

## مقاله کوتاه

اثر کنترلی چهار جدایه از *Trichoderma harzianum* بر نماتد ریشه‌گرهی*Meloidogyne javanica* در خیار گلخانه‌ایفائزه پورخواجه، حبیب‌اله چاره‌گانی\*، محمد عبدالمهدی و مهدی صدوری<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۶)

## چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne spp.*) مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهان جالیزی هستند که علاوه بر کاهش پنج‌درصدی محصولات کشاورزی، موجب فراهم شدن شرایط برای آلودگی گیاه به بیمارگرهای دیگر نیز می‌شوند. قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai یکی از عوامل بالقوه در مهار زیستی اغلب عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله نماتدها است. به منظور شناسایی جدایه‌های مؤثر *T. harzianum* برای کنترل نماتد ریشه‌گرهی در خیار، چهار جدایه از این قارچ با کدهای ۳۶، ۳۹، ۴۲ و ۴۳ با غلظت  $10^7$  اسپور در میلی لیتر به روش خیساندن خاک مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهچه‌های خیار رقم سوپردومینوس (*Super Dominus*) در مرحله چهار برگی، ۲۴ ساعت پس از تیمار با قارچ با ۲۰۰۰ تخم و لارو *M. javanica* مایه‌زنی شده و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط گلخانه به مدت دو ماه نگهداری شدند. نتایج بررسی شاخص‌های تکثیر نماتد نشان داد که جدایه کد ۴۲ قارچ نسبت به سایر جدایه‌ها بیشترین تأثیر را در کاهش فعالیت‌های زیستی نماتد داشت. تعداد تخم، گال، توده تخم و فاکتور تولیدمثل در گیاهان تیمار شده با این جدایه از قارچ *T. harzianum* به ترتیب ۶۹/۲، ۸۱/۸، ۸۸/۶ و ۷۰ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد.

کلیدواژه: فاکتور تولیدمثل، گلخانه، مدیریت، مهار زیستی.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.charehgani@yu.ac.ir

۱. به ترتیب دانش‌آموخته، استادیار، استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.

## Biocontrol effect of *Trichoderma harzianum* isolates on root knot nematode *Meloidogyne javanica* on greenhouse cucumber

F. Pourkhajeh\*, H. Charehgani, M. Abdollahi, and M. Sadravi<sup>1</sup>

(Received: 18.6.2018; Accepted: 16.3.2019)

### Abstract

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are the most important parasitic nematodes infecting cucurbits plants. These nematodes cause 5% loss in crop production and also provide favorable conditions for co-infection with other plant pathogens. *Trichoderma harzianum* Rifai is a potential bio-control agents for controlling the plant pathogens, including plant parasitic nematodes. In order to find the effective isolate/s of *T. harzianum* for management of root-knot nematodes on cucumber, a suspension of  $10^7$  spores/ml of four isolates of *T. harzianum* with 36, 39, 42 and 43 codes was evaluated by soil drenching method. Twenty four hours after soil drenching of fungus isolates, four leaf stage seedlings of cucumber (cv. Super Dominus) were inoculated with 2000 eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* and kept for two months in the greenhouse and the experiment was conducted as a completely randomized design with four replicates. The results showed that the isolate *Th42* was the most effective isolate on reducing the biological activity of nematode as compared to other treatments. The isolate *Th42* reduced the number of eggs, galls, egg masses and reproductive factor by 69.2, 81.8, 88.6 and 70%, respectively, as compared to control treatment.

**Keywords:** Reproductive factor, Greenhouse, Management, Biological control

---

\*Corresponding author's E-mail: h.charehgani@yu.ac.ir

1. Former MSc. Student, Assis. Prof., Prof. and assoc prof. of Plant Pathology, Respectively, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran..

## مقدمه

آزمایشگاه نیز به اثبات رسیده است (Pourkhajeh et al. 2017). در مطالعه حاضر، چهار جدایه از قارچ *T. harzianum* به منظور بررسی تأثیر آن‌ها روی نماتد *M. javanica* در خیار کشت شده در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌های بررسی

به منظور تهیه‌ی نماتد ریشه‌گرهی گونه *M. javanica*، گیاهان گوجه‌فرنگی و خیار دارای علائم زردی، پژمردگی و گال بر روی ریشه، از گلخانه‌ها و مزارع آلوده در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. گونه‌ی نماتد *Meloidogyne* بر اساس نقوش کوتیکولی ناحیه‌ی پیرامون مخرج نماتد ماده و با استفاده از کلیدهای رایج شناسایی، تعیین گردید (Jepson 1987). نماتد با استفاده از روش توده تخم منفرد (Single egg mass) خالص‌سازی و روی گیاه گوجه‌فرنگی به طور متوالی تکثیر و در حجم انبوه تکثیر شد (Hussey and Barker 1973). سوسپانسیون تخم و لارو نماتد *M. javanica* تهیه و جهت استفاده در آزمایش‌ها به کار گرفته شد (Vrain 1977). جدایه‌های ۳۶، ۳۹، ۴۲ و ۴۳ قارچ *T. harzianum* از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه یاسوج فراهم و پس از تک اسپور کردن روی محیط کشت PDA تکثیر گردید (Booth 1977). منشأ اولیه جدایه‌های ۳۶ و ۳۹ به ترتیب مناطق نصرآباد گرگان و گیلداغ مازندران و جدایه‌های ۴۲ و ۴۳ شهر یاسوج است، همه جدایه‌ها در کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه یاسوج موجود می‌باشند. پس از تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور در آب مقطر استریل با استفاده از لام گلبول‌شمار (Hemocytometer)، غلظت مورد نظر جهت استفاده در آزمایش‌ها تهیه شد. برای انجام آزمایش، بستر کشت در گلدان‌های پلاستیکی به حجم

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) از نظر اهمیت جزء سه نماتد مهم انگل گیاهی بوده و از نظر دامنه‌ی میزبانی و تعامل با بسیاری از عوامل بیماری‌زا، از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی به شمار می‌آیند (Mehrotra 1983). میزان خسارت نماتدهای این جنس در بسیاری از کشورها حدود ۵ درصد از محصول گزارش شده است (Hussey and Jansen 2002). عوامل کنترل زیستی قارچی در چند دهه‌ی اخیر اهمیت زیادی در کنترل بیماری‌های گیاهی پیدا کرده‌اند (Janisiewicz et al. 2001). قارچ *Trichoderma harzianum* از عوامل مفیدی است که با پارازیته کردن تخم، لارو و ماده بالغ نماتد *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood 1949 جمعیت نماتد را کاهش می‌دهد (Naserinasab et al. 2013). این قارچ هم‌چنین قادر به القاء مقاومت گیاه در مقابل نماتدها و کاهش خسارت نماتد است (Van Loon & Vanstrien 1998). به منظور مهار زیستی نماتد سیستی چغندر قند از ده جدایه از قارچ تریکودرما متعلق به گونه‌های *T. virens* و *T. harzianum* روی تخم و سیست نماتد در آزمایشگاه و گلخانه استفاده گردید. در بین آن‌ها *T. harzianum* Bi و *T. virens* vml به ترتیب با ۷۶/۱۸ و ۷۲/۵۵ درصد پارازیتیسیم، بهتر از جدایه‌های دیگر عمل کردند (Mahdikhani Moghadam et al. 2009). اثر *T. harzianum* در سیستمیک شدن ترکیبات فنلی ایجاد شده در گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* و اثر مهارزیستی این قارچ روی گونه ذکر شده و تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی نیز به اثبات رسیده است (Maleki Ziarati et al. 2009). مهار زیستی نماتد *M. javanica* توسط دو جدایه 39 و 42 در شرایط

شاهد بیشتر بود. کم‌ترین میزان وزن تر شاخساره در گیاهان تیمار شده با جدایه ۳۶ قارچ بود که تنها با گیاهان تیمار شده با جدایه ۴۲ قارچ اختلاف معنی‌دار نداشت. کم‌ترین میزان وزن خشک شاخساره در گیاهان تیمار شده با جدایه ۴۲ قارچ مشاهده شد که با گیاهان تیمار شده با جدایه‌های ۳۹ و ۴۳ قارچ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. وزن تر ریشه در تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند ( $P \leq 0.05$ ) (جدول ۱).

چرخه زندگی نماتدهای ریشه‌گرهی در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در ۲۵ روز و در دمای ۱۴ درجه سلسیوس در ۵۶ روز کامل می‌شود (Agrios 2005) در مطالعه حاضر مشخص شد که جدایه‌های مورد بررسی از قارچ *T. harzianum* در مقایسه با شاهد تأثیر چندانی بر شاخص‌های رویشی گیاه نداشت. دلیل این عدم تأثیر می‌تواند کم بودن دوره رویشی گیاه بعد از مایه‌زنی نماتد باشد و با توجه به مدت‌زمان آزمایش احتمالاً نسل دوم نماتد در گیاهان شاهد و تیمار شده با جدایه‌های قارچ، فرصت کافی برای ایجاد خسارت روی گیاه را نداشته‌اند. مطالعات مختلف تأثیر جدایه‌های مختلف قارچ *T. harzianum* در القاء مقاومت سیستمیک در گیاه علیه نماتدهای ریشه‌گرهی را نشان داده است. در مطالعه‌ای پیش تیمار گیاهان گوجه‌فرنگی با جدایه T908 قارچ *T. harzianum* باعث افزایش بیان ژن‌های *PR5*، *PR-1* و *ACO* پنج روز پس از مایه‌زنی نماتد *M. incognita* گردید. در مطالعه مذکور القاء مقاومت سیستمیک به اثبات رسید (Leonetti et al. 2017). القاء مقاومت سیستمیک در گیاه باعث افزایش فعالیت گیاه و تولید آنزیم‌های دفاعی و بار اضافه بر آن شده (Oka et al. 1999; Molinari and Baser 2010) که سبب کاهش مقادیر وزن تر و خشک شاخساره و وزن تر ریشه نسبت به شاهد شده است.

$240 \text{ cm}^3$  حاوی ماسه، کود آلی و خاک مزرعه به نسبت مساوی تهیه و به مدت ۲۰ دقیقه با بخار آب ۱۲۱ درجه سلسیوس در فشار یک اتمسفر در دستگاه اتوکلاو سترون شد. بذر خیار رقم سوپردومینوس (Super Dominus) حساس به نماتد ریشه‌گرهی (Charehgani et al. 2018) در گلدان‌ها کشت گردید و در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه یاسوج قرار داده شدند. پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهار برگگی، به گلدان‌های تیمار قارچ، ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^7$  به صورت خیساندن خاک استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت، تعداد ۲۰۰۰ تخم و لارو *M. javanica* به گلدان‌ها مایه‌زنی گردید. از گیاه تیمار شده با نماتد و بدون قارچ به عنوان شاهد استفاده شد و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار طراحی گردید. پس از گذشت ۴۵ روز از زمان مایه‌زنی نماتد، گیاهان از خاک خارج و شاخص‌های رویشی گیاه شامل طول، وزن تر و خشک شاخساره و وزن تر ریشه و همچنین شاخص‌های نماتد شامل تعداد تخم (Hussey and Barker 1973) and تعداد گال و توده‌ی تخم (Hussey and Jansen 2002) موجود در ریشه مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور تولیدمثل نماتد نیز بر مبنای جمعیت نهایی به جمعیت اولیه‌ی تعیین شد. داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 تجزیه شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار، طراحی گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج نشان داد که طول شاخساره در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های ۳۹ و ۴۳ قارچ به طور معنی‌داری از گیاهان

جدول ۱. تأثیر جدایه‌های قارچ *Trichoderma harzianum* بر شاخص‌های رویشی گیاه خیار رقم سوپردومینوس آلوده به *Meloidogyne javanica* و شاخص‌های جمعیتی نماتد در شرایط گلخانه.

**Table 1. Effect of *Trichoderma harzianum* isolates on the growth parameters of cucumber cv. Super Dominus, infected with *Meloidogyne javanica* and the nematode indices in greenhouse.**

Isolates	Growth parameters and nematode indices							
	Shoot height (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Eggs/root	Galls/root	Egg masses/root	Reproduction factor
Control	29±2.66 <sup>b</sup>	11.13±0.58 <sup>ab</sup>	1.72±0.14 <sup>ab</sup>	4.76±0.65 <sup>a</sup>	7790±380 <sup>a</sup>	396±31.85 <sup>a</sup>	350±38.37 <sup>a</sup>	4.07±0.18 <sup>a</sup>
Th 36	38.5±4.17 <sup>ab</sup>	7.4±1.16 <sup>c</sup>	1.71±0.12 <sup>ab</sup>	2.62±0.37 <sup>a</sup>	2618±337 <sup>c</sup>	355±104 <sup>a</sup>	308±88.42 <sup>a</sup>	1.46±0.12 <sup>c</sup>
Th 39	42.75±2.68 <sup>a</sup>	13.50±1.13 <sup>a</sup>	2.17±0.21 <sup>a</sup>	4.77±0.96 <sup>a</sup>	5554±399 <sup>b</sup>	124±17.28 <sup>b</sup>	109±18.71 <sup>b</sup>	2.83±0.19 <sup>b</sup>
Th 42	40±0.40 <sup>ab</sup>	8.63±0.17 <sup>bc</sup>	1.31±0.01 <sup>b</sup>	2.72±0.22 <sup>a</sup>	2400±163 <sup>c</sup>	72±11.43 <sup>b</sup>	40±4.89 <sup>b</sup>	1.22±0.08 <sup>c</sup>
Th 43	46.5±2.24 <sup>a</sup>	13.46±0.50 <sup>a</sup>	2.11±0.31 <sup>a</sup>	3.56±0.33 <sup>a</sup>	6533±449 <sup>ab</sup>	272±5.83 <sup>ab</sup>	220±6.53 <sup>ab</sup>	3.37±0.22 <sup>ab</sup>

اعداد میانگین چهار تکرار ± خطای استاندارد آورده شده است. حروف مشابه لاتین نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

Data are means of four replicates ± standard error. Values followed by the same letters in each column are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

موفقیت این قارچ در امر مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی شده‌اند. این قارچ به دلیل توانایی تولید مقادیر زیاد آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز و گلوکاناز، در زمره دشمنان طبیعی طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی قرار گرفته است (Verma et al. 2007). همچنین در پژوهش کواری و همکاران (Kavari et al. 2015) مشخص گردید که میزان توانایی تولید آنزیم کیتیناز قارچ با میزان کاهش تفریح تخم‌های نماتد *M. javanica* رابطه مستقیم دارد. در مطالعه‌ای دیگر، جدایه‌ای از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال نماتد *M. javanica* در ریشه گوجه‌فرنگی را کاهش دهد (Khattak & Stephen 2008). بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، جدایه ۴۲ ایرانی قارچ *T. harzianum* می‌تواند به عنوان عامل مهار زیستی نماتد *M. javanica* در خیار در شرایط گلخانه و مزرعه برای بررسی‌های بیشتر در آینده پیشنهاد گردد.

کم‌ترین میزان تعداد تخم در ریشه و فاکتور تولیدمثل نماتد در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های ۴۲ و ۳۶ قارچ مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند. در گیاهان تیمار شده با جدایه ۴۲ قارچ *T. harzianum* کم‌ترین تعداد گال و توده تخم در ریشه مشاهده شد که با جدایه‌های ۴۳ و ۳۹ قارچ *T. harzianum* اختلاف معنی‌داری نداشت ( $P \leq 0.05$ ) (جدول ۱).

مقایسه شاخص‌های جمعیتی نماتد نشان دادند که جدایه ۴۲ قارچ نسبت به سایر جدایه‌ها بیشترین تأثیر را بر نماتد داشته و در گیاهان تیمار شده با این جدایه از قارچ *T. harzianum* تعداد تخم، گال، توده تخم و فاکتور تولیدمثل نماتد به ترتیب ۶۹/۲، ۸۱/۸، ۸۸/۶ و ۷۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. گونه‌های این جنس با تولید انواع متابولیت‌های ضد میکروبی در کنار سازوکارهای دیگری چون تحریک مقاومت القایی در گیاه میزبان باعث

## منابع

- Agrios G. 2005. Plant pathology. 5<sup>th</sup> ed., Elsevier Academic Press., USA. 922 p.  
Booth C. 1977. *Fusarium* laboratory guide to identification of major species. Common wealth mycological

- Institut. Kew, Surrey, England, 55 p.
- Charehgani H., Pourkhajeh F. and Gholampour S. 2018. Influence of initial population densities of *Meloidogyne javanica* on three cucumber cultivars. 23<sup>th</sup> Iranian plant protection congress of Iran, 27–30 August, Gorgan, Iran. p. 753–754 (In Persian with English Summary).
- Hussey R. S. and Barker K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.
- Hussey R. S. and Janssen G. J. W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species, pp. 43–70. In: J. L. Starr, R. Cook and J. Bridge (Eds). Plant Resistance to Parasitic Nematodes. CABI Publishing, UK.
- Janisiewicz W. J., Tworkoshi T. J. and Kurtzman C. P. 2001. Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. Journal of Phytopathology 91: 1098-1108.
- Jepson S. B. 1987. Identification of root knot nematodes. Cambrian News Ltd. CABI, Wallingford, UK. 256 p.
- Kavari M., Mahdikhani Moghadam E. and Rouhani H. 2015. Survey on chitinase production by several isolates of *Trichoderma* and its biological control effect on tomato root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Iranian Journal of Plant Protection 29: 123-133. (In Persian with English Summary).
- Khattak B. and Stephen S. M. 2008. Effect of some indigenous isolates of *Trichoderma harzianum* on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. Sarhad Journal of Agriculture 24: 285-288.
- Leonetti P., Zonno M.C., Molinari S. and Altomare C. 2017. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Cell Reports 36(4): 621-631.
- Mahdikhani Moghadam E., Rouhani H. and Flahi Rastegar M. 2009. Biological control of sugar beet cyst forming nematode with *Trichoderma* under in vitro and green house condition. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 13(48): 301-312. (In Persian with English Summary).
- Maleki Ziarati H., Roustae A., Sahebani N., Etebarian H. R. and 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 (3): 259-272. (In Persian with English Summary).
- Mehrotra R. S. 1983. Plant Pathology. Tata McGraw Hill Publishing Company Limited, New Delhi. 771 p.
- Molinari S. and Baser N. 2010. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. Journal of Crop Protection 29: 1354-1362.
- Naserinasab F., Sahebani N. and Etebarian H. R. 2013. Induction of plant defense response against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato by *Trichoderma harzianum* BI. Journal Management System 1(4): 1-12. (In Persian with English Summary).
- Oka Y., Cohen Y. and Spiegel Y. 1999. Local and systemic induced resistance to the root-knot nematodes in tomato by DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid. Journal of Phytopathology 89: 1138-1143.
- Pourkhajeh F., Charehgani H., Abdollahi M. and Sadravi M. 2017. Effects of three isolates of fungus *Trichoderma harzianum* on hatching and mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under laboratory conditions. 3<sup>th</sup> Iranian Mycological Congress, 26-28 August, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. p. 107. (In Persian with English Summary).
- Van Loon L. C. and Vannestri E. A. 1998. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Journal of Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 85-97.
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. and Valero J. R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37: 1-20.
- Vrain T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. Journal of Nematology 9: 51–249.