مقاله پژوهشی DOI: 10.22034/ijon.2022.549312.1016

اثر باکتری‌های *Pseudomonas* و *Streptomyces* در کنترل نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne incognita*) در گوجه فرنگی تحت شرایط گلخانه

کیهان منظم[۱]، سالار جمالی[۲]✉ و مهسا علیمی[۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد ملکان، ملکان

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۳. شرکت بیوسم، مونترال، کانادا

✉ پست الکترونیکی مسئول مکاتبات: jamali@guilan.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۴ پذیرش علمی: ۱۴۰۱/۰۹/۱۵ انتشار در سامانه: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱

چکیده

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از دامنه میزبانی وسیعی برخوردار بوده و در بسیاری از محصولات کشاورزی ایجاد خسارت می‌کنند و گوجه‌فرنگی یکی از گیاهانی است که به واسطه این نماتدها دچار آلودگی شدید می‌شوند. در این تحقیق، فعالیت دو سویه *Pseudomonas fluorescens* و دو سویه *Streptomyces* sp. در برابر نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* در گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار برای هر مرحله، در شرایط گلخانه اجرا شد. در انتها بعد از ۶۰ روز، تعداد گال‌ها، توده تخم، جمعیت لارو سن دوم، وزن تر و خشک و میزان رشد طولی گیاه یادداشت‌برداری شد. نتایج نشان داد که در بین تیمارهای باکتری، بیشترین میزان کنترل با میانگین ۱۲۷ گال در ریشه، ۶۷ تخم در گرم ریشه و ۱۶ لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک در زمان قبل از کاشت، به *P. fluorescens* GU5 تعلق داشت. گیاهان تیمارشده با این سویه، از بیشترین وزن تر و خشک برخوردار بودند. *P. fluorescens* CHA0 در جایگاه دوم قرار گرفت. سویه‌های SH8 و SH20 *Streptomyces* به ترتیب اثرات کمتری در کنترل نشان دادند. با این‌که نماتدکش کادوزافوس (راگبی) بیشترین کاهش شاخص آلودگی به نماتد را با تعداد ۴۷ گال و ۲۸ توده تخم در ریشه موجب شد، ولی در صفات رشدی گیاه، بعد از سویه GU5 قرار گرفت. استفاده از هر یک از تیمارها در زمان قبل از کاشت، از بالاترین تأثیر در کنترل نماتد برخوردار بود. فاکتور تولیدمثل نیز در گیاهان تیمار شده با سویه‌های مختلف باکتری، به طور معنی‌داری از گیاهان شاهد آلوده کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، مهار زیستی، *Solanum lycopersicum*

Efficacy of *Pseudomonas* and *Streptomyces* strains on control of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato under greenhouse conditions

Keyhan Monazam [1], Salar Jamali [2]✉, Mahsa Alimi [3]

1. Islamic Azad University of Malekan, Malekan, Iran
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. BioSam Company, Montreal, Canada

✉ Corresponding author E-mail: jamali@guilan.ac.ir

Received: 2022/02/23 Revised: 2022/12/06 Accepted: 2022/12/12

Abstract

Root-knot nematodes *(Meloidogyne* spp.) have a wide host range and cause yield loss in many crops and tomato plants are one of the hosts that seriously damaged by the nematodes. In this study, the antagonistic activities of two strains of *Pseudomonas fluorescens* and two strains as *Streptomyces* sp. were evaluated against the root knot nematode (*M. incognita*) infecting tomato plants under greenhouse conditions. The experiment was conducted in a completely randomized design with five treatments and three replicates for each stage. After 60 days, at the harvest, numbers of galls, egg mass and second stage juveniles (J2), also fresh and dry weights and plant length were recorded. The results showed that amongst bacterial treatments, the highest control level with an average of 127 galls/root, 67 eggs/g root and 16 J2/100g soil belonged to *P. fluorescens* GU5 at before planting stage. The plants treated with this strain also had the highest fresh and dry weights. The *P. fluorescens* CHA0 treatment was ranked in the second place. Two *Streptomyces* strains, SH8 and SH20 performance showed less control effects, respectively. Although, application of the nematicide Cadusafos (Rugby) caused the highest efficacy in decreasing infection index (47 galls and 28 egg mass in root) compared with bacterial treatments, but its impact on plant growth traits was less than that of GU5 strain. Applying the treatments before the planting time showed the highest effect in the nematode control. The nematode reproduction factor in the plants treated with the two bacteria was significantly less than that of the controls.

Keywords: Antagonist, Biocontrol, *Solanum lycopersicum*

How to cite: Monazam, K., Jamali, S. & Alimi, Z. 2022. Efficacy of *Pseudomonas* and *Streptomyces* strains on control of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato under greenhouse conditions. Iranian Journal of Nematology 1(1), 118-127.

مقدمه

گوجه فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* یکی از محبوب‌ترین و مهم‌ترین سبزیجات در جهان است (Salim *et al.* 2020). تولید جهانی این محصول بیش از ۱۸۰ میلیون تن می باشد (Mata Nicolas *et al.* 2020). از چالش‌های فراروی تولید آن، خسارت توسط عوامل بیماری‌زای گیاهی است. یکی از نماتدهای مهم که ریشه گوجه‌فرنگی و بسیاری از سبزیجات دیگر را مورد حمله قرار می‌دهد، نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) است. با عنایت به خطرات زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه سموم و اهمیت سلامت غذایی که اخیراً هم مورد توجه بسیار قرار گرفته، کاربرد روش‌های جای‌گزین اهمیت می‌یابد. در بین روش‌های کنترل، مهار زیستی با امتیاز سازگار بودن با طبیعت، می تواند از جایگاه ویژه‌ای برخوردار شود. از طریق اعمال مهار زیستی در مدیریت تلفیقی، می‌توان با کاربرد کمتر سموم و ماندگاری پایین آنها در خاک، کمک شایانی به کاهش آلودگی‌های خاک کرد (Migunova & Sasanelli 2021). عوامل باکتریایی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی از جمله قارچ‌ها به کار گرفته شده اند (Alimi *et al.* 2012). تاکنون گونه‌های باکتری متعددی متعلق به جنس‌های *Agrobacterium*، *Arthrobacter*، *Azotobacter*، *Clostridium*، *Desulfovibrio*، *Serratia*، *Burkholderia*، *Azospirillum*، *Bacillus*، *Chromobacterium*، *Corynebacterium* و *Streptomyces* جهت مدیریت نماتدها معرفی شده‌اند (Khabbaz *et al.* 2019; Nimnoi & Ruanpanun 2020; Forghani & Hajihassani 2020; Migunova & Sasanelli 2021). این عوامل به روش‌های مختلفی نماتدها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. از جمله این روش‌ها می‌توان به پارازیته کردن نماتدهای ماده و لارو، تولید توکسین، آنتی بیوتیک و آنزیم اشاره کرد. توکسین‌های تولیدی به وسیله باکتری‌های فراریشه، سبب جلوگیری از تکثیر نماتد، تفریخ تخم، بقای لارو و هم‌چنین مرگ مستقیم نماتد می‌شوند (Tian *et al.* 2007). سرکوب نماتدهای انگل گیاهی توسط باکتری‌های ارتقاءدهنده رشد گیاهان، از طریق سازوکارهای مختلفی مانند افزایش رقابت مؤثر در جایگاه اکولوژیکی، ازدیاد در سطح گیاه، تولید نماتدکش و ترکیبات ضد میکروبی (آنتی‌بیوتیک‌ها، سموم، سیدروفورها و آنزیم‌های هیدرولیتیک) صورت می‌گیرد. باکتری‌ها و متابولیت‌های تولیدشده توسط آنها، هم روی گیاه تأثیرگذار است و هم روی جامعه میکروبی (Berg *et al.* 2017). کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به ویژه باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida*، *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* در کنترل عوامل بیماریزا و نماتدها به اثبات رسیده است (Meyer 2003; Siddiqui & Mahmood 1999). حضور *P. fluorescens* سبب تغییر الگوهای ترشحی ریشه و اثر روی مراحلی از زندگی نماتد که وابسته به این ترشحات است، خواهد شد. هم‌چنین با تولید متابولیت‌های ثانویه چون آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن و القای مقاومت، مانع حیات نماتدها شده و افزایش سلامتی گیاه را در پی دارد. باکتری *Pseudomonas chlororaphis* 06 برای کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه اثرات مطلوبی داشته است (Lee *et al.* 2011). نتایج به کارگیری فعالیت برخی جنس‌های باکتریایی روی گونه *M. incognita* نشان داد تمامی باکتری‌های مورد آزمایش در کنترل نماتد مؤثر بوده و بیووارهای *Bacillus thuringiensis*، *P. fluorescens* و *Rhizobium leguminosarum* در مدت ۷۲ ساعت توانستند به طور کامل جمعیت نماتد را مهار کنند (Ashoub & Amara 2010). در آزمایش گلخانه‌ای که اثر دو سویه PRS9 و GRP3باکتری *P fluorescens* به همراه کود آلی و معدنی بررسی شد، باکتری توانست علاوه بر کنترل *M. incognita*، در بهبود رشد گوجه‌فرنگی نیز تاثیر گذار باشد (Singh & Siddiqui 2010).

اکتینومیست‌های اطراف ریشه گیاهان از خود ترکیبات فعالی تولید می‌کنند که حدود ۷۵ درصد از ترکیبات فعال بیولوژیکی را شامل می‌شود (Suzuki *et al.* 2000). گونه‌های مختلف *Streptomyces* یکی از اعضای مهم این گروه هستند که از توانایی بالایی در کنترل نماتدهای انگل گیاهی برخوردارند (Samac & Kindel 2001; Sun *et al.* 2006). بررسی تأثیر متابولیت‌های ثانویه تولیدشده توسط ایزوله *Streptomyces* sp. CMU-MH021 در شرایط آزمایشگاهی نشان داد پایین‌ترین غلظت که توانست از تفریخ تخم *M. incognita* جلوگیری کند، ۳۰ µg/ml بود. غلظت ۱۲۰µg/ml باعث مرگ‌ومیر لاروهای جوان سن دوم شد (Ruanpanun *et al.* 2011). در بررسی قابلیت نماتدکشی استرین *Streptomyces antibioticus* M7، در شرایط گلخانه مشخص شد که استرین مورد نظر نه تنها باعث کاهش ۵۰ تا ۶۲ درصدی گال ریشه و ۵۳ تا ۷۶ درصدی توده تخم *M. incognita* شده بلکه سبب ارتقای شاخص‌های رشدی گیاه نیز گردیده است (Sharma *et al.* 2019). اخیراً اکتینومیست جداشده از گلسنگ (*Agromyces allii*

(130935، توانسته است در مقابل لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita*، بازدارندگی نشان دهد (Cao *et al.* 2021). با توجه به تاثیر سوء کنترل شیمیایی روی محیط زیست و سلامت انسان و با در نظر گرفتن این نکته که مهار زیستی می‌تواند به عنوان بخشی از مدیریت تلفیقی نماتدها و در راستای تحقق کشاورزی پایدار به کار گرفته شود، در این پژوهش، تأثیر دو سویه *P. fluorescens* و دو سویه *Streptomyces* sp. در مقایسه با نماتدکش کادوزافوس جهت کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی *M. incognita* در شرایط گلخانه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نماتد

ابتدا نمونه‌های آلوده به نماتد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. کشت انبوه و خالص نماتد از طریق تک کیسه تخم (single egg mass) فراهم شد. نشاءهای رقم ارلی اوربانا در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی نسبت مساوی از خاک مزرعه، ماسه و کود سترون شده با دستگاه اتوکلاو پرورش یافت. سوسپانسیون تخم به طور جداگانه، توسط پیپت به داخل حفره‌هایی به عمق سه تا پنج سانتی‌متر در مجاورت نشاء گوجه‌فرنگی (در مرحله ۲ تا ۴ برگ حقیقی) مایه‌زنی گردید. گلدان‌ها در دمای ۳ ± ۲۵ درجه سلسیوس درگلخانه نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۶۰ روز جمعیت خالص نماتد تکثیر و تا حصول جمعیت مورد نظر، تکثیر به طور متوالی انجام شد (Hussey & Barker 1973).

با توجه به اهمیت نقوش کوتیکولی انتهای بدن نماتدهای ماده (Perineal pattern) در تشخیص نماتد ریشه گرهی، برش انتهایی از این بخش تهیه و با استفاده از کلید معتبر اقدام به شناسایی گونه گردید (Jepson 1987).

تهیه باکتری

دو سویه باکتری *P. fluorescens* CHA0 و *P. fluorescens* GU5 از گروه گیاهپزشکی دانشگاه گیلان و دو سویه SH8 و SH20 از *Streptomyces* sp. از پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری تهیه گردید. باکتری‌ها در محیط کشت Nutrient Agar (NA) کشت و تکثیر شدند. به منظور تهیه مایه تلقیح جدایه‌ها، از روش تمپسون (Thompson 1996) استفاده شد. باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سلسیوس روی به‌همزن گردان با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. سپس به کمک سانتریفیوژ با ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، سلول‌های باکتری از محیط کشت مایع جدا شده و در انتها با آب مقطر استریل شستشو و با استفاده از محلول بافر یک مولار MgSo4.7H2O سوسپانسیون غلیظی از باکتری تهیه شد. جهت انجام آزمون، OD (تعداد کلنی در واحد حجم بر حسب cfu/ml در طول موج ۶۰۰ نانومتر) مشخصی برای باکتری تعیین گردید. بدین منظور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، غلظت باکتری *P. fluorescens*، در طول موج ۶۰۰ نانومتر، OD ۰/۱۲ ($۱۰^۷$-$۱۰^۹$ سلول در میلی‌لیتر) انتخاب شد. از آنجایی که *Streptomyces* sp. اسپور تولید می‌کند، با شمارش اسپورها با استفاده از لام گلبول شمار، رقت $۱۰^۶$ اسپور برای انجام آزمایش در نظر گرفته شد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

ابتدا خاک استریل (به نسبت ۱:۱:۲ خاک، ماسه و خاک-برگ) به درون گلدان‌هایی با اندازه دهانه ۱۴ و ارتفاع ۱۱سانتی‌متر منتقل شد. در هر گلدان، دو بذر گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا کاشته شد که بعد از جوانه‌زنی و ظهور برگ اصلی، بوته ضعیف‌تر با اسکالپل استریل حذف گردید. تعداد ۲۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتد در داخل چاهک‌هایی به عمق سه تا پنج سانتی‌متری خاک، مایه‌زنی شد. در مرحله اول آزمون، تیمارها شامل مایه‌زنی باکتری با دو سویه *P. fluorescens* با غلظت $۱۰^۹$ سلول در میلی‌لیتر و دو سویه *Streptomyces* با غلظت $۱۰^۶$ اسپور بودند. در تیمار نماتدکش، گرانول ۱۰ درصد نماتدکش کادوزافوس (با نام تجاری راگبی) به میزان توصیه شده پنج گرم با خاک مخلوط گردید. در مرحله بعدی آزمون، اعمال تیمارها در پنج زمان صورت گرفت: ۱- قبل از کاشت: تیمارها ۴۸ ساعت قبل از کاشته شدن بذر به گلدان حاوی نماتد، اضافه گردیدند. ۲- همراه با بذر در زمان کاشت: تیمارها در هنگام کاشتن بذر به گلدان حاوی نماتد اضافه شدند. ۳- در زمان گیاهچه: وقتی که بوته‌های گوجه‌فرنگی در مرحله سه تا پنج برگ حقیقی بودند، تیمارها به گلدان حاوی نماتد اضافه شدند. ۴- در زمان گل‌دهی: وقتی که گل در ۴۰ درصد از بوته‌ها ظاهر شد، تیمارها به گلدان اضافه گردیدند. ۵- در همه مراحل: در این بخش همه تیمارها با هم در هر یک از مراحل اعم از زمان‌های قبل از کاشت، همراه با بذر در موقع کاشت، در زمان گیاهچه و در زمان گل‌دهی، به صورت توأمان به گلدان‌ها افزوده شدند. برای هر تیمار، شاهد آلوده و شاهد سالم نیز در نظر گرفته شد. برای هر

زمان، سه تکرار اختصاص یافت. گلدان‌ها در دمای ۳ ± ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط گلخانه نگه‌داری و بعد از گذشت ۷۵ روز از کاشت بذور و ۱۰ روز از آخرین مرحله تلقیح، گیاهان داخل گلدان‌ها برداشت شدند. شاخص‌های آلودگی به نماتد شامل تعداد گال، تعداد توده تخم در یک گرم ریشه و تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک و شاخص‌های رویشی گیاه از قبیل میزان رشد، وزن تر و خشک بوته بررسی شدند. از حاصل جمع طول ریشه (نوک ریشه تا محل یقه) و طول ساقه (محل یقه تا انتهای نوک ساقه) میزان رشد گیاه محاسبه گردید. پس از خارج کردن بوته‌ها از گلدان، وزن تر آنها توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردید. سپس به مدت ۴۸ ساعت درون آون با دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و وزن خشک آنها محاسبه شد.

به منظور شمارش نماتدهای داخل بافت ریشه، یک گرم ریشه به کمک محلول اسید فوشین ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی و با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفته و جمعیت نهایی در کل ریشه ثبت شد (Hussey & Janssen 2002). به منظور تعیین تعداد لاروهای سن دوم نماتد موجود در ۱۰۰ گرم خاک، نماتدها با استفاده از روش سینی (Whitehead & Hemming 1965) استخراج و شمارش شدند. جمعیت نهایی نماتد، از طریق جمع نمودن تعداد نماتد در خاک و ریشه مشخص گردید و فاکتور تولیدمثل، با تقسیم عدد حاصل بر جمعیت اولیه نماتد محاسبه شد (Taylor & Sasser 1978).

محاسبات آماری

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار برای هر مرحله در شرایط گلخانه به مرحله اجرا درآمد. داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج

تشخیص گونه

با بررسی نقوش کوتیکولی ناحیه‌ی انتهای بدن نماتد ماده (Perineal pattern)، گونه مورد مطالعه *Meloidogyne incognita* تشخیص داده شد (Jepson 1987).

تأثیر تیمارهای باکتری

تجزیه و تحلیل آماری شاخص‌های آلودگی نسبت به نماتد و صفات رشدی گیاه نشان داد که اثرات تیمارهای به کار برده‌شده، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P\leq 0.05$) (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها حاکی از آن بود که در تعداد گال و تعداد توده تخم در ریشه، بیشترین تأثیر متعلق به کاربرد نماتدکش کادوزافوس بود (به ترتیب ۴۷ و ۲۸). در بین تیمارهای باکتریایی، *P. fluorescens* GU5 به ترتیب با مقادیر ۱۲۷ گال و ۶۷ کیسه تخم در ریشه بیشترین تأثیر را بروز داد (جدول ۱). اما بقیه تیمارها در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در شاخص تعداد لارو سن دوم در خاک، روند تغییرات مشابه بود با این تفاوت که بین سویه‌های مختلف باکتری، به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). فاکتور تولیدمثل در گیاهان تیمارشده با سویه‌های مختلف باکتری، به طور معنی‌داری از گیاهان شاهد آلوده کمتر بود. با وجود این‌که بین سویه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، اما کمترین میزان (۰/۴۱) بعد از نماتدکش، مربوط به سویه *P. fluorescens* GU5 بود (جدول ۱).

در مورد صفات رشدی گیاه، بیشترین رشد طولی (۹۶/۳ سانتی‌متر) متعلق به تیمار سویه *P. fluorescens* GU5 بود ($P\leq 0.05$). سویه دیگر همین باکتری نیز بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به نماتدکش (۸۴/۶ سانتی‌متر)، در رتبه بعدی قرار گرفت. گیاهان در خاک دارای دو سویه باکتری *Streptomyces* مشابه با تیمار نماتدکش عمل نموده و نسبت به شاهد، دارای رشد بیشتری بودند. میانگین شاخص‌های وزن تر و خشک، با وجود تفاوت در تیمارها، از روند مشابهی برخوردار بوده و بیشترین مقادیر در سویه *P. fluorescens* GU5 (۴۸/۷ و ۵/۹ گرم) و نماتدکش (۴۶/۶ و ۵/۷ گرم) و کمترین مقادیر وزن تر در سویه *Streptomyces* sp. SH8 با ۳۰/۱ و وزن خشک در سویه *Streptomyces* sp. SH20 با ۳/۸ گرم، بدون اختلاف معنی‌دار با *P. fluorescens* CHA0 به ثبت رسید (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین تأثیر باکتری‌ها در شاخص‌های آلودگی به *M. incognita* و صفات رشدی گیاهان گوجه فرنگی

Table 1. The mean comparison of bacterial effects on *M. incognita* indices and growth traits of tomato plants

Treatment	Number of galls/root	Number of egg mass/g root	Number of J2s/100g soil	Reproduction factor (RF)	Shoot & root length (cm)	Shoot & root fresh weight (g)	Shoot & root dry weight (g)
***Pseudomonas fluorescens* GU5**	127b*	67b	16b	0.41a	96.3a	48.7a	5.9a
***Pseudomonas fluorescens* CHA0**	149c	87c	15b	0.51a	84.6bc	32.5b	4.2b
***Streptomyces* sp. SH8**	154c	95c	18b	0.56a	78.1c	30.1b	4.1b
***Streptomyces* sp. SH20**	167c	99c	20b	0.59a	77.9c	31.2b	3.8b
Rugby	47a	28a	5a	0.16a	80.1c	46.6a	5.7a
Control- nematode	298d	110d	1210c	6.6b	48.9d	25.1c	2.8c

* ستون‌های دارای حروف مشترک، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می باشند.

*Columns with similar letters are not significantly different at 5% level.

تأثیر زمان‌های مصرف

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که زمان‌های مصرف دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند ($P\leq 0.05$) (جدول ۲). مصرف باکتری‌ها در خاک، در تمام مراحل (قبل از کاشت، زمان کاشت، گیاهچه و گلدهی)، تعداد گال در ریشه (۸۹)، تعداد توده تخم در گرم ریشه (۴۹)، تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک (۱۲) را در مقایسه با مصرف انفرادی آنها در یک زمان، به طور معنی‌داری کاهش داد. به طور کلی، تأثیر مصرف تیمارها در مرحله قبل از کاشت، از بقیه مراحل به صورت انفرادی بیشتر بود. اختلاف معنی-دار بین زمان کاشت و قبل از کاشت، در شاخص تعداد توده تخم در گرم ریشه (۸۰) ملاحظه گردید. این تفاوت بین کاربرد تیمارها در زمان کاشت و زمان‌های گیاهچه و گلدهی نیز به طور معنی‌داری قابل رویت بود (جدول ۲). صفات رشدی (طول رشد، وزن تر و خشک گیاهچه) در زمان‌های قبل از کاشت و در زمان کاشت مشابه بوده، هر چند مقادیر عددی (به ترتیب ۸۴/۷ سانتی‌متر، ۴۸/۸ و ۴/۸ گرم)، در زمان قبل از کاشت بیشتر بود. از سوی دیگر، با وجود عدم اختلاف معنی‌دار صفات مورد اشاره در زمان‌های گیاهچه و گلدهی، مقدار آن‌ها در زمان گیاهچه (به ترتیب ۸۰/۱ سانتی‌متر، ۳۹/۵ و ۴/۴ گرم) اندکی بالاتر از زمان گلدهی بود. در تمامی موارد، شاهد آلوده و بدون آلودگی با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان دادند (جدول ۲).

بحث

در مطالعه انجام شده، کاربرد چهار سویه باکتری متعلق به دو جنس *Pseudomonas* و *Streptomyces* در زمان‌های مختلف نشان داد که همه تیمارها قادر به کاهش شاخص‌های آلودگی نماتد و بهبود شرایط رشدی گوجه‌فرنگی در مقایسه با گیاهان شاهد بودند. تحقیقات مشابه انجام شده، تأییدکننده این مدعا می‌باشند (Rafiei & Khodakaramian 2016; Forghani & Hajihassani 2020). در نتایج تحقیقی، باکتری *P. fluorescens* دارای اثرات مطلوبی در کاهش تعداد گال و توده تخم نماتد *M. incognita* بوده است (Moslehi *et al.* 2021). سویه *P. fluorescens* CHA0 در ترکیب با اسید سالسیلیک توانست با تأثیرگذاری بر بیان ژن *PR1*، سبب کاهش شاخص‌های آلودگی *M. javanica* و بهبود رشد بوته‌های گوجه‌فرنگی شود (Dehghanian *et al.* 2020)

جدول ۲. مقایسه میانگین تأثیر زمان‌های مصرف باکتری‌های *Pseudomonas* و *Streptomyces* در شاخص‌های آلودگی به *M. incognita* و صفات رشدی گیاهان گوجه فرنگی

Table 2. The mean comparison of *Pseudomonas* and *Streptomyces* application times on *M. incognita* indices and growth traits of tomato plants

Application time	Number of galls/root	Number of egg mass/g root	Number of J2s/100g soil	Shoot & root length (cm)	Shoot & root fresh weight (g)	Shoot & root dry weight (g)
Before planting	114c*	64c	17c	84.7bc	48.8a	4.8a
At planting time	127c	80d	16c	83.9bc	46.2a	4.7a
Seedling stage	156d	84d	17c	80.1cd	39.5b	4.4bc
Flowering stage	180e	114e	21d	77.7cd	38.2b	4.3bc
At all stages	89b	49b	12b	91.2b	32.9c	3.9c
Control-nematode	204f	131f	28e	74.8d	26.2d	2.2d
Control-without nematode	0a	0a	0a	89.1a	47.4a	4.7a

* میانگین‌های دارای حروف مشترک، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می باشند.

*Values means followed by the same letter are not significantly different at 5%.

در بررسی حاضر، بیشترین درصد تأثیرگذاری تیمارها روی کاهش شاخص‌های آلودگی، متعلق به سویه *P. fluorescens* GU5 بود. این سویه از استان گیلان جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفته است. تنها در شاخص تعداد لارو سن دوم، علی‌رغم مقادیر بیشتر، اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها مشاهده نگردید. فاکتور تولیدمثل که در نماتدشناسی به عنوان شاخصی جهت تعین مناسب بودن میزبان نماتد مورد استفاده قرار می گیرد (López-Gómez & Verdejo-Lucas 2017)، در تمامی تیمارها به زیر عدد یک تنزل یافته و نشان دهنده کاهش نسبی جمعیت نماتد بوده است. اثربخشی جدایه‌های منطقه‌ای و بومی، نکته‌ای است که در نتایج سایر محققین هم به چشم می خورد (Cao *et al.* 2021; Su *et al.* 2017; Sharma *et al.* 2019). نکته قابل توجه، بهبود شاخص‌های رشدی گیاه در حالت کاربرد سویه مذکور در مقایسه با تیمار نماتدکش و عدم اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها است. این مطلب مؤید تأثیر مثبت باکتری‌های ارتقاءدهنده رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) می‌باشد. یافته‌ای که در سایر مطالعات هم قابل استنباط است (Moazezikho *et al.* 2020; Dehghanian *et al.* 2020). سویه *P. fluorescens* CHA0 در شاخص تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک با سویه *P. fluorescens* GU5 اختلاف معنی‌دار نداشت. به طریق مشابه، اثر تلفیقی قارچ *Metarhizium anisopliae* و باکتری *P. fluorescens* CHA0 روی نماتد ریشه گرهی *M. incognita* در گوجه‌فرنگی، ضمن بهبود شاخص‌های رشدی گیاه، سبب کاهش قابل توجه ویژگی‌های آلودگی نماتد نظیر تعداد گال و توده تخم نیز شده است (Jahanbazian *et al.* 2015).

دو سویه *Streptomyces* نیز بعد از *Pseudomonas*، دارای اثرات کنترل‌کنندگی نماتد و افزایش رشد گیاه بودند. کاربرد استرین M7 گونه *Streptomyces antibioticus* نه تنها منجر به

کاهش گال ریشه و توده تخم در گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به *M. incognita* شده بلکه روی طول، وزن تر و خشک بوته‌های گوجه-فرنگی نیز در شرایط گلخانه، اثرات مثبت داشته است (Sharma *et al.* 2019). تلقیح هم‌زمان دو استرین *Streptomyces* به نام‌های KPS-E004 و KPS-A032 منجر به افزایش طول، وزن ریشه و طول ساقه فلفل در آلودگی به *M. incognita* گردیده و کارآیی کنترل نماتد را به میزان قابل‌توجهی افزایش داده است (Nimnoi & Ruanpanun 2020).

در خصوص زمان‌های مصرف، کاربرد سویه‌های باکتری در همه مراحل رشد گیاه به صورت توأم در مقایسه با تیمارهای قبل از کاشت، زمان کاشت، زمان گیاه‌چه و زمان گلدهی، بهترین اثربخشی را در کاهش آلودگی به *M. incognita* و صفات رشدی گیاه دارا بود. این نکته حکایت از نقش استمرار عامل مهار زیستی در کنترل موفق نماتد دارد. حضور گسترده و تقویت جمعیت این عامل، باعث تقلیل جمعیت عامل خسارت‌زا و تقلیل خسارت وارده به گیاه میزبان خواهد شد (Alizadeh *et al.* 2020). البته امکان عملی نمودن این روش با توجه به محدودیت‌ها، نکته‌ای است که باید مدنظر قرار گیرد. با این‌حال، هر چه دفعات کاربرد بیشتر باشد، به همان نسبت پایداری عامل در محیط بیشتر و درصد کنترل افزایش خواهد یافت. اختلاف بین زمان‌ها در مورد صفات رشدی، به مراتب کمتر از شاخص‌های آلودگی نماتد بود. به نحوی‌که قبل از کاشت و زمان کاشت و هم‌چنین مرحله گیاهچه و گلدهی علی‌رغم وجود اختلاف، با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نشان ندادند. به صورت نسبی، هرچه زمان ورود باکتری به سامانه حضور بیمارگر (پاتوسیستم) سریع‌تر صورت گرفت، عامل مهارکننده نیز در کنترل موفق‌تر ظاهر شد. کاربرد به‌هنگام عوامل بازدارنده نماتد ریشه گرهی، از نتایج مطلوبی در کنترل آن برخوردار خواهد بود. از سازوکارهای دخیل در کنترل نماتدها توسط باکتری‌ها، می توان به تولید ترکیبات فنی جهت بهبود مقاومت، تولید مواد سمی نماتدکش، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره کرد (Forghani & Hajihassani 2020).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد سویه‌های مورد استفاده باکتری *P. fluorescens* CHA0 و *P. fluorescens* GU5 توانستند میزان آلودگی *M. incognita* در گیاه گوجه‌فرنگی را کاهش و صفات مرتبط با رشد گیاه را ارتقاء دهند. بهترین تأثیر در استفاده از باکتری *P. fluorescens* GU5 مشاهده شد. این سویه باعث ارتقای صفات رشدی گیاه، حتی فراتر از کاربرد نماتدکش کادوزافوس گردیده و از این حیث می تواند قابل توجه باشد. سویه *P. fluorescens* CHAO، SH8 و *Streptomyces* SH20 به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در کل، اثرات باکتری *Pseudomonas* بیشتر از *Streptomyces* بود و سویه بومی منطقه عملکرد به مراتب بهتری از خود نشان داد. مصرف زودهنگام به دلیل استقرار بهتر عامل کنترل‌کننده، از برتری نسبی در مقایسه با کاربرد آن در سایر مراحل برخوردار بود. رویکرد مبتنی بر استفاده از باکتری‌ها درکنترل زیستی امیدوارکننده به نظر می‌رسد، زیرا به کاهش میزان استفاده از مواد شیمیایی و تثبیت تغییرات اکولوژیکی کمک می‌کند (Migunova & Sasanelli 2021).

تضاد منافع

نویسندگان با یکدیگر، با تحقیق انجام شده و محل انجام پژوهش تضاد منافعی ندارند.

سپاس‌گزاری

نگارندگان مراتب تشکر خود را از دانشگاه گیلان، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر و شرکت بیوسم مونترال به جهت حمایت‌های انجام شده در طول تحقیق، اعلام می‌دارند.

References

Alimi M., Soleimani M.J. & Taghinasab Darzi M. 2012. Characterization and application of microbial antagonists for control of Fusarium head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* using single and mixture strain of antagonistic bacteria on resistance and susceptible cultivars. *African Journal of Microbiology Research* 6 (2), 326–334.

Alizadeh M., Vasebi Y. & Safaie N. 2020. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. *Open Agriculture* 5 (1), 404-440.

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

Berg G., Koberl M., Rybakova D., Muller H., Grosch R. & Smalla K. 2017. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology* 93(5). https://doi.org/10.1093/femsec/fix050

Cao X., Zhang R., Meng Sh., Ren Q., Mo M. & Liu Y. 2021. Biocontrol potential of *Agromyces allii* 130935 and its metabolites against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Rhizosphere*, https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100378

Dehghanian S.Z., Abdollahi M., Charehgani H. & Niazi A. 2020. Combined of salicylic acid and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on the expression of PR1 gene and control of *Meloidogyne javanica* in tomato. *Biological Control* 141,104134. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol. 2019.104134

Forghani F. & Hajihassani A. 2020. Recent advances in the development of environmentally benign treatments to control root-knot nematodes. *Frontiers in Plant Science* 11, 1125. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01125

Hussey R.S. & Barker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 5 (12), 1025-1028.

Hussey R.S. & Janssen G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In Starr J.L. Cook R. & Bridge J. (Eds.), *Plant resistance to parasitic nematodes* (pp. 43–70). Wallingford, UK, CAB International.

Jahanbazian L., Abdollahi M. & Rezaie R. 2015. Combined effect of *Metarhizium anisopliae* and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato. *Journal of Iranian Plant Pathology* 51 (3), 339-355.

Jepson S.B. 1987. *Identification of root-knot nematodes*. Wallingford, UK, CAB International.

Khabbaz S.E., Ladhalakshmi D., Babu M., Kandan A., Ramamoorthy V., Saravanakumar D., … Kandasamy S. 2019. Plant growth promoting bacteria (PGPB)- a versatile tool for plant health management. *Canadian Journal of Pesticides & Pest Management* 1 (1), 1–25.

Lee J.H., Ma K.C., Ko S.J., Kang B.R., Kim I.S. & Kim Y.C. 2011. Nematicidal activity of a nonpathogenic biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Journal of Nematology* 62 (3), 746-751.

López-Gómez M. & Verdejo-Lucas S. 2017. Penetration and post-infection development of root-knot nematodes in watermelon. *Spanish Journal of Agricultural Research* 15 (4), 49042971, https://doi.org/10.5424/sjar/2017154-11189

Mata-Nicolás E., Montero-Pau J., Gimeno-Paez E., Garcia-Carpintero V., Ziarsolo P., Menda N., …Van der Knaap E. 2020. Exploiting the diversity of tomato: The development of a phenotypically and genetically detailed germplasm collection. *Horticulture Research* 7, https://doi.org/10.1038/s41438-020-0291-7

Meyer S.L.F. 2003. United states department of agriculture research service programs on microbes for management of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science* 59, 665-670.

Migunova V.D. & Sasanelli N. 2021. Bacteria as biocontrol tool against phytoparasitic nematodes. *Plants* 10 (2), 389. https://doi.org/10.3390/plants1002.0389

Moazezikho A., Charehgani H., Abdollahi M. & Rezaei R. 2020. Evidence for inhibitory effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and aqueous extracts of *Datura stramonium* and *Myrtus communis* on tomato plants infected with *Meloidogyne javanica* (Tylenchida: Heteroderidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30, 15. https://doi.org/10.1186/s41938-020-02170

Moens M., Perry R.N. & Starr J.L. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In Perry R.N., Moens M. & Starr J.L. (Ed.) *Root-knot nematodes* (pp. 1-17). Wallingford, CABI Publishing.

Moslehi Sh., Pourmehr S., Shirzad A. & Khakvar R. 2021. Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31(1). https://doi.org/10.1186/s41938-021-00396-4.

Naserinasab F., Sahebani N. & 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.

Nimnoi P. & Ruanpanun P. 2020. Suppression of root-knot nematode and plant growth promotion of chili (*Capsicum flutescens* L.) using co-inoculation of *Streptomyces* spp. *Biological Control* 145, 104244. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104244.

Rafiei S. & Khodakaramian Gh. 2016. Isolation and identification of cucumber rhizospheric fluorescent pseudomonads and evaluation of their antagonistic potential as biocontrol agents. *Journal of Biocontrol in Plant Protection* 3 (2), 59-75.

Ruanpanun P., Laatsch H., Tangchitsomkid N. & Lumyong S. 2011. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27(6), 1373-1380.

Salim M.M.R., Rashid M.H., Hossain M.M. & Zakaria M. 2020. Morphological characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 19 (3), 233-240.

Samac D.A. & Kindel L. 2001. Suppression of the root lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant Soil* 235, 35-44.

Sharma M., Jasrotia S., Ohri, P. & Manhas R.K. 2019. Nematicidal potential of *Streptomyces antibioticus* strain M7 against *Meloidogyne incognita*. *AMB Express* 9 (1), 168. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0894-2.

Siddiqui Z.A. & Mahmood. I. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology* 69 (2), 167-179.

Singh P. & Siddiqui Z.A. 2010. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Pseudomonas* on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43(14), 1423-1434.

Su L., Shen Z., Ruan Y., Tao C., Chao Y., Li R. & Shen Q. 2017. Isolation of antagonistic endophytes from banana roots against *Meloidogyne javanica* and their effects on soil nematode community. *Frontiers in Microbiology* 8: 2070. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02070

Sun M.H., Gao L., Shi Y.X., Li B.J. & Liu X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology* 93(1), 22-28.

Suzuki S., Yamomoto K., Okuda T., Nishio M., Nakanishi N. & Komatsubara S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. *Actinomycetology* 14, 27-33.

Taylor A.L. & Sasser J.N. 1978. *Biology, identification, and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. Raleigh, NC, North Carolina State University Graphics.

Thompson D.C. 1996. Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms in Kentucky bluegrass. *Plant Disease* 80, 850-862.

Tian B., Yang J. & Zhang K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology* 61(2), 197-213. https://doi.org/ 10.1111/j.1574-6941.2007. 00349.x

Whitehead A.G. & Hemming J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology* 55(1), 25-38.