# بررسی تأثیر خاک کاربرد ترکیبات زیستی قارچ تریکودرما در کنترل نماتد ریشه‌گرهی پسته (*Meloidogyne javanica*)

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

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

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

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

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

## چکیده

نماتد ریشه گرهی با ایجاد *اختلال در سیستم* جذب آب و مواد غذایی ریشه، ضعف و کاهش رشد گیاه باعث خسارت زیادی به محصولات کشاورزی در دنیا می‌شود. کنترل نماتد با استفاده از عوامل بیوکنترل به‌تنهایی یا با تلفیق دیگر روش‌های مدیریتی، می‌تواند یک گام مؤثر دررسیدن به کشاورزی پایدار و سالم باشد. در این پژوهش پتانسیل ترکیبات زیستی تریکودرما به‌صورت خاک کاربرد در کنترل نماتد ریشه گرهی روی دانهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرندی بررسی شد. از تیمارهای عصاره خام و سوسپانسیون اسپور تریکودرما، به همراه ترکیبات تجاریISR2000 و نماتدکش نماتوزین استفاده شد. آزمایش گلخانه‌ای بر اساس طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار انجام و پس از گذشت ۹۰ روز شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ارزیابی شد. نتایج نشان داد که شاخص‌های بیماری‌زایی نماتدی، تعداد گال، تعداد کیسه تخم، تعداد لارو سن دوم و فاکتور تولیدمثل، در دان هال‌های تیمار شده با عوامل بیوکنترل نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. تیمار سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره *Trichoderma harzianum* (جدایه T127-12) و نماتدکش نماتوزین، کمترین میزان آلودگی گال، به ترتیب برابر با ۲۴/۵۶ و ۲۹/۵۷ درصد داشتند و میزان آلودگی کیسه تخم، برابر با ۱۹/۱۰ و ۲۶/۸۸ درصد می‌باشد. همچنین تعداد لارو سن دوم در تیمار سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره جدایه T127-12 و ترکیب تجاریISR2000 به ترتیب برابر با ۷۵/۱۶ و ۴۰/۴۷ درصد، در مقایسه با تیمار نماتد کاهش نشان دادند. از بین تیمارهای استفاده‌شده، سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره، جدایه T127-12 با کاهش تکثیر نماتد به میزان ۶۲/۴۹ درصد بیشترین اثر کنترلی در بین تیمارها نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** پسته، تریکودرما، مهار زیستی، نماتد ریشه‌گرهی

## مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) گیاهی نیمه گرمسیری و از مهم‌ترین محصولات کشاورزی و صادراتی ایران است. بر اساس آمار FAO در سال ۲۰۱۹ ایران با ۴۱۱۴۳۲ هکتار زمین زیر کشت پسته و تولید ۳۳۷۸۱۵ تن محصول پسته بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته در جهان است که حدود ۸۰ درصد سطح زیر کشت و تولید آن مربوط به استان کرمان می‌باشد. نمادهای انگل گیاهی محدودیت‌های عمده‌ای برای تولید محصولات کشاورزی در سراسر جهان به وجود آورده‌اند. در ایران، *M. incognita* و *M. javanica* عمده‌ترین گونه‌های خسارت زا هستند که در باغ‌های پسته یافت می‌شوند (Ebadi *et al*. 2018) . نماتد ریشه گرهی علاوه بر خسارت مستقیم به ریشه‌های گیاه و تشکیل حوضچه تغذیه‌ای با ایجاد زخم زمینه ورود سایر بیمارگرهای قارچی و باکتریایی را فراهم می‌آورد. گیاهان آلوده دارای رشد کم، کلروز (زردی)، پژمردگی در طول روز و ایجاد تورم یا گره‌های مشخص روی سطح ریشه می‌باشند (Bawa *et al*., 2020). در سال‌های اخیر گونه‌های *Trichoderma* spp. به‌عنوان عوامل کنترل زیستی برای کنترل عوامل مختلف بیماری‌زایی گیاهی استفاده‌شده است. این قارچ می‌تواند متابولیت های ثانویه (فرار و غیر فرار) و آنزیم‌های هیدرولیتیک (کیتینازها و پروتئاز) تولید کنند که به کوتیکول نماتدها خسارت میزند. علاوه بر این، هیف‌های آنها می‌توانند یک‌لایه محافظتی فیزیکی و شیمیایی روی ریشه‌ها ایجاد کرده و از خسارت نماتد جلوگیری کنند (Harman *et al*., 2004). هدف این پژوهش بررسی پتانسیل استفاده از ترکیبات زیستی تریکودرما در کنترل نماتد ریشه گرهی به شیوه خاک کاربرد و معرفی بهترین سویه در مدیریت تلفیقی این نماتد می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

نماتد ریشه گرهی از ریشه‌های آلوده درختان پسته جداسازی و سپس خالص‌سازی و تکثیر نماتد روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپر چف انجام شد. بدین منظور بذرهای گوجه‌فرنگی بعد از ضدعفونی درون سینی نشاء کشت شدند. گیاهچه ها در مرحله ۴ تا ۵ برگی به گلدان منتقل شدند. برای رسیدن به یک جمعیت خالص، یک کیسه تخم درکنار ریشه گیاه گوجه‌فرنگی قرار داده شد. پس از گذشت ۴۵ روز جمعیت خالص به دست آمد و برای تکثیر جمعیت خالص، مراحل فوق روی گیاهچه های گوجه تکرار شد. 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 مورداستفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ‌شناسی بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان تهیه شدند. این جدایه‌های 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. جدایه های موردنظر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند، پس از گذشت ۷–۱۰ روز، اسپورهای سطح پتری جمع‌آوری و شمارش اسپورها با لام هموسایتومتر صورت گرفت و درنهایت غلظت میزان اسپور جهت مایه‌زنی گلدان‌ها به میزان $۲\times۱۰^{۷}$ CFU زاد مایه در هر کیلوگرم خاک تعیین شد. برای تیمار شاهد، از آب مقطر با مقدار مساوی استفاده شد. برای تهیه عصاره خام تریکودرما، ۴–۵ قرص میسلیومی قارچ از کشت‌های هفت‌روزه به ارلن حاوی محیط کشت PDB اضافه شد. سپس عصاره خام قارچی از فیلتر عبور داده شد (Grinyer *et al*., 2005).

گلدان‌ها از خاک و ماسه استریل به نسبت ۱:۲ پر شدند. بعد از گذشت دو هفته از تیمار سوسپانسیون اسپور تریکودرما، در مرحله ۶–۸ برگی دانهال‌های پسته گلدان‌ها با تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دوم به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها به مدت ۹۰ روز در شرایط گلخانه با دمای۲۰ تا۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و آبیاری منظم انجام شد. استفاده از ترکیبات زیستی بعد از مایه‌زنی با نماتد طی سه مرحله بافاصله ۱۵ روز و ترکیب تجاری ISR2000 بافاصله ۱۰ روز یک‌بار و نماتدکش نماتوزین (۲ میلی‌لیتر در هر مترمربع) یک‌بار در طول آزمایش استفاده شدند. برای ارزیابی پتانسیل تیمارها در کنترل نماتد، شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد شامل تعداد گال، کیسه تخم در گرم ریشه، تراکم جمعیت لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک و جمعیت نهایی (PF)، فاکتور تولیدمثل (RF)، اندازه‌گیری و درنهایت درصد کنترل (NC) و تکثیر (Mr) محاسبه شد (Oostenbrink, 1966).

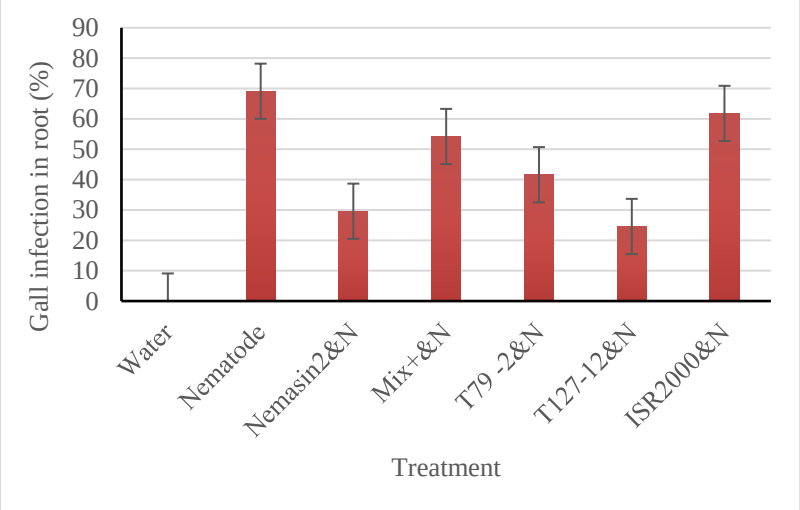
## نتایج و بحث

نتایج آنالیز آماری و بررسی مقایسه میانگین اثر ترکیبات زیستی تریکودرما روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد بعد از تیمار سه‌ماهه دان هال‌های پسته نشان داد که تیمارهای مختلف تریکودرما تفاوت معنی‌داری روی فاکتورهای جمعیتی نماتد داشتند (جدول ۱). جدایه های مورداستفاده دارای تأثیرهای متفاوتی در کاهش میزان آلودگی و شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی در مقایسه با تیمار نماتد شاهدی نشان دادند. (جدول ۱).

**جدول ۱- تأثیر تیمارهای مختلف در کاهش آلودگی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* و شاخص‌های جمعیتی نماتد روی دانهال‌های پسته.**

| تیمار | شاخص گال به حجم ریشه (٪) | شاخص کیسه تخم به حجم ریشه (٪) | کاهش لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک (٪)(J2) | جمعیت نهایی نماتد (PF) | شاخص تولیدمثل (RF) | تکثیر (٪) (Mr) | کنترل (٪) (NC) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Water | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| Nematode | 69.09 | 61.82 | 0 | 9161 | 4.58 | 100 | 0 |
| Nematosin2&N | 29.58 | 26.88 | 22.69 | 5019 | 2.51 | 54.79 | 45.21 |
| Mix+ &N | 54.19 | 41.87 | 17.13 | 7897 | 3.95 | 86.21 | 13.79 |
| T79-2 &N | 41.6 | 32 | 26.76 | 4841 | 2.42 | 52.85 | 13.79 |
| T127-12 &N | 24.56 | 19.1 | 75.16 | 3436 | 1.72 | 37.51 | 62.49 |
| ISR 2000&N | 61.79 | 48.55 | 40.47 | 2995 | 1.50 | 32.70 | 67.30 |

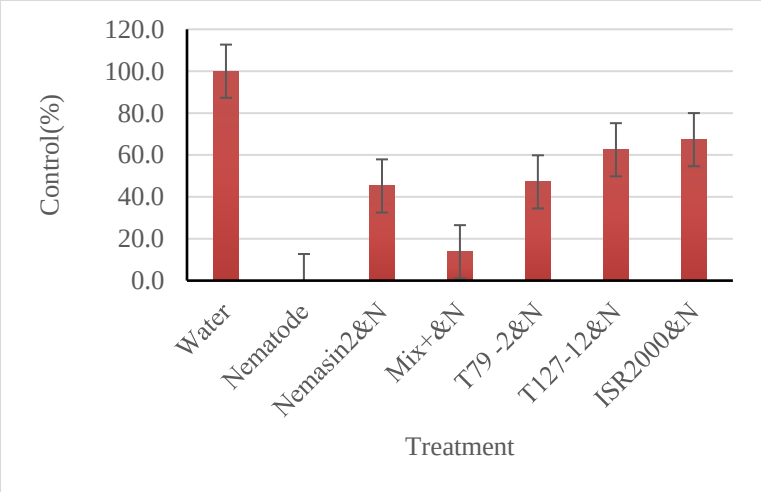
در ارزیابی شاخص گال ریشه و همچنین شاخص کیسه تخم، نتایج نشان داد که بوته‌های آلوده تیمار شده با ترکیب زیستی سوسپانسیون اسپور تریکودرما همراه با عصاره، جدایه T127-12 و ترکیب شیمیایی نماتوزین، کمترین میزان آلودگی دارند و بیشترین آلودگی در تیمار نماتد مشاهده شد که نشان از کنترل موفق این عامل آنتاگونیستی دارد (شکل ۱ و جدول ۱). در شاخص تعداد لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک، تیمار سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره تریکودرما جدایه T127-12 و ترکیب تجاری ISR2000 به ترتیب با ۷۵/۶۴ و ۴۱/۰۲ درصد، بیشترین کاهش تعداد لارو سن دوم در مقایسه با تیمار نماتد نشان داد. قارچ تریکودرما به دلیل داشتن توانایی بالا در تولید انواع ترکیبات هیدرولیتیکی کیتینازی و پروتئازی لیز کننده روی لارو سن دوم و تخم نماتد و همچنین فعال‌کننده فاکتورهای القاء کننده مقاومت در گیاه موجب جلوگیری از ایجاد خسارت می‌شود. مطالعات فن و همکاران (۲۰۲۰) نشان می‌دهد که *T. citrinoviride* Snef1910 بیماری ریشه‌گرهی ناشی از *M. incognita* را به‌طور مؤثری کنترل می‌کند و باعث افزایش درصد کاهش گال و کیسه تخم درگاه میزبان می‌شود. صاحبانی و هادوی (۲۰۰۸) نشان دادند که گونه *T. harzianum* BI اثر مستقیم و غیرمستقیم روی تخم و لارو نماتد دارد (Sahebani and Hadavi, 2008). در پژوهشی، گزارش‌شده که دو گونه *T. harzianum* و *T. viride*. به‌طور قابل‌توجهی گال‌های ریشه و تولید تخم و لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* را در خاک کاهش می‌دهند (Al-Hazmi and Tariq, 2015).



شکل ۱- درصد شاخص گال نسبت به حجم ریشه در دانهال‌های پسته

جمعیت نهایی نماتد در هر گلدان برای تیمار نماتد نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. در بین تیمارهای مورداستفاده، تیمار سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره، جدایه T127-12 و ترکیب تجاری ISR2000 دارای جمعیت پایینی می‌باشند. این دو ترکیب زیستی احتمالاً علاوه براثر مستقیم روی کیسه تخم و لارو سن دوم توانایی ایجاد مقاومت القایی در گیاه و تحمل گیاه را نسبت به بیمارگر افزایش می‌دهند. در ارزیابی فاکتور تولیدمثل، بالاترین میزان تولیدمثل در نهال‌های نماتدی و کمترین میزان در دو تیمار سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره، جدایه T127-12 و ترکیب تجاری ISR2000 مشاهده شد (جدول ۱).

با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* جدایه T127-12 به‌عنوان یکی از موفق‌ترین عوامل کنترلی نماتد ریشه گرهی معرفی می‌گردد که با بیشترین کاهش تکثیر نماتد، بالاترین درصد کنترل‌کنندگی نماتد را روی نهال‌های آلوده نشان داد (شکل۲) و با توجه به خطرات زیست‌محیطی و هزینه بالای نماتدکش‌های شیمیایی استفاده از این ترکیب زیستی در مدیریت تلفیقی نماتد ریشه گرهی توصیه می‌گردد.




**شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف در کنترل نماتد ریشه گرهی در نهال‌های آلوده پسته**

## منابع


Al-Hazmi, A.S. and Tariq-Javeed, M., 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. Saudi Journal of Biological Sciences, 23(2), pp.288-292.

Bawa, N., Kaur, S. and Dhillon, N.K., 2020. Efficacy of *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma harzianum* and *T. viride* bio-formulations against *Meloidogyne incognita*. Indian Phytopathology, 73(4), pp.799-804.

Ebadi, M., Fatemy, S. and Riahi, H., 2018. Biocontrol potential of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolates against *Meloidogyne javanica* on pistachio. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28(1), pp.1-6.

Fan, H., Yao, M., Wang, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Duan, Y. and Chen, L., 2020. Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Snef1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. BMC Microbiology, 20(1), pp.1-11.

Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B.R. and Nevalainen, H., 2005. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. Current Genetics, 47(6), pp.381-388.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2(1), pp.43-56.

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

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

Oostenbrink, M., 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Major characteristics of the relation between nematodes and plants, (66-4).

Sahebani, N. and Hadavi, N., 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry, 40(8), pp.2016-2020.

# Potential of soil set application of Trichoderma biocompounds on biocontrol of pistachio 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*

**Abstrac**

Root-knot nematode causes great damage to agricultural products in the world by disruption of water and root nutrition absorbance as well as weakness and reduced plant growth. Nematode control using biocontrol agents alone or in combination with other management methods can be an effective step in achieving sustainable and healthy agriculture. In this study, the potential of *Trichoderma* biological compounds as soil application in the control of root knot nematode on pistachio seedlings of Badami Riz Zarandi cultivar was investigated. Crude extract and *Trichoderma* spore suspension were used, along with ISR2000 and Nematosine as commercial compounds. Greenhouse experiments were performed based on a completely randomized design with 6 replications and after 90 days, nematode pathogenicity factors were evaluated. The results showed that pathogenicity factors, number of galls, number of egg mass, number of second juveniles (J2) and reproductive factor were significantly different in seedlings treated with biocontrol agents compared to the control. Application of spore suspension with Crude extract of *Trichoderma harzianum* (isolate T127-12) and Nematosine compound had the lowest gall infection ratio of 24.56 and 29.57%, respectively and the egg mass infection was 19.10 and 26.88%, respectively. Also, the number of second juveniles in ISR2000 compound and treatment spore suspension with Crude extract of T127-12 isolate decreased by 40.47 and 75.16%, respectively, compared to nematode treatment. Among the treatments used, spore suspension with Crude extract of T127-12 isolate showed the highest control effect among the treatments by reducing nematode proliferation by 62.49%.

***Keywords***: biological control, pistachios, root knot nematode, Trichoderma