# بررسی تغییرات برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و رویشی نهال‌های پسته تیمار شده با آنتاگونیست‌های قارچی در شرایط حضور و عدم حضور نماتد ریشه‌گرهی

فاطمه مهدی‌نژاد[۱]، ابراهیم صداقتی[۲،۳]، اعظم زین‌الدینی ریسه[۲]، حسین علایی[۲]، ماریه نادی[۳،۴*]، محمد مرادی[۳،۴]

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱

**چکیده**

افزایش سطح ترکیبات فنلی از جمله سدهای دفاعی گیاهان در برابر حمله بیمارگرها و استرس‌های محیطی می‌باشد. در این مطالعه اثر گونه‌های قارچی میکوریز وزیکولار-آربوسکولار، *Funneliformis mosseae*، *Rhizophagus intraradices*، *Funneliformis caledonius* و *Tricoderma* (*T. aureoviride* و *T. harzianum*) بر روی القاء ترکیبات فنلی در گیاه پسته رقم بادامی ریز زرند در زمان‌های مختلف صفر، ۳۶، ۷۲، ۱۳۲ و ۲۸۸ ساعت پس از مایه‌زنی با نماتد ریشه‌گرهی با دوازده تیمار، سه تکرار در گلخانه اجراء گردید. نتایج نشان داد که محتوای فنل کل در گیاهان تیمار شده افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند. در نهال‌های پسته مایه‌زنی شده با تیمار میکوریز در زمان ۱۳۲ ساعت بعد از مایه‌زنی نماتد به سرعت شاهد افزایش محتوای فنل کل بودیم. در تیمار *Trichoderma* بیشترین افزایش در ساعت ۲۸۸ در شرایط حضور و عدم حضور نماتد مشاهده گردید. همچنین فاکتورهای رشدی تعداد برگ در تیمار میکوریز- *Trichoderma* به ترتیب برابر با ۱۸/۵۳ و ۳۳/۳۳ درصد موجب افزایش وزن تعداد برگ در حضور و عدم حضور نماتد مشاهده گردید. همچنین تیمار میکوریز نسبت به شاهد سالم برابر با ۲۴/۷۷ درصد و تیمار میکوریز- *Trichoderma*- نماتدکش با ۶۹/۱۹ درصد دارای بیشترین تعداد می‌باشند. قارچ‌های مورد بررسی می‌توانند جهت استفاده در کنترل بیولوژیکی نماتد ریشه‌گرهی مورد توجه قرار گیرند.

[۱] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان، ایران
[۲] هیأت علمی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان، ایران
[۳] پژوهشگر مرکز سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی، رفسنجان، ایران
[۴] هیأت علمی پژوهشی، پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران
* نویسنده مسئول: marieh_nadi@yahoo.com

**واژه‌های کلیدی**: القاء مقاومت، بادامی ریز زرند، کلنیزاسیون، میکوریز آربوسکولار

**مقدمه**

پسته اهلی (*Pistacia vera* L.) متعلق به خانواده پسته‌سانان (Anacardiaceae) می‌باشد. در این خانواده تعداد زیادی جنس وجود دارد که بیشتر مخصوص مناطق نیمه گرمسیری (Sup-tropical zone) هستند اگرچه از نظر بسیاری از ویژگی‌ها بویژه نیاز سرمایی بالا و خزان‌پذیر بودن، به گیاهان مناطق معتدله (Temperate zone) نیز شباهت دارد. در جنس پسته ۱۳ گونه وجود دارند (پناهی و همکاران، ۱۳۸۱) که ۳ گونه آن در ایران شناسایی شده است که به‌صورت درخت و درختچه هستند (کریمی، ۱۳۸۹). پسته‌ی اهلی دارای تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بسیار زیادی است، دارای ۴۵ رقم بومی در مناطق مختلف ایران می‌باشد (Mehrnejad, 2006). این محصول مورد حمله آفات و بیماری‌های گوناگونی قرار می‌گیرد، در میان بیماری‌های خاکزاد نماتد ریشه‌گرهی از جمله عوامل بیماری‌زا، تهدید کننده تولید این محصول می‌باشد. گونه‌های *Meloidogyne javanica* و *M. incognita* در اغلب باغات پسته از استان‌های مختلف جداسازی شده است (Fatemy, 2009). گونه‌های *M. arenaria*، *M. incognita* و *M. Javanica* در نواحی گرمسیری غالب‌تر و گونه‌های *M. chitwood*، *M. fallax* و *M. hapla* در اقلیم‌های معتدل و خنک شایع‌تر هستند (Hun & Handoo, 2009). نماتدهای مولد ریشه‌گرهی به دلیل وسعت دامنه‌ی میزبانی، پراکندگی جهانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی، یکی از پنج عامل درجه‌ی اول بیماری‌زا بوده و در رده‌ی مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی و تهدیدکننده‌ی رشد گیاهان محسوب می‌شوند (Karssen & Moens, 2006). علائم آلودگی به نماتد ریشه‌گرهی در قسمت‌های هوایی گیاه شامل کاهش رشد گیاه، کم بودن تعداد برگ‌ها، کوچک، رنگ‌پریده و مایل به زرد بودن برگ‌ها، کوچک و نامرغوب بودن شکوفه‌ها و میوه‌ها می‌باشند. بارزترین نشانه در قسمت‌های زیرزمینی گیاه به صورت برجستگی‌های گره مانند ظاهر می‌شود. گیاهان جوان در اثر بیماری از بین می‌روند و گیاهان مقاوم‌تر، بیماری را به صورت کوتولگی، کاهش رشد، زردی و گاهی پژمردگی در ساعات گرم روز نشان می‌دهند (Vovlas *et al*., 2005). میزان خسارت ناشی از حمله نماتدهای ریشه‌گرهی بستگی به عواملی از قبیل میزبان، شرایط آب و هوایی، نوع خاک، نژاد نماتد و جمعیت آن در خاک دارد (Sikora & Fernandez, 2005). روش‌های مدیریت نماتدها شامل پیش‌گیری، آیش، تناوب زراعی با گیاهان غیرمیزبان، استفاده از ارقام مقاوم، روش فیزیکی از قبیل آفتاب‌دهی، ضدعفونی با بخار آب و استفاده از نماتدکش می‌باشد (Pakeerathan *et al*., 2009). از روش‌های مدیریت در برابر بیماری‌های گیاهی، فعال‌سازی سیستم دفاعی گیاه است. ترکیبات سنتزی و بیولوژیکی متنوعی

هستند که قادرند بسیاری از بیماری‌های گیاهی را بدون آنتی بیوتیک مستقیم و از طریق القای مقاومت در گیاه کنترل کنند. مقاومت القایی یک روش کنترل بیولوژیکی می‌باشد 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 (Gorlach *et al*., 2000; Siegrist & Cvetkovich, 2000). مقاومت القایی به عنوان کلیه واکنش‌هایی که به فعال شدن مقاومت گیاه از طریق ایجاد موانع فیزیکی و شیمیایی در برابر عوامل زنده یا غیرزنده بیمارگر منجر می‌گردد، تعریف شده است (Abdel-Monaim *et al*., 2012; Kloepper *et al*., 1992). مقاومت القایی توسط برخی میکروارگانیسم‌ها، مواد شیمیایی طبیعی، مصنوعی و یا با ایجاد زخم در گیاه تحریک و فعال می‌گردد. قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و قارچ *Trichoderma* از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که باعث القای مقاومت در گیاه می‌شوند و اهمیت ویژه‌ای دارند. افزایش مقاومت به پاتوژن‌های خاک‌زاد به طور وسیعی در گیاهان میکوریزی توصیف شده است در مقابل تأثیر میکوریز بر روی بیماری‌های اندام‌های هوایی به مقدار زیادی به الگوی زندگی مهاجم بستگی دارد. در بین مکانیزم‌های بالقوه که برای مقاومت سیستم‌های میکوریزی ضروری هستند، القاء و تحریک فرآیندهای دفاعی گیاه بسیار مورد توجه قرار دارد. در روند تشکیل میکوریزا تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاه اتفاق می‌افتد. تجمع ترکیبات دفاعی گیاه (تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، فعال‌سازی متابولیسم مسیر فنیل پروپانوئید و تجمع ایزوفرم‌های خاص از آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتینازها و گلوکانازها در ریشه‌های میکوریزی گزارش شده است (Liu *et al*., 2006). قارچ *Trichoderma* با مکانیسم‌های مختلف از جمله پارازیته نمودن مستقیم تخم و لاروهای نماتد و القای مقاومت در گیاه میزبان باعث کنترل بیماری می‌شود. عکس‌العمل‌های دفاعی گیاه ممکن است به صورت موضعی و سیستمیک بروز نماید که در حالت سیستمیک، میزان برخی آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه مثل پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز در گیاه افزایش می‌یابند. بسیاری از آنزیم‌ها از جمله پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز، کیتیناز و ترکیبات فنلی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک می‌باشند (Hussey & Barke, 1973; Robb *et al*., 1987). گونه‌های *Trichoderma* به دلیل خاک‌زی بودن و استقرار سریع در خاک، قابلیت مهار بسیاری از قارچ‌ها و نماتدهای بیماری‌زای گیاهی را دارند (Ahmad & Baker, 1987; Lee *et al*., 2012). کلنیزه‌شدن سطح ریشه گیاه توسط آنتاگونیست‌ها می‌تواند منجر به کاهش حمله مستقیم عوامل بیماری‌زا با تولید مواد آنتی‌میکروبی و فنلی باشد که سبب ایجاد مقاومت القایی سیستمیک می‌شوند (Kloepper *et al*., 1992). مواد فنلی گروهی از ترکیبات با وزن ملکولی پایین

می‌باشند که پس از حمله عوامل بیماری‌زا میزان آن‌ها در گیاه افزایش پیدا می‌کند (Kosuge, 1969). ترکیبات فنلی به متابولیت‌های ثانویه معروف هستند و شامل فلاونوئید، تانن‌ها، هیدروکسی سینامیک اسیدها و لیگنین‌ها هستند که در بافت‌های گیاهی به فراوانی یافت می‌شوند (Blokhina *et al*., 2003). ترکیبات فنلی در کاهش و یا مهار اکسیداسیون لیپیدها، حذف رادیکال‌های آزاد، قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره‌ی اکسیداتیو، دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Chu *et al*., 2000; He & Zhu, 2008; Ksouri *et al*., 2007). اغلب گیاهان ترکیبات پروپانوئیدی مثل فلاونوئیدها و هیدروکسی‌سینامیک‌اسیدها را در شرایط طبیعی سنتز می‌کنند اما سنتز و تجمع آن‌ها بوسیله تنش‌های محیطی مثل UV، شدت نور بالا، دمای پائین، جراحت و حمله پاتوژن‌ها القاء می‌گردد (Dixon, 1999; Yamasaki *et al*., 1997). محققان مختلف تغییر ترکیبات فنلی و نقش آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان بیمار را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش‌های این محققان نشان می‌دهد که تجمع مواد فنلی اغلب در ارتباط با واکنش مقاومت است (Gorlach *et al*., 2000). ترکیبات فنلی به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها و پلی‌فنل اکسیداز در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی، به ویژه نماتدها به صورت سیستمیک دخالت دارند (Ogallo & Clure, 1996). برگ‌های یک گیاه اندام‌های اصلی فتوسنتز هستند و شاخص سطح برگ بهترین معیار از ظرفیت یک گیاه زراعی برای تولید ماده خشک است. سطح برگ یکی از متغیرهایی است که در بررسی رشد و شبیه‌سازی و بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و بوم‌شناختی از جمله فتوسنتز، تعرق و بیان انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد، و برای درک اثر متقابل گیاه و محیط ضروری است (اکرم قادیری و همکاران، ۱۳۸۳). هدف از اجرای این تحقیق بررسی تأثیر عوامل بیوکنترل قارچی بر افزایش محتوای فنل کل نهال‌های پسته تیمار شده، شاخص سطح برگ و بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز در شرایط حضور و عدم حضور نماتد بود.

## مواد و روش

### الف- تهیه اینوکولوم نماتدی

جهت تهیه زادمایه نماتدی پس از جمع‌آوری خاک آلوده از باغ‌های موسسه تحقیقات پسته رفسنجان اقدام به کاشت نشاء گوجه‌فرنگی رقم ارلی اربانا در خاک آلوده گردید. جمعیت خالص نماتدی از تک کیسه تخم تهیه شد. برای این منظور تک کیسه تخم به‌طور جداگانه در سوراخ‌هایی به عمق سه تا پنج سانتی‌متر مجاور ریشه گوجه‌فرنگی قرار داده شد و گلدان‌های یک

کیلوگرمی در گلخانه در شرایط ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰-۴۵ روز نگهداری شدند. جمعیت کافی از زادمایه نماتدی با تکثیر بر روی گوجه‌فرنگی به دست آمد. جهت شناسایی گونه نماتد از ریشه‌های آلوده چندین نماتد ماده جدا و با تهیه برش از ناحیه کوتیکولی انتهای بدن آن‌ها اسلاید میکروسکوپی تهیه و بررسی شد و گونه نماتد *Meloidogyne javanica* شناسایی گردید (Hussey & Barke, 1973). برای تهیه سوسپانسیون نماتدی حاوی لاروهای سن دوم، ریشه‌های گوجه‌فرنگی حاوی گال و کیسه تخم خرد شده و سپس بر روی دستمال کاغذی داخل یک سبد قرار داده شدند برای مدت یک هفته، لاروهای تفریخ شده هر ۲۴ ساعت یک بار از آب داخل پتری جمع‌آوری شد (Jepson, 1987). برای تعیین غلظت سوسپانسیون لاروی، تعداد لارو در یک سی‌سی از سوسپانسیون با لام مدرج شمارش گردید. این کار سه بار تکرار و میانگین گرفته شد. میزان ۱۰ سی‌سی سوسپانسیون نماتدی که حاوی پنج هزار لارو سن دوم بود به عنوان زادمایه نماتدی استفاده گردید.

**ب- تهیه اینوکولوم قارچ میکوریز وزیکولار- آربوسکولار و *Trichoderma***

مخلوط سه قارچ میکوریز وزیکولار- آربوسکولار با نام‌های *Funneliformis mosseae*، *Rhizophagus intraradices*، *Glomus caledonius* و جدایه‌های قارچ *Trichoderma* از کلکسیون قارچ‌شناسی بخش بیماری‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان تهیه گردید. میزان ۶۰ گرم از مخلوط اینوکولوم میکوریزایی با خاک هر گلدان مخلوط شد. پس از سه تا چهار ماه، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها به روش فیلیپس و هیومن (Phillips & Hayman, 1970) انجام شد و درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها با استفاده از میکروسکوپ اندازه‌گیری شد (Biermann & Linderman, 1981). جدایه‌های قارچ تریکودرما (*T. aureoviride* و *T. harzianum*) مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از T1، T2، T3، T4 و T5، ریشه‌های نهال‌های پسته به وسیله جدایه‌های *Trichoderma* با غلظت $10^7$ اسپور در میلی‌لیتر به روش سوسپانسیون اسپور شمارش گردید.

**ج- آزمایش‌های گلخانه‌ای**

بعد از تهیه بذرها پژوهشکده پسته کشور، نسبت به آماده‌سازی آن‌ها جهت کاشت اقدام شد. رقم پسته مورد استفاده در این آزمایش بادامی زرند بود که با آب به مدت پنج دقیقه شستشو داده شدند و سپس با محلول نیم درصد هیپوکلریت سدیم به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی شده و بعد از چند بار شست‌وشو در آب مقطر سترون تا زمان جوانه‌زنی در پارچه مرطوب قرار داده شدند. پس از ضدعفونی کردن در داخل گلدان‌های سه کیلویی از خاک و ماسه استریل به نسبت ۱:۲ پر و تعداد پنج بذر در عمق سه سانتی‌متری کاشته شد (Khatamidoost *et al*., 2015).

نهال‌های پسته در مرحله‌ی ۱۰-۸ برگی با مقدار ۶۰ گرم از مخلوط زادمایه میکوریزایی تهیه شده، مایه‌زنی شدند. بعد از رنگ‌آمیزی ریشه‌ها در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد در بن‌ماری در حال جوش قرار گرفتند. به منظور اطمینان از خلوص قارچ‌ها و کلنیزه شدن ریشه‌ها، رنگ‌آمیزی ریشه‌های گیاهی انجام و بررسی میکروسکوپی جهت مشاهده اندام‌های مختلف قارچ صورت گرفت (Phillips & Hayman, 1970). پس از اطمینان از تیمار میکوریزایی، تیمار *Trichoderma* اعمال گردید. برای تیمار تریکودرمایی میزان ۱۰ گرم از زادمایه مخلوط جدایه‌های T1، T2، T3، T4 و T5 به ازای یک کیلوگرم خاک در مرحله سه ماهگی رشد گیاه پسته انجام گردید (Beckman & Pusey, 2001). بعد از مدت ۲۱ روز جمعیت لاروی نماتد هر گلدان با ۵۰۰۰ لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی مایه‌زنی گردید. در پنج سطح مختلف زمانی (صفر، ۳۶، ۷۲، ۱۳۲ و ۲۸۸ ساعت) از برگ نهال‌های پسته نمونه‌برداری شد و میزان ترکیبات فنل مورد بررسی قرار گرفت.

**د- مایه‌زنی نهال‌های پسته با نماتد ریشه‌گرهی**

در این آزمایش برای بررسی تأثیر عوامل بیوکنترل بر فعالیت ترکیبات فنلی در شرایط حضور نماتد سوسپانسیونی حاوی ۵۰۰۰ لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی به هر گلدان مایه‌زنی گردید. برای انجام این کار در اطراف طوقه نهال‌های پسته به آرامی با یک میله شیشه‌ای سه سوراخ ایجاد شد و پس از مایه‌زنی گلدان‌ها آبیاری شدند. مایه‌زنی نماتد دو هفته بعد از تیمار با قارچ *Trichoderma* انجام شد.

**ه- اندازه‌گیری شاخص سبزینگی (SPAD) و سطح برگ**

برای اندازه‌گیری شاخص سبزینگی از دستگاه SPAD (Minolta 502, Japan) استفاده گردید. سطح برگ به وسیله دستگاه سنجش سطح برگ براساس واحد سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری شد.

**و- استخراج فنل و بررسی میزان ترکیبات فنلی**

سنجش محتوای ترکیبات فنلی کل با روش فولین-سیاکالتیو و توسط معرف فولین اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Robb *et al.*, 1987). میزان ۰/۰۵ گرم از بافت برگ در پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده شد و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ (Denley BR401, UK) به مدت ۱۰ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه، به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم پنج درصد اضافه گردید و جذب نمونه‌ها بعد از یک ساعت نگهداری در تاریکی با اسپکتروفتومتر

مدل (A. C. N 5472686) در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد. غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید (Roland & Laima, 1999).

**ز- آنالیز آماری**

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه در سه تکرار و دوازده تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل قارچ میکوریز، قارچ *Trichoderma*، مخلوط همزمان قارچ میکوریز- *Trichoderma*، کاربرد نماتدکش، مخلوط قارچ میکوریز-*Trichoderma* - نماتدکش و شاهد بودند. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel و SAS (Version 9.1) تجزیه و تحلیل آماری شدند. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد مورد مقایسه قرار گرفتند (Duncan & Ferris, 1983).

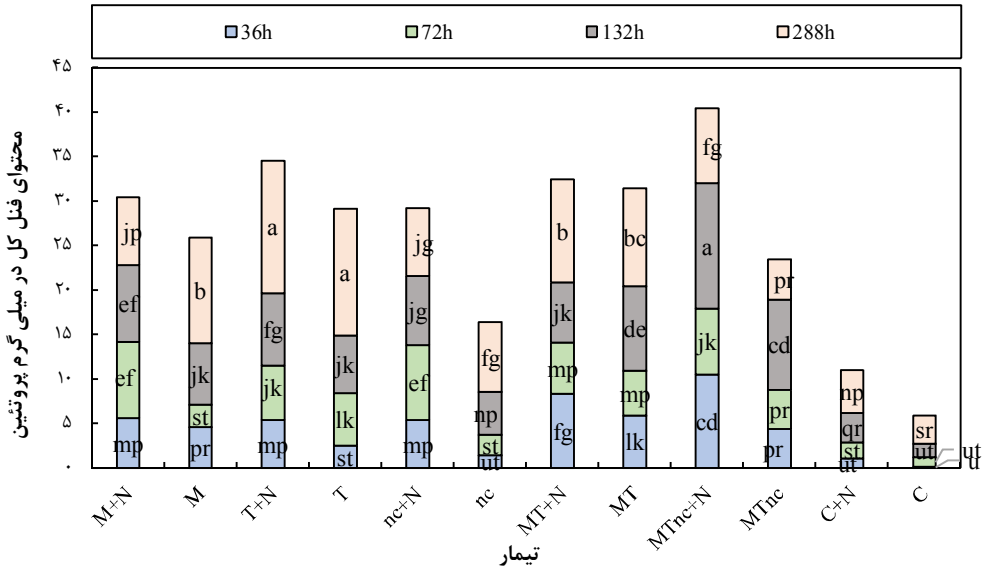
## نتایج و بحث

محتوای فنل کل بین زمان‌های مختلف نمونه‌برداری بین تیمارهای مورد آزمایش در حضور و عدم حضور نماتد تفاوت آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشت (جدول ۱). مخلوط تیمارها در شرایط حضور و عدم حضور نماتد در ۱۳۲ ساعت مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی را دارد (شکل ۱) که این نشان دهنده برهمکنش تیمارها با یکدیگر در القای ترکیبات فنلی می‌باشد که در مقایسه با تیمار *Trichoderma* به تنهایی توانسته است سبب افزایش سریع‌تر فنل گیاه شود. در نهال‌های پسته آلوده به نماتد و تیمار شده با میکوریز، کلنیزاسیون وسیع میکوریز مانند سدی دفاعی مانع نفوذ تعدادی از لاروهای سن دوم به داخل ریشه گیاه شد که همین سبب بالا رفتن قابل توجه ترکیبات فنلی در گیاه آلوده به نماتد و در حقیقت ریشه میکوریزایی شد. در این شرایط گیاه

**جدول ۱- تأثیر قارچ‌های vesicular-arbuscular mycorrhiza و *Trichoderma* بر فعالیت ترکیبات فنلی در حضور و عدم حضور نماتد ریشه‌گرهی در نهال‌های پسته.**

| منابع تغییرات | میانگین مربعات | |
|---|---|---|
| | درجه آزادی | فنل کل |
| تیمار(T) | ۱۱ | ۷۶/۰۰** |
| زمان(H) | ۳ | ۱۱۱/۶۳** |
| T × H | ۳۳ | ۱۹/۶۳** |
| خطا | - | ۰/۶۹ |
| ضریب تغییرات | | ۱۲/۹۰ |

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.




**شکل ۱- تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با اینوکولوم عوامل بیوکنترل (میکوریز وزیکولار- آربوسکولار و *Trichoderma*) بر فعالیت ترکیبات فنلی در حضور و عدم حضور نماتد در زمان‌های ۳۶، ۷۲، ۱۳۲ و ۲۸۸ ساعت.**

**M= Mycorrhizae, T = *Trichoderma,* nc = nematicidae, MT = Mycorrhizae + *Trichoderma*, MTnc = Mycorrhizae + *Trichoderma* + nematicidae, N= nematode, C= Control**

بیشتر انرژی خود را در مرحله دفاعی اولیه مصروف حقیقت ریشه میکوریزایی شد. در این شرایط گیاه بیشتر انرژی خود را در مرحله دفاعی اولیه مصرف کرده است. در حالی که در شرایط عدم حضور نماتد قارچ میکوریز انرژی لازم را برای بالا رفتن ترکیبات دفاعی و ایجاد حالت آماده باش گیاه داشته است. البته عوامل آنتاگونیست با توجه به گونه و گیاه میزبان مکانیسم‌های متفاوتی را برای مقابله با بیمارگرها استفاده می‌کنند. افزایش ترکیبات فنلی در تیمار *Trichoderma* پس از ۲۸۸ ساعت در شرایط حضور و عدم حضور نماتد و در تیمار میکوریزایی در عدم حضور نماتد مشاهده گردید (شکل ۱).

اولین مرحله از فعالیت‌های دفاعی گیاهان مقاوم شامل تجمع سریع ترکیبات فنلی در سایت آلودگی است که رشد پاتوژن را محدود یا کند می‌کند. این ترکیبات علاوه بر جذب اشعه ماوراءبنفش در اپیدرم گیاهان، دارای عملکرد آنتی‌اکسیدانی نیز هستند (Egert & Tevini, 2002). پلی‌فنل‌ها دارای ساختار شیمیایی ایده‌آلی برای خورندگی رادیکال‌های آزاد هستند. ترکیبات فنلی ترکیبات ضد قارچی هستند و تجمع آن‌ها در گیاهان تیمار شده به‌وسیله عوامل آنتاگونیست، می‌تواند دلیل کاهش حمله پاتوژن‌ها باشد (Mpiga, 1997). فنل‌ها به همراه سایر آنزیم‌ها و مواد دفاعی نظیر پراکسیدازها و پلی‌فنل‌اکسیداز در مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی به صورت سیستمیک دخالت

دارند و مقدارشان در میزبان متغیر می‌باشد (Ogallo & Clure, 1996).

عوامل بیوکنترل همراه با رشد سریع در محل ریشه با بافت رابطه متقابلی دارند و تغییرات بیوشیمیایی متفاوتی از قبیل افزایش فعالیت کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکوناز، پراکسیداز و تشکیل سدهای ساختمانی و تجمع فیتوالکسین‌ها را در زخم‌ها القاء می‌کنند (El-Ghaouth *et al*., 1998). میزان ترکیبات فنلی در گیاهان آلوده به نماتد کمتر از القاء توسط عوامل آنتاگونیست بوده است که می‌تواند به دلیل حرکت بین سلولی نماتد ریشه‌گرهی و به‌کارگیری مکانیسم‌های خاموش کننده‌ی پاسخ‌های دفاعی بیوشیمیایی و مهار مکانیسم‌های مقاومت گیاه نسبت داد. گیاهان به‌منظور از بین بردن اثر رادیکال‌های آزاد ناشی از استرس‌های زنده و غیرزنده مکانیسم‌های دفاعی خود را به‌کار می‌گیرند. تجمع چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکساید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به استرس در گیاهان به اثبات رسیده است (Honty *et al*., 2005).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تعداد برگ در نهال‌های پسته (جدول ۲) نشان داد که وزن تعداد برگ در تیمار میکوریز- *Trichoderma* نسبت به شاهد آلوده و سالم به ترتیب برابر با ۱۸/۵۳ و ۳۳/۳۳ درصد موجب افزایش تعداد برگ شده است. همچنین تیمار میکوریز نسبت به شاهد سالم برابر با ۲۴/۷۷ درصد و تیمار میکوریز- *Trichoderma*- نماتدکش با ۶۹/۱۹ درصد دارای بیشترین تعداد می‌باشند (شکل ۲).

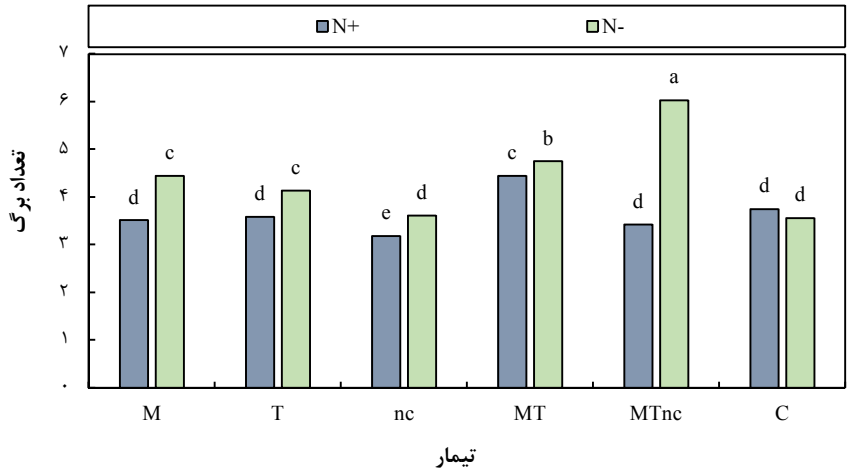
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص سبزینگی برگ (جدول ۲) در نهال‌های پسته نشان داد که تیمارهای میکوریز، مخلوط میکوریز- *Trichoderma* و مخلوط میکوریز- *Trichoderma*- نماتدکش در حضور و عدم حضور نماتد تقریباً اثر مشابهی داشته‌اند (شکل ۳).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط

**جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مربوط به تأثیر عوامل بیوکنترل بر شاخص‌های سطح برگ و سبزینگی گیاه پسته.**

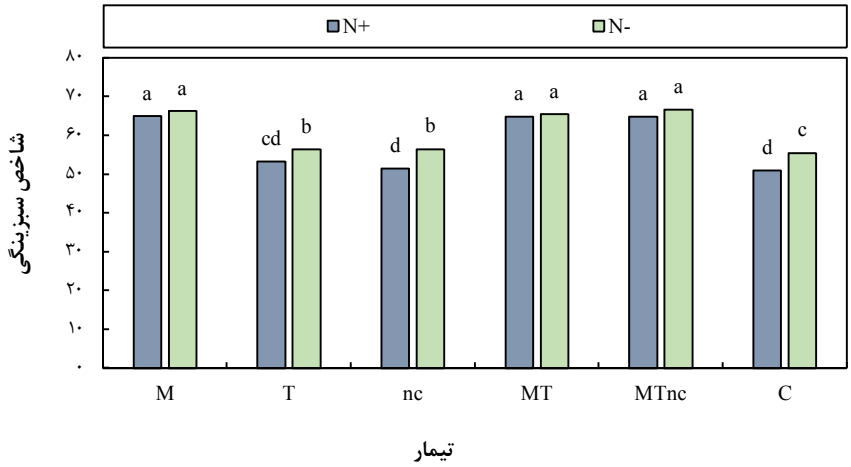
| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | قطر ساقه | طول ساقه | سبزینگی | تعداد برگ | سطح برگ |
| تیمار | ۱۱ | ۱/۲۴۸** | ۲/۹۶۸ ns | ۱۵۱/۱۶۶** | ۲/۴۶۵** | ۱۸/۸۳۰** |
| خطا | ۴ | ۰/۰۹۷ | ۲/۷۳۴ | ۲/۷۹۹ | ۰/۰۴۱ | ۱/۲۲۷ |
| کل | ۳۳ | - | - | - | - | - |

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد




**شکل ۲- تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با اینوکولوم عوامل بیوکنترل (میکوریز وزیکولار- آربوسکولار و *Trichoderma*) بر شاخص تعداد برگ علیه نماتد.**

**M= Mycorrhizae, T = *Trichoderma,* nc = nematicidae, MT = Mycorrhizae + *Trichoderma*, MTnc = Mycorrhizae + *Trichoderma* + nematicidae, N= nematode, C= Control**



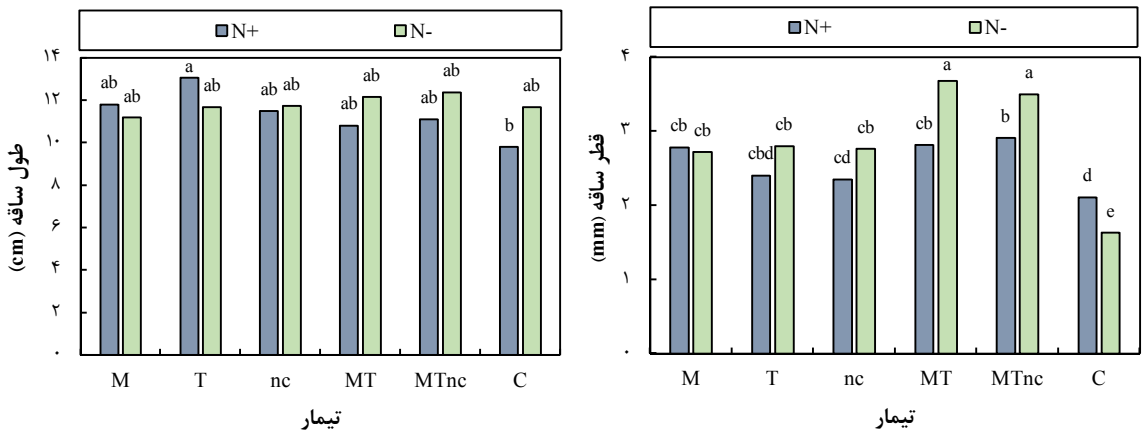

**شکل ۳- تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با اینوکولوم عوامل بیوکنترل (میکوریز وزیکولار- آربوسکولار و *Trichoderma*) بر شاخص سبزینگی علیه نماتد.**

**M= Mycorrhizae, T = *Trichoderma,* nc = nematicidae, MT = Mycorrhizae + *Trichoderma*, MTnc = Mycorrhizae + *Trichoderma* + nematicidae, N= nematode, C= Control**

به طول ساقه (جدول ۲) نشان داد که تیمارهای *Trichoderma* و میکوریز در نهال‌های مایه‌زنی شده با نماتد با مقادیر ۳۳/۱۲ و ۲۰/۳۸ درصد افزایش ، دارای بیشترین طول ساقه می‌باشند (شکل ۴). همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قطر ساقه (جدول ۲) نشان داد که تیمار میکوریز- *Trichoderma*

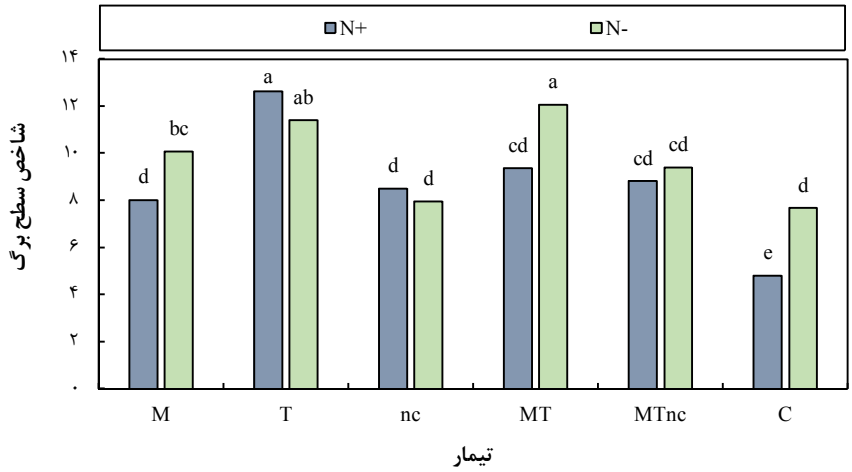
و میکوریز- *Trichoderma*- تماتدکش نسبت به شاهد سالم به ترتیب برابر با ۱۲۵/۷۶ و ۱۱۴/۷۲ درصد موجب افزایش قطر ساقه در نهال‌های پسته شده است (شکل ۴).

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به سطح برگ در نهال‌های پسته (جدول ۲) نشان داد که تیمار میکوریز- *Trichoderma*- نماتدکش و میکوریز سبب کاهش معنی‌دار سطح برگ در نهال‌های مایه‌زنی شده با نماتد نسبت به تیمارهای ذکر شده بدون حضور نماتد شدند، اما نماندکش تفاوتی با شاهد نداشت (شکل ۵)، در تیمارهای سالم، تیمار میکوریز- *Trichoderma*- نماتدکش و میکوریز دارای بیشترین میزان نسبت و شاخص سطح برگ بود (شکل ۵). به نظر می‌رسد که تفاوت قابل توجهی بین تیمارهای مورد بررسی از لحاظ میزان و نوع اثربخشی باشد. از آنجایی که ریشه‌های آلوده نمی‌توانند وظیفه خود را به خوبی انجام دهند و کم آبی در گیاه به وجود می‌آید، بنابراین گیاه برای حفظ بقا و فرار از تنش کم آبی مکانیسم‌هایی را به کار می‌گیرد. برگ‌ها ممکن است سرعت تعرق و دریافت انرژی ناشی از تابش خورشید را به‌وسیله لوله‌ای شدن کاهش دهند. یکی از اثرات دیگر کم آبی، کاهش رشد سلولی و در نتیجه کاهش گسترش سطح برگ است (Tadayon, 2009). وقتی گیاهان با کم آبی مواجه می‌شوند، انعطاف‌پذیری دیواره سلول‌های در حال رشد برگ‌ها و ساقه‌ها عمدتاً کم شده و با کاهش تورژسانس سلولی توسعه سلول و در نتیجه رشد برگ کاهش می‌یابد (Amarjit & Basra, 1958). زردی برگ‌ها از علائم عمومی حمله نماتدها به گیاه می‌باشد




**شکل ۴- تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با اینوکولوم عوامل بیوکنترل (میکوریز وزیکولار- آربوسکولار و *Trichoderma*) بر شاخص طول و قطر ساقه علیه نماتد.**

**M= Mycorrhizae, N= Nematode, T= *Trichoderma*, nc= nmaticidae, C= Control**



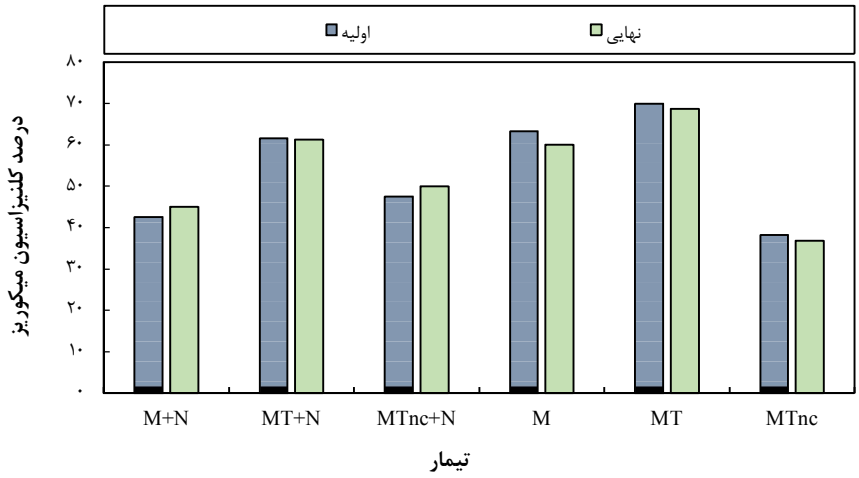

**شکل ۵- تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با اینوکولوم عوامل بیوکنترل (میکوریز وزیکولار- آربوسکولار و *Trichoderma*) بر شاخص سطح برگ علیه نماتد.**

**M= Mycorrhizae, T = *Trichoderma,* nc = nematicidae, MT = Mycorrhizae + *Trichoderma*, MTnc = Mycorrhizae + *Trichoderma* + nematicidae, N= nematode, C= Control**

(Melakeberhan *et al*., 1987). حضور نماتد در کنار گیاه سبب کاهش میزان آب لازم برای گیاه خواهد شد. به نوعی که گیاه حالت پژمردگی و کم آبی را در خود نشان می‌دهد و یکی از آثار کم آبی، کاهش رشد سلولی و بنابراین کاهش نسبت و حتی شاخص سطح برگ است. چرا که شاخص سطح برگ برابر است با نسبت سطح برگ به سطح خاک اشغال شده و نسبت سطح برگ برابر است با سطح برگ به وزن خشک برگ ($cm^2\ g^{-1}$) که این میزان در تیمارهای آلوده بسیار پایین است. یکی از مشکلات بیشتر عوامل بیوکنترل عدم پایداری و کاهش جمعیت آن‌ها با سرعت نسبتا زیاد در محیط مزرعه یا باغ می‌باشد. مزیت نسبی قارچ های میکوریز نسبت به سایر عوامل بیوکنترل ثبات جمعیت و پایداری آن‌ها پس از استقرار می باشد. نتایج نشان داد که در همه تیمارها جمعیت آن‌ها در طول دوره آزمایش کاهش پیدا نمی‌کند (شکل ۶).

## نتیجه‌گیری کلی

بیمارگرهای متعددی به گیاه پسته حمله نموده و موجب درجات مختلفی از خسارت می‌گردند. به دلیل خطرات زیست محیطی سموم، محققان به دنبال روش‌های تلفیقی و استفاده از مکانیسم های مقاومتی گیاه، جهت کاهش خسارت ناشی از عوامل بیماری‌زا می‌باشند. مقاومت القایی توسط برخی میکروارگانیسم‌ها، مواد شیمیایی طبیعی، مصنوعی و یا با ایجاد زخم درگیاه تحریک و فعال می‌گردد. استفاده از مواد شیمیایی القاء کننده مقاومت همچون ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها علاوه بر اینکه خطری برای محیط




**شکل ۶- تأثیر پایداری عامل بیوکنترل قارچ میکوریز آربوسکولار در روی ریشه نهال پسته.**

زیست ندارند، بر سلامت انسان تأثیر مثبت می‌گذارند. گیاهان با پاسخ‌های دفاعی فیزیکی و شیمیایی مختلف از خودشان در مقابل عوامل بیماری‌زا دفاع می‌کنند. نماتدهای پارازیت گیاهی سالانه خسارات اقتصادی فراوانی را به محصولات مختلف وارد می‌نمایند و کنترل شیمیایی آن‌ها اثرات مخرب و جبران ناپذیری بر محیط زیست بر جا می‌گذارد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوی فنل کل پس از مایه‌زنی نهال‌های پسته با محرک‌های القایی و اعمال تیمارهای مورد بررسی در پژوهش نشان داد که تیمار قارچ *Trichoderma* بیشترین تأثیر و تیمار نماتدکش کمترین تأثیر را در محتوی فنل کل داشت. موفقیت یک عامل بیوکنترل، مشخص نمودن فرمولاسیون مناسب و توانایی کاربرد هم‌زمان آن با سموم شیمیایی، روش مایه‌زنی و جمعیت مناسب از عامل بیوکنترل بسیار ضروری می‌باشد. بررسی آنتاگونیست‌ها در شرایط باغی جهت بالا بردن کارایی عوامل بیوکنترل ضروری می‌باشد. استفاده از این ترکیبات علاوه بر اینکه خطر زیست محیطی ندارند برای گیاه مفید محسوب شده و در کنترل بیماری هم مؤثرترند. همچنین استفاده از مواد شیمیایی القاء کننده مقاومت همچون ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها علاوه بر اینکه خطری برای محیط زیست ندارند بر سلامت انسان تأثیر مثبت می‌گذارند.

## منابع


۱- پناهی، ب، اسماعیل پور، ع، مؤذن پورکرمانی، ف، و فریور مهین، م. (۱۳۸۱). راهنمای پسته (کاشت داشت برداشت). *نشر آموزش کشاورزی*.

۲- کریمی، حر. (۱۳۸۹). فیلوژنی گونه‌های جنس پسته. *نشر پلک*. تهران.

۳- اکرم قادری، ف، رضایی، ج، سلطانی، ا. (۱۳۸۳). برآورد سطح برگ در ارقام پنبه با استفاده از

ویژگی‌های رویشی گیاه. *علوم کشاورزی و منابع طبیعی*. ۱۱(۱): ۲۴-۱۵.

4- Abdel-Monaim, MF, Abdel-Gaid, MA, & Armanious, HA. (2012). Effect of chemical inducers on root rot and wilt diseases, yield and quality of tomato. *International Journal of Agricultural Sciences, 2*(7), 210-220.

5- Ahmad, JS, & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology, 77*(2), 182-189.

6- Amarjit, S, & Basram R. (1958). Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Thenetherlands by Harwood Academic Publishers.

7- Beckman, TG, & Pusey, PL. (2001). Field testing peach rootstocks for resistance to *Armillaria* root rot. *HortScience, 36*, 101-103.

8- Biermann, B, & Linderman, R. (1981). Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytologist, 87*, 63-67.

9- Blokhina, O, Virolainen, E, & Fagerstedt, KV. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany, 91*(2), 179-194.

10- Chu, YH, Rao, SG, & Zhang, H. (2000). A case for end system multicast (keynote address). *ACM SIGMETRICS Performance Evaluation Review, 28*(1), 1-12.

11- Dixon, NM. (1999). The organizational learning cycle: How we can learn collectively. Gower Publishing, Ltd.

12- Duncan, LW, & Ferris, H. (1983). Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species. *Journal of Nematology, 15*, 227-234.

13- Egert, M, & Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany, 48*(1), 43-49.

14- El-Ghaouth, A, Wilson, CL, & Wisniewski, M. (1998). Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by Candida saitoana in apple fruit. *Phytopathology, 88*(4), 282-291.

15- Fatemy, S. (2009). Integrated management of pistachio nematodes. Integrated management of fruit crops and forest nematodes (Eds.), Ciancio, A, Mukerji, KG. Springer the Netherlands. 243–252.

16- Goodman, KS. (1986). What's whole in whole language? A parent/teacher guide to children's learning. heinemann educational books, Inc., 70 Court St., Portsmouth, NH 03801.

17- Gorlach, A, Brandes, RP, Nguyen, K, Amidi, M, Dehghani, F, & Busse, R. (2000). A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circulation research, 87*(1), 26-32.

18- He, Y, & Zhu, ZY. (2008). Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicun esculentum*. *Biological Plantarum, 52*, 792-795.

19- Honty, K, Hevesi, M, Toth, M, & Stefanovits-Banyai, E. (2005). Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*, Proceedings of the 8th Hungarian Congress on Plant

Physiology and the 6th Hungarian Conference on Photosynthesis. *Acta Biologica Szegediensis, 49*, 127-129.

20- Hunt, DJ, & Handoo, ZA. (2009). Taxonomy, identification and principal species. root- knot nematodes. *CAB International,* 55-88.

21- Hussey, RS, & Barke, KR. (1973). A comparsion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter, 57*, 1025-1028.

22- Jepson, SB. (1987). Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). C.A.B international, UK.

23- Karssen, G, & Moens, M. (2006). Root-knot Nematodes. In: Perry. RN, & Moens, M. (Eds).

24- Khatamidoost, Z, Jamali, S, Moradi, M, & Saberi-Riseh, R. (2015). Effect of Iranian strains of *Pseudomonas* spp. on the control of root-knot nematodes on pistachios. *Biocontrol science technology, 25*(3), 291-301.

25- Kloepper, JW, Tuzun, S, & Kuc, J. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Scienceand Technology, 2*, 349-351.

26- Kosuge, T. (1969). The role of phenolics in host response to infection. *Annual Review of Phytopathology, 7*, 195-222.

27- Ksouri, R, Megdiche, W, Debez, A, Falleh, M, Grignon, C, & Abdelly, C. (2007). Salinity effect on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry, 45*, 244-248.

28- Lee, HL, Chang, CK, Jeng, WY, Wang, AHJ, & Liang, PH. (2012). Mutations in the substrate entrance region of β-glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability. *Protein Engineering Design and Selection, 25*(11), 733-740.

29- Liu, RJ, Li, HF, Shen, CY, & Chiu, WF. (2002). Detection of pathogenesis-related proteins in cotton plants, Physiological and Molecular Plant Pathology Volume 47, Issue 6, December 1995, pp. 357-363.

30- Mehrnejad, MR. (2006). Three pistachio species evaluated for resistance to the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae*. Forest Insect Population Dynamics and Host Influences.

31- Melakeberhan, H, Webster, JM, Brooke, RC, D'Auria, JM, & Cackette, M. (1987). Effect of Meloidogyne incognita on plant nutrient concentration and its influence on the physiology of beans. *Journal of Nematology, 19*(3), 324.

32- Mpiga, P. (1997). Induction de la résistance chez la tomate contre la pourriture fusarienne de la racine et du collet: action conjuguée de *Pseudomonas fluorescens* et du chitosane.

33- Ogallo, JL, & Clure, MAMc. (1996). Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematode in tomato. *Journal of Phytopathology, 86*, 498-501.

34- Pakeerathan, K, Mikunthan, G, & Tharahani, N. (2009). Effects of different animal manures on *Meloidogyne incognita* (kofoid and white) on tomato. *World Journal of Agricultural Sciences, 5*(4), 432-435.

35- Phillips, JM, & Hayman, D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society, 55*, 158-118.

36- Robb, J, Powell, DA, & Street, PFS. (1987). Time course of wall- coating secretion in *Verticillium* – infected tomatoes. *Physiology and Plant Pathology, 31*, 217-226.

37- Roland, SF, & Laima, SK. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture, 1*, 1-5.

38- Siegrist, M, & Cvetkovich, G. (2000). Perception of hazards: The role of social trust and knowledge. *Risk analysis, 20*(5), 713-720.

39- Sikora, RA, & Fernandez, E. (2005). Nematode parasites of vegetables. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, 2*, 319-392.

40- Tadayon, MR. (2009). Physiological responses of plants to environmental stresses. Publishers of Shahrekord University, Iran. psylla, *Agonoscena pistaciae*, pp. 58-62. In: Kamata, N, Liebhold, A, Quiring, DT. (Eds.).

41- Vovlas, N, Mifsud, D, Landa, BB, & Castillo, P. (2005). Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant pathology, 54*(5), 657-664.

42- Yamasaki, H, Sakihama, Y, & Ikehara, N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as adetoxification mechanism of plant cells against $H_2O_2$. *Plant Physiology, 115*, 1405-1412.

# Evaluation of Changes in some Physiological and Vegetative Indices of Pistachio Seedlings Treated with Fungal Antagonists in the Presence and Absence of Root-Knot Nematode

**Abstract**

Increase of phenolic content is one of the defensive barriers against pathogenic disorders and environmental stresses. In this study the effects of fungal species of arbuscular mycorrhizal species *Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices, Funneliformis caledonius* and *Tricoderma, Tricoderma harzianum Tricoderma aureoviride* on induction of phenolic compounds in pistachio plant Badami Riz Zarand at 0, 36, 72, 132 and 288 hours after nematode inoculation was performed in three replications based on completely randomized design. The results showed that the total phenol content in treated plants had a significant increase compared to the control. Pistachio seedling treated by mycorrhizia at 132 hours and *Trichoderma* after 72 hours showed slowly increase in at 132 hours post-nematode inoculation and *Trichoderma* slowly after 72 hours of inoculation, there was a slight increase in phenol content in the presence and absence of the nematode, so that in 288 hours had maximum of increase. Also, the growth factors of leaf number in Mycorrhiza-*Trichoderma* treatment were equal to 18.53 and 33.33%, respectively, causing an increase in leaf number weight in the presence and absence of nematodes. Also, mycorrhiza treatment compared to healthy control is equal to 24.77% and mycorrhiza-*Trichoderma*-nematode treatment with 69.19% have the highest number. The studied fungi can be suggested for using in biological control of root-knot nematode.

**Keywords**: Arbuscular mycorrhizal, Badami Riz Zarand, Colonization, Resistance induction