نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، ص. ۱۳۳-۱۲۳

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 1, Spring 2015, P. 123-133

بررسی تولید آنزیم کیتیناز توسط چندین جدایه از قارچ تریکودرما و تاثیر آن بر کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی *Meloidogyne javanica*

مجتبی کواری[۱] - عصمت مهدیخانی مقدم[۲*] -حمید روحانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۹

چکیده

کیتین از جمله مهم‌ترین ترکیبات دیواره سلولی قارچ‌های حقیقی به‌شمار می‌رود. این ترکیب به وفور در ساختمان دیواره تخم نماتدها از جمله نماتد مولد گره ریشه گوجه فرنگی *Meloidogyne javanica* یافت می‌شود. کیتین پس از تجزیه توسط آنزیم‌های کیتیناز، تبدیل به زیر واحدهای سازنده‌اش یعنی N- استیل گلوکز آمین می‌گردد. گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) به دلیل تولید مقادیر قابل توجهی آنزیم‌های هیدرولیتیک متعدد از جمله کیتیناز، پروتئاز و بتا ۱و ۳ گلوکاناز، به یکی از عوامل مورد استفاده جهت کنترل بیمارگرهای گیاهی تبدیل شده است. در این پژوهش میزان فعالیت کیتینازی ۱۵ جدایه قارچ تریکودرما در ارتباط با توانایی بیوکنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. از بین این جدایه‌ها، جدایه‌های T.BI، T6و T65 به ترتیب با فعالیت آنزیمی ۱۹/۲، ۱۸/۳ و ۱۷ واحد بر میلی‌لیتر (U/ml) به عنوان فعال‌ترین و جدایه‌های T16 ، T12N و T12 به ترتیب با فعالیت آنزیمی ۵/۵، ۵/۴ و ۳/۷ واحد بر میلی‌لیتر به عنوان ضعیف‌ترین جدایه‌ها تعیین شدند. در آزمایشات گلخانه‌ای نیز نتایجی هم‌سو با نتایج آزمایشگاهی به دست آمد و جدایه‌های T.BI ،T65 و T6 به عنوان موثرترین جدایه‌ها در کنترل بیولوژیک این نماتد عمل کردند.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، کنترل بیولوژیک، فعالیت آنزیمی، نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی

مقدمه

نماتدهای ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp. از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گیاهان بوده که دامنه‌ی وسیعی از محصولات اعم از سبزیجات، گیاهان زراعی و علف‌های هرز را مورد حمله قرار می‌دهند (۳۲)؛ تا کنون بیش از۲۰۰۰ میزبان گیاهی برای آن‌ها گزارش شده است (۱۴). امروزه با توجه به خطرات و مشکلات ناشی از کنترل شیمیایی، استفاده از سایر روش‌ها به عنوان جایگزین و یا حداقل استفاده‌ی متناوب از آنها مورد توجه قرار گرفته که بین آن‌ها به کار گرفتن میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست علیه عوامل بیماری‌زا بیش‌تر از سایر روش‌ها نظر محققین را به خود جلب کرده است (۲۱). گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) از جمله عواملی به شمار می‌روند که بالقوه به‌عنوان مناسب‌ترین عوامل کنترل بیولوژیکی مطرح می‌باشند؛ به‌طوری که در حدود ۶۰ درصد از تجارت محصولات بیولوژیک کنترل کننده‌ی بیمارگرهای گیاهی را به خود اختصاص می‌دهند (۹). مکانیسم‌های بیوکنترلی متعددی برای قارچ تریکودرما در شرایط طبیعی ذکر شده است، به‌طوری‌که اثر بیوکنترلی یک جدایه را می‌توان نتیجه‌ی مجموعهٔ مکانیسم‌هایی دانست که به صورت: اثر مستقیم روی بیمارگر، افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر و هم‌چنین اثر بر رابطه‌ی متقابل میزبان و بیمارگر اعمال می‌شود. با این حال در استفاده از قارچ تریکودرما تکیه بیش‌تری بر تاثیر مستقیم قارچ تریکودرما بر بیمارگر می‌باشد. در این حالت قارچ تریکودرما با تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و ترکیبات سمی و آنتی بیوتیک‌ها باعث از بین رفتن میکروارگانیسم هدف قبل از نفوذ به بافت گیاهی می‌گردد. تریکودرما می‌تواند با تولید موادی شبه فیتوهورمونی مانند سیتوکینین، زئاتین، جیبرلین، ایندول استیک اسید و اتیلن سبب افزایش رشد گیاه و بهبود جذب مواد غذایی در گیاه شود؛ از طرفی با تحریک مقاومت سیستمیک (SAR و ISR) در گیاه سبب کاهش میزان بیماری می‌گردد. تولید آنزیم های مختلف و از بین بردن عوامل بیماری‌زا قبل از نفوذ به درون میزبان جزء مهم‌ترین مکانیسم‌های قارچ تریکودرما می‌باشد. از جمله مهم‌ترین این آنزیم‌ها، کیتینازها، پروتئازها، لیپازها و گلوکانازها می‌باشد که سبب از بین بردن دیواره سلولی سلول‌های هدف می‌شوند. در گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما، انواعی از اگزوکیتینازها و اندوکیتینازها دارای اهمیت می‌باشند. این آنزیم‌ها با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی در پلیمر خطی کیتین، ساختمان این ترکیب را در هم می‌شکنند. (۲). در این میان حضور آنزیم‌های کیتیناز در فعالیت بیوکنترلی بسیار موثر می‌باشد. از آنزیم‌های کیتینازی در

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: mahdikhani-e@ferdowsi.um.ac.ir)

زمینه های مختلف از جمله کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی (۷ و ۱۰)، استفاده در صنعت داروسازی (۳۱)، بیوتکنولوژی (۲۰) و نیز تولید حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود (۱۲). پوستهٔ تخم نماتد از مهم‌ترین ساختارهایی است که وظیفهٔ محافظت از لارو نماتد در داخل تخم را بر عهده دارد. در نماتد ریشه گرهی پوستهٔ تخم شامل ۵۰ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کیتین و ۲۰ درصد لیپید است (۳). تحقیقات نشان می‌دهد که آنزیم کیتیناز سبب از بین رفتن تعداد زیادی از لاروهای سن دوم درون تخم و هم‌چنین کاهش شدید میزان تفریخ تخم می گردد (۸). هم‌چنین تحقیقات نشان دادند که تجزیهٔ کیتین در محیط ریشه سبب آزاد شدن ترکیبات نماتدکش آمونیومی و کاهش جمعیت نماتدهای انگل گیاهی می گردد (۲۸). با توجه به اهمیت ساختاری کیتین در حفظ ساختمان تخم نماتدها، ترکیبات آنزیمی می‌توانند توسعه و ثبات تخم را کاهش دهند. تغییر در نفوذپذیری پوسته‌ی تخم می‌تواند به مرگ جنین، مهار تفریخ تخم و کاهش جمعیت نماتد منجر شود. نماتدهایی که تخم‌های خود را درون بافت گیاهی قرار می‌دهند، از این لحاظ آسیب‌پذیرتر به نظر می‌رسند (۲۵). در یک پژوهش بر روی گیاه توتون دستکاری شده ژنتیکی با توانایی تولید میزان بالای آنزیم اندوکیتیناز، کاهش تعداد تودهٔ تخم و کاهش تفریخ تخم در نماتد ریشه گرهی به طور معنی داری مشاهده گردید (۵). هدف از این تحقیق، بررسی رابطه بین میزان تولید اگزوکیتینازهای جدایه‌های متعلق به چندین گونه از تریکودرما و قابلیت بیوکنترلی آن‌ها بر تخم نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی *M.javanica* و هم چنین اثر آن‌ها بر میزان کنترل بیماری مذکور بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های قارچ

پانزده جدایه از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما از کلکسیون بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت خالص تهیه و بر روی محیط کشت (PDA (Merck®, 39g.l^{-1} کشت و نگهداری گردید (جدول۱).

تهیه مایه تلقیح قارچ

جهت مایه‌زنی جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما به بوته‌های گوجه فرنگی در گلخانه ابتدا مقدار ۲۰۰ گرم دانه گندم شسته شده که به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰ میلی لیتر آب‌مقطر جوشانده شده بودند و به مدت ۲ ساعت روی پارچه‌ی تمیزی جهت حذف رطوبت سطحی پخش شده بودند، را درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و طی دو روز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱درجه سانتی‌گراد سترون گردید. سپس به هر ارلن ده دیسک پنج میلی‌متری از کشت تازه هر کدام از جدایه‌های قارچی افزوده شد و ارلن‌ها به مدت ۱۲ روز جهت رشد قارچ در دمای ۱±۲۸ سانتی‌گراد قرار داده شد. طی این مدت هر دو روز یک بار محتویات هر ارلن به خوبی به هم زده شد و در نهایت با استفاده از سری‌های رقت تهیه شده از هر جدایه، مقدار گندم مورد نیاز جهت افزودن میزان 1×10^{7} زادمایه قارچ به هر گرم خاک در هر گلدان به تعیین گردید. تیمارهای شاهد فاقد اینوکولوم بودند.

تهیه جمعیت نماتد ریشه گرهی

نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی، گونهٔ *M.javanica* از بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و برای تکثیر بر روی بوتهٔ گوجه فرنگی رقم موبیل در شرایط گلخانه نگهداری گردید.

اثر نوع منبع کربن مورد استفاده در محیط کشت القا کننده کیتیناز بر میزان تولید آنزیم

در این آزمایش جهت تهیه محیط کشت القا کنندهٔ کیتیناز از دو نوع منبع کربن شامل پودر ریسهٔ رایزوکتونیا و کیتین کلوئیدال به مقدار مساوی استفاده گردید. روش تهیه دو منبع کربن مذکور به‌شرح زیر است.

آماده سازی سوبسترا جهت سنجش فعالیت کیتینازی

آماده سازی ریسه رایزوکتونیا: برای آماده سازی ریسه رایزوکتونیا و جداسازی مواد قندی از ریسه از روش Zeilinger و همکاران (۳۳) استفاده شد. در این روش، قارچ رایزوکتونیا در محیط کشت مایع کشت گردید و به مدت ۹۶ ساعت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن ریسه‌های قارچ با استفاده از کاغذ صافی از محیط جدا شد و جهت حذف مواد قندی، ریسه‌ها ۶ بار با آب مقطر استریل و سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه شست و شو گردید و به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰- سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از آن ریسه‌های قارچ با استفاده از ازت مایع پودر گردید.

جدول ۱- جدایه‌های مربوط به گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما مورد استفاده در آزمایش

گونه‌ی قارچ	T.*harzianum*	T.*virens*	T.*konigii*	T.*saturnisporum*
جدایه قارچی مورد استفاده	T20, T14N, T16, T.BI, T7, T25, T16A, T19	T6, T21, T65, T64	T77	T12, T12N

برای تهیه کیتین کلوئیدال، به ۵گرم کیتین کراب شل، ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال افزوده شد و بهم زده شد، پس از ۲۴ ساعت در دمای ۴درجه سانتی‌گراد با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک سوسپانسیون مزبور فیلتر شد، سوسپانسیو به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. جهت شست و شوی بقایای اسیدی از کیتین کلوئیدال، رسوب حاصله چندین بار با آب مقطر سترون شست و شو گردید و سپس مورد استفاده قرار گرفت (۲۹).

محیط کشت پایه برای تولید آنزیم کیتیناز شامل آمونیوم دی هیدروژن فسفات (گرم در لیتر(۵ گرم بر لیتر)، سولفات منیزیم (۱ گرم بر لیتر)، نیترات پتاسیم (۵ گرم بر لیتر)، سولفات منیزیم ۷ آبه (۱ گرم بر لیتر)، کلرید سدیم (۱ گرم بر لیتر) و ۱ درصد نمک‌های ضروری (V/V) شامل [(سولفات منگنز(۸/. گرم بر لیتر)، سولفات روی ۷ آبه (۱/۷ گرم بر لیتر) و سولفات آهن ۷ آبه (۲/۵ گرم بر لیتر))] به همراه کیتین کلوئیدی یا پودر ریسه قارچ رایزوکتونیا به میزان یک گرم در لیتر بود(۳۳). محیط کشت مورد نظر تهیه و اتوکلاو گردید و پس از سرد شدن درون هر بطری شیشه‌ای یک لیتری سترون مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط ریخته شد و پس از مایه‌زنی قارچها به مدت ۹۶ ساعت بر روی شیکر در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

سنجش آنزیمی کیتیناز

سنجش آنزیمی به روش رنگ سنجی (Colorimetric) طبق روش مولانو و همکاران (۱۹) صورت پذیرفت. ترکیب سنجش شامل یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ درصد کیتین خالص در بافر استات ۵۰ میلی‌مولار(pH=۵/۲) و یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. ترکیب فوق به مدت ۷ ساعت در دمای ۳۷ درجه بر روی شیکر قرار گرفت در این حالت رنگ ترکیب واکنش از حالت بی‌رنگ به حالت تیره رنگ تغییر پیدا کرد و سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و واکنش با افزودن یک میلی‌لیتر دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) متوقف شد. در این آزمایش از N-Acetylglucosamine(GlcNAc) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی برابر با مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک میکرومول N-Acetylglucosamine از کیتین در هر دقیقه در شرایط آزمایش مورد نیاز است (۹).

کشت قارچ بر روی محیط جامد حاوی کیتین

جهت اندازه‌گیری میزان رشد جدایه‌های مختلف قارچ بر روی محیط جامد حاوی کیتین قارچ بر روی محیط آب آگار(WA) دارای ۰/۱ درصد کیتین کلوئیدال خالص و کیتین استخراج شده از ریسهٔ رایزوکتونیا، کشت گردید و میزان رشد پرگنه قارچ پس از ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد.

بررسی تأثیر مستقیم جدایه‌های قارچ تریکودرما و عصاره محیط کشت قارچ بر میزان تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه

برای بررسی تأثیر جدایه های قارچ تریکودرما بر میزان مرگ و میر و تفریخ تخم‌ها، یک لام سترون را درون یک پتری استریل قرار داده و یک حلقهٔ پارافین به قطر یک سانتی‌متر بر روی هر لام زده شد و در هر حلقه دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی۳۰ عدد تخم نماتد قرار داده شد. سپس در دو طرف حلقه، دو دیسک ۵ میلی‌متری از هر یک از جدایه‌های قارچی قرار داده شد. برای جلوگیری از خشک شدن دیسک‌های محیط کشت و سوسپانسیون، درون هر پتری مقداری آب مقطر استریل ریخته شد و لام با قرار دادن خلال دندان استریل درون پتری از کف پتری جدا شد و پتری‌ها به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نمونه‌های شاهد دو دیسک ۵ میلی‌متری از محیط کشت نشدهٔ PDA در دو طرف حلقه قرار داده شد. هم‌چنین در آزمایشی دیگر، تأثیر عصاره ی محیط کشت القا کنندهٔ کیتیناز بر میزان تفریخ تخم نماتد مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار ۳۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد تخم نماتد و ۱۵ میلی‌لیتر محلول عصاره محیط کشت حاصل از کشت هر کدام از جدایه‌ها بر روی محیط مایع القا کننده کیتیناز درون یک پتری ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینهٔ فعالیت آنزیم) قرار داده شد. در نمونه‌های شاهد، از آب مقطر استریل به جای عصارهٔ آنزیمی استفاده شد (۱۵).

بررسی میزان توانایی جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp. در کنترل نماتد ریشه گرهی در گلخانه

برای بررسی میزان تأثیر جدایه‌های قارچ مورد نظر در کنترل این نماتد، ابتدا خاک هر گلدان(یک کیلوگرم خاک و به نسبت‌های: خاک رسی:۱، خاک‌برگ:۱، ماسه:۲) با میزان گندم محاسبه شده جهت هر جدایه قارچی مایه‌زنی شده و به خوبی مخلوط گردید. سپس یک عدد نشاء گوجه‌فرنگی رقم موبیل در مرحله‌ی ۴ برگی به هر گلدان منتقل گردید. این آزمایش در خاک استریل و غیر استریل به طور جداگانه انجام پذیرفت. پس از گذشت ده روز از تاریخ مایه‌زنی قارچ به بوته‌ها، در اطراف طوقهٔ هر بوته سه سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر ایجاد و به هر گلدان ۲۰۰۰ عدد تخم نماتد اضافه گردید (۲۵). تیمارهای شاهد مثبت شامل گلدان‌های دارای گیاه به همراه نماتد و بدون قارچ و شاهد منفی شامل گلدان‌های دارای گیاه بدون نماتد و قارچ بود. اندازه گیری شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد شامل شاخص گال، تعداد کیسه

تخم در هر گرم ریشه، تعداد تخم درون هر کیسه تخم، تعدا لارو سن دوم در ۱۰۰گرم خاک اطراف ریشه و فاکتور تولید مثل نماتد پس از گذشت ۴۵ روز از مایه‌زنی نماتد به بوته‌های گوجه فرنگی صورت گرفت. در این آزمایش شاخص گال طبق روش تایلور و ساسر تعیین شد که بر طبق این روش شدت گال ریشه (RGS) بر اساس شاخص ۵- ۰ (۰: بدون گال، ۱ : ۲-۱گال، ۲: ۱۰-۳ گال، ۳ : ۳۰-۱۱گال، ۴ : ۱۰۰-۳۱ گال و ۵: بیش از ۱۰۰گال) ارزیابی شد (۲۳). هم‌چنین فاکتور تولید مثلی نماتد نیز از نسبت جمعیت نهایی نماتد به جمعیت اولیه نماتد به دست آمد. این آزمایش در دو نوع خاک سترون و غیر سترون انجام شد. در طی این مدت، گلدان‌های مذکور در شرایط گلخانه و در دمای ۲±۲۸ و حداقل ۸ ساعت نور در روز قرار گرفتند.

آنالیزهای آماری

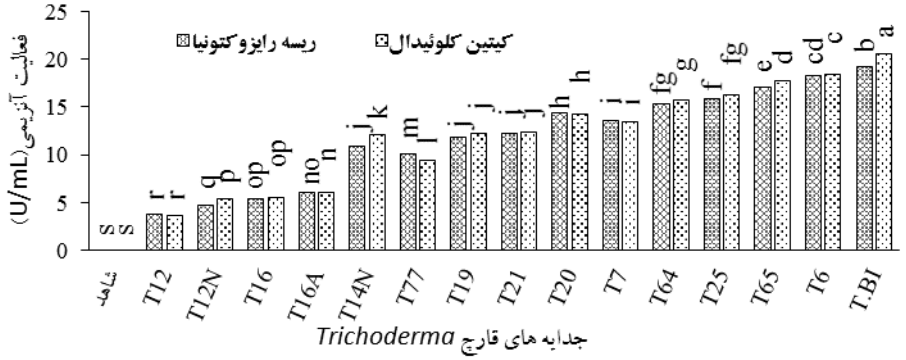
این تحقیق شامل دو آزمایش جداگانه در آزمایشگاه و گلخانه بود. در آزمایشگاه آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی ساده و با سه تکرار انجام گرفت. فاکتورها شامل جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما (۱۵جدایه تریکودرما و شاهد) و نوع سوبسترای آزمایش شامل کیتین کراب شل (Sigma®) یا کیتین استخراج شده از ریسه‌ی رایزوکتونیا بودند. در گلخانه نیز آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام پذیرفت. در این شرایط فاکتورهای آزمایش شامل جدایه‌های مختلف قارچ(۱۵جدایه و شاهد) و دو نوع خاک استریل و غیر استریل بودند. تجزیه واریانس صفات مختلف با استفاده از دستور "Proc GLM" نرم‌افزار SAS V.9.2 انجام پذیرفت. مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف آزمایشی با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی دار(LSD) در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت پذیرفت.

پیش از انجام تجزیه واریانس داده‌های آزمایشی، تست نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SigmaPlot V.12.0 انجام شد که در صورت نیاز داده‌ها قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال گردیدند. ارتباط بین فعالیت آنزیمی جدایه‌های مختلف قارچ و مقدار شاخص تولید مثلی نماتد، با استفاده از برازش معادله‌ی خطی درجه‌ی یک و برآورد ضریب تبیین یا همبستگی (r^2) توسط نرم‌افزار SigmaPlot V.12.0تعیین گردید.

نتایج

سنجش آنزیمی

برای این منظور، میزان جذب نوری ترکیب واکنش پس از توقف واکنش در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و با توجه به میزان جذب صورت گرفته در هر تیمار، فعالیت آنزیمی جدایه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با استفاده از غلظت‌های مختلف N-Acetylglucosamine محاسبه گردید. نتایج نشان داد که نوع منبع کیتین مورد استفاده جهت فعالیت آنزیمی، تنها در برخی از جدایه‌ها تأثیر معنی‌داری را در میزان فعالیت آنزیمی سبب می‌شود (جدول۲ و شکل۱). در بین این جدایه‌ها، جدایه‌های T.BI و T6 دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیمی در هر دو نوع منبع کیتین بودند. هم‌چنین جدایه‌های T12 و T12N نیز در هر دو آزمایش کم‌ترین توانایی تولید آنزیم کیتیناز را دارا بودند.



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌های قارچ Tricoderma در دو نوع مختلف منبع کیتین (جدایه‌های دارای حروف مشابه تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشتند)

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر نوع منبع کیتین مورد استفاده در آزمایش بر میزان تولید آنزیم کیتیناز

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	مجموع‌مربعات	Pr>F
جدایه قارچ	۱۵	۳۰۳۲/۱	**
نوع منبع کیتین	۱	۲/۰۷	ns
جدایه قارچ× نوع منبع کیتین	۱۵	۶/۶۲	ns
خطا	۶۴	۳۶/۲	
ضریب تغییرات (C. V.)		۶/۶۵	

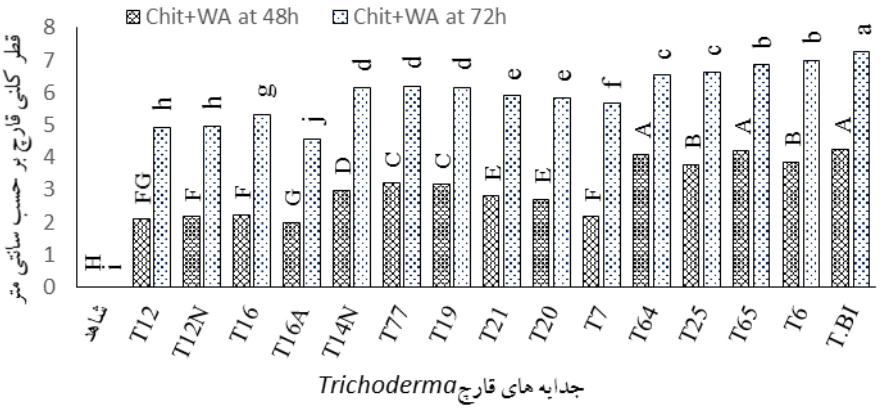
ns ، ** به ترتیب نشان از تأثیر غیرمعنی‌دار و معنی‌دار فاکتور آزمایشی در سطح ۰/۰۱ می‌باشد (**P<0.01**).

کشت بر روی محیط جامد

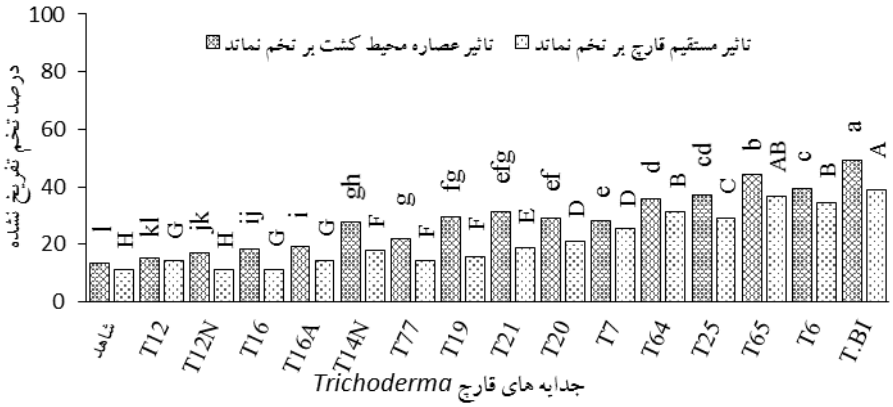
نتایج نشان داد که میزان رشد جدایه‌های قارچ تریکودرما بـر روی محیط کشت حاوی کیتین کلوئیدال با میزان توان آنزیمی آن جدایه‌ها ارتباط مستقیم دارد. در این بین تنها جدایه‌ای کـه نسـبت بـه فعالیـت آنزیمی‌اش، رشد کم‌تری بر روی محیط کشت جامد دارای کیتـین دارا بود، جدایهٔ T16A بود (شکل۲).

تاثیر مستقیم قارچ بر تخم نماتد

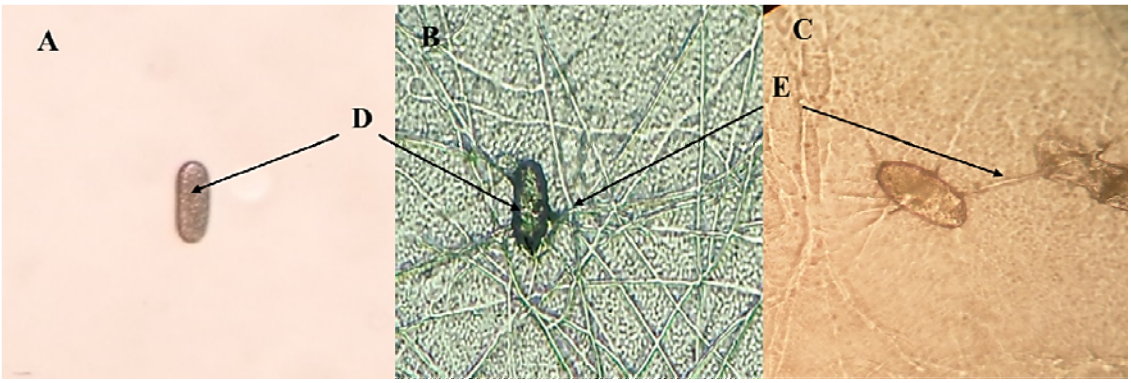
در آزمایش تأثیر عصاره محیط کشت بر روی تفـریخ تخـم نماتـد مشخص گردید که بیش‌تر جدایه‌ها قادر به کاهش میزان تفریخ تخـم نماتد می‌گردند. نتایج مقایسه میانگین و تجزیه واریانس نشان داد کـه تحت شرایط آزمایشگاهی، تمامی جدایه‌های قارچ به جز جدایـه T12 قادر به کاهش تفریخ تخم‌ها با اختلاف معنی‌دار نسـبت بـه شـاهد در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند (شکل ۳).



شکل ۲- قطر کلنی جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* بر روی محیط کشت دارای کیتین بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت



شکل ۳- میزان تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما بر میزان تخم تفریخ شده در آزمایشگاه



شکل ٤- پارازیته شدن تخم نماتد توسط قارچ تریکودرما، A: تخم سالم، B و C: تخم پارازیته شده، D: تخم نماتد، E: ریسه‌های قارچ

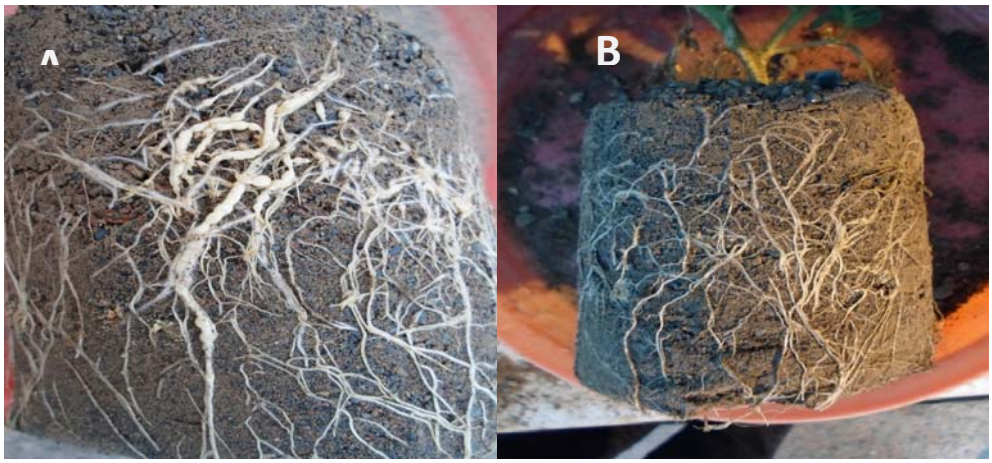
نتایج گلخانه‌ای

در خاک غیر سترون جدایه‌های T.BI ، T65 و T6 به عنوان برترین جدایه‌ها در آزمایشات گلخانه‌ای تعیین شدند. هم‌چنین جدایه‌های T16، T12و T12N به عنوان ضعیف‌ترین جدایه‌های گلخانه‌ای تعیین شدند. این سه جدایه قادر به کاهش فاکتور تولید مثل و شاخص گال نماتد با اختلاف معنی‌دار نسبت به شاهد نبودند (شکل ۷ و ۸). نتایج به دست آمده نشان‌دهندهٔ همبستگی معنی‌داری (r^2 =0.83) بین میزان فعالیت آنزیمی جدایه قارچ مورد استفاده جهت کنترل بیولوژیکی نماتد با مقدار فاکتور تولید مثلی نماتد مورد نظر است (شکل۶) این همبستگی نشان می‌دهد با افزایش میزان فعالیت آنزیمی یک قارچ، میزان فاکتور تولید مثلی نماتد کاهش پیدا می‌کند. نتایج در خاک استریل نشان داد که در برخی از جدایه‌ها میزان تأثیر قارچ بر کاهش مقدار فاکتور تولید مثل نماتد با توجه به نوع خاک در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار است (شکل۶). به عنوان مثال در گلدان‌های تیمار شده با جدایهٔ T64 در خاک استریل میزان فاکتور تولید مثلی نماتد ۱۲/۱۲ و در خاک غیر استریل این عدد۱۴/۰۳ به دست آمد.

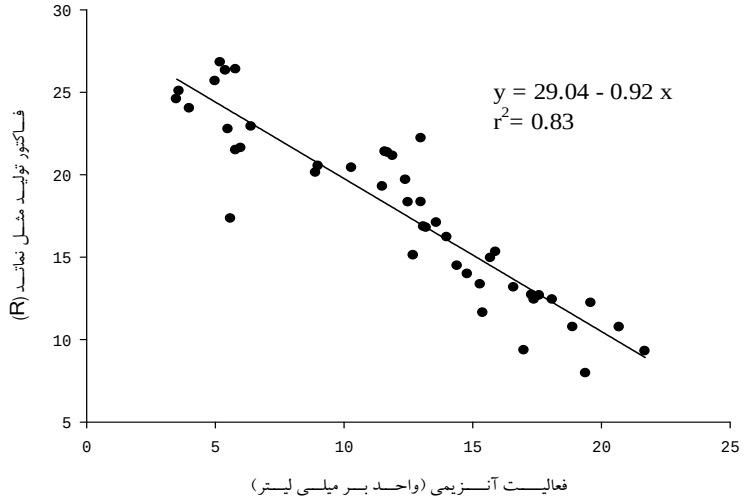
جدول ۳- تجزیه واریانس فاکتور تولید مثلی نماتد تحت تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* spp. در خاک سترون و غیر سترون

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	مجموع مربعات	Pr > F
جدایه قارچ	۱۵	۲۶۲۹/۵	**
خاک	۱	۱۴/۶	**
جدایه قارچ×خاک	۱۵	۲۰/۹	ns
خطا	۶۴	۶۰/۲۸	
ضریب تغییرات (C. V.)		۵/۴۶	

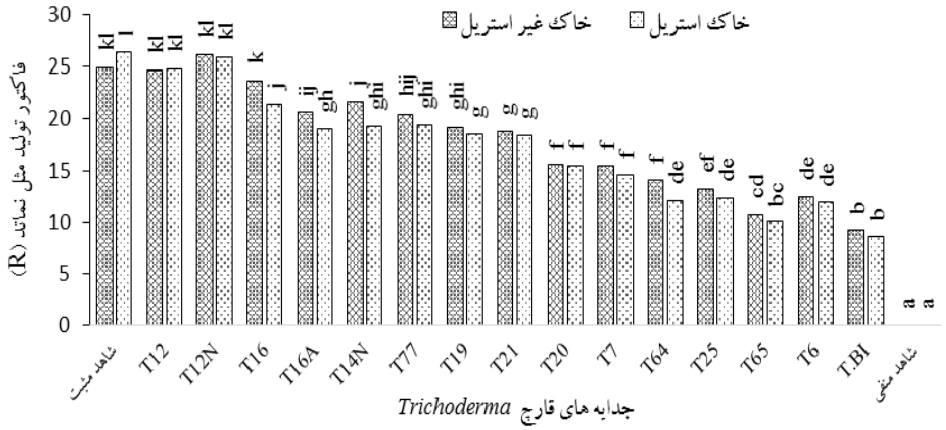
ns و ** – به ترتیب نشان از تأثیر غیرمعنی‌دار و معنی‌دار فاکتور آزمایشی در سطح ۰/۰۱ می‌باشد (**P<0.01**).



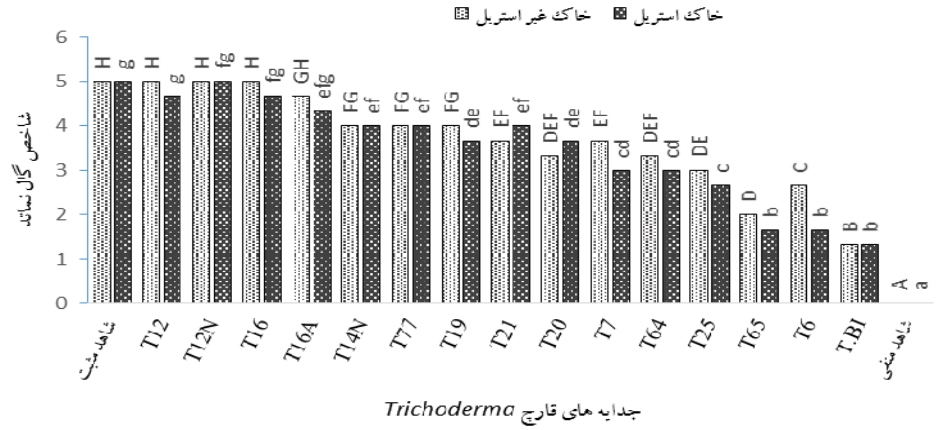
شکل ۵- A: ریشهٔ گیاه شاهد مثبت، B: ریشه گیاه شاهد منفی



شکل ٦- نمودار رگرسیون بین میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌های قارچ Trichoderma با فاکتور تولید مثل نماتد



شکل ۷- تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما بر فاکتور تولید مثل نماتد ریشه گرهی در خاک استریل و غیر استریل



شکل ۸-شاخص گال نماتد تحت تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما در خاک استریل و غیر استریل

بحث

نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا به گوجه فرنگی می‌باشد. کنترل نماتد ریشه‌گرهی به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولید مثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن آن دشوار می‌باشد. در حال حاضر استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به عنوان روشی سالم و جایگزین روش‌های شیمیایی، در مدیریت تلفیقی نماتدها مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۱۷). تاکنون تحقیقات زیادی در خصوص استفاده از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما به عنوان عامل کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی صورت پذیرفته است و در بسیاری از این تحقیقات قابلیت‌های منحصر به فرد گونه‌های این جنس در تولید انواع متابولیت‌های ضد میکروبی در کنار مکانیزم‌های دیگری چون تحریک مقاومت القایی در گیاه میزبان را از دلایل موفقیت این قارچ در امر کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی معرفی کرده‌اند. توانایی تولید مقادیر بالای آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز و گلوکاناز، این قارچ را در زمرهٔ دشمن طبیعی طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی قرار داده است (۳۰). در این تحقیق، میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز توسط ۱۵ جدایه از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما در ارتباط با توانایی کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از سنجش آنزیمی نشان داد که جدایه‌های T.BI، T6 و T65بیش‌ترین میزان تولید آنزیم را در محیط القا کننده‌ی کیتیناز حاوی کیتین کلوئیدال (به عنوان منبع استاندارد کیتین) دارا می‌باشند. هم‌چنین جدایه‌های T16، T20 و T12 نیز کمترین میزان تولید آنزیم کیتیاز را در محیط مزبور دارا بودند. در یک پژوهش بر روی میزان تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما در سال ۲۰۰۴، جدایهٔ T24 از گونهٔ *T.harzianum* با فعالیت آنزیمی ۲۹/۳ واحد بر میلی‌لیتر، به عنوان قوی‌ترین جدایه در تولید آنزیم مذکور شناخته شد. همچنین در همین پژوهش تاثیر نحوه‌ی مایه‌زنی جدایه‌های قارچی به محیط القا کنندهٔ آنزیم نیز بررسی گردید و مشخص شد مایه‌زنی محیط با سوسپانسیون اسپوری نسبت به مایه‌زنی با استفاده از حلقه‌های محیط کشت قارچ سبب تولید مقدار بالاتری آنزیم می‌گردد (۹). در پژوهشی دیگر، میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز توسط سه گونهٔ مختلف قارچ تریکودرما بر روی محیط کشت جامد حاوی کیتین کلوئیدال و با استفاده از شاخص رنگ (bromocresol purple) مورد بررسی قرار گرفت که هالهٔ صورتی رنگ تولید شده نشان دهندهٔ میزان تولید آنزیم توسط قارچ مورد نظر درون محیط می‌باشد. در این پژوهش گونهٔ *T.harzianum* و سپس گونهٔ *T. virens* بیش‌ترین میزان آنزیم را تولید کرده بودند (۱۸). در این پژوهش هم‌چنین علاوه بر کیتین کلوئیدال استاندارد، از کیتین ریسهٔ رایزوکتونیا نیز به عنوان منبع کربن جهت القای آنزیم استفاده گردید و مشاهده شد در همهٔ جدایه‌ها به جز جدایهٔ T77 میزان آنزیم تولیدی در صورت استفاده از ریسه رایزوکتونیا به عنوان منبع کیتین نسبت به استفاده از کیتین استاندارد پایین‌تر است. البته این تفاوت تنها در تعدادی از جدایه‌های مورد بررسی معنی‌دار بودند و در بیش‌تر جدایه‌ها تفاوت میزان آنزیم تولیدی معنی‌دار نبود. یکی از دلایل این امر احتمالاً به خاطر کم‌تر بودن میزان کیتین خالص موجود در ریسه رایزوکتونیا نسبت به کیتین تجاری مورد استفاده است که سبب کاهش میزان کیتین کل موجود در محیط و درنتیجه تولید میزان کم‌تر آنزیم می‌گردد. دلیل دیگر این تفاوت احتمالاً به وجود سایر ترکیبات قندی در ریسه رایزوکتونیا برمی‌گردد که سبب می‌شود قارچ علاوه بر کیتین، منبع تغذیه‌ای دیگری نیز در محیط داشته باشد و در نتیجه میزان تولید آنزیم خود را کاهش دهد.

هم‌چنین نتایج تأثیر قارچ در تخریب و پارازیته نمودن تخم نماتد در آزمایشگاه، این‌گونه تفسیر می‌شود که با توجه به ترکیب پوستهٔ تخم نماتد که بخش زیادی از آن را کیتین تشکیل می‌دهد، بالا بودن میزان فعالیت آنزیمی کیتیناز سبب افزایش میزان تخریب و پارازیته شدن تخم‌ها توسط جدایه‌های مختلف قارچ را در پی دارد. بر اساس نتایج میزان فعالیت آنزیمی و میزان تأثیر قارچ بر تخم، یک گونه همبستگی مثبت و معنی‌دار بین میزان فعالیت آنزیمی و درصد تخم تخریب شده وجود دارد که این امر نشان دهندهٔ تأثیر این آنزیم در تخریب تخم‌ها می‌باشد. در رابطه با قرار گرفتن مستقیم تخم نماتد در مقابل جدایه‌های قارچ تریکوردما، ریسه‌های قارچ مورد نظر می‌توانند وارد بدن لارو یا تخم‌ها شده و آن‌ها را پارازیته نمایند یا با تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده مانند کیتیناز، پروتئاز و لیپاز، سبب تخریب پوستهٔ تخم نماتد شده و باعث کاهش تفریخ تخم و افزایش مرگ لاروها شوند (۴). در برخی جدایه‌ها مانند جدایه‌T65 و T64 میزان تخریب تخم‌ها نسبت به جدایهٔ T6 بالاتر است در حالی‌که بر اساس نتایج موجود میزان توانایی جدایه T6 در تولید آنزیم کیتیناز نسبت به دو جدایه مذکور بالاتر است که این امر احتمالاً به دلیل تأثیر متابولیت‌های دیگر این قارچ مانند آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز در تخریب تخم‌ها می‌باشد. بدین‌معنا که احتمالاً دو جدایهٔ T65 و T64 دارای توانایی بالاتری در تولید آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز و یا سایر ترکیبات موثر در تخریب تخم ها می‌باشند. تأثیر آنزیم کیتیناز در تخریب تخم‌های این نماتد توسط دو قارچ *Paecilomyces lilacinus* و *Pochonia* spp. نیز گزارش شده است (۱۶). در پژوهشی که توسط صاحبانی و همکاران صورت گرفت، تأثیر جدایهٔ T.BI بر میزان کاهش تفریخ تخم این نماتد در طول شش روز بررسی شد و نشان داده شد که بیش‌ترین میزان کاهش تفریخ تخم‌ها در روز سوم از مایه‌زنی قارچ به نماتد صورت می‌گیرد. هم‌چنین در همین پژوهش

مشخص گردید میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز قارچ با میزان کاهش تفریخ تخم‌های نماتد دارای ارتباط مثبت می‌باشد (۲۲). صدیقی و همکاران در پژوهشی دیگر تأثیر عصاره محیط کشت مایع پنج گونه از قارچ تریکودرما را بر میزان تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دو بررسی نمودند. طبق این پژوهش، بیش‌ترین تأثیر مربوط به گونه‌های *T. viride* و *T.harzianum* به ترتیب با کاهش ۴۴ درصد و ۴۰ درصد در تفریخ تخم‌ها بود (۲۵).

نتایج آزمایشات گلخانه‌ای به نحوی مؤید نتایج آزمایشگاهی بودند. در بررسی میزان تأثیر جدایه‌های قارچ در کنترل بیولوژیک نماتد در گلخانه معیارهایی هم‌چون تعداد توده تخم، تعداد تخم درون هر توده تخم، تعداد گال بر روی ریشه (شاخص گال)، تعداد لارو سن ۲ در ۱۰۰گرم خاک اطراف ریشه و در نهایت فاکتور تولید مثل نماتد مورد استفاده قرار گرفتند (۲۶). بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایشات گلخانه‌ای، بین بیش‌تر جدایه‌های قارچ تریکودرما در میزان توانایی کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵ درصد وجود دارد. بر اساس این نتایج، بیش‌ترین میزان توانایی کنترل‌کنندگی در گلدان‌های تیمار شده با جدایه T.BI مشاهده گردید و پس از آن جدایه‌های T65 و T6 در رتبه‌های بعد قرار می‌گرفتند. هم‌چنین در بین ضعیف‌ترین جدایه‌ها از نظر توانایی بیوکنترلی نیز سه جدایهٔ T12N، T12 و T16 کم‌ترین موفقیت را در کاهش شاخص‌های بیماری‌دارا بودند. نکته‌ی جالب توجه در رابطه با این نتایج این است که بین توانایی تولید آنزیم کیتیناز توسط جدایه‌های مختلف قارچ در آزمایشگاه و میزان توانایی این جدایه‌ها در کاهش شاخص‌های بیماری نماتد ریشه گرهی در آزمایشگاه یک همبستگی خطی با ضریب تبیین بالا (r^2=0.83) وجود دارد که این امر نشان‌دهندهٔ تاثیر معنی‌دار میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌های قارچ تریکودرما بر قدرت بیوکنترلی جدایه می‌باشد. بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه، مشخص شده که ریسه‌های قارچ تریکودرما توانایی نفوذ به درون ریشه گیاه را دارا می‌باشند، اهمیت این امر در رابطه با بیمارگرهای داخلی ریشه مشخص می‌شود و ریسه‌های قارچ پس از نفوذ به درون ریشه می‌توانند بیمارگر را پارازیته نمایند. از نمونهٔ بارز این بیمارگرها، نماتدهای ریشه‌گرهی می‌باشند که درون بافت ریشه و زیر اپیدرم فعالیت می‌کنند و قارچ تریکودرما پس از نفوذ به درون ریشه می‌تواند به درون تودهٔ تخم نفوذ کرده و از کیتین موجود در تخم به عنوان یک بستر غذایی استفاده نموده و آن‌ها را پارازیته کند. از طرفی با توجه به ترکیب پوستهٔ تخم نماتد و کوتیکول لاروهای سن دو، کیتیناز تولید شده توسط جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما سبب تخریب تخم‌های نماتد ریشه گرهی درون ریشه و لاروهای سن دو موجود در خاک گشته که این امر سبب کاهش جمعیت نماتد مذکور در ریشه گوجه فرنگی و هم‌چنین کاهش سایر شاخص‌های بیماری از جمله شاخص گال و فاکتور تولید مثل نماتد می‌گردد (۱۳). از طرفی کیتیناز تولیدی توسط این جدایه‌ها تأثیرات فراوانی را نیز بر گیاه میزبان می‌گذارد. کیتینازها می‌توانند به عنوان گروهی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR-Protein) در گیاه عمل نمایند. یکی از تأثیرات کیتیناز در گیاهان، فعال کردن مکانیزم‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها می‌باشد. هم‌چنین کیتینازها می‌توانند در فرایندهایی مثل بهبود رشد و نمو سلول‌ها و ترمیم زخم‌ها، مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول (PCD) و مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی نقش داشته باشند (۲۷). در پژوهشی که به منظور توانایی جدایهٔ T.BI در کنترل بیولوژیک نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در گلخانه صورت گرفت، مشخص شد که این قارچ قادر به کنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی تحت شرایط گلخانه‌ای می‌باشد (۲۲). هم‌چنین در پژوهشی دیگر نیز که به منظور بررسی توانایی بیوکنترلی چندین جدایه از قارچ تریکودرما بر نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی صورت گرفت، جدایه‌هایی از دو گونهٔ *T.harzianum* و *T.virens* بیش‌ترین میزان توانایی کنترل کنندگی را از خود نشان دادند (۱). از طرفی بارها ثابت شده است که مهم‌ترین مکانیسم بیوکنترلی جدایه‌های قارچ تریکودرما علیه بیمارگرهای گیاهی، تحریک مقاومت القایی سیستمیک و افزایش میزان ترکیبات دفاعی در میزبان می‌باشد. این امر نیز به نحوی تحت تأثیر متابولیت‌های تولیدی این جدایه‌ها می‌باشد که یکی از این متابولیت‌ها، آنزیم‌های کیتیناز می‌باشد (۱۱).

نکتهٔ دیگر در رابطه با نتایج آزمایشات گلخانه‌ای این است که در برخی از جدایه‌ها بین میزان موفقیت در کنترل بیماری در خاک سترون و غیر سترون تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود دارد. مثلاً در جدایهٔ T.64 مشاهده می‌شود که این جدایه در خاک استریل فاکتور تولید مثل نماتد برابر با می‌باشد که این عدد با فاکتور تولید مثل به دست آمده در خاک غیر استریل تحت تاثیر این جدایه دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد که این امر نشان دهندهٔ توانایی کم‌تر جدایه مذکور در رقابت با سایر میکروارگانیزم‌ها و کلنیزه نمودن ریشه گیاه در خاک غیر استریل نسبت به خاک استریل می‌باشد.

در پایان می‌توان گفت فاکتورهای متفاوتی بر توان یک عامل بیوکنترل تأثیر گذار است و نمی‌توان با اطمینان از موفق بودن یا ناموفق بودن یک عامل بیوکنترل صحبت نمود، اما بر اساس این پژوهش و پژوهش‌های مشابه؛ جدایه‌های گونه‌های *T.harzianum* و *T.virens* به خصوص جدایهٔ T.BI و T6 بهترین جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش می‌باشد.

منابع

1- Affokpon A., Coyne D. L., Htay C.C., Agbèdè R.D., Lawouin L., and Coosemans J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. Soil Biology and Biochemistry, 43(3): 600-608.
2- Benítez T., Rincon M.A,. Limon M.C., and Codon A.C. 2004, Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains., International Microbiology, 7:249-260.
3- Bird F.A., and McClure M.A. 1976. The tylenchid (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability. Parasitology, 72:19-28.
4- Bonants P.J.M., Fitters P.F.L., Thijis H., Den Belder E., Waalwijk C., and Henfling J.W.D.M. 1995. A basic serin protease from *paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiology, 141: 775-784.
5- Brants A., Brown C.R., and Earle, A.D. 2000. *Trichoderma harzianum* Endochitinase Does Not Provide Resistance to *Meloidogyne hapla* in Transgenic Tobacco. Journal of Nematology, 32(3):289–296.
6- Chahal V.P.S., and Chahal P.P.K. 1991.control of *meloidogyne incognita* with *bacillus thuringensis*. Dev. Plant soil Sci., 45:677-680,.
7- De la Veg H., Specht C.A., Liu Y., and Robbins P.W. 1998. Chitinases are a muti-gene family in Aedes, Anopheles and Drosophila. Insect Molecular Biology, 7: 233-239.
8- Dick R.P. 2002. Enzymes in the environment: activity, ecology and applications.. CRC Press. Vol. 86
9- El-Katatny M.H., Somitsch W., Robra K.H., El-Katany M.S., and Gubitz G.M. 2000. production of chitinase and beta-1, 3- glucanase by T. *harizianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotinum rolfsii*. Food Technology and Biotechnology, 38:173-180.
10- Haran S., Shickler H., Chet I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142: 2321-2331.
11- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, 2:43-56.(307).
12- Herrera-Estrella A., and Chet I. 1999. Chitinases in biological control. Express. 87:171- 184.
13- 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.
14- Jeapson S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes *Meloidogyne* species. Camberian International, 265 pp.
15- Khan A., Williams K.L., and Nevalainen H.K. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biological Control,31(3): 346-352.
16- Khan A., Williams K., Molloy M.P., and Nevalainenc H., 2003. Purification and characterization of a serine protease and chitinases from Paecilomyces lilacinus and detection of chitinase activity on 2D gels. Protein Expression and Purification, 32: 210–220.
17- Lopez-Ilorca, L.V., Macia-Vicente, J.G. and Jansson, H.B. 2008. Mode of action and interaction of nematophagous fungi. In: Ciancio A. and Mukerji K. G (eds.) Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. 51-76.
18- Lunge A.G., and Patil A.S. 2012. Charectization of efficient chitinolytic enzyme producing *Trichoderma* species: a tool for beter antagonistic approach, International Journal of Science, Environment, 1(5): 377-385.
19- Molan. J., Duram A., and Cabib. E. 1997. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin., Anal Biochem 1977, 83:648-656.
20- Muzzarelli R.A.A., and Peter M.G. 1997. Chitin handbook. European Chitinase Society, Atec Grottammare, Italy.1:1-10 .
21- Roberts D.P., Lohrke S.M., Meyer S.L.F., Buyer J.S., Bowerrs J.H., Baker C.J., Li W., Souza J.T., Lewis J.A., and Chung S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soil born diseases of cucumber. Crop Protection, 24(2):141-155.
22- Sahebani N., and Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry, 40(8): 2016-2020.
23- Sasser J.N., Carter C.C., and Hartman K.M. 1984. Standardization of host suitability studies and reporting of resistance to root-knot nematodes. Department of Plant Pathology, North Carolina State University.
24- 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* . Phytopathology, 91:687-693.
25- Siddiqui I.A., Amer Zareen M., Javad Zaki M., and Shaukat S.S. 2001. Use of *Trichoderma* spicies in the control of *Meloidogyne javaniva*, Roor-rot nematode in the Okra and Mungbean, Pakistan journal of Biological sciences, 4(7): 846-848.
26- Siddiqui 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 fluorescens* in tomato. Letters in

applied microbiology, 38(2), 169-175.
27- Singh A., Kirubakaran I., and Sakhtivel N. 2007. Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. Protein Expression and Purification, 56: 100–109.
28- Spiegel Y., Chet I., and Cohn E. 1987. Use of chitin for controlling plant-parasitic nematodes II. Mode of action. Plant and Soil, 98:337–346.
29- Thiagarajan V., Revathi R., Aparanjini K., Sivamani P., Girilal M., Priya C.S., and Kalaichelvan P.T. 2011. Extracellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporum* PTK2 cell wall. INT J CURR SCI, 1: 30-44.
30- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., and Valero J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* sp. : panoply of biological control. Biochem. Ezymol. J., 37:1-20.
31- Wen C.M., Tseng C.S., Cheng C.Y., and Li Y.K. 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2 .Biotechnol. Appl. Biochem, 35’ 213- 219.
32- Xu J., Narabu T., Mizukubo T., and Hibi T. 2001. A molecular marker correlated with selected virulence againts the tomato resistance gene Mi in *Meloidogyne incogenita*, M.*javanica* and M. *arenaria* Phytopathology, 91: 377-382.
33- Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S.L., Mach R.L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C.P. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology, 26: 131-140.