# ارزیابی توانایی آنتاگونیستی دو جدایه از قارچ *Trichoderma harzianum* علیه نماتد ریشه‌گرهی توتون *Meloidogyne incognita* در آزمایشگاه

# Evaluation of the antagonistic ability of two isolates of *Trichoderma harzianum* against Tobacco root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)

**مرضیه شازده احمدی***

دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱۱ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۱۸

**چکیده**

نماتدهای ریشه‌گرهی .*Meloidogyne* spp به‌دلیل نحوه خسارت و دامنه میزبانی وسیع از نظر اقتصادی از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی در سطح جهان می‌باشند. در سالیان اخیر، مهار زیستی نماتدهای ریشه‌گرهی، با هدف کاهش اثرات خطرناک سموم شیمیایی از جمله تهدید سلامت بشر و آلودگی محیط زیست، یک اولویت به‌شمار می‌رود. آنتاگونیست‌ها یکی از عوامل مؤثر در کنترل زیستی می‌باشند. یکی از مهم‌ترین آنتاگونیست‌ها، قارچ *Trichoderma harzianum* بوده که دارای توانایی بسیار زیادی برای مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله نماتدها است. به‌منظور مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی توتون *Meloidogyne incognita*، اثر آنتاگونیستی دو جدایه از قارچ *Trichoderma harzianum* در شرایط آزمایشگاه در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات آزمایشگاهی، تأثیر عصاره کشت دو گونه قارچ تریکودرما به نام‌های *Trichoderma harzianum* BI و *Trichoderma harzianum* Iran 2375c با غلظت $10^6$ اسپور در میلی‌لیتر، روی مرگ‌ومیر لاروهای جوان سن دوم و نرخ تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در گیاه توتون، طی ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شدند. شرایط آزمایشی تا ۱۴ روز حفظ شدند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مؤثرترین تیمار، جدایه *T. harzianum* BI بود که پس از ۱۴ روز، سبب کاهش ۸۶/۷ درصد در نرخ تفریخ تخم و بعد از ۷۲ ساعت، موجب ۶۹/۵ درصد مرگ‌ومیر روی لاروهای سن دوم نماتد گردید. در مجموع، نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که عصاره کشت هر دو جدایه قارچی از توانایی آنتاگونیستی خوبی علیه نماتد *M. incognita* برخوردار می‌باشند.

**واژگان کلیدی:** مهار زیستی، قارچ آنتاگونیست، *Nicotiana tabacum*، *Trichoderma harzianum* BI، *T. harzianum* Iran 2375c

## مقدمه

توتون، .*Nicotiana tabacum* L، یکی از گیاهان مهم زراعی و صنعتی است که توجه به کمیت و کیفیت آن، حائز اهمیت بسیار می‌باشد. این گیاه، مورد حمله انواع مختلفی از بیماری‌ها و آفات، به‌ویژه نماتد ریشه‌گرهی قرار می‌گیرد. نماتدهای ریشه‌گرهی جنس *Meloidogyne*، با توجه به وسعت انتشار و دامنه وسیع میزبانی، از شایع‌ترین و مهم‌ترین نماتدهای خسارت‌زای محصولات کشاورزی در جهان هستند (ایزدپناه و همکاران، ۱۳۸۹). مشخص‌ترین نشانه‌های این بیماری در قسمت‌های زیرزمینی گیاه به‌وجود می‌آید. روی ریشه‌های آلوده، گال‌های گره مانندی ایجاد می‌شود. قطر ریشه‌های آلوده به نماتد، دو یا چند برابر قطر ریشه‌های سالم بوده و گره‌های تولید شده در طول ریشه، ظاهری خشن و گرز مانند به آن می‌دهند.

محقق، بخش بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران، ایران
**نویسنده مسئول مکاتبات:** noshinshazdeahmadi@yahoo.com

علایم این بیماری در اندام‌های هوایی، مشابه علایم سایر عوامل بیماری‌زای ریشه است؛ شامل کاهش رشد اندام‌های هوایی، علایمی مشابه کمبود مواد غذایی در برگ، کلروز، پژمردگی و کاهش محصول. شدت این علایم، اغلب به تعداد لاروهای سن دومی که به ریشه نفوذ می‌کنند، بستگی دارد. عوامل محیطی نیز بر میزان خسارت به گیاه اثر می‌گذارند. عواملی مانند خشکی یا دمای بالا که باعث ایجاد تنش در گیاه می‌شوند، میزان خسارت را افزایش می‌دهند. علایم ایجاد شده در اندام‌های هوایی، به میزان تأثیری که نماتد بر جذب آب و مواد غذایی به‌وسیله ریشه‌ها و انتقال آن‌ها به سمت بالای گیاه می‌گذارد، بستگی دارند (Al-Ameiri, 2009).

آگاهی در مورد برهم‌کنش‌های بین نماتد- میزبان، سبب پیشرفت در روش‌های نوین مدیریت نماتدها شده و می‌تواند به راهکارهای موفق در رابطه انگلی نماتدها با میزبان غلبه کند. برای مهار نماتدهای ریشه‌گرهی، روش‌های متفاوتی مانند تناوب زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و نماتدکش‌های شیمیایی توصیه می‌شوند. به‌طورکلی مدیریت بیماری‌های خاکزاد بسیار مشکل بوده و از بین بردن آن‌ها توسط روش‌های شیمیایی بسیار هزینه‌بر و خطرناک است. تا چند سال اخیر کاربرد سموم شیمیایی، رایج‌ترین روش در مدیریت این بیمارگر بوده است، اما در حال حاضر بر اساس توافقات بین‌المللی، کاربرد نماتدکش‌های شیمیایی در بعضی از کشورها به دلایلی از قبیل اثرات مخرب آن‌ها روی محیط زیست، سرطان‌زایی در انسان، ماندگاری در خاک و آلودگی آب‌های زیرزمینی ممنوع شده است (نعیمی و همکاران، ۱۳۹۲).

در دهه‌های اخیر، مدیریت زیستی بیمارگرهای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نموده است. تحقیقات نشان داده که استفاده از آنتاگونیست‌های مختلف از جمله قارچ تریکودرما به محیط خاک و ریزوسفر، می‌تواند از خسارت بیماری تا زیر آستانه زیان اقتصادی بکاهد (پیری‌پور و همکاران، ۱۴۰۱). موفقیت در مدیریت بیماری‌های گیاهی همراه با سلامت محیط زیست، توانسته مدیریت زیستی را یکی از مقبول‌ترین روش‌ها در مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی معرفی نماید. کنترل زیستی، دارای مکانیسم‌های مختلفی می‌باشد که توسط محققان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. برخی از این مکانیسم‌ها شامل آنتی‌بیوز، رقابت برای فضا و مواد غذایی (به‌خصوص آهن غیر قابل جذب)، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و پارازیتیسم، افزایش رشد گیاه و القا مقاومت می‌باشند (حیدری و اولیاء، ۱۳۹۶). عوامل کنترل زیستی قارچی، در دو دهه اخیر از اهمیت زیادی در مدیریت بیماری‌های گیاهی برخوردار شده‌اند. آنتاگونیست‌های قارچی مانند *Trichoderma* به‌طور چشم‌گیری برای مدیریت بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی به‌کار می‌روند. گونه‌های قارچ *Trichoderma* sp.، از جمله هیفومیست‌های خاکزی هستند که به‌دلیل تنوع متابولیسمی و قدرت رقابتی در اغلب مناطق از موجودات غالب میکروفلور خاک می‌باشند. این قارچ، ترکیبات متنوعی با خاصیت آنتی‌بیوتیکی تولید می‌کند؛ برای مثال، جدایه‌های مختلف این قارچ، بیش از یک‌صد نوع متابولیت با خاصیت آنتی‌بیوتیکی تولید می‌کنند (Schuster and Schmoll, 2010). قارچ *Trichoderma* با مواد مترشحه از بذرها که باعث تحریک جوانه‌زنی اسپور قارچ می‌شود و نیز برای تصاحب غذا و مکان، با میکروارگانیسم‌های ریزوپلان رقابت می‌کند. گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* به‌عنوان محرک رشد و توسعه گیاهان عمل می‌کنند و باعث بهبود رشد در سیستم‌های کنترل شده و طبیعی می‌گردند (Harman, 2006). تحقیقات متعددی نیز القای مقاومت سیستمیک در گیاه توسط گونه‌های *Trichoderma* را تأیید کرده‌اند. کلونیزه شدن سطح ریشه گیاه توسط قارچ *Trichoderma* می‌تواند با ایجاد مقاومت القایی سیستمیک، منجر به کاهش حمله مستقیم عوامل بیماری‌زا گردد. علاوه بر این ویژگی‌ها، جدایه‌های این قارچ، با تولید آنزیم‌ها و سایر متابولیت‌ها به‌عنوان عوامل قارچی مهم در مهار زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Samuels, 1996).

در مطالعه‌ای، بیان شد که موفقیت در کنترل بیماری‌های گیاهی همراه با سلامت محیط زیست، توانسته کنترل زیستی را یکی از مقبول‌ترین روش‌های کنترل بیماری‌های گیاهی در مبارزه تلفیقی معرفی نماید. در این

راستا، استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاک، مانند گونه‌های مختلف تریکودرما از اهداف کشاورزی پایدار به‌شمار می‌روند (Siddiqui *et al*., 2001).

استفاده از گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* به‌عنوان عوامل کنترل زیستی، نخستین بار توسط ویندلینگ، مطرح و مورد بررسی قرار گرفت (Weindling, 1932). گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* از جمله قارچ‌های آزادزی هستند و در تعامل با میکروارگانیسم‌های دیگر بوده و تقریباً در تمام زیستگاه‌های متنوع وجود دارند. قارچ *T. harzianum* سازوکارهای مختلفی، از جمله تأثیر مستقیم بر نماتد و تخم آن‌ها دارد و عامل مهمی جهت کنترل زیستی *M. arenaria* به‌شمار می‌رود (Windham *et al*., 1989). گونه‌های قارچ *Trichoderma* به‌علت داشتن نرخ تولیدمثلی زیاد علیه عوامل بیماری‌زا، به‌کارگیری مکانیسم‌های رقابت، خاصیت انگلی، آنتی‌بیوز و تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر آنزیم‌های آمیلولیتیک، پکتولیتیک، پروتولیتیک، لیپولیتیک، کینولیتیک و سلولیتیک و همچنین، کارآیی در تحریک رشد و القای مقاومت در گیاهان، در زمره عوامل مهم کنترل زیستی بسیاری از عوامل بیماری‌زا، از جمله نماتدهای انگل گیاهی قرار دارند (Howell, 2003). در تحقیقی مشخص شد که رشد گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با جدایه *T. harzianum* T-203 پس از کشت در خاک‌های آلوده به نماتد ریشه‌گرهی، افزایش یافته و گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد (بدون قارچ) کاهش یافت (Sharon *et al*., 2001). در پژوهشی گزارش شد که تیمار خاک با قارچ *T. harzianum T12* و *T. koningii* منجر به کاهش تولید توده تخم در نماتد *M. arenaria* گردید (Windham *et al*., 1989). با بررسی اثر پارازیتیسم مستقیم بین قارچ *T. harzianum* و نماتد مولد سیست طلایی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی، نتیجه گرفته شد که قارچ در سیست و تخم داخل آن نفوذ کرده و قادر به از بین بردن لاروهای نماتد می‌باشد (Saiffullah and Thomas, 1996). مطالعه ارتباط متقابل بین میسلیوم قارچ *T. harzianum* و میسلیوم چندین قارچ بیمارگر گیاهی، مؤید قدرت بالای پارازیتیسم قارچ تریکودرما می‌باشد (Elad *et al*., 1980).

هدف از این تحقیق، ارزیابی توانایی آنتاگونیستی دو گونه از قارچ تریکودرما به نام‌های *Trichoderma harzianum* BI و *Trichoderma harzianum* Iran 2375c برای کنترل نماتد ریشه‌گرهی توتون *Meloidogyne incognita* بوده است و اثر آن‌ها روی کاهش خسارت ناشی از این نماتد، در دو آزمایش جداگانه در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

### عامل بیماری

ریشه‌های توتون آلوده به نماتد ریشه‌گرهی از سه مزرعه توتون آلوده در اطراف شهرستان گرگان، تهیه و از هر مزرعه، پنج نمونه جمع‌آوری و به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش منتقل شدند. تکثیر نماتد با روش توده تخم منفرد روی توتون رقم K326 انجام شد. برای شناسایی گونه نماتد، از انتهای بدن نماتد ماده، مطابق کلید (Jepson, 1987)، برش تهیه و مشخصات ریختی آن بررسی گردید. پس از چندین دوره تکثیر متوالی نماتد، جمعیت کافی از نماتد خالص *M. incognita* تولید شد. استخراج تخم و لارو سن دو نماتد با استفاده از روش (Hussey and Barker, 1973) انجام شد.

### تهیه جدایه‌های قارچ آنتاگونیست

دو جدایه از قارچ تریکودرما به نام‌های *Trichoderma harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c از آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، به‌صورت خالص تهیه شد. به منظور تهیه تک اسپور و تکثیر این دو جدایه، برای هر یک به‌طور جداگانه، قطعاتی با اندازه پنج تا هفت میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه درون ظروف پتری‌دیش حاوی محیط کشت PDA=Potato Dextrose Agar قرار داده شد و سپس، به‌مدت ۴۸ ساعت، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، درون انکوباتور

نگهداری گردیدند. پس از تهیه سوسپانسیون اسپور در آب مقطر استریل، با استفاده از لام گلبول‌شمار، غلظت مؤثر $10^6$ spore/mL از این دو قارچ آنتاگونیست، برای استفاده در آزمایشات، تهیه شد (ناصری‌نسب و همکاران، ۱۳۹۲).

**اثر مستقیم قارچ‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c روی تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه**

در این آزمایش، پلاک‌های پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c به‌طور جداگانه برای هر جدایه، در وسط ظروف پتری حاوی آب آگار دو درصد قرار داده شد و پس از رسیدن کلنی قارچ به حاشیه پتری (پس از ۱۰ روز)، یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی جمعیت ۵۰ عدد تخم *M. incognita* استریل شده توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به تشتک‌های پتری اضافه شد. به پتری‌های شاهد، که فقط حاوی آب مقطر استریل و بدون قارچ بودند، نیز به همان نسبت، سوسپانسیون تخم اضافه شد. سپس، پتری‌ها، به‌مدت ۱۴ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، نگهداری شدند و بعد از گذشت این زمان، تعداد تخم‌های تفریخ شده نماتد در تیمار و شاهد شمارش شدند (Irfan *et al*., 2005).

**اثر مستقیم قارچ‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دو نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه**

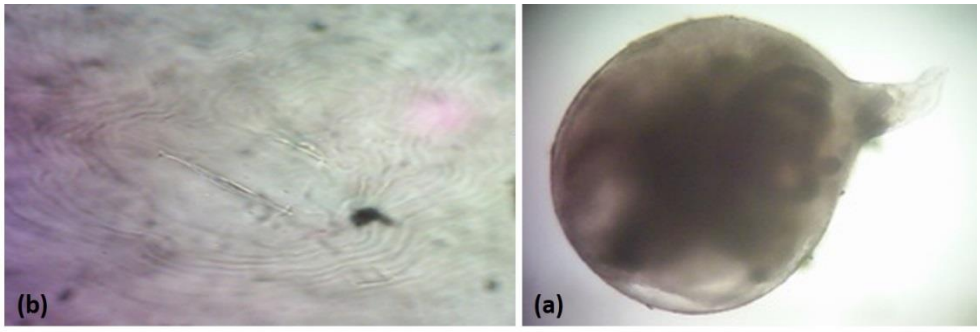
در این آزمایش، از کشت ۱۰ روزه دو جدایه *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c به‌طور جداگانه برای هر جدایه، روی محیط آب آگار استفاده شد و سوسپانسیونی از لاروهای تازه تفریخ شده و استریل نماتد با جمعیت حدود ۳۰ لارو در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه و به تشتک‌های پتری اضافه و سپس، درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس، نگهداری شدند. پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان مرگ‌ومیر لاروها در پتری‌های تیمار و شاهد شمارش شدند. پتری‌های شاهد، فقط حاوی آب مقطر استریل و بدون قارچ بودند (Irfan *et al*., 2005).

کلیه آزمایشات، در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط آزمایشگاه اجرا شد. داده‌های حاصل از این تحقیق، با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (9.1) آنالیز و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

## نتایج

**شناسایی گونه نماتد ریشه‌گرهی**

گونه نماتد با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی نماتد ماده و با استفاده از کلید شناسایی (Jepson, 1987)، *M. incognita* تشخیص داده شد (شکل ۱- a و b).




شکل ۱- نماتد ماده ریشه‌گرهی (*M. incognita*) با بزرگنمایی × ۴۰ (a) الگوی انتهای بدن نماتد ماده گونه *M. incognita* (b)

Fig. 1. Root-Knot nematode, *M.. incognita* X40 (a) Perineal pattern on female *M. incognita* nematodes (b)

### بررسی اثر مستقیم قارچ‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum Iran* 2375c روی تفریخ تخم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه

نتایج حاصل از این بررسی، بیانگر نقش مؤثر و معنی‌دار دو جدایه از قارچ‌های آنتاگونیست *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c روی عدم تفریخ تخم و همچنین، مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد ریشه‌گرهی توتون (*M. incognita*) بود.

نتایج حاصل از بررسی اثر مستقیم جدایه‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c در شرایط آزمایشگاه، نشان داد که بیشترین درصد تخم‌های تفریخ نشده نماتد *M. incognita* پس از ۱۴ روز، در اثر تیمار با جدایه *T. harzianum* BI با حدود ۸۶/۷ درصد مشاهده شد که در بالاترین گروه آماری قرار گرفت و بعد از آن، تیمار *T. harzianum* Iran 2375c قرار داشت که دارای ۷۷ درصد تأثیر روی عدم تفریخ تخم این نماتد بود. تیمار شاهد که در آن فقط از آب مقطر استریل علیه تفریخ تخم‌های این نماتد استفاده شده بود، با ۱۹ درصد تأثیر، دارای کمترین میزان بوده و در پایین‌ترین گروه آماری نسبت به سایر تیمارها قرار داشت (جدول ۱).

جدول ۱- اثر جدایه‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c بر تفریخ تخم و مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه

Table 1. The effect of *T. harzianum* BI and *T. harzianum* Iran 2375c isolates on the hatching of nematode *M. incognita* eggs and larval mortality in laboratory conditions

| تیمار Treatment | | نرخ بازدارندگی از تفریخ تخم پس از ۱۴ روز (٪) Suppression rate of egg hatching in 14 days (%) | مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم (٪) Mortality of second stage juvenile ($J_2$) (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | ۴۸ ساعت 48 h | ۷۲ ساعت 72 h |
| *T. harzianum* BI | | 86.7 [b] | 59.1 [a] | 69.5 [a] |
| *T. harzianum* Iran 2375c | | 77 [b] | 48.2 [b] | 60.1 [b] |
| Control | شاهد | 19 [c] | 10.8 [c] | 21.3 [a] |

میانگین‌هایی که در هر ستون، با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با همدیگر دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

The averages shown with different letters in each column have a significant difference with each other at the 1% probability level.

### بررسی اثر مستقیم قارچ‌های *T. harzianum BI* و *T. harzianum Iran 2375c* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دو نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه

بررسی نتایج حاصل از اثر مستقیم جدایه‌های *T. harzianum* BI و *T. harzianum* Iran 2375c روی درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه، نشان داد که جدایه‌های مورد استفاده قارچ تریکودرما، توانستند به‌خوبی تعداد لاروهای نماتد را کاهش دهند. در این آزمایش، درصد مرگ‌ومیر لاروها بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. بیشترین درصد مرگ‌ومیر لاروهای نماتد *M. incognita* در تیمار *T. harzianum* BI مشاهده شد که بعد از گذشت ۷۲ ساعت، باعث افزایش مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد به میزان ۶۹/۵ درصد گردید. بعد از آن، تیمار *T. harzianum* Iran 2375c قرار داشت که بعد از گذشت ۷۲ ساعت، باعث افزایش مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد به میزان ۶۰/۱ درصد شد. کمترین درصد مرگ‌ومیر لاروها، مربوط به تیمار شاهد بود که بعد از گذشت ۴۸ ساعت، دارای ۱۰/۸ درصد تأثیر و بعد از گذشت ۷۲ ساعت، دارای ۲۱/۳ درصد تأثیر روی درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* بود که در پایین‌ترین گروه آماری قرار گرفت (جدول ۱).

**بحث**

نتایج آزمایشات کنترل زیستی دو جدایه از قارچ *T. harzianum* علیه نماتد ریشه‌گرهی توتون در شرایط آزمایشگاه، نشان داد که این آنتاگونیست‌ها، توانایی پارازیته نمودن تخم و همچنین لاروهای سن دوم نماتد در محیط کشت را دارا می‌باشند. این توانایی می‌تواند در اثر تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک و متابولیت‌های ثانویه و همچنین تولید برخی آنزیم‌های تجزیه‌کننده کوتیکول نماتدها مانند پروتئاز در مقابل لاروهای سن دوم نماتد باشد (Khan and Saxena, 1997). با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات متعدد، می‌توان استنباط کرد که غلظت $10^6$ اسپور در میلی‌لیتر از قارچ *T. harzianum* می‌تواند به‌عنوان یک غلظت مؤثر در مبارزه با نماتد ریشه‌گرهی در مطالعات انتخاب شود (صاحبانی و همکاران، ۱۳۸۵؛ ملکی زیارتی و همکاران، ۱۳۸۸؛ ناصری‌نسب و همکاران، ۱۳۹۲). بررسی میزان تأثیر غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* علیه نماتد *M. javanica* نشان داد که وزن تر ریشه در غلظت $10^6$ اسپور در میلی‌لیتر از این قارچ، نسبت به غلظت‌های کمتر و شاهد، اختلاف معنی‌دار داشت. بررسی مقایسه غلظت‌های مختلف قارچ *T. harzianum* روی وزن تر اندام هوایی نشان داد که غلظت $10^6$ اسپور در میلی‌لیتر از این قارچ، نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد، اختلاف معنی‌دار داشت (ملکی‌زیارتی و همکاران، ۱۳۸۸).

با توجه به وجود کیتین در لایه‌های میانی پوسته تخم نماتد با ضخامت ۰/۴ میکرومتر، به نظر می‌رسد که این دو جدایه از قارچ *T. harzianum*، توسط تولید آنزیم کیتیناز، مانع از تفریخ تخم‌های نماتد می‌شوند (Brant *et al*., 2000). در تحقیق مشابهی، متابولیت‌های خارج سلولی در آزمایش محیط کشت فیلتر شده تریکودرما توانستند به میزان ۳۰/۸ درصد، باعث مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد ریشه‌گرهی در گوجه‌فرنگی شوند (Al Fattah *et al*., 2007). در پژوهش دیگری، جدایه Th از قارچ *T. harzianum* توانست تعداد گال‌ها را بر روی ریشه گیاه گوجه‌فرنگی کاهش دهد (Khattak and Stephen, 2008). در پژوهش دیگری، جدایه *T. virens* G1-3 در کاهش جمعیت نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) مؤثر شناخته شد (Meyer *et al*., 2000). این جدایه و باکتری *Burkholderia cepacia* Bc-2 علیه این نماتد مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که محیط کشت فیلتر شده حاوی ترکیبات خارج سلولی قارچ و باکتری، از تفریخ تخم و حرکت لاروهای سن دوم نماتد جلوگیری کرد. همچنین، آغشته کردن ریشه‌های گوجه‌فرنگی به محیط کشت فیلتر شده *T. virens* باعث شد که تعداد تخم و لارو نماتد در گرم ریشه، به میزان ۴۲ درصد نسبت به شاهد، کاهش یابد. در تحقیق حاضر، نیز جدایه *T. harzianum* BI روی تفریخ تخم نماتد *M. incognita* به میزان ۸۶/۷ درصد و روی درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم، بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب، به میزان ۵۹/۱ و ۶۹/۵ درصد مؤثر بوده است.

در پژوهش انجام شده توسط هاشمی و همکاران (۱۳۹۷) به منظور مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) توسط جدایه قارچ *T. harzianum* Iran 2375c در گیاه خیار، گزارش شد که بین زمان‌های مختلف مورد مطالعه (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، اختلاف معنی‌دار وجود داشت و مؤثرترین زمان در مرگ‌ومیر لاروهای جوان سن دو و همچنین، عدم تفریخ تخم نماتد، زمان ۷۲ ساعت بود، که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشت.

در پژوهش دیگری، اثر عصاره کشت سه جدایه Th-3، Th-2 و Th-1 از قارچ *T. harzianum* علیه لاروهای جوان سن دوم نماتد *M. javanica* به‌کار برده شد و اختلاف معنی‌داری در مرگ‌ومیر لاروهای جوان سن دوم در همه جدایه‌ها، نسبت به شاهد مشاهده گردید (Al-Ameiri, 2009) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشت. نتایج ارزیابی عدم تفریخ تخم نماتد *M. javanica* تحت تأثیر دو جدایه از قارچ *T. harzianum* (شهرکرد و همدان)، بیانگر بیشترین اثر ممانعت‌کننده بر تفریخ تخم از جدایه شهرکرد طی ۲۴ ساعت بود (حیدری و اولیاء، ۱۳۹۶).

در پژوهش دیگری جدایه *T. harzianum* T-12 و *T. koningii* T-8 در کاهش تولید تخم و لارو نماتد ریشه‌گرهی (*M. arenaria*) در خاک تأثیر داشت (Windham *et al*., 1989). اثر متقابل بین قارچ *T. harzianum* و نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که قارچ تریکودرما،

سیست‌های نماتد طلایی سیب‌زمینی را کلونیزه کرده و به تخم‌های داخل سیست نیز نفوذ کرده و باعث مرگ لاروهای نماتد می‌گردد (Siffullah and Thomas., 1996). به منظور بررسی کنترل زیستی نماتد ریشه‌گرهی (*M. javanica*) توسط قارچ *T. harzianum*، چندین جدایه از قارچ مذکور مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصل مشخص نمود کـه هـمه جـدایه‌های *T. harzianum*، تخم‌ها و لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* را در شرایط آزمایشگاه کلونیزه کردند (Sharon *et al*., 2007). دو جدایه از گونه *T. harzianum* به نام‌های T- 203 و T-35 به‌عنوان عوامل کنترل زیستی موفق علیه نماتدهای ریشه‌گرهی معرفی شدند که تا حدوی با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت داشت (Sikora *et al*., 2003). در پژوهش دیگری، که به منظور مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی (*M. javanica*) در گوجـه‌فرنـگـی، با اسـتفـاده از قارچ‌های *Talaromyces flavus* و *T. harzianum* در شرایط گلخانه انجام شد، گزارش شد که بین تیمارهای آزمایش، کمترین تعداد تخم و جمعیت نماتد، متعلق به بوته‌های تیمار شده با ترکیب دو گونه قارچ آنتاگونیست بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده در سطح احتمال پنج درصد نشان داد و به‌طور میانگین، جمعیت نماتد را تا ۸۰ درصد کاهش داد. در بررسی تأثیر هر یک از قارچ‌های مذکور به تنهایی، قارچ‌های *T. harzianum* و *T. flavus* به ترتیب، باعث ۷۸ و ۶۷ درصد کاهش جمعیت نماتد *M. javanica* شدند. تیمار *T. harzianum* نسبت به تیمار *T. flavus*، تأثیر بیشتری در افزایش رشد رویشی و کاهش جمعیت نماتد داشت، اما اختلاف بین آن‌ها معنی‌دار نبود (ابوترابی و نراقی، ۱۳۹۵).

عوامل آنتاگونیست، با مکانیسم‌های مختلفی، موجب محدودیت رشد و بیماری‌زایی عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌گردند. عوامل آنتاگونیست، همراه با رشد سریع در محل ریشه، با بافت گیاه رابطه متقابل دارنـد و تـغییرات بـیوشـیمیایی متفاوتی از قبیـل افـزایش فعـالـیت آنزیم‌ها، تشـکـیل سـدهـای ساخـتمانی و تجمع فیتوالکـسین‌هـا را در زخـم‌ها القا می‌کننـد (El- Ghaouth *et al*., 1998). به‌عنوان مثال، قارچ *T. harzianum* با ایجاد رقابت، خواص مایکوپارازیتیسمی و تولید آنزیم و ترکیبات سمی با عوامل بیماری‌زا مقابله می‌کند. این قارچ، دارای مکانیسم‌های ایجاد ترکیبات ضدنماتدی و اثر مستقیم روی لاروهای سن دوم و تخم نماتد بوده و همچنین، با کاهش میزان جذب نماتدها توسط ریشه، نفوذ آن‌ها را محدود کرده و علاوه بر این، با القای مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل حمله نماتد، موجب محدودیت بیماری‌زایی آن می‌شود. به‌طوری‌که می‌توان نتیجه گرفت که قارچ *T. harzianum* با مکانیسم‌های مختلفی بر علیه نماتدها مؤثر می‌باشد (Benitez *et al*., 2004).

## نتیجه‌گیری و پیشنهاد

با توجه به کنترل موفـق نـمـاتـد ریـشه‌گـرهـی تـوتـون (*M. incognita*) در شـرایط آزمایشـگاه، ایـن دو جدایه از قارچ *T. harzianum* می‌توانند به‌عنوان عوامل کنترل زیستی موفق علیه نماتد ریشه‌گرهی به‌کار روند. همچنین، با توجه به این‌که بسیاری از عوامل زراعی مانند تناوب، افزایش مواد اصلاح‌کننده خاک، تغییرات اسیدیته محیط، تغییر بافت خاک و غیره، می‌توانند در استقرار آنتاگونیست‌ها مؤثر باشند و اثر آن‌ها را افزایش یا کاهش دهند، لذا پیشنهاد می‌شود که اثر این دو جدایه قارچی، در شرایط مزرعه‌ای و خاک‌های دارای آلودگی طبیعی به نماتد ریشه‌گرهی توتون به منظور شناسایی تیمارهای برتر و بالا بردن کارایی عوامل کنترل زیستی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

## سپاس‌گزاری

از زحمات مدیریت، معاونت تحقیقات و نیز از آقای مهندس سید افشین سجادی در اجرای آزمایشات این پژوهش، تقدیر و سپاس‌گزاری می‌گردد.

**منابع** **References**


**ابوترابی، ا. و نراقی، ل. ۱۳۹۵.** مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) در گوجه‌فرنگی با استفاده از قارچ‌های *Talaromyces flavus* و *Trichoderma harzianum* در شرایط گلخانه. مهار زیستی در گیاه‌پزشکی ۴(۲): ۹-۱.

**ایزدپناه، ک.، اشکان، م.، بنی‌هاشمی، ض.، رحیمیان، ح. و میناسیان، و. ۱۳۸۹.** بیماری‌شناسی گیاهی. نشر آییژ. ۳۲۸ صفحه.

**پیری‌پور، ن.، عباسی، خ. و بیگی، س. ۱۴۰۱.** ارزیابی آنتاگونیستی برخی جدایه‌های قارچی روی نماتد ریشه‌گرهی خیار (*Meloidogyne javanica*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. دو فصلنامه علمی علوم سبزی‌ها ۱۱ (۱): ۱۲۷-۱۱۳.

**حیدری، ف. و اولیاء، م. ۱۳۹۶.** بررسی کاربرد جداگانه و تلفیقی قارچ *Trichoderma harzianum* i2375c و ورمی‌کمپوست در مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی (*M. javanica*). پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۶ (۳): ۱۲-۱.

**صاحبانی، ن.، روستایی، ع. و هادوی، ن. ۱۳۸۵.** بررسی کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) توسط قارچ *Trichoderma viride*. علوم کشاورزی ایران ۳۷(۳): ۴۱۱-۴۰۵.

**ملکی‌زیارتی، ح.، روستایی، ع.، صاحبانی، ن.، اعتباریان، ح.ر. و امینیان، ح. ۱۳۸۸.** بررسی امکان کنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه گوجه‌فرنگی *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood به وسیله قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در گلخانه و تغییرات کمی ترکیبات فنلی در گیاه. مجله به‌زراعی نهال و بذر ۲۵(۳): ۲۷۲-۲۵۹.

**ناصری‌نسب، ف.، صاحبانی، ن. و اعتباریان، ح. ر. ۱۳۹۲.** مطالعه اثر قارچ آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* BI بر القای پاسخ دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتد مولد گره‌ریشه (*Meloidogyne javanica*). تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۱(۴): ۱۲–۱.

**نعیمی، س.، رهنما، ک.، طاهری، ع. و داوران، ت. ۱۳۹۲.** بررسی اثر متقابل قارچ *Trichoderma spp.* با نماتد مولد گره‌ریشه (*Meloidogyne* spp.) روی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای. دومین همایش ملی توسعه پایدار کشاورزی و محیط زیست سالم. صفحه ۱۰.

**هاشمی، م.، اولیاء، م. و جمالی زواره، ع. ۱۳۹۷.** مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne incognita*) توسط قارچ *Trichoderma harziannum* Iran 2375c در خیار. مهار زیستی در گیاه‌پزشکی ۶(۲): ۹۱-۸۱.

**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. and Sikora, A. 2007.** Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato. Jordan Journal Agricultural Sciences 3: 297-309.

**Benitez, T., Rincon, M.A., Limon, M.C. and codon, A.C. 2004.** Biological mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249-260.

**Brants, A., Brrown, C.R. and Earir, E.D. 2000.** *Trichoderma harzianum* endochitinase does not provide resistance to *Meloidogyne hapla* in tobacco. Journal of Nematology 32: 289-296.

**Elad, I., Chet, I. and PandKatan, J. 1980.** *Trichoderma harzianum*: A biological agent effective against *Sclerotinia rolfsii* and *Rhizoctinia solani*. Phytopathology 70: 119-121.

**El-Ghaouth A., Wilson, C.L. and Wisniewski, M. 1998.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Journal of Phytopathology 88: 282-291.

**Harman, G.E. 2006.** Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96(2): 190-194.

**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.

**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.

**Irfan, U.D., Saifullah-Khan, H. and Khattak, B. 2005.** Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Trichoderma harzianum* and spent mushroom compost in tomato under field conditions. Pakistan Journal of Phytopathology 17: 144-145.

**Jepson, S.B. 1987.** Identification of Root–Knot Nematodes *Meloidogyne* species. Wallingford, UK: CAB International. 265pp.

**Khan, T.A. and Saxena, S.K. 1997.** Effect of root dip treatment with fungal filtrates on root penetration, development and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. International Journal of Nematology 7: 85-88.

**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.

**Meyer, S.L.F., Massoud, S.I., Chitwood, D.J. and Roberts, D.P. 2000.** Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Nematology 2(8): 871-879.

**Samuels, G.J. 1996.** *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100(8): 923-935.

**Schuster, A. and Schmoll, M. 2010.** Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87(3): 787-799.

**Saiffullah Khan, H. and Thomas, B.J. 1996.** Studies on the parasitism of *Globodera rostochiensis* by *Trichoderma harzianum* using low temperature scanning electron microscopy. Afro-Asian Journal of Nematology 6: 117-122.

**Sikora, R.A., Niere, B. and Kimenju, J. 2003.** Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. pp. 179-192. In: Neuenschwander, P., Borgermeister, C. and Langewald, J. (eds.). Biological Control in IPM Systems in Africa. Wallingford, UK: CABI Publishing.

**Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O. and Spiegel, Y. 2001.** Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 91(7): 687-693.

**Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H. and 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. and Shaukat, S.S. 2001.** Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica*, root-knot nematode in the okra and mung bean. Pakistan Journal of Biological Sciences 4(7): 846-848.

**Weindling, R. 1932.** *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22(10): 837-845.

**Windham, G.I., Windham, M.T. and Williams, W.P. 1989.** Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. Plant Disease 73: 493-495.

# Evaluation of the antagonistic ability of two isolates of *Trichoderma harzianum* against Tobacco root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)

**M. Shazdeahmadi***

Received: 30 Apr., 2024 Accepted: 8 Jul., 2024

**ABSTRACT**

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) are one of the most important plant parasitic nematodes in the world. In recent years, the biological control of root-knot nematodes is considered a priority, to reduce the dangerous effects of chemical toxins, including threats to human health and environmental pollution. Antagonists are one of the effective factors in biological control. In order to biologically control tobacco root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*), the antagonistic ability of two isolates of *Trichoderma harzianum* was investigated in laboratory conditions in a Completely Randomized Design (CRD) project in 4 replications. In laboratory studies, the effect of the culture extract of two isolates of *Trichoderma*, including *Trichoderma harzianum* BI and *Trichoderma harzianum* Iran 2375c with a concentration of 106 spores/mL, on the mortality of the second-stage juveniles (J2) after 48 and 72 hours and egg hatching of *M. incognita* in tobacco were evaluated at 48 and 72 hours. The experiment condition retained till 14 days. The average comparison showed that the most effective treatment was the *T. harzianum* BI isolate, after 14 days, caused 86.7 % decrease in egg hatching rate and after 72 hours, caused 69.5 % on the mortality of second-stage juveniles (J2) of *M. incognita*. In general, the results obtained from this research showed that the culture extracts of both *T. harzianum* isolates have good antagonistic ability against the *M. incognita*.

**Key words:** Biological control, antagonistic, *Nicotiana tabacum*, *Trichoderma harzianum* BI, *T. harzianum*

Researcher, Department of Biotechnology, Tirtash Tobacco Research and Education Center, Behshahr, Mazandaran, Iran

**Corresponding author:** noshinshazdeahmadi@yahoo.com