Archive of SID

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۱ / شماره ۳ / سال ۱۳۹٤: ۳۳۹-۳۵۵

اثر تلفیقی قارچ *Metarhizium anisopliae* و باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 بر نماتود ریشه‌گرهی، *Meloidogyne incognita* در گوجه‌فرنگی*

لیلا جهانبازیان[۱]، محمد عبدالهی[۲]** و رسول رضایی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۲)

چکیده

نماتود ریشه‌گرهی از مهم‌ترین نماتودهای انگل گیاهی با دامنه وسیع میزبانی است. با توجه به خطرات سموم، استفاده از روش‌های غیرشیمیایی، از جمله مهار زیستی در مبارزه با آفات و بیماری‌های گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، اثر دو عامل کنترل زیستی *Metarhizium anisopliae* و *Pseudomonas fluorescens* CHA0 بر نماتود *Meloidogyne incognita* به طور جداگانه و به طور توام، در چند آزمایش مطالعه گردید. در آزمون غیرفرار تعیین اثر بازدارندگی باکتری بر قارچ، مشخص شد که باکتری بر قارچ اثر بازدارنده نداشت. در بررسی‌های آزمایشگاهی اثر سوسپانسیون و عصاره کشت این عوامل، بیشترین اثر کشندگی بر لارو سن دوم در تیمار مخلوط عصاره کشت هر دو عامل با قریب ۹۵٪ و در درجه دوم، در تیمار عصاره کشت باکتری با حدود ۸۰٪ مرگ و میر، مشاهده گردید. بیشترین کاهش تفریخ تخم (۹۸-۹۳ درصد) نیز در تمامی تیمارهایی که عصاره کشت یک یا هر دو عامل موجود بودند، مشاهده شد. در مقایسه اثر روش‌های کاربرد این عوامل، در تیمارهایی که خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ صورت گرفت، شاخص‌های رشدی گیاه به میزان قابل توجهی بهبود یافتند و شاخص‌های نماتود نیز به مقدار قابل توجه کاهش داشتند، به طوری که در آزمایش اثر تلفیقی عوامل کنترل زیستی در شرایط گلخانه، در تیمار افزودن فرم تجاری قارچ به خاک و خیساندن خاک با سوسپانسیون اسپور، شاخص‌های رشدی گیاه در بهترین وضعیت قرار داشتند و همین تیمار نیز به میزان قابل توجهی موجب کاهش شاخص‌های نماتود شد، به طوری که تعداد گال در گیاه تا ۳۰٪ و فاکتور تولیدمثل تا حدود ۷۵٪ کاهش یافت. این مقاله اولین گزارش از اثر نماتودکشی قارچ *M. anisopliae* بر نماتود ریشه گرهی *M. incognita* می‌باشد.

کلیدواژه: باکتری محرک رشد گیاه، عصاره کشت ، قارچ محرک رشد گیاه، مقاومت القائی سیستمیک، مهار زیستی

---

* به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، تحت راهنمایی نگارنده دوم و مشاوره نگارنده سوم

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: abdollahi@yu.ac.ir

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه یاسوج.

۲. دانشیار نماتدشناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه یاسوج.

۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی دانشگاه یاسوج.

www.SID.ir

Archive of SID

Combined effect of *Metarhizium anisopliae* and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato

L. Jahanbazian[1], M. Abdollahi[2*] and R. Rezaie[3]

(Received: 3.6.2014; Accepted: 13.9.2015)

Abstract

Root knot nematodes are one of the most important plant parasitic nematodes with worldwide distribution and wide host range. Regarding to the hazards of synthetic chemicals, this is necessary to use other measures, such as biological control. In some studies, the separate, as well as the combined effects of two biocontrol agents, *Metarhizium anisopliae* and *Pseudomonas fluorescens* CHA0, on *Meloidogyne incognita* were studied. In a laboratory test, it has been showed that there is no non-volatile inhibitory effect of *P. fluorescens* CHA0 on *M. anisopliae*. In case of *In vitro* assay of culture filtrate and suspension of both biocontrol agents, the mixture of culture filtrates and culture filtrate of the bacterium caused about 95% and 80% larval mortality, respectively. Maximum inhibitory in egg hatch (93-98%) observed in those treatments in which culture filtrate of one or two agents were included. In the experiment that was designed to compare the application methods, the growth factors of tomato plants considerably increased and the nematode-related factors considerably decreased, in those *M. anisopliae* spore suspension were applied as soil drench. Soil drench of the trade formulation of *M. anisopliae* to the soil and foliar spray of *P. fluorescens* CHA0, improved the plant-related factors and decreased up to 30% of gall formation and up to 75% of reproduction factor. This is the first report of nematicidal effect of *M. anisopliae* on *M. incognita*.

Keywords: Biological control, Culture filtrate, Nematode, Plant growth promoting fungi, Plant growth promoting rhizobacteria, Systemic acquired resistance

* Corresponding author's E-mail: abdollahi@yu.ac.ir

1. Msc student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
2. Associate Professor of Nematology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.
3. Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نماتودهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) از عوامل مهم زیان‌آور در کشت گوجه‌فرنگی هستند. میانگین خسارت این نماتودها ۱۵ درصد اعلام شده است که گاه به ۸۰ درصد نیز می‌رسد (Sidiqui & Mahmood 1999). بیش از ۹۰ گونه در این جنس شناسایی شده است که چهار گونه *M. javanica*، *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. hapla* دارای اهمیت و پراکندگی بیشتری نسبت به بقیه هستند (Sasser 1989). استفاده از روش‌های متداول مبارزه با این نماتودها در مواردی بسیار پرهزینه بوده و در مواردی دیگر کارآیی کافی ندارند. کاربرد سموم نماتودکش نیز به دلیل مضر بودن برای سلامتی انسان و ایجاد آلودگی محیط زیست محدود شده است. از این رو محققان به دنبال استفاده از راه‌های جایگزین از جمله مهار زیستی می‌باشند (Nitao *et al.* 1999). نماتودهای خاک‌زی به وسیله برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها مورد حمله قرار می‌گیرند، لذا از این میکروارگانیسم‌ها می‌توان برای مبارزه با نماتودهای انگل گیاهی استفاده کرد (Tian *et al.* 2007). از مزایای مهار زیستی می‌توان به امکان بهره‌گیری از منابع موجود، کاهش احتمال ایجاد مقاومت، کاهش آلودگی محیط زیست و حرکت به سوی کشاورزی پایدار اشاره نمود (Mokhtari *et al.* 2009). باکتری‌ها از نظر تعداد بیشترین فراوانی را در بین موجودات زنده خاک دارند. تعدادی از آن‌ها، از جمله گونه‌هایی از جنس‌های *Pasteuria*، *Pseudomonas* و *Bacillus* دارای توانایی زیادی برای کنترل بیولوژیک نماتودها هستند. گروه‌هایی از باکتری‌های خاک‌زی با سازوکارهای مختلف از جمله پارازیته کردن، تولید زهرابه، آنتی‌بیوتیک و انواع آنزیم، ایجاد مقاومت القائی سیستمیک در گیاه و افزایش سلامتی گیاه، بر نماتودها اثر می‌گذارند (Tian *et al.* 2007). ترشحات ریشه در تفریخ تخم نماتود، جلب آنها به سمت ریشه، تشخیص میزبان و نفوذ به ریشه مؤثر است. رایزوباکترها یکی از گروه‌های مهم باکتری‌های کنترل‌کننده نماتودها هستند که در فرایشه گیاهان زندگی می‌کنند (Ahmadzadeh 2012). حضور رایزوباکترها، از جمله سودوموناس‌های فلورسنت که همه جا حضور داشته و جزء ساکنان معمول ریزوسفر هستند، در مناطق خاص ریشه قادر به تغییر الگوهای ترشحی ریشه هستند و بنابراین روی مراحلی از زندگی نماتود که وابسته به این ترشحات است، نیز تأثیر می‌گذارد. نماتودهای انگل داخلی ساکن از جمله گونه‌های متعلق به جنس *Meloidogyne* و به ویژه نماتودهای سیستی که در مراحل رشدی خود شدیداً به ترشحات ریشه وابسته هستند، دارای حساسیت بالا به این باکتری‌ها می‌باشند (Sikora & Hoffmann-Hergarten 1993). سودوموناس‌های فلورسنت دارای رشد سریع و قدرت سازگاری بالا بوده و می‌توانند در شرایط مختلف فرایشه و فیلوسفر از تعداد زیادی از ترکیبات آلی استفاده کنند و پتانسیل بالایی در کنترل بیماری‌های گیاهی خاکزاد، برگی، پس از برداشت و غیره دارند (Ahmadzadeh 2012).

قارچ موسکاردین سبز، *Metarhizium anisopliae* یک قارچ خاک‌زی با انتشار جهانی است. این قارچ اولین بار توسط متشنیکوف (Metschnikoff 1897) تحت نام *Entomophthora anisopliae* توصیف شد و سوروکین (Sorokin 1883) آن را به *M. anisopliae* تغییر نام داد. این قارچ از جمله مهم‌ترین بیمارگرهای حشرات است که به واسطه خصوصیات منحصر به فرد متعددی که دارد، به طور گسترده در سطح تجاری تولید شده است (Richards & Rogers 1990, Medonica 1992). این قارچ بر روی

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت‌های مصنوعی به صورت توده‌ای رشد می‌کند و به راحتی می‌توان کنیدی‌های آن را به مدت طولانی نگهداری نمود. زادمایه‌های این بیمارگر تا زمانی که در مجاورت میزبان قرار نگیرند، جوانه نمی‌زنند (Farashiani *et al.* 2011). در مورد اثر *M. anisopliae* بر نماتودها تنها چند گزارش محدود وجود دارد. *تریبهوانشوار و همکاران* (Tribhuvaneshwar *et al.* 2008) اثر این قارچ بر نماتود *Rotylenchulus reniformis* را در گوجه‌فرنگی بررسی کردند. بر اساس گزارش ایشان، این قارچ جمعیت نهایی این نماتود و همچنین نماتودهای آزادزی را کاهش داد و رشد گیاه را بهبود بخشید. در بررسی انجام شده، این قارچ از نمونه‌های خاک شهرستان بویراحمد، از نماتودهایی که به طور طبیعی آلوده شده بودند، جدا نموده و قدرت بیماری‌زایی آن بر *Heterodera avenae* را بررسی و توانایی آن در پارازیته کردن لارو این نماتود ۴۷/۱ درصد برآورد گردید (Ghayedi & Abdollahi 2013). بر اساس این یافته‌ها، این قارچ با تولید کنیدی‌های چسبنده و جوانه‌زنی این کنیدی‌ها، نماتود را پارازیته می‌کند. نفوذ مستقیم از طریق کوتیکول و تولید هیف عفونی در درون بدن نماتود، موجب مرگ آن می‌شود. کاربرد تلفیقی چند عامل آنتاگونیست موجب استفاده هم‌زمان از چند سازوکار متفاوت علیه بیمارگر هدف شده و می‌تواند فعالیت بیوکنترلی را در طیف گسترده‌ای انجام داده و یک مشابه‌سازی از شرایط طبیعی فراهم کند (Janisiewicz 1996). این عوامل ممکن است اثر بیوکنترلی یکدیگر را کاهش و یا افزایش دهند که اطلاع از این موضوع برای پیش‌بینی کارآیی آن‌ها در تلفیق با یکدیگر لازم است (Siddiqui & Shaukat 2004). با توجه به این که اثر باکتری *P. fluorescens* به عنوان عامل کنترل زیستی بر نماتود ریشه‌گرهی مورد توجه بسیاری از محققان مختلف بوده است (Almaghrabi *et al.* 2013, Bagheri *et al.* 2013, Mokhtari *et al.* 2009, Siddiqui *et al.* 2005, Siddiqui *et al.* 2006, Sankari *et al.* 2012)، در این پژوهش اثر هر یک از این دو عامل کنترل زیستی به صورت مجزا و همچنین تلفیقی از آن‌ها بر نماتود ریشه‌گرهی بررسی گردیده است.

مواد و روش‌های بررسی

تهیه جمعیت نماتود

نماتود از ریشه‌های آلوده گوجه‌فرنگی در گلخانه‌های سی‌سخت جمع‌آوری و با استفاده از تک کیسه تخم نماتود ماده، جمعیت خالص تهیه و سپس با چند دوره متوالی انتقال نشاء رقم حساس Red cloud به خاک آلوده، به میزان کافی تکثیر شد. ریشه‌ی آلوده با جریان ملایم آب شستشو و سپس به قطعات ۲ سانتی‌متری تقسیم و در مخلوط‌کن حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم ۵٪ ریخته شد و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط گردید. سوسپانسیون به دست آمده دو بار با آب مقطر بر روی الک ۴۰۰ مش شستشو داده شد. جهت تعیین غلظت و شمارش تعداد تخم و لارو، با هم زدن و یکنواخت کردن سوسپانسیون نماتود، در سه مرتبه، هر بار به مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون در ظرف شمارش ریخته و سپس با استفاده از استریومیکروسکوپ تعداد لارو و تخم نماتود شمارش گردید (Hussey & Barker 1973). با تهیه اسلاید از انتهای بدن نماتود بالغ ماده و مشاهده نقوش ناحیه پیرامون مخرج و با استناد به الگوی *ساسر و کارتر* (Sasser & Carter 1982)، گونه موجود شناسایی گردید.

برای تهیه لارو سن دوم نماتود، یک کاغذ صافی بر روی توری فلزی قرار گرفته در درون تشتک پتری گذاشته

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس سوسپانسیون تخم نماتود روی کاغذ صافی قرار داده شد و در تشتک پتری آب مقطر ریخته شد و به مدت چهار تا پنج روز در انکوباتور با دمای حدود ۲۷°C نگهداری شدند. به این ترتیب تخم‌ها روی کاغذ صافی مرطوب تفریخ شده و لاروهای سن دوم نماتود پس از عبور از کاغذ صافی در کف تشتک پتری جمع شدند (Vrain 1997).

تهیه قارچ *M. anisopliae* و باکتری جدایه *P. fluorescens* CHA0

جدایه DEMI-001 قارچ *M. anisopliae* که بیماری‌زایی آن بر ملخ ثابت شده بود، از مؤسسه تحقیقات جنگل و مرتع کشور و جدایه باکتری *P. fluorescens* CHA0 از بخش گیاهپزشکی دانشگاه شیراز تهیه گردید. ملخ‌های آلوده به جدایه DEMI-001 قارچ *M. anisopliae* در زیر هود با جریان هوای سترون درون تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شد و جهت جلوگیری از خشک شدن، تشتک‌ها با نوار پارافیلم بسته شدند. پس از یک هفته، اسپورهای سبز رنگ این قارچ بر سطح بدن حشرات نمایان شد که از این اسپورها بر روی محیط کشت سیب‌زمینی آگار (PDA) کشت گردید. برای تکثیر قارچ، از محیط کشت اختصاصی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز، ۱۸ گرم آگار و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین به میزان ۰/۶ گرم، تتراسایکلین به مقدار ۰/۰۵ گرم و سیکلوهگزامید به میزان ۰/۰۵ گرم، در یک لیتر آب مقطر استفاده شد. به منظور انجام قسمتی از آزمایشات گلخانه‌ای، از محصول تجاری Green Muscle TC® که یک حشره‌کش بیولوژیک بر پایه نژاد IMI 330189 قارچ *M. anisopliae* var *acridum* و به صورت پودر می‌باشد، استفاده شد.

ارزیابی اثر بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* بر قارچ *M. anisopliae*

اثر بازدارندگی *P. fluorescens* بر رشد *M. anisopliae* در آزمایش‌های تعیین اثر متقابل و اثر مواد فرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و هر یک در چهار تکرار بررسی و هر آزمایش دو بار تکرار گردید و میانگین مشاهدات ثبت شد. در آزمایش اثر متقابل، ابتدا در یک طرف از ظروف کشت حاوی PDA، باکتری به طور یکنواخت کشت داده شد. سپس در طرف دیگر تشتک پتری، قطعه‌ای از کشت قارچ قرار داده شد و در تشتک‌های شاهد به جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید (Fokkema 1978, Zivkovic *et al.* 2010). در آزمایش اثر مواد فرار باکتری بر قارچ، در یک طرف از تشتک پتری باکتری بر روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) کشت داده شد و در طرف دیگر، قطعه‌ای از قارچ در مرکز ظرف بر روی همین محیط کشت قرار داده شد و درهای دو تشتک حاوی باکتری و قارچ را برداشته و دو تشتک روی هم قرار داده شدند و اطراف تشتک‌ها با نوار پارافیلم کاملاً بسته شد. در تیمار شاهد، در تشتک ظروف کشت به جای باکتری از آب مقطر سترون بر روی محیط کشت NA استفاده شد. زمانی که در تیمار شاهد قارچ تمام سطح ظروف کشت را اشغال نمود، قطر کلنی قارچ در تیمارها اندازه‌گیری گردید (Kazemzadeh *et al.* 2006, Fiddman & Rossal 1994).

تعیین اثر قارچ *M. anisopliae* و باکتری *P. fluorescens* بر تفریخ تخم و مرگ و میر لارو سن دوم نماتود *M. incognita*

در این آزمایش از سوسپانسیون و عصاره قارچ *M.*

www.SID.ir

Archive of SID

anisopliae IMI 330189 و باکتری به طور جداگانه و همچنین از عصاره باکتری رشد کرده در محلول حاوی عصاره قارچ و مخلوطی از هر دو عصاره استفاده گردید (Naserinasab *et al.* 2011). این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با نه تیمار در چهار تکرار به شرح زیر انجام گرفت:

تیمار ۱: شاهد (آب مقطر)؛ تیمار ۲: شاهد (محیط کشت مایع نوترینت)؛ تیمار ۳: شاهد (محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز)؛ تیمار ۴: عصاره کشت باکتری، رشد یافته در عصاره کشت قارچ؛ تیمار ۵: عصاره کشت قارچ؛ تیمار ۶: مخلوط عصاره کشت قارچ و عصاره کشت باکتری؛ تیمار ۷: سوسپانسیون 10^7 اسپور قارچ؛ تیمار ۸: عصاره کشت باکتری؛ تیمار ۹: سوسپانسیون 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی (cfu) باکتری

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری، از کشت ۴۸ ساعته باکتری با لوپ استریل به آب مقطر انتقال داده شد و تعیین غلظت با اسپکتروفتومتر صورت گرفت. برای تهیه عصاره کشت باکتری، یک لوپ از کشت جوان باکتری را در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Nutrient Broth (NB) سترون ریخته روی شیکر با ۱۵۰ حرکت در دقیقه رشد داده شد. پس از ۴۸ ساعت، عصاره به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی عصاره از صافی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد (Siddiqui & Shaukat 2004). برای تهیه سوسپانسیون قارچ، قطعات محیط کشت قارچ در ارلن حاوی آب مقطر انداخته شد و یک ساعت با شیکر تکان داده و با لام هموسیتومتر تعیین غلظت گردید. برای تهیه عصاره کشت قارچ، قارچ را در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط PDB روی شیکر با ۱۵۰ حرکت در دقیقه در دمای اتاق رشد داده و پس از ۱۰ روز دو بار توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد (Naserinasab *et al.* 2011, Mukhtar & Pervaz 2003).

برای تهیه عصاره باکتری رشد کرده در محلول حاوی عصاره قارچ، قارچ به مدت ۱۰ روز در محیط PDB روی شیکر با سرعت ۱۵۰ حرکت در دقیقه در دمای اتاق رشد داده شد و سپس دو مرتبه توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره به دست آمده به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط NB در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه گردید و سپس از کشت ۲۴ ساعته باکتری، به آن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ حرکت در دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. پس از آن، محتویات ارلن به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی از صافی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد (Siddiqui & Shaukat 2004). به منظور بررسی اثر سوسپانسیون و عصاره کشت‌های تهیه شده بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتود، به طور جداگانه تعداد ۱۰۰ لارو سن دوم ضدعفونی سطحی شده به دو میلی‌لیتر از عصاره و همچنین سوسپانسیون‌های 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر از باکتری و 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر قارچ اضافه شد. آب مقطر سترون و محیط PDB بدون قارچ و NB بدون باکتری به عنوان تیمارهای شاهد در نظر گرفته شد و تیمارها در انکوباتور با دمای ۲۷°C نگهداری شدند. تعداد لاروهای مرده پس از ۴۸ ساعت شمارش و میزان مرگ و میر به صورت درصد تعیین گردید (Cayrol *et al.* 1989). در بررسی اثر تیمارها بر تفریخ تخم نماتود، تعداد ۱۰۰ عدد تخم ضدعفونی سطحی شده به یک میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌های کشت و سوسپانسیون‌های تهیه شده اضافه شد و در دمای ۲۷°C نگهداری گردید. در تیمارهای شاهد، تخم‌ها در آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر و محیط‌های PDB بدون قارچ و NB بدون باکتری قرار داده شدند و یک هفته بعد تعداد تخم‌های تفریخ شده در هر کدام از تیمارها شمارش گردید و نتایج به صورت درصد بازدارندگی از تفریخ تخم ثبت شد (Ashoub & Amara 2010).

بررسی اثر روش‌های مختلف استفاده از قارچ *M. anisopliae* و باکتری *P. fluorescens* بر نماتود در گلخانه

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار به شرح زیر در چهار تکرار، انجام شد:

۱- خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری *P. fluorescens* CHA0؛ ۲- خیساندن خاک با سوسپانسیون *M. anisopliae* DEMI-001؛ ۳- فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ و سوسپانسیون‌پاشی برگ با باکتری؛ ۴- فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ و خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری؛ ۵- خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ و سوسپانسیون‌پاشی برگ با باکتری؛ ۶- خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ و سوسپانسیون باکتری؛ ۷- شاهد مایه‌زنی شده با نماتود؛ ۸- شاهد مایه‌زنی نشده با نماتود

با توجه به یافته‌های صدیقی و شوکت (Siddiqui & Shaukat 2002)، چون اختلاف معنی‌داری بین دو روش خیساندن خاک و فروبردن ریشه در سوسپانسیون باکتری مشاهده نشده است، از این رو در تحقیق حاضر تنها از روش خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری استفاده گردید.

در روش خیساندن خاک، دو سانتی‌متر از سطح خاک گلدان‌ها کنار زده شد و ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های 10^8 سلول باکتری و 10^7 اسپور قارچ به ازای هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون، به خاک گلدان‌ها اضافه گردید. در روش فرو کردن ریشه، قبل از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان، ریشه‌های آن‌ها شستشو داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر نگهداری شد. محلول‌پاشی اندام‌های هوایی گیاه نیز با سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون انجام شد. در شاهد به هر گلدان ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. پس از این مرحله، هر کدام از گلدان‌ها با ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتود *M. incognita* مایه‌زنی شدند.

بررسی اثر تلفیقی *P. fluorescens* و فرمولاسیون تجاری IMI 330189 قارچ *M. anisopliae* بر نماتود *M. incognita* در گلخانه

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار به شرح زیر در چهار تکرار انجام شد:

۱- شاهد بدون نماتود؛ ۲- شاهد مایه‌زنی شده با نماتود؛ ۳- فرو کردن ریشه در سوسپانسیون قارچ؛ ۴- افزودن دو گرم فرمولاسیون تجاری قارچ به خاک؛ ۵- خیساندن خاک با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر؛ ۶- افزودن ۲ گرم فرمولاسیون تجاری قارچ به خاک و خیساندن خاک با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر

برای آزمایشات گلخانه‌ای، گوجه‌فرنگی حساس به نماتود ریشه‌گرهی رقم Early urbana انتخاب شد (Khodaei Arbat *et al.* 2009). ابتدا بذرهای گوجه‌فرنگی به وسیله محلول ۵٪ هیپوکلریت سدیم، به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شد و پس از شستشوی بذرها با آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر سترون، در گلدان‌های حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه و ماسه با نسبت ۱:۱:۲ که با عبور بخار آب به مدت یک ساعت سترون شده بود) کشت گردیدند. گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به گلدان‌ها منتقل شدند. در روش فرو کردن ریشه، قبل از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان، ریشه‌های آن‌ها شستشو داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر نگهداری شد. سپس در گلدان‌های یک کیلوگرمی یک بوته گوجه‌فرنگی در هر گلدان کاشته شد و نماتود با جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دوم به ازای هر گیاه مایه‌زنی شد. برای مایه‌زنی، سه حفره در اطراف ریشه گیاه ایجاد شد و سوسپانسیون نماتود به خاک اضافه گردید. پس از مایه‌زنی نماتود، گلدان‌ها به مدت دو ماه در گلخانه با دمای حدود ۲۷-۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و به طور متعارف آبیاری شدند (Naserinasab *et al.* 2011, Maleki Ziarati *et al.* 2009).

در تیمار افزودن فرمولاسیون تجاری به خاک، دو سانتی‌متر از سطح خاک گلدان‌ها کنار زده شد و دو گرم از محصول بیولوژیک (بر پایه نژاد IMI 330189 قارچ *M. anisopliae* var *acridum*) با خاک مخلوط شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون، در هر گلدان ریخته شد و در تیمار شاهد به هر گلدان ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. سپس هر کدام از گلدان‌ها با ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتود *M. incognita* مایه‌زنی شد. پس از دو ماه، شاخص‌های رشدی گیاه شامل طول ریشه و شاخسار، وزن تر ریشه و شاخسار، وزن خشک ریشه و شاخسار و همچنین شاخص‌های نماتود شامل تعداد گال در ریشه، تعداد توده تخم در ریشه، تعداد تخم در هر توده تخم، تعداد کل تخم در ریشه و تعداد لارو سن دوم در خاک تعیین گردید و در نهایت با تقسیم جمعیت نهایی نماتود (مجموع تعداد گال در ریشه، تعداد تخم در ریشه و تعداد لارو سن ۲ در خاک) بر جمعیت اولیه، فاکتور تولیدمثل محاسبه شد. جهت شمارش گال و توده تخم، رنگ‌آمیزی ریشه انجام شد. برای رنگ‌آمیزی، ریشه‌ها کاملاً شستشو داده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ائوزین‌یلو (حاوی ۰/۱ گرم ائوزین‌یلو در ۱ لیتر آب مقطر) نگهداری شدند و سپس جهت خارج شدن رنگ اضافی شسته شدند (Jacquet *et al.* 2005). داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS 20 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت که تجزیه واریانس بر اساس آنالیز یک طرفه و مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن انجام شد.

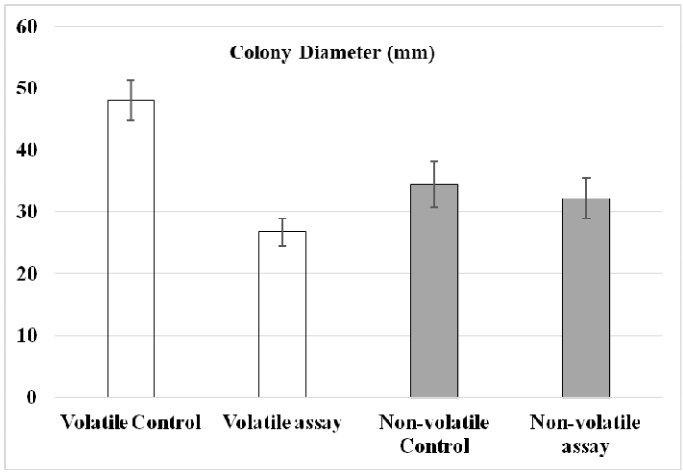
نتایج و بحث

ارزیابی اثر بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* بر قارچ *M. anisopliae*

نتایج حاصل از اثر متقابل این دو آنتاگونیست (شکل ۱) در آزمون غیرفرار نشان داد که قطر کلنی قارچ در تیمارهای قارچ + باکتری و شاهد (قارچ) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند و لذا می‌توان نتیجه گرفت که در این آزمون باکتری تأثیر بازدارنده بر رشد قارچ نگذاشته است. در بررسی اثر مواد فرار روی قطر کلنی قارچ، بین تیمار قارچ + باکتری و شاهد (قارچ) در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت و باکتری به میزان تقریبی ۴۰٪ رشد قارچ را کاهش داد. تولید مواد فرار ضد قارچی یکی از مکانیسم‌های کنترل زیستی عوامل باکتریایی است که علاوه بر تأثیر بر سرعت رشد میسلیوم، بر فعالیت آنزیمی قارچ نیز اثر می‌گذارد (Fiddaman & Rossal 1994). در آزمایشات *رهاننده و همکاران* (Rahanandeh

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. ارزیابی اثر بازدارندگی باکتری *Pseudomonas fluorescens* بـر قـارچ *Metarhizium anisopliae* در آزمـون‌هـای فـرار (دو نمودار سمت چپ) و غیرفرار (دو نمودار سمت راست)

Fig 1. Volatile (left) and non-volatile (right) assay to detect inhibitory effect of *Pseudomonas fluorescens* on *Metarhizium anisopliae*

et al. 2006) کاهش رشد قارچ‌های *Fusarium solani*، *F. oxysporum* و *Lasiodiplodia theobromae* بـه واسـطه ترکیبات فرار باکتری *P. fluorescens*، گزارش شده است.

اثر قارچ *M. anisopliae* و باکتری *P. fluorescens* بر تفریخ تخـم و مـرگ و میـر لارو سـن دوم نمـاتود *M. incognita*

بر اساس نتایج جدول مقایسه میـانگین اثـر تلفیقـی *P. fluorescens* و *M. anisopliae* بر مـرگ و میـر لارو سـن دوم و تفـریخ تخـم نمـاتود *M. incognita* در شـرایط آزمایشگاهی (جـدول ۱)، مخلـوط عصـاره کشـت هـر دو عامل کنترل زیستی با ایجـاد حـدود ۹۵٪ مـرگ و میـر در لارو سن دوم و بیش از ۹۸٪ بازدارنـدگی از تفـریخ تخـم، بهترین تیمار این آزمایش بود. در درجه دوم، تیمار عصـاره بـاکتری بـا ایجـاد ۸۰٪ مـرگ و میـر در لارو و ۹۵٪ بازدارندگی تفریخ تخم قرار داشـت کـه بـا ایـن توصـیف، می‌توان اثر قابل توجه عصاره این باکتری در ایجاد مـرگ و میر در لارو و جلوگیری از تفریخ تخم را دریافت. *آشـوب و آمارا* (Ashoub & Amara 2010) نیـز در بررسـی خـود مرگ و میر صددرصـدی لارو سـن دوم نمـاتود را بـر اثـر عصاره کشت باکتری گزارش نمودنـد. اثـر عصـاره کشـت باکتری *P. fluorescens* بر تفریخ تخم و مرگ و میـر لارو سن دوم نماتود *M. javanica* نیز توسط *صدیقی و شوکت* (Siddiqui & Shaukat 2004) گـزارش گردیـده اسـت. مشـخص شـده اسـت کـه سـودوموناس‌هـای فلورسـنت متابولیت‌هایی نظیر فنـازین‌هـا، ایندول‌هـا، فنیـل پیـرول و پتـرین تولیـد مـی‌کننـد کـه مـی‌تواننـد علیـه نمـاتود *M. incognita* فعالیت داشته باشند (Linberg 1981, Ashoub & Amara 2010).

بـر اسـاس نتـایج آزمایشـات قبلـی (Ghayedi & Abdollahi 2013) مرگ و میر ۷۰ درصدی لارو و کـاهش ۹۶-۹۳ درصـدی تفـریخ تخـم *Heterodera avenae* در تیمارهای با عصاره قارچ نیز بیانگر کارآیی بالای این عامـل کنترل زیستی است. قارچ‌ها می‌توانند نماتودهـا را مسـتقیماً پارازیته کنند یا این‌که متابولیت‌ها و آنزیم‌هایی ترشح کننـد که بر آن‌ها تأثیر بگذارند. این ترکیبات فعال این قابلیـت را

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. اثر تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ *Metarhizium anisopliae* IMI 330189 بر مرگ و میر لارو سن دوم و بازدارندگی از تفریخ تخم نماتود *Meloidogyne incognita* در شرایط آزمایشگاهی.

Table 1. Combined effect of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* and the fungus *Metarhizium anisopliae* IMI 330189 on larval mortality and egg hatch inhibition of *Meloidogyne incognita*, under laboratory condition.

Treatments	Larval mortality (%)	Egg hatch inhibition (%)
T1	5.42 g	27.73 d
T2	12.80 f	32.16 d
T3	9.88 fg	31.44 d
T4	69.50 c	93.16 a
T5	69.88 c	96.64 a
T6	94.98 a	98.22 a
T7	32.18 e	51.83 c
T8	80.28 b	94.99 a
T9	46.45 d	65.69 b

– بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT)، اعداد با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ نیستند.

– T1 = شاهد (آب مقطر)؛ T2 = شاهد (محیط کشت مایع نوترینت)؛ T3 = شاهد (محیط کشت مایع سیب‌زمینی–دکستروز)؛ T4 = عصاره کشت باکتری، رشد یافته در عصاره کشت قارچ؛T5 = عصاره کشت قارچ؛ T6 = مخلوط عصاره کشت قارچ و عصاره کشت باکتری ؛ T7 = سوسپانسیون قارچ؛ T8 = عصاره کشت باکتری؛ T9 = سوسپانسیون باکتری

- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P≤0.05), based on Duncan Multiple Range Test.

- T1 = Control (distilled water); T2 = Control (NB); T3 = Control (PDB); T4 = Culture filtrate of the bacterium, grown in culture filtrate of the fungus; T5 = Culture filtrate of the fungus; T6 = A mixture of the fungus and culture filtrate of the bacterium; T7 = Spore suspension of the fungus; T8 = Culture filtrate of the bacterium; T9 = Suspension of the bacterium.

دارند که به عنوان نماتودکش‌های جدید به کار برده شوند. قارچ *M. anisopliae* تعدادی سیکلوپپتید و دستروکسین تولید می‌کند که ممکن است در بیماری‌زایی آن نقش داشته باشد (Kershaw *et al.* 1999). اثر عصاره کشت قارچ *M. anisopliae* بر حشرات قبلاً اثبات شده است (Mohanty *et al.* 2008, Jahanbazian *et al.* 2013). این قارچ زهرابه‌های دستروکسین A و B تولید می‌کند و قبل از این که تهاجم گسترده به اندام‌های حشره میزبان صورت گیرد، آن را می‌کشد (Roberts 1966).

افزودن عصاره کشت قارچ به محیط کشت باکتری باعث کاهش فعالیت نماتودکشی باکتری گردیده است (جدول ۱). قارچ‌های مختلف باعث ایجاد درجات مختلفی از فعالیت نماتودکشی باکتری *P. fluorescens* می‌شوند. افزودن عصاره کشت *Aspergillus niger* به محیط کشت *P. fluorescens* باعث افزایش فعالیت نماتودکشی و بتاگالاکتوسیداز آن شد، در حالی که *A. quadrilineatus* این فعالیت را کاهش داد (Siddiqui *et al.* 2006). سوسپانسیون اسپور قارچ در مقایسه با عصاره آن اثر بازدارندگی کمتری بر تفریخ تخم نماتود داشت ولی سوسپانسیون سلول‌های باکتری باعث کاهش قابل توجه تفریخ تخم نماتود گردید. اضافه کردن عصاره کشت قارچ به محیط کشت باکتری بر بازدارندگی از تفریخ تخم نماتود به وسیله باکتری تأثیر منفی نداشت (جدول ۱).

مقایسه روش‌های مختلف استفاده از قارچ *M. anisopliae* و باکتری *P. fluorescens* بر نماتود در گلخانه

در آزمایش مقایسه اثر روش‌های کاربرد این عوامل

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. مقایسه روش‌های کاربرد *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و *Metarhizium anisopliae* IMI 330189 بر شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود *Meloidogyne incognita*.

Table 2. Comparison of application methods of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and *Metarhizium anisopliae* IMI 330189on growth factors of infected tomato with *Meloidogyne incognita*.

Treatments	Shoot length (cm)	Fresh shoot weight (g)	Dry shoot weight (g)	Root length (cm)	Fresh root weight (g)	Dry root weight (g)
T1	55.75 b	38.35 b	10.69 ab	29.25 ab	16.53 a	3.63 ab
T2	57.75 b	34.78 b	9.62 bc	25.75 b	19.65 a	3.62 ab
T3	62.25 b	41.26 ab	8.38 cd	27.00 ab	16.00 a	3.10 b
T4	66.25 ab	35.63 b	7.40 d	27.75 ab	18.79 a	3.82 ab
T5	69.75 ab	37.29 b	10.51 ab	26.00 b	20.57 a	3.48 ab
T6	59.25 b	33.11 b	7.29 d	25.00 b	18.47 a	4.45 a
T7	66.25 ab	34.17 b	7.24 d	24.50 b	19.06 a	3.16 b
T8	81.75 a	51.59 a	12.17 a	31.00 a	17.29 a	4.00 ab

- بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT)، اعداد با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ نیستند.

- T1 = خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری؛ T2 = خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ؛ T3 = فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ و سوسپانسیون‌پاشی برگ با باکتری؛ T4 = فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ و خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری؛ T5 = خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ و سوسپانسیون‌پاشی برگ با باکتری؛ T6 = خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ و سوسپانسیون باکتری؛ T7 = شاهد مایه‌زنی شده با نماتود؛ T8 = شاهد مایه‌زنی نشده با نماتود

- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P≤0.05), based on Duncan Multiple Range Test.

- T1 = 20 ml of the bacterium suspension as soil drench; T2 = Application of the fungus as soil drench; T3 = Root dip in spore suspension of the fungus and foliar spray of the bacterium suspension; T4 = Root dip in spore suspension of the fungus and the bacterium suspension as soil drench; T5 = Application of the fungus as soil drench and foliar spray of the bacterium suspension; T6 = Application of the fungus and the bacterium suspension, both as soil drench; T7 = Inoculated control; T8 = Uninoculated control

کنترل زیستی بر شاخص‌های رشدی گیاه، در تیمارهایی که خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ یا سوسپانسیون باکتری صورت گرفت، به میزان قابل توجهی بهبود یافتند (جدول ۲) و شاخص‌های مرتبط با نماتود نیز به مقدار قابل توجه در تیمارهای فوق و همچنین در تیمار فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ همراه با سوسپانسیون‌پاشی برگ باکتری کاهش داشتند (جدول ۳). استفاده از قارچ به صورت سوسپانسیون اسپور در خاک بر تولید گال و تکثیر نماتود مؤثر بود ولی در تلفیق با باکتری هم به صورت اسپری باکتری بر اندام‌های هوایی و هم سوسپانسیون سلول باکتری در خاک کم اثرتر بوده است. استفاده از قارچ به روش فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ در تلفیق با هر دو روش مایه‌زنی باکتری، بر تولید گال و تکثیر نماتود موثر بود (جدول ۳). توانایی کلونیزه کردن ریشه توسط قارچ *M. anisopliae* قبلا گزارش شده است (Hu & St. Leger 2002, St. Leger 2008). بعضی از جدایه‌های این قارچ به صورت درون‌رست در گیاه وجود دارند ولی از نظر توانایی کلنیزه کردن ریشه، بین جدایه‌های مختلف آن‌ها تفاوت وجود دارد (Elena *et al.* 2011). با توجه به این که در تیمار استفاده از سوسپانسیون اسپور قارچ به تنهایی کاهش گال، توده تخم و تخم نماتود مشاهده شده است، پس احتمالاً جدایه مورد بررسی توانایی کلنیزه کردن ریشه را داشته است. در آزمایش حاضر، ممکن است باکتری با تأثیر بر

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه روش‌های کاربرد *Pseudomonas fluorescens* و *Metarhizium anisopliae* بر شاخص‌های نماتود *Meloidogyne incognita* در گوجه‌فرنگی

Table 3. Comparison of application methods of *Pseudomonas fluorescens* and *Metarhizium anisopliae* on nematode indices of *Meloidogyne incognita* in infected tomato.

Treatments	Galls/root	Egg masses/root	Eggs/root	Eggs/egg mass	J2/soil	Reproduction Factor
T1	1065.5 b	598.6 b	33486 cd	560.0 bc	1765 d	18.16 de
T2	1369.8 ab	532.9 b	15134 d	278.0 c	5200 bc	10.85 ef
T3	1121.2 b	543.1 b	30612 cd	563.5 bc	5625 bc	18.68 de
T4	1245.6 ab	598.5 b	46264 bcd	789.0 ab	8350 b	27.93 cd
T5	1792.5 ab	1638.9 a	126386 a	957.5 ab	4625 cd	66.40 a
T6	1922.5 a	910.8 b	89073 ab	984.0 a	3675 cd	47.34 b
T7	1713.1 ab	970.2 ab	69479 bc	724.8 ab	12200 a	41.70 bc

– بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT)، اعداد با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ نیستند.

– T1 = خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری؛ T2 = خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ؛ T3 = فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ و سوسپانسیون‌پاشی برگ با باکتری؛ T4 = فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور و خیساندن خاک با سوسپانسیون باکتری؛ T5 = خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ و سوسپانسیون‌پاشی برگ با باکتری؛ T6 = خیساندن خاک با سوسپانسیون قارچ و سوسپانسیون باکتری؛ T7 = شاهد مایه‌زنی شده با نماتود؛ T8 = شاهد مایه‌زنی نشده با نماتود

- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P≤0.05), based on Duncan Multiple Range Test.

- T1 = Twenty ml of the bacterium suspension as soil drench; T2 = Application of the fungus as soil drench; T3 = Root dip in spore suspension of the fungus and foliar spray of the bacterium suspension; T4 = Root dip in spore suspension of the fungus and the bacterium suspension as soil drench; T5 = Application of the fungus as soil drench and foliar spray of the bacterium suspension; T6 = Application of the fungus and the bacterium suspension, both as soil drench; T7 = Inoculated control; T8 = Uninoculated control

ترشحات ریشه گیاه، باعث کاهش توانایی قارچ در کلنیزه کردن ریشه شده باشد.

بررسی اثر تلفیقی *P. fluorescens* و *M. anisopliae* بر نماتود *M. incognita* در گلخانه

در آزمایش گلخانه‌ای بررسی اثر قارچ *M. anisopliae* و باکتری *P. fluorescens* بر شاخص‌های مرتبط با نماتود *M. incognita* و فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی، بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت (جداول ۴ و ۵). در تیمار ریشه با قارچ، تعداد گال در ریشه، تعداد لارو سن دوم در خاک، تعداد کیسه تخم و تخم در ریشه کاهش یافت. این قارچ به میزان قابل توجهی فاکتور تولیدمثل نماتود را نیز کاهش داد (جدول ۵). با توجه به نتایج ارایه شده در جدول ۱، قارچ با کاهش میزان تفریخ تخم و هم‌چنین ایجاد مرگ و میر در لارو سن دوم نماتود، باعث کاهش جمعیت نماتود شده است. *تریبهوانشوار و همکاران* (Tribhuvaneshwar *et al.* 2008) نیز در بررسی اثر قارچ *M. anisopliae* بر نماتود *Rotylenchulus reniformis* روی گوجه‌فرنگی، مشاهده کردند که تیمار ریشه گوجه‌فرنگی با قارچ موجب افزایش طول ریشه و ساقه شد. ایشان همچنین مشاهده نمودند که قارچ باعث کاهش جمعیت نهایی نماتود در خاک و تعداد تخم در توده‌ی تخم گردید. بیشترین طول ریشه در تیمار ریشه با قارچ *M. anisopliae* مشاهده گردید (جدول ۴). طبق مطالعات *النا و همکاران* (Elena *et al.* 2011)، *M. anisopliae* باعث افزایش فاکتورهای رشدی گوجه‌فرنگی نظیر طول و وزن خشک ریشه و ساقه شده است. طبق نتایج بررسی‌های ایشان، میزان افزایش رشد به جدایه قارچ

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴. اثر تلفیقی *P. fluorescens* CHA0 و فرمولاسیون تجاری *M. anisopliae* IMI 330189 به بر شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود *Meloidogyne incognita*.

Table 4. Combined effect of *P. fluorescens* CHA0 and *M. anisopliae* IMI 330189 on growth factors of tomato, infected with *Meloidogyne incognita*.

Treatments	Shoot length (cm)	Fresh shoot weight (g)	Dry shoot weight (g)	Root length (cm)	Fresh root weight (g)	Dry root weight (g)
T1	48.00 b	34.85 a	6.50 a	29.25 bc	13.24 a	2.09 a
T2	46.50 b	29.34 b	4.97 c	27.75 c	12.38 ab	1.49 bc
T3	54.25 b	27.49 b	4.22 bc	33.50 ab	11.98 b	1.51 bc
T4	65.75 a	32.25 ab	5.11 c	25.75 c	7.73 e	1.11 c
T5	47.00 b	28.49 b	4.59 c	35.00 a	10.92 c	1.59 b
T6	61.75 a	30.73 ab	5.45 ab	30.00 abc	9.32 d	1.22 bc

– بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT)، اعداد با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ نیستند.

– T1 = شاهد مایه‌زنی نشده با نماتود؛ T2 = شاهد مایه‌زنی شده با نماتود؛ T3 = فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ؛ T4 = افزودن ۲ گرم فرمولاسیون تجاری قارچ به خاک؛T5 = خیساندن خاک با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر؛ T6 = افزودن ۲ گرم فرمولاسیون تجاری قارچ به خاک و خیساندن خاک با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر

- Values followed by the same letters in each column are not significantly different ($P \leq 0.05$), based on Duncan Multiple Range Test.

- T1 = Uninoculated control; T2 = Inoculated control; T3 = Root dip in spore suspension of the fungus; T4 = Soil application of two grams of the fungus; T5 = 20 ml of the bacterium suspension as soil drench; T6 = Soil application of two grams of the fungus and 20 ml of the bacterium suspension as soil drench

و میزان آغشته سازی با قارچ بستگی دارد. ممکن است جدایه‌های مختلف این قارچ تأثیر متفاوتی بر نماتود ریشه‌گرهی داشته باشند.

در مطالعه اثر تلفیقی عوامل آنتاگونیست مورد بررسی بر نماتود ریشه‌گرهی، در مقایسه با اثر باکتری به تنهایی، تفاوتی وجود نداشت. به عبارت دیگر قارچ خاصیت بیوکنترلی باکتری را افزایش نداد و البته کاهشی نیز در تلفیق این دو عامل کنترل زیستی حاصل نشد. البته با توجه به این که هر کدام از عوامل آنتاگونیست به تنهایی خسارت و تولیدمثل نماتود را کاهش دادند، انتظار می‌رفت که اثر تلفیقی آن‌ها جمعیت نماتود را شدیداً کاهش دهد. اثر این قارچ‌ها به علت تأثیر بر میزان متابولیت‌های تولید شده به وسیله باکتری اعلام شد (Siddiqui *et al.* 2006). در استفاده تلفیقی از قارچ و باکتری تا حدودی افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی دیده شد. قارچ هم به تنهایی و هم در تلفیق با باکتری باعث افزایش طول ساقه گردید (جدول ۴). با توجه به کاهش اثر نماتودکشی باکتری بر اثر افزودن عصاره کشت قارچ به محیط کشت باکتری (جدول ۲)، نتایج مشاهده شده در شرایط گلخانه قابل توجیه است. استفاده تلفیقی از قارچ و باکتری نسبت به استفاده از قارچ به تنهایی بر کاهش فاکتورهای تولیدمثلی نماتود بهتر بود.

در یک نتیجه‌گیری کلی از این بررسی می‌توان به کارآیی بسیار خوب عوامل بیوکنترل مورد بررسی توجه نمود. افزایش قابل توجه مرگ و میر لارو سن دوم و همچنین کاهش چشم‌گیر تفریخ تخم در تیمار استفاده از مخلوط عصاره هر دو عامل بیوکنترل و بهبود شاخص‌های رشدی به ویژه وزن خشک شاخسار در تیمار استفاده توام از دو عامل با خیساندن خاک توسط سوسپانسیون اسپور قارچ و محلول‌پاشی برگ با سوسپانسیون باکتری، اثر تلفیقی این دو عامل را روشن می‌سازد. علاوه بر این،

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵. اثر تلفیقی *Pseudomonas fluorescens* و *Metarhizium anisopliae* بر شاخص‌های نماتود *Meloidogyne incognita* در گوجه‌فرنگی آلوده.

Table 5. Combined effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Metarhizium anisopliae* on nematode factors of *Meloidogyne incognita* in infected tomato.

Treatments	Galls/root	Egg masses/root	Eggs/root	Eggs/egg mass	J2/soil	Reproduction Factor
T2	537.4 a	437.2 a	22532 a	520.3 a	5408.75 a	14.24 a
T3	286.0 bc	80.3 c	3523 c	449.0 a	3107.00 a	3.46 c
T4	378.0 b	201.6 b	9090 b	453.0 a	2500.00 a	5.99 b
T5	209.2 c	89.9 c	2641 c	269.3 b	4067.50 a	3.46 c
T6	211.4 c	109.0 c	3392 c	309.3 b	3210.00 a	3.41 c

– بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT)، اعداد با حروف مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ نیستند.

– T2 = شاهد مایه‌زنی شده با نماتود؛ T3= فرو کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور قارچ؛ T4 = افزودن ۲ گرم فرمولاسیون تجاری قارچ به خاک؛ T5= خیساندن خاک با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر؛ T6 = افزودن ۲ گرم فرمولاسیون تجاری قارچ به خاک و خیساندن خاک با ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری به ازای هر میلی‌لیتر

- Values followed by the same letters in each column are not significantly different ($P \leq 0.05$), based on Duncan Multiple Range Test.

- T1 = Uninoculated control; T2 = Inoculated control; T3 = Root dip in spore suspension of the fungus; T4 = Soil application of two grams of the fungus; T5 = 20 ml of the bacterium suspension as soil drench; T6 = Soil application of two grams of the fungus and 20 ml of the bacterium suspension as soil drench

شاخص‌های مرتبط با نماتود نیز در تیمارهای استفاده از قارچ، بیانگر اثرات بسیار قابل توجه این عامل بیوکنترل بر نماتود مورد آزمایش است. با توجه به این که قارچ *M. anisopliae* کمتر مورد توجه متخصصان نماتودشناس بوده است، جا دارد که آزمایشات تکمیلی به منظور بررسی بیشتر ابعاد به کارگیری این قارچ ارزشمند در روش‌های مدیریتی نماتودهای انگل گیاهی اجرا گردد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول تحت راهنمایی نگارنده دوم و مشاوره نگارنده سوم در دانشگاه یاسوج انجام شده است. نگارندگان لازم می‌دانند از مساعدت‌های مسولان محترم دانشگاه یاسوج قدردانی نمایند. از بررسی کنندگان محترم که با دقت بسیار موجبات افزایش کیفیت مقاله را فراهم نمودند، نهایت سپاس را داریم.

منابع

Ahmadzadeh M. 2012. Biological control of plant diseases: plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, Tehran, 470 p.

Almaghrabi O. A., Massoud S. I. and Abdelmoneim T. S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Sciences 20: 57-61.

Ashoub A. H. and Amara M. T. 2010. Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of American Science 6(10): 321-328.

Bagheri N., Ahmadzadeh M. and Heidari R. 2013. Effects of *Pseudomonas fluorescence* strain UTPF5 on mobility, mortality, and hatching of root knot nematode *Meloidogyne javanica*. Proceedings of Conference of Biological Control in Agriculture and Natural Resources, 27-28 Aug., University of Tehran, Tehran, Iran. p.

www.SID.ir

Archive of SID

81.
Cayrol J. C., Djian A. and Pijarowski L. 1989. Study of the nematicidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. Revue de Nematologie 12 (4): 331-336.
Elena G. J., Beatriz P. J., Alejandro P. and Lecuona R. E. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. Advances in Biological Research 5(1): 22-27.
Farashiani M. E., Askary H., Moniri V. R., Omid R., Azizkhani E., Babmorad M., Zamani S. M., Hashemi M. and Zeinali S. 2011. Influence of super absorbent polymers on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch). Sorokin against *Aeolesthes sarta* (Col.: Cerambycidae). Iranian Journal of Forest and Range Protection Research 8(1): 27-38.
Fiddaman P. and Rossal S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 76: 395-405.
Fokkema N. J. 1978. Fungal antagonism in the phylosphere. Annals of Applied Biology 89: 115-117.
Ghayedi S. and Abdollahi M. 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. Journal of Plant Protection Research 53(2): 165-171.
Hu G. and St. Leger R. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Applied and Environmental Microbiology 68: 6383-6387.
Hussay R. S., and Barker K. R. 1973. A compression of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.
Jacquet M., Bongiovanni M., Martinez M., Verschave P., Wajnberg E. and Castagnone-Sereno P. 2005. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. Plant Pathology 54: 93– 99.
Jahanbazian L., Abdollahi M. and Haghnazari E. 2014. Effect of culture filtrate of DEMI-001 isolate of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. against *Tribolium castaneum* Herbst. (Col., Tenebrionidae). Third Insect Pest Management Conference. Jan. 21-22, 2014, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. p. 471.
Janisiewicz W. J. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apple. Phytopathology 86: 473-479.
Kazemzadeh M., Padasht F., Khodakaramian G. K. and Roostai A. 2006. Effect of antibiosis antagonistic bacterial isolated from ice paddy of the Guilan province on the *Rhizoctonia solani* causal agent of rice sheath. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 12 (6).
Kershaw M. J., Moorhouse E. R., Bateman R., Reynolds S. E. and Charnley A. K. 1999. The Role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. Journal of Invertebrate Pathology 74: 213-223.
Khodaei Arbat A., Taheri A. H., Pahlevani M. H. and Niknam GH. R. 2009. Evaluation of Tomato Cultivars Resistance to Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949). Journal of Plant Production 16(1): 45-55.
Lindberg G. S. 1981. An antibiotic lethal to fungi. Plant Diseases 65: 680- 683.
Maleki Ziarati H., Roustaee A., Sahebani N., Etebarian H. R. and Aminian H. 2009. Study of Biological Control of Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica* (Trube) Chitwood, in Tomato by *Trichoderma harzianum* Rifai in Greenhouse and Quantitative Changes of Phenolic Compounds in Plant. Seed and Plant Production Journal 25(3): 259-272.
Medonica A. F. 1992. Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata* in Brazil. Pp. 239-244. *In:* C. J. Lomer and C. Prior (eds.). Biological Control of Locusts and Grasshoppers. CAB International, Wallingwood, United Kingdom.
Metschnikoff E. 1879. Maladies des hannetons du ble. Zapiski imperatorskogo obshchestua sel'skago Khozyaistra yuzhnoi rossii. 17-50.
Mohanty S. S., Raghavendra K., Mittal P. K. and Dash A. P. 2008. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 1199–1202.
Mokhtari S., Sahebani N. and Etebarian H. R. 2009. Study on biological control and systemic induction of

www.SID.ir

Archive of SID

peroxidase enzyme activity in tomato plant infected with root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 antagonist. Journal of Agriculture 11(1) : 151-161.

Mukhtar T. and Pervaz I. 2003. In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. International Journal of Agriculture and Biology 5(4): 576-579.

Naserinasab F., Sahebani N. and Etebarian H. R. 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on Tomato. African Journal of Food Science 5(3): 276-280.

Nitao J. K., Meyer S. L. F. and Chitwood D. J. 1999. In-vitro assays of *M. incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. Journal of Nematology 31: 772-783.

Rahanandeh H., Niknejad Kazempour M. and Hasanzadeh N. 2006. The study of bacterial antagonistic effect decay agents of crown and root of mulberry trees in Guilan Province. Journal of Agricultural Science 1: 223-232.

Richards M. G. and Rodgers P. B. 1990. Commercial development of insect biocontrol agents. The exploitation of micro-organisms in applied biology. Aspects of Applied Biology 24: 245- 253.

Roberts D. W. 1966. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. 1. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. Journal of Invertebrate Pathology 8: 212–221.

Sankari M. K., Jonathan E. I., Devrajan K. and Raguchander T. 2012. *Pseudomonas fluorescens* induced systemic resistance in tomato against *Meloidogyne incognita*. Indian Journal of Nematology 42(1): 5-10.

Sasser J. N. 1989. Plant parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy. A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology and Consortium for International Crop Protection. 115 pp.

Sasser J. N. and Carter C. C. 1982. Overview of the international *Meloidogyne* project Rational, goals, implementation and progress to date. Proceeding of Conference on Root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. (Region 111*)* Brasillia Brazil. PP. 3-13.

Siddiqui I. A. and Mahmood I. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematode: A review: Bioresource Technology 167- 179.

Siddiqui I. A. and Shaukat S. S. 2002. Rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance (ISR) in tomato against *Meloidogyne javanica*. Journal of Phytopathology 150: 469- 473.

Siddiqui I. A. and Shaukat S. S. 2004. *Trichoderma harzianum* enhances the production of nematicidal compounds in vitro and improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. Letters in Applied Microbiology 38: 169–175.

Siddiqui I. A., Haas D. and Heeb S. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Applied and Environmental Microbiology 71(9): 5646–5649.

Siddiqui I. A. Shaukat S. S. Sheikh I. H. and Khan A. 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 641–650.

Sikora R. A. and Hoffmann-Hergarten S. 1993. Biological control of plant parasitic nematodes with plant-health-promoting rhizobacteria. Pp. 166-172. *In:* R. D. Lumsden and J. L. Vaughn (eds.). Pest Management: Biotechnology Based Technologies. Washington: American Chemical Society.

Sorokin N. 1883. Rastitelnye parazity cheloveka i zhivotnykn' kak' prichina zaraznykn' boleznei (Plant parasites causing infectious diseases of man and animals). Vyp. II. Izdanie glavnogo Voenno-Meditsinskago Upraveleneia. St Petersburg. 544 p. Pervoe prilozenie k Voenno-Meditsinskomu Zhurnalu za. (First supplement to J. Military Med.). 168–198.

St. Leger R. 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. Journal of Invertebrate Pathology 98: 271-276.

Tian B., Yang J. and Zhang K. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbiology Ecology 61: 197-213.

Tribhuvaneshwar Sharma M. K. and Bhargava S. 2008. Efficacy of green muscardine fungi, *Metarhizium anisopliae* against reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* on tomato. Indian Journal of Nematology 38: 242-244.

www.SID.ir

Archive of SID

Vrain T. C. 1977. A Technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. Journal of Nematology 9(3): 249-251.

Živković S., Stojanović S., Ivanović Ž., Gavrilović V., Popović T. and Balaž J. 2010. Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Archives of Biological Science Belgrade 62(3): 611-623.

www.SID.ir