

## مه‌ارزیستی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* توسط قارچ *Trichoderma harzianum* Iran2375c در خیار

مطهره السادات هاشمی، مجید اولیاء، عبدالحسین جمالی زواره

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

مسئول مکاتبات: مطهره السادات هاشمی، پست الکترونیک: Bita.hashemi5701@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۱۲

۹۱-۸۱(۲)۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۱۰

### چکیده

امروزه مه‌ارزیستی نماتدهای ریشه گرهی با هدف کاهش اثرات خطرناک سموم شیمیایی از جمله تهدید سلامت بشر و آلودگی محیط زیست یک اولویت به‌شمار می‌رود. یکی از عوامل مؤثر در مه‌ارزیستی، قارچ‌ها هستند. تحقیقات زیادی نشان‌دهنده عملکرد مؤثر *Trichoderma spp.* در کاهش خسارت و مه‌ار بیماری‌های مختلف بوده است. در مطالعات آزمایشگاهی این پژوهش تأثیر عصاره کشت قارچ *Trichoderma harzianum* Iran2375c بر مرگ و میر جوان مرحله دوم و تفریح تخم در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از غلظت‌های ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ عصاره کشت تعیین شد. در مطالعات گلخانه‌ای گیاهچه‌های چهار برگی، با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> اسپور در گرم مایه‌زنی شده و پس از گذشت ۱۰ روز از مایه‌زنی خاک گلدان‌ها به‌وسیله قارچ، تعداد ۳۰۰۰ تخم و جوان مرحله دوم نماتد *Meloidogyne incognita* به ازای هر کیلو خاک پای ریشه گیاهچه‌ها تلقیح شد. آزمایش در شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در ده تکرار انجام شد. دو ماه پس از تلقیح نماتد، شاخص‌های رشدی گیاه و شاخص‌های مربوط به نماتد اندازه‌گیری شد. در مطالعات آزمایشگاهی غلظت ۱:۱ مؤثرترین در مرگ و میر جوان مرحله دوم و تفریح تخم بود. با بررسی نتایج مطالعات گلخانه‌ای شاخص‌های رشدی تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار با شاهد بودند. طبق نتایج تجزیه واریانس تمام شاخص‌های مربوط به نماتد در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار با شاهد بودند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده پتانسیل این قارچ در مه‌ارزیستی این نماتد و همچنین بهبود عملکرد رشدی گیاه می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** کنترل بیولوژیک، قارچ آنتاگونیست، عصاره کشت، تریکودرما، گال ریشه

### مقدمه

تولید شده به ریشه ظاهری خشن و گرزمانند می‌دهد (Agrios, 2005). علایم اندام‌های هوایی مشابه علایم عوامل بیماری‌زای دیگر ریشه است که عبارتند از کاهش رشد اندام‌های هوایی و کاهش نسبت اندام‌های هوایی به ریشه؛ علایمی شبیه کمبود مواد غذایی در برگ، به خصوص کلروز؛ پژمردگی زودگذر در شرایط کمبود آب، یا در وسط روز که دما بالا می‌رود، تا زمانی که رطوبت خاک به حد کافی برسد؛ کاهش محصول. میزان این علایم اغلب به تعداد جوان‌هایی که به ریشه نفوذ می‌کنند و در ریشه گیاهان جوان مستقر می‌شوند، بستگی دارد. عوامل محیطی نیز بر میزان خسارت به گیاه اثر می‌گذارند. عواملی مثل خشکی یا دمای بالا که باعث ایجاد تنش در گیاه می‌شوند، میزان خسارت را افزایش می‌دهند. علایم ایجاد شده در اندام‌های

خیار یکی از محصولات کشاورزی می‌باشد که با توجه به نیاز کشور در تمام طول سال در گلخانه‌ها و یا مزارع تولید می‌شود. یکی از بیماری‌های مهم خیار، نماتد ریشه گرهی می‌باشد. نماتدهای ریشه گرهی از شایع‌ترین بیماری‌هایی هستند که در جهان تولید محصولات کشاورزی را کاهش می‌دهند. تقریباً همه گیاهانی که در جهان، به‌عنوان منبع غذایی به‌شمار می‌روند، نسبت به این نماتد حساس می‌باشند (Sasser & Carter, 1985). مشخص‌ترین نشانه‌های بیماری در قسمت‌های زیرزمینی گیاه به وجود می‌آید. روی ریشه‌های آلوده گال‌های گره‌مانندی ایجاد می‌شود. قطر این ریشه‌ها دو یا چند برابر قطر ریشه سالم می‌باشد. در طول ریشه، چندین محل دچار آلودگی می‌شود و لذا گره‌های

گیاهچه چهار برگی گوجه‌فرنگی رقم فلات در گلدان حاوی خاک سترون قرار داده شد. پس از گذشت دو ماه، تخم نماتد از ریشه‌های آلوده با استفاده از هیپوکلرید سدیم ۵٪ استخراج شد (Hussy & Baker, 1973). برای تعیین گونه نماتد، از انتهای بدن نماتد ماده به روش Taylor & Netscher (1974) برش تهیه و مشخصات ریختی آن بررسی گردید.

#### تکثیر قارچ *Trichoderma harzianum* Iran2375c

قارچ *T. harzianum* Iran 2375c خالص‌سازی شده از آزمایشگاه بیماری شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد تحویل گرفته شد و سپس قطعاتی با اندازه ۵ تا ۷ میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه درون ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و سپس در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگه داری شدند.

#### ارزیابی آزمایشگاهی اثر جدایه *T. harzianum*

##### i2375C بر نماتد ریشه گرهی *M. incognita*

#### الف) بررسی اثر نماتدکشی عصاره کشت

**قارچ بر جوان مرحله دوم (J<sub>2</sub>):** قطعاتی از حاشیه رشد فعال پرگنه درون فلاسک‌های ارلن حاوی عصاره سبزمینی دکستروز (PDB) تلقیح و به مدت ۱۴ روز درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. سپس محیط کشت حاوی توده‌های رشد کرده قارچ از کاغذ صافی سترون عبور داده شد تا عصاره قارچ استاندارد (۱۰۰٪) به دست آید. سپس با اضافه نمودن آب مقطر سترون، غلظت‌های ۱۰<sup>-۱</sup> و ۱۰<sup>-۲</sup> از عصاره کشت تهیه و از آب مقطر سترون نیز به عنوان شاهد استفاده شد. غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ و آب مقطر سترون (شاهد) به ظروف پتری سترون منتقل و به هر کدام حدود ۱۰۰ جوان مرحله دوم اضافه گردید و درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درصد مرگ و میر نماتد ثبت شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد.

#### ب) بررسی اثر عصاره کشت قارچ بر تفریح

**تخم نماتد:** غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ طبق

هوایی بر اثر تأثیری است که نماتد بر جذب آب و مواد غذایی به وسیله ریشه و انتقال آن‌ها به سمت بالای گیاه می‌گذارد (Hussey, 1985). یکی از جنس‌های اصلی مورد علاقه مطالعات مهار زیستی در سال‌های اخیر *Trichoderma* است. گونه‌های این جنس قارچی، از جمله هیفومیست‌های خاکزی هستند که به دلیل تنوع متابولیکی و قدرت رقابتی در اغلب مناطق از موجودات غالب میکروفیلور خاک می‌باشند (Samuels, 1996). این قارچ انواع مواد با خاصیت آنتی بیوتیکی تولید می‌کند، برای مثال جدایه‌های مختلف آن بیش از یکصد نوع متابولیت تولید می‌کنند که خواص آنتی بیوتیکی آن‌ها شناخته شده است (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). *Trichoderma* بر سر مواد مترشحه از بذرها (که باعث تحریک جوانه‌زنی اسپور قارچ می‌شود) و نیز برای تصاحب غذا و مکان با میکروارگانیزم‌های ریزوپلان رقابت می‌کند (Howell, 2003). در سال‌های اخیر یافته‌هایی در مورد نقش ژن‌های کدکننده تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی به دست آمده که می‌تواند در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری مؤثر باشد (Howell, 2003; Harman, 2006). همچنین آنزیم‌هایی که در فرآیند تولید کیتین مؤثر هستند کشف شد (Danzelli et al., 2003). گونه‌های مختلف *Trichoderma* به‌عنوان محرک رشد و توسعه گیاهان عمل می‌کنند و باعث بهبود رشد در سیستم‌های کنترل شده و طبیعی می‌شوند (Harman, 2000; Yedidia et al., 2001). تحقیقات متعددی نیز القای مقاومت سیستمیک در گیاه توسط گونه‌های *Trichoderma* را تأیید می‌کند (Harman et al., 2001). به دلیل این ویژگی‌ها، جدایه‌های این قارچ در تولید آنزیم و سایر متابولیت‌ها و همچنین از جمله مهم‌ترین عوامل قارچی در مهار زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

#### مواد و روش‌ها

#### شناسایی و تهیه جمعیت نماتد ریشه گرهی

##### *M. incognita*

جهت تهیه جمعیت خالص نماتد، یک کیسه تخم از ریشه گوجه‌فرنگی آلوده جدا و در مجاورت ریشه یک

(Mr%) به روش اوستین و همکاران (۱۹۶۶)، از دو فاکتور جمعیت نهایی هر تیمار ( $P_f$ ) به جمعیت نهایی تیمار نماتد ( $P_i$ ) استفاده شد ( $Mr\% = P_f / P_i$ ).

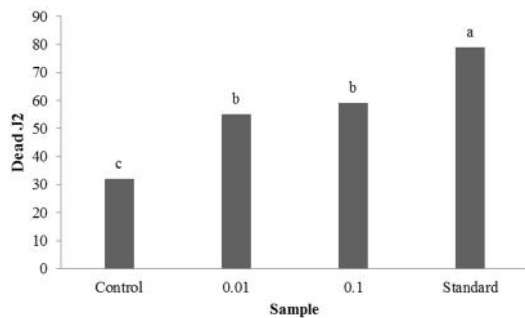
### آنالیز آماری

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (9.4) آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

### نتایج و بحث

#### شناسایی گونه نماتد ریشه‌گرهی

با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده و با استفاده از کلید شناسایی Eisenback (1985) گونه نماتد، *M. incognita* تشخیص داده شد.



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر غلظت عصاره کشت قارچ *T. harzianum* i2375c بر مرگ و میر جوان مرحله دوم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح پنج درصد می‌باشد.

Fig. 1. The average comparison of the effect of *T. harzianum* i2375c culture extract concentration on second stage juvenile mortality of *M. incognita* nematode in *in vitro* conditions, after 24, 48 and 72 hours. The data are average of four replicates. Similar letters indicate that there is no significant difference between treatments at the 5% level.

#### بررسی آزمایشگاهی

بررسی اثر عصاره کشت قارچ *T. harzianum* i2375c بر مرگ و میر جوان مرحله دوم نماتد *M. incognita*

روش قبل تهیه و آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گردید و به ظروف پتری منتقل شدند، به هر ظرف حدود ۲۰۰ تخم نماتد ریشه‌گرهی اضافه شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفریح تخم نماتد بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد.

#### آزمایشات گلخانه‌ای

ابتدا ۵۰ گرم گندم در فلاسک ارلن نیم لیتری ریخته و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس در اتوکلاو سترون شد. قطعات پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه جدایه‌های قارچ در این محیط تلقیح شد (جونز و همکاران، ۲۰۰۳) فلاسک‌های ارلن به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند.

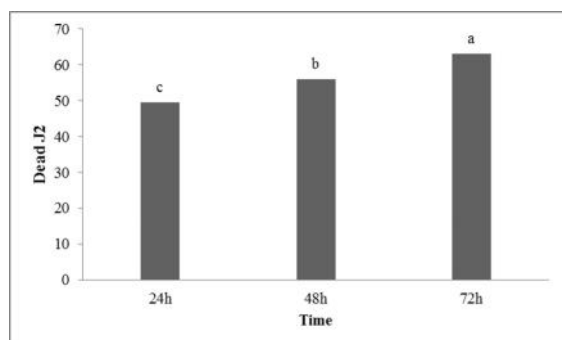
در تیمارهای دارای قارچ، غلظت ۱۰<sup>۶</sup> اسپور در مایه قارچ رشد یافته روی دانه گندم با دو کیلوگرم خاک سترون شده به طور کامل مخلوط و درون هر گلدان یک گیاهچه خیار چهار برگی قرار داده شد. پس از گذشت ۱۰ روز از مایه زنی خاک گلدان‌ها به وسیله قارچ، سوسپانسیون از تخم و جوان مرحله دوم *M. incognita* تهیه و در هر گلدان به ازای هر کیلوگرم حدود ۳۰۰۰ تخم و جوان مرحله دوم با ایجاد ۳ حفره به عمق ۴ سانتی متر در کنار طوقه و تزریق سوسپانسیون در پای ریشه گیاهچه‌ها تلقیح شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای حدود ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و به طور مرتب آبیاری صورت گرفت. آزمایش در شرایط گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار در ده تکرار انجام شد. گیاهان دو ماه پس از تلقیح نماتد از گلدان خارج و شاخص‌های رشدی گیاه (طول اندام هوایی و زیرزمینی، وزن تر و خشک اندام هوایی و زیرزمینی) و شاخص‌های مربوط به نماتد (تعداد گال، توده تخم، تخم و جوان مرحله دوم) در ۲۰۰ گرم از خاک به روش جنکینز (۱۹۶۴) اندازه‌گیری شد. با استفاده از  $P_f$  (جمعیت نهایی نماتد) و  $P_i$  (جمعیت اولیه نماتد)،  $R_f$  (فاکتور تولید مثل) محاسبه شد ( $R_f = P_f / P_i$ ) و جهت محاسبه درصد تکثیر

تعدادی از گونه‌های مختلف این قارچ را علیه نماتد ریشه-گرهی به کار بردند و ارتباط معنی‌داری بین عدم تفریح تخم و اثر بر مرگ جوان نماتد با گونه‌های مورد استفاده به دست آوردند. Sharon *et al.*, (2007) اثر عصاره کشت و اسپور جدایه‌هایی از *T. atroviride* و *T. asperellum* را بر پارازیتسم تخم و لارو نماتد ریشه گرهی *M. javanica* بعد از گذشت ۴۸ ساعت بررسی نمودند که در پارازیتسم تخم و لارو نتایج قابل قبولی بدست آوردند. نتایج بررسی اثر قارچ *Metarhizium anisopliae* بر نماتد *M. incognita*، نشان داد که این قارچ باعث ایجاد مرگ و میر در لارو سن دوم و کاهش تفریح تخم نماتد شد. مرگ و میر مشاهده شده در لارو ۸۱/۱۹ درصد بود، در حالی که میزان مرگ میر در شاهد ۲/۱۷ درصد ثبت شد (Jahanbazian, 2014).

#### بررسی اثر عصاره کشت قارچ *T. harzianum*

##### *i2375c* بر تفریح تخم نماتد *M. incognita*

اثر غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ در شرایط آزمایشگاهی بر حدود ۲۰۰ تخم نماتد ریشه گرهی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر زمان بر مرگ و میر جوان مرحله دوم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌داری بین تیمارها در سطح ۵٪ می‌باشد.

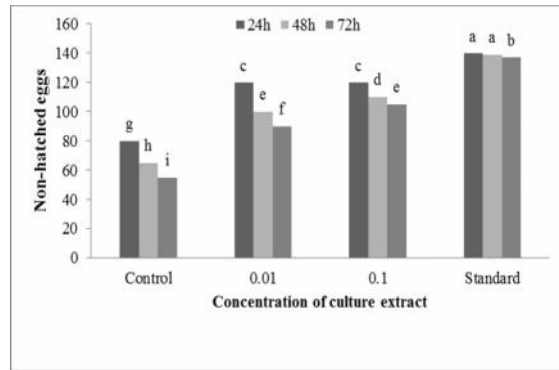
Fig. 2. The average comparison effect of time on second stage juvenile of *M. incognita* nematode in *in vitro* conditions, after 24, 48 and 72 hours. The data are average of four replicates. Similar letters indicate that there is no significant difference between treatments at the 5% level.

بررسی نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از اثر نماتد کشی غلظت‌های عصاره کشت قارچ، بیان‌کننده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشد. از بُعد غلظت، مؤثرترین غلظت استاندارد بود که اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها داشت. غلظت‌های  $10^{-1}$  و  $10^{-2}$  نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ولی اثر مشابهی داشتند و فاقد اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر بودند (شکل ۱). بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین زمان‌های مختلف بوده است و مؤثرترین زمان در مرگ و میر جوان مرحله دوم، ۷۲ ساعت بود (شکل ۲).

قارچ‌ها می‌توانند نماتدها را مستقیماً پارازیت کنند یا این که متابولیت‌ها و آنزیم‌هایی ترشح کنند که بر آن‌ها تأثیر بگذارند. این ترکیبات فعال این قابلیت را دارند که به‌عنوان نماتدکش‌های جدید به کار برده شوند (Ghayedi & Abdollahi, 2013). در پژوهشی که توسط Al-fattah *et al.*, (2007) انجام شد متابولیت خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتره شده *T. harzianum* Th3، توانست تا ۳۰ درصد باعث مرگ و میر جوان مرحله دوم نماتد شود. آن‌ها بیان کردند متابولیت‌های ثانویه که از قارچ‌ها ترشح می‌شود محتوی مواد سمی برای نماتدهای پارازیت گیاهی است. در بررسی دیگر قارچ *T. harzianum* سبب کاهش ۸/۸٪ نرخ تفریح تخم نماتد *M. javanica* شد (El-Gorban *et al.*, 2014). Al-ameiri (2009) نیز اثر عصاره کشت سه جدایه *T. harzianum* Th1، Th2، Th3 را علیه جوان مرحله دوم نماتد *M. javanica* به کار برد که تفاوت معنی‌داری در مرگ و میر جوان مرحله دوم در همه جدایه‌ها نسبت به شاهد مشاهده کرد. در آنالیز آماری اثر عصاره کشت دو جدایه قارچ *T. harzianum* (شهرکرد و همدان) بر مرگ و میر جوان مرحله دوم مشخص شد که بین خاصیت نماتد کشی و نوع جدایه قارچ مورد استفاده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. از طرفی زمان‌های شمارش و نوع

غلظت به‌صورت جداگانه بر تعداد مرگ و میر جوان‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ داشتند (Heidari & Olia, 2016). Seddiqi *et al.*, (2001) در سال ۲۰۰۱ اثر عصاره کشت

مرحله دوم بررسی نمودند. طبق این پژوهش، بیشترین تأثیر مربوط به گونه‌های *T. harzianum* و *T. viride* به ترتیب با کاهش ۴۴٪ و ۴۰٪ در تفریخ تخم‌ها بود. در بررسی دیگر میزان مرگ و میر جوان مرحله دوم نماتد *M. javanica* توسط *T. harzianum* پس از ۷۲ ساعت ۶۴/۵ درصد بیان شد (El-Gorban *et al.*, 2014). (Al-ameiri 2009).  
 ameiri عصاره کشت سه جدایه Th3، Th2 و Th1 قارچ *T. harzianum* به صورت اتوکلاو شده و نشده علیه تخم نماتد *M. javanica* به کاربرد. وی به طور کلی عصاره اتوکلاو نشده را بهتر از اتوکلاو شده ارزیابی نمود اما در هر دو حالت درصد تفریخ تخم در همه‌ی تیمارها تفاوت معنی داری با شاهد داشت. همچنین چهار عصاره با غلظت صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد به کار برد که بهترین غلظت را ۱۰۰ درصد بیان نمود. (Khattak & Stephen 2008).  
 بررسی اثر عصاره کشت قارچ ۱۵ جدایه از *T. harzianum* در غلظت‌های ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱:۱۰۰ بیشترین درصد ممانعت از تفریخ تخم نماتد *M. javanica* را در غلظت ۱:۱ یا استاندارد توسط جدایه T9 و کمترین اثر را در غلظت ۱:۱۰۰ از عصاره کشت جدایه قارچ T15 مشاهده کردند. نتایج غلظت‌ها در بررسی (Al-ameiri 2009) و (Khattak & Stephen 2008) با نتایج حاصل از این پژوهش هم‌سو می‌باشد. نتایج حاصل از ارزیابی اثر عصاره کشت جدایه‌های قارچ *T. harzianum* بر نماتد *M. javanica* بر عدم تفریخ تخم در ظروف پتری حاوی عصاره کشت قارچ در مقایسه با شاهد نشان داد، مؤثرترین جدایه قارچی در کاهش میزان تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی جدایه‌ی *T. harzianum* (i) در زمان ۲۴ ساعت است که دارای اختلاف معنی دار با شاهد می‌باشد همچنین با جدایه‌های *T. asperellum* (h<sub>1</sub>) و *harzianum* (v<sub>1</sub>) در همان زمان ۲۴ ساعت اختلاف معنی داری نداشت (Abedi *et al.*, 2015).  
 نتایج ارزیابی عدم تفریخ تخم نماتد *M. javanica* تحت تأثیر دو جدایه *T. harzianum* (شهرکرد و همدان) بیانگر بیشترین اثر ممانعت کننده بر تفریخ تخم از جدایه شهرکرد در زمان ۲۴ ساعت می‌باشد که با جدایه همدان در ۲۴ ساعت اختلاف معنی داری نداشت (Heidari & Olia, 2016).



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر زمان و غلظت عصاره کشت قارچ *T. harzianum* i2375c بر تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار بین تیمارها در سطح ۵ می‌باشد.

Fig. 3. The average comparison of effect of time and concentration of culture extract of *T. harzianum* i2375c on the egg hatching of *M. incognita* nematode in *in vitro* conditions, after 24, 48 and 72 hours. The data are average of four replicates. Similar letters indicate that there is no significant difference between treatments at the 5% level.

نتایج نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد. غلظت‌ها و زمان‌های مورد استفاده نسبت به یکدیگر دارای اختلاف معنی داری هستند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین در این بین مؤثرترین غلظت، غلظت استاندارد می‌باشد که در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی داری نداشت (شکل ۳). تولید آنزیم‌های مختلف از جمله کیتیناز توسط *Trichoderma* (Benitez *et al.*, 2004) با توجه به اهمیت ساختاری کیتین در حفظ ساختمان تخم نماتدها، باعث کاهش توسعه و ثبات تخم‌ها می‌شود. تغییر در نفوذپذیری پوسته تخم می‌تواند به مرگ جنین، مهار تفریخ تخم و کاهش جمعیت نماتد منجر شود (Seddiqi *et al.*, 2001). در پژوهشی که توسط Sahebani & Hadavi (2008) صورت گرفت، مشخص شد که میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز قارچ با میزان کاهش تفریخ تخم‌های نماتد دارای ارتباط مثبت می‌باشد. (Seddiqi *et al.*, 2001) در پژوهشی دیگر تأثیر عصاره محیط کشت مایع پنج گونه *Trichoderma* را بر میزان تفریخ تخم و مرگ و میر جوان

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارهای نماتد *M. incognita* و قارچ *T. harzianum* i2375c بر شاخص‌های رشدی بوته خیار در گلخانه.

Table 1. The average comparison of the effect of nematode *M. incognita* and *T. harzianum* i2375c on growth indices cucumber plants in greenhouse.

Treatment	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root length (cm)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
Control	88.10 a	66.39 b	8.28 ab	31.13 a	1.80 c	1.26 a
Fungus	89.30 a	78.06 a	9.12 a	31.45 a	2.56 b	1.26 a
Nematode	67.50 b	63.97 b	7.34 c	22.92 b	3.10 a	1.03 b
Fungus+Nematode	75.20 b	69.84 b	7.69 bc	29.15 a	2.69 b	1.13 ab

داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ می‌باشد.

The data are average of four replicates. Similar letters indicates that there is no significant difference between treatments at the 5% level.

### بررسی گلخانه‌ای

#### تأثیر قارچ *T. harzianum* i2375c بر شاخص‌های رشدی

بهبود رشد در گیاه آلوده به نماتد تیمار شده با *T. harzianum* که با نتایج این تحقیق همسو می‌باشد. Meyer *et al.*, (2001) مقدار کمی افزایش در رشد گوجه فرنگی تیمار شده با *Trichoderma* spp. در حضور *M. incognita* مشاهده کرد. Affokpon *et al.*, (2011) بیان نمودند که گیاهان شاهد فاقد قارچ نسبت به گیاهان تیمار شده با جدایه‌های مختلف قارچی دارای وزن ریشه کم‌تری بودند که نشان‌دهنده قدرت تحریک رشد ریشه توسط برخی جدایه‌ها می‌باشد. ارزیابی خسارت نماتد *M. incognita* روی بامیه نشان داد که تمامی سطوح تلقیح، شاخص‌های طول ساقه، حجم ریشه و وزن تر و خشک گیاه را کاهش داده و افزایش جمعیت سبب افزایش تعداد گال، توده تخم و جمعیت نهایی نماتد شد (Hussain *et al.*, 2011). بررسی میزان تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر آلودگی نماتد *M. javanica* نشان داد که وزن تر ریشه در غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر قارچ نسبت به غلظت‌های کم‌تر و شاهد اختلاف معنی‌دار داشت. بررسی مقایسه غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر وزن تر اندام هوایی نشان داد که غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر قارچ نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (Maleki Ziyarati *et al.*, 2009).

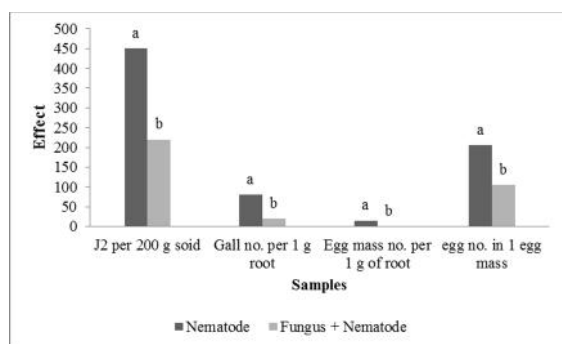
مقایسه تأثیر جدایه‌های مختلف *T. harzianum* و *T. asperellum* بر شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی اعم از متوسط وزن تر و خشک ریشه و ساقه، متوسط طول ریشه و ساقه نشان داد اثر متقابل تیمار در حضور و عدم حضور نماتد *M. javanica* دارای اثر معنی‌دار در سطح پنج

در مقایسه اثر قارچ بر شاخص‌های رشدی خیار، طول ساقه و ریشه، وزن تر ساقه و ریشه و وزن خشک ساقه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد بودند، در حالی که وزن خشک ریشه معنی‌دار در سطح پنج درصد بود. با توجه به جدول مقایسه میانگین، طول ساقه در تیمارهای شاهد و قارچ فاقد اختلاف معنی‌دار و بیشتر از تیمارهای نماتد و قارچ+نماتد؛ همچنین طول ریشه در تیمار نماتد با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار و با کم‌ترین میزان بود. وزن تر و خشک ساقه بیش‌ترین میزان مربوط به تیمار قارچ و کم‌ترین وزن خشک ساقه مربوط به تیمار نماتد بود. بیش‌ترین میزان وزن تر ریشه در تیمار نماتد و کم‌ترین در تیمار شاهد مشاهده شد. وزن خشک ریشه در تیمارهای شاهد، قارچ و قارچ+نماتد در یک گروه آماری و تیمارهای نماتد و قارچ+نماتد در یک گروه دیگر قرار گرفت (جدول ۱). کلنیزاسیون ریشه توسط *Trichoderma* spp. باعث افزایش رشد و توسعه ریشه و تولید محصول، مقاومت به استرس‌های غیرزیستی و افزایش بازده استفاده از مواد مغذی خاک می‌شود (Spiegel & Chet, 1998; Sharon *et al.*, 2001). شاخص رشدی در دو کولتیوار گوجه‌فرنگی (Alisa و Super Strain B) آلوده به نماتد *M. incognita* کم‌تر از گیاه آلوده به نماتد تلقیح شده با قارچ *T. harzianum* و شاهد می‌باشد (Abd-Elgawad & Kabeil, 2012) که این مطلب نشان‌دهنده کاهش رشد در گیاه آلوده به نماتد و



گرهی در آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شود. نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* بر شاخص‌های نماتد *M. javanica* در گیاه گوجه‌فرنگی نشان می‌دهد تیمارها، در سطح ۵٪ دارای اثر معنی‌داری در کاهش میزان شاخص‌های نماتدی (متوسط تعداد گال، توده تخم، تخم درون هر توده، تعداد جوان مرحله دوم در ۲۰۰ گرم خاک هر گلدان) بود. به‌طور کلی مؤثرترین جدایه *T. harzianum* (i) بود (Abedi, 2014).

با افزایش سطوح جمعیتی نماتد *M. incognita*، تعداد گال، کیسه تخم و جوان مرحله دوم در هر دو رقم (جینا وی اف و فلات وای) افزایش نشان داد، به طوری که این افزایش در رقم حساس (فلات وای) به مراتب بیشتر بوده است. در واقع تعداد گال، به‌عنوان صفتی متأثر از تعامل بین میزبان و بیمارگر مطرح می‌باشد. هر چقدر شرایط میزبان برای توسعه بیمارگر مطلوب‌تر باشد، میزان گال تشکیل شده نیز بیشتر خواهد بود. افزایش تعداد کیسه تخم، جوان مرحله دوم و به تبع آن فاکتور تولیدمثلی نماتد در رقم حساس، نشان از مساعد بودن شرایط لازم برای فعالیت و طی



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر قارچ *T. harzianum* i2375c بر شاخص‌های نماتد *M. incognita* در بوته خیار در گلخانه. داده‌ها میانگین چهار تکرار می‌باشند. حروف مشابه، نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح پنج درصد می‌باشد.

Fig. 4- The average comparison of the effect of *T. harzianum* i2375c on the indices of *M. incognita* in cucumber plant in greenhouse. The data are average of four replicates. Similar letters indicate that there is no significant difference between treatments at the 5% level.

درصد به جز در مورد شاخص طول ریشه می‌باشد ( Abedi, 2014). Parveen *et al.*, (2007) افزایش رشد گیاه تیمار شده با *T. harzianum* و کاهش تعداد گال ریشه‌ی گیاه آلوده به *M. incognita* را در گیاه نعنای معطر گزارش نمودند. Al-ameiri (2009) افزایش رشد (طول و وزن اندام هوایی) معنی‌داری را در گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با *T. harzianum* نسبت به تیمار فقط نماتد گزارش کرد، این افزایش به بیش از ۵۰ درصد در گیاهان طویل‌تر رسید در تیمارهای آلوده به نماتد و واجد دو جدایه Th1 و Th2 نیز رشد گیاهان افزایش یافت اما با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. قارچ *T. harzianum* i2375c نه تنها اثر بر کنترل نماتد *M. javanica* دارد بلکه افزایش رشد گیاه را با تهیه عناصر غذایی فراهم می‌کند (El-gorban *et al.*, 2014).

#### اثر قارچ *T. harzianum* i2375c بر شاخص‌های نماتد

##### *M. incognita* در خیار

نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های نماتد را در سطح ۱ درصد معنی‌دار بیان کرد. بیش‌ترین مقادیر شاخص‌های نماتد مربوط به تیمار نماتد و کم‌ترین آن‌ها مربوط به تیمار قارچ+نماتد بود (شکل ۴). با توجه به جدول ۲ *Trichoderma* در حد معنی‌داری سبب کاهش جمعیت نماتد شد و میزان کنترل این نماتد به وسیله قارچ *Trichoderma*، ۶۵/۵۷ درصد بود.

بررسی میزان تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* بر آلودگی نماتد *M. javanica* نشان داد که غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر قارچ سبب کاهش معنی‌دار قطر گال‌ها در این غلظت نسبت به غلظت‌های کم‌تر و شاهد بود ولی با غلظت‌های بالاتر تفاوت معنی‌داری نداشت.

میانگین توده تخم در هر گیاه و تعداد تخم در هر توده تخم در مقایسه با غلظت‌های  $10^3$ ،  $10^4$ ،  $10^5$  و شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ولی نسبت به غلظت‌های  $10^7$ ،  $10^8$  تفاوت معنی‌داری نداشت ( Maleki Ziyarati *et al.*, 2009). با توجه به نتایج حاصل می‌توان چنین استنباط کرد که غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر تریکودرما می‌تواند به‌عنوان یک غلظت مؤثر در کنترل و مبارزه با نماتد ریشه-

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر قارچ *T. harzianum* بر شاخص‌های نماتد *M. incognita* در بوته خیار در گلخانه

Table 2. The average comparison of the effect of *T. harzianum* i2375c on *M. incognita* nematode indices in cucumber plant in greenhouse.

Treatment	Final population (P <sub>f</sub> )	Reproductive factor (R <sub>f</sub> )	Multiplication rate (Mr%) <sup>1</sup>	Nematode control (%) <sup>2</sup>
Nematode	29040 a	4.84 a	100 a	0 b
Fungus+nematode	8014 b	1.33 b	34.42 b	65.57 a

داده‌ها میانگین ده تکرار می‌باشند.

۱.نسبت جمعیت نهایی به جمعیت اولیه نماتد.

۲.نسبت جمعیت نهایی هر تیمار به جمعیت نهایی تیمار نماتد.

The data are average of ten replicates.

1. The ratio of the final population to the initial population of the nematode.

2. The ratio of the final population of each treatment to the final population of nematode treatment.

نتایج آزمایش میزان تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T.*

*harzianum* بر نماتد *M. incognita* نشان داد که این قارچ به میزان قابل توجهی بر فعالیت نماتد ریشه‌گرهی شامل ایجاد گال روی ریشه‌ها، تعداد توده تخم و تعداد تخم در هر توده تخم مؤثر می‌باشد. با توجه به چگونگی فعالیت قارچ، نماتد و ارتباط متقابل آن‌ها با گیاه، به نظر می‌رسد که قارچ *T. harzianum* به نحوی فعالیت نماتد را در داخل گیاه دچار محدودیت نماید، به طوری که نه تنها میزان ظهور گال روی ریشه کاهش یافت بلکه تعداد توده تخم و تعداد تخم داخل هر توده تخم نیز کاهش یافت. بنابراین این احتمال وجود دارد که قارچ نظام دفاعی گیاه را تحریک نماید. ارزیابی عملکرد این قارچ در شرایط مزرعه که دما و رطوبت کنترل نشده و سایر میکروارگانیسم‌ها حضور دارند، ضروری می‌باشد.

نمودن چرخه زندگی بیمارگر می‌باشد (Ghasemzade et al., 2016). (al., 2016). (Pandey et al. (2003) از جدایه‌های مختلفی از قارچ *T. viride* جهت کنترل نماتد *M. incognita* در گیاه نخود استفاده نمود. طبق نتایج تحقیقات در همه گیاهان تیمار شده با جدایه‌های *T. viride* کاهش تعداد گال و جمعیت نهایی نماتد در شرایط مزرعه و کشت گلدانی اتفاق افتاد. به طوری که جمعیت *T. viride* افزایش یافته بود، همچنین تعداد تخم‌ها و جمعیت جوان مرحله دوم به‌طور قابل توجهی در تیمار دارای قارچ کاهش یافت. (Al-fattah et al. (2007) شاهد کاهش ۳۰/۸ درصدی در میزان گال ریشه در گیاهان گوجه‌فرنگی کشت شده در خاک تیمار شده با قارچ و نماتد *M. incognita* یک هفته قبل از نشا گیاه بودند. همچنین بیان کردند *T. viride* (Tv) باعث کاهش ۲۰ درصدی در تعداد توده تخم شد. بررسی

## References

- Abd-Elgawad, M.M.M. & Kabeil, S.S.A., 2012. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum* and *Serratia marcescens* and their related enzymatic changes in tomato roots. African Journal of Biotechnology, 11(96): 16247–16252.
- Abedi, E. 2014. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*, using *Trichoderma harzianum* i25 and investigation on the plant defense compounds fluctuations on tomato. Master's thesis. Faculty of Agriculture, Shahr-e-Kord University, Iran. (In Persian with English Summary)
- Abedi, E., Olia, M. & Shabani, L. 2015. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*, using *Trichoderma harzianum* i25 and investigation on the plant defense compounds fluctuations on tomato. Iranian Journal of Plant Pathology, 51 (4): 413–430. (In Persian with English Summary)



- Affokpon, A., Coyne, D.L., Htay, C.C., Agbede, R.D., Lawouin, L. & Coosemans, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 600–608.
- Agrios, G. N., 2005. *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier Academic Press. Pp. 1026–1389.
- Al-ameiri, N.S. 2009. Efficiency of Jordanian *Trichoderma harzianum* (Rifai) isolates against *Meloidogyne javanica* (Treub) on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 5: 446–457.
- Al-fattah, A., Dababat, A. & Sikora, R.A. 2007. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 19: 297–309.
- Benitez, T., Rincon, M.A., Limon, M.C. & codon, A.C. 2004. Biological mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7:249–260.
- Donzelli, B.G.G., Ostroff, G. & Harman, G.E. 2003. Enhanced enzymes hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydrate Research*, 338: 1823–1833.
- Eisenback, J.D. 1985. Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males and females of the genus *Meloidogyne* (root knot nematode). In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (eds) *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume I. Biology and Control. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, pp. 47-77.
- El-Gorban, A.M., Abdel-Wahab, M.A., Bahkali, A.H. & Al-Sum, B.A. 2014. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on tomato plants by *Hypocrea lixii* (the teleomorph of *Trichoderma harzianum*). *Clean – Soil, Air, Water*, 42(10): 1464–1469.
- Ghasemzade, A., Jamali, s., Esfahani, M. & Pedramfar, H. 2016. Effects of nematode (*Meloidogyne incognita* Race2) on root and shoot traits of two susceptible and tolerant cultivars of tomato. *Science and Technology of Greenhouse Cultivation*, 8(1): 73–91. (In Persian with English Summary)
- Ghayedi, S. & Abdollahi, M. 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. *Journal of Plant Protection Research*, 53(2): 165–171.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*, 84:377–393.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190–194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*, 2:43–56.
- Heidari, F. & Olia, M. 2016. Biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, using vermicompost and fungus *Trichoderma harzianum* on tomato. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52 (1):109–124. (In Persian with English Summary)
- 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.

- Hussain, M.A., Mukhtar, T. & kayani, M.Z.. 2011. Assessment of the damage caused by *Meloidogyne incognita* on okra (*Abelmoschus esculentus*). Journal of Plant Science, 21(4): 857–861.
- Hussey, R. S. 1985. Host-parasite relationships and associated physiological changes. Sasser, J. N. and C. C. Carter. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and control. 143–153.
- Jahanbazian, L. 2014. Biological control of tomato root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) by *Pseudomonas fluorescens* and *Metarhizium anisopliae*. Master's thesis. Faculty of Agriculture. Yasuj University, Iran. (In Persian with English Summary)
- Khattak, B. & Stephen, S.M. 2008. Effect of some indigenous isolats of *Trichoderma harzianum* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Sarhad Journal of Agriculture, 24: 285–288.
- Maleki Ziyarati, H., Roostaie, N., Etebariyan, H. & Aminian, H. 2009. Study of biological control of root knot nematode *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood, in tomato by *Trichoderma harzianum* rifai in greenhouse and quantitative changes of phenolic compounds in plant. Seed and Plant Production Journal, 25 (2): 259–272.
- Meyer, S.L.F., Roberts, D.P., Chitwood, D.J., Carta, L.K., Lumsden, R.D. & Mao, W. 2001. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on bell pepper. Nematropica, 31: 75–86.
- Pandey, G., Pandey, R.K. & pant, H. 2003. Efficacy of different levels of *Trichoderma viride* against root-knot nematode in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Annual Plant Protection Science, 11 (1): 96–98.
- Perveen, K., Haseeb, A. & Shukla, P.K. 2007. Efficacy of pesticides, neem seed powder and biocontrol agents on *Meloidogyne incognita* and growth and oil yield of *Mentha arvensis*. Nematologia Mediterranea, 35: 75–79.
- Sahebani, N. & Hadavi, N. 2008. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry, 40(8): 2016–2020.
- Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research, 100: 923–935.
- Sasser, J.N. & Carter, C.C. 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. Pp 19–24.
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., nagan, H. & Samuels, G.J. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. European Journal of Plant Pathology, 118: 247–258.
- Siddiqui, I.A., Amer Zareen, M., Javad Zaki, M. & Shaukat, S.S. 2001. Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica*, root-knot nematode in the okra and mungbean. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4(7): 846–848.
- Sivasithamparam, K. & Ghisalberti, E. 1998. Secondary metabolites In *Trichoderma* and *Gliocladium* vol. 1. (eds) Kubicek C.P. and Harman G.E. Taylor and Francis. London. pp. 139–191.
- Spiegel, Y. & Chet, I. 1998. Evaluation of *Trichoderma* sp. as a biological agent against soil borne fungi and plant parasitic nematodes in Israel. Integrated Pest Management Reviews, 3: 169–175.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. & Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil, 235: 235–242.

**Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, using *Trichoderma harzianum* Iran2375c on cucumber**

**Motahara Sadat Hashemi, Majid Olia, Abdol-Hossein Jamali**

Department of Plant pathology, Agricultural Faculty, University of Shahr-e-Kord, Shahr-e-Kord, Iran

Corresponding author: Motahara Sadat Hashemi, Bita.hashemi5701@gmail.com

---

Received: Oct., 2, 2017

6(2) 81-91

Accepted: Jul., 3, 2019

---

**Abstract**

Biocontrol of nematodes is now a priority in order to reduce the harmful effects of chemicals, including human health and environmental pollution. A lot of research suggest effective performance of *Trichoderma* spp. in reducing the damage and inhibition of various diseases. In this study, we investigated the effect of *Trichoderma harzianum* Iran2375c culture extracts on second stage juvenile mortality and egg hatching at 24, 48 and 72 hours using the concentrations of 1: 1, 1:10 and 1:100. In greenhouse studies, four leaf seedlings were inoculated with a concentration of  $10^6$  spores/g and after 10 days of inoculation of the soil, 3000 eggs and juvenile (stage two) of *Meloidogyne incognita* nematode per Kilogram were inoculated to the root of seedling. Experiment was carried out in greenhouse conditions in completely randomized design with four treatments in ten replications. Two month after inoculation of nematode, plant growth indices and indices related to nematode were measured. The concentration of 1:1 was the most effective in second stage juvenile mortality and egg hatching. Based on the results of greenhouse studies, the growth and nematode indices of treatments showed a significant difference. The results of this study indicates the potential of *T. harzianum* Iran2375c in biological control of *M. incognita* and promotion of plant growth.

**Keywords:** Biological control, fungal antagonist, culture extract, *Trichoderma*, root gall

---