آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۹۱، شماره ۲، اسفند ۱۴۰۲
Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 91, No. 2, March 2024
DOI: 10.22092/JAEP.2023.362756.1483

مقاله پژوهشی

اثربخشی تریکودرما به‌عنوان محرک دفاعی گیاه در دانهال پسته علیه نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*

زهرا فاریابی[۱]، حسین علایی[۲]✉، اعظم زین‌الدینی ریسه[۳]، نرگس حاتمی[۴]

۱، ۲، ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران؛
۴- استادیار، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲)

چکیده

در این پژوهش توانایی گونه‌های *Trichoderma* در مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی از مسیرتغییرات ترکیبات بیوشیمیایی درگیر در دفاع القایی در دانهال پسته بررسی شد. ترکیبات زیستی تریکودرما شامل سوسپانسیون اسپور و عصاره خام به‌دو روش خاک کاربرد و محلول‌پاشی استفاده شدند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی مشخص کرد که این محرک‌ها موجب تجمع آنزیم‌های پراکسیداز (POX)، پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) و ترکیبات فنلی دانهال‌ها و در نتیجه افزایش مقاومت آن‌ها در برابر بیمارگر شدند. ترکیبات زیستی و سویه‌های تریکودرما نسبت به ترکیبات شیمیایی از نظر افزایش سطح آنزیم و دوام آن در گیاه عملکرد بهتری را نشان دادند. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های POX، PPO، PAL و محتوای فنل کل، نمونه‌برداری در روز اول، چهارم، هشتم و دوازدهم پس از مایه‌زنی نماتد انجام شد. بیشترین افزایش آنزیم POX، در روز چهارم و هشتم به‌ترتیب در روش محلول‌پاشی و خاک‌کاربرد مشاهده شد. میزان آنزیم PPO در تیمارخاک‌کاربرد سوسپانسیون اسپور همراه با عصاره خام در روزهای هشتم و دوازدهم افزایش بیشتری داشت. همچنین بیشترین میزان آنزیم PAL روز چهارم وهشتم در تیمار عصاره خام و سوسپانسیون اسپورمخلوط سویه‌ها به‌همراه عناصر غذایی مشاهده شد. در تیمار ترکیبات زیستی، میزان فنل کل در روزهای هشتم و دوازدهم به‌سرعت افزایش یافت.

واژه‌های **کلیدی**: پسته، تریکودرما، مهارزیستی، نماتد ریشه‌گرهی

Efficacy of *Trichoderma* as stimulator of plant defense in pistachio seedlings against root-knot nematode *Meloidogyne javanica*

Z. FARYABI[1], H. ALAEI[2]✉, A. ZEYNADDINI RISE[3], N. HATAMI[4]

1,2,3. MSc Student, Associate Professor, Assistant Professor of Dept. Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran; 4- Assistant Professor of Research Institute of Forests and Rangeland, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

In this research, the potential of *Trichoderma* species in biocontrol of root-knot nematode was investigated through the changes of the biochemical compounds involved in induced defense in pistachio seedlings. *Trichoderma* compounds, including spore suspension and crude extract, were used by soil application and foliar spraying. The results of biochemical tests revealed that the used stimulants caused the accumulation of peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonialyase (PAL) and phenolic compounds of the seedlings and as a result increased their resistance against the pathogens. Biological compounds as well as *Trichoderma* isolates showed better performance than chemical compounds in terms of increasing the enzyme level and its durability. To measure the activity of enzymes and total phenol content, sampling was done on day 1, 4, 8, and 12 post inoculation of the nematode (dpi). The highest increase in POX was observed on the fourth and eighth dpi in the foliar and soil application methods, respectively. The amount of PPO in soil application with spore suspension and the crude extract had a greater increase on the eighth and twelfth dpi. The highest amount of PAL enzyme was observed on the fourth and eighth dpi using crude extract and spore suspension of the mixed strains with micronutrient. In treatment of biological compounds, the total phenolic content increased rapidly on the eighth and twelfth dpi.

Keywords: Biological control, pistachio, root knot nematode, *Trichoderma*

✉ **hossein.alaei@vru.ac.ir**

©2024, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) یکی از مهمترین محصولات باغی و صادراتی ایران می‌باشد که از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است. اگرچه ایران مهمترین تولیدکننده‌ی پسته در دنیا است، اما عملکرد پسته در برخی مناطق آن پایین است. استان کرمان به‌عنوان یکی ازتولیدکنندگان عمده پسته در جهان در تولید این محصول راهبردی با چالش‌هایی از جمله آفات و بیماری‌های گوناگون روبرو است که بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و ویروس‌ها از دلایل اصلی بهره‌وری پایین این محصول می‌باشند (Fattahi *et al*., 2020). حداقل ۳۰ بیماری مهم پسته درجهان گزارش شده است که نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) یکی از آنها است (de Oliveira *et al*., 2021; Teviotadle *et al*., 2002). دو گونه نماتد *M. incognita* و *M. javanica* از جمله گونه‌های غالب وخسارت‌زا در فون نماتدهای باغ‌های پسته در ایران معرفی شده‌اند (Ebadi *et al*., 2018). مهار نماتدهای ریشه‌گرهی به‌دلیل توانایی تولید مثل بالا، دامنه میزبانی وسیع و پراکندگی جغرافیایی گسترده بسیار سخت می‌باشد. چندین استراتژی مدیریتی، از قبیل روش‌هایی مانند تناوب زراعی، کودسبز، کشت مخلوط، اصلاح خاک، کشت ارقام مقاوم، عوامل مهار زیستی و نماتدکش‌های شیمیایی مختلف، برای مدیریت نماتد ریشه‌گرهی استفاده می‌شود (Bawa *et al*., 2020; Bhuiyan *et al*., 2018). نماتدکش‌های شیمیایی بسیار سمی هستند و عموماً باعث آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی می‌شوند و همچنین توسط گیاهان جذب می‌شوند در چند دهه اخیر به‌دلیل اثرات نامطلوب باقیمانده نماتدکش‌ها، چندین نماتدکش از بازار خارج شده‌اند (Singh *et al*., 2020). با توجه به ایجاد خسارت‌های زیست‌محیطی، تلاش محققین در سالیان گذشته برای مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها بیشتر شده است، معرفی آنتاگونیست‌ها از جمله تریکودرما به محیط خاک و ریزوسفر می‌تواند سبب کاهش خسارت حتی پایین‌تر از آستانه زیان اقتصادی شود (Wang *et al*., 2019).

قارچ تریکودرما به‌علت داشتن قدرت سازگاری بالا با شرایط مختلف محیطی توانایی بالایی در مهار زیستی عوامل بیماری‌زا دارد (Harman *et al*. 2021). در سال‌های اخیر از گونه‌های مختلف *Trichoderma* spp. به‌عنوان عامل زیست‌مهار، برای مهار بیشتر بیمارگرهای اندام‌های هوایی و ریشه گیاه از جمله نماتدهای ریشه‌گرهی در مناطق مختلف جهان استفاده شده است (Zin and Badaluddin, 2020; Martinez-Medina *et al*., 2017). این قارچ به‌عنوان کود زیستی به‌شیوه‌های مختلف از جمله ضدعفونی بذر، ضدعفونی ریشه نهال، خاک‌کاربرد و محلول پاشی استفاده می‌شود (Awad-Allah *et al*., 2022) و قابلیت فرموله شدن به اشکال مختلف گرانول، پودر، پودر وتابل و غیره را دارد که با توجه به‌نوع عامل بیمارگر یک یا چند روش کاربردی از قارچ تریکودرما مورد استفاده قرار می‌گیرد (Meher *et al*., 2020). از سازوکارهای مهم مهار زیستی تریکودرما می‌توان به تأثیر مستقیم شامل رقابت برای مواد مغذی یا فضا، تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار، آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی بیمارگر، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های بیمارگر و قارچ‌انگلی و اثرات غیرمستقیم شامل تغییرات ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی در گیاهان میزبان، مانند تحمل تنش، انحلال یا جداسازی مواد مغذی غیرآلی و القاء مقاومت در برابر بیمارگرهای مختلف قارچی اشاره کرد (Silva *et al*., 2019). ممکن است سازوکارهای مستقیم و غیر مستقیم مهار زیستی تریکودرما به‌صورت همزمان برعامل بیماری‌زا اثر کنند و عوامل محیطی مثل دما، اسیدیته و در دسترس بودن مواد غذایی بر توانایی مهار زیستی تریکودرما اثر بگذارند (Awad-Allah *et al*., 2022). این قارچ با تغییر در متابولیسم گیاه می‌تواند متابولیت‌های ثانویه (فرار و غیرفرار) و آنزیم‌های هیدرولیتیک (کیتینازها و پروتئاز) تولید کند که پوسته تخم و کوتیکول نماتدها را هدف قرار می‌دهد و باعث عدم تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دوم می‌شود. همچنین ریسه‌های این قارچ با ایجاد یک لایه محافظتی فیزیکی و شیمیایی روی ریشه، خسارت نماتد را کاهش می‌دهد

Sharma *et al*., 2021; Khan *et al*., 2020; Feyisa *et al*., 2016;) Al-Hazmi *et al*., 2016) و تا حدی از حرکت نماتد به‌سمت ریشه و در نتیجه آن نفوذ نماتد به درون ریشه جلوگیری می‌کند (Golzary *et al*., 2011). علاوه بر موارد اشاره شده، تقویت رشد گیاه توسط *Trichoderma* spp. نتیجه سازوکارهای مختلفی از جمله تولید ترکیبات هورمونی، محلول‌سازی فسفات و تولید سیدروفورها می‌باشد (Li *et al*., 2015). یکی از سازوکارهای مهم در عمل مهار زیستی این قارچ، القاء مقاومت است که هدف آن فعال کردن سیستم دفاعی گیاه و در نتیجه محدود کردن فعالیت بیمارگر است. مقاومت ایجاد شده اختصاصی نیست و در برابر طیف وسیعی از بیمارگرها مؤثر می‌باشد. القای سیستمیک سازوکارهای دفاعی گیاه در گوجه‌فرنگی به نماتد ریشه‌گرهی توسط سویه‌های مختلف *Trichoderma* ثابت شده است (de Medeiros *et al*., 2017; Martinez-Medina *et al*., 2017) این نوع مقاومت سبب تغییر در میزان آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و ترکیبات دیگری نظیر فنل در گیاه می‌شود (Alfiky and Weisskopf, 2021; El-Sharkawy *et al*., 2018). گونه‌های تریکودرما تعداد زیادی از متابولیت ثانویه مانند پپتایبول‌ها، گلیوتوکسین، گلیوویرین، پلی‌کتیدها، پیرون‌ها و ترپن‌ها را در مجاورت خود تولید و ترشح می‌کنند که فعالیت ضد میکروبی را در برابر بسیاری از بیماری‌ها نشان می‌دهند (Vizcaino *et al*., 2005; Vinale *et al*., 2008) همچنین باعث افزایش ترکیبات ضدمیکروبی مانند فنل‌ها در گیاه می‌شوند. ترکیبات فنلی شامل متابولیت‌های ثانویه معروف مانند فلاونوئید، تانن‌ها، هیدروکسی سینامیک اسیدها و لیگنین‌ها می‌شوند (Blokhina *et al*., 2003) این ترکیبات در شرایط طبیعی سنتز می‌شوند اما سنتز و تجمع آن‌ها به‌وسیله تنش‌های محیطی مثل UV، شدت نور بالا، دمای پائین، جراحت و حمله بیمارگرها القاء می‌گردد (Dixon, 1999) و در کاهش و یا مهار اکسیداسیون لیپیدها، حذف رادیکال‌های آزاد، قرار گرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های POX، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه زنجیره‌ی اکسیداتیو، دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Chen *et al*., 2019; He and Zhu 2008; Yamasaki *et al*., 1997). بسیاری از محققان تغییر ترکیبات فنلی و نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت درون گیاه بیمار را مورد مطالعه قرار داده‌اند و گزارش‌های این محققان نشان می‌دهد که تجمع مواد فنلی اغلب در ارتباط با واکنش‌های مقاومت در گیاه است (Alfiky and Weisskopf, 2021) برخی از این متابولیت‌ها مانند اسید استیک جدا شده از *T. longibrachiatum* فعالیت ضد نماتدی را در برابر *Meloidogyne* spp. نشان داده است (Djian *et al*., 1991). همچنین تحقیقات نشان داده است که تجمع سالیسیلیک اسید (SA) و بیان ژن‌های مربوط به بیماری‌زایی از طریق محلول‌پاشی برگی با بتا آمینو بوتیریک اسید(β-aminobutyric acid) و یا اسید سالیسیلیک به‌دلیل القای فعالیت دفاعی گیاه و ایجاد مقاومت سیستمیک القایی به‌تنهایی نیز در کنترل نماتد *M. javanica* در گیاه گوجه‌فرنگی مؤثر واقع شده است (Mostafanezhad *et al*., 2014). همچنین بتا آمینو بوتیریک اسید موجب کاهش نفوذ لاروهای سن دوم نماتد به‌درون بافت ریشه و به تعویق انداختن چرخه زندگی نماتد می‌گردد (Charehgani *et al*., 2014). بنابراین در این پژوهش با استفاده از ترکیبات زیستی بر پایه قارچ تریکودرما، به‌عنوان محرک سیستم دفاعی گیاه، تغییرات سطوح آنزیم‌های دفاعی و محتوای فنل کل در مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی در دو روش استفاده خاک‌کاربرد و محلول‌پاشی اندازه‌گیری شد و نتایج حاصله برای پژوهش‌های تکمیلی و کاربردی مورد استفاده قرار گرفت. لازم به‌ذکر است که در این تحقیق تاثیر عوامل مهار زیستی بر شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی در دانهال‌های پسته نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی زادمایه نماتد و قارچ‌های آنتاگونیست

به‌این منظور تک توده‌ی تخم نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* از خاک آلوده باغ‌های پسته جدا و در مجاورت گیاهچه

گوجه‌فرنگی (رقم سوپرچف) در شرایط گلخانه قرار داده شد و پس از دو ماه استخراج تخم و لارو سن دوم نماتد با استفاده از روش هوسی و بارکر (Hussey and Barker, 1973) انجام شد. برای شناسایی گونه نماتد از برش ناحیه کوتیکولی انتهای بدن نماتدهای ماده اسلاید میکروسکوپی تهیه و گونه نماتد *M. javanica* شناسایی گردید. برای تهیه سوسپانسیون نماتدی حاوی لاروهای سن دوم، از روش جپسون (Jepson,1987) و برای تعیین غلظت سوسپانسیون لاروی، از روش هوسی و بارکر (Hussey and Barker, 1973) استفاده شد و برای مایه‌زنی گلدان‌ها به‌ازای هر کیلوگرم از خاک گلدان‌ها ۲۰۰۰ لارو سن دوم استفاده گردید. به‌منظور مایه‌زنی، حفره نیمه عمیق در کنار هر بوته ایجاد و به‌کمک میکروپیپت حجم تعیین شده از سوسپانسیون لارو را درون حفره ریخته شد و بعد از اتمام کار دوباره پوشانده شد.

سویه‌های قارچ تریکودرما مورد استفاده در این پژوهش از کلکسیون بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان تهیه شدند. این سویه‌ها شامل گونه‌های *T. harzianum*، گونه *T. aureoviride* و گونه *Trichoderma guizhouense* می‌باشند که از خاک‌های شور و قلیایی باغ‌های پسته و مناطق مختلف استان کرمان توسط برآهویی و میرخانی (Brahoei, 2018; Mirkhani, 2013)، جداسازی و شناسایی شدند. از سویه‌های مورد نظر با استفاده از روش دنی و همکاران (Doni *et al.*, 2014) زادمایه اسپور قارچ تهیه و با استفاده از لام هموسایتومتر میزان اسپور برای مایه‌زنی گلدان‌ها به‌میزان ۲×۱۰^{۷} زادمایه در هر کیلوگرم خاک تعیین شد و برای تیمار شاهد، آب مقطر با مقدار مشابه به گلدان‌ها اضافه شد. از کشت‌های یک هفته‌ای آنتاگونیست با استفاده از روش گرینیر و همکاران، عصاره خام قارچ تهیه و تا زمان مصرف نگهداری شد (Grinyer *et al.*, 2005).

آزمایش گلخانه‌ای

بذرهای پسته رقم بادامی ریز زرند از پژوهشکده پسته کشور تهیه و پس از شستشوی سطحی و ضدعفونی و جوانه‌زنی در گلدان‌های سه کیلویی حاوی خاک و ماسه سترون به‌نسبت ۱:۲، تعداد پنج بذر کشت شد (Khatamidoost *et al.*, 2015). بعد از رشد دانهال‌ها، پیش تیمارهای خاک کاربرد حاوی تریکودرما دو هفته قبل از مایه‌زنی نماتد اعمال شد. در مرحله ۸-۶ برگی دانهال‌ها، ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد به‌ازای هر کیلوگرم خاک، به‌هرگلدان مایه‌زنی شد. استفاده از فعال کننده‌های زیستی و تجاری ISR2000، طی سه مرحله بعد از مایه‌زنی با نماتد، با فاصله ۱۰ روز با غلظت یک در هزار محلول‌پاشی شدند. نماتدکش ولوم (Velum) (پیریدینیل اتیل بنزامید) برای یک بار بر اساس دستورالعمل شرکت (۰/۸۹ میکرولیتر برای هر گلدان) به‌صورت خاک‌کاربرد استفاده شد. همچنین استفاده از ترکیبات زیستی، طی سه مرحله بعد از مایه‌زنی با نماتد، با فاصله ۱۰ روز به‌میزان ۲×۱۰^{۷} CFU/ml زادمایه در هر کیلوگرم خاک و ترکیب تجاری ISR2000 به‌صورت خاک‌کاربرد با میزان سه در هزار استفاده شد. برای تیمار ترکیبات شیمیایی سم نماتوزین با دو غلظت یک و دو میلی‌لیتر در متر مربع (۷/۰۸ و ۱۴/ ۱۶ میکرولیتر در هر گلدان) و همچنین سم ولوم، بر اساس دوز مصرفی شرکت سازنده بعد از مایه‌زنی با نماتد استفاده شد. عملکرد تیمارهای زیست مهار با نماتدکش‌های شیمیایی مقایسه گردید.

شاخص‌های ارزیابی ترکیبات زیستی در مهار نماتد ریشه‌گرهی

شمارش تعداد گال و کیسه تخم در ریشه و تعیین جمعیت لارو سن دوم

شاخص گال بر اساس روش تایلور و ساسر تعیین شد (Taylor and Sasser, 1978)، برای تعیین جمعیت لارو سن دوم در خاک، به‌ازای ۲۰۰ گرم خاک تعداد لاروهای سن دوم با روش سینی استخراج شد (Whitehead and Hemming, 1956) و شمارش لارو سن دوم توسط استریومیکروسکوپ با کمک لام مخصوص شمارش نماتد انجام و میانگین جمعیت محاسبه شد.

بررسی تغییرات بیوشیمیایی

بعد از مایه‌زنی دانهال‌های پسته با نماتد برای اندازه‌گیری سطوح آنزیم‌های دفاعی POX، PPO و PAL و فنل کل،

نمونه‌برداری در چهار زمان مختلف شامل روز اول، چهارم، هشتم و دوازدهم پس از مایه‌زنی نماتد انجام شد. نمونه‌های برگ جدا شده، بعد از قرارگرفتن در نایلون سریعاً به فریزر منتقل و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج آنزیم از بافت برگ با استفاده از روش روونی و همکاران استفاده شد (Reuveni *et al.*, 1994). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از پیش ماده گایاکول و میزان جذب نوری در طول موج ۴۷۰ نانومتر در زمان‌های صفر، ۶۰، ۱۲۰و ۱۸۰ ثانیه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانش شد. سپس با استفاده از ضریب خاموشی تتراگایاکول ($Cm^{-1}Mm^{-}$ ۲۵/۵[1]) مقدار تتراگایاکول تشکیل شده با فرمول $A=\varepsilon bc$ محاسبه گردید (Plewa *et al.*, 1991). برای اندازه‌گیری آنزیم پلی فنل اکسیداز براساس روش انیسه و همکاران (Anese *et al.*, 1994) از پیش ماده پیروگالل استفاده شد و فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالل($Mm^{-1}\ cm^{-1}$ ۲/۶) و فرمول $A=\varepsilon bc$ محاسبه شد و همچنین فعالیت آنزیمی از روش برادفورد (Bradford, 1976) محاسبه شد (مقادیر فرمول ذکر شده شامل A= جذب خوانده شده، ε= ضریب خاموشی، B= عرض کووت برابر با یک سانتیمتر و c = غلظت آنزیم می‌باشد.) برای اندازه‌گیری آنزیم PAL از فنیل آلانین به‌عنوان پیش ماده استفاده شد و فعالیت آنزیم بر حسب مقدار سینامیک اسید تولید شده تخمین زده شد (D'Cunha *et al.*, 1996). برای محاسبه مقدار سینامیک اسید تولید شده از منحنی استاندارد سینامیک اسید استفاده شد (Wang *et al.*, 2006). سنجش محتوای ترکیبات فنل کل با معرف فولین- سیاکالتیو انجام و غلظت ترکیبات فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد (Fleltcher and Kott, 1999).

واکاوی داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سوسپانسیون قارچ بصورت خاک‌کاربرد، ترکیبات زیستی تریکودرمایی بصورت خاک‌کاربرد و محلول‌پاشی، سموم شیمیایی و شاهد در حضور نماتد با شش تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده به‌کمک نرم افزار SAS نسخه ۹.۱ انجام شد. مقایسهٔ میانگین تیمارها با استفاده از روش آزمون دانکن و در سطح احتمال یک درصد محاسبه شد (Duncan and Ferris, 1983) همچنین جهت ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel استفاده گردید.

نتایج

ارزیابی عصاره خام و سوسپانسیون اسپور تریکودرما بر مهار نماتد ریشه‌گرهی پسته در گلخانه

نتایج آنالیز آماری و بررسی مقایسه میانگین اثر ترکیبات زیستی تریکودرما روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد بعد از تیمار سه ماهه دانهال‌های پسته نشان داد که تیمارهای مختلف تریکودرما تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد، روی فاکتورهای جمعیتی نماتد در مقایسه با تیمار شاهد نماتدی داشتند (جدول ۱)

تأثیر محرک‌های القایی با اندازه‌گیری تغییرات بیوشیمیایی

بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشخص کرد که فعالیت آنزیم‌های POX، PPO، PAL و ترکیبات فنلی در نهال‌های پسته در حضور نماتد ریشه‌گرهی، تحت تأثیر عامل آنتاگونیست و زمان و اثرات متقابل آنها در سطح احتمال پنج درصد قرار گرفتند (جدول۲).

آنزیم پراکسیداز (POX)

براساس جدول تجزیه واریانس مشخص شد که آنزیم POX تحت تاثیر معنا دارعامل بیماری، محرک‌های القایی و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمالی پنج درصد قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که دانهال‌های آلوده تیمار شده با محرک‌های القایی نسبت به دانهال‌های شاهد سالم و آلوده از نظر میزان فعالیت آنزیم POX افزایش معنی‌داری نشان دادند. همچنین در روز اول و چهارم بین اکثر تیمارهای مورد بررسی در حضور نماتد و شاهد تفاوت معنی‌دار وجود داشت. بالاترین سطح آنزیمی

POX در تیمار زیستی عصاره خام تریکودرما به‌همراه عناصر غذایی (محلول پاشی) در مقایسه دیگر تیمارها از روز اول و چهارم در نهال‌های تیمار شده در شرایط حضور نماتد از خود نشان داد که این میزان به‌ترتیب برابر با ۳۳/۳۳ و ۵۳/۳۳ درصد بود. در تیمار ترکیبات شیمیایی استفاده شده مجموعا مقدارآنزیم کمتری نسبت به‌ترکیبات زیستی استفاده شده داشتند و در تیمار ولوم افزایشی در سطح آنزیم POX مشاهده نشد. میزان فعالیت دو تیمار زیستی به‌روش محلول‌پاشی نسبت به شاهد و نماتد در تمامی روزها بیشتر می‌باشد. در تیمارترکیب تجاری ISR2000 به‌صورت خاک‌کاربرد و محلول‌پاشی، افزایش مقدار این آنزیم در روز اول مشاهده شد اما بعد از آن سیر نزولی داشت. مقایسه این ترکیب به دو روش استفاده شده (خاک‌کاربرد و محلول‌پاشی)، تفاوت در مقدار آنزیم در روزهای مختلف مشاهده شد اما در مجموع تفاوت چشمگیری با هم نداشتند. درحالی که در تیمارهای ترکیبات تریکودرمایی به‌روش محلول‌پاشی، سطح این آنزیم را بیشتر بالا برده بودند. در ترکیبات خاک‌کاربرد بیشترین مقدار مجموعاً در تیمار عصاره خام و سوسپانسیون اسپور سویه T127-12 با بیشترین سطح در روز هشتم مشاهده شد و بعد از آن سیر نزولی داشت (جدول۳).

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز (PPO)

براساس جدول تجزیه واریانس مشخص شد که آنزیم PPO تحت تاثیر معنادار عامل بیماری، محرک‌های القایی و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمالی پنج درصد قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در روز هشتم و دوازدهم بین تیمارهای مورد بررسی در حضور و عدم حضور نماتد با شاهد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. بالاترین سطح آنزیمی PPO در سوسپانسیون اسپور و عصاره خام مخلوط سویه‌ها به همراه عناصر غذایی (خاک‌کاربرد) و تیمار عصاره خام و سوسپانسیون اسپور سویه T79-2 به‌ترتیب با ٥٤/٨٣ و٨٣/٣٣ درصد در روزهای دوازدهم و هشتم در مقایسه با دیگر تیمارها از خود نشان می‌دهند. میزان آنزیم PPO در تیمار محلول پاشی ISR2000 در روز چهارم به میزان ١٦٦/٦٦درصد بیشتر از سایر تیمارها بود. کمترین فعالیت آنزیمی در تیمارها در ساعات اولیه و حداکثر فعالیت آنزیمی در روز چهارم و دوازدهم مشاهده شد. نتایج آنزیم PPO در حضور نماتد افزایش بیشتری در روز هشتم و دوازدهم نسبت به شرایط کنترل نشان می‌دهد به دلیل تحریک سیستم دفاعی گیاه در اثر حضور نماتد می‌باشد (جدول۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی در دانهال‌های پسته

Table 1. Variance analysis of treatments effect on pathogenicity indicator of root knot nematode on pistachio seedlings

Source of variation	Degree of freedom	# Galls/g of root	# Eggs/g of root	# J2/200g of soil
Treatment	11	967.88*	275.7*	**3733.38***
Error	40	107	37.76	**364**
Coefficient of variation %	-	19.37	27.07	**14.88**

* Indicate significant difference p<0.05.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم‌های دفاعی و ترکیبات فنلی در حضور نماتد ریشه‌گرهی در دانهال‌های پسته

Table 2. Variance analysis of treatments' effect on defense enzymes activity and phenolic compounds in the presence of root-knot nematode in pistachio seedlings.

Source of variation	Degree of freedom	POX[1]	PPO[2]	PAL[3]	Phenol
Treatment (T)	11	0.0023*	0.00012*	0.774*	0.0016*
Time (H)	3	0.0137*	0.0010*	33.20*	0.023*
H × T	33	0.0029*	0.00019*	0.377*	0.00088*
Error	-	0.00088	0.00005	0.05	0.0005
Coefficient of variation %		32.57	24.60	9.97	3.21

* Indicate significant difference p<0.05. [1] Peroxidase, [2] Polyphenol oxidase, [3] Phenylalanine ammonialyase

جدول ۳- میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی از تأثیر مایه‌زنی دانهال‌های پسته با ترکیبات زیستی و نماتدکش در حضور نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*)

Table 3. The mean activity level of defense enzymes from the effect of inoculation of pistachio seedlings with biological compounds and nematicides in the presence of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*)

Treatment	Application	dpi of Nematod[1]	POX[2]	PPO[3]	PAL[4]
Nematode + Nematosin 1 (used dose: 1 ml/m²)	soil	1	0.02 a-c	0.024 f-i	0.61 s-u
		4	0.003 g-i	0.047 a-b	2.76 f-l
		8	0.0095 a-i	0.028 f-i	2.3 o-n
		12	0.0091 b-i	0.037 a-h	2.4 l-n
Nematode + Nematosin 2 (used dose: 2 ml/m²)	soil	1	0.01 a-i	0.019 k-l	0.28 u
		4	0.0087 b-i	0.034 a-i	2.78 e-l
		8	0.0008 i	0.025 f-j	2.28 o-n
		12	0.01 a-i	0.047 a-c	2.41 l-m
Nematode + Velum	soil	1	0.002 h-i	0.016 k-l	0.23 u
		4	0.006 d-i	0.033 a-j	2.93 d-h
		8	0.001 h-i	0.041 a-f	2.44 k-m
		12	0.007 d-i	0.023 f-l	2.58 i-g
Nematode + ISR2000	foliar spray	1	0.018 ae	0.021 k-j	0.99 q-s
		4	0.0007 i	0.048 a	3.21 b-e
		8	0.001 h-i	0.036 f-j	2.93 d-h
		12	0.01 a-i	0.032 b-j	2.46 j-m
Nematode + crude extract mix	foliar spray	1	0.021 a-b	0.024 f-i	0.56 t-u
		4	0.018 a-e	0.038 a-h	3.01 t-u
		8	0.005 e-i	0.039 a-h	1.98 n-p
		12	0.01 a-i	0.038 a-j	1.82 p
Nematode + crude extract mix plus	foliar spray	1	0.016 a-g	0.024 f-i	0.72 s-t
		4	0.023 a	0.027 f-i	3.46 a-b
		8	0.001 i	0.039 a-f	2.85 e-k
		12	0.019 a-d	0.046 a-d	2.18 n-p
Nematode + crude extract / spore suspension mix plus	soil	1	0.018 a-f	0.031 d-j	0.29 u
		4	0.003 g-i	0.022 k-l	3.67 a
		8	0.005 e-i	0.028 f-i	3.3 ad
		12	0.011 a-i	0.048 a	2.16 n-p
Nematode + crude extract / spore suspension 79-2	soil	1	0.005 e-i	0.013 k-l	0.85 r-t
		4	0.013 a-i	0.037 a-h	3.03 d-f
		8	0.001 h-i	0.048 a	2.75 f-l
		12	0.008 b-i	0.03 f-j	1.92 o-p
Nematode + crude extract / spore suspension 127-12	soil	0	0.01 a-i	0.028 f-l	1.16 q-r
		4	0.007 b-i	0.033 a-j	3.17 b-f
		8	0.018 a-f	0.024 f-l	2.47 m
		12	0.012 a-i	0.023 f-l	2.57 o-p
Nematode + ISR2000	soil	1	0.021 a-b	0.018 k-l	1.78 p
		4	0.002 h-i	0.029 f-l	3.12 b-f
		8	0.01 a-i	0.028 f-l	2.89 d-j
		12	0.004 f-i	0.034 a-j	2.47 i-m
Control / water	foliar spray/ soil	1	0.018 a-f	0.028 f-l	1.35 q
		4	0.017 a-g	0.035 a-i	3.51 a-b
		8	0.002 h-i	0.023 f-l	2.9 d-i
		12	0.003 g-i	0.023 f-l	2.46 i-m
Nematode	soil	1	0.012 a-i	0.022 g-l	1.97 n-p
		4	0.015 a-h	0.018 k-j	3.39 a-c
		8	0.002 h-i	0.031 d-j	2.82 e-l
		12	0.002 h-i	0.031 d-j	1.88 o-p

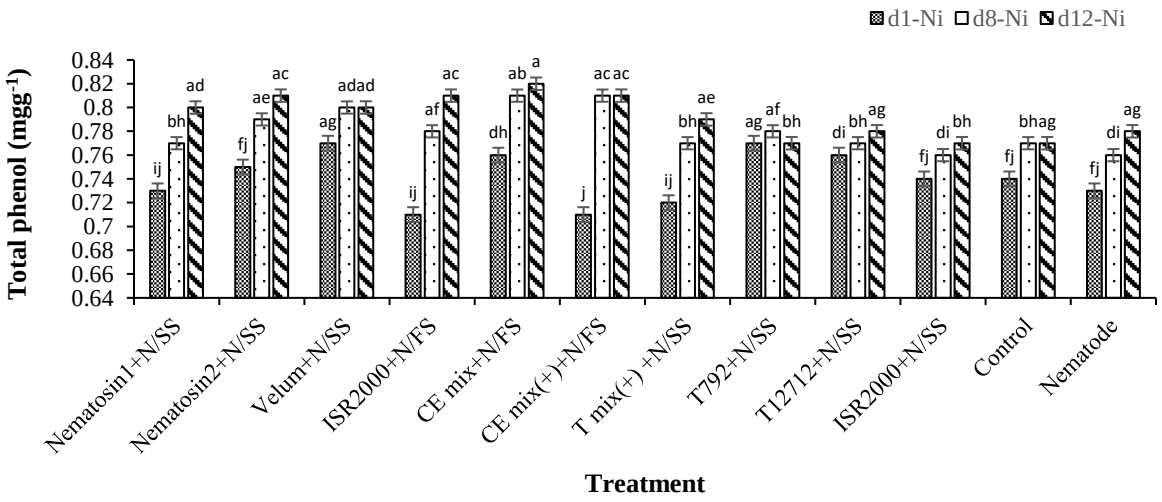
Means within a column followed by the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$). [1]day post inoculation of nematode, [2] Peroxidase, [3] Polyphenol oxidase, [4] Phenylalanine ammonialyase.

آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL)

براساس جدول تجزیه واریانس مشخص شد که آنزیم PAL تحت تاثیر معنادار عامل بیماری، محرک‌های القایی و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمالی پنج درصد قرار گرفت (جدول ۲). همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد در روز اول نمونه‌برداری بین تیمارهای مورد آزمایش تفاوت معنی‌دار زیادی وجود نداشت. نتایج کلی بیانگر افزایش میزان آنزیم PAL در دانهال‌های پسته تیمار شده در روز چهارم بود و سپس سیر نزولی در روز هشتم و دوازدهم داشت. حداکثر فعالیت این آنزیم در روز چهارم و هشتم در تیمارخاک‌کاربرد عصاره خام و سوسپانسیون اسپورمخلوط سویه‌ها به‌همراه عناصر غذایی با ۸۵/۲۷ و ۷۸/۵۱ درصد به‌ترتیب در شرایط حضور و عدم حضور نماتد مشاهده شد. بین تیمارهای خاک‌کاربرد و محلول‌پاشی ترکیب ISR2000، تفاوت تنها در مقدار آنزیم در روز اول بود که در تیمار خاک‌کاربرد مقدار آنزیم بیشتر بود. در تیمار عصاره خام و سوسپانسیون اسپور سویه T127-12 در روز دوازدهم نسبت به تیمار نماتد افزایش میزان آنزیم مشاهده شد (جدول۳).

ترکیبات فنلی

براساس جدول تجزیه واریانس مشخص شد که ترکیبات فنلی تحت تاثیر معنادار عامل بیماری، محرک‌های القایی و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمالی پنج درصد قرار گرفت (جدول ۲). نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوی فنل کل پس از مایه‌زنی با نماتد ریشه‌گرهی و اعمال تیمارهای مورد بررسی در پژوهش نشان داد که تیمار محلول‌پاشی ترکیبات عصاره خام مخلوط سویه‌ها همراه و یا بدون ریزمغذی بیشترین تأثیر را در محتوی فنل کل داشتند، این در حالی بود که در تمامی تیمارها در روز اول مایه‌زنی نماتد کمترین مقدار فنل و در روز دوازدهم پس از مایه‌زنی نماتد، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مشاهده شد. در تیمار ترکیب ISR2000 به‌روش محلول‌پاشی مقدار ترکیبات فنلی بیشتر از تیمار خاک‌کاربرد بود. در تیمار نماتدکش، بیشترین مقدار ترکیبات فنلی مربوط به سم ولوم بود. در این پژوهش افزایش محتوای فنل در دانهال‌های تیمارشده با سویه‌ها یا ترکیبات زیستی تریکودرمایی در حضور نماتد در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر ترکیبات زیستی و نماتدکش بر محتوای فنل کل دانهال‌های پسته در حضور نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*)

Fig. 1. The effect of biological compounds and nematicides on total phenol content of pistachio seedlings in the presence of root knot nematode (*Meloidogyne javanica)*

Nematosin1: dose 1 mlm^{-2}; Nematosin2: dose $2mlm^{-2}$; SS: soil application; FS: foliar spray; N: nematode; CE: crude extract; d1-Ni: day1-nematod inoculation; (+): micronutrient; mix: *Trichoderma* isolates mix

بحث

گزارش‌های زیادی از کاربرد قارچ تریکودرما علیه بیماری ریشه‌گرهی در گیاهان مختلف وجود دارد، برخی گونه‌های تریکودرما هم آسیب نماتد ریشه‌گرهی را کاهش داده و هم باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (Olajide and Iziogu, 2015). همچنین گزارش‌هایی از کاربرد موفقیت آمیز گونه‌های تریکودرما در گوجه فرنگی وخیار گلخانه‌ای علیه نماتد ریشه‌گرهی موجود است که توانسته است تعداد تخم، گال، کیسه تخم و فاکتور تولید مثل را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهد (Pourkhajeh *et al*., 2019; de de Medeiros *et al*., 2017). در صورت مناسب بودن شرایط پیشروی فعالیت بیمارگر، میزان گال، تعداد کیسه تخم و جمعیت لارو سن دوم بیشتر خواهد شد که نشان از مساعد بودن شرایط مورد نیاز جهت فعالیت و کامل کردن چرخه زندگی بیمارگر می‌باشد (Ghasemzadeh *et al*., 2016). کاهش تعداد گال و تخم و لاروهای سن دوم نماتد ممکن است به‌دلیل توانایی بالای عوامل زیستی ریزوسفر مانند تریکودرما باشد زیرا آن‌ها به‌راحتی می‌توانند کلونیزه شوند و ریشه را دربرگیرند و مکان تغذیه نماتدها را کاهش دهند در نتیجه از گسترش نماتد به بافت‌های داخلی ریشه جلوگیری می‌کنند (Harman *et al*., 2004). به‌طور کلی، قارچ تریکودرما به‌عنوان کود زیستی باید قبل از کشت برای دستیابی به حداکثر مهار نماتد استفاده شود زیرا استقرار خوب قارچ در ناحیه ریزوسفرگیاهی برای مهار نماتد مهم به‌نظر می‌رسد. این عوامل زیست مهار می‌توانند به‌عنوان مکمل یا جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی پیشنهاد شوند (d"Errico *et al*. 2022). استفاده از تریکودرما در گلخانه برای کنترل بیمارگرهای خاکزی به‌صورت خاک‌کاربرد و محلول‌پاشی و در مزرعه به‌روش محلول‌پاشی مورد استفاده قرار گرفته است (Meher *et al*., 2020).

گیاهان با بسیاری از سازوکارهای دفاعی مختلف به نماتدها و بیماری‌های قارچی پاسخ می‌دهند از جمله بیان آنزیم‌های مرتبط با دفاع مانند کیتیناز (Sato *et al*., 2019)، -β-1,3گلوکاناز (Park *et al*., 2019) ، پراکسیداز (Ji *et al*., 2019) و فنیل آلانین آمونیالیاز (Zhang *et al*., 2017) که توسط بعضی از میکروارگانیسم‌ها، مواد شیمیایی طبیعی، مصنوعی و یا با ایجاد زخم درگیاه تحریک و فعال می‌گردد. (Manganiello *et al*., 2018; Wang *et al*., 2019). زمانی که سطح ترکیبات فنلی و آنزیم‌های مرتبط با دفاع در گیاه آلوده و پاسخ‌های دفاعی مانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن بالا برود باعث افزایش مقاومت گیاه و کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد می‌شود (Esfahani *et al*., 2017). اولین سطوح دفاعی گیاه در مقابل حمله بیمارگر، دیواره سلولی می‌باشد و پراکسیداز نیز یک آنزیم مهم در فرآیند سنتز دیواره سلولی، اکسیداسیون فنل، سوبرینی‌کردن و لیگنینی‌شدن در زمان دفاع علیه عامل بیماری‌زا می‌باشد. بالا رفتن میزان فعالیت POX با القا مقاومت ارتباط دارد و در حالات ایزوفرم‌های مختلف سبب جذب اکسیژن فعال در سلول می‌شود (Prusky, 2002). در اکثر موارد سرعت تجمع ترکیبات فنلی در گیاه آلوده با مقاومت بالاتر بیشتر می‌باشد. با توجه به‌نحوه فعالیت قارچ، نماتد و ارتباط متقابل آن‌ها با گیاه، احتمال دارد که *T. harzianum* به طریقی فعالیت نماتد درون گیاه را کاهش می‌دهد که علاوه بر کاهش گال روی ریشه، تعداد کیسه تخم و تعداد تخم درون کیسه را نیز کاهش پیدا می‌کند، در نتیجه به نظر می رسد قارچ سبب تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌شود. *T. harzianum* توانایی نفوذ در کیسه تخم نماتد را داشته و همچنین با فعال کردن آنزیم‌های مرتبط با مقاومت از جمله POX، PPO و PAL، می‌تواند تعداد تخم نماتد را به‌میزان قابل توجهی کاهش دهد(Hyder *et al*., 2017) . نماتد و قارچ آنتاگونیست فعالیت آنزیم POX را در گیاه افزایش می‌دهند و در نتایج این تحقیق نیز نهال‌های آلوده تیمار شده با ترکیبات زیستی افزایش فعالیت آنزیم POX را نسبت به‌شاهد آلوده نشان می‌دهد. کمتر شدن میزان ترکیبات فنلی در گیاه آلوده به‌نماتد نسبت به‌گیاه تیمار شده با عوامل آنتاگونیست به‌دلیل حرکت بین سلولی نماتد و از بین بردن مکانیسم‌های مقاومت گیاه

می‌باشد. براساس یافته‌های ما مشخص شد که میزان آنزیم POX در ترکیب زیستی به‌روش محلول پاشی عصاره خام مخلوط سویه‌ها در روز چهارم و ترکیب خاک‌کاربرد عصاره خام و سوسپانسیون اسپور سویه T127-12 در روز هشتم بعد از مایه‌زنی نماتد بود. بیشترین مقدار آنزیم پلی فنل اکسیداز در ترکیبات خاک‌کاربرد عصاره خام و سوسپانسیون اسپورمخلوط سویه‌ها به‌همراه عناصر غذایی در روز دوازدهم و عصاره خام و سوسپانسیون اسپور سویه T79-2 در روز هشتم بعد از مایه‌زنی نماتد مشاهده شد. در آنزیم PAL حداکثر فعالیت در روز چهارم و هشتم بعد از مایه‌زنی نماتد در تیمار عصاره خام و سوسپانسیون اسپور مخلوط سویه‌ها به‌همراه عناصر غذایی (خاک‌کاربرد) به‌ترتیب با ۸۵/۲۷ و ۷۸/۵۱ درصد، در شرایط حضور و عدم حضور نماتد ملاحظه شد. بررسی میزان ترکیبات فنلی در تیمارهای مخلوط عصاره خام همراه و بدون عناصر غذایی(محلول پاشی) نشان داد که بیشترین تأثیر را در محتوی فنل کل در روزهای هشتم و دوازدهم داشتند. در روز اول (همزمان با مایه‌زنی نماتد) کمترین مقدار فنل و در روز دوازدهم (پس از مایه‌زنی نماتد) بیشترین مقدار فنل در تمام تیمارها مشاهده شد به‌طوری‌که در روش محلول پاشی ترکیبات زیستی عصاره خام تریکودرما و ترکیب تجاری ISR2000 بیشترین مقدار بوده است. میزان آنزیم‌ها و ترکیبات فنلی و در برخی موارد تاثیر ترکیبات به‌روش محلول پاشی و در برخی تاثیر ترکیبات خاک‌کاربرد بیشتر بوده است. مطالعات زیادی برای مقایسه اثر نماتدکش‌ها و مهار زیستی گونه‌های تریکودرما علیه نماتد ریشه‌گرهی در گیاهان مختلف از جمله خیار، سویا، پسته و غیره صورت گرفته است که تمام نتایج نشان دهنده اثر بخش بودن مهار زیستی گونه‌های تریکودرما نسبت به‌کنترل شیمیایی است (Mehdinezhad *et al.*, 2021). استفاده از ISR2000 به‌عنوان ترکیب زیستی محرک و تنظیم کننده رشد گیاهی توانسته خسارت ناشی از بیمارگر ویروس X سیب زمینی را کاهش داده و همچنین افزایش عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی را به‌دنبال داشته است (Hussein and Kamberoglu, 2017). همچنین ترکیب ISR2000 توانسته آلودگی در گیاه را از طریق تحریک مکانیسم‌های مقاومت گیاه و یا اجزای چسبنده دیواره سلولی مخمر به‌عنوان یک مانع جلوگیری کننده از اتصال پاتوژن بر روی سطوح برگ عمل کند (Newton *et al.*, 1993; Reglinesky *et al.*, 1994).

با توجه به‌نتایج پژوهش‌های قبلی و انطباق آنها با نتایج این پژوهش، مؤثر بودن استفاده از ترکیبات زیستی بر پایه قارچ تریکودرما در مهار زیستی نماتد ریشه‌گرهی به اثبات رسید و امید است که این نتایج برای تحقیقات تکمیلی و کاربردی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان به‌جهت تامین مالی بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش از محل پژوهانه تشکر و قدردانی می‌نمایند. از سرکار خانم مهندس مهدیه کرد ساردویی (رئیس اداره حفظ نباتات جیرفت) وآقایان دکتر علی‌اکبر محمدی میریک، دکتر سید رسول صحافی و مهندس محمد افضلی به‌خاطر همکاری و کمک در انجام این پژوهش و واکاوی آماری داده‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

ALFIKY, A. and L. WEISSKOPF, 2021. Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications, Journal of Fungi, No. 7: 1-18. https://doi.org/10.3390/jof7010061.

AL-HAZMI, A.S. and M. TARIQJAVEED, 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato, Saudi Journal of Biological Sciences, No. 23: 288-292. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007.

ANESE, M., M.C. NICOLI, G. DALL'AGLIO and C.R. LERICI, 1994. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities, Journal of Food Biochemistry, No. 18: 285-293.

AWAD-ALLAH, E.F.A., A.H.M. SHAMS, A.A. HELALY and E.I.M. RAGHEB, 2022. Effective applications of *Trichoderma* spp. as biofertilizers and biocontrol agents mitigate tomato *Fusarium* wilt disease, Agriculture, No. 12: 1-17. https://doi.org/10.3390/agriculture12111950.

BAWA, N., S. KAUR and N.K. DHILLON, 2020. Efficacy of *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma harzianum* and *T. viride* bio-formulations against *Meloidogyne incognita*, Indian Phytopathology, No. 73: https://doi.org/10.1007/s42360-020-00276-1

BHUIYAN, S., K. GARLICK, J. ANDERSON, P. WICKRAMASINGHE and G. STIRLING, 2018. Biological control of root-knot nematode on sugarcane in soil naturally or artificially infested with *Pasteuria penetrans*, Australasian Plant Pathology, No. 47: 45-52. https://doi.org/10.1007/s13313-017-0530-z

BLOKHINA, O., E. VIROLAINEN and K.V. FAGERSTEDT, 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, Annals of Botany, No. 91: 179-194. https://doi.org/10.1093/aob/mcf118

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, No. 72: 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRAHOEI, N., 2018. Identification of *Trichoderma* isolates from the soil of citrus orchards in Kerman province and investigation of the enzyme activity of isolates effective in controlling citrus gomosis disease, Master's Thesis, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan. (in Persian with English summary).

CHAREHGANI, H., A. KAREGAR and M. DJAVAHERI, 2014. Comparison of Dl-B-amino-N-butyric acid, salicylic acid and abscisic acid in induction of resistance in tomato infected by *Meloidogyne incognita*, Iranian Journal of Plant Pathology, No. 504: 161-163.

CHEN, S.C., J.J. REN, H.J. ZHAO, X.L. WANG, T.H. WANG, S.D. JIN, Z.H. WANG, C.Y. LI, A.R. LIU, X.M. LIN and J. AHAMMED, 2019. *Trichoderma harzianum* improves defense against *Fusarium oxysporum* by regulating ROS and RNS metabolism, redox balance, and energy flow in cucumber roots, Phytopathology, No. 109: 972-982. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-18-0342-R.

D'ERRICO, G., N. GRECO, F. VINALE, R. MARRA, V. STILLITTANO, S.W. DAVINO, S.L. WOO and T. D'ADDABBO, 2022. Synergistic effects of *Trichoderma harzianum*, 1, 3 Dichloropropene and organic matter in controlling the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato, Plants, No. 11: 1-10. https://doi.org/10.3390/plants11212890.

D'CUNHA, G.B., V. SATYANARAYAN and P. MADHUSUDANAN NAIR, 1996. Stabilization of phenylalanine ammonia lyase containing *Rhodotorula glutinis* cells for the continuous synthesis of l-phenylalanine methyl ester/96, Enzyme

and Microbial Technology, No. 19: 421-427. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00013-0.

DE MEDEIROS, H.A., J.V.D. ARAúJO FILHO, L.G.D. FREITAS, P. CASTILLO, M.B. RUBIO, R. HERMOSA and E. MONTE, 2017. Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*, Scientific Reports, No. 7: 1-13. https://doi.org/10.1038/srep40216.

DE OLIVEIRA, C.M., N.O. ALMEIDA, M.V.D.C.B. CORTES, M.L. JúNIOR, M.R. DA ROCHA and C.J. ULHOA, 2021. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean, Biological Control, No. 152: 104-425. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104425.

DIXON, R.A., and C. L. STEELE, 1999. Flavonoids and isoflavonoids–a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Science, No 4: 394-400. https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01471-5

DJIAN, C., L. PIJAROWSKI, M. PONCHET, N. ARPIN and J. FAVRE-BONVIN, 1991. Acetic acid: a selective nematicidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, Nematologica, No. 37: 101-112.

DONI, F., A. ISAHAK, C.R. CHE MOHD ZAIN, S. MOHD ARIFFIN, W.N.A. WAN MOHAMAD and W.M. WAN YUSOFF, 2014. Formulation of *Trichoderma* sp. SL2 inoculants using different carriers for soil treatment in rice seedling growth, Springerplus, No. 3: 1-5. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-532.

DUNCAN, L.W. and H. FERRIS, 1983. Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species, Journal of Nematology, No. 15: 227.

EBADI, M., S. FATEMY and H. RIAHI, 2018. Biocontrol potential of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* isolates against *Meloidogyne javanica* on pistachio, Egyptian Journal of Biological Pest Control, No. 28: 1-6 https://doi.org/10.1186/s41938-018-0047-y

EL-SHARKAWY, H.H., Y.M. RASHAD and S.A. IBRAHIM, 2018. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp., Physiological and Molecular Plant Pathology, No. 103: 84-91. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.002.

ESFAHANI, L., S. JAMALI, A. SAEEDIZADEH and H. PEDRAMFAR, 2018. Inducing systemic resistance of tomato by salicylic acid and two biocontrol agents against root-knot nematode, Iranian Journal of Plant Protection Science, No. 48: 283-294. (In Persian with English abstract).

FATTAHI, M., A. MOHAMMADKHANI, B. SHIRAN, B. BANINASAB and R. RAVASH, 2020. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis with different pistachio rootstocks under salinity stress condition, Journal of Plant Process and Function, No. 38: 309-326. (In Persian with English abstract).

FEYISA, B., A. LENCHO, T. SELVARAJ, P. AMB and G. GETANEH, 2016. Evaluation of some botanicals and *Trichoderma harzianum* for the management of tomato root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chit Wood), Advances in Crop Science and Technology, No. 4: 201. https://doi.org/10.5897/JEN2015.0145

FLETCHER, R.S. and L.S. KOTT, 1999. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. In Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress. p. 26-29.

GHASEMZADEH, A., S. JAMALI, M. ESFAHANI and H. PEDRAMFAR, 2017. The effect of nematode *(Meloidogyne incognita* race 2) on root and shoot traits in susceptible and tolerant tomato cultivars, Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, No. 8: 73-92.

GOLZARY, H., N. PANJEHKEH, M. AHMADZADEH, M. SALARI and E. SEDAGHATI-KHORAVI, 2011. Elucidating the parasitic capabilities of *Trichoderma*

against *Meloidogyne javanica* on tomato, Insight Plant Disease, No. 1: 12-19.

GRINYER, J., S. HUNT, M. MCKAY, B.R. HERBERT and H. NEVALAINEN, 2005. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*, Current Genetics, No. 47: 381-388. https://doi.org/10.1007/s00294-005-0575-3.

HARMAN, G.E., C.R. HOWELL, A. VITERBO, I. CHET and M. LORITO, 2004. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts, Nature Reviews Microbiology, No. 2: 43-56. https://doi.org/10.1038/nrmicro797.

HARMAN, G.E., F. DONI, R.B. KHADKA and N. UPHOFF, 2021. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants photosynthetic capability, Journal of Applied Microbiology, No. 130: 529-546. https://doi.org/10.1111/jam.1436810.1111/jam.14368 HE, Y. and Z.J. ZHU, 2008. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*, Biologia Plantarum, No. 52: 792-795. https://doi.org/10.1007/s10535-008-0155-8.

HUSSEIN, M. and M.A. KAMBEROGLU, 2017. The response to potato virus X infection of tomato plants treated with ISR2000, European Journal of Plant Pathology, No. 149: 807-815. https//:doi.org/10.1007/s10658-017-1227-4.

HUSSEY, R., 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique, Plant Disease Reporter, No. 57: 1025-1028.

HYDER, S., M. INAM-UL-HAQ, S. BIBI, A. HUMAYUN, S. GHUFFAR and S. IQBAL, 2017. Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent, Journal of Entomology and Zoology Studies, No. 5: 214-222 .

JEPSON, S.B., 1987. Identification of Root-Knot Nematodes *(Meloidogyne species)*, C.A.B international.

JI, X., J. LI, Z. MENG, S. DONG, S. ZHANG and K. QIAO, 2019. Inhibitory effect of allicin against *Meloidogyne incognita* and *Botrytis cinerea* in tomato, Scientia Horticulturae, No. 253: 203-208. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.046.

KHAN, R.A.A., S. NAJEEB, S. HUSSAIN, B. XIE and Y. LI, 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi, Microorganisms, No. 8: 817. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817.

KHATAMIDOOST, Z., S. JAMALI, M. MORADI and R. SABERI RISEH, 2015. Effect of Iranian strains of *Pseudomonas* spp. on the control of root-knot nematodes on pistachios, Biocontrol Science and Technology, No. 25: 291-301.

LI, R. X., F. CAI, G. PANG, Q.R. SHEN, R. LI and W. CHEN, 2015. Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth, PLoS One, No. 10: e0130081. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130081.

MANGANIELLO, G., A. SACCO, M.R. ERCOLANO, F. VINALE, S. LANZUISE, A. PASCALE, M. NAPOLITANO, N. LOMBARDI, M. LORITO and S.L. WOO, 2018. Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid, Frontiers in Microbiology, No. 9: 1966. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01966.

MARTINEZ-MEDINA, A., I. FERNANDEZ, G.B. LOK, M.J .POZO, C.M. PIETERSE and S.C. VAN WEES, 2017. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*, New Phytologist, No. 213: 1363-1377. https://doi.org/10.1111/nph.14251.

MEHDINEJAD, F., E. SEDAGHATI, A. ZEINADINI, H. ALAEI, M. NADI and M. MORADI, 2021. Improvement of growth factor and nutrients elements in treated pistachio seedlings by some symbiotic fungi in presence of *Meloidogyne javanica*, Journal

of Pistachio Science and Technology, No. 5: 168-183. (in Persian with English summary).

MEHER, J., R. RAJPUT, R. BAJPAI, B. TELI and B. SARMA, 2020. *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond*, Cham, Switzerland, Springer.

MIRKHANI, F., 2013. Identification of *Trichoderma* species of soil application in pistachio orchards of Kerman province based on morphological and molecular characteristics, Master's Thesis, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan. (in Persian with English summary).

MOSTAFANEZHAD, H., N. SAHEBANI and S. NOURINEJHAD ZARGHANI, 2014. Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) with combination of *Arthrobotrys oligospora* and salicylic acid and study of some plant defense responses, Biocontrol Science and Technology, No. 24: 203-215. https://doi.org/10.1080/09583157.2013.855166.

NEWTON, A., G.D. LYON and T. REGLINSKI, 1993. Development of a new crop protection system using yeast extracts. Home Grown Cereals Authority. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04155.x

OLAJIDE, M. and N. IZIOGU, 2015. Biocontrol of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) using *Trichoderma harzianum* on tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill), Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, No. 5: 59-64.

PARK, Y.-H., R.C. MISHRA, S. YOON, H. KIM, C. PARK, S.-T. SEO and H. BAE, 2019. Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens, Journal of Ginseng Research, No. 43: 408-420. https://doi.org/10.1016/j.jgr.2018.03.002.

PLEWA, M.J., S.R. SMITH and E.D. WAGNER, 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase, Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, No. 247: 57-64.

POURKHAJEH, F., H. CHAREHGANI, M. ABDOLLAHI and M. SADRAVI, 2019. Biocontrol effect of *Trichoderma harzianum* isolates on root knot nematode *Meloidogyne javanica* on greenhouse cucumber, Iranian Journal of Plant Pathology, No. 55: 77-82.

PRUSKY, D., 2002. Mechanisms of resistance of fruits and vegetables to postharvest diseases. In Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables, CRC Press. p. 658-676.

REGLINSKI, T., G. LYON and A. NEWTON, 1994. Induction of resistance mechanisms in barley by yeast-derived elicitors, Annals of Applied Biology, No. 124: 509-517. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04155.x.

REUVENI, R., V. AGAPOV and M. REUVENI, 1994. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize, Plant Pathology, No. 43: 245-250.

SATO, K., Y. KADOTA and K. SHIRASU, 2019. Plant immune responses to parasitic nematodes, Frontiers in Plant Science, No. 10: 14. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01165.

SHARMA, M., I. SAINI, P. KAUSHIK, M.M. ALDAWSARI, T.A. BALAWI and P. ALAM, 2021. Mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* application reduces root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infestation in eggplant, Saudi Journal of Biological Sciences, No. 28: 3685-3691. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.054.

SILVA, R.N., V.N. MONTEIRO, A.S. STEINDORFF, E.V. GOMES, E.F. NORONHA and C.J. ULHOA, 2019. *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security, Fungal Biology, No. 123: 565-583. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010.

SINGH, B., DEVINDRAPPA, K.K. HAZRA, U. SINGH and S. GUPTA, 2020. Ecofriendly management of

Meloidogyne javanica in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using organic amendments and biocontrol agent, Journal of Cleaner Production, No. 257: 120-542. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120542.

TAYLOR, A. and J. SASSER, 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes, North Carolina State University Graphics, No. 111.

TEVIOTDALE, B. L., T. J., MICHAILIDES and J.W. PSCHEIDT, 2002. Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate. Zones, American Phytopathological Society St. Paul. MN, USA..

VINALE, F., K. SIVASITHAMPARAM, E.L. GHISALBERTI, R. MARRA, M.J. BARBETTI, H. LI, S.L. WOO and M. LORITO, 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants, Physiological and Molecular Plant Pathology, No. 72: 80-86. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005.

VIZCAINO, J.A., L. SANZ, A. BASILIO, F. VICENTE, S. GUTIERREZ, M.R. HERMOSA and E. MONTE, 2005. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections, Mycological Research, No. 109: 1397-1406. https://doi.org/10.1017/S0953756205003898.

WANG, J.W., L.P. ZHENG, J.Y. WU and R.X. TAN, 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures, Nitric Oxide, No. 15: 351-358. https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.04.261.

WANG, Q., X. CHEN, X. CHAI, D. XUE, W .ZHENG, Y. SHI and A. WANG, 2019. The involvement of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid in the signaling pathway of *Clonostachys rosea*-induced resistance to gray mold disease in tomato, Phytopathology, No. 109: 1102-1114. https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-19-0025-R.

WHITEHEAD, A.G. and J. R. HEMMING, 1956. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil, Annals of Applied Biology, No. 55: 25-38. https://doi.org/10.1111/j.17447348.1965.tb07864.x10 1111/j.1744-7348.1965.tb07864.x.

YAMASAKI, H., Y. SAKIHAMA and N. IKEHARA, 1997. Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H2O2, Plant Physiology, No. 115: 1405-1412. https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1405.

ZHANG, S., Y. GAN and B. XU, 2015. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*, Applied Soil Ecology, No. 94: 21-29. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.010.

ZIN, N.A. and N.A. BADALUDDIN, 2020. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications, Annals of Agricultural Sciences, No. 65: 168-178. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003.