گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٤، شماره۳، پاییز ١٤٠٠
doi 10.22055/ppr.2021.17128

اثر استرین Tr6 *Trichoderma harzianum* در القای مقاومت علیه سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyodidae)، در گیاه گوجه‌فرنگی

مهسا الداغی[۱]، حسین اللهیاری*[۲]، وحید حسینی نوه[۲]و کیوان بهبودی[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج ، ایران
۲- *نویسنده مسوول: استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

چکیده

یکی از مکانیسم‌های عمل قارچ‌های جنس *Trichoderma* spp.، تحریک سامانه دفاعی در گیاهان است. در این مطالعه، اثر استرین *Trichoderma harzianum* Tr6 بر ترجیح میزبانی و تخم‌گذاری سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* westwood در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. در این راستا چهار آزمایش شامل سنجش فنول کل، بررسی اثر زمان در بروز مقاومت، انتخاب آزاد و بدون انتخاب در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ٦٠-٧٠ درصد و دوره نوری ٨:١٦ ساعت (روشنایی:تاریکی) انجام شد. نتایج نشان داد بیشترین غلظت فنول کل در گیاه مربوط به زمان‌های۳ و ٤ روز بعد از تلقیح قارچ بود که به‌ترتیب برابر با ۰/۰۰۳±۰/۳۵۰۳و ۰/۰۰۱±۰/۳۳۲۳ میلی‌گرم بر گرم بود و کمترین تعداد افراد بالغ پشت برگ از روی گیاهانی که ۲ و ٤ روز از زمان تلقیح آن‌ها می‌گذشت، جمع‌آوری شد که به‌ترتیب میانگین آن‌ها برابر با ۰/۸٦±۲/۲ و۰/٦۳±۲/۰بود. همچنین در گیاهان تیمارشده به‌وسیله قارچ تریکودرما، کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد حشرات بالغ درپشت برگ (٤/٦٦±۳/۰)، تخم‌های گذاشته شده (۱/۵۱±۷/٤) و میزان قطرات عسلک تولیدشده (۰/۲۸±۱/۰) نسبت به گیاهان شاهد، مشاهده شد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که تیمار گیاه با استرین Tr6 *T. harzianum* سبب القای مقاومت نسبت به گیاه‌خواری سفیدبالک، کاهش ترجیح میزبانی و تخم‌گذاری شد و کاربرد آن می‌تواند یک گزینه امیدوارکننده در برنامه مدیریت تلفیقی این آفت در گلخانه باشد.

کلیدواژه‌ها: تریکودرما، آنتاگونیست، ترجیح میزبانی، فنول کل

دبیر تخصصی: دکتر جبرائیل رزمجو

Citation: Aldaghi, M., Allahyari, Hosseininaveh, H., & Behboudi, K. (2021). Effect of *Trichoderma harzianum* Tr6 in inducing resistance in tomato against *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyodidae). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 44(3): 107-117. https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17128

مقدمه

سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) از جمله آفات چندین‌خوار و همه‌جا گستر بوده که با تغذیه از شیره گیاه موجب ضعیف شدن گیاه، ترشح عسلک و رشد قارچ‌های ساپروفیت، جذب ذرات گرد و غبار در سطح گیاه (آلودگی ثانویه)، انتقال برخی ویروس‌های گیاهی و در نهایت کاهش فتوسنتز و عملکرد محصول می‌شود (Van Lenteren, 1992; Van der Linden and van der Staaij, 2001). با توجه به نقش آفت‌کش‌های شیمیایی در کنترل آفات کشاورزی و چالش‌های ناشی از استفاده بی‌رویه از آن‌ها، یافتن روش‌های جایگزین کم‌خطر برای محیط و در عین حال با اثرات آفت‌کشی قابل قبول در مقایسه با سموم رایج مورد نیاز می‌باشد (Vander Linden and van der Staaij, 2001; Shores, 2005). از این‌رو مقاومت القایی به‌عنوان یک روش کنترل غیرشیمیایی، با هدف بالا بردن مقاومت گیاه به وسیله دامنه‌ی وسیعی از موجودات ریز (باکتری‌ها، قارچ‌های پاتوژن، مایکوریزا و غیره) و ترکیبات شیمیایی نظیر سالسیلیک‌اسید[1] و جاسمونیک‌اسید[2] می‌تواند یک روش مطلوب در حفاظت گیاه و کنترل جمعیت آفات باشد (Kuc, 1985). در اثر واکنش‌های گیاه و آنتاگونیست، تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و ساختمانی در گیاه رخ می‌دهد. از جمله ترکیبات دخیل در واکنش‌های دفاعی گیاه، ترکیبات فنلی هستند که در گیاهان نقش‌های فراوانی از جمله در ساختار دیواره سلولی، تنظیم رشدونمو و نیز سازوکارهای دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی برعهده دارند و افزایش محتوای این ترکیبات در گیاه، روی گیاه‌خوارها و یا پاتوژن‌های گیاهی اثر منفی دارد (Baldwin and Schultz, 1983). تولید ترکیبات فنولی در گیاه با مسیرهای دفاعی گیاهی ارتباط دارد و نشانی از بروز مقاومت در گیاه می‌باشد (Baldwin and Schultz, 1983; Felton et al., 1999). قارچ تریکودرما، یکی از محرک‌های زنده موثر در القای مقاومت است که در بسیاری از اکوسیستم‌ها گسترش یافته و گونه‌های مختلفی از آن مانند *Trichoderma harzianum* Rifai، به عنوان همزیست غیربیماری‌زا موفق عمل کرده و با مکانیسم‌های مختلف تجزیه آنزیمی، ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین محلول کردن مواد غذایی و افزایش قابلیت جذب آن‌ها و توسعه‌ی ریشه‌ها سبب بهبود رشد گیاهان و کنترل بیمارگرهای گیاهی می‌شود (McLean et al., 2012). استقرار و تکثیر قارچ روی ریشه گیاهان، باعث تولید و یا افزایش غلظت ترکیبات شیمیایی دفاعی در گیاه و در نتیجه القای نوعی مقاومت گسترده در برابر انواع مختلف مهاجمان به گیاه با عنوان مقاومت القایی سیستمیک (ISR[3]) می‌شود (Harman et al., 2004; Barahona, 2010; Hermosa et al., 2012). در زمینه کنترل آفات این نوع مقاومت، روی تغذیه، رشد و زنده‌مانی حشرات اثر نامطلوب باقی می‌گذارد (Wu and Baldwin, 2010). به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای، تلقیح ریشه گیاهانی از خانواده‌ی کدوئیان و بادنجانیان با استرین‌های *T. atroviride* Karsten علیه نماتد *Meloidogyne incognita* Kofoid and White منجر به افزایش ترکیبات فنولی و متابولیت‌های ثانویه در گیاه و کاهش ترجیح میزبانی شته پنبه *Aphis gossypii* Glover و سفیدبالک گلخانه *T. vaporariorum* Westwood شد (Barahona, 2010). در تحقیقی دیگر تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی توسط دو استرین قارچ اندوفیت *Fusarium oxysporum* Schlecht strain 162 و *T. atroviride* strain MT-20 باعث کاهش ۵۰ درصدی جمعیت سفیدبالک گلخانه طی ۱۰ روز نسبت به گیاهان شاهد شد (Menjivar and Cabrera, 2012). در آفات غیرمکنده نیز نظیر سوسک‌های لوبیا *Acanthoscelides obtectus*

1- Salisilic acide
2- Jasmonic acide
3- Induced systemic resistance

Say، کاربرد چهار استرین تریکودرما و دو استرین تجاری تریکودین (TD) موجب کاهش تجمع حشره و همچنین کاهش تعداد سوراخ‌های ایجاده شده توسط آن در لوبیاهای تیمارشده با قارچ شد (Rodriguez-Gonzalez et al., 2019). همچنین، تلقیح ریشه خیار با استرین *T. harzianum* T-203 به طور قابل توجهی علائم بیماری لکه‌برگی باکتریایی با عامل *Pseudomonas syringe* Van Hall را کاهش داد (Shores, 2005). تلقیح گوجه‌فرنگی با استرین‌های *T. harzianum* سبب القای مقاومت نسبت به بیماری کپک خاکستری *Botrytis cinerea* Pers و نیز لکه‌برگی آلترناریایی *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* Keissl شده است (Shores and Harman, 2008). استرین قارچ *T. harzianum* strain Tr6 را پیش‌تر، علیزاده از ریشه‌های خیار مزارع پاکدشت جداسازی کرده و مقاومت القایی موثری را علیه بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و ساقه خیار *Fusarium oxysporum* f.sp. *radiciscumerinum* گزارش داده است (Alizadeh et al., 2012). نظر به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی برای ایران به‌خصوص از جنبه صادرات فرآورده‌های آن (Bagheri et al., 2012) و با توجه به خسارت اقتصادی سفیدبالک گلخانه علی‌رغم کاربرد روش‌های مختلف کنترل که به تولید این محصول وارد می‌آورد، ارائه راهکار مکمل یا جایگزین برای کنترل آفت مذکور ضرورت دارد. لذا این پژوهش به منظور بررسی قابلیت استرین آنتاگونیست بومی در القای واکنش دفاعی گیاه گوجه فرنگی در برابر سفیدبالک گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی گیاه گوجه فرنگی

برای ضدعفونی سطحی، بذرهای گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) رقم فلات به مدت دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم (۱٪) آغشته شده و بلافاصله با آب مقطر به طور کامل شسته شدند و سپس این بذور به مدت ۲۴ ساعت برای جوانه زنی بین کاغذ صافی مرطوب سترون در دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بذرهای جوانه‌زده در گلدان‌های پر شده با پرلیت و کوکوپیت سترون کشت شده و در اتاقک رشد در شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس پرورش داده شد. نشاها یک روز در میان آبیاری شده و پس از ۶ هفته، از گلدان خارج و ریشه‌ها با آب شسته شدند تا بستر کشت از ریشه‌ها جدا شوند و بعد از آن نشاها در گلدان‌های جدید با خاک سترون کاشته شدند (Nazeri and Allahyari, 2017).

جمع‌آوری و پرورش سفیدبالک گلخانه

برای پرورش سفیدبالک گلخانه و انجام آزمایش‌ها از کلنی موجود در آزمایشگاه پویایی جمعیت گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران استفاده شد. گیاهان گوجه‌فرنگی رقم فلات آلوده به سفیدبالک در اتاقک پرورش در شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد نگه‌داری شده و با قرار دادن گیاهان سالم در بین گیاهان آلوده، منبع تغذیه آنها تأمین شد. در همه آزمایش‌ها از سفیدبالک‌های بالغ هم‌سن استفاده شد. برای هم‌سن کردن سفیدبالک‌ها، برگ آلوده به شفیره جدا و داخل یک ظرف برای ۲۴ ساعت نگه‌داری شدند. سپس سفیدبالک‌های یک‌روزه‌ای که طی ۲۴ ساعت گذشته از شفیره‌ها بیرون آمده بودند، در آزمایش‌ها استفاده شدند (Nazeri and Allahyari, 2017). برای تشخیص سنین پورگی در آزمایش‌ها، از شکل‌شناسی ظاهری استفاده شد. پوره سن اول یا پوره خزنده دارای سه جفت پا بوده و متحرک است و بعد از ساکن شدن در محیط به دور خود مواد مومی سفید رنگی می‌پوشانند. سنین دوم و سوم و چهارم پورگی ثابت و براساس اندازه بدن قابل تفکیک هستند، علاوه بر آن در سن چهارم پورگی یک جفت چشم قرمز رنگ دیده می‌شود و

در کنار بدن شفیره غدد ترشح کننده‌ی موم قرار گرفته‌اند که شبیه مژه نمایان هستند (Perring et al., 2018).

استرین تریکودرما و تهیه سوسپانسیون اسپور

استرین Tr6 از قارچ *T. harzianum* از کلکسیون واقع در بخش بیماری‌شناسی گیاهی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به طور خالص تهیه و پس از تک‌اسپور کردن روی محیط کشت PDA کشت شد. برای تهیه سوسپانسیون اسپور، ظروف پتری به مدت یک هفته در انکوباتور در دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شد. با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ظروف پتری، اسپورها از سطح ظروف جمع‌آوری و دو بار با آب مقطر استریل به وسیله سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه شستشو شدند. در نهایت تعداد اسپور در میلی‌لیتر به وسیله هماسیتومتر اندازه‌گیری و با افزودن سولفات منیزیوم رقت مورد نظر سوسپانسیون به میزان 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد (Alizadeh et al., 2013).

مایه‌زنی گیاهچه‌ها

مایه‌زنی هر گیاهچه در مرحله ۴ تا ۶ برگی توسط سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر به میزان ۱۰ میلی لیتر به ازای هر گیاهچه به خاک سترون پای ریشه افزوده و در انکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد (Alizadeh et al., 2013).

سنجش فنول کل

در این آزمایش، گیاهان ۴ تا ۶ برگی انتخاب شده و از برگ آن‌ها در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح، نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های برگی در فویل آلومینیوم بسته‌بندی و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. سنجش میزان فنول کل به روش Ainsworth and Gillespie (2007) انجام شد. به‌منظور همگن‌سازی بافت برگ از متانول ۹۵ درصد استفاده شد و محلول به‌دست آمده به‌مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگه‌داری شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با ۱۴ هزار دور در دقیقه، مایع رویی با معرف فولین‌سیوکالتئو[1] و کربنات سدیم هفت درصد مخلوط شد. تیمار شاهد، تنها متانول ۹۵ درصد به همراه کربنات‌سدیم و معرف فولین‌سیوکالتئو بود. میزان جذب در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت خوانده شد. مقدار فنول کل از روی منحنی استاندارد برحسب گالیک اسید با غلظت‌های مختلف به‌صورت میلی‌گرم در هر گرم پودر خشک گیاه محاسبه و ثبت شد. آزمایش برای هر زمان در ۶ تکرار (۶ بوته) انجام شد.

آزمون اثر زمان در بروز مقاومت

در این آزمایش، بوته‌های ۴ تا ۶ برگی آلوده به Tr6 *T. harzianum* و بوته‌های شاهد (آبیاری شده با آب مقطر) در قفس‌های جداگانه مجهز به توری ارگانزا قرار داده شدند و ۲۰ عدد حشره بالغ یک‌روزه در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ روز پس از تلقیح با قارچ، رهاسازی شده و بعد از ۲۴ ساعت، تعداد بالغین موجود در هر گلدان شمارش و حذف شدند. آزمایش برای هر زمان در ۵ تکرار انجام شد.

آزمون انتخاب آزاد[2]

در این آزمایش، ترجیح میزبانی آفت با حق انتخاب بین میزبان سالم و آلوده بررسی شد. دو بوته‌ی ۴ تا ۶ برگی تیمار (بعد از گذشت سه روز از آلودگی به *T. harzianum* Tr6) و شاهد (آبیاری شده با آب مقطر) در قفس‌های هم‌اندازه به فاصله مساوی از هم قرار داده شده و ۵۰ عدد حشره بالغ یک‌روزه رهاسازی شدند. بعد از ۲۴ ساعت، تعداد حشرات بالغ پشت برگ شمارش شده و سپس حذف شدند. همچنین تخم‌های تولید شده شمارش شده و گلدان‌ها به توری‌های مجزا منتقل و تا

1- Folin ciocalteu
2- Free choice

پایان دوره رشدی پوره‌ها نگه‌داری شدند. از آنجاکه پوره سن یک متحرک و قادر به تغذیه از نقاط مختلف پشت برگ بوده و بقیه مراحل پورگی ثابت هستند، از مراحل رشدی، پوره سن یک و چهار (آخرین سن پورگی) انتخاب شده و تعداد آن‌ها شمارش و ثبت شد. آزمایش در ۵ تکرار (۵ قفس) انجام شد.

آزمون بدون انتخاب[1]

در این آزمایش، آفت به طور مستقیم به روی گیاه آلوده منتقل شده و تغذیه و تخم‌گذاری آن بررسی شد. برای این منظور داخل هر قفس، یک بوته‌ی تیمار (بعد از گذشت سه روز از آلودگی به *T. harzianum* Tr6) و یا یک بوته‌ی شاهد (آبیاری شده با آب مقطر) قرار داده شد و تعداد ۲۰ عدد حشره بالغ یک‌روزه رهاسازی و بعد از ۲۴ ساعت، تعداد بالغین پشت برگ شمارش و پس از آن حذف شد. تخم‌های تولید شده شمارش و ثبت شد. از آن‌جاکه در آزمایش قبل در هر قفس هم بوته سالم و هم بوته آلوده وجود داشت، بررسی میزان عسلک تولیدی توسط حشره که منحصرا از گیاه سالم و یا آلوده تغذیه کرده باشد، امکان پذیر نبود، برای همین در این آزمایش، در هر بوته ۳ برگ به طور تصادفی (بالا، وسط و پایین) انتخاب شدند، تعداد قطرات عسلک تولیدی توسط سفیدبالک در پشت برگ زیر استریومیکروسکوپ (Stemi SV6) مشاهده و ثبت شد. در طول آزمایش به‌منظور محاسبه قطرات عسلکی که به زمین می‌افتادند، روی خاک پای گیاه و همچنین زیر گلدان‌ها ورق آلومینیومی قرار داده شد. سپس گلدان‌ها برای تفریخ تخم‌ها به قفس های خود منتقل و تا پایان دوره رشدی پوره‌ها نگه‌داری شدند. در مراحل رشدی سن یک و چهار، تعداد پوره‌ها شمارش و ثبت شد. آزمایش در ۵ تکرار (۵ قفس گیاه تیمار، ۵ قفس گیاه شاهد) انجام شد. بنابراین در هر تکرار، ۵ مولفه شامل تعداد بالغین، تعداد تخم‌های گذاشته شده، تعداد قطرات عسلک و تعداد پوره‌های سن یک و چهار شمارش و ثبت شد.

تجزیه آماری

هر چهار آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. در سنجش فنول و بررسی اثر زمان در بروز مقاومت، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و میانگین آن‌ها با اسفاده ازآزمون توکی مقایسه شد. در آزمون انتخاب آزاد و بدون انتخاب نیز تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از روش *t*-test و به کمک نرم‌افزار SPSS صورت گرفت.

نتایج

سنجش میزان فنول

نتایج نشان داد بین تیمارها از نظر غلظت فنول در بافت برگی گیاه در زمان‌های مختلف بعد از تلقیح قارچ، تفاوت معناداری در سطح ۱ درصد وجود داشت. محتوای فنول کل در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بین ۰/۲۶۹ تا ۰/۳۵۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در نوسان بود؛ سطح فنل، نسبت به زمان صفر بعد از ۲۴ ساعت کاهش و در دو زمان ۷۲ و ۹۶ ساعت افزایش معناداری یافت. بنابراین در زمان‌های ۳ و ۴ روز بعد از تلقیح، بالاترین میزان فنول کل در گیاه تولید و ثبت شد. براین اساس، آزمایش‌های انتخاب آزاد و بدون انتخاب بر پایه ۳ روز آلودگی قبلی گیاه به تریکودرما انجام شد (F= 17.97, df = 4, P<0.001) (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین (±SE) غلظت فنول در زمان‌های مختلف پس از تلقیح با *T. harzianum* Tr6

Table 1. Mean phenolic (±SE) contents at different hours after *T. harzianum* Tr6 inoculation

Time (hour)	0	24	48	72	96
Concentration (mg/g)	0.3181±0.002ab	0.2896±0.002b	0.2696±0.006b	0.3323±0.001a	0.3503±0.003a

[a]Means with different letters were significantly different (Tukey P<0.001)

2- No choice

آزمون اثر زمان در بروز مقاومت

نتایج نشان داد بین تیمارها از نظر حضور افراد بالغ پشت برگ در زمان‌های مختلف بعد از تلقیح قارچ، تفاوت معناداری در سطح ۱ درصد وجود داشت. در گروه‌های ۶، ۸ و ۱۰ روز بعد از تلقیح، بیشترین تعداد افراد بالغ نسبت به زمان صفر دیده شد و کمترین تعداد مربوط به گروه‌های ۲ و ۴ روز بعد از تلقیح بود (F= 7.94, df = 5, P<0.001) (جدول ۲).

آزمون انتخاب آزاد

با وجود حق انتخاب سفیدبالک در این آزمایش، کاهش معناداری در بالغین پشت برگ(n=5, t=4.57, P= 0.0018)، تعداد تخم گذاشته‌شده (n=5, t=2.79, P =0.0234)، پوره‌های سن اول (n=5, t=2.9, P = 0.0198) و پوره‌های سن چهارم (n=5, t=2.62, P = 0.0307) در گیاهان تلقیح شده با قارچ نسبت به شاهد در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۳).

آزمون بدون انتخاب

کاهش معناداری در میانگین بالغین پشت برگ (n=5, t=3.95, P = 0.0042)، تخم‌ها (n=5, t=3.36, P=0.01)، پوره‌های سن یک (n=5, t=3.43, P=0.0089)، پوره‌های سن چهار (n=5, t=3.82, P=0.0051) و نیز قطرات عسلک تولیدشده (n=5, t=9.07, P< 0.001) در گیاهان تلقیح شده با قارچ در قفس‌های مجزا نسبت به شاهد در سطح ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۴).

بحث

القای مقاومت در گیاهان می‌تواند مناسب بودن گیاه برای گیاه‌خوار را به وسیله برهم‌کنش‌هایی به واسطه گیاه تغییر داده و با صرف کم‌ترین هزینه برای گیاه باعث بروز سریع پاسخ‌های دفاعی شود و بر عملکرد تولیدمثلی و ترجیح میزبانی گیاه‌خوار اثر بگذارد که این تأثیر می‌تواند مثبت، منفی و یا خنثی باشد (Walling, 2008; Khalidet al., 2015). در پژوهش حاضر، میزان فنول کل با حضور تریکودرما در خاک پای ریشه گوجه فرنگی در بازه‌ی زمانی کوتاه‌مدت سه تا چهار روز افزایش یافت که با یافته‌ی قبلی در مورد این استرین روی خیار نیز هم-خوانی داشت (Alizadeh et al., 2013).

جدول ۲- میانگین (±SE) تعداد بالغین سفیدبالک روی گیاهان القا شده با *T. harzianum* Tr6 در روزهای مختلف پس از تلقیح

Table 2. Mean number (±SE) adults of *T. vaporariorum* in plants inoculated by *T. harzianum* Tr6 at different days after inoculation

Time (day)	0	2	4	6	8	10
Treatment	7.6±1.43ab	2.2±0.86b	2.0±0.63b	11.0±1.01a	9.8 ±2.45a	12.4±1.34a

[a]Means with different letters were significantly different (Tukey P<0.001)

جدول ۳- میانگین تعداد بالغین، تخم و پوره‌های سفیدبالک، ۲۴ ساعت بعد از رهاسازی روی گیاهان تلقیح شده با *T. harzianum* Tr6 و شاهد

Table 3. Mean number of adults, eggs and nymphs of *T. vaporariorum*, in plants inoculated by *T. harzianum* Tr6 with control after 24 hours

Stage	df	control	Treatment	t Value	Pr > |t|
Adult	8	18± 1.97a	7± 0.84b	4.57	0.0018
Egg	8	25.2± 2.91a	14.6± 1.73b	2.79	0.0234
1st instar	8	24.8± 2.84a	14± 1.72b	2.9	0.0198
4th instar	8	23.8± 3.11a	12.6± 2.21b	2.62	0.0307

Means with different letters within each row were significantly different (t-test P<0.05)

1st instar = The first stage of nymph, 4th instar = The fourth stage of nymph

جدول ٤- میانگین تعداد بالغین، تخم، پوره و عسلک سفیدبالک، ٢٤ ساعت بعد از رهاسازی روی گیاهان القا شده با *T. harzianum* Tr6 و شاهد

Table 4. mean number of adults, eggs, nymphs and honeydew of *T. vaporariorum* in plants inoculated by *T. harzianum* Tr6 with control, after 24 hours

Stage	df	control	Treatment	*t* Value	Pr > |t|
Adult	8	11.2± 1.63a	3.4± 0.66b	3.95	0.0042
Egg	8	17.8± 2.32a	7.4± 1.51b	3.36	0.01
1st instar	8	17.6± 2.32a	6.8± 1.58b	3.43	0.0089
4th instar	8	16± 1.97a	5.8± 1.33b	3.82	0.0051
Honeydew	8	4.8± 0.71a	1± 0.28b	9.07	<0.001

*Means with different letters within each row were significantly different (*t*-test $P<0.01$)
1st instar = The first stage of nymph, 4th instar = The fourth stage of nymph

پژوهش‌های بسیاری نشان داده است که میزان غلظت ترکیبات فنولی در ارتباط با میزان بافت آسیب‌دیده توسط تغذیه حشره یا آلودگی به پاتوژن‌ها والقای مقاوت در گیاه است (Baldwin and Schultz, 1983; Felton et al., 1999; Rani and Yasur, 2009). این ترکیبات به‌عنوان پیش‌ماده آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و همچنین نقش دورکنندگی برای حشرات داشته و می‌توانند مانع از تغذیه، رشد و زنده‌مانی حشرات گیاه‌خوار شوند و تجمع این ترکیبات در بخش‌های خاصی از گیاه به‌صورت سد تغذیه‌ای عمل می‌کند(Abdul, 2015). برای ایجاد پاسخ القایی در گیاهان به یک حداقل میزان آسیب به گیاه نیاز است که در مورد بیشتر مواد فرار ترپنوئیدی در زمان‌های ۷۲ تا ۹۶ ساعت محقق می‌شود (Walling, 2008; Menjivar and Cabrera, 2012). در پژوهش فعلی در بازه‌ی زمانی دو تا چهار روز، استقرار سفیدبالک روی گیاه کاهش یافت که دلالت بر بالا رفتن مقاومت در گیاه توسط قارچ و افزایش فعالیت دفاعی میزبان در برابر سفیدبالک داشت. در آزمایش گلخانه‌ای مشابه نیز ۴۸ ساعت بعد از تلقیح ریشه گیاه با استرین‌های *T. atroviride*، کاهش معناداری در جمعیت شته پنبه، شته سبز هلو و سفیدبالک در مقایسه با شاهد مشاهده شده است (Barahona, 2010). این تأخیر زمانی کوتاه‌مدت در بررسی اثر گیاه‌خواری روی گیاه‌خواران دیگر به واسطه میزبان نیز مشهود است؛ به‌طور مثال برای ایجاد آسیب اولیه توسط یک گیاه‌خوار، حشرات بالغ سفیدبالک روی برگ گیاه خیار استقرار یافتند و هفت روز بعد از حذف آن‌ها، کنه‌های ماده بالغ تارتن روی برگ‌های تحت تیمار قرار داده شدند که کمترین تعداد نتاج و دوره رشد و نمو پیش از بلوغ در کنه‌ها مشاهده شد (Nazeri and Allahyari, 2017). از سوی دیگر، در پژوهش حاضر، تلقیح قارچ به گیاه، باعث کاهش ترجیح میزبانی، تخم‌گذاری و نیز میزان تولید عسلک پشت برگ گیاه شد که هم‌راستا با نتایج مطالعاتی از این دست می‌باشد؛ به‌طور مثال تلقیح گیاه گوجه فرنگی توسط دو استرین قارچ اندوفیت *Fusarium oxysporum* 162 و *Trichoderma atroviride* MT-20 باعث کاهش جمعیت سفیدبالک گلخانه شد (Menjivar and Cabrera, 2012). در بررسی روی شته سیب‌زمینی *Macrosiphum euphorbia* نیز القای مقاومت با استفاده از استرین *T. harzianum* T22، با بیوسنتز ترپنوئیدها و فعال کردن مسیر سالیسیلیک اسید همراه بوده و منجر به کاهش تغذیه، تولیدمثل شته و همچنین افزایش تولید ترکیبات فرار طبیعی[1] (VOCs) در جلب دشمن طبیعی شته سیب‌زمینی، *Aphidius ervi* Haliday، به سمت گیاه شده است (Coppola and Cascone, 2017). با توجه به تعداد نسل و میزان باروری بالا در سفیدبالک‌ها مهم‌ترین عامل در کنترل جمعیت آن، کاهش نرخ تولیدمثل است. برای حشراتی مانند سفیدبالک که

1- Volatile Organic Compounds

پوره‌های غیرمتحرک دارند، گیاه منتخب برای تخم‌گذاری، یک اصل بسیار مهم است. روی یک میزبان خوب، نسل بعدی ادامه خواهد یافت و روی یک میزبان ضعیف، نوعی مقاومت آنتی‌بیوزی رخ داده و نسل بعدی کاهش می‌یابد. تغذیه نامناسب اگرچه بلافاصله منجر به از بین رفتن حشره نمی‌شود اما باعث افزایش طول دوره پورگی، کاهش طول عمر ماده‌ها و در نتیجه کاهش تخم‌گذاری آن‌ها خواهد شد (Legrand and Barbosa, 2000). چرخه زندگی طولانی و تغذیه بلند مدت پوره‌ها از استراتژی‌های تغذیه‌ای حشره به منظور پرهیز یا بازداشتن رفتارهای دفاعی حشره در مقابل گیاه و تضمین بقای نسل آن است (Walling, 2008). یافته‌های قبلی نشان داد که قارچ تریکودرما می‌تواند سبب تحولات فیزیولوژیکی در گیاه شده، مکانیسم‌های دفاعی را در میزبان القا کند و گیاه را در برابر حمله حشره آماده‌تر کند (Harman et al., 2004; Hohman et al., 2012; Copolla and Cascone, 2017). نکته‌ی قابل اهمیت آن است که حشرات مکنده مانند شته‌ها و سفیدبالک‌ها استایلت انعطاف‌پذیر خود را بین سلول‌ها وارد می‌کنند و پاسخ گیاه به آسیب آن‌ها به عکس العمل گیاه به بیماری‌های گیاهی تا پاسخ به گیاه‌خواری حشرات با قطعات دهانی جونده بسیار شبیه‌تر است (Rostas et al., 2003, Felton et al., 1999; Menjivar and Cabrera, 2012). همچنان‌که سفیدبالک‌ها مسیر دفاعی سالسیلیک‌اسید را فعال و مسیر جاسمونیک‌اسید را سرکوب می‌کنند (Rostas et al., 2003;Menjivar and Cabrera, 2012; Khalid et al., 2015). درصورتی‌که فعال شدن مسیر سالسیلیک‌اسید بیشتر در مورد بیمارگرهای گیاهی، قارچ‌های مایکوریزا و قارچ‌های خاک‌زی از جمله تریکودرما دیده شده است (Shores,2005; Hermosa et al., 2012; Hohmann et al., 2012; Alizadeh et al., 2013). بنابراین با توجه به این‌که تغذیه حشرات مکنده از گیاه و استقرار و تکثیر قارچ در ریشه گیاه هر دو از یک مسیر مشابه (مسیر سالسیلیک‌اسید)، منجر به القای مقاومت در گیاه می‌شوند، کاربرد تریکودرما در خاک پای ریشه گیاه می‌تواند اثر هم‌افزایی در فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه در برابر حمله سفیدبالک داشته باشد. در تحقیق حاضر، با توجه به کاهش ترجیح و تخم‌گذاری سفیدبالک گلخانه در پی کاربرد قارچ تریکودرما در گیاه می‌توان استنباط کرد که حضور آن در جلوگیری از افزایش طغیانی این آفت چند نسلی در گلخانه موثر خواهد بود. به‌طور کلی القای مقاومت درگیاه هیچ‌گونه اثر منفی بر محیط زیست و سلامت انسان ندارد و در محیط بسته گلخانه نسبت به شرایط مزرعه راحت‌تر می‌توان از آن در تلفیق با دیگر روش‌های حفاظت گیاه به‌منظور کاهش جمعیت حشرات استفاده نمود. البته چنانچه عامل بیرونی القاکننده دیگری نظیر یک میکروارگانیسم یا ترکیبات شیمیایی یا یک گیاه‌خوار ثانویه به محیط اضافه گردد، بایستی برهمکنش متقابل عوامل القای مقاومت نیز در استراتژی‌های هم‌افزایی کنترل زیستی در نظر گرفته شود. در نهایت، مطالعات بیشتری به منظور پژوهش‌های تکمیلی جهت بررسی تعیین مناسب‌ترین روش کاربرد این استرین در سطح وسیع در تلفیق با سایر عوامل کنترلی پیشنهاد می‌شود.

سپاس‌گزاری

از حمایت‌های مالی و امکانات فراهم شده توسط دانشگاه تهران جهت اجرای این پژوهش تشکر و قدرانی می‌شود.

REFERENCES

Abdul, R. W., Barkat, H. and H. C. Sharma. 2015. Induced resistance in groundnut by jasmonic acid and salicylic acid through alteration of trichom density and oviposition by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Aob Plants, 5: 1–9.

Ainsworth, E. A., and Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature protocols, 2(4): 875–877.

Alizadeh, H., Behboudi, K., Nikkhah, M. J., Zamioudis, C., Pieterse, C. M. J., and Bakker, P. A. H. M. 2013. Induced systemic resistance in cucumber and Arabidopsis thaliana by the combination of *Trichoderma harzianum Tr6* and *Pseudomonas* sp. Ps1. Biological Control, 65: 14–23.

Bagheri, S., Kocheily, F., Mosadegh, M. S., and Shishehbor, P. 2012. Investigation on population changes of jasmine whitefly *Aleuroclava jasmini* (Takahashi) (Homo: Aleyrodidae) in citrus orchards of Dezful city. 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, p. 666.

Baldwin, I. T., and Schultz J. C. 1983. Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. Science, 221: 277–279.

Barahona, R. 2010. The systemic activity of mutualistic endophytic fungi in Solanaceae and Cucurbitaceae plants on the behaviour of the phloem-feeding insects *Trialeurodes vaporariorum, Aphis gossypii* and *Myzus persicae*. Friont Cover, 120 pp.

Coppola, M., and Cascone, P. 2017. *Trichoderma harzianum* enhances tomato indirect defense against aphids. Plant-Insect-Microbiology Interactions, 24(6): 1025–1033.

Felton, G. W., Korth, K. L., Bi, J. L., Wesley, S. V., Huhman, D. V., Mathews, M. C., and Murphy, J. B. 1999. Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. Current Biology, 9: 317–320.

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

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158: 17–25.

Hohmann, P., Jones, E. E., Hill, R. A., and Stewart, A. 2012. Ecological studies of the bio-inoculant *Trichoderma hamatum* LU592 in the root system of *Pinus radiata*. FEMS Microbiol Ecology, 80, 709–721.

Khalid, A. S., Mohamad Roof, M. N., Rebecca, H. H., and Idris, A. B. 2015. Aphid-induced defences in chilli affect preferences of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Scientific Reports, 5(13): 1–9.

Kuc, J. 1985. ‘Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques’, In: Forest Potentials, Productivity and Value, Weyerhauser Science Symp. 4 (Eds. R. Ballard *et al.*) Weyerhauser Co. Press, p. 147–190.

Legrand, A., and Barbosa P. 2000. Pea aphid (Hom: Aphididae) fecundity, rate of increase and within plant distribution unaffected by plant morphology. Environmental Entomology, 29: 978–993.

Martinuz, A. 2012. Effectiveness of systemic resistance toward *Aphis gossypii* (Hom., Aphididae) as induced by combined applications of the endophytes *Fusarium oxysporum* Fo162 and *Rhizobium etli* G12. Biocontrol, 62(3): 206–212.

McLean, K. L., Hunt J. S., Stewart, A., Wite, D., Porter, I. J., and Villalta, O. 2012. Compatibility of a *Trichoderma atroviride* biocontrol agent with management practices of Allium crops. Crop Protection, 33: 94–100.

Menjivar, R. D., and Cabrera, J. A. 2012. Induction of metabolite organic compounds by mutualistic endophytic fungi to reduce the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) infection on tomato. Plant and Soil, 352(2): 233–241.

Nazeri, M., and Allahyari, H. 2017. Survey on the effect on pest injury on induced resistance. Ph D. Thesis. University of Tehran (In Farsi with English summary).

Perring, T. M., Stansly, P. A., Liu, T. X., Smith. H. A., and Andreason, S. A. 2018 Sustainable management of arthropod pests of tomato. In: *Whiteflies:* Biology, Ecology and Management, p. 73–110.

Rani, P. U., and Yasur, J. 2009. Physiological changes in groundnut plants induced by pathogenic infection of *Cercosporidium personatun* Deighton. Allelopathy Journal, 23(2): 369–378.

Rodriguez -Gonzalez, A., Pedro, A., Casquero, R., Cardoza, E., and Santiago, G. 2019. Effect of trichodiene synthase encoding gene expression in *Trichoderma* strains on their effectiveness in the control of *Acanthoscelides obtectus*. Journal of Stored Products Research, 83: 275–280.

Rostas, M., Simon, M., and Hilker, M. 2003. Ecological cross-effects of induced plant responses towards herbivores and phytopathogenic fungi. Basic Applied Ecology, 4: 43–62.

Shores, M. 2005. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum T203*. Phytopathology, 95(1): 76–84.

Shores, M., and Harman, G. E. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum T22* inoculation of the root: a proteomic approach. Plant Physiology, 147: 2147–2163.

Walling, L. 2008. Avoiding Effective Defences: Strategies Employed by Phloem-Feeding Insects. Plant Physiology, 146: 859–866.

Van der Linden, A., and van der Staaij, M. 2001. Banker plants facilitate biological control of whiteflies in cucumber. Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology, Netherlands Entomological Society, p. 75–80.

Van Lenteren, J. C. 1992. The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera, Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera, Aleyrodidae). Applied Entomology, 114(5): 392–399.

Wu, J., and Baldwin, I. T. 2010. New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. Annual Review of Genetics, 44: 1–24.

© 2021 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

44(3), Autumn, 2021

doi 10.22055/ppr.2021.17128

Effect of *Trichoderma harzianum* Tr6 in inducing resistance in tomato against *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyodidae)

M. Aldaghi[1], H. Allahyari[2*], V. Hosseininaveh[2] and K. Behboudi[3]

1. Ph.D. student, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. ***Corresponding Author:** Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran (allahyar@ut.ac.ir).
3. Associate professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Received: 30 May 2021 Accepted: 31 August 2021

Abstract

Background and Objectives

The greenhouse whiteflies, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), are one of the major pests of vegetable and ornamental crops in greenhouses in the world. They damage crops through direct feeding, inserting their stylet into leaf veins, and extracting nourishment from the phloem sap. As a by-product of feeding, honeydew is excreted, which is an indirect but yet another substantial source of damage. The third most harmful characteristic is the ability of adults to transmit various plant viruses. Induced resistance is a non-chemical control method that has no negative impact on the environment and human health and can be a desirable approach in plant protection and pest control. *Trichoderma* spp. has spread in many ecosystems and its various species such as *Trichoderma harzianum* Rifai have been successful as non-pathogenic symbionts in controlling plant pathogens via different mechanisms. Some of these mechanisms include enzymatic degradation, secretion of antibiotics, and increasing root absorption capacity. Recent findings suggest that *T. harzianum* is also a potent inducer of Induced Systemic Resistance (ISR) and can stimulate the immune system in plants against plant diseases and pests. In this study, the efficacy of *T. harzianum* Tr6 was investigated on host preference and egg production of *T. vaporariorum.*

Material and Methods

To evaluate the effect of *T. harzianum* Tr6, four tests were carried out: 1) Total phenol assay using Folin–Ciocalteu reagent, 2) The effect of time on induced resistance, 3) Free choice, and 4) Non choice. These tests were conducted on tomato plants (Falat cultivar) at 25±2°C, relative humidity of 60-70%, and a photoperiod of 8 h/16 h (day/night). Also, these

experiments were performed on one-day-old adults in plots with four or six leaves in shelves equipped with organza mesh.

Results

According to the phenol assay, the highest amount of total plant phenol was observed three and four days after inoculation by Tr6 strain respectively 0.3503±0.001 and 0.3323±0.001mg/g. Therefore, for the next three tests, plants that were inoculated after three days were used as treated samples, and plants watered with distilled water were used as control ones. In these experiments, the lowest number of adults on the back of the leaves after 24 hours was observed two and four days upon inoculation respectively 2.2 ± 0.86 and 2.0 ± 0.63. On the other hand, plants inoculated by Tr6 displayed a significant decrease in adults on the back of the leaves (3.4± 0.66), egg-laying (7.4± 1.51), and honeydew droplets (1± 0.28) compared to control plants.

Conclusion

The most important factor in controlling the whitefly population is reducing the reproduction rate. Induced resistance can repel insects from plants and limit their nutrition, and thus, reduce their reproduction. This study implied that the inoculation of tomato by *T. harzianum* Tr6 strain could induce resistance to whitefly and reduce host preference and egg production, as well as honeydew secretion. Therefore, this strain can be a promising option in preventing the outbreak of this multi-generational pest.

Keywords: ***Trichoderma, Antagonist, Host preference, Total phenol***

Associate editor: J. Razmjou (Prof.)

Citation: Aldaghi, M., Allahyari, Hosseininaveh, H., & Behboudi, K. (2021). Effect of *Trichoderma harzianum* Tr6 in inducing resistance in tomato against *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyodidae). Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 44(3): 107-117. https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17128.