نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۳۷-۲۵

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 1, Spring 2021, P. 25-37

مقاله پژوهشی

ارزیابی سطح آنزیم‌های دفاعی القاء شده در اثر قارچ‌های آنتاگونیست علیه نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در نهال‌های پسته

فاطمه مهدی‌نژاد[۱]- اعظم زین‌الدینی ریسه[۲*]- ابراهیم صداقتی[۳]- حسین علایی[٤]- محمد مرادی[٥]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۳

چکیده

پسته از مهمترین محصولات صادراتی کشور است و نماتد ریشه‌گرهی از عوامل خسارت‌زا در تولید این محصول است. در این پژوهش اثرات مهار زیستی قارچ‌های میکوریز وزیکولار- آرباسکولار (*Funneliformis mosseae, Rhizophagus intraradices, Funneliformis caledonius*)، *Tricoderma* (*Tricoderma harzianum ,Tricoderma aureoviride*) و مخلوط دو قارچ علیه *M. javanica* تحت شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. به منظور بررسی تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست بر القاء آنزیم‌های دفاعی در نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دوازده تیمار در سه تکرار در گلخانه انجام شد. مقایسهٔ میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن اجرا گردید. سطح آنزیم‌های دفاعی فنیل‌آلانیل آمونیالیاز (PAL)، پراکسیداز (POX) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO)، در چهار زمان یک و نیم، سه، پنج و نیم و دوازده روز بعد از مایه‌زنی نماتد اندازه‌گیری شدند. آزمایش دیگری به منظور ارزیابی پتانسیل قارچ‌های آنتاگونیست بر کنترل نماتد ریشه گرهی در نهال‌های پسته اعمال گردید. آزمایش دوم در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تیمار و سه تکرار انجام شد. شاخص‌های بیماریزایی در تیمارهای قارچی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نماتدی نشان دادند. تیمار *Tricoderma* در تمامی شاخص‌های مورد بررسی تسبت به دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. شاخص تولید مثل در تیمار *Trichoderma* و تلفیق آن با میکوریز ۷۲ و ۳۳/۳ درصد و جمعیت نماتدی برابر با ۷۳/۴ و ۳۶/۲ درصد در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد. حداکثر میزان فعالیت آنزیمی برای POX، PPO در تیمارهای مختلف در روز دوازدهم به دست آمد. حداکثر مقدار برای فعالیت PAL در نهال‌های تیمار شده با قارچ‌های میکوریز و *Tricoderma* پس از پنج و نیم روز ملاحظه شد.

واژه‌های کلیدی: پسته، مهار زیستی، میکوریز، *Tricoderma*

مقدمه

پسته (*Pistacia vera*) از مهمترین محصولات باغی و کالاهای صادراتی کشور می‌باشد (۲۱). تولیدات کشاورزی به عنوان مهمترین منابع غذایی مردم جهان با چالش‌های متعددی روبرو می‌باشند که یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده را می‌توان بیمارگرهای گیاهی نام برد. از جمله مهمترین نماتدهای خسارت‌زای محصولات کشاورزی در جهان گونه‌های *Meloidogyne* می‌باشند. گونه‌های *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* و *M. Javanica* به دلیل پراکنش زیاد، دامنه میزبانی وسیع و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی در رده مهمترین بیمارگرهای گیاهی قرار دارند که تأمین منابع غذایی جهان را تهدید می‌نمایند. از باغات پسته و بادام ایران ۲۶ گونه، متعلق به ۱۳ جنس از نماتدهای راسته Tylenchida گزارش شده است (۲). دو گونه *Meloidogyne incognita* و *M. javanica* در اغلب باغات پسته در استان‌های مختلف وجود دارند (۱۶ و ۱۷). مدیریت نماتدهای ریشه‌گرهی به دلیل دامنه میزبانی گسترده، چرخه تولیدمثلی کوتاه مدت و همچنین میزان تولیدمثل بالا بسیار مشکل است (۸). استفاده از نماتدکش‌ها، ارقام مقاوم، گیاهان تله، ریشه‌کنی میزبان، استفاده از گیاهان آنتاگونیست و آفتابدهی خاک از روش‌های کنترل نماتد می‌باشند البته استفاده از نماتدکش‌ها نه تنها سبب بروز مقاومت در جمعیت‌های نماتدی

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، استادیار و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان
(*- نویسنده مسئول: Email: zeynadini@vru.ac.ir)
۵- استادیار پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان

DOI: 10.22067/JPP.2021.32842.0

می‌شود بلکه دارای خطرات زیستی محیطی نیز می‌باشند (۴). قارچ‌های میکوریز در طبیعت در تأمین نیازهای آبی و تغذیه‌ای گیاهان نقش مؤثری دارند، با افزایش جذب فسفر، آب و مواد معدنی سبب افزایش رشد و سلامتی گیاه و سبب بهبود ساختار خاک می‌گردند و از طرف دیگر با سازو کارهای غیر مستقیم مانند تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی در گیاهان و القاء مقاومت سبب حفاظت زیستی میزبان در برابر بیمارگرها می‌شوند (۱، ۷، ۳۶ و ۴۱). قارچ‌های، تریکودرما جزء قارچ‌های همه‌جازی هستند و دامنه وسیعی از زیستگاه‌های خاکی از اقلیم‌های سرد تا گرمسیری شامل خاک‌های کشاورزی، جنگل، باغ‌ها، مراتع و بیابان و صحرا را کلنیزه می‌کنند (۱۸). گونه‌هایی نظیر *Trichoderma harzianum* کنترل مؤثری را علیه نماتدهای ریشه‌گرهی ایجاد می‌کند. از دیگر گونه‌های که دارای توانایی آنتاگونیستی علیه *Meloidogyne* spp. می‌باشند می‌توان *T. viride*, *T. asperellum* و *T. aureoviride* را نام برد (۲۴ و ۴۱). کاربرد این قارچ‌ها سبب کاهش گال‌های نماتدی و بهبود رشد گیاه و در طولانی مدت سبب افزایش رشد و بازده گیاه می‌شوند (۳۸). در بررسی اثر تیمار قارچ *Glomus mosseae* بر چهار واریته لوبیای چشم بلبلی (*Ving sinesis* L.) کاهش قابل توجهی در میزان گال و همچنین بهبود در رشد گیاه در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه علیه نماتد *M. incognita* مشاهده شد (۳۰). بررسی اثرات حفاظت زیستی دو گونه *G. mosseae* و *G. intraradices* در مقابل *M. graminicola* در برنج صورت گرفت، مشاهده شد که *G. mosseae* نسبت به *G. intraradices* درصد کلنیزاسیون بالاتری داشته و از تکثیر نماتد جلوگیری کرد (۲۵). در بین گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما، *Trichoderma longibrachiatum* در اکثر خاک‌های دنیا دیده می‌شود این گونه توانایی بالایی در کنترل نماتدهای گیاهی از قبیل *M. javanica* و *Heterodera avenae* دارد (۳ و ۴۵). گیاهان دارای دامنه گسترده‌ی از سازو کارهای دفاعی مؤثر در برابر تهاجم بیمارگرها و آفات مختلف هستند. این سازو کارها شامل موانع فیزیکی پیش ساخته، سدهای شیمیایی و پاسخ‌های دفاعی القاء شده است (۳۲). دخالت مسیر فنیل پروپانوئید در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با میکوریز در کنترل نماتد *M. incognita* نقش اساسی دارد (۴۳). کاهش معنی‌دار شاخص‌های نماتدی در گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با *T. harzianum* با افزایش سطح آنزیم‌های دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز [1](PAL)، پراکسیداز [2](POX) و پلی‌فنل اکسیداز [3](PPO) همراه بوده است (۳۵). این آزمایش با هدف بررسی پتانسیل القاء مقاومت نهال‌های پسته تیمار شده با قارچ‌های میکوریز و تریکودرما با اندازه‌گیری تغییرات سطح آنزیم‌های دفاعی PAL، POX و PPO علیه نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* انجام شد.

مواد و روش‌ها

خالص‌سازی، استخراج و شناسایی نماتد ریشه‌گرهی

جهت تهیه زادمایه پس از جمع‌آوری خاک آلوده از باغ‌های موسسه تحقیقات پسته رفسنجان اقدام به کاشت نشاء گوجه‌فرنگی رقم Early urbana در خاک آلوده گردید. جمعیت خالص نماتد از تک کیسه تخم تهیه شد. برای این منظور تک کیسه تخم روی گوجه‌فرنگی در شرایط ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. شناسایی گونه با تهیه برش از ناحیه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها (perineal pattern) و بررسی اسلاید میکروسکوپی انجام شد (۲۳). گونه نماتد *Meloidogyne javanica* شناسایی گردید. برای تهیه سوسپانسیون نماتد حاوی لاروهای سن دوم، ریشه‌های گوجه‌فرنگی حاوی گال و کیسه تخم خرد شده و سپس 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 جمع آوری و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۰). برای تعیین غلظت سوسپانسیون لارو، تعداد لارو در یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون با لام مدرج شمارش گردید این کار سه بار تکرار و میانگین گرفته شد. میزان ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون که حاوی پنج هزار لارو سن دوم بود به عنوان زادمایه نماتد استفاده گردید.

تهیه زادمایه قارچ میکوریز وزیکولار-آرباسکولار

گونه‌های قارچ میکوریز از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان تهیه گردید و با نسبت ۲۰ درصد در محیط خاک، پرلایت و ماسه با نسبت مساوی مخلوط شدند و در گلدان چهار کیلوگرمی پر شد. در هر گلدان هشت عدد بذر ذرت رقم ۷۰۴ ضدعفونی شده کشت شد و حدود پنج ماه تنش خشکی به گلدان داده شد.

تهیه زادمایه قارچ تریکودرما

جدایه‌های قارچ تریکودرما (*T. harzianum*, *Tricoderma aureoviride*) مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از T1، T2، T3، T4 و T5 که از کلکسیون قارچ‌شناسی بخش بیماری‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان تهیه شدند. این جدایه ها جمع‌آوری شده از خاک‌های شور و قلیایی مناطق مختلف استان کرمان جداگانه تکثیر شدند. پس از خالص سازی به نسبت یکسان از هر

1- Phenylalanine ammonia lyase
2- Peroxidase
3- Polyphenoloxidase

جدایه با هم مخلوط گردیدند. به این ترتیب مقدار گندم لازم از مخلوط جدایه‌ها برای مایه‌زنی گلدان‌ها به میزان 10^7 اسپور به ازای هر بوته تعیین گردید.

آزمایشات گلخانه‌ای

ابتدا بذرهای پسته رقم بادامی‌زرند 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. گلدان‌های سه کیلوگرمی از خاک و ماسه استریل به نسبت ۱:۲ پر شده و تعداد پنج عدد بذر در عمق سه سانتی‌متری کاشته و در گلخانه در شرایط ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۳). نهال‌های پسته در مرحله‌ی ۱۰-۸ برگی با مقدار ۶۰ گرم از مخلوط زادمایه میکوریزایی تهیه شده، مایه‌زنی شدند و سه ماه بعد جهت بررسی از این گیاهان نمونه‌برداری انجام شد. به منظور اطمینان از خلوص قارچ‌ها و کلنیزه شدن ریشه‌ها، رنگ‌آمیزی ریشه‌های گیاهی انجام و بررسی میکروسکوپی جهت مشاهده اندام‌های مختلف قارچ صورت گرفت (۳۱). پس از اطمینان از تیمار میکوریزا، تیمار *Trichoderma* اعمال گردید. برای تیمار تریکودرما میزان ۱۰ گرم از زادمایه مخلوط جدایه‌های T1، T2، T3، T4 و T5 به ازای یک کیلوگرم خاک استفاده شد (۹). بعد از مدت ۲۱ روز از تیمار تریکودرمایی مایه‌زنی نهال‌های پسته با جمعیت ۵۰۰۰ لارو سن دوم نماتد *M. javanica* انجام شد. تیمار نماتدکش غلظت ۰/۶ گرم به ازای هر گلدان در خاک نماتدکش نماتورین (حاوی fosthiazate) از گروه فسفات‌های آلی، ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی نماتد استفاده گردید. تیمار نماتدکش، جهت بررسی اثرات منفی احتمالی بر روی تیمارهای مهارزیستی (میکوریز، تریکودرما) و همچنین ارزیابی عملکرد تیمارهای مهار زیستی در مقایسه با نماتدکش اعمال گردید.

این پژوهش به صورت دو آزمایش جداگانه انجام شد. در آزمایش اول جهت ارزیابی اثر تیمارهای قارچی بر شاخص‌های بیماریزایی نماتدی آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی با شش تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل قارچ میکوریز، قارچ *Trichoderma*، مخلوط همزمان قارچ میکوریز- *Trichoderma*، کاربرد نماتدکش، مخلوط قارچ میکوریز-*Trichoderma* - نماتدکش و شاهد بودند. آزمایش دوم با هدف بررسی پتانسیل قارچ‌های آنتاگونیست در القاء آنزیم‌های دفاعی نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور عوامل کنترلی در شرایط حضور و عدم حضور نماتد و زمان پیاده شد. تیمارهای کنترلی در بالا اشاره شدند و فاکتور دوم چهار زمان یک و نیم، سه، پنج و نیم و دوازده روز بعد از مایه‌زنی نماتد را شامل گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم شکل‌ها به کمک نرم‌افزار Excel (Version 9.1) انجام شد. مقایسهٔ میانگین تیمارها با استفاده از روش آزمون دانکن و در سطح احتمال یک درصد صورت گرفت (۱۳).

ارزیابی شاخص‌های بیماریزایی

پس از گذشت ۷۵ روز از زمان مایه‌زنی نماتد به خاک، نهال‌های پسته از گلدان بیرون آورده شد. شاخص‌های آلودگی نماتد شامل تعداد گال و کیسه تخم، شاخص تولید مثل و تعداد لارو سن دوم محاسبه گردید. شمارش تعداد گال و تعداد کیسه تخم در ریشه براساس روش تایلور و ساسر (۴۲) تعیین گردید. در این روش در صورت عدم وجود گال یا کیسه تخم روی ریشه شاخص صفر، بین ۲-۱ گال یا کیسه تخم شاخص یک، بین ۱۰-۳ شاخص دو، بین ۳۰-۱۱ شاخص سه، بین ۱۰۰-۳۱ شاخص چهار و بیش از ۱۰۰ گال یا کیسه تخم شاخص پنج در نظر گرفته شد. برای این منظور تعداد چهار نمونه یک گرمی از وزن تر ریشه پسته جدا شده و تعداد کیسه تخم و تعداد گال به‌وسیله استریومیکروسکوپ (Carl Zeiss, Germany) شمارش گردید. برای شمارش تعداد تخم داخل هر کیسه از محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۲۵ درصد به مدت ۳ دقیقه بر روی کیسه تخم استفاده گردید تا تخم‌ها از ماده ژلاتینی آزاد شوند. برای محاسبه فاکتور تولید مثل جمعیت نهایی در هر تیمار بر جمعیت اولیه که پنج هزار لارو بود تقسیم گردید. جهت تعیین جمعیت لارو سن دوم در خاک بعد از خارج نمودن نهال، خاک گلدان به طور کامل مخلوط و یک نمونه ۳۰۰ گرمی از خاک برداشته و استخراج لاروهای سن دوم نماتد با استفاده از روش سینی وایت هد انجام شد (۴۵).

ارزیابی فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

در تیمارهای مختلف و در پنج مرحله زمانی صفر، یک و نیم، سه، پنج و نیم و دوازده روز بعد از مایه‌زنی نماتد سطح آنزیم‌های دفاعی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت استخراج آنزیم‌های مورد نظر و تهیه عصاره گیاهی نمونه‌های جدا شده از برگ نهال‌های پسته در درون یک هاون از قبل سرد شده با سه میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷/۲) کاملاً هموژنیزه شدند. عصاره گیاهی به دست آمده در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Denley BR401 UK) شد و سپس سوسپانسیون رویی جهت بررسی میزان تغییرات سطوح آنزیمی استفاده گردید (۳۴). میزان فعالیت آنزی POX براساس روش پلوا و همکاران (۳۳) و فعالیت آنزیم PPO با روش نیکولی و همکاران (۲۹) اندازه‌گیری شد. جهت

مشخص کردن میزان فعالیت آنزیم PAL از روش دانها (۱۰) استفاده گردید.

نتایج و بحث

تیمارهای قارچی در شاخص‌های مختلف بیماریزایی در مقایسه با تیمار نماتد تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان دادند. تیمار *Trichoderma* به تنهایی بهترین نتیجه بازدارندگی بیماری را نشان داد. بعد از آن تیمار تلفیق *Trichoderma*– میکوریز پیشنهاد می‌گردد به‌طوری که در تمامی شاخص‌ها با تیمار نماتد به تنهایی تفاوت معنی داری نشان داد و تقریباً مشابه تیمار تلفیقی تریکودرما– میکوریز– نماتدکش عمل کرده است (جدول ۱).

جدول ۱- اثر تیمارهای مهار زیستی قارچی و نماتدکش بر روی شاخص‌های بیماریزایی نماتد ریشه‌گرهی در نهال‌های پسته
Table 1- Effect of biological control agents and nematicide treatments on pathogenic indices of root-knot nematode in pistachio seedlings

تیمار Treatment	شاخص تولید مثل Reproduction factor	جمعیت نهایی نماتد در گلدان Final population	تعداد لارو سن دوم در ۳۰۰ گرم خاک Second juveniles/300gr of soil	تعداد تخم داخل هر کیسه تخم Number of egg/egg mass	تعداد کیسه تخم در یک گرم ریشه Number of egg mass/gr of root	تعداد گال در یک گرم ریشه Number of gall/gr of root
نماتد Nematode	3.9a	19969.8a	1273a	273.2a	20.4a	27a
نماتد+تریکودرما Nematode+Trichoderma	1.08d	5412.4d	340d	215.3c	5.2c	9.5c
نماتد+میکوریز Nematode+Mycorrhiza	2.8b	14054.6b	793c	235.2b	18.6a	23.8a
نماتد+نماتدکش Nematode+Nematicide	3.6a	18155a	1186a	278.3a	17.4a	24.8a
نماتد+تریکودرما+میکوریز Nematode+Trichoderma+Mycorrhiza	2.6b	13400.3c	1066b	203.6c	9b	16.1b
نماتد+تریکودرما+میکوریز +نماتدکش Nematode+Trichoderma+Mycorrhiza+Nematicide	2.3b	11710.8c	833cb	217.2c	7.6cb	13.8cb

تیمارها با حروف یکسان با توجه به آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.
Treatments with the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at 1%

قارچ تریکودرما به دلیل داشتن توانایی بالا در تولید انواع ترکیبات آنزیمی لیز کننده تخم نماتدها و فاکتورهای القاء کننده مقاومت در گیاهان مختلف به عنوان یکی از موفق‌ترین عوامل کنترلی نماتد ریشه گرهی معرفی می‌گردد (۲۸، ۳۶ و ۴۶). با توجه به نتایج جدول یک کاربرد تریکودرما اثر بیشتری در کنترل نماتد ریشه‌گرهی در مقایسه با دیگر تیمارها نشان داد. نتیجه بدست آمده همخوانی با یافته‌های قبلی را نشان می‌دهد به طوری که جدایه BI از گونه *T. harzianum* دارای اثرات مستقیم بر تخم‌ها ولاروهای نماتد داشته و از طرف دیگر با القاء مقاومت به صورت غیرمستقیم می تواند نفوذ و خسارت نماتد را کاهش دهد (۳۶).

در تیمار میکوریز اگر چه اختلاف معنی‌داری در شاخص گال و کیسه تخم با شاهد دیده نشد اما تعداد لارو سن دوم و فاکتور تولید مثل نماتد کاهش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان دادند. این مطلب می‌تواند به دلیل کوچک بودن اندازه کیسه تخم و تأثیر بر روی تعداد تخم داخل کیسه‌ها باشد. نتیجه یافته قبلی بر روی گونه میکوریزایی *Rizophagus irregularis* در گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که توده تخم و تخم‌ها در ریشه‌های تیمار شده کاهش قابل توجهی دارند (۳۸). در یافته‌های قبلی مشخص شده است که ریشه پنبه به طور معنی‌داری وقتی که ۵۰ درصد از آن توسط *G. intraradices* کلونیزه شود اثر بازدارندگی بر روی نماتد ریشه‌گرهی نشان می‌دهد در حالی که در میزان کمتر از ۵۰ درصد هیچ تأثیری ندارد. در حالی که در مورد گونه *Scutellospora heterogama* در گیاه پشن فروت (*Passiflora edulis*) تنها ۴۰ درصد از کلونیزاسیون میکوریزایی برای کاهش اثرات منفی *M. incognita* کافی است (۵). در مورد نهال‌های پسته احتمال دارد که در تیمار میکوریزایی میزان لازم کلونیزاسیون برای اثر بازدارندگی معنی‌دار رخ

نداده است و لاروهای نماتدی توانستند از سد دفاعی اولیه رد شوند. به طوری که بر اساس یافته‌های قبلی نماتدهایی که بر روی موانع موجود در ریزوسفر غلبه کرده و موفق به آلوده کردن ریشه‌های تیمار شده با میکوریز می‌شوند، احتمالاً با موانع اضافی ناشی از القای پاسخ‌های دفاعی گیاه روبه رو خواهند شد که تکثیر نماتد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴۴). تیمار نماتدکش به تنهایی از نظر آماری با تیمار شاهد مثبت تفاوت معنی‌داری در کاهش شاخص‌های بیماریزایی نماتد ریشه‌گرهی در نهال‌های پسته نشان ندادند و این مطلب می‌تواند احتمالاً به دلیل پایین بودن غلظت آن برای گیاه پسته باشد.

کاهش تعداد گال در تیمارهای میکوریز- *Trichoderma* و *Trichoderma* نسبت به تیمار میکوریز می‌تواند به دلیل جلوگیری از ورود لاروهای آلوده‌کننده نماتد به ریشه به دلیل فعالیت پروتئینازی قارچ *Trichoderma* باشد. تیمار گیاه گوجه‌فرنگی با قارچ *T. harzianum* T-203 و یا با عصاره آن کاهش شدیدی در تعداد گال‌های ریشه و بهبود قابل توجهی در وزن تر بخش هوایی نشان داد. بررسی‌ها نشان دادند که عامل مهار زیستی بر روی نفوذ نماتد به دلیل فعالیت پروتئینازی اثر داشته است (۳۹).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مقادیر آنزیم‌های دفاعی نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX)، پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) در نهال‌های پسته رقم بادامی ریز زرند تحت تأثیر نماتد، قارچ‌های مهار زیستی، زمان مورد بررسی و اثرات متقابل آن‌ها در سطح احتمال یک درصد قرار گرفتند (جدول ۲).

سطح آنزیم‌های مختلفی به دنبال تیمار با میکوریز و تریکودرما در گیاهان افزایش می یابد که هر یک از آنزیم‌ها به نحوی در محدود کردن توسعه عوامل بیمارگر نقش دارند (۱۴). نتایج حاصل از آنزیم POX در حضور نماتد افزایش بیشتری نسبت به شرایط عدم حضور نماتد نشان داد این مطلب به دلیل تحریک سیستم دفاعی گیاه در اثر حضور نماتد می‌باشد (شکل ۱). بررسی‌های قبلی نشان داده که، نماتد ریشه‌گرهی می‌تواند سبب القاء آنزیم‌های دفاعی گیاهان مختلف شود اما سازو کار القاء آنزیم توسط عامل مهار زیستی با بیمارگر تفاوت دارد (۴۴). کاهش تکثیر نماتد در نهال‌های پسته، اهمیت نقش آنزیم‌های دفاعی القاء شده توسط قارچ‌های مهار زیستی را در برابر نماتد تقویت می‌کند. تیمار میکوریزایی افزایش سطح آنزیمی POX بیشتری را در مقایسه با تیمارهای تریکودرمایی نشان داد. هر چند که قارچ تریکودرما توانست سبب القاء این آنزیم شود. حداکثر سطح این آنزیم در تیمارهای مختلف در دوازده روز بعد از مایه‌زنی نماتد مشاهده شد به‌طوری که در تیمار میکوریز- تریکودرما افزایش ۱۳۶ و ۱۸۳ درصد به ترتیب در شرایط عدم حضور و حضور نماتد رخ داد (شکل ۱). افزایش سطح این آنزیم در تیمار میکوریز به تنهایی در هر دو شرایط از نظر آماری با تیمار مخلوط میکوریز- تریکودرما تفاوت معنی‌داری نداشت. از جمله نقش‌های که آنزیم پراکسیداز علیه بیمارگرها برعهده دارند می‌توان به سنتز فیتوالکسین‌ها، تجمع ترکیبات فنلی در دیواره سلولی گیاهان، محدود کردن گسترش بیماری و تولید لیگنین اشاره نمود (۱۱).

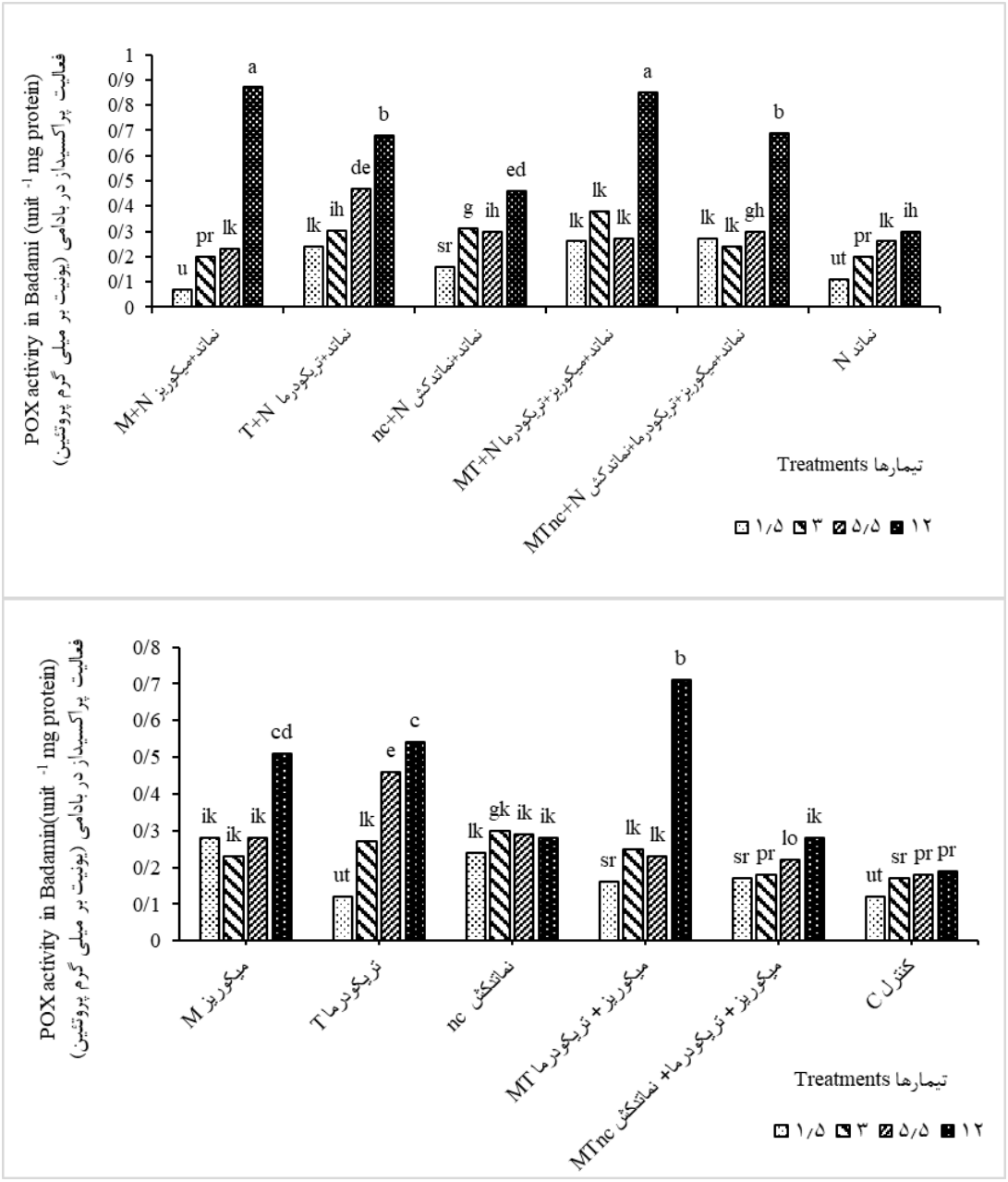
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر عوامل مهار زیستی قارچی و نماتد کش بر روی فعالیت آنزیم‌های دفاعی علیه نماتد ریشه‌گرهی

Table 2- Results of variance analysis of the effect of fungal biological control agents and nematicide on the activity of defensive enzymes against root-knot nematode

منابع تغییر Source of variations	میانگین مربعات Mean of squares			
	درجه آزادی Df	پراکسیداز Peroxidase	پلی فنل اکسیداز Polyphenol oxidase	فنیل آلانین آمونیا لیاز Phenylalanine Ammonylase
تیمار Treatment	11	0.08**	21.96**	1.38**
زمان Time	3	0.79**	129.33**	6.50**
زمان × ساعت H ×T	33	0.04**	5.32**	0.17**
خطا Error	-	0.0008	0.008	0.01
Coefficient of variation%	-	9.32	3.14	6.93

**تفاوت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است.

** Significant difference at 1% probability level.



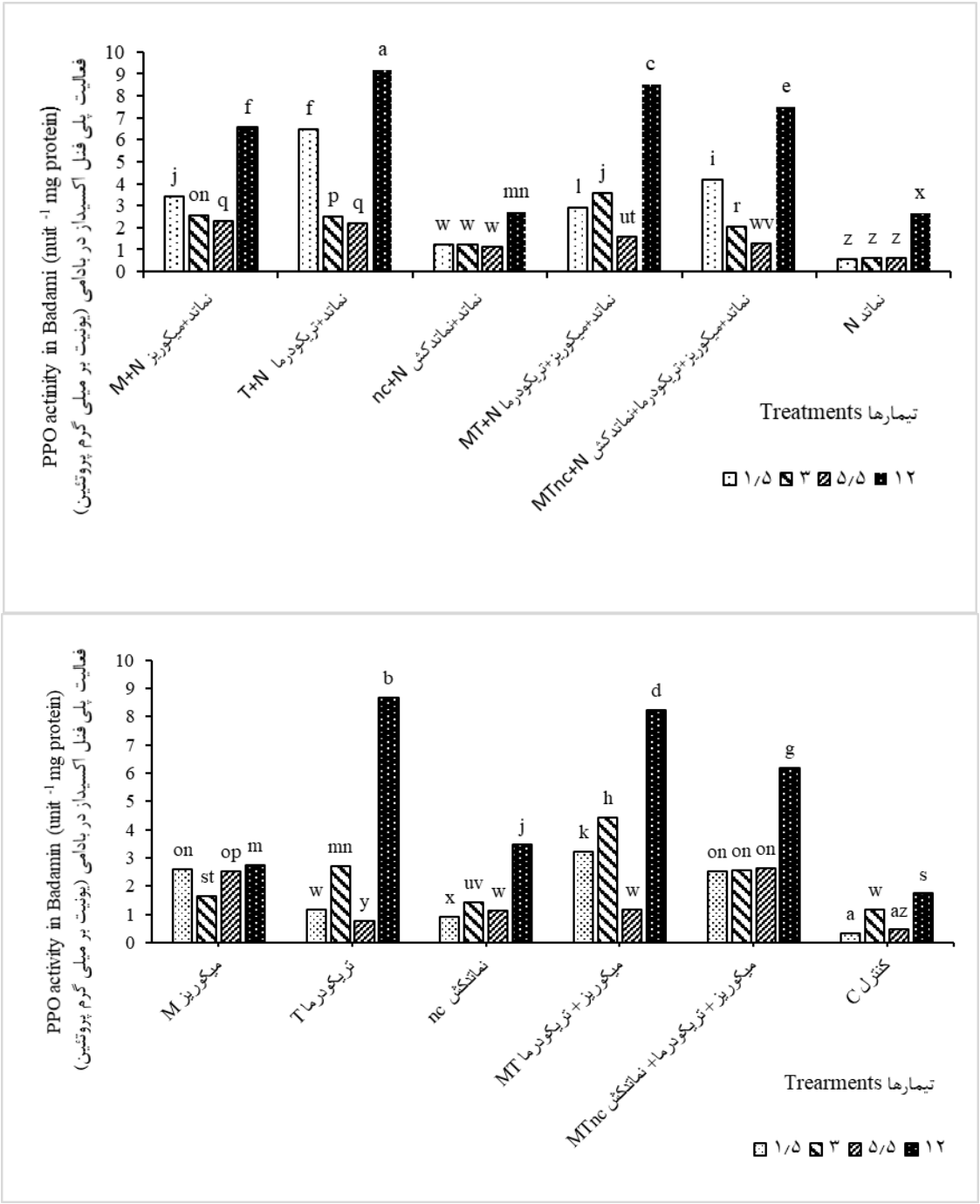
شکل ۱-تأثیر قارچ‌های vesicular-arbuscular mycorrhiza و *Trichoderma* بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور نماتد (بالا) و عدم حضور نماتد (پایین)

تیمارها با حروف یکسان با توجه به آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 1- Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza and *Trichoderma* fungi on the activity of peroxidase enzyme in the presence (up) and absence (down) of nematode of nematode

Treatments with common words are statistically no significant difference (Duncan test, α=0.01).

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های مربوط به پلی‌فنل اکسیداز نشان داد که در روز دوازدهم بین تیمارهای مورد بررسی در حضور و عدم حضور نماتد با شاهد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (شکل ۲). افزایش میزان آنزیم PPO در تیمار تریکودرما بیشتر از بقیه بود که این میزان برابر با ۹/۱۷ unit/mg protein و ۸/۶۶ به ترتیب در شرایط حضور و عدم حضور نماتد بود. آنزیم پلی‌فنل اکسیداز موجب تبدیل ترکیبات منو یا دی فنل به ترکیبات کینون می‌گردند (۲۷). تیمار میکوریزایی در شرایط حضور نماتد در روز دوازدهم افزایش ۱۴۷ درصدی را نشان داد در حالی که در شرایط عدم حضور نماتد این تیمار فعالیت قابل توجهی نداشت.

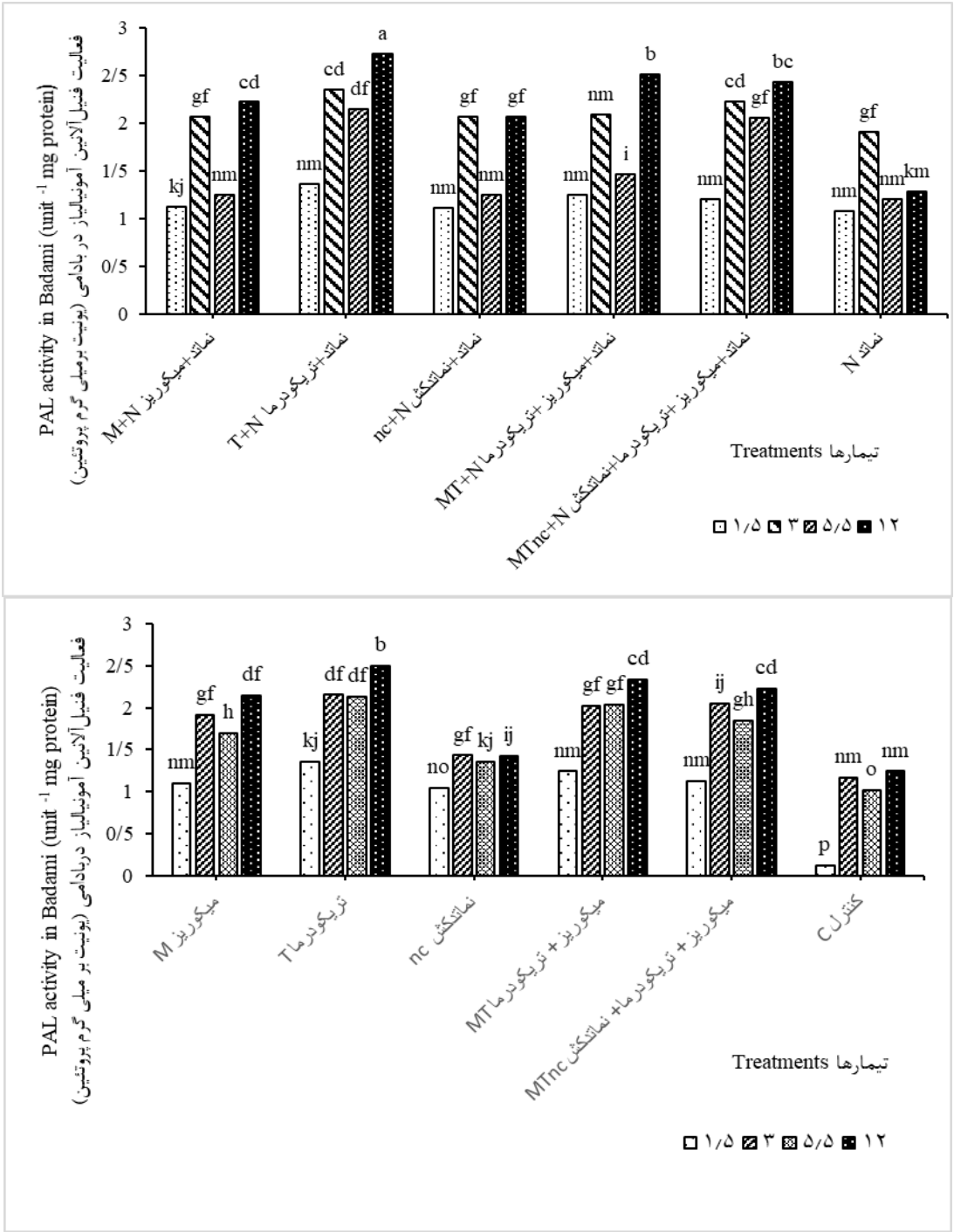


شکل ۲- تأثیر قارچ‌های vesicular-arbuscular mycorrhiza و *Trichoderma* بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در حضور نماتد (بالا) و عدم حضور نماتد (پایین)

تیمارها با حروف یکسان با توجه به آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 2- Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza and *Trichoderma* fungi on the activity of polyphenol oxidase enzyme in the presence (up) and absence (down) of nematode of nematode

Treatments with common words are statistically no significant difference (Duncan test, α=0.01).



شکل ۳- تأثیر قارچ‌های vesicular-arbuscular mycorrhiza و *Trichoderma* بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در حضور نماتد (بالا) و عدم حضور نماتد (پایین)

تیمارها با حروف یکسان با توجه به آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 3- Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza and *Trichoderma* fungi on the activity of phenylalanine ammonia lyase enzyme in the presence (up) and absence (down) of nematode

Treatments with common words are statistically no significant difference (Duncan test, α=0.01).

این مطلب با نتایج قبلی که نشان داد گیاهان گوجه‌فرنگی تیمار شده با میکوریز فعالیت PPO کمی داشتند هماهنگ می‌باشد. از طرفی کارایی عوامل بیوکنترل با توجه به گونه و رقم گیاه می‌تواند تنوع نشان دهد (۲۸). کمترین فعالیت آنزیمی PPO در تیمار نماتدکش برابر با۲/۷ unit/mg protein نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید. نتایج کلی بیانگر افزایش میزان آنزیم PAL در نهال‌های تیمار شده پسته در کلیه تیمارها می‌باشد. حداکثر میزان فعالیت این آنزیم در تیمار میکوریزایی و تریکودرمایی پنج و نیم روز بعد در شرایط حضور و عدم حضور نماتد ملاحظه شد (شکل ۳). این نتایج با مطالعه قبلی که به دنبال تیمار میکوریزای شاهد افزایش آنزیم PAL در گیاه گوجه‌فرنگی در حضور نماتد بوده‌اند مطابقت دارند (۳۸). میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی در تیمارهای مورد بررسی پس از مایه‌زنی نماتد سیر صعودی و نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. یافته‌ها با نتایج بررسی تأثیر *Meloidogyne javanica* بر روی ریشه گوجه‌فرنگی در تعامل با قارچ عامل پژمردگی آوندی مطابقت داشت، به‌طوری که بعد از مایه‌زنی نماتد شاهد افزایش سطوح آنزیم PAL بودند (۳۵). آنزیم PAL آنزیمی کلیدی در شروع بیوسنتز ترکیبات دفاعی گیاه از جمله فیتوالکسین‌ها به ویژه فنیل پروپانوئیدها و برخی از ترکیبات فنلی و لیگنینی می‌باشد. افزایش سطح ترکیبات فنلی و آنزیم‌های دفاعی در گیاهان تیمار شده با عوامل آنتاگونیست می‌تواند سبب افزایش مقاومت گیاهان و کاهش شاخص‌های بیماریزای نماتدی گردد. استفاده از فعال کننده‌های دفاعی قبل از آلودگی توسط بیمارگر منجر به راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی نظیر تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آماده باش گیاه میزبان می‌شود (۱۵). تحقیقات متعدد در مورد محرک‌های ویژه و شیمیایی نشان داده است که گیاهان توانایی تشخیص تعداد زیادی از ترکیبات مشتق شده از سطح میکروب‌ها را دارا هستند. این ترکیبات واکنش‌های دفاعی را در گیاهان میزبان (سازگار) و غیر میزبان (ناسازگار) القاء می‌کنند (۱۲ و ۱۹). به دنبال تیمار ریشه گیاهان توسط گونه‌های قارچ *Trichoderma* و میکوریز، شاهد تحریک سیستم دفاعی گیاه به دلیل افزایش سطوح آنزیم‌ها دفاعی و افزایش جذب عناصر و مواد غذایی می‌باشیم. این مطلب نشان می‌دهد که با استفاده همزمان این دو عامل مهار زیستی می‌توانیم از اثرات مثبت هر دو در بهبود بنیه گیاه و مقاومت در برابر بیماری سود ببریم. نتایج مطالعات قبلی نشان داد که کاربرد همزمان چند عامل بیوکنترل توانایی بهتری در بهبود شاخص‌های رشدی- افزایش سطوح آنزیم‌های دفاعی مانند PAL, PPO و POX در گیاه گوجه فرنگی نسبت به نماتد *M. incognita* را دارند (۶ و ۱۵). استفاده از قارچ‌های افزاینده رشد گیاهان مانند میکوریز و تریکودرما ضمن بهبود رشد گیاه، می‌تواند مصرف کود و سموم شیمیایی را کاهش دهد و جهت رشد و توسعه بهتر گیاه و کنترل بیماری‌ها مؤثر باشند (۲۸). البته بررسی‌های دیگری در آینده در خصوص شناسایی دیگر سازو کارهای کنترلی این آنتاگونیست‌ها، کاربرد ترکیب این قارچ‌ها با دیگر آنتاگونیست‌های باکتریایی و حتی کودهای دامی و همچنین مطالعات باغی ضروری می‌باشد.

منابع

1. Akbar N.S., and Nadeem S. 2014. Simulation of peristaltic flow of chyme in small intestine for couple stress fluid. Meccanica 49(2): 325-334.
2. Aliramaji F., Pourjam E., and Karegar A. 2005. Some tylenchids associated with pistachio and almond trees in Iran. In: IV International symposium on pistachios and almonds, Acta Horticulturae 726: 659-666.
3. AL-Shammari T.A., Bahkali A.H., Elgorban A.M., El-Kahky M.T., and Al-Sum B.A. 2013. The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. Journal of Pure and Applied Microbiology 7: 199-207.
4. Anita B., and Samiyappan R. 2012. Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. Journal of Biopesticides 5: 53-59.
5. Anjos É.C.T.D., Cavalcante U.M.T., Gonçalves D.M.C., Pedrosa E.M.R., Santos V.F.D., and Maia L.C. 2010. Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus (*Scutellospora heterogama*) and the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on sweet passion fruit (*Passiflora alata*). Brazilian Archives of Biology and Technology 53(4): 801-809.
6. Annapurna M., Bhagawati B., and Kurulkar U. 2018. Biochemical Mechanism of Native Fungal Bioagents in the Management of Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* on Tomato. International Journal of Current Microbiology and Applied Science 7(11): 380-395.
7. Barea J.M., Azcón R., and Azcón-Aguilar C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie van leeuwenhoek 81(1-4): 343-351.
8. Barker K.R., and Koenning S.R. 1998. Developing sustanaible system for nematode management. Annual Review of Phytopathology 36(1): 165-205.
9. Beckman T.G., and Pusey P.L. 2001. Field Testing peach rootstocks for resistance to Armillaria root rot. HortScience 36(1): 101-103.

10. D'cunha G.B., Satyanarayan V., and Nair P.M. 1996. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 42(1): 17-20.
11. Deepak S., Niranjan-Raj S., Shailasree S., Kini R.K., Boland W., Shetty H.S., and Mithöfer A. 2007. Induction of resistance against downy mildew pathogen in pearl millet by a synthetic jasmonate analogon. Physiological and Molecular Plant Pathology 71(1-3): 96-105.
12. Dong H., Li W., Zhang D., and Tang W. 2003. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against Verticillium wilt of cotton. Crop Protection 22(1): 129-134.
13. Duncan L.W., and Ferris H. 1983. Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species. Journal of Nematology 15: 227-234.
14. Edreva A., Velikova V., Tsonev T., Dagnon S., Gürel A., Aktaş L., and Gesheva E. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. General and Applied Plant Physiology 34(1-2): 67-78.
15. Esfahani L., Jamali S., Saeedizadeh A., and Pedramfar H. 2017. Inducing systemic resistance of tomato by salicylic acid and two - biocontrol agents against root- knot nematode. Iranian Journal of Plant Protection Science 48(2): 283-294. (In Persian with English abstract)
16. Farivar Mehin H. 1984. Study of the Root-knot Nematodes on Pistachio in Iran. In: Proceeding of the first International Congress of Nematology, 5-10 Aug, Guelph, Ontario, Canada. 26-27.
17. Fatemy S. 2009. Integrated management of pistachio nematodes. P. 243-252. In Ciancio A. Mukerji, K.G. (ed.) Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes. Springer the Netherlands.
18. Hagn A., Pritsch K., Schloter M., and Munch J.C. 2003. Fungal diversity in agricultural soil under different farming management systems, with special reference to biocontrol strains of *Trichoderma* spp. Biology and Fertility of Soils 38(4): 236-244.
19. He C.Y., Hsiang T., and Wolyn D.J. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defense responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Plant Pathology 51(2): 225-230.
20. Hussey R.S., and Barker K.R. 1973. A Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant disease Report57:1025-1028.
21. Jebeli ameli F. 2006. Factors affecting export of pistachio saffron and dates in the non-oil commodities basket. Journal of Agriculture and Development, 14(54): 85-102. (In Persian)
22. Jepson S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CAB international, Wallingford, UK.
23. Khatamidoost Z., Jamali S., Moradi M., and 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.
24. Liu R., Dai M., Wu X., Li M., and Liu X. 2012. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. Mycorrhiza 22(4): 289-296.
25. Manandhar S. 2011. Study on the bioprotective effect of endomycorrhizae against *M. graminicola* in rice. Journal of Biological Pest Control 5(1): 28-35.
26. Martínez-Medina A., Roldán, A., Albacete A., and Pascual J. A. 2011. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. Phytochemistry 72(2-3): 223-229.
27. Milavec M., Gruden K., Ravnikar M., and Kovač M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by Potato virus YNTN. Plant Pathology 57(5): 861-869.
28. Nagesh M., and Reddy P.P. 2004. Biochemical changes in *Glomus fasciculatum* colonized roots of *Lycopersicon esculentum* in presence of *Meloidogyne incognita*. Indian Journal of Experimental Biology 42: 721-727.
29. Nicoli M.C., Elizable B.E., Piotti A., and Lerici C.R. 1991. Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. Journal of Food Biochemistry 15:169-184.
30. Odeyemi I.S., Afolami1 S.O., and Sosanya O.S. 2010. Effect of *Glomus mosseae* (arbucular mycorrhizal fungus) on host parasite relationship of *Meloidogyne incognita* on four improved cowpea varieties. Journal of Plant Protection Research 50(3): 320-325.
31. Phillips J.M., and Hayman D.S. 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(1): 158-161.
32. Pieterse J.N. 2001. Hybridity, so what? Department of Sociology of University of Illinois at Urbana-Champaign.
33. Plewa M.J., Smith S.R., and Wanger E.D. 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutatation Research 247: 57–64.
34. Reuveni R., Agapov V., and Reuveni M. 1994. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize. Plant Pathology 43(2): 245–250.
35. Sahebani N., and Hadavi N. 2008. Study on the Systemic Effect of Root-knot Nematode (*Meloidogyne javanica*)

on Phenylalanine Ammonia Lyase Enzyme Activity in Tomato Root in the Interaction between Root-Knot Nematode and Tomato Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Isfahan University of Technology-Journal of Crop Production and Processing, 12(43), 217-225. (In Persian)

36. Sahebani, N., and Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry 40(8): 2016-2020.
37. Schüßler A., and Walker C. 2010. The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University, 19.
38. Sharma I.P., and Sharma A.K. 2017. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. Symbiosis 71(3): 175-183.
39. 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.
40. Siddiqui Z.A., and Akhtar M.S. 2009. Effects of antagonistic fungi, plant growth-promoting rhizobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi alone and in combination on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Journal of General Plant Pathology 75(2): 144-153.
41. Sohrabi F., Sheikholeslami M., Heydari R., Rezaee S., and Sharifi R. 2020. Investigating the effect of *Glomus mosseae*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on plant growth and controlling *Meloidogyne javanica* in tomato. Indian Phytopathology 1(3): 1-8.
42. Taylor A., and Sasser J. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University Graphics, 111.
43. Van Wees S.C., Van der Ent S., and Pieterse C.M. 2008. Plant Immune Responses Triggered by Beneficial Microbes. Curr. Opin. Plant Boil 11(4): 443-448.
44. Vos C., Schouteden N., Van Tuinen D., Chatagnier O., Elsen A., De Waele D., and Gianinazzi-Pearson V. 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root–knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. Soil Biology and Biochemistry 60(1): 45-54.
45. Whitehead A.G., and Hemming J.R., 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of applied Biology 55: 25-38.
46. Zhang S.h., Gan Y., and Xu B. 2014. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. BioControl 59(3): 319-331.

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 1, Spring 2021, P. 25-37

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۳۷-۲۵

Evaluation of the Level of Defense Enzymes Induced by Antagonistic Fungi against Root Knot Nematode, *Meloidogyne javanica* in Pistachio Seedlings

F. Mehdinejad[1]- A. Zeynadini Riseh[2]*- E. Sedaghati[3]- H. Alaei[4]- M. Moradi[5]

Received: 31-10-2020
Accepted: 13-03-2021

Introduction: Pistachio is one of the most important export products of the country and root knot nematode is one of the threatening factors in its production. The most prevalent species in pistachio orchards are those of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. Plants have a wide range of defense mechanisms effective against the invasion of various pathogens and pests. These mechanisms include pre-existing physical barriers, chemical barriers, and induced defense responses. Beneficial soil microorganisms such as *Trichoderma* spp. and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can protect plants from infection by direct mechanisms such as production of toxins, enzymes, and other metabolites or by inducing systemic resistance. Induce resistance to the root knot nematode occurs following an increased accumulation of different antagonistic compounds such as peroxidase and polyphenol oxidase. Increased levels of these enzymes has been observed in different plants that are responsible for the induced protection against *Meloidogyne*.

Materials and Methods: In this study potential of antagonistic fungi, vesicular-arbuscular mycorrhiza (*Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis caledonius*) and Trichoderma (*Tricoderma aureoviride*, *Tricoderma harzianum*) and mixed of both fungi against *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions was investigated. In order to investigate the effect of antagonistic fungi on the induction of defense enzymes in pistachio seedlings of Badami Riz Zarand cultivar, the study was performed as a factorial experiment based on completely randomized design with twelve treatments in three replications in the greenhouse. Pistachio seedlings were inoculated at the stage of 8-10 leaf with 60 g of mycorrhizal mixture and three months later, these plants were sampled for examination. In order to ensure the purity of the fungi and the colonization of the roots, staining of the plant roots was performed and microscopic examination was performed to observe different organs of the fungus. After confirming the mycorrhiza treatment, Trichoderma treatment was applied. For Trichoderma treatment, 10 g of mixture of isolates T1, T2, T3, T4 and T5 per kg of soil was used. Pure nematode populations were prepared from a single egg mass on Early Urbana tomatoes. Pistachio seedlings were inoculated with 5000 second-stage juveniles of nematode 21 days after Trichoderma treatment**.** Nematode indices including the number of galls, egg masses and second juveniles per gram of root, the number of eggs in each egg mass and reproductive factor after 75 days for each treatment were measured. The second experiment was performed to investigate the effect of biological treatments on nematode indices in a completely randomized design with six treatments and three replications. Defense enzymes level of Peroxidase (POX), Polyphenol oxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) determined at four times of one and a half, three, five and a half and twelve days after nematode inoculation.

Results and Discussion: Disease indices showed a significant decrease in fungi treatments compared to the nematode control. *Trichoderma* treatment showed a significant difference in all indicators compared to the other treatments. Reproductive index in *Trichoderma* treatment and its combination with mycorrhizal treatment decreased by 72 and 33.3 and nematode population decreased by 73.4% and 36.2% compared to the control, respectively. Extracellular hydrolytic enzymes play important role in the infection process of *Tichoderma* species against plant-parasitic nematodes. In mycorrhiza treatment, although there was no significant difference in gall index and egg mass with the control, but the number of second juveniles and nematode reproductive factor showed a significant decrease compared to the control. This may be due to the small size of the egg mass and the effect on the number of eggs. Previous results on mycorrhizal species of *Rizophagus irregularis* in tomato plant showed that egg masses and number of eggs in treated roots have a significant reduction. The maximum enzymatic activity for POX, and PPO was obtained in different treatments on the twelfth day. The

1, 2, 3 and 4- M.Sc. Student of Plant Pathology, Assistant Professor and Associate Professors, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, respectively.
(*- Corresponding Author Email: zeynadini@vru.ac.ir)
5- Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan
DOI: 10.22067/JPP.2021.32842.0

maximum amount for PAL activity in seedlings treated with mycorrhizal and *Tricoderma* fungi was observed after five and a half days. The level of different enzymes increases after treatment with mycorrhiza and *Trichoderma* in plants, each of which plays a role in limiting the development of nematodes.

Conclusion: Due to the high proliferation of nematodes in pistachio orchards and due to the environmental hazards of nematicides, the use of biocontrol agents is recommended. The studied fungal strains in the present study could be used as components in an integrated approach to manage *M. incognita* on pistachio plants. The use of plant growth promoting fungi such as mycorrhiza and *Trichoderma* while improving plant growth, can reduce the use of fertilizers and chemical pesticides and are effective for better plant growth and development and disease control. However, further studies on the use of combinations of these fungi with other bacterial antagonists and even animal manures as well as garden studies are necessary.

Keywords: Biological control, Mycorrhiza, Pistachio, *Trichoderma*