomato

E. Abedi[1], M. Olia[2*] and L. Shabani[3]

(Received: 21.1.2014; Accepted: 13.10.2015)

Abstract

In this study, the bio-control activity of *Trichoderma harzianum* i25 on root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in the laboratory and greenhouse conditions and its ability to induce biochemical defense enzymes such as peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) and total phenol on tomato were investigated. At first, the nematode by the help of morphological and molecular characters and then fungal isolate using morphological one were identified. Infection ability of fungal isolate on the eggs of *M.javanica* and effects of fungal culture filtrate on egg hatching and mortality of *M. javanica* juveniles (J_2) were tested *in vitro* experiment. In the greenhouse experiment, effect of the fungus on tomato plants growth parameters as well as nematode population examined. Also in another experiment, host plant roots at 6 leaf stage were inoculated with fungal spore suspension and nematode as well and POX, PPO and total phenol activity measured after 1 to 8 days of inoculation. Results indicated that the fungal isolate prohibited larval egg hatching and increased nematode mortality and also parasitized the eggs in the egg masses. In the greenhouse, the fungal isolate reduced disease and suppressed nematode population at 85% and also the fungus increased host plant growth parameters. The amount of POX and PPO increased and this increase was at its max. in the 4th and 5th day of the infected plant treated with the fungus. Inoculation of the tomato seedlings with the fungus increased the total phenol amount in the leaves in which the highest amount recorded in the infected fungus treated plant on the 8th day. Results indicated the potential of the isolate i25 in nematode bio-control.

Keywords: fungal Culture filtrate ,polyphenol oxidase, peroxidase, total phenol

* Corresponding author's E-mail: Olia100@yahoo.com
1. M.Sc. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, University ofShahrekord.
2. Associate Prof. Department of Plant Protection, University of Shahrekord.
3. Assistant Prof. Department of Biology, University of Shahrekord.

مقدمه

نماتودهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* Goeldi, 1887) از نظر اقتصادی مهم‌ترین نماتودهای انگل گیاهی در سطح جهان می‌باشند. این نماتودها به عنوان انگل اجباری بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی مطرح می‌باشند و اغلب ارتباط پیچیده و اختصاصی با میزبان خود برقرارمی‌کنند (Hussey & Janssen 2002). گونه‌های *M.arenaria, M. incognita, M. hapla* و *M. javanica* از لحاظ اقتصادی بسیار مهم و گستره جغرافیایی و دامنه میزبانی وسیعی دارند. بیش از ۹۰٪ خسارت وارده به گیاهان در جهان در اثر نماتود ریشه‌گرهی مربوط به این چهار گونه عمده است (Hugall *et al.* 1999). برای مهار این نماتودها از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که اغلب کارایی لازم را نداشته یا نظیر مبارزه شیمیایی مضرات زیست محیطی به دنبال دارد. در سال‌های اخیر مهار زیستی به عنوان یک روش مناسب جهت مهار بیمارگرها مطرح شده که در این روش آنتاگونیست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sharon *et al.* 2001). از جمله عوامل مهار زیستی می‌توان به باکتری‌ها و قارچ‌ها اشاره نمود که در مهار زیستی علیه نماتودها، قارچ‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند. بعضی گونه‌های قارچ *Trichoderma* (Persoon1794) جهت مهار زیستی نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica* مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sharon*et al.* 2001, Harman2000, Harman *et al.*2004) از مهم‌ترین مکانیسم‌های این آنتاگونیست در مقابل نماتودها، می‌توان به ایجاد متابولیت‌های ضدنماتودی وکاهش ترشحات ریشه که سبب جلوگیری از جذب نماتود می‌شود واثر مستقیم قارچ بر تخم ولارو نماتود اشاره کرد. از دیگر مکانیزم‌های این قارچ در کنترل عوامل بیماری‌زا، القاء مقاومت و تغییر آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز، فنل‌اکسیداز، کاتالاز و ترکیبات دیگری مانند فنل در گیاه می‌باشد. آنزیم پراکسیداز در بسیاری از گیاهان بررسی شده، دارای خاصیت کاتالیزکنندگی شدیدی است و در فرایند اکسیداسیون فنل‌ها دخالت دارد (Silva *et al.* 2004, Mohammadi & Kazemi 2002). نقش ترکیبات فنلی از سال‌ها قبل در مقاومت گیاهان به عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد توجه قرار گرفته و به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها و پلی‌فنل‌اکسیداز، در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی به خصوص نماتودها به صورت سیستمیک دخالت دارند (Ogallo & McClure 1996,Kosuge 1969). کلنیزاسیون ریشه توسط *Trichoderma* spp. باعث افزایش رشد و توسعه ریشه و تولید محصول، مقاومت به استرس‌های غیرزیستی و افزایش بازده استفاده از مواد مغذی خاک شود (Spiegel & Chet 1998,Sharon *et al.* 2001). تلاش‌های متعددی در جهت استفاده از گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* جهت مهار زیستی نماتودهای انگل گیاهی انجام شده است (Sharon *et al.*2001,Elad *et al.*1983). *وینـدهام و همکاران* (Windham *et al.*1989) با مایه‌زنی دو جدایه *T. harzianum* و *T. koningii* به خاک کاهش تعداد تخم نماتود *Meloidogyne arenaria* را مشاهده نمودند. *پرواتاردی و همکاران* (Parvatha Reddy*et al.* 1996) با کاربرد مخلوط *T. harzianum* و عصاره چریش جمعیت نماتود مرکبات *Tylenchulus semipenetrans* را کاهش جمعیت دادند. همچنین اثر متقابل *T.harzianum* و *Globodera rostochiensis* در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد که قارچ به درون سیست و تخم داخل آن نفوذ کرده و باعث مرگ لاروها می‌شود (Siffulah & Thomas 1996).

مایر و همکاران (Meyer *et al.* 2001) دریافتند که

جدایه‌های *Trichoderma* در افزایش رشد گیاه و کاهش خسارت ناشی از نماتود مؤثرند. *سوارز و همکاران* (Suarez *et al.*2004) نشان دادند که قارچ *Trichoderma* مستقیما از طریق افزایش مقدار کیتیناز و پروتئناز، تخم و لارو نماتود را انگله می‌کند. اثر *T. harzianum* BI در سیستمیک شدن ترکیبات فنلی ایجاد شده در گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتود ریشه‌گرهی *M. Javanica* و اثر مهار زیستی این قارچ روی گونه ذکر شده و تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی بررسی گردید (Maleki Ziarati *et al.*2008, 2009). همچنین اثر غلظت‌های مختلف اسپور جدایه قارچی *T. harzianum* BI بر مهار زیستی نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica* در شرایط گلخانه از طریق کاهش جمعیت نماتود و شدت بیماری مشاهده شد (Sahebani & Hadavi 2008). همچنین اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* BI و سالسیلیک اسید را بر مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتود ریشه‌گرهی *M. Javanica* با اندازه‌گیری آنزیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز و میزان فنل کل و نشان داده شد که استفاده تلفیقی از سالسیلیک اسید و عامل آنتاگونیست باعث افزایش معنی‌دار میزان فنل کل گردید و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین‌آمونیالیاز و فنل کل در روز چهارم بعد از مایه‌زنی به حداکثر میزان خود رسید (Naserinasab *et al.* 2011).

براساس تحقیقات انجام شده ایجاد مقاومت القایی و القاء ترکیبات فنلی در گیاه توتون گوجه‌فرنگی وابسته به تولید پروتین‌های اختصاصی که در ارتباط با پدیده‌ی بیماری‌زایی وسیستمیک شدن در گیاه می‌باشد (Van Loon & Vanstrien 1999). عکس‌العمل بافت گیاه در مقابل حمله بیمارگرها که منجر به افزایش مقدار مواد فنلی می‌شود به موازات افزایش تنفس و پروتئین در گیاه صورت می‌گیرد واین افزایش سنتز فنل در نتیجه فعالیت غیر عادی بافت‌های مورد حمله گیاه در برابر بیماری می‌باشد (Vidhyasekaran 2002).

هدف از این پژوهش تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و تغییرات فنل کل در اثر مایه‌زنی جدایه *Trichoderma harzianum* i25 بر گوجه فرنگی آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌های بررسی

۱) شناسایی و تهیه جمعیت نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica*

جهت تهیه جمعیت خالص نماتود، یک کیسه تخم (egg mass) از ریشه گوجه‌فرنگی آلوده جدا و در مجاورت ریشه یک گیاهچه چهاربرگی گوجه‌فرنگی رقم فلات در گلدان حاوی خاک سترون قرار داده شد. بعد از گذشت ۶۰ روز، تخم و لارو سن دو نماتود از ریشه‌های آلوده با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ استخراج شد (Hussey & Barker 1973). برای تعیین گونه نماتد، از روش‌های ریخت‌شناختی و ملکولی استفاده شد. به همین منظور، از انتهای بدن نماتود ماده به روش *تیلور و نجستر* Taylor & (Netscher 1974) برش تهیه و مشخصات ریختی آن بررسی گردید. همچنین گونه نماتد مورد استفاده با استفاده از روش ملکولی *زیلسترا و همکاران* (Zijlstra 1997) ارزیابی گردید.

۲)جداسازی و شناسایی قارچ *Trichoderma harzianum*

بیست نمونه از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک‌های زراعی استان‌های اصفهان و چهار محال و بختیاری انتخاب

گردید. سپس از نمونه‌ها در آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه گردید و ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر نمونه به پتری ۶ سانتی‌متری حاوی محیط کشت‌های چون سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) مالت-آگار (MA=MEA)، محیط کشت آرد ذرت-آگار (CMA) و آرد ذرت-دکستروز-آگار(CMD) منتقل گردید قارچ‌های رشد یافته با روش نوک ریسه (Hyphal tip) خالص‌سازی شدند. برای شناسایی ریختی قارچ *Trichoderma* sp. اندازه طول و عرض کنیدیوم کنیدیوفور، اندازه و مشخصات فیالید تعیین و از کلید شناسایی گمز وبی‌ست Gams &Bissett (1998)استفاده گردید.

۳)ارزیابی آزمایشگاهی اثر جدایه *T. harzianum* i25 برنماتود ریشه‌گرهی *M. Javanica*

الف) بررسی اثرعصاره کشت جدایه قارچ بر مرگ ومیرلاروسن دو نماتود: چهار دایره با قطر یک سانتی‌متر از حاشیه رشد فعال جدایه قارچی در داخل ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی حاوی محیط کشت مایع،عصاره‌ی سیب زمینی-دکستروز (PDB)مایه‌زنی و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵°Cدر محیط ساکن انکوباتور نگهداری شد وسپس محیط کشت مایع(PDB) حاوی توده‌های رشد کرده قارچ از کاغذ صافی سترون واتمن شماره یک عبور داده شد، تا عصاره کشت قارچ استاندارد(s) بدست آید (Khan & Goswami1999). با افزودن مقادیر ۱۰ و ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر سترون، غلظت‌های 10^{-1}و 10^{-2} از عصاره کشت تهیه و نتایج با شاهد آب مقطر سترون مقایسه شد. غلظت‌های مختلف عصاره و شاهد داخل تشتک‌های پتری سترون منتقل و به هر پتری ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی لارو ۱۵۰ لارو سن دو اضافه گردیدوبعد از۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت تعداد مرگ ومیر مشاهده شده ثبت شد. آزمایش به صورت فاکتوریل (زمان نمونه‌برداری و غلظت) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد.

ب)بررسی اثر عصاره کشت جدایه قارچ بر تفریخ تخم‌های نماتود: غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ طبق روش قبل تهیه وبه همراه آب مقطر سترون به عنوان شاهد داخل تشتک‌های پتری منتقل شد.به هر تشتک۱۵۰ تخم نماتود ریشه‌گرهی سترون اضافه وپس از ۲۴، ۴۸و۷۲ساعت تفریخ تخم نماتود بررسی گردید.آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد.

ج)تعیین درصد انگلی شدن تخم‌های موجود درکیسه‌های تخم نماتد به وسیله‌ی قارچ: به منظور بررسی توانایی انگلی شدن تخم‌های موجود در کیسه‌های تخم به وسیله‌ی جدایه i25 دوایری با قطر یک سانتی‌متر از حاشیه رشد فعال جدایه قارچی به مرکزتشتک‌های حاوی PDA منتقل و تعداد چهار توده تخم استریل در چهار طرف تشتک‌های پتری قرارداده شد(Fatemi 1998)و از محیط کشت فاقد قارچ نیز به عنوان شاهد استفاده گردید تشتکها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸°Cنگهداری شدند وپس ازآن توده‌های تخم به مدت یک هفته روی محیط WA قرار داده شده و سپس مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در چهار تکرار انجام شد.

٤)آزمایشات گلخانه‌ای

الف)تهیه زادمایه **قارچ و جمعیت نماتود و افزودن آن‌ها به خاک گلدان‌ها:** ۵۰ گرم گندم در یک ارلن نیم لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیترآب مقطر ریخته و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰°C دو روز متوالی سترون شد دیسک‌های پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه جدایه قارچ

در شامل کشت فاقد بدون قارچ بود و ارلن به مدت یک ماه در دمای ۲۵°Cدر انکوباتور نگهداری شد.

ب)تیمارها وشاخص‌های اندازه‌گیری: تیمارهای آزمایش عبارت بودند از: ۱-گیاه سالم(شاهد) ۲-گیاه مایه‌زنی شده با نماتود ۳-گیاه مایه‌زنی شده با قارچ، ۴-گیاه مایه‌زنی شده با قارچ و نماتود. در تیمارهای مربوطه ده گرم مایه قارچ رشد یافته (متوسط در هر یک گرم 10^6اسپور)روی دانه گندم با دو کیلوگرم خاک سترون (۵٪ وزنی)به طور کامل مخلوط و داخل هر گلدان یک نشا۲۰ روزه (چهار برگی) گوجه‌فرنگی رقم فلات کشت داده شد. پس از ده روز نگهداری در گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد،به هر گلدان در تیمارهای مربوطه سوسپانسیونی از ۵۰۰۰ تخم و لارو سن دو استخراج شده و به روش *هوسی و بارکر* (Hussey &Barker 1973) مایه‌زنی شد وازآب مقطر سترون در تیمار شاهد استفاده گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی وپنج تکرار انجام گردید. گلدان‌ها به مدت ۷۰ روز در شرایط گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری وبه طور مرتب آبیاری شدند.

پس از برداشت شاخص‌های رشدی گیاه شامل وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی و شاخص‌های بیماری‌زایی نماتود شامل تعداد گال،توده تخم و تخم داخل هر توده و میانگین تعداد لاروسن دوم نماتود در ۲۰۰ گرم خاک تعیین گردید. فاکتور تولید مثل (R_f) یا نسبت جمعیت نهایی (مجموع لارو سن دوم موجود در خاک به همراه تمامی تخم‌های نماتود موجود روی ریشه) به جمعیت اولیه محاسبه شد ($R_f=P_f/P_i$). جهت محاسبه درصد تکثیر (Mr%)، از دو فاکتور جمعیت نهایی هر تیمار(P_f) به جمعیت نهایی تیمار نماتود(P_f) استفاده گردید (Mr%(Oostenbrink1966)=P_f/P_f).

۵)بررسی میزان تغییرات آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و ترکیبات فنلی برگ گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با نماتود وقارچ *T. harzianum* i25

الف)تهیه مایه تلقیح قارچ و نماتود و افزودن به خاک گلدان‌ها: جمعیت نماتود به صورت سوسپانسیونی حاوی تخم ولارو سن دو به صورت قبل تهیه شد. جهت تهیه مایه قارچ، جدایه i25 روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) تکثیر وبا استفاده از لام هموسیتومترغلظت 10^6اسپوردر هر میلی‌لیترآب مقطر سترون از کشت ده روزه تهیه شد(Batta 2004). گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی شش برگی رقم فلات توسط ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپوربا غلظت فوق و تعداد۲۰۰۰ لارو نماتود به ازا هر گیاه در گلدان‌های ۲ کیلو گرمی به طور همزمان با ایجاد دو حفره به عمق ۴ سانتی‌متر در کنار طوقه و تزریق سوسپانسیون در پای ریشه‌ی گیاه با مایه‌زنی شدند. تیمارها شامل گیاه سالم و گیاه مایه‌زنی‌شده با نماتود گیاه مایه‌زنی‌شده با قارچ و گیاه مایه‌زنی‌شده با قارچ و نماتود بودند. آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل چهار تیمار ذکر شده و فاکتور دوم شامل هشت نمونه‌برداری به فواصل زمانی یک روزه بعد از مایه‌زنی بود.

ب)عصاره‌گیری بافت برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها: ۰/۱ گرم از برگ گیاه توزین و داخل هاون چینی درون نیتروژن مایع عصاره‌گیری و در ۱/۵میلی‌لیتر بافرنمک‌های فسفات حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) سائیده شد. بافر مورد استفاده در این مرحله دارای pH=۷/۴ و شامل ۰/۰۲ گرم KH_2PO_4، ۰/۱۴ گرم Na_2HPO_4، ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۰۲

جدول۱. اثر *Trichoderma harzianum* i25بر رشد گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*

Table 1. Effect of *Trichoderma harzianum* i25 on the growth of tomato plants,infected with *Meloidogyne javanica*

Treatment	Root dried weight (g)	Root fresh weight (g)	Root length (cm)	Shoot dried weight (g)	Shoot fresh weight (g)	Shoot Length (cm)
Control	5/27a	32/59a	33/80a	15/63ab	72/86b	80/80ab
Nematode	1/63c	12/04c	26/20b	17/70c	58/33c	35/80c
*T.harzianum*i 25	5/54a	35/07a	34/60a	17/92a	90/07a	83/63a
*T.harzianum*i 25+ Nematode	3/14b	23/54b	29/80ab	13/96b	80/61ab	71/60b

اعداد میانگین پنج تکرار هر تیمار می‌باشند. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح ۵٪ بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دارنیستند.

Data are the mean of five replicates. Values with the same letters in each column are not significantly different at 5% level according to LSD test

گرم KCl و ۱ گرم PVP بود.

عصاره‌گیری و نگهداری بافت در دمای ۴°C و بر روی یخ انجام شد.محلول حاصل را به داخل میکروتیوب‌ها منتقل و توسط میکروسانتریفوژ در10000gبه مدت 10 دقیقه در دمای ۴°Cسانتریفوژ شد. سپس میکروتیوب‌ها به داخل رک منتقل و روی یخ نگهداری شدند.

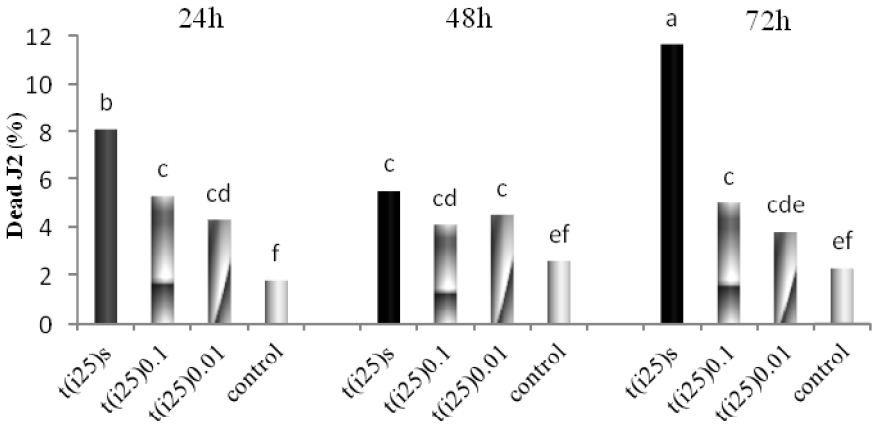
سنجش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز: مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز مطابق با روش *لین وکائو* (Lin&Kao 1999) حاوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی‌مولار و ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در کوت مخلوط شد. کینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر در مدت زمان یک دقیقه قرائت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل یک میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه می‌شود، تعریف شد.

سنجش میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز: مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر ازعصاره‌ی آنزیمی و ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار با pH=۶/۵ بود.برای شروع واکنش ۲۰۰ میکرولیتر کاتکول ۰/۰۱ مولار به مخلوط واکنش اضافه وتغییرات جذب نوری ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت هر واحد فعالیت آنزیم معادل تغییرات جذب نوری نمونه در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دقیقه در گرم وزن تر گیاه محاسبه شد.

ج)استخراج فنل از بافت گیاه: ۰/۱ گرم از بافت برگ در داخل هاون چینی حاوی نیتروژن مایع عصاره‌گیری و در۱/۵میلی لیتر متانول ۸۰٪ سائیده شد.پس از سانتریفوژ عصاره در دور g ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه،فاز بالایی که حاوی ترکیبات فنولی بود در دمای۲۰°C-نگهداری شد.

ارزیابی میزان فنل کل وتهیه محلول پایه وغلظت‌های استاندارد: میزان ترکیبات فنولی کل اندام هوایی گیاهچه‌ها توسط روش *سینگلتون و روسی* (Singleton&Rossi 1965) اندازه‌گیری شد. برای این منظور۳۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی نمونه‌ها به همراه ۱/۲ میلی‌لیترکربنات‌سدیم و ۱/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ترکیب و در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانش شد. مقدار ترکیبات فنولیک در برگ‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بدست آمد.

کلیه داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS(نسخه ۹/۲) آنالیز شدند. جدول تجزیه واریانس ترسیم و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSDدر سطح احتمال ۰/۵ ٪انجام شد.



شکل ۱.اثر غلظت‌های مختلف عصاره کشت *Trichoderma harzianum* i25 برمرگ ومیر لارو سن دو نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه بعد از ۲٤، ٤٨ و۷۲ ساعت. اعداد میانگین چهار تکرار هر تیمار هستند. اعداد دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ براساس آزمون LSD معنی دار نیستند

Fig 1.Effect of the different concentrations of culture filtrate of the isolate *Trichoderma harzianum* i25 on the the mortality of juveniles of *Meloidogyne javanica* in vitro conditions, after24, 48 and72 houres. Data are the mean of four replicates.Culumns with the same letters are not significantly different at 5% level according to LSD test.

نتایج وبحث

۱)شناسایی گونه نماتود ریشه‌گرهی

بااستفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌هاوبا استفاده از کلید شناسایی *ایسنباک و تریانتافیلو* (Eisenback & Triantaphyllou 1985)گونه نماتود، *M. Javanica* تشخیص داده و با روش ملکولی نیز تایید شد(Zijlstra 1997).

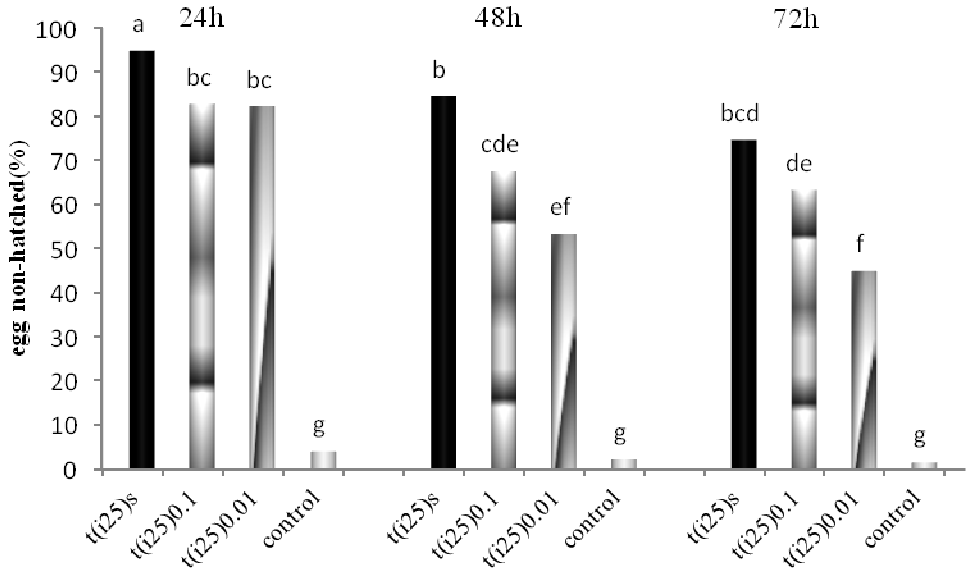
۲)شناسایی گونه قارچ *Trichoderma*

پرگنه قارچ روی محیط PDA در دمای ۲۵°Cبعداز یک هفته به صورت کرکی شکل تشکیل و بعد از سه تا پنج روز روی سطح آن به طور یکنواخت کنیدیوم‌های سبز رنگ ایجاد شد. بدون بوی مشخص گاهی رنگ‌زرد تاقهوه‌ای،کنیدیوم‌هابه اندازه ۲/۷–۳/۵ ×۲/۵–۳/۰ میکرومتر وابعاد فیالید ۴/۸–۸/۵×۲/۵–۳/۵میکرومتر،که براساس کلید با مشخصات *T. harzianum* مطابقت دارد Gams (&Bissett 1998).

۳)نتایج سنجش‌های آزمایشگاهی

بررسی اثر عصاره کشت جدایه *T. harzianum* i25 بر مرگ و میر لاروسن دو نماتود ریشه‌گرهی *M.javanica*

: میانگین مرگ ومیرلارو سن دو (J_2) نماتود تیمارعصاره کشت جدایه i25 با آب مقطر تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ داشت و به طور کلی عصاره قارچ در زمان ۷۲ ساعت و غلظت استاندارد بهتر از سایر زمان‌ها وغلظت‌ها عمل نموده است(شکل ۱). غلظت استاندارد عصاره کشت قارچ با اثر لاروکشی شدیدتر با دو غلظت 10^{-1}و 10^{-2} تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ دارد ولی این دو غلظت از نظر آماری دریک گروه قرار گرفته و هر سه غلظت نیز با شاهد تفاوت معنی‌داری دارند.



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف عصاره کشت *Trichoderma harzianum* i25 برتفریخ تخم نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه بعد از ۲٤، ٤٨ و۷۲ ساعت. . اعداد دارای حروف مشابه در سطح ۵٪ براساس آزمون LSD معنی دار نیستند.

Fig 2.Effect of the different concentrations of culture filtrate of the isolate *Trichoderma harzianum* i25 on the egg hatching of *Meloidogyne javanica* in vitro conditions after 24, 48 ,72 houe. Data are the mean of four replicates.Culumns with the same letters are not significantly different at 5% level according to LSD test

بررسی اثر عصاره کشت جدایه *T. harzianum* i25 برتفریخ تخم نماتود *M. javanica*

در آزمایش اثر عصاره بر تفریخ تخم نماتود *M.javanica* جدایه i25 در زمان ۲۴ ساعت وغلظت استاندارد موثرتر تشخیص داده شد که با تمام غلظت‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت و نیز با شاهد اختلاف معنی داری دارد(شکل ۲).همچنین طبق شکل ۲ غلظت‌های ده درصد ویک درصد عصاره نیز اختلاف معنی داری در هر سه زمان شمارش با شاهد داشته‌اند و توانسته اند تاحدی ازتفریخ تخم‌ها جلوگیری به عمل آورند.غلظت‌های استاندارد، 10^{-1}و10^{-2} عصاره کشت قارچ به ترتیب با ۸۴، ۷۱ و۶۰ درصد ممانعت از تفریخ بایکدیگر تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ ایجاد کرده اند.کاهش غلظت عصاره کشت باعث کاهش اثر ممانعت روی تفریخ تخم‌ها شده است. در مقایسه بین سه زمان شمارش، زمان ۲۴ ساعت دارای اختلاف معنی دار با زمان‌های ۴۸ و۷۲ ساعت می‌باشد.

قارچ‌ها توکسین‌ها ، متابولیت‌ها و آنزیم‌هایی به داخل محیط کشت در زمان رشدشان ترشح می‌کنند (Saksirirat & Hoppe 1991) کوتیکول J_2 اساسا از پروتین‌هایی تشکیل شده بنابراین افزایش فعالیت پروتولیتیکی همستیز باعث افزایش توانایی مهار زیستی می‌شود همچنین آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز دارای رابطه مستقیم با مرگ-ومیر لاروسن‌دو(J_2) می‌باشد (Goratari *et al* .2008; Blaxster & Robertson. 1998). *شارون و همکارانش* (Sharon *et al.* 2007) اثرعصاره کشت و اسپور جدایه‌هایی از *T. Asperellum* و *T. Atroviride* را بر پارازیتیسم تخم و لارو نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica*

بعد از گذشت ۴۸ ساعت بررسی نمودند که نتایج قابل قبولی بدست آوردند. نتایج آزمایش مهار زیستی *T. harzianum* BI علیه نماتود*M. javanica* در آزمایشگاه نشان داد که این انتاگونیست توانایی پارازیته کردن تخم نماتود و همچنین لارو سن دوم در محیط کشت را دارا می‌باشد که این توانایی می‌تواند در اثر تولید مواد آنتی بیوتیک و متابولیت ثانویه و تولید برخی آنزیم‌های لیز کننده کوتیکول نماتودها مانند پروتئاز باشد (Khan & Saxena. 1997). در پژوهش دیگری که توسط *الفتاح و همکاران*(Al-Fattah *et al.* 2007) انجام شد متابولیت خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتره شده *T. harzianum* Th3 ، توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ‌ومیر لاروسندو نماتود*M. javanica* شود آنها همچنین بیان نمودند متابولیت‌های ثانویه‌ای از قارچ‌ها ترشح می‌شود که محتوی مواد سمی برای نماتودهای پارازیت گیاهی است.ترکیبی از آنزیم‌ها برای از هم گسیختن پوسته تخم لازم است اگرچه مواد کیتینولیتیکی احتمالا مهم ترین نقش را در شکستن پوسته تخم دارند. (Khan *et al.*2002 ,Morton2004).(Tikhonov 2004, گونه‌های *Trichoderma* spp. در محیط کشت خود کیتیناز هایی ترشح می‌کنندکه ممکن است مانع تفریخ تخم شود(Chet & Baker. 1981).سیدیکو و همکاران(Siddiqui *et al.* 2001)بیان نمودند گونه های *Trichoderma* spp. باعث کاهش معنی‌داری در تفریخ تخم *M. javanica* می‌شوند که به علت مرگ لاروها می‌باشد.*خاتک و استفن*(Khattak & Stephen. 2008) در بررسی اثر عصاره کشت قارچ ۱۵ جدایه از *T. harzianum* در غلظت‌های ۱:۱، ۱:۱۰و۱:۱۰۰بیشترین درصد ممانعت از تفریخ تخم نماتود *M. javanica* را در غلظت ۱:۱ یا استاندارد توسط جدایه T9 و کمترین اثر را در غلظت ۱:۱۰۰ از عصاره کشت جدایه قارچی T15 مشاهده کردند که نتایج حاصل از این آزمایش مطابقت دارد.*الامیری*-Al) (Ameiri. 2009عصاره‌ی کشت سه جدایه Th3 ، Th2 و Th1 قارچ *T. harzianum* به صورت اتوکلاو شده واتوکلاو نشده علیه تخم نماتود *M. javanica* به کاربرد، وی به طور کلی عصاره اتوکلاو نشده را بهتر از اتوکلاو شده ارزیابی نمود اما در هر دو حالت درصد تفریخ تخم در همه‌ی تیمارها تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت، همچنین عصاره را با چهار غلظت۲۵، ۵۰، و ۱۰۰ ٪ به کار برد که بهترین غلظت را،غلظت ۱۰۰٪ و بعد از آن غلظت ۵۰٪ را نیز موثر در لارو کشی بیان نمود.

اثر جدایه *T. harzianum* i25 بر کیسه تخم‌های نماتود *M.javanica*

الف)اثر روی کیسه تخم:کلیه کیسه‌های تخم توسط جدایه قارچی مورد مطالعه کلونیزه شدند

ب)اثر قارچ روی انگلی شدن تخم‌های موجود در کیسه‌های تخم : تخم‌های موجود در کیسه‌های تخم در اثر تیمار جدایه انگلی شدند وآلودگی ۹۹ درصد بود در حالی که در تیمار شاهد که روی محیط فاقد پرگنه قارچ بود هیچگونه آلودگی دیده نشد وتعدادی ازتخم‌های بالغ نیز تفریخ شدند. آلوده سازی مستقیم عوامل مهار زیستی قارچی از اصلی‌ترین مکانیزم‌های کنترل نماتودهای پارازیت گیاهی است(Stirling. 1991;Kerry.1987) . *مهدی خانی و همکاران* (۱۳۸۸)توانایی جدایه‌هایی از دو گونه *Trichoderma harzianum* و*T. virens* را در پارازیته کردن سیت وتخم نماتود سیستی چغندر اثبات کردند .*شارون و همکارانش*(Sharon *et al.* 2001) با به کار بردن جدایه‌هایی از *T.harzianum* گزارش نمودند که برخی جدایه‌ها توانایی نفوذ به توده‌های تخم را دارند.

جدول ۲.تاثیر جدایه ***Trichoderma harzianum*** **i25** بر فعالیت نماتود ریشه گرهی ***Meloidogyne javanica*** در گوجه‌فرنگی

Table 2.Effect of *Trichoderma harzianum* i25 on the activities of *Meloidogyne javanica* in tomato plants

Treatment	No. of eggs/eggmas	No. of Egg mass/gr root	No. of gall/1gr of root	No. of J2/200 gr of soil
Control	-	-	-	-
Nematode	118/00a	42/20a	55/20a	191/00a
*T.harzianum*i 25	-	-	-	-
*T.harzianum*i 25+ Nematode	21/40b	16/40b	23/06b	27/20b

اعداد میانگین پنج تکرار هر تیمار می‌باشند. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح ۵٪ بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دارنیستند.

Data are the mean offivereplicates. Values with the same letters in each column are not significantly different at 5% level according to LSD test

آزمایشات گلخانه ای

اثر جدایه *T. harzianum* i25 بر شاخص‌های رشدی گیاه گوجه فرنگی

در آزمایش گلخانه ای قارچ آنتاگونیست توانست روی شاخص‌های مختلف رشدی اعم ازمتوسط وزن تر وخشک ریشه و ساقه ،متوسط طول ریشه وساقه اثر معنی داری بگذارد. کمترین شاخص‌های رشدی گیاه میزبان شاخص‌های رشدی(اندام هوایی وزیرزمینی) مربوط به گیاه آلوده به نماتود وفاقد قارچ است وبیشترین شاخص‌ها مربوط به تیمار واجد جدایه *T. harzianum* i25 و فاقد نماتود است ولی با شاهد سالم در اکثر موارد تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد.*ونیدهام و همکاران*(1989) با بررسی اثر دو جدایه *T. harzianum*(T-12) و *T. koningi*(T-8) بر رشد گیاه جو در حضور نماتود*M. arenaria* گزارش نمودند وزن تر ساقه ،وزن خشک ساقه و طول ساقه نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری دارد و نیز گیاهان تیمار شده با جدایه*T. harzianum*(T-12) نسبت به گیاهان آلوده تیمار شده با این جدایه دارای وزن خشک وتر ساقه بیشتری می‌باشند.*مایر* (2001) افزایش رشد اندکی در گوجه‌فرنگی تیمار شده با .*Trichoderma* spp در حضور*M. incognita* مشاهده کرد که با نتایج این پژوهش همسو می‌باشد. *آفکوپن و همکاران*(Affokpon *et al.*2011)بیان نمودند که گیاهان کنترل فاقد قارچ نسبت به گیاهان تیمار شده با ایزوله‌های مختلف قارچی دارای وزن ریشه کمتری بودند که نشان می‌دهد برخی ایزوله‌ها باعث تحریک رشد ریشه نیز می‌شوند.کلنیزاسیون ریشه توسط *Trichoderma* spp باعث افزایش رشد و توسعه ریشه و تولید محصول،مقاومت به استرس‌های غیر زیستی و افزایش بازده استفاده از مواد مغذی خاک می‌شود (Spiegel & Chet. 1998;Sharon et al. 2001).

اثر جدایه *T. harzianum* i25 برکاهش آلودگی و شاخص‌های جمعیتی نماتود*M. javanica*

در بررسی اثر آنتاگونیست بر شاخص‌های نماتود جدایه *T. harzianum* i25 توانست شاخص‌های تعداد تخم ، توده تخم ،گال وتعداد لارو به طور معنی داری(سطح ۵٪) در مقایسه با شاهد کاهش دهد(جدول ۲).طبق نتایج جدول ۳ این جدایه توانسته حدود ۸۵ درصد در کنترل

جدول۳. تاثیر جدایه *Trichoderma harzianum* i25 بر شاخص‌های نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*

Table 3. Effect of *Trichoderma harzianum* i25on the indices of *Meloidogyne javanica*

Treatment	Final population(PF)	Reproductive factor (RF)	Multiplication rate(Mr%)	Nematode Control(%NC)
Nematode	62917a	12/51a	100a	0b
T.harzianum i25+ Nematode	8942b	1/77b	14/21b	85/79a

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح ۵٪ بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دار نیستند

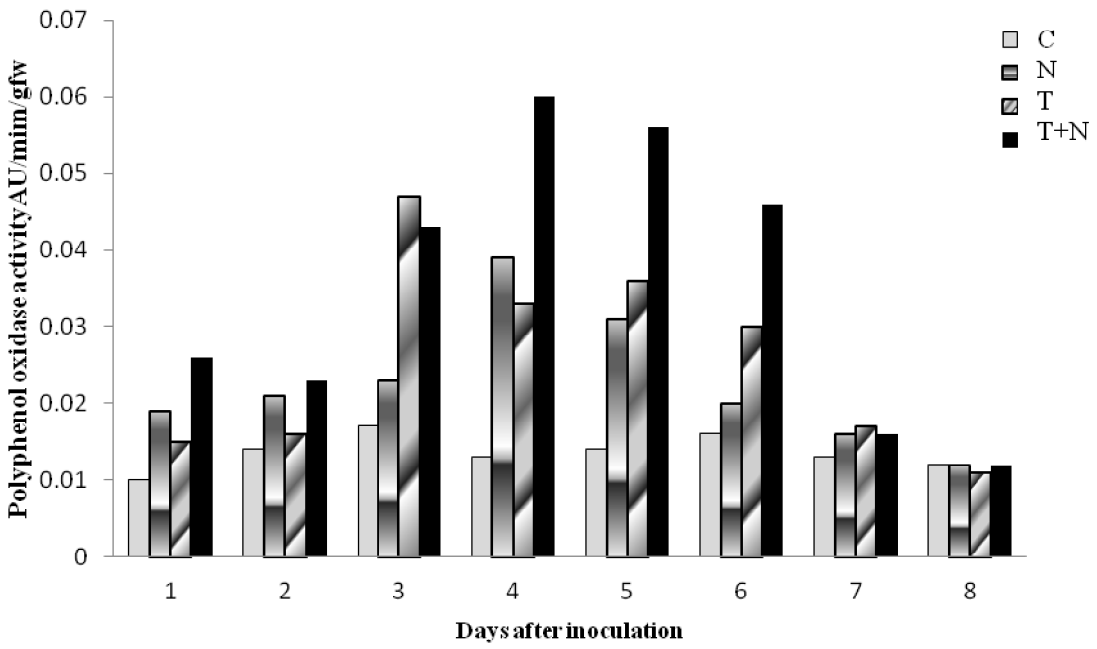
Number with the same letters are not significantly different at 5% level according to LSD test

نماتود موفق عمل نماید و درصد تکثیر را تا ۱۴ درصد کاهش دهد. جدایه‌های قارچ نمی‌توانند به طور کامل از ایجاد گال روی ریشه ممانعت کنند که این مسئله شاید به دلیل زمان کوتاهی که عامل مهار زیستی برای کنترل لارو سن‌دوم دارد، باشد (Al-Ameiri. 2009) نتایج آزمون مهار زیستی قارچ *T. Harzianum* نشان داده‌است که قارچ به کاهش قابل توجهی در فعالیت نماتود ریشه گرهی *M. javanica* شامل ایجاد بیماری و ایجاد گال روی ریشه‌ها، تعداد توده‌تخم و تعداد تخم در هر توده تخم موثرباشد. احتمالا قارچ باتحریک مکانیسم‌های دفاعی مانع نفوذ نماتود به داخل ریشه شده که با نتایج *شارون و همکاران* (2001)*ونیدهام و همکاران*(1989) و *صاحبانی و همکاران* (۱۳۸۴) مشابهت دارد.*پاندی و همکاران* (Pandey *et al*.2003)از جدایه‌های مختلفی از قارچ*T. Viride* جهت مهار نماتود *M. incognita*در گیاه نخود استفاده نمود طبق نتایج تحقیقات وی و همکارانش در همه گیاهان تیمار شده با جدایه‌های*T. viride* کاهش تعداد گال و جمعیت نهایی نماتود در شرایط مزرعه و کشت گلدانی اتفاق افتاد بطوریکه جمعیت *T. viride* افزایش یافته بود، همچنین تعداد تخمها و جمعیت لاروسن دو در هر گرم از ریشه به طور قابل توجهی در تیمارواجد قارچ کاهش یافته است .*الامیری* (2009) گزارش کرد تیمار گیاهان با جدایه‌های *T. harzianum* باعث کاهش معنی‌داری در تعداد گال ریشه آلوده به *M. javanica*در مقایسه با شاهد نماتودی دارد این کاهش در جدایه‌یTh3 در مقایسه با ضعیف ترین جدایه به بیش از ۵۰٪ هم می‌رسید. جدایه *T. harzianum* i25در گلخانه تا حد زیادی موفق عمل نمود که نشان از سازگاری آن با محیط و توانایی بقا و قدرت رقابت با دیگر میکروارگانیسم‌های موجود در خاک دارد.

سنجش تغییرات آنزیم‌ها وفنل کل

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

طی روز اول و دوم،در گیاهان گوجه فرنگی آلوده تیمار شده باجدایه *T.harzianum* i25 از نظر میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در مقایسه با سایر تیمارها تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ مشاهده نشد.اما در روز سوم پس از مایه‌زنی گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ در مقایسه با گیاهان سالم تیمار شده باقارچ و گیاه سالم (شاهد) دارای تفاوت معنی داری بودند.بیشترین میزان فعالیت آنزیم درروز چهارم بعد از مایه‌زنی در بین تمام روزهای نمونه برداری و مانند روزهای قبل در گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ ثبت گردید. فعالیت آنزیم در گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ و گیاه سالم تیمار شده با قارچ در روز پنجم کاهش یافت ولی در هر دو تیمار این کاهش نسبت به روز



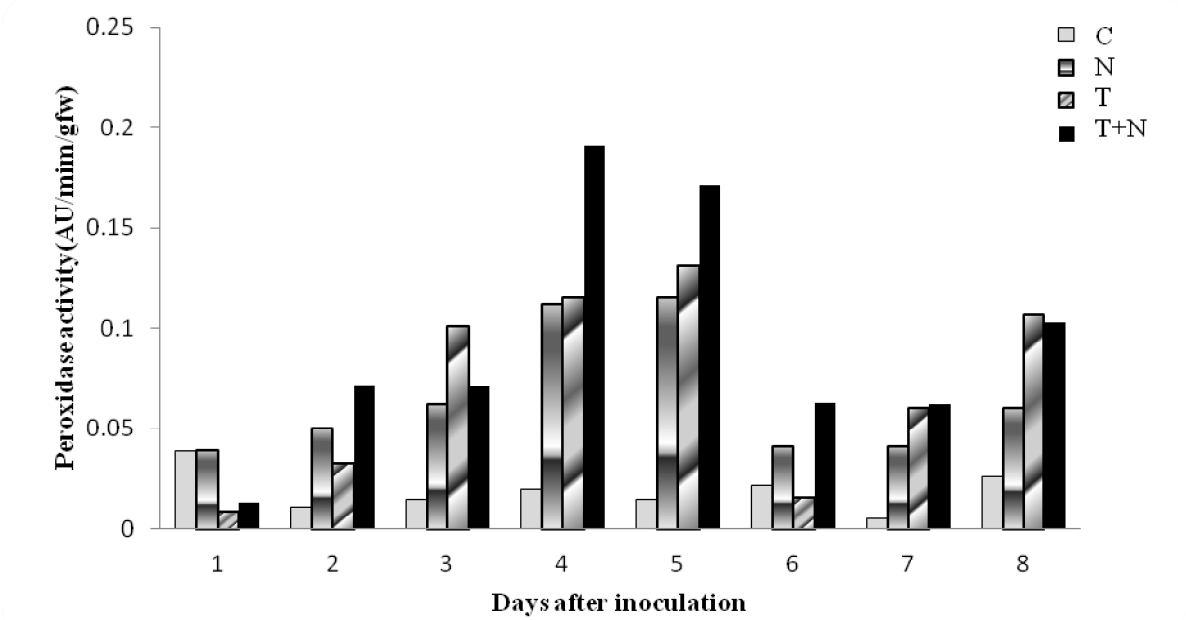
شکل۳. فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیدازدر برگ گوجه‌فرنگی در اثر مایه‌زنی با *Trichoderma harzianum* i25 و نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*. اعداد میانگین ۳ تکرار است. T: قارچ *T.harzianum* i25، N: نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica*، C: گیاه سالم (شاهد).

Fig 3.Polyphenol oxidase specific activity in tomato leaf inoculated with *Trichoderma harzianum* i25 and *Meloidogyne javanica*. Data are the mean of three replicates. T: *T. harzianum* i25, N:root-knot nematode *M. javanica*. C: Control

چهارم معنی‌دار نبود. در روز ششم ، فعالیت آنزیم در تمام تیمارها نسبت به روز پنجم کاهش یافت روزهای هفتم وهشتم نیز این روند کاهشی در کلیه تیمارها ادامه یافت (شکل۳).

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم پر اکسیداز

در بررسی میزان فعالیت آنزیم پراکسیدازدر روز اول بعد از مایه‌زنی در گیاهان گوجه فرنگی آلوده تیمار شده با جدایه *T. harzianum* i25در مقایسه با سایر تیمارها تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ مشاهده نشد. فعالیت آنزیم در روز دوم در گیاهان آلوده تیمار شده با قارچنسبت به گیاهان تیمار شده با قارچ تنها و شاهد سالم تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ داشتد در حالی که نسبت به گیاهان آلوده به نماتودتفاوت معنی دار مشاهد نشد.درروز سوم بعد از مایه‌زنی هر سه تیمار از لحاظ آماری در یک گروه قرار گرفتندو تیمارها به غیر از گیاهان تیمار شده با قارچ تنها،دارای تفاوت معنی داری باشاهد سالم بودند بیشترین میزان تغییرات آنزیم نسبت به سایر روزهای نمونه برداری در روز چهارمثبت شد که مربوط به گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ بود وتفاوت معنی داری نسبت به گیاهان تیمار شده با قارچ تنهاوگیاهان سالم نشان دادتغییرات در روز پنجم نیز به همین ترتیب ادامه یافتولی مقدار عددی تغییرات آنزیم درگیاه آلوده تیمار شده با قارچ کاهش یافت بدون اینکه تفاوت معنی داری با روز چهارم داشته باشد. گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ و گیاه تیمار شده با قارچ تنها و نیز با گیاهان آلوده با نماتود در روز ششم تفاوت



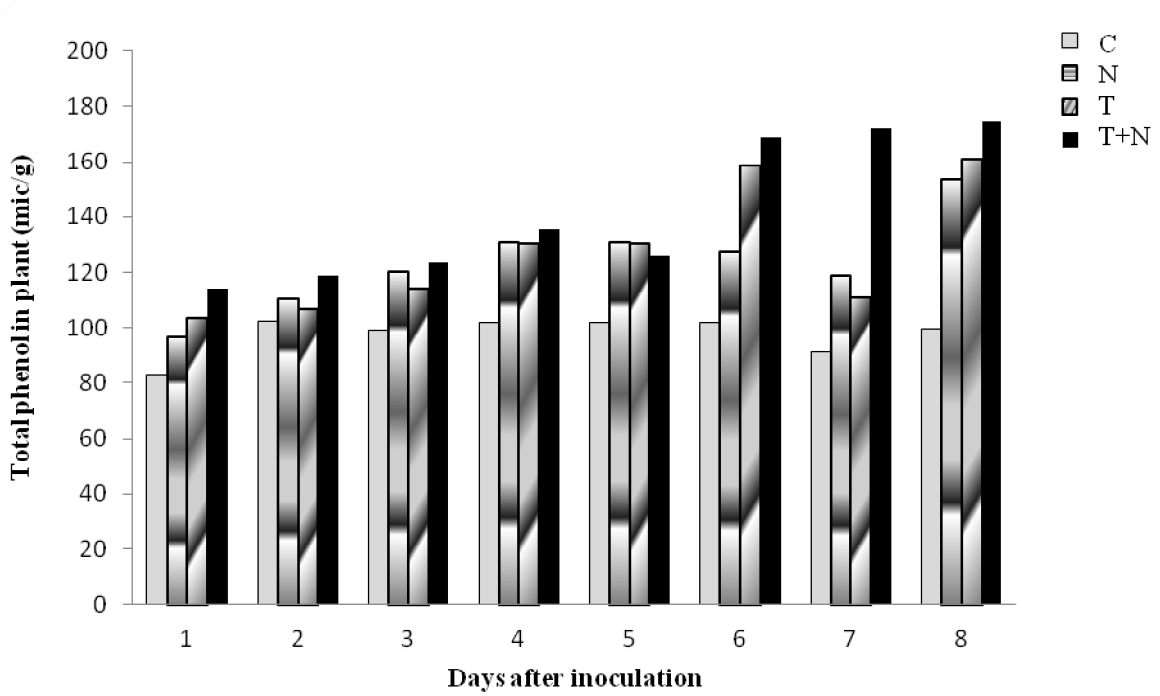
شکل٤. فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گوجه‌فرنگی در اثر مایه‌زنی با *Trichoderma harzianum* i25 ونماتودریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*. اعداد میانگین ۳ تکرار است.T: قارچ *T.harzianum* i25، N: نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica*، C: گیاه سالم (شاهد).

Fig 4. Peroxidase specific activity in tomato leaf inoculated with *Trichoderma harzianum* i25 and *Meloidogyne javanica*. Data are the mean of three replicates. T: *T. harzianum* i25, N:root-knot nematode *M. javanica*. C: Control

معنی داری با یکدیگر نداشتند.بیشترین میزان تغییرات آنزیم پراکسیداز در تیمار مایه‌زنی شده با قارچ تنها در روز ششم نمونه برداری مشاهده شد.در روز هفتم تفاوت معنی داری بین هیچ یک از تیمارها مشاهده نشد.گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ و گیاه آلوده شده با نماتود در روز هفتم تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان ندادند ولی در بین گیاهان آلوده تیمار شده با قارچ با گیاهان سالم تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ مشاهده شد. (شکل۴).

بررسی میزان تغییرات فنل کل

تغییرات فنل در همه تیمارها از روز اول تا هشتم بعد از مایه‌زنی با شاهد اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ نشان دادند. و به صورت روند افزایشی تا روز هشتم ادامه یافت.در روز چهارم نیز با افزایش ناگهانی در مقدار فنل اختلاف قابل توجهبا روزهای قبل در تمام تیمارها مشاهده شدتغییرات مقدار فنل از روز اول طی روزهای متوالی در تیمارشده با قارچ با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ودر روز هشتم بیشترین میزان ارزیابی شد که دارای اختلاف معنی داری با سایر روزها بود.در تیمار آلوده نیز در تمام روزها اختلاف معنی داری در میزان فنل در مقایسه با شاهد دیده شد وبیشترین مقدار در روز هشتم وبا اختلاف معنی دار با روزهای گذشته مشاهده شدبیشترین میزان فنل دربین تمام تیمارها در طی هر هشت روز مربوط به تیمار آلوده واجد قارچ بود به طوریکه بیشترین مقدار فنل در روز هشتم بعد از مایه‌زنی در تیمار آلوده و واجد قارچ اندازه گیری شد که با روزهای دیگر اختلاف معنی داری داشت.همچنین تیمار آلوده و واجد قارچ دارای اختلاف معنی دار با شاهد درتمام روزها و نیز اختلاف معنی دار با



شکل ۵. میزان فنل کل(میکروگرم در یک گرم بافت برگ)در گیاه گوجه‌فرنگی در اثر مایه‌زنی با *Trichodermaharzianum* i25 و نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*. اعداد میانگین سه تکرار است.T: قارچ *T.harzianum* i25،N: نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica*،C:گیاه سالم (شاهد).

Fig 5.Total phenol in tomato inoculatedwith *Trichoderma harzianum* i25 and *Meloidogyne javanica*. Data are the mean of three replicates. T: *T. harzianum* i25,N: root-knot nematode*M. Javanica*, C:Control

سایر تیمارها درتمام روزها به جز روز اول داشت (شکل۵).

از نتایج مربوط به فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز ،چنین یافت می‌شود که فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه الوده تیمار شده با قارچ انتاگونیست *Trichoderma* نسبت به سالم افزایش داشته است و به نظر می‌رسد با نفوذ نماتود در داخل بافت گیاه در روزهای اول افزایش فعالیت پراکسیداز مشاهده می‌شود و پس از شروع تغذیه نماتود در روزهای پنجم و ششم و با تشکیل سلول‌های غول آسا سنتز انزیم پراکسیداز در بافت کاهش می‌یابد و علت ان می‌تواند اثر ترشحات تولید شده از غدد مری نماتود برمسیر بیوشیمیایی سنتز آنزیم پراکسیداز باشد که در ارتباط با پدیده ی بیماری زایی در گیاه است (Williamson & Hussey . 1996)از طرفی قارچ آنتاگونیست *Trichoderma* نیز باعث القا و سنتز آنزیم پراکسیداز در بافت گیاه می‌شود و سیستم دفاعی گیاه (به ویژه آنزیم پراکسیداز) را تحریک می‌کند Howell) .(2003.. تیمار بذور بادام زمینی با باکتری سودوموناس باعث تجمع سریع آنزیم‌های دفاعی مرتبط با مقاومت از قبیل کیتیناز، بتا ۱و۳ گلوکاناز، پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز در بذور بادام زمینی در مقایسه با شاهد سالم می‌گردد (Kishore *et al*.2006) *صاحبانی وهادوی* بیشترین میزان آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز را در روز پنج وششم بعد از مایه‌زنی مشاهده نمودند.ترکیبات فنلی ترکیبات ضد قارچی هستند و تجمع آنها در گیاهان تیمار به وسیله‌ی آنتاگونیست ،

می‌تواند دلیل کاهش حمله پاتوژن‌ها باشد (Mpiga *et al*.1997). *ملکی زیارتی و همکاران* در سال ۱۳۸۶ نشان داند که میزان فنل کل گوجه فرنگی ارقام کینگ استون پس از تیمار با قارچ *Trichoderma harzianum* BI به تنهایی بدون حضور نماتود از روز اول پس از مایه‌زنی طی روزهای متوالی با شاهد اختلاف معنی‌دار داشته و حداکثر میزان آن در روز هشتم بوده است که با نتایج بدست آمده از این پژوهش مشابهت دارد. به نظر می‌رسد تنها ترکیبات فنلی نقش موثری در مقاومت میزبان علیه نماتودها نداشته واین ترکیبات همراه با سایر مواد دفاعی نظیرآنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در مکانیسم‌های دفاعی نقش دارند که با نتایج *اعتباریان، ملکی زیارتی و همکاران* و *اگالو و مک لور*(Ogallo & McClure. 1996) مشابهت دارد.وقوع پدیده ی ایجاد مقاومت القایی و القا ترکیبات فنلی در گیاه توتون وگوجه فرنگی براساس تحقیقات انجام شده وابسته به تولید پروتین‌های اختصاصی که در ارتباط با پدیده ی بیماری زایی وسیستمیک شدن در گیاه می‌باشد (Van loon & Vanstrien 1999).عکس العمل بافت گیاه در مقابل حمله بیمارگرها که منجر به افزایش مقدار مواد فنلی می‌شود به موازات افزایش تنفس و پروتئین در گیاه صورت می‌گیرد که این افزایش سنتز فنل در نتیجه فعالیت غیر عادی بافت‌های مورد حمله گیاه در برابر بیماری می‌باشد(Vidhyasekaran. 2002) با توجه به نتایج فوق می‌توان چنین بیان کرد که جدایه *T.harzianum* i25 به همراه نماتود ریشه گرهی باعث سیستمیک شدن ترکیبات فنلی و تحریک مقاومت در قسمت‌های مختلف گیاه گوجه فرنگی شده و پتانسیل باالقوه‌ای در کنترل نماتود ریشه گرهی با ایجاد مقاومت القایی سیستمیک در گیاه دارد.

منابع

Affokpon A.,Coyne D.L., Htay C.C., Agbede R.D.,Lawouin L. and Cooseman J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes inWest African vegetable production systems. Soil Biology Biochemistry 43:600–608.

Al-Ameiri N.S.2009. Efficiency of Jordanian *Trichoderma harzianum* (Rifai) isolates against *Meloidogyne javanica* (Treub) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.).Jordan Journal of Agricultural Sciences 5:446-457.

Batta Y. A. 2004.Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. International Journal of Food Microbiology96: 281-288.

Dababat A. A. F. A. and Sikora R. 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.

Elad Y.,Chet I., Boyle P. And Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani*and *Sclerotinia rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73:85–88.

Eisenach J. D. and Triantaphyllou H. H.1985.Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races, pp: 191-274.In: W. R. Nickle (Ed.). Manual of gricultural nematology. Marcel Dekker, Inc.

Fatemy S. 1998. Antagonistic activity *Paecilomyces fumoroseus*against*Meloidogyne javanica* and *Hetrodera schachtii*. IranianJournal of Plant Pathology 34:67-75 (In Persian with English summary).

Gams W. and Bisset J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*,pp:3-34.In: G. E.Harman and C. P. Kubicek (Eds).*Trichoderma* and *Gliocladium*, Volume1: Basic biology, taxonomy and genetics. CRC Press.

Harman G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrolchanges in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84:377–393.

Harman G. E. Howell C. R.,Viterbo A.,Chet I. and Lorito M.2004.*Trichoderma* speciesopportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2:43-56.

Howell C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the

history and evolution of current concepts.Plant Disease 87:4-10.
Hugall A.,Stanton J. and Moritz C. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomitic *Meloidogyne*.Molecular Biology and Evolution16:157-164.
Hussey R.S. and Baker K. R.1973. A comparison of method of collecting inoculation for *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease 57:1025-1028.
HusseyR. S. and Janssen G. J. W. 2002. Root-Knot.nematodes: *Meloidogyne* species. In J L Starr.
Jones E.E., Mead A. and Whipps J.M.2003.Evaluation of different *Coniothyriumminitans* inoculum sources and application rates on apothecial production and infection of *Sclerotinia sclerotiorum*. Soil Biology and Biochemistry35: 409-419.
Kerry B.R. 1987. Biological pp:233-263. In:R. H. Brown and B. R. Kerry (Eds). Principles and practice of nematode control in crops.Academic Press
Khan A.,Williams K. L. and Nevalainen H. K. M. 2004. Effects of *Paecilimyces lilacinus* protease and chitinaseon the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles.Biol Control 31:346–352.
Khan M.K. and Goswami B.K. 1999. Nematiocide effect of cultur filtrate *Paecilomyces lilacinus* isolates on *Meloidogyne incognita*. Indian Jounal of Nematolology29:2-8.
Khan T.A. and Saxena S. K. 1997.Effect of root dip treatment with fungal filtrates on rootpenetration, development and reproduction of *Meloidogyne javanica*on tomato. International Journal of Nematology 7: 85-88.
Khattak B., Saifullahand Stephen M.2008.Effect of some indigenous isolates of *Trichodermaharzianum*on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Sarhad Journal of Agriculture 24: 285-288.
Kishore G. K.,Pande S. and Podile A. R. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* GSE 18 inhibits the cell wall degrading enzymes of *Aspergillus niger* and activates defence-related enzymes of groundnut in control of collar rot disease. Australasian Plant Pathology35: 259-263.
Kosuge T. 1969. The role of phenolics in host response to infection. Annual Review of Phytopathology 7: 195-221.
Lin C.C. and Kao C. H. 1999. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in rootsof rice seedlings. Plant and Soil216:147-153.
Malaki Ziarati H., Roosstaee A., SahebaniN., Etebarian H. R. and Aminean H.A. 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 ProductionJournal25: 259-272. (In Persianwith English summary).
Malaki Ziarati H. Sahebani N. Rahnama K. and Noori N. 2008. Effect of fungus *Trichoderma harzianum*on induced systemic phenolic compounds against root knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources14: 161-168. (In Persianwith English summary).
Meyer S.L.F.,Roberts D.P.,Chitwood D.J.,Carta L.K.,Lumsden R.D. and Mao W. 2001. Application of *Burkholderiacepacia* and *Trichoderma virens*,alone andincombi-nations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper.Nematropica 31: 75–86.
Mohammadi M. and Kazemi H. 2002. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with*Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science162: 491-498.
M'piga P.,Bélanger R.R. Paulitz T.C.andBenhamou N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens*strain 63-28. Physiological and Molecular Plant Pathology 50: 301-320.
Naserinasab F.,Sahebani N. and Etebarian H.R .2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on tomato.African Journal of Food Science5: 276-280.
Ogallo J.L.and McClure M.A. 1996. Systemic acquired resistance and susceptibility to rootknot-nematode in tomato. Phytopathology 86: 498-501.
Oostenbrink M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Landlbouwhogeschool Wageningen66: 1.
Pandey G.,Pandey R.K. and Pant H. 2003. Efficacy of different levels of*Trichodermaviride* against root-knot nematode in chickpea (*Cicer arientinum* L.) Annals of Plant Protection Sciences11(1): 101-103.

Parvatha ReddyP.,Rao M.S. and Nagesh M. 1996. Management of citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans,* by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. Nematologia Mediterranea 24:265-267.

Sahebani N. and Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Biology Biochemistry 40: 2016–2020.

Sahebani N.,Rosstaee R.S. and Hadavi N.2006. study of Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma viride*.Journal of Agricultural Science and Technology37:405-411.

Saksirirat, W. and Hoppe, H. H. 1991. Degradation of uredospores of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) by cell free culture filtrates of the mycoparasite *Verticillium psalliotae* Treschow. Phytopathology 132: 33-45.

Sharon E.,Chet I.,Viterbo A.,Bar-Eyal M.,Nagan H. and Samuels G. J. 2007. Parasitism of Trichoderma on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix.European Journal of Plant Pathology 118: 247–258.

Sharon E.,Bar-Eyal M., Chet I.,Herrera-Estrella A.,Kleifeld O. andSpiegel Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogynejavanica* by *Trichoderma harizianum*. Phytopathology91:687-693.

Siddiqui I.A.,Amer-Zareen M.,Zaki M.J. and Shaukat S.S. 2001. Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode in *okra andmungbean*. Pakistan Journal of Biological Sciences.4:846-848.

Siffulah A. andThomas B.J. 1996. Study on the parasitism of *Globodera rostochiensis* by *Trichoderma harzianum* using low temperature scanning electron microscopy. Afro-Asian Journal ofNematology6:117-122.

Silva H. S.A.,Romeir R.D. S.,Macagnan D.,Halfeld-Viera B. D. A., Pereira M. C. B. and Mountreer A.2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plant:Non-specific protection and increase in enzymes activity. BiologicalControl 29:288-295.

Singleton V. L. andRossi Jr. J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics withphosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture16: 144-158.

SpiegelY.andChetI.1998.Evaluationof*Trichoderma*spp.Asabiocontrolagentagainstsoilbornefungiandplantparasitic nematodesinIsrael.Integrated Pest Management Reviews3: 169–175.

Stirling G.R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems and prospects.CAB International. 282 p.

Suarez B.,Rey M.CastilloP.and Llobell A.2004. Isolation and characterization of PRA1 a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413displaying nematicidal activity. Applied Microbiology and Biotechnology65: 46–55.

Tikhonov V. E.,Lopez-Llorca L.V.,SalinaJ. andJansson H. B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genetics and Biology35: 67–78.

Taylor D.P. and Netscher C. 1974. An improved technique for preparing pernieal patterns of*Meloidogyne* spp. Nematologica 20:268-269.

Van Loon L. C. and Vanstrien E. A. 1999.The families of pathogensis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1type proteins.Physiological and Molecular Plant Pathology55: 85-97.

Vidhyasekaran P. 2002. Bacterial disease resistance in plants: Molecular biology and biotechnological applications. Food Products Press.452 p.

Williamson V. M. and Hussey R.S .1996. Nematode Pathogenesis and resistance in plants. The Plant cell8:1735-1745.

Windham G. I.,Windham M. T. andWilliams W.P. 1989. Effects of*Trichoderma* spp. onmaize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction.Plant Disease 73:493-495.

Zilstra C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla, M. chitwoodi* and *M. fallax*,andto sensitively differentiate them each from each other and from *M. incognita* in mixtures. Fundamental and Applied Nematolology20:505-511.