DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jaep.2017.108181
آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۴، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۵

کاربرد توام دوگونه از *Trichoderma* و *Bacillus subtilis* در کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی (*Meloidogyne javanica*)

میترا بدخشان[۱]، عصمت مهدیخانی مقدم[۲]✉، ساره بقائی راوری[۲] و حمید روحانی[۳]

۱- کارشناس ارشد؛ ۲- دانشیار؛ ۳- استاد؛ گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۵)

چکیده

کاربرد همزمان دو گونه *Trichoderma harzianum* و *T. virens* به همراه دو جدایه از باکتری *Bacillus subtilis*، در کاهش شاخص‌های بیماریزایی نماتد *Meloidogyne javanica* و بهبود فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی ارزیابی گردید. آزمون سنجش زیستی، کاربرد عصاره کشت گونه‌های قارچی و سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی به صورت تکی و تلفیقی بر تفریخ تخم و مرگ و میر لارو نماتد بررسی شد. در تیمار ترکیبی *T. virens* (جدایه T65) و *B. subtilis* (جدایه MD) مرگ و میر لارو سن دوم و عدم تفریخ تخم نماتد به ترتیب به میزان ۵ و ۱/۵ برابر نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه افزایش یافت. همچنین ریشه‌های آلوده گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا در مرحله ۴-۵ برگی با ترکیب جدایه‌های ذکر شده، در شرایط گلخانه تیمار گردیدند که نتایج حاکی از کاهش ۶۸، ۵۷/۵ و ۳۸/۳ درصدی به ترتیب در تعداد گال، تخم و لارو سن دوم نسبت به شاهد دارد. ارزیابی بهبود فاکتورهای رشدی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه دلالت بر این دارد که جدایه باکتریایی MD، پتانسیل افزایش ۳۴ و ۱۱۰ درصدی را به ترتیب در طول ساقه و ریشه گوجه فرنگی در مقایسه با شاهد سالم دارا می‌باشد. به نظر می‌رسد جدایه MD باکتری *B. subtilis* ، گزینه مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر در زمینه تولید هورمون‌های گیاهی و احتمال القاء مقاومت در گیاه باشد. همچنین برآورد کارایی تیمار تلفیقی T.65+MD در کاهش شاخص‌های بیماریزایی نماتد ریشه گرهی در شرایط طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، تریکودرما، کنترل زیستی، نماتد ریشه گرهی.

Simultaneous application of two species of *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* to control root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on tomato

M. BADAKHSHAN[1], E. MAHDIKHANI- MOGHADDAM[2]✉, S. BAGHAEE- RAVARI[2] and H. ROUHANI[3]

1- M.Sc.; 2. Associate Professor; 3- Professor; Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

In the current research, simultaneous application of *Trichoderma harzianum* (T.BI) and *T. virens* (T.65) species with two strains of *Bacillus subtilis* (MD, Bs) were evaluated on reduction of *Meloidogyne javanica* pathogenicity indexes and improvement of tomato growth factors in a bioassay trial fungal culture extract and bacterial suspension were tested on mortality of second stage juveniles and egg hatching individually and simultaneously. Application of T65 (*T. virens)* and MD (*B. subtilis*) caused 5 and 1.5 times enhancement in juvenile mortality and egg hatching inhibition of *M. javanica* in comparison to control in laboratory conditions. Furthermore, roots of tomato seedlings with 4-5 leaves were treated by mentioned combination in greenhouse. Comparing to control treatment of T65+ MD lead to reduction of gall, egg and second stage juvenile numbers by 68, 57.5 and 38.3 % respectively. According to our results, efficiency assessment of T.65+MD treatment on reduction of pathogenicity indexes in root knot nematode is recommended under natural condition. Evaluation of tomato growth factors improvement in pot experiments revealed that MD bacterial strain has potential of increasing tomato shoot and root length by 34 and 110 % respectively in comparison to healthy control. Therefore, it seems that MD strain is suitable candidate for further research in the fields of plant hormones production and possible induction of resistance in plant.

Key words: *Bacillus*, Biological control, Root knot nematode, *Trichoderma*.

✉ **Corresponding author: Mahdikhani-e@ferdowsi.um.ac.ir**

مقدمه

گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) یکی از محصولات اقتصادی مهم در کشاورزی می‌باشد که وجود حالت تازه خوری و قابلیت فرآوری آن، نقش بسزایی در پذیرش سریع و همگانی آن به عنوان یک محصول غذایی مطلوب داشته است (Behnamian and Masiha, 2001). نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) انگل داخلی ساکن هستند و بیشترین خسارت را در میان آفات کشاورزی به طیف گسترده ای از محصولات به ویژه سبزیجات وارد می‌آورند (Hashem and Abo-Elyousr, 2011). میزان خسارت ناشی از نماتدهای ریشه گرهی به عوامل متعدد از جمله نوع رقم، شرایط آب و هوایی، نوع خاک و مهم‌تر از همه جمعیت نماتد در خاک بستگی دارد (Damadzadeh, 2006). میزان آستانه خسارت اقتصادی نماتدهای مولد گره در محصولات مختلف ۰/۵ تا ۱/۱ تخم در یک سانتی متر مکعب خاک تعیین شده است (Sikora and Fernandez, 2005). کنترل نماتد ریشه گرهی به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولید مثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن، دشوار می‌باشد (Naserinasab *et al.*, 2011). در حال حاضر با توجه به مشکلات ناشی از کاربرد مواد شیمیایی و اثرات سوء سموم بر سلامت انسان و محیط زیست، استفاده از سایر روش‌های جایگزین از اهمیت زیادی برخوردار است (Sahebani and Hadavi, 2008).

استفاده از گونه‌های قارچ *Trichoderma* و باکتری *Bacillus* می‌تواند گزینه مناسبی در کنترل زیستی بیمارگرهای خاکزی به ویژه نماتدها با هدف کاهش میزان خسارت بیماری باشد. گونه‌های *Trichoderma* آزادزی هستند و در محیط‌های ریشه، خاک و اندام‌های هوایی گیاه در تعامل با میکروارگانیسم‌های مختلف دیگر به سر می‌برند. کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط گونه‌های قارچ *Trichoderma*، مقاومت گیاه را به تنش‌های محیطی افزایش می‌دهد و اغلب باعث افزایش رشد و توسعه ریشه‌ها، جذب عناصر غذایی و افزایش عملکرد محصول می‌گردد (Harman *et al.*, 2004). گونه *T. harzianum* از طریق تجمع متابولیت‌ها در خاک و فعالیت‌های آنتاگونیستی، حرکت نماتد را به سمت ریشه کند می‌کند و قارچ فرصت کلونیزه کردن و جلوگیری از نفوذ نماتد به ریشه را پیدا می‌کند (Golzari *et al.*, 2011). کاربرد گونه *T. harzianum* علیه نماتد *M. enterolobii* حاکی از آنست که این قارچ با تولید ترکیبات شیمیایی و تحریک برخی از مکانیسم‌های دفاعی در گیاه گوآوا، مانع نفوذ و توسعه نماتد به داخل ریشه می‌شود (Jindapunnapat *et al.*, 2013). از گونه‌های *Bacillus subtilis*، *B. cereus*، *B. amyloliquefaciens*، *B. pumilus*، *B. mycoides* و *B. licheniformis* به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک، به طور مؤثری برای سرکوب نماتدهای متعلق به جنس‌های *Meloidogyne* و *Heterodera* استفاده شده است (Gardener *et al.*, 2004). گونه‌های *Bacillus* با تولید آنزیم‌های هیدرولتیک مانند گلوکاناز، پروتئاز و آنتی بیوتیک، فعالیت بازدارندگی علیه قارچ‌ها و نماتدها دارند (Ruzin *et al.*, 2014). بررسی‌ها حاکی از آنست که گونه *B. subtilis* با تولید متابولیت‌های سمی، علیه نماتد ریشه گرهی *M. incognita* مؤثر واقع می‌شود (Ruzin *et al.*, 2014; Munshid *et al.*, 2013).

تاکنون مطالعات متعددی در زمینه کنترل بیولوژیک نماتدهای انگل گیاهان به ویژه جنس *Meloidogyne* از طریق کاربرد تلفیقی عوامل بیوکنترل صورت گرفته است. نتایج حاصل از یک پژوهش نشان داد که کاربرد باکتری *B. subtilis* و قارچ *Paecilomyces lilacinus* به تنهایی و یا در ترکیب با هم باعث افزایش پارامترهای رشدی گیاه و کاهش شاخص‌های آلودگی *M. incognita* می‌گردد، اما ترکیب دو عامل آنتاگونیست تأثیر بیشتری نسبت به کاربرد تنهایی هر کدام از عوامل دارد (Meyer and Roberts, 2002). اثرات نماتد کشی *Pseudomonas fluorescens*، *Pacillomyces lilacinus*، *Pichia guilliermondii* و *Calothrix parietina* به تنهایی و در ترکیب با هم، علاوه بر اثرات کشنده بر روی نماتد، باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاهان هم شده است (Hashem and

Abo-Elyousr, 2011). در بررسی دیگری مشاهده شد که تلفیق قارچ *Verticillium chlamydosporium* و باکتری *Pasteuria penetrans* تأثیر بیشتری در کاهش جمعیت نماتد نسبت به استفاده از هر کدام از عوامل به تنهایی دارد (Meyer and Roberts, 2002).

بررسی‌های انجام گرفته در داخل کشور، نیز نشان دهنده تاثیر بیشتر کاربرد توام عوامل بیوکنترل با یکدیگر، در مباحث کنترلی می‌باشد. به عنوان مثال اثر تلفیقی *T. harzianum Bi* و *Pseudomonas fluorescens* باعث افزایش معنی دار مرگ و میر لاروهای *M. javanica* نسبت به کاربرد هر کدام از عوامل به تنهایی می‌گردد(Mokhtari *et al.*, 2014). همچنین کاربرد توأم سه باکتری *Pantoea* sp.، *B. subtilis* و *P. fluorescence* روی نماتد *M. javanica* در گیاه گوجه فرنگی نسبت به استفاده از آن‌ها به طور جداگانه و یا در ترکیب‌های دوتایی، اثر بیشتری در افزایش شاخص‌های رویشی گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتد دارد (Majzoob *et al.*, 2010). اثر تلفیقی *Trichoderma virens* و *Glomus mosseae* در کنترل نماتد *M. javanica* منجر به کاهش تعداد گال ریشه، تعداد توده تخم در هر گرم ریشه و تعداد لارو سن دوم در هر گلدان می‌گردد (Miraki *et al.*, 2013).

با توجه به گستردگی انتشار گونه‌های مختلف نماتد ریشه گرهی در دنیا، خسارت مستقیم و غیر مستقیم این نماتد به محصول گوجه فرنگی و با توجه به مطالعات اندک داخلی در مورد نقش بیوکنترلی گونه‌های باسیلوس و تریکودرما به صورت تلفیق، بدین منظور در تحقیق حاضر، کاربرد همزمان دو گونه قارچ تریکودرما و دو جدایه از باکتری *Bacillus subtilis* در کاهش شاخص‌های بیماریزایی نماتد *M. javanica* و بهبود فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی ارزیابی گردید.

روش بررسی

شناسایی و تهیه جمعیت خالص از نماتد *Meloidogyne javanica*: ریشه‌های آلوده به نماتد ریشه گرهی در سال ۱۳۹۳ از گلخانه گوجه فرنگی روستای مغان شهرستان کاشمر جمع آوری گردید. برای بدست آوردن یک جمعیت خالص از هر نمونه، ریشه‌های حاوی گره درون پتری حاوی آب مقطر قرار داده شد و زیر بینو کولر از هر نمونه یک کیسه تخم بزرگ که حاوی تخم بیشتری بود انتخاب گردید و این کیسه تخم با پنس به آرامی‌از ریشه جدا و هر توده تخم بطور جداگانه درون ویال حاوی آب مقطر قرار داده شد. توده ژلاتینی با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ درصد به مدت ۴۵ ثانیه از بین رفته و سوسپانسیون حاصل دو بار در ۲۸۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. تخم‌های حاصل با آب مقطر سترون شستشو و به گلخانه انتقال داده شدند (Hussey and Barker, 1973). با گذشت ۶۰ تا ۹۰ روز از مایه زنی نشاءهای گوجه فرنگی با سوسپانسیون تخم نماتد، ریشه آلوده گیاهان برای تشخیص و تکثیر مجدد نماتد آماده گردید. به منظور شناسایی نماتد ریشه گرهی محل گره‌ها در زیر بینو کولر، با کمک اسکالپل شکافته و نماتد موجود در زیر کیسه‌ی تخم به آرامی‌جدا گردید. پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ، توسط میکروسکوپ الیمپوس BH2، مشخصات مورفولوژیک و مورفومتریک بررسی و شناسایی گونه‌ی نماتد با استفاده از کلید جپسون (Jepson 1987) صورت پذیرفت.

تهیه جدایه‌های قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس: دو گونه قارچ تریکودرما شامل *Trichoderma harzianum* (T.BI) و *T. virens* (T.65) از کلکسیون بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت خالص تهیه و بر روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (Potato Dextrose Agar) کشت و نگهداری گردید. همچنین جدایه‌های *Bacillus subtilis* (Bs) و *B. subtilis* (MD) نیز از کلکسیون بخش بیماری شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت خالص تهیه شد. برای رشد باکتری از محیط آگار غذایی (Nutrient Agar) استفاده گردید.

تهیه مایه تلقیح قارچ: برای بررسی قابلیت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچ تریکودرما در شرایط آزمایشگاه، از کشت ۷ روزه قارچ، دو بلوک پنج میلی متری از هر یک از گونه‌های قارچی درفالکون‌های حاوی محیط مایع سیب زمینی-دکستروز-براث (Potato Dextrose Broth) قرار داده و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸°C لرزانده شدند. عصاره کشت قارچ در ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس از کاغذ صافی شماره یک واتمن عبور داده شد. جهت آزمایشات گلخانه‌ای سوسپانسیون اسپوری از هر یک از جدایه‌های قارچ با غلظت ۱×۱۰^{٦} اسپور در هر میلی لیتر تهیه گردید (Sahebani and Hadavi, 2008).

تهیه مایه تلقیح باکتری: قابلیت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاه، به روش لیان و همکاران (Lian *et al.*, 2007) با اندکی تغییر مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور کشت تازه باکتری در محیط مایع لوریا برتانی (LB) مایه زنی و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۰۰ دور در دقیقه در ۳۰°C لرزانده شد. سوسپانسیونی با غلظت $۱۰^{۸}$ سلول باکتری در هر میلی لیتر (cfu/ml) از هر جدایه باکتری تهیه و به منظور حذف سلول‌های باکتری، سانتریفیوژ در دو مرحله به مدت ۱۰ دقیقه در ٤۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت و بعد از هر بار سانتریفیوژ، مایع رویی از کاغذ صافی شماره یک واتمن عبور داده شد. جهت آزمایشات گلخانه ای، باکتری‌های جمع شده در ته فالکون در آب مقطر استریل سوسپانسیون گردیدند. غلظت مایه تلقیح باکتری نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به میزان $۱۰^{۸}$ cfu/ml تعیین گردید.

بررسی اثر تلفیقی قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس بر تفریخ تخم و مرگ و میر لارو نماتد: میزان مساوی از سوسپانسیون باکتریایی ($۱۰^{۸}$ cfu/ml) هر جدایه به علاوه عصاره کشت حاصل از هر یک از جدایه‌های قارچی (۱×۱۰^{٦} اسپور در هر میلی لیتر) در میکروتیوب‌های با حجم ۲ میلی لیتر به صورت ترکیبی و جداگانه همراه با تخم (تقریباً ۲۰۰ عدد) و یا لارو سن دوم (۱۰۰-۹۰ عدد) نماتد در دمای ۲۸°C در انکوباتور تیمار گردیدند. با گذشت ۲٤ ساعت از انکوباسیون، درصد مرگ و میر لاروها و بعد از ۱۲۰ ساعت درصد عدم تفریخ تخم مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. از محیط مایع بدون قارچ و باکتری به عنوان شاهد استفاده گردید.

بررسی اثر تلفیقی قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس روی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه: پس از تهیه غلظت‌های قارچ (۱×۱۰^{٦} اسپور در هر میلی لیتر) و باکتری ($۱۰^{۸}$ cfu/ml) مطابق مراحل قبل، ریشه‌های گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا در مرحله ۴ تا ۵ برگی به مدت ۳۰ دقیقه در تیمارهای تکی (TBI, T65, MD, Bs) و ترکیبی (T.BI+Bs، T.BI+MD، T.65+Bs و T.65+MD)، قبل از کاشت غوطه ور و سپس به گلدان‌های پلاستیکی حاوی یک کیلوگرم خاک استریل حاوی مخلوطی ازخاک زراعی و ماسه (۱:۱)، انتقال یافتند. علاوه بر آن میزان ۵۰ml از هر سوسپانسیون با غلظت‌های گفته شده نیز به خاک هر تیمار اضافه شد (Hashem and Abo-Elyousr, 2011). پس از گذشت یک هفته از انتقال نشاها به گلدان‌ها، در اطراف طوقه‌ی هر بوته سه سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر ایجاد و به هر گلدان ۲۰۰۰ عدد تخم نماتد اضافه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۸ تیمار و ٤ تکرار شامل : ۱-شاهد سالم (تنها خاک سترون)، ۲- شاهد آلوده (خاک + نماتد)، ۳- نماتد +T.BI، ۴- نماتد +T.65، ۵- نماتد +Bs، ۶- نماتد + MD، ۷- نماتد + Bs+T.BI، ۸- نماتد +MD+T.BI، ۹- نماتد +Bs+T.65، ۱۰- نماتد +MD+T.65، ۱۱-T.BI، ۱۲-T.65، ۱۳-Bs، ۱٤ - MD، ۱۵- T.BI + Bs، ۱۶- T.BI + MD، ۱۷- T.65 + Bs، ۱۸- T.65 +MD در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط دمایی ۲۵±۲° C اجراء گردید. قابلیت کنترل کنندگی جدایه‌های مورد استفاده در آزمایش پس از ٤۵ روز از زمان تلقیح نماتد، بر اساس شاخص‌های بیماریزایی شامل تعداد گال، تعداد توده تخم، تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه بررسی گردید.

شاخص گال به صورت ۰ تا ۵ (۰: بدون گال، ۱: ۲-۱ گال، ۲: ۱۰-۳ گال، ۳: ۳۰-۱۱ گال، ۴: ۱۰۰-۳۱ گال و ۵: بیش از ۱۰۰گال) ارزیابی شد (Taylor and sasser,1978). شمارش تعداد توده تخم با استفاده از روش هوسی و بارکر (Hussey and Barker, 1973) طبق آنچه قبلا گفته شد، انجام گرفت. همچنین برای تعیین تعداد لارو سن دوم، ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه در آزمون گلخانه به مدت ۴۸ ساعت هوا دهی شد وسپس تعداد لارو پس از پروسه استخراج، شمارش گردید (Whitehead and Hemmimg, 1965). علاوه بر ثبت شاخص‌های بیماریزایی، فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی شامل طول ریشه و ساقه، وزن تر ریشه و ساقه مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه گیری وزن خشک ریشه و ساقه، بافت مورد نظر برای ۷۲ ساعت در ۶۰°C نهاده شد و سپس وزن آن ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های بدست آمده در آزمون‌های سنجش زیستی و گلخانه‌ای توسط نرم افزار SPSS v.15 با استفاده از آزمون دانکن با درصد احتمال ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

نتیجه و بحث

سنجش زیستی اثر تلفیقی قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس در شرایط آزمایشگاه: نتایج بدست آمده از آزمون سنجش زیستی نشان داد که تمام تیمارها بر روی لاروهای نماتد اثر کشندگی داشته و اثر تمامی‌تیمارها در مرگ و میر لاروها بعد از ۲۴ ساعت یکسان بوده (۱۰۰ درصد) و از لحاظ آماری اختلاف معنی داری با یکدیگر در سطح احتمال ۵٪ ندارند (جدول ۱). در حالیکه در آزمون بررسی تفریخ تخم، بیشترین اثر گذاری در کاهش تفریخ تخم مربوط به تیمارهای T.65 + Bsو تیمار T.65 + MD (۹۹٪) می‌باشد.

عوامل آنتاگونیست با مکانیسم های مختلفی موجب محدودیت تکثیر و بیماریزایی عوامل بیماریزای گیاهی می‌شوند. به عنوان مثال قارچ *T. harzianum* با ایجاد رقابت، ویژگی‌های مایکوپارازیتیسمی و تولید آنزیم‌ها و ترکیبات سمی با عوامل بیماری‌زا مقابله می‌کند. این قارچ به طور اختصاصی در مقابل نماتدها با تولید ترکیبات ضد نماتدی و اثر مستقیم روی لاروهای سن ۲و تخم نماتد و همچنین با کاهش میزان جذب نماتدها توسط ریشه، نفوذ آنها را محدود کرده و علاوه بر این با القای مکانیسم دفاعی گیاه در مقابل حمله نماتد، موجب محدودیت بیماری‌زایی آن می‌گردد (Sharon *et al.*, 2001). گونه‌های مختلف باسیلوس آنتی بیوتیک‌ها سمی مختلفی علیه نماتدها مثل fengycin و zwittermycin (Liefert *et al.*, 1995) تولید می‌نمایند. گونه *B. megaterium* با تولید مواد فرار نماتدکش در کاهش جمعیت نماتد موثر است (Huang *et al.*, 2010). پروتئازهای مترشحه از *B. nematocida* نیز به عنوان فاکتور اصلی تجزیه کوتیکول نماتد پیشنهاد شده است (Niu *et al.*, 2007).

در بررسی حاضر، نتایج آزمون سنجش زیستی نشان دهنده کاهش تفریخ تخم و افزایش مرگ و میر لاروها به ویژه در تیمارهای تلفیقی دارد. در واقع پارازیتیسم مستقیم تخم و لارو از طریق افزایش در فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و پروتئاز می‌باشد. در پژوهشی که توسط صاحبانی و هادوی (Sahebani and Hadavi, 2008) صورت گرفت نتایج نشان داد که قارچ *T. harzianum BI* اثر مستقیم و غیر مستقیم روی تخم و لارو نماتد دارد. این موضوع به توانایی تریکودرما در تولید آنزیم‌های خارج سلولی مانند کیتیناز و پروتئاز مربوط می‌باشد. از طرفی آنتی بیوتیک‌های باکتریایی و دیگر ترکیبات سمی‌موجود در متابولیت‌های باکتریایی احتمالاً باعث بی تحرکی لاروهای سن دوم و تحلیل تدریجی دیواره تخم و لارو نماتد ریشه گرهی می‌گردند (Bokhari, 2009; Abo-Elyousr *et al.*, 2010).

استفاده از سوسپانسیون کشت سلولی *B. pumilus* و یا آنزیم‌های تولیدی از آن روی لارو سن دوم و تخم نماتد *M. arenaria* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شده است (Lee and Kim, 2016). نتایج آن‌ها نشان داد در دوز بالای

آنزیم (۰/۱۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر)، تجزیه نسبی پوسته تخم و دیواره لارو انجام می‌گیرد، و در گلخانه نیز تعداد توده تخم و گال به میزان قابل توجهی در تیمارهای باکتری نسبت به شاهد کاهش یافت.

اثر تلفیقی قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد و پارامترهای رشدی گیاه در شرایط گلخانه: نتایج حاصل از آزمون‌های گلخانه‌ای نشان دادند که بین تیمارهای آزمایشی در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۲). بر اساس نتایج، هر دو آنتاگونیست می‌توانند در کاهش شاخص‌های بیماریزایی نماتد *M. javanica* مؤثر باشند. تیمارهایی که به صورت تلفیق قارچ و باکتری در گلدان‌های آلوده به نماتد استفاده گردید، نسبت به کاربرد جداگانه هر کدام از عوامل بیوکنترل، کارایی بیشتری در کاهش فاکتورهای بیماریزایی نماتد مثل تعداد تخم، گال و جمعیت لارو در خاک، نشان دادند. کمترین میانگین تعداد گال، تعداد تخم و تعداد لارو به ترتیب مربوط به تیمارهای T.65+MD، T.65+Bs و T.BI+Bs است که نسبت به شاهد اختلاف معنی داری را نشان می‌دهند.

پتانسیل تولیدات زیستی تجاری با فرمولاسیون باکتریها و قارچهای مفید برای کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی آزمون می‌گردد. بررسی فرمولاسیون‌های حاوی *B. megaterium* و *T. album* و *T. harzianum* در کاهش فاکتورهای بیماریزایی نماتد *M. incognita* در شرایط گلخانه، حاکی از امکان ترکیب مواد مذکور در مدیریت تلفیقی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی می‌باشد (Radwan *et al*., 2012). هر چند بکارگیری انفرادی باکتری‌های غالب ریزوسفری شامل گونه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* در کنترل بیماری‌های نماتدی کاربرد فراوان دارد (Ashoub and Amara, 2010; Golzari *et al*., 2011; Ramezani-Moghaddam *et al*., 2013)، اکثر پژوهش‌های انجام گرفته در حیطه بیوکنترل نماتدها، دلالت بر اثر تقویتی کاربرد توام عوامل بیوکنترل دارند. به طور مثال استفاده از *B. subtilis* و *P. fluorescens* در ترکیب با هم در کاهش جمعیت نماتد *M. incognita* و بهبود پارامترهای رشد گیاه مؤثر است (Munshid *et al*., 2013). همچنین باکتری *P. fluorescens* در ترکیب با *T. viride* باعث کاهش جمعیت نماتد *M. incognita* می‌گردد (Muthulakshmi *et al*., 2010). استفاده از *Trichoderma koningii* و *B. megaterium* در کنترل جمعیت‌های *M. incognita*، *M. incognita* و *Fusarium oxysporum* در سیب زمینی نشان داده است که بکارگیری همزمان قارچ و باکتری می‌تواند بسیار کاراتر از فرمولاسیون‌های انفرادی عمل نماید (El-Shennawy *et al*., 2012). تلفیق عوامل قارچی و باکتریایی مورد مطالعه، در ارتقاء فاکتورهای رشدی گوجه فرنگی تأثیر معنی داری نداشتند (جدول ۳).

جدول ۱- اثر دو گونه از قارچ تریکودرما و دو جدایه از باکتری*B. subtilis* بر مرگ و میر لاروها و عدم تفریخ تخم نماتد به ترتیب بعد از ۲۴ و ۱۲۰ ساعت

Table 1- Effect of two *Trichoderma* species and two stains of *B. subtilis* on larvae mortality and egg hatch inhibition of nematode after 24 and 120 hour, respectively.

Egg hatch inhibiton after 120h (%)	Second stage juvenile mortality after 24h (%)	Treatment
63.5c	20b	Control
67.5c	100a	T.BI
96a	100a	T.65
85	100a	Bs
92.5ab	100a	MD
70.5b	100a	T.BI+Bs
72b	100a	T.BI+MD
99a	100a	T.65+Bs
99a	100a	T.65+MD

TBI :*T. harzianum*, T65: *T. virens*, MD: *B. subtilis*, Bs: *B. subtilis*

میانگین‌های که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ درصد می‌باشند.

Means in each column followed by the same letter are not significantly different at %5 probability level, using Duncan test.

جدول ۲- اثر دو گونه از قارچ تریکودرما و دو جدایه از باکتری*B. subtilis* بر شاخص‌های بیماریزایی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی*M. Javanica* بعد از ٤٥ روز در شرایط گلخانه

Table 2- Effect of two *Trichoderma* species and two stains of *B. subtilis* on pathogenicity indexes of root knot nematode *M. javanica* after 45 days under greenhouse conditions.

Second larvae number (100 gr soil)	Egg number (1 gr root)	Gall number (1 gr root)	Treatment
3525a	46250a	173a	Control
200c	30850b	168a	T.BI
1225bc	29350b	87bc	T.65
2870b	20900bc	101bc	Bs
125c	31575b	161ab	MD
150c	12900c	70c	T.BI+Bs
2675b	20425bc	81bc	T.BI+MD
1350bc	3850ab	63c	T.65+Bs
2175b	19675bc	56c	T.65+MD

TBI :*T. harzianum*, T65: *T. virens*, MD: *B. subtilis*, Bs: *B. subtilis*

میانگین‌های که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن فاقد تفاوت آماری معنی دار در سطح ۵٪ درصد می‌باشند.

Means in each column followed by the same letter are not significantly different at %5 probability level, using Duncan test.

جدول ۳- مقایسه میانگین فاکتورهای رشدی گوجه فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica* در تیمارهای مختلف قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس بعد از ٤٥ روز در شرایط گلخانه

Table 3- Median comparison of growth factors of infected tomato by *M. javanica* using different treatments of *Trichoderma* and *Bacillus* after 45 days under greenhouse conditions.

Root dry weight	Root wet weight	Shoot dry weight	Shoot wet weight	Root length	Shoot length	Treatments
0.171cde	2.51dcef	0.46ab	1.94ab	22.37cde	8.75bc	شاهد سالم
0.163def	2.36def	0.26c	1.35de	18.5de	8bc	شاهد آلوده
0.194cd	2.87cde	0.24cd	1.41cde	24.25cde	6.62bc	TBI+N
0.125def	1.93ef	0.22cde	1.22de	25.25cde	8.25bc	T65+N
0.226c	3.59c	0.38b	2.32ab	20.5de	9abc	Bs+N
0.158cdef	2.4cdef	0.27c	1.84bcd	18.75de	9.37ab	MD+N
0.106ef	2.11def	0.21cde	1.08e	19.5de	8.37bc	TBI+Bs+N
0.134def	2.07def	0.2cde	1.42cde	34.5bcd	8.12bc	TBI+MD+N
0.115def	1.37f	0.17cde	1.19cde	12.5e	9abc	T65+Bs+N
0.09f	1.2f	0.12e	1.09e	21.75cde	7.75bc	T65+MD+N
0.303b	4.95b	0.37b	1.53cde	59a	6.25bc	TBI
0.226c	3.35cd	0.15de	1.12e	47.25b	7.62bc	T65
0.127def	1.81ef	0.21cde	1.08e	40bc	6c	Bs
0.497a	6.46a	0.51a	2.35a	47b	11.75a	MD
0.154cdef	2.13def	0.2cde	0.83e	28.5bcd	6.37bc	TBI+Bs
0.361b	5.79b	0.4b	1.95ab	31.25bcd	7.37bc	TBI+MD
0.118def	2.34cdef	0.19cde	1.46cde	34.25bcd	8.75bc	T65+Bs
0.119def	2.19def	0.16de	0.86e	30.75bcd	6c	T65+MD

TBI :*T. harzianum*, T65: *T. virens*, MD: *B. subtilis*, Bs: *B. subtilis*

میانگین‌های که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند براساس آزمون دانکن فاقد تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ درصد می‌باشند.

Means in each column followed by the same letter are not significantly different at %5 probability level, using Duncan test.

در برخی موارد افزایش یک یا دو پارامتر در تیمار با جدایه‌های تکی یا ترکیبی دیده شده است. با این حال، کاربرد باکتری (MD) *B. subtilis*، بیشترین تأثیر را در افزایش فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی نسبت به سایر تیمارها و شاهد سالم نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد جدایه MD از گونه *B. subtilis* در بررسی حاضر، می‌تواند جهت تهیه کودهای رشدی، تحت مطالعات تکمیلی قرار گیرد.

باکتری *Bacillus* قادر به تولید طیف وسیعی از هورمون‌های افزایش دهنده رشد است (Singh and Siddiqui, 2010). به طور کلی گونه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* بیشترین قدرت حل فسفات معدنی را دارند (Abbasi *et al.*, 2011) و بدین وسیله باعث بهبود عملکرد محصول و جذب بهتر مواد مغذی برای گیاه میزبان می‌گردند (Kapilan and Thavaranjit, 2015). با توجه به نتایج بررسی حاضر، کاربرد همزمان (*T. virens*) T65 و (*B. subtilis*) MD، مرگ و میر لارو و عدم تفریخ تخم *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه را به ترتیب به میزان ۵ و ۱/۵ برابر در مقایسه با شاهد افزایش داد. در آزمون گلخانه نیز تیمار ترکیبی مذکور منجر به کاهش ۶۸، ۵۷/۵ و ۳۸/۳ درصدی به ترتیب در تعداد گال، تخم و لارو سن دوم نسبت به شاهد (نماتد) گردید. با توجه به داده‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، تیمار تلفیقی T.65+MD می‌تواند به عنوان کاندیدای کاهش شاخص‌های بیماریزایی نماتد ریشه گرهی در شرایط طبیعی پیشنهاد گردد. همچنین جدایه باکتریایی MD باعث افزایش ۳۴ و ۱۱۰ درصدی به ترتیب در طول ساقه و ریشه گوجه فرنگی نسبت به گیاه شاهد سالم گردیده است. بنابراین به نظر می‌رسد جدایه مذکور گزینه مناسبی جهت ارزیابی‌های تکمیلی در زمینه تولید تنظیم کننده‌های رشد و احتمال القاء مقاومت در گیاه باشد.

References

ABBASI, A. A. H. and R. SHARF, 2011. Antagonistic effects of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* on *Meloidogyne incognita* infecting *vigna mungo* L. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. 2: 55 - 63.

ABO-ELYOUSR, K. A., Z. KHAN, M. El-MORSI AWARD and M. F. ABEDEL-MONEIN, 2010. Evaluation of plant extracts and *Pseudomonas* spp. for control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematropica, 40:289-299.

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

BEHNAMIAN, M. and S. MASIHA, 2001. Tomato: with most emphasize on greenhouse tomato. Sotodeh Press.

BOKHARI F. M. 2009. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 42: 361-369.

DAMADZADEH, M. 2006. Nematology in agriculture. Andishe gostar, Esfehan.

El-SHENNAWY, M. Z., E. Z. KHALIFA, M. M. AMMAR, E. M. MOUSA and S. L. HAFEZ, 2012. Biological control of the disease complex on potato caused by root-knot nematode and Fusarium wilt fungus. Nematologia Mediterranea, 40: 169-172.

GARDENER, B. B. M. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Phytopathology, 94: 1252–125.

GOLZARI, H., M. PANJEKEH, M. AHMADZAEH, M. SALARI and A. SEDAGHAT, 2011. Study the role of fluorescent *Pseudomonas* bacteria metabolites root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomatoes in control. Iranian Journal of Plant Protection Science, 42(1): 113-124.

GOLZARI, H., M. PANJEKEH, M. AHMADZAEH, M. SALARI and E. SEDAGHTI-KHORAVI, 2011. Elucidating the parasitic capabilities of *Trichoderma* against *Meloidogyne javanica* on tomato. Plant

Disease, 1: 12-19.

HARMAN, G. E., C. R. HOWELL, A. VITERBO, I. CHET and M. LORITO, 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, 2: 43-56.

HASHEM, M. and K. A. ABO-ELYOUSR, 2011. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. Crop Protection, 30: 285-292.

HUANG, Y., C. K. Xu, L. MA, K. Q. Zhang, C. Q. DUAN and M. H. MO, 2010. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium*YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. European Journal of Plant Pathology, 126: 417–422.

HUSSEY, R. S. and K. R. BARKER, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.

JEPSON, S. B. 1987. Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). CAB International. United Kingdom. 265p.

JINDAPUNNAPAT, K., B. CHINNASRI and S. KWANKIAE, 2013. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne enterolobii)* in guava by the Fungus *Trichoderma harzianum*. Journal of Developments in Sustainable Agriculture, 8: 110-118.

KAPLAN, R. and A. C. THAVARANJIT, 2015. Promotion of vegetable seed germination by soil borne bacteria. Archives Applied Science Research, 7:17-20.

LEE, Y. S. and K. Y. KIM, 2016. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 against root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. Journal of Phytopathology. 164: 29-39.

LIAN, L. H., B. Y. TIAN, R. XIONG, M. Z. ZHU, J. XU and K. Q. ZHANG, 2007. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. Letters in Applied Microbiology, 45: 262-269.

LIEFERT, C., H. LI, S. CHIDBURE, S. HAMSON, S. SIGEE, H. S. EPTON and A. HARBOUR, 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* cl. 27 and *Bacillus pumilus* cl. 45. Journal of Applied Bacteriology, 78: 97-108.

MAJZOOB, S. H., A. KARGAR BIDEH, H. A. ZARGHANI, 2010. Effect of *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Bacillus subtilis* and *Pantoea* sp. in the control of *Meloidogyne javanica* on cucumber (Super Amelia and Royal). In: 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran 533. (In Persian with English summary).

MEYER, S. L. and D. P. ROBERTS, 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. Journal of Nematology, 34:1–8.

MIRAKI, K., M. ABDOLLAHI and F. TALLAYI, 2013. Effect of *Trichoderma virens* and *Glomus mosseae* in controlling root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 2: 9-16.

MOKHTARI, S., N. SAHEBANI and H. ETEBARIAN, 2014. Biological control of *Meloidogyne javanica* by two against antagonists *Trichoderma harzianum* BI and *Pseudomonas fluorescens* CHAO in tomato plant. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 3: 117-126.

MUNSHID, H., S. SIMON and A. A. LAL, 2013. Antagonistic potential of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* of green onion (*Allium fistulosum*). International Journal of Botany and Research, 3: 15-22.

MUTHULAKSHMI, M., K. DEVRAYAR and E. I. JONATHAN, 2010. Biocontrol of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofeid and White) Chitarod in mulberry. Journal of Bio pesticide, 3: 479-482.

NASERINASAB, F., N. SAHEBANI and H. R. ETEBARIAN, 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on Tomato. African Journal of Food Science, 5: 276 – 280.

NIU, Q., X. HUANG, L. ZHANG, L. LIAN, Y. LI, J. LI and K. ZHANG, 2007. Functional identification of the genebace16 from nematophagous bacterium *Bacillus nematocida*. Applied Microbiology and Biotechnology, 75: 141–148.

RADWAN, M. A., S. A. A. FARRAG, M. M. ABU-ELAMAYEM and N. S. AHMED, 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. Applied Soil Ecology 56: 58– 62.

RAMEZANI-MOGHADDAM, M., E. MAHDKHANI-MOGHADAM, S. BAGHAEE-RAVARI and H. ROUHANI, 2013. The nematicidal potential of local *Bacillus* species against the root-knot nematode infecting greenhouse tomatoes. Biocontrol Science and Technology, 24: 279-290.

RUIZ, S. E., A. J. CRISTOBAL, R. A. REYES, S. J. TUN, R. A. GARCIA and A. J. PACHECO, 2014. In vitro antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soils of the Yucatan Peninsula against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita.* Phyton, 83:45-47.

SAHEBANI, N. and N. HADAVI, 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry, 40: 2016-2020.

SHARON, E., M. BAR-EYAL, I. CHET, A. HERRERA-ESTRELLA, O. KLEIFELD and Y. SPIEGEL, 2001. Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 91: 687-693.

SIKORA, R. A. and E. FERNANDEZ, 2005. Nematode parasites of vegetables. In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Luc, M., Sikora. R. A. and Bridge, J. (Editors), 2nd edition, CABI Wallingford, UK.

SINGH, P. and Z. A. SIDDIQUI. 2010. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Bacillus* on tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43: 552-561.

TYLOR, A. L. and J. N. SASSER, 1978. Biology, identification and control of root-knot nematode, *Meloidogyne* species. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC. 111pp.

WHITEHEAD, A. G. and J. R. HEMMING, 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology, 55: 25-38.