بررسی پتانسیل محلول‌پاشی فعال کننده های زیستی قارچ تریکودرما در کنترل نماتد ریشه گرهی(*Meloidogyne javanica*) در گوجه‌فرنگی

زهرا فاریابی[۱]، حسین علایی[۲]*، اعظم زین الدینی ریسه[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

[۲] دانشیار بیماری شناسی گیاهی ، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

[۳] استادیار بیماری شناسی گیاهی ، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

*نویسنده مسئول: hossein.alaei@vru.ac.ir

چکیده

نماتد ریشه گرهی از خسارت‌زاترین نماتدهای انگل گیاهی بوده و به علت پراکندگی وسیع، دامنه میزبانی بالا و تاثیر متقابل با قارچها و باکتری‌های خاکزاد گیاهی در رده مهمترین بیمارگر های گیاهی می‌باشد. در این پژوهش پتانسیل فعال کننده‌های زیستی تریکودرما بصورت محلول پاشی در کنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی رقم حساس سوپر چف مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایش شامل: میکس عصاره‌های خام تریکودرما بصورت همراه و بدون عناصر غذایی، ترکیبات تجاریISR2000 و نماتدکش ولوم استفاده شد. آزمایش گلخانه‌ای براساس طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید و پس از گذشت ۹۰ روز شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ارزیابی شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های بیماری‌زایی مانند تعداد گال، کیسه تخم، لارو سن دوم و فاکتور تولید مثل در گلدان‌های تیمار شده با عوامل بیوکنترل نسبت به شاهد آلوده تفاوت معنی داری داشت. در تیمار نماتدکش ولوم ومحلول پاشی ترکیب زیستی Mix.E، کمترین میزان آلودگی گال نسبت به حجم ریشه، به ترتیب برابر با ۳۰ و ۳۰/۷۶ درصد و میزان آلودگی کیسه تخم نسبت به حجم ریشه، برابر با ۲۴/۵۶ و ۲۹/۳۳ درصد می‌باشد. بیشترین کاهش تعداد لارو سن دوم در تیمار ولوم،و محلول پاشی ترکیبات زیستی Mix.E و $Mix.E^{+}$ (همراه با عناصر غذایی) بترتیب برابر با ۸۶/۸۳ و ۷۲/۵ و ۶۲/۵ درصد، در مقایسه با تیمار شاهد نماتد مشاهده شد. استفاده از ترکیب زیستی Mix.E در کنار سم ولوم نشان دهنده تاثیر بالا و قابل مقایسه ترکیبات زیستی در کنار ترکیب شیمیایی ولوم بوده است و دارای بیشترین درصد کنترل و کمترین میزان تولید مثل نماتد را داشتند.

واژه‌های کلیدی: نماتد ریشه‌گرهی، قارچ تریکودرما، کنترل بیولوژیک، گوجه‌فرنگی

مقدمه

گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یکی از منابع ارزشمند و غنی از آنتی اکسیدانت‌ها (لیکوپن، آسکوربیک اسید و فنل ها) در رژیم غذایی میباشد. همچنین از لحاظ اقتصادی دومین سبزی مهم در دنیا بشمار میرود که به دلیل بیماری های نماتدی هر ساله حجم قابل توجهی از این محصول از بین می رود. نماتدهای ریشه گرهی، به‌ویژه *Meloidogyne incognita* ، *M. javanica* و *M. hapla* شایع‌ترین گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی هستند که بیشترین خسارت اقتصادی را در خاک های شنی ایجاد می کنند. نماتدهای ریشه گرهی می‌توانند موجب ۱۹ تا ۳۹ درصد خسارت بر روی گیاه گوجه فرنگی شوند(Javed, 2007). به دنبال نفوذ نماتد در بافت ریشه در مدت کوتاهی شاهد تشکیل گال‌ها بر روی ریشه خواهیم بود، که تعداد و شدت گال‌زایی در موارد پیشرفته تر سبب جلوگیری از رشد ریشه های ثانویه و ظریف در اطراف محل آلوده می‌شود که با توجه به گونه نماتد و گونه گیاه متفاوت است(Perry *et al*., 2010) . با توجه به خطرات زیست محیطی سموم شیمیایی، استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک می تواند یک روش کارآمد برای کنترل نماتدها باشد. بررسی های پیشین نشان داده است که قارچ تریکودرما یکی از موفق ترین عوامل کنترل بیولوژیکی شناخته شده است و دارای توانایی بالایی در تولید انواع آنزیم‌های موثر در کنترل نماتد در مقایسه با دیگر آنتاگونیست‌ها می‌باشد (Howell, 2003). از مکانیسم‌های مهم کنترل بیولوژیک *Trichoderma* می‌توان به تأثیر مستقیم شامل رقابت برای مواد مغذی یا فضا ، تولید آنتی بیوتیک های فرار و غیر فرار و آنزیم های لیتیک، غیرفعال سازی آنزیم های پاتوژن و انگلی و اثرات غیرمستقیم شامل تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان میزبان، مانند تحمل تنش ، انحلال یا جداسازی مواد مغذی غیر آلی و القا مقاومت

در برابر بیماری های ناشی از بیمارگرها اشاره کرد (Silva *et al*., 2019). بررسی منابع نشان می دهد که عصاره خام فیلتر شده *T. harzianum* و *T. viride* باعث کاهش گال‌های ریشه، کیسه تخم، و تعداد لارو سن دوم نماتد *M incognita* شده است(El-Sherif and Ismail, 2007). بنابراین در این پژوهش تلاش به استفاده از ترکیبات زیستی بر پایه قارچ تریکودرما بوده است که جدایه‌ها شامل گونه‌های *T. harzianum* (کدهای T43-3 ، T43-9، T127-12، T1-1، T53) ، گونه *T.aureoviride* (کدهای T43-13، T116-2،T-41) و گونه *T .guizhounse* (کد CT79-2) می‌باشند.

مواد و روش‌ها

نماتد ریشه گرهی از ریشه‌های آلوده گیاه گوجه جداسازی شد و خالص سازی و تکثیر نماتد روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپر چف انجام شد. بدین منظور بذرهای گوجه فرنگی بعد از ضدعفونی درون سینی نشاء کشت شدند. گیاهچه ها در مرحله ۴ تا ۵ برگی به گلدان‌های یک کیلوگرمی منتقل شدند. برای رسیدن به یک جمعیت خالص، یک کیسه تخم درکنار ریشه گیاه گوجه فرنگی قرار داده شد. پس از گذشت تقریبا دو ماه آلودگی کامل و برای تکثیر جمعیت خالص، مراحل فوق روی گیاهچه های گوجه فرنگی تکرار شد تا جمعیت مناسب و کافی بدست آمد. استخراج تخم و لارو سن دوم نماتد با استفاده از روش هوسی و بارکر (Hussey and Barker,. 1973) انجام شد. شناسایی گونه نماتدی با تهیه برش از انتهای بدن نماتد ماده انجام و گونه *Meloidogyne javanica* تشخیص داده شد (Jepson,1987) . جدایه‌های قارچ تریکودرما مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ‌شناسی بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان تهیه شدند. این جدایه‌ها شامل گونه‌های *T. harzianum* ، گونه *T.aureoviride* و گونه *T .guizhounse* می‌باشند. برای تهیه عصاره خام تریکودرما از کشت‌های یک هفته‌ای آنتاگونیست، ۴–۵ قرص میسلیومی قارچ با اسکالپل جدا کرده و به ارلن حاوی محیط کشت PDB اضافه شد. محیط کشت‌های حاوی قارچ آنتاگونیست، به مدت یک هفته روی شیکر قرار داده شد. پس از رشد قارچ آنتاگونیست، عصاره خام قارچی از فیلتر عبور داده شد و درون ارلن تا زمان مصرف نگهداری شدند(Grinyer *et al*., 2005).

گلدان‌ها ازخاک و ماسه استریل به نسبت ۱:۲ پرشدند.پس از اینکه نهال های گوجه فرنگی به مرحله ۴–۵ برگی رسیدند به گلدان ها منتقل شدند و مقدار ۲۰۰۰ لارو سن دوم به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان مایه‌زنی شد. استفاده از فعال کننده های زیستی و تجاری ISR2000،طی سه مرحله بعد از مایه زنی با نماتد، با فاصله ۱۰ روز با غلظت 1 در هزار محلول پاشی شدند و نماتد کش ولوم برای یک بار با 0.89 µl برای هر گلدان بصورت خاک کاربرد استفاده شد. گلدان ها به مدت ۹۰ روز در شرایط گلخانه با دمای ۲۰ تا۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری و آبیاری منظم انجام شد.

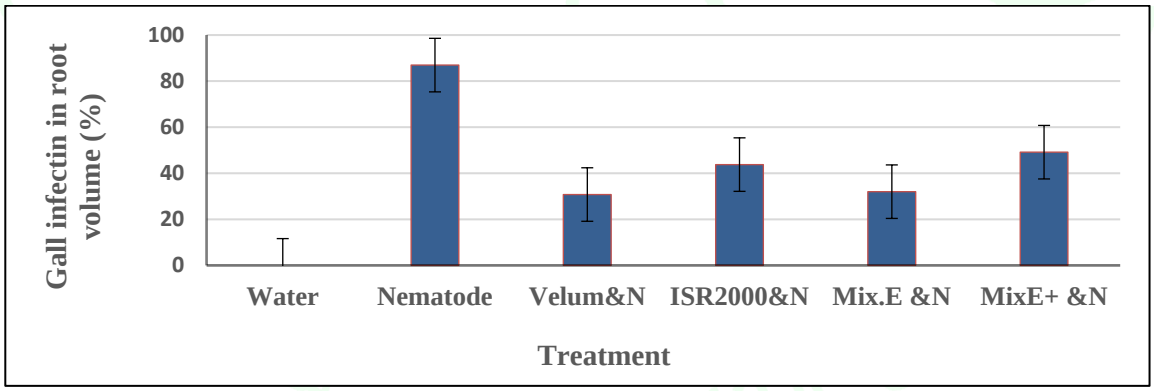
نتایج و بحث

نتایج آنالیز آماری و بررسی مقایسه میانگین اثر ترکیبات زیستی تریکودرما روی شاخص‌های بیماریزایی نماتد بعد از تیمار سه ماهه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی نشان داد که تیمارهای مختلف تریکودرما تفاوت معنی‌داری روی فاکتورهای جمعیتی نماتد در مقایسه با تیمار شاهد نماتدی داشتند. (جدول ۱).

جدول ۱-تاثیر تیمارهای مختلف در کاهش میزان آلودگی نماتد ریشه‌گرهی و شاخص های جمعیتی نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه فرنگی.

تیمار	درصد گال به حجم ریشه (٪)	درصد کیسه تخم به حجم ریشه(٪)	درصد کاهش لارو سن دوم (J2) به شاهد در ۲۰۰ گرم خاک(٪)	جمعیت نهایی نماتد (PF)	شاخص تولید مثل (RF)	درصد تکثیر نماتد (Mr%)	درصد کنترل نماتد (NC%)
Water	0	0	0	0	0	0	100
Nematode	86.95	61.82	0	34633	17.32	100	0
Velum&N	30.76	26.88	86.83	3255	1.63	9.40	90.60
ISR2000&N	43.75	41.87	45.83	24933	12.47	71.99	28.01
MixE &N	32	32	72.5	20520	10.26	59.25	40.75
Mix.E^{+} &N	49.14	19.1	62.5	23400	11.70	67.57	32.43

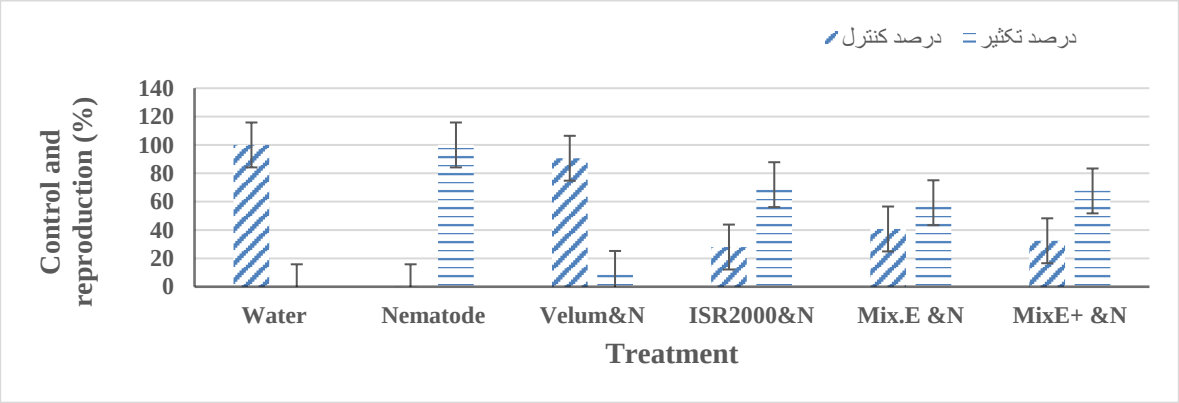
در ارزیابی شاخص گال ریشه و همچنین شاخص کیسه تخم، نتایج نشان داد که بوته‌های آلوده تیمار شده با ترکیب شیمیایی ولوم و محلول پاشی ترکیبات زیستی Mix.E، و Mix.E^{+} از کمترین میزان آلودگی برخوردار می‌باشند و بیشترین آلودگی، در تیمار شاهد نماتد (بوته آلوده به نماتد بدون اعمال تیمار) مشاهده شد که نشان از کنترل موفق این ترکیبات فعال کننده زیستی تریکودرما دارد (شکل ۱ و جدول ۱). همچنین در شاخص میزان تعداد لارو سن دوم، تیمار سم ولوم، ترکیب زیستی Mix.E و Mix.E^{+} (همراه با عناصر غذایی) ،به ترتیب با ۸۶/۸۳، ۷۲/۵ و ۶۲/۵ درصد، بیشترین کاهش تعداد لارو سن دوم در مقایسه با تیمار شاهد نماتد را نشان دادند. یکی از راه‌های کنترل در برابر بیماریهای گیاهی، فعالسازی سامانه دفاعی گیاه است که از راه تجمع سالیسیلیک اسید(SA) و بیان ژنهای مربوط به بیماریزایی می‌باشد. محلول پاشی برگی با بتا آمینو بوتریتیک اسید[1] و یا استفاده از اسید سالیسیلیک به دلیل القای فعالیت دفاعی گیاه و ایجاد مقاومت سیستمیک القایی به تنهایی نیز در کنترل نماتد *M. javanica* در گیاه گوجه فرنگی مؤثر واقع شده است (Mostafanezhad *et al*., 2014). همچنین بتا آمینو بوتریتیک اسید موجب کاهش نفوذ لاروهای مهاجم نماتد به درون بافت ریشه شده و باعث به تعویق انداختن چرخه زندگی نماتد درون بافت ریشه میگردد (Charehgani *et al*., 2014). در بررسی هایی نشان داده شد که محلول پاشی فسفیت پتاسیم روی سیب زمینی توانسته است با القای پاسخ های دفاعی فراگیر، منجر به کاهش حساسیت مقابل قارچهای *Phytophthora infestans* و *Fusarium solani* و باکتری *Erwinia carotovora* می‌شود(Lobato *et al*., 2011). این عوامل بیوکنترلی میتوانند به عنوان مکمل یا جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی پیشنهاد شوند.



شکل ۱- درصد شاخص آلودگی گال نسبت به حجم ریشه در گیاه آلوده به نماتد ریشه گرهی

[1] β-aminobutyric acid

جمعیت نهایی نماتد در گلدان برای تیمار نماتد نسبت به سایر تیمارها دارای اختلاف چشمگیری می‌باشد. در بین تیمارهای مورد استفاده، محلول پاشی دو ترکیب زیستی تریکودرمایی $Mix.E^{+}$ و Mix.E دارای جمعیت پایینی از نماتد می‌باشند. در ارزیابی فاکتور تولید مثل،کمترین میزان تولید مثل مربوط به بوته‌های تیمار شده با ترکیبات پاششی زیستی می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی، بیانگر نقش مؤثر قارچ آنتاگونیست تریکودرما در کنترل نماتد ریشه گرهی می‌باشد. بیشترین درصد کنترل در بین تیمارهای مورد استفاده مربوط به سم ولوم و بعد از آن به ترکیبات زیستی Mix.E و $Mix.E^{+}$ می‌باشد. در راستای تاثیرات مخرب ترکیبات شیمیایی در محیط زیست استفاده از ترکیبات زیستی بعنوان جایگزین سموم پیشنهاد می‌شود(شکل ۲).



شکل ۲- درصد کنترل و تکثیر تیمارهای مختلف در کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی

منابع

Charehgani, H., Karegar, A. and Djavaheri, M., 2014. Comparison of Dl-B-amino-N-butyric acid, salicylic acid and abscisic acid in induction of resistance in tomato infected by *Meloidogyne Incognita*. Iranian Journal of Plant Pathology, 504, pp.161-163.

El-Sherif, A.G. and Ismail, A.F., 2007. Management of *Meloidogyne incognita* in potato by cultures filtrates of the microparasitic fungi, *Trichoderma harzianum* or *T. viride*. Journal of Agriculture Science Mansoura University, 32, pp.8733-8742.

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(1): 4-10.

Hussey, R.S., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Report., 57, pp.1025-1028.

Javed, N., Gowen, S. R., Inam-ul-Haq, M., & Anwar, S. A. 2007. Protective and curative effect of neem (Azadirachta indica) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. Crop Protection, 26(4), 530-534.

Jepson, S. B. 1987. Identification of Root Knot Nematode (*Meloidogyne* species). CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 265 pp.

Lobato, M.C., Olivieri, F.P., Altamiranda, E.G., Wolski, E.A., Daleo, G.R., Caldiz, D.O. and Andreu, A.B., 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. European Journal of Plant Pathology, *122*(3), pp.349-358.

Mostafanezhad, H., Sahebani, N. and Nourinejhad Zarghani, S., 2014. Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) with combination of *Arthrobotrys oligospora* and salicylic acid and study of some plant defense responses. Biocontrol Science and Technology, 24(2), pp.203-215.

Perry, R. N., Moens, M. and Staar, J. L. 2010. Root Knot Nematode. CAB International Press. 531 pp.

Silva, R. N., Monteiro, V. N., Steindorff, A. S., Gomes, E. V., Noronha, E. F., & Ulhoa, C. J. 2019. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. Fungal Biology, 123(8), 565-583.

Evaluation of foliar application of *Trichoderma* bioactivators on biocontrol of tomato root knot nematode (*Meloidogyne javanica*)

Zahra Faryabi[1], Hossein Alaei[2*], Azam Zeynaddini Rise[3]
[1] MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan
[2] Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan
[3] Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan
*Corresponding Author: hossein.alaei@vru.ac.ir

Root-knot nematode is one of the most harmful plant parasitic nematodes and considered as the most important plant pathogens due to its wide distribution, high host range and interaction with Pathogenic fungi and bacteria. In this study, the potential of *Trichoderma* bioactivators as foliar application in the control of tomato root knot nematode was investigated on Super Chef seedling as susceptible cultivar. *Trichoderma* crude extract treatments were used in combination with and without nutrients, along with ISR2000 commercial compounds and velum nematicide. Greenhouse experiments were performed based on a completely randomized design with 3 replicates, nematode pathogenicity index was evaluated after 90 days After nematode inoculation. The results showed that pathogenicity indexes such as number of galls, number of egg mass, number of second juvenile, reproductive factor in Treated pots with biocontrol agents were significantly different from the infected control. velum nematicide treatment and foliar spraying of Mix.E biological compound, the lowest gall index percentage in relation to root velum was equal to 30 and 30.76%,respectively, and the egg mass contamination in relation to root velum was equal to 24.56 and 29.33%, respectively. In addition, the highest reduction in the number of second juvenile per 200 g.soil was observed in velum treatment, and foliar application of biological compounds Mix.E and Mix.E^{+},that was equal to 86.83, 72.5 and 62.5%, respectively Compared with the infected control treatment. Among the treatments used, velum and foliar application of bioactive compound Mix.E had the highest percentage of control and the lowest rate of nematode reproduction.

Keywords: biological control, root-knot nematodes, tomatoes, Trichoderma fungi