آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۸، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۹

بازدارندگی سودوموناس‌های فلورسنت علیه گالزایی نماتد *Meloidogyne javanica* روی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

Inhibition of gall formation of *Meloidogyne javanica* on tomato using fluorescent pseudomonads under green-house condition

سعیده خلیقی[۱]، غلام خداکرمیان[۲]*، زهرا تنها معافی[۳]، سید عباس حسینی نژاد[۳] و ابوالقاسم قاسمی[۳]

۱- دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

(تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۸؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۹)

چکیده

از ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی و درختان زیتون استان‌های گلستان، گیلان (منطقه رودبار) زنجان و قم نمونه‌های خاک جمع‌آوری شد. از این نمونه‌ها باکتری‌های جنس *Pseudomonas* روی محیط کشت King's B جدا و ویژگی‌های فنوتیپی آن‌ها بررسی گردید. همه استرین‌ها روی محیط King's B رنگ فلورسنت تولید نموده و ویژگی‌های آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در چهار و ٤١ درجه سانتی‌گراد و اکسیداز در آن‌ها مثبت بود. بیشتر استرین‌ها نیترات را احیاء و ژلاتین را ذوب کردند ولی قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون، تولید لوان روی محیط آگار غذایی حاوی ۵٪ ساکاروز و فعالیت پکتولیتیکی روی حلقه‌های سیب‌زمینی نبودند. مایع فیلتر شده از کشت ۴۸ ساعته استرین‌ها در محیط کشت

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

Archive of SID
www.SID.ir

مـایع King's B تهیـه شـد. اثـر نماتدکـشی ایـن مـایع روی لاروهـای تـازه تفـریخ شـده *Meloidogyne javanica* در شـرایط آزمایـشگاه بررسـی شـد. نتـایج نـشان داد کـه در شـرایط آزمایشگاه در مجموع بیش از ٦٠٪ از استرین‌های مورد بررسی توانستند درصد قابل توجهی از نماتدها (بیش از ۵۰٪) را کنترل کنند. اثر نماینده اسـترین‌هـای بـا بازدارنـدگی بـالا بـه همـراه نماتدکش نماکور گرانول ۱۰٪ روی تولید تخم، تعداد لارو و نماتد بالغ تولیـد شـده، گـالزایی نماتد و وزن تر ریشه واندام‌های هوایی گیاه گوجه‌فرنگی در شـرایط گلخانـه بررسـی شـد. در شرایط گلخانه تعداد کل تخم، لارو، مـاده بـالغ و تعـداد گـال تـشکیل شـده روی ریـشه‌هـای گوجه‌فرنگی تفاوت معنی‌دار نشان داد. بالاترین میـزان تخـم، لارو و مـاده بـالغ و تعـداد گـال تشکیل شده روی ریشه گیاهان شاهد بود. کمترین آنها در گیاهان تیمار شده بـا *Pseudomonas fluorescens* استرین ۹۹ بود. بین تیمارها از نظر وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی گوجـه‌فرنگـی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی با شاهد تفاوت نشان دادند. تیمار شاهد دارای بـالاترین میزان وزن تر ریشه و اندام هوایی بـود.

واژه‌های کلیدی: زیتـون، سـودوموناس‌هـای فلورسـنت، گـال ریـشه گوجـه‌فرنگـی، نمـاکور *Meloidogyne javanica* .

Abstract

Soil samples were collected from rhizosphere of tomato and olive plants in Golestan, Gilan, Zanjan and Qom provinces (Iran). Fluorescent pseudomonas bacterial strains were isolated on King's B medium and their phenotypic features were characterized. For all tested strains production of fluorescent pigments on King's B medium, arginine dihydrolase, growth at four and 41 ºC and oxidase were positive. Most of them reduced nitrate and produced gelatinase but tobacco hypersensitivity reaction (HR), levan formation and pectinolytic activity on potato slices were negative for all. Filtrate liquid was obtained from 48 h culture of the fluorescent pseudomonas on King's B broth medium. Nematicidal activity of the bacterial filtrate against fresh hatched *Meloidogyn javanica* juveniles was investigated under laboratory condition. Results indicated that above 60% of the tested strains showed nematicidal activity (>50% nematode mortality) under this condition. Efficacy of the representative of the most effective strains along with the nematicide, Nemacur 10G against nematode egg production, the juveniles, mature females and gall formation, plant fresh root and aboveground weight of

Archive of SID

www.SID.ir

tomato were studied under green-house condition. Under this condition total nematode eggs, juveniles, mature females and gall formation on tomato roots were decreased significantly as compared to other treatments.

The highest number of eggs,, juveniles,, mature females and gall formation on tomato roots were observed in control treatment, and the lowest were recorded in plants treated with *Pseudomonas fluoresces* strain 99. There was no significant differences between the treatments as far as fresh root and aboveground weight are concerned, however, they differed significantly as compared to control check treatments in which the highest fresh root and aboveground weight.

Key words: Fluorescent pseudomonad, *Meloidogyn javanica*, Nemacur, olive, tomato root gall.

مقدمه

نماتدهای ریشه گرهی، انگل داخلی و ساکن ریشه بوده و از بیمارگرهای مهم گیاهان زارعی هستند. این نماتدها بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی را آلوده کرده و در بافت ریشه مکان‌های تغذیه خاصی (Nematode Feeding Site, NFS) را ایجاد می‌کنند و تا پایان چرخه زندگی خود به تغذیه از NFS ادامه می‌دهند (Abad *et al.*, 2002). نماتدهای ریشه گرهی باعث کاهش میزان سیتوکنین و جیبرلیک اسید در بافت‌های ریشه گوجه‌فرنگی می‌شوند. اثر دیگر نماتد روی گیاه میزبان، کاهش میزان فتوسنتز است که ممکن است در اثر خسارت به ریشه و کاهش انتقال آب و بسته ماندن روزنه‌ها و کاهش میزان CO_2 ورودی به برگ باشد (Bird, 1974).

علایم خسارت نماتدهای ریشه گرهی در اندام‌های هوایی مانند علایم ایجاد شده توسط سایر بیمارگرهای ریشه است. گال‌های ایجاد شده توسط نماتدهای ریشه گرهی در واقع همان سلول‌های هیپوتروفی شده اطراف محل تغذیه نماتد می‌باشند. رشد و نمو سلول‌ها به سرعت در پاسخ به تغذیه لاروهای سن دوم شروع می‌شود. این پدیده ممکن است به‌واسطه تنظیم کننده‌های رشد مترشحه از غدد نیمه شکمی (Subventral) مری و ورود آن به بافت میزبان باشد. نماتدهای ریشه گرهی همچنین موجب القاء تشکیل سلول‌های غول‌پیکر (Giant cells) در بافت آوندی می‌شوند. گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica* و *M. hapla*

Archive of SID

www.SID.ir

M. arenaria به دلیل پراکنش زیاد و دارا بودن دامنه میزبانی گسترده، از نظر کشاورزی در درجه اول اهمیت قرار دارند. روش‌های کنترل این نماتدها شامل استفاده نماتدکش‌ها، ارقام مقاوم، گیاهان آنتاگونیست، گیاهان تله، ریشه کنی میزبان و کنترل بیولوژیک است. از بین آنتاگونیست‌های نماتدها می‌توان ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه را نام برد (Sikora, 1992). باکتری‌های کنترل کننده نماتدها شامل دو گروه عمده باکتری‌های پارازیت و رایزو باکتری‌های غیر پارازیت هستند (Siddiqui and Mahmood, 1999, 2000 and 2003).

استرین‌هایی از سودوموناس‌های فلورسنت دمساز ریشه می‌توانند روی بیماری‌های مختلف اثر بازدارندگی داشته و از این طریق رشد و باردهی محصولات کشاورزی را بالا ببرند. این باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های بازدارندگی مانند تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و کلاته‌کننده آهن می‌باشند (Kumar and Dubf, 1992; Honglin and Riggs, 2000). اگرچه اطلاعات کمی در ارتباط با مکانیسم بازدارندگی نماتدها روی سودوموناس‌های فلورسنت وجود دارد ولی بسیاری از این باکتری‌ها با تولید متابولیت‌هایی چون آورمکتین‌ها، والینومایسین‌ها تأثیر بازدارندگی دارند(Neipp and Becker, 1999). فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید، ۲و٤ دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG) اووماسین A، پیولوترین(PLT) و پیرولنیترین ترکیباتی هستند که در بازدارندگی پاتوژن‌ها و نماتدها نقش دارند. ۲و٤ دی استیل فلوروگلوسینول یکی از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی مهم تولید شده توسط استرین‌های سودوموناداهای فلورسنت می‌باشد و یک فاکتور کلیدی در فعالیت بیوکنترلی *Pseudomonas fluorescens* است (Notz *et al.*, 2001). این باکتری‌ها با تولید DAPG، باعث کاهش تحرک لاروها،افزایش مرگ و میر آن‌ها و افزایش تفریخ تخم‌های نماتدهای سیست سیب‌زمینی می‌شوند. وقتی تفریخ تخم‌ها دور از ریشه‌های میزبان رخ دهد لاروها در شرایط مرگ‌آوری قرار می‌گیرند و از گرسنگی می‌میرند (Kluepfel *et al.*, 2002). مکانیسم بازدارنده دیگر تولید آمونیم، سیانیدهیدروژن، سولفیدهیدروژن و اسیدهای چرب فرار است. این متابولیت سمی روی تخم‌گذاری و تولید مثل نماتد تاثیر گذاشته و موجب کاهش جمعیت نماتدها می‌شود (Westcott and Kluepfel, 1993; Neipp and Becker 1999; Kluepfel *et al.*, 2002). ثابت شده است که بازدارندگی باکتری *P. aeruginosa* علیه نماتدهای ریشه گرهی به دلیل وجود ترکیبات

Archive of SID

www.SID.ir

نماتـد کـش چـون پروتئـــیناز یـا گلیکوپروتیئنـاز اسـت (Ali *et al.*, 2002). همچنـین فعالیـت نماتدکشی *P. fluorescens* روی لاروهای سن دوم *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانـه به اثبات رسیده است (Siddiqui and shaukat, 2002). آنتی‌بیـوتیک diacetylphloroylucinol تولید شـده توسـط اســترین (Fll3) *P. fluorescens* باعـث افـزایش تفـریخ تخـم‌هـا و کـاهش حیات لاروهای سن دوم نماتـد سیـست سـیب‌زمینـی (*Globodera rostochiensis*)شـده اسـت (Cronin *et al.*, 1997).

کنترل شیمیایی نماتدهای خاک بسیار پرهزینه و از نظر زیـست محیطـی پرخطراسـت. بـه ویژه نماتدهای ریشه گرهی از مهمترین نماتـدهای بیمـاری‌زای گیـاهی هـستند کـه هـر سـاله زیان‌های زیادی را به بار می‌آورند. استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت آنتاگونیست نماتـدها که با ریشه گیاهان و شرایط فیزیکوشیمیایی خاک سازگار هستند روشـی کـم هزینـه و از نظـر زیست محیطی بی‌خطراست و به همین خاطر پژوهش اخیر انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی سودوموناس‌های فلورسـنت: از خـاک ریزوسـفر ریـشه‌هـای گوجه‌فرنگی و درختان زیتون استان‌های گلستان، گیلان (منطقه رودبار) زنجان و قم نمونه‌هایی به صورت ضربدری با فواصل نسبتاً مساوی گردآوری شد. پس از ثبت مشخـصات، نمونـه بـه آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی باکتری‌های سودوموناس‌های فلورسنت یک گرم خاک از هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی یک درصد پپتون سوسپانسیون شد. پس از تهیه سری رقت، از سوسپانسیون تهیه شـده روی محـیط کـشت King's B مخطـط گردیـد. نمونه‌های کشت شده به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و باکتری‌های مولد رنگ فلورسنت تا خلوص نهایی روی محیط فوق کشت شدند.

شناسایی *Meloidogyne javanica* و تکثیر آن بـه روش انتقـال تـوده تخـم: ریـشه‌هـای گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد ریشه گرهی با آب شسته شدند. پس از جدا سازی ماده هـا و تهیـه برش از شبکه کوتیکولی انتهای بدن (Perineal pattern) و بررسی‌های مرفولـوژی میکروسـکپی از وجود گونه نماتد *M. javanica* در نمونه‌ها اطمینان حاصل شد (Jepson, 1987)، سپس از توده

Archive of SID

www.SID.ir

تخم همان ماده جهت تکثیر روی گیاه گوجه فرنگی رقم روتگرز استفاده شد.

برای استخراج تخم‌های نماتد، ریشه‌های آلوده شستشو و در قطعاتی درون یک ظرف حاوی هیپوکلریت سدیم ۰/٦ درصد به مدت سه دقیقه به‌شدت تکان داده شد. تخم‌های نماتد با الک ۵۰۰ مش جدا و جمع‌آوری شد. شمارش تخم‌ها و لاروهای سن دوم با اسلاید شمارش انجام گرفت.

انتخاب استرین‌های سودوموناس فلورسنت آنتاگونیست *Meloidogyne javanica*: برای گزینش استرین‌های با بازدارندگی بالا در شرایط گلخانه، توان آنتاگونیستی استرین‌های باکتری روی لاروهای سن دوم نماتد مورد بررسی به ترتیب زیر ارزیابی شد. ابتدا لاروهای سن دوم (J_2) تازه تفریخ شده، در سوسپانسیونی حاوی ۵۰ میلی‌گرم تتراسایکلین در لیتر، ۰/۰٤٤ گرم استرپتومایسین در لیتر و ۰/۰۵۲ گرم کلرامفنیکل در لیتر ضدعفونی شدند. سپس اینوکلوم باکتری از کشت تازه در محیط King's B مایع که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر(۱۵۰ rpm) به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شده بود، تهیه شد. پس از سانتریفوژ کردن (۱۵ دقیقه در ٤۵۰۰ g) عصاره نمونه‌های باکتری فیلتر شد. تعداد ٤۰-۳۰ لارو تازه تفریخ شده و استریل به یک میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده باکتری اضافه و در دمای اتاق به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. برای تیمار کنترل از آب مقطز استریل استفاده شد. سپس لاروهای مرده شمارش گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار MSTAT هفت استرین باکتری برای آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی والگوی پروتئینی استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت مورد بررسی: برای بررسی ویژگی‌های فنوتیپی ۳۰ استرین انتخاب شده از مجموع ۹۷ استرین از روش‌های استاندارد به شرح زیر استفاده شد:

آزمون فوق حساسیت در توتون به روش Klement *et al.* (1964)، آزمون هوازی یا بی‌هوازی بودن (O/F) به روش Hough and Leifson (1953)، آزمون اکسیداز به روش Kovacs (1956)، آزمون حساسیت به KOH 3٪ به روش Suslow *et al.* (1982)، آزمون‌های تولید لوان روی محیط کشت سوکروز ۵٪ و احیای نیترات به روش Lilliott *et al.* (1984)، آزمون‌های لهاندن سیب‌زمینی، رشد در دمای چهار و ٤۱ درجه سانتی‌گراد و تولید رنگ فلورسنت روی

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت King's B به روش Schaad (1988)، هیدرولیز آژرنین بـه روش Thornley (1960) و هیدرولیز نشاسته به روش گراهام Graham (1967) انجام شد. آزمون‌های لستیناز و ذوب ژلاتین بـه روش Macfaddin (1980) انجـام شـد. بـرای بررسـی اسـتفاده اسـترین‌هـای بـاکتری از کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی از محیط پایـه Ayer *et al.* (1969) اسـتفاده شـد. غلظت نهایی این مواد به میزان ۰/۳ – ۰/۲ درصد و آگارز به میزان ٪۱/۲ اضافه شد. نتیجه ایـن آزمایش تا یک ماه پس از کشت بررسی گردید.استخراج و الکتروفـورز پـروتئین‌هـای محلـول سلولی با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید و سیستم ناپیوسته لاملی انجام شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای: برای تهیه مایه تلقیح از هفت استرین باکتری آنتاگونیست انتخـاب شده جهت تیمار خاک، باکتری‌ها روی محیط King'B کشت و در ۲۸–۲٦ درجـه سـانتی‌گـراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت، به هر پتری ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و از باکتری‌های رشد کرده سوسپانـسیون تهیـه شـد. بـه روش اسـپکتروفتومتری جـذب نـوری سوسپانسیون‌های تهیه شده در طول موج ٦۰۰ نانومتر بـه OD۰/۱ تنظـیم شـد. ریـشه نـشاهای گوجه‌فرنگی رقم Rutgers به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون استرین‌هـای انتخـاب شـده قـرار داده شدند. سپس در خاک پاستوریزه حاوی ۷۰۰۰ عدد لارو فعـال نماتد *M. javanica* بـه ازای هر نشاء گوجه‌فرنگی کاشته شدند. به خاک گلدان‌ها به میزان ۳/٥ میلـی‌لیتـر بـه ازای هـر ۳٥۰ گرم خاک سوسپانسیون استرین‌های باکتری انتخاب شده اضافه شد. نماتدکش نمـاکور گرانـول ۱۰٪ با غلظت چهار پی‌پی‌ام به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی بـه کار رفت. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌هـای به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار MSTAT آنالیز گردید. میانگین داده‌ها با اسـتفاده از آزمـون چند دامنه دانکن مقایسه شد.

نتیجه و بحث

از ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی و درختان زیتون تعداد ۹۷ اسـترین دارای ویژگـی‌هـای ظاهری جنس سودوموناس جدا شد.

اثر آنتاگونیستی استرین‌های جدا شده علیه *M. javanica* در آزمایشگاه بررسی شد. بر

Archive of SID

www.SID.ir

مبنای فعالیت آنتاگونیستی تعداد ۶۰ استرین علیه لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* تعداد ۳۰ استرین جهت شناسایی و بررسی بیشتر انتخاب شد. نتایج تجزیه واریانس و گروه‌بندی استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت بررسی شده بر مبنای فعالیت آنتاگونیستی علیه *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه به ترتیب در جداول یک و دو نوشته شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس فعالیت آنتاگونیستی استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت علیه لارو سن دوم نماتد ریشه گرهی *Meloidogyn javanica* در شرایط آزمایشگاه

Table 1- Variance analysis for antagonistic activity of fluorescent pseudomanads strains against second-stage juvenile (J2) of *Meloidogyn javanica* under laboratory condition

Source of variation	df	Sum of squars	Mean of squars	Fs
Treatment	59	9.847	0.167	**
Error	120	4.644	0.039	-
Total	179	14.491	-	-

** significant

استرین‌های سودوموناس فلورسنت مورد بررسی در شرایط آزمایشگاه موجب مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* شدند و از این نظر دارای تفاوت معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی آن‌ها وجود گروه‌های زیادی را در میان استرین‌ها مشخص کرد. در مجموع بیش از ٦٠٪ از استرین‌های مورد بررسی توانستند درصد قابل توجهی (بیش از ۵۰٪) از نماتدها را کنترل کنند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- گروه‌بندی استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت بر مبنای فعالیت آنتاگونیستی علیه لاروهای سن دومنماتد ریشه گرهی *Meloidogyn javanica* در شرایط آزمایشگاه

Table 2. Grouping of fluorescent pseudomanads based on their antagonistic activity towards second-stage juvenile (Mortality %)) of *Meloidogyn javanica* under laboratory condition.

Strain No.	Mortality (%)	Statistic group	Strain No.	Mortality (%)	Statistic group	Strain No.	Mortality (%)	Statistic group
IS.29	100	A	IS.602	63.33	FG	IS.500	41.67	JK
IS .93	100	A	IS.601	63.33	FG	IS.82	41.67	JK
IS .97	100	A	IS.88	63.33	FG	IS.83	40	K
IS. 34	96.67	AB	IS.208	63.33	FG	IS.31	39.33	K
IS. 204	93.33	B	IS.3	63.33	FG	IS.37	37.67	K
IS.210	87.67	BC	IS.69	60	FG	IS.78	35.33	KL
IS.203	83.33	C	IS.67	60	FG	IS.2	30	L
IS.108	80	CD	IS.600	60	FG	IS.7	30	L
IS.39	80	CD	IS.12	56.67	H	IS.201	30	L
IS. 308	80	CD	IS.54	56.67	H	IS.33	30	L
IS.46	76.67	D	IS.303	56.67	H	IS.24	28.67	L
IS.68	76.67	D	IS.307	53.33	H	IS.52	28.33	L
IS.13	73.33	E	IS.23	50	I	IS.205	20	M
IS.406	68.33	EF	IS.603	50	I	IS.92	20	M
IS.48	66.67	F	IS.400	49/67	I	IS.409	18.33	M
IS.103	66.67	F	IS.407	46.67	IJ	IS.204	16.67	MN
IS.207	66.67	F	IS.36	45.33	J	IS.206	13.33	N
IS.250	66.67	F	IS.63	45.33	J	IS.73	13.33	N
IS.99	66.63	FG	IS.83	45	J	IS.605	13.33	N
IS.99	66.63	FG	IS.51	45	J	control	0.00	O

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج شبیه این بررسی در پژوهش‌های سایر محققین نیز گزارش شده است. فعالیت نماتدکشی *P. fluorescens* روی لاروهای سن دوم *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به اثبات رسیده است (Siddiqui and shaukat, 2002). آنتی‌بیوتیک diacetylphloroylucinol تولید شده توسط استرین *P. fluorescens* (Fll3) باعث افزایش تفریخ تخم‌ها و کاهش حیات لاروهای سن دوم نماتد سیست سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) شده است (Cronin *et al.*, 1997). برخی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های مورد بررسی در جدول سه آمده است. نقوش پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده استرین‌های مورد بررسی نیز در شکل یک نشان داده شده است.

جدول ۳- برخی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های *Pseudomonas* آنتاگونیست *Meloidogyn javanica* جداشده از فرایشه گوجه‌فرنگی و زیتون

Table 3. Some phenotypic features of the *Pseudomonas* strains antagonistic against *Meloidogyn javanica* isolated from rhizospher of tomato and olive plants.

Test	Positive strains (%)	Test	Positive strains (%)
D- Xylose	100	Butyrate	50
Sucrose	100	Phenyl acetate	27
L – tartaric acid	100	Nicotinate	27
D - galactose	94	D- alanine	10
L - arabinose	97	Levan production	40
Thehalose	57	Lecetinase	64
Sorbitol	67	Nitare reduction	40
Adonitol	34	Jelatin liquifection	50
Geraniol	44	Growth at 4°C	100
Ethanol	54	Growth at 41°C	34
Glycol	90	Potato rot	0
Azelate	7	Tobacco HR	0
n-butylamine	30	Fluoresecnt pigment	100
Valerate	57	Non-fluoresecnt pigment	0

از نظر ویژگی‌های فنوتیپی، استرین‌های سودوموناس منتخب مورد بررسی همگی روی محیط کشت King's B رنگ فلورسنت تولید نموده و ویژگی‌های آرژنین دی‌هیدرولاز، رشد در چهار و ٤١ درجه سانتی‌گراد و اکسیداز در آن‌ها مثبت بود. اکثراً توانایی احیاء نیترات را داشتند

Archive of SID

www.SID.ir

ولی هیچ‌یک قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون، تولید لوان روی محیط حاوی ۵٪ سوکروز و فعالیت پکتولیتیکی روی حلقه‌های سیب‌زمینی نبودند. جز یک گروه همه ژلاتین را هیدرولیز نمودند. از تعداد ۳۰ استرین منتخب بر اساس خصوصیات فنوتیپی ارایه شده توسط Fahy and Persley, 1983; Stanier *et al*. (1966); Bossis *et al*. (2000) و Schaad (2001) تعداد ۲۸ استرین با داشتن ویژگی‌هایی مانند تولید رنگ فلورسنت روی محیط *Pseudomonas* agar F اکسیداز مثبت، توانایی هیدرولیز آرژنین و ژلاتین، رشد در چهار درجه سانتی‌گراد، تولید لیسیتیناز، عدم فعالیت پکتولیتیکی و ایجاد واکنش HR روی برگ توتون با ویژگی‌های ذکرشده با گونه *P. fluorescens* مطابقت داشتند. با مقایسه ویژگی‌های فنوتیپی این استرین‌ها در سطح بیوار شامل بیوارهای I (سه استرین)، بیوار II (هشت استرین)، بیووار III (چهاراسترین)، بیوار IV (۱۳ استرین)بودند. دو استرین دیگر نیز با داشتن ویژگی‌های فنوتیپی ذکر شده برای گونه *P. putida* به بیووار B این گونه تعلق داشتند.

نقوش پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده مقایسه شد. این نقوش در بیشتر استرین‌ها شبیه بود و تنها در تعداد و محل قرارگیری برخی باندها با هم تفاوت داشتند. دو استرین مربوط به گونه *P. putida* با داشتن باندهای متفاوت و متمایز از سایر استرین‌های مورد بررسی قابل تشخیص بودند (شکل ۱).

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای در جداول ٤ تا ۷ ارایه گردیده است.

جدول ٤- تجزیه واریانس اثراستریـن‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش نماکور ۱۰٪ بر تعداد لارو و نماتد بالغ تولید شده در ۵۰۰ گرم خاک و ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyn javanica*

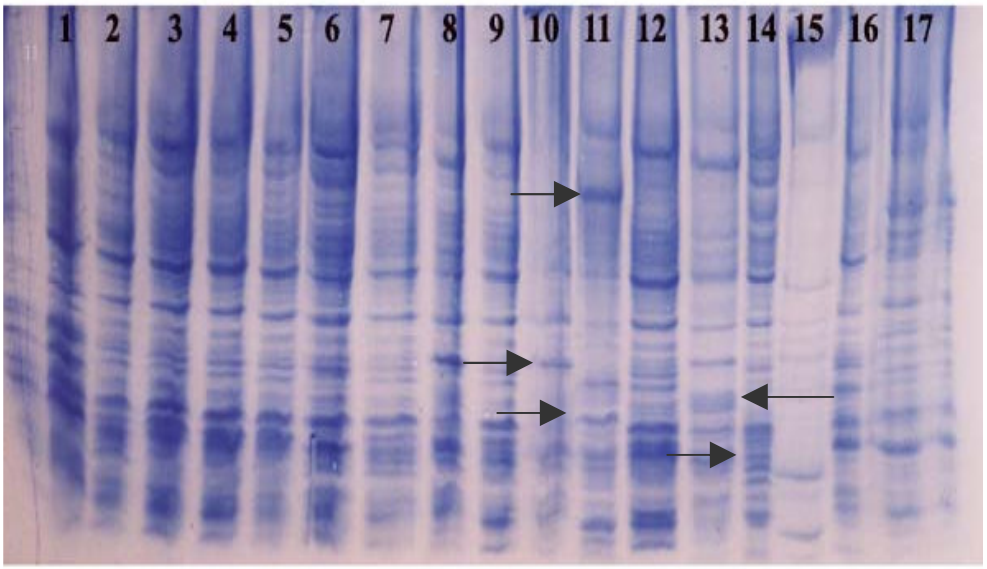
Table 4. Variance analysis for prohibiotion of juvenile and mature *Meloidogyn javanica* formation on tomato roots in 500 gram soil disinfected with fluorescent pseudomanads strains and nemacure

Source of variation	df	Sum of squars	Mean of squars	Fs
Treatment	8	8326133292.7	104766661.5	**
Error	18	2992757552.6	166264308.4	-
Total	26	11318890845.4	-	-

** Significant

Archive of SID

www.SID.ir



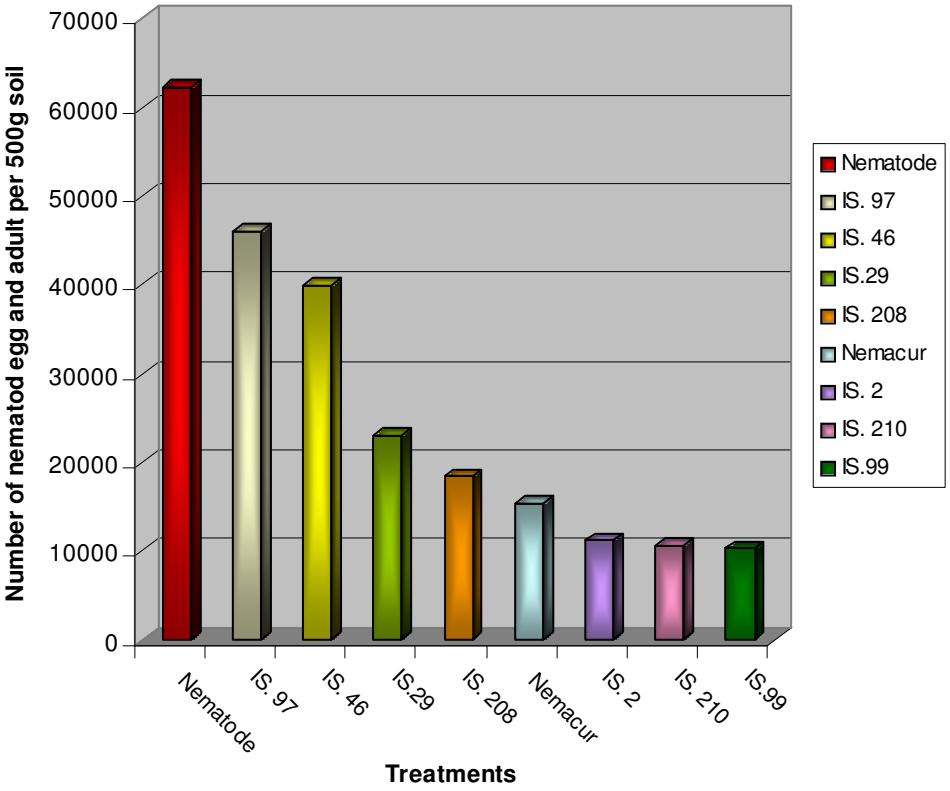
شکل ۱- نقوش پروتئین‌های محلول سلولی الکتروفورز شده استرین‌های *Pseudomonas* آنتاگونیست *Meloidogyne javanica* جدا شده از فراریشه گوجه‌فرنگی و زیتون

Fig. 1. Total protein electrophoretic pattern of the *Pseudomonas* strains antagonistic against *Meloidogyne javanica* isolated from rhizospher of tomato and olive plants

1: *P. fluorescens* (Biovar V) , 2: *P. fluorescens* (Biovar V), 3: *P. fluorescens* (Biovar V), 4: *P. fluorescens* (Biovar V), 5: *P. fluorescens* (Biovar V), 6: *P. fluorescens*(Biovar II), 7: *P. fluorescens* (Biovar V), 8: *P. fluorescens* (Biovar I), 9: *P.fluorescens* (Biovar V), 10: *P.fluorescens*(Biovar I), 11: *P.fluorescens* (strain CHAO), 12: *P.fluorescens* (Biovar III), 13: *P. putida* (Biovar B), 14: *P.fluorescens* (Biovar I), 15: *P. putida* (Biovar B), 16: *P.fluorescens* (Biovar II), 17: *P.fluorescens* (Biovar V)

Archive

www.SID.ir



شکل ۲- اثر استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش نماکور ۱۰٪ بر تعداد لارو و ماده بالغ در ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Fig. 2. Inhibition of juvenile and mature females of *Meloidogyne javanica* on tomato roots treated with fluorescent pseudomanads strains and nemacure

تعداد لارو و نماتد بالغ تولید شده روی ریشه گیاه گوجه فرنگی در تیمارهای به کار برده شده تفاوت معنی‌دار (P=% ۵) داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد لارو و نماتد بالغ تولید شده، روی ریشه گیاهان شاهد و کمترین روی ریشه گیاهان تیمار شده با استرین ۹۹ بود (شکل ۲).

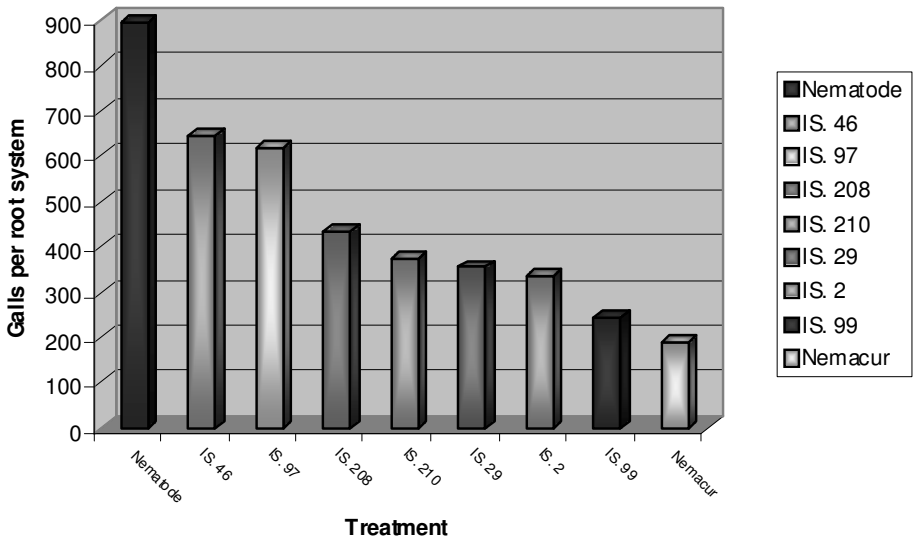
www.SID.ir

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش نماکور بر تعداد گال ایجاد شده روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Table 5. Variance analysis for prohibiotion of gall formation by *Meloidogyne javanica* on tomato roots in 500 gram soil disinfected with fluorescent pseudomanads strains and nemacure.

Source of variation	df	Sum of squars	Mean of squars	Fs
Treatment	8	1212584	151573	**
Error	18	463906.6	25772.5	-
Total	26	1676490.6	-	-

** Significant



شکل ۳- اثر استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش نماکور بر تعداد گال ایجاد شده روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به *M. javanica*

Fig. 3. Inhibiotion of gall formation of *Meloidogyne javanica* on tomato roots treated with fluorescent pseudomanads strains and nemacure

تعداد گال تشکیل شده روی ریشه گیاه گوجه فرنگی در تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنی‌دار (P=% ۵) بود. این تفاوت در نمودار شماره پنج نشان داده شده است.

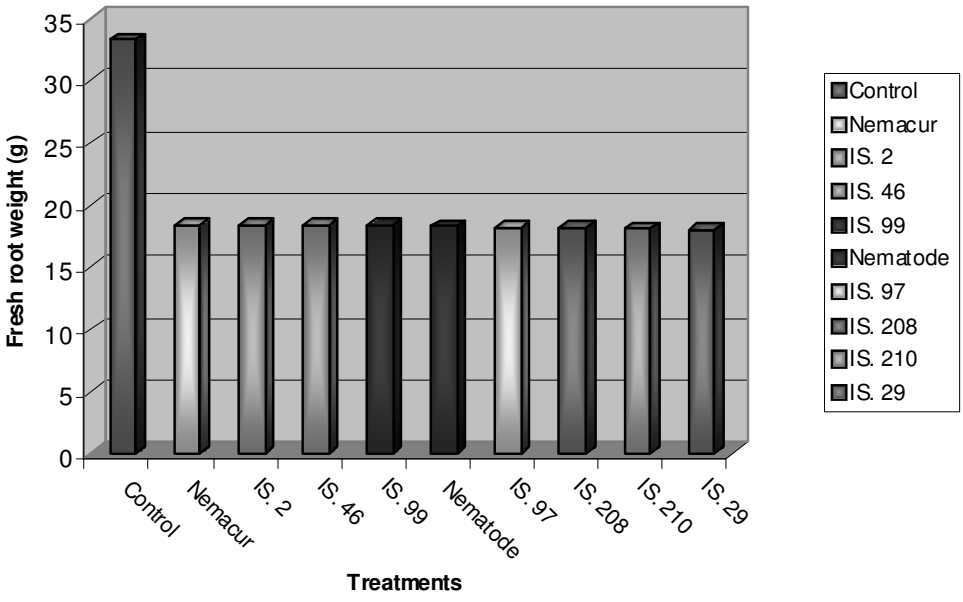
www.SID.ir

جدول ٦- تجزیه واریانس اثر استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش نماکور بر وزن تر ریشه گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Table 6. Variance analysis for effect of fluorescent pseudomanads strains and nemacure on tomato fresh root weight infested with *Meloidogyne javanica*.

Source of variation	df	Sum of squars	Mean of squars	Fs
Treatment	9	613.53	68.17	ns
Error	20	621.54	31.07	-
Total	29	1235.08	-	-

** Non-significant

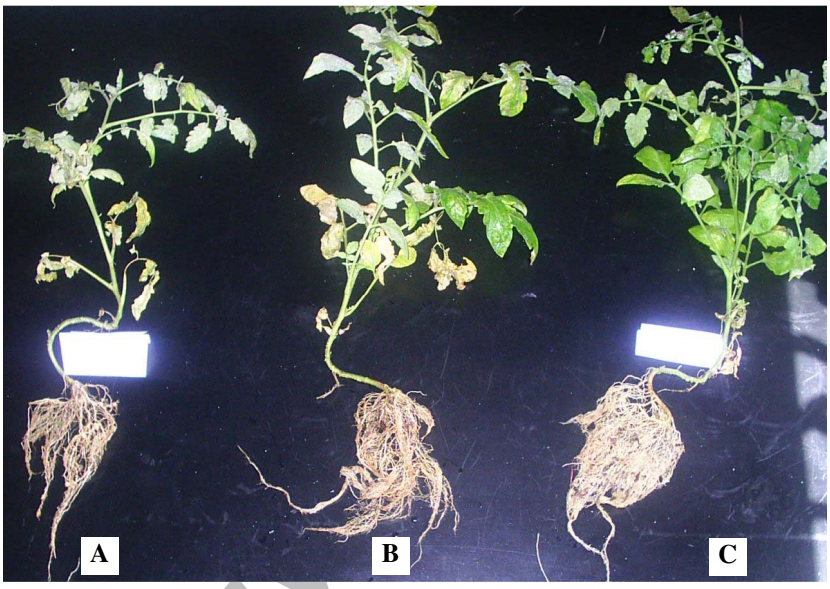


شکل ٤- مقایسه استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و سم نماکور بر وزن تر ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Fig. 4. Comparison of the effect of fluorescent pseudomanads strains and nemacure on tomato fresh root weight infested with *Meloidogyne javanica*.

www.SID.ir

از نظر وزن تر ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای باکتری و نماتد وجود نداشت ولی بین تیمار شاهد و سایر تیمارها تفاوت وجود داشت. تیمار شاهد دارای بالاترین میزان وزن تر ریشه بود.



شکل ۵- اثر تیمارهای مختلف روی ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

A: کنترل، B: نماتدکش نماکور و C: استرین شماره ۹۹ *Pseudomonas fluorescent*

Fig. 5. Effect of different treatments on tomato fresh root weight infested with *Meloidogyne javanica* (from left to right A: control, B: nemacure and C: *Pseudomonas fluorescent* strain 99)

مقایسه ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های بررسی شده نشان داد که بیشتر این استرین‌ها وابسته به *P. fluorescens* هستند که شامل بیوارهای I، II، III و IV با بیشترین فراوانی بودند. تعداد معدودی نیز به گونه *P. putida* بیووار B تعلق داشتند. احتمالاً دلیل فراوانی بیشتر گونه *P. fluorescens* و سازگاری آن با منطقه فراریشه گیاهان بررسی شده است چرا که گزارش‌های زیادی در مورد موفقیت عوامل بیوکنترل سازگار با ریزوسفر گیاهان وجود دارد (Kluepfel *et al.*, 2002).

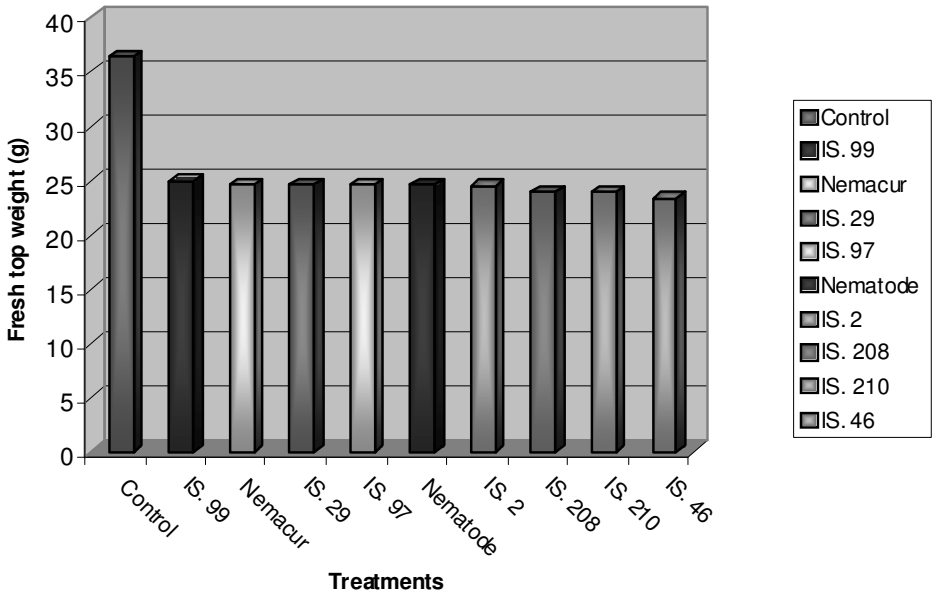
Archive
www.SID.ir

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش نماکور بر وزن تر اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Table 7. Variance analysis for effect of fluorescent pseudomanads strains and nemacure on tomato fresh above- ground weight infested with *Meloidogyn javanica*.

Source of variation	df	Sum of squars	Mean of squars	Fs
Treatment	9	398.78	44.30	**
Error	20	1966/10	98.30	-
Total	29	2364.8	-	**-**

** Significant



شکل ٦- اثر استرین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و سم نماکور بر وزن تر اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی آلوده به *Meloidogyne javanica*

Fig. 6. Effect of fluorescent pseudomanads strains and nemacure on tomato fresh above-ground weight infested with *Meloidogyne javanica*

www.SID.ir

بررسی‌های زیادی در مورد کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی با استفاده از باکتری‌های مختلف به ویژه باکتری‌های جنس سودوموناس وجود دارد (Honglin, and Riggs, 2000; Ali *et al*., 2002; Jacq and Fortune, 1979; Siddiqui and Mahmood, 1999; Siddiqui *et al*., 2000, 2003 and 2006). به نظر می‌رسد باکتری‌های آنتاگونیست نماتدهای پارازیت گیاهی با مکانیسم‌های گوناگون از ادامه یا تکمیل سیکل زندگی آن‌ها در مراحل مختلف زندگی جلوگیری می‌کنند (Siddiqui and Mahmood, 1999). ترکیباتی مانند پروتئیناز یا گلیکوپروتئیناز توانایی کشتن نماتدها را دارند (Ali *et al*., 2002) یا آنتی‌بیوتیک diacetylphloroylucinol استرین *P. fluorescens* (Fll3) باعث افزایش تفریخ تخم‌ها و کاهش لاروهای سن دوم نماتد سیست سیب‌زمینی (*Globodera rostaochiensis*) شده است (Cronin *et al*., 1997). در این میان اثر نماتد کشی سیانید هیدروژن مترشحه توسط استرین *P. fluorescens* CHAO به اثبات رسیده است (Siddiqui *et al*., 2006). باکتری *P. aeruginosa* علیه آلودگی‌های قارچی و نماتدهای ریشه گرهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه موثر بوده است. آنچه مهم است این است که هریک ازاین فاکتورها در جلوگیری از فعالیت نماتدها دارای سهم ویژه‌ای بوده و مجموعه آن‌ها سبب کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی می‌شود.در بررسی ما اثر بازدارندگی استرین‌های به کار رفته در شرایط آزمایشگاه و گلخانه دارای تفاوت معنی‌دار بود ولی استرین‌هایی که در شرایط آزمایشگاه بالاترین تاثیر را داشتند در شرایط گلخانه الزاماً دارای بالاترین اثر نبودند. وجود این پدیده را می‌توان به شرایط پیچیده خاک و نیز وجود توام مراحل محتلف زندگی نماتد(تخم، لارو و نماتد بالغ) نسبت داد. چرا که هر باکتری با ترشح مواد بازدارنده علیه مرحله خاصی از زندگی نماتد مؤثر است ضمن اینکه در شرایط طبیعی احتمال تجزیه مواد بازدارنده توسط سایر میکروب‌های خاک وجود دارد. استرین شماره ۹۹ در شرایط آزمایشگاه جزء استرین‌های با بازدارندگی متوسط بود (جدول ۲)در حالی که در شرایط گلخانه بالاترین تاثیر را داشت. این استرین در آزمایش‌های گلخانه‌ای بیشترین تاثیر را روی لاروها و نماتدهای بالغ نشان داد و در جلوگیری از تعداد گال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

تشکیل شده روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی نیز مؤثرترین استرین بود (شکل ۱). یکی از دلایل چنین تفاوت توانایی نشانه سازگاری بیشتر این استرین با منطقه ریزوسفر گوجه‌فرنگی و استقرار بهتر آن است. این پدیده در مورد بسیاری از عوامل آنتاگونیست پاتوژن‌های ریشه گزارش شده است. معمولاً سازگاری با منطقه فراریشه یک فاکتور کلیدی برای موفقیت عوامل آنتاگونیست پاتوژن‌های ریشه است (Honglin and Riggs, 2000; Ali *et al*., 2002; Jacq and Fortune 1979; Siddiqui *et al.*, 2000, 2003).

از نظر تأثیر روی وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه گوجه‌فرنگی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری دیده نشد ولی با تیمار کنترل تفاوت معنی‌دار داشتند (شکل‌های ۵ و ۶). به نظر می‌رسد که گیاه گوجه فرنگی با داشتن سیستم ترمیم کننده قوی و ویژگی قابلیت نشاکاری آن از طریق ایجاد اندام‌های جدید ریشه در برابر نماتد مقاومت می‌کند و در این راه مقدار قابل توجهی انرژی از دست می‌دهد. این اتلاف انرژی در تفاوت تیمارهای آلوده به نماتد در مقایسه با تیمار بدون آلودگی کاملاً مشهود است (شکل‌های ۵ و ۶). یکی دیگر از مکانیسم‌های مقاومت گیاهان در برابر نماتدهای پارازیت ریشه، مقاومت سیستمیک القاء شده به وسیله باکتری‌های ریزوسفر است. این نوع از مقاومت در اثر استرین *P. fluorescens* CHAO گزارش شده است (Siddiqui *et al.*, 2006). در گزارش دیگری مقاومت سیستمیک ایجاد شده در ریشه‌های گوجه‌فرنگی در اثر استرین *P. fluorescens* CHAO به متابولیت ثانویه 2,4-diacetylphloroglucinol نسبت داده شده است (Siddiqui and Shaukat 2003)*.

* **نشانی نگارندگان:** مهندس سعیده خلیقی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، پیکان‌شهر، تهران، ایران؛ دکتر غلام خداکرمیان، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، انتهای چرم‌سازی، همدان، ایران؛ دکتر زهرا تنهامعافی، دکتر سید عباس حسینی نژاد و مهندس ابوالقاسم قاسمی مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، صندوق پستی ۱٤٥٤، تهران ۱۹۳۹۵، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

ABAD, P., ROSSO, M. FAVERY, B. 2002. Pathogenicity factors of *Meloidogine* and host plant esponse. Nematology, 4(5): 611-614.

ALI, N. I., I. A. SIDDIQUI, S. S. SHAUKAT, M. J. ZAKI, 2002. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. Soil boil. Biochem., 34: 1051-1058.

BIRD, A. F. 1974. Plant response to root-knot nematode. Ann. Rev. Phytopatho. 15: 69-874.

BOSSIS, E., P. LEMANCEAU, X. LATOUR and L. GARDAN, (2000). The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida: current status and need for revision. Agronomie, 20: 50-63.

CRONIN, D., Y. MOENNE-LOCCOZ, C. DUNNE and F. O'GARA, 1997. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chtinas-producing bacteria. Euro. J. plant Pathol., 103: 433-440.

DULEP KUMAR B. S. and H. C. DUBE, 1992. Seed bacterization with a Fluorescent Pseudomonads for enhance plant growth, yield and disease coutrol. Soil Biol. Biochem., 24: 539- 542.

FAHY, P. C. and G. J. PERSLEY, 1983. Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide. Academic Press, Australia, 393 pp.

GAUTAM, A., Z. A. SIDDIQUI and I. MAHMOOD, 1995. Integrated management of *incognita* on tomato. Nematol.. Mediterra., 23: 215-17

GRAHAM, D. C. and W. HODGKISS, 1967. Identification of gram negative,yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. J. Appl. Bacteriol., 30: 175 - 189.

HONGLIN, T and R. D. RIGGS, 2000. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. J. Nematol., 32 (1): 377- 388.

JACQ. V. A., R. FORTUNE, 1979. Biological control of rice nematodes using sulphate reducing bacteria. Rev. Nematol., 2: 41-50.

JEPSON S. B. 1987. Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne*) Species. Wallingford, UK: CAB International. 265pp.

KLEMENT, Z., G. L. FARKAS and H. LOVREKOVICH, 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474 - 477.

Archive of SID

www.SID.ir

KLUEPFEL D. A., A. P. NYCZEPIR, J. E. LAWRENCE, W. P. Wechter and B. Everenez 2002. Biological control of the phytoparasitic Nematode *Mesocriconema xenoplax* on peach trees. J. Nematol., 34(2): 120-123.

KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178: 703.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature. (London) 227: 680-685.

LELLIOTT, R. A., BILLING, E. and A. C. HAYWARD, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. Appl. Bacteriol., 29: 470-489.

NEIPP, P. W. and J. O. BECKER, 1999. Evaluation of biocontrol activity of rhizbacteria from beta vulgan's against *Heterodera Schachtii*. J. Nematol., 31 (1): 54- 61.

NOTZ, R., M. MAURHOFER, U. SCHNIDER-KEEL, B. DUFFY, D. HAAS and G. DEFAGO, 2001. Biotic factors affecting expression of the 2,4- diacetyle phloroglucinol genephla in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO in the rhizosphere. Phytopathology, 91: 873- 881.

RODRIGUEZ-KABANA, R. M. and G. MORGAN JONES, 1987. Biological control of nematodes. Soil amendments and microbial antagonists. Plant and Soil, 100: 237- 247.

SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third ed. APS Press, Minnesota, 398 pp.

SCHROTH, M. N. and J. G. HANCOCK, 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. Science, 216: 1276- 1381.

SIDDIQUI, Z. A. and I. MAHMOOD, 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review: Biores. Technol., 69: 167- 179.

SIDDIQUI, I. A. and S. EHTESHAMUL-HAQUE, 2000. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot- root knot disease complex in tomato. Nematol. Medit., 28: 189-192.

SIDDIQUI, I. A. and S. S. SHAUKAT, 2003. Impact of biocontrol *Pseudomanas fluorescens* CHAO and its genetically modified (GM) derivatives on penetration of *javanica* in mungbean roots. Nematol. Medit., 31: 43-45.

SIDDIQUI I. A., S. S. SHAUKAT and M. HAMID, 2003. Suppression of *Meloidogyne incognita* by *Psendomonas fluorescence* strain CHAO its genetically modified derivatives: I. The influence of oxygen. Nematol. Medit., 31: 105- 109

Archive of SID

www.SID.ir

SIDDIQUI, I. A., S. S. SHAUKAT, I. H. SHEIKH and A. KHAN, 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *javanica* in tomato. World J. Microbiol. Biotech., 22: 641-650

SIKORA R. A. and SABINE HOFFMAN-HERGARTEN, 1992. Importance of plant Health-promoting rhizobacteria for the control of soil- borne fungal diseases and plant parasitic nematodes. Arab. J. Plant Protec., 10: 48-53.

STANIER, R. Y., N. J. PALLERONI and M. DOUDOROFF, 1966. The aerobic pseudemonads, ataxonomy study. J. Gen. Microbiol., 43: 159- 271.

STIRLING, G. R. and M. F. WACHTEL, 1990. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root- knot nematodes. Nematol., 26: 208- 312.

SUSLOW, T. U., M. N. SCHROTH and M. ISAKA, 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917 - 918.

THORNLEY, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol., 23: 37 52.

WESTCOTT, S. W. and D. A. KLUEPFEL, 1993. Inhibition of *Criconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. Phytopathology, 83: 1245-1249.

Address of the authors: Eng. S. KHALIGHI, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Dr. G. KHODAKARAMIAN, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran; Drs. Z. TANHA-MAAFI, Dr. S. A. HOSSAINI and Eng. A. GHASEMI, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran 19395, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir