مقاله پژوهشی DOI: 10.22034/ijon.2025.2021838.1032

بررسی اثرات دو گونه باکتری *Bacillus* و پودر خشک زرشک قرمز و نعناع فلفلی بر بیماری‌زایی و خسارت نماتد ریشه‌گرهی در خیار

علی اکبر فدایی تهرانی✉، نجمه کریمیان، فاطمه یوسفی کوپایی
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
✉پست الکترونیکی مسئول مکاتبات: ma_fadaei@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۰ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۸/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۰۴

چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) از عوامل بیماری‌زای مهم خیار هستند. هرچند استفاده از ترکیبات شیمیایی روش مؤثری برای کنترل این نماتدها محسوب می‌شوند، ولی موجب تحمیل هزینه‌های بالا به تولیدکنندگان و خسارات جبران‌ناپذیر به محیط‌زیست و سلامت انسان می‌گردند. بنابراین مهار زیستی می‌تواند گزینه مطلوبی برای کاهش مصرف ترکیبات شیمیایی محسوب شود. برای بررسی اثر عوامل مهار زیستی نماتد ریشه گرهی خیار، از زرشک قرمز (*Berberis vulgaris* L.) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، و باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *B. cereus* استفاده گردید. در آزمایشگاه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی دوگیاه فوق و غلظت‌های مختلف باکتری‌های مذکور، بر تفریخ تخم مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گلخانه نیز اثر پودر خشک گیاهان و باکتری‌های فوق، بر شاخص‌های رشدی خیارهای سالم و آلوده به نماتد و شاخص‌های جمعیتی نماتد، بررسی شد. نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی نشان‌دهنده اثر بازدارندگی تفریخ تخم توسط عصاره‌های گیاهی و باکتری‌ها نسبت به شاهد بود. بیشترین ممانعت از تفریخ تخم بعد از ۲۴ ساعت، در تیمار ده هزار میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی زرشک قرمز مشاهده شد. هر چند افزایش غلظت در هر دو گیاه و روش عصاره‌گیری باعث افزایش ممانعت از تفریخ تخم شد ولی در مورد عصاره آبی نعناع فلفلی، افزایش غلطت از پنج هزار به ده هزار میلی‌گرم در لیتر باعث افزایش تفریخ تخم گردید. غلظت 10^7 cfu/ml گونه *B. cereus* نیز بعد از ۲۴ ساعت، بیشتر از سایر غلظت‌های استفاده‌شده درصد تفریخ تخم را کاهش داد. ارزیابی نتایج بررسی گلخانه‌ای سه ماه بعد از مایه‌زنی با نماتد نشان‌دهنده اثر معنی‌دار کاربرد عوامل مورد مطالعه در افزایش تعدادی از شاخص‌های رشدی خیار و شاخص‌های جمعیتی نماتد ریشه‌گرهی بود. هر چند کاربرد پودر خشک زرشک قرمز باعث افزایش معنی‌دار طول و وزن تر ساقه در گیاهان سالم و بیمار گردید، ولی تفاوت میزان افزایش بین دو گروه مذکور معنی‌دار نبود. باکتری‌های مورد بررسی نیز بر شاخص‌های رشدی اثر معنی‌دار نداشتند. کاربرد عوامل مهار زیستی باعث تغییر معنی‌دار تعدادی از شاخص‌های جمعیتی نماتد شدند. کمترین میانگین تعداد گال، توده تخم و توده تخم در گرم ریشه در تیمارهای کاربرد *B. subtilis* و پودر خشک نعناع فلفلی و کم‌ترین فاکتور تولیدمثل و تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک در تیمارهای پودر خشک نعناع فلفلی و زرشک قرمز مشاهده شدند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های مهار زیستی، گیاهان دارویی، نماتدهای انگل گیاهی

Studying the effects of two species of *Bacillus* and dry powder of red barberry and peppermint on the pathogenicity and damage of root-knot nematode in cucumber

Ali Akbar Fadaei Tehrani , Najmeh Karimian, Fatmeh Yosefi Kopaie

Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

✉Corresponding author E–mail: ma_fadaei@yahoo.com

Received: 2025/10/02 Revised: 2025/11/18 Accepted: 2025/11/25

Abstract

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are important pathogens that cause damage to cucumber. Although the use of chemical compounds is an effective method for controlling these nematodes, they impose high costs on producers and cause irreparable damage to the environment. Therefore, biological control can be a good alternative to chemical compounds.. To investigate the effect of biological control agents on cucumber root-knot nematode, red barberry (*Berberis vulgaris*) and peppermint (*Mentha piperita*), and the bacteria *Bacillus subtilis* and *B. cereus* were used. In the laboratory, the effect of different concentrations of aqueous and alcoholic extracts of the plants and different populations of the bacteria on egg hatching was evaluated. In the greenhouse, the effect of dry powder of the above plants and bacteria on the growth indices of healthy and nematode-infected cucumbers and the root knot nematode population indices was investigated. The results of laboratory studies showed an inhibitory effect of plant extracts and biocontrol bacteria on egg hatching compared to the control. After 24 hours, highest inhibition of egg hatching was observed in 10,000 mg/L of red barberry aqueous extract. Although increasing the concentration of the extracts reduced egg hatching, in the case of peppermint aqueous extract, increasing the concentration from 5000 to 10000 mg/L increased egg hatching. The 10^7 cfu/ml concentration of *B. cereus* also reduced the percentage of egg hatching more than the other used concentrations after 24 hours. The results of the greenhouse study three months after nematode inoculation showed a significant effect of the application of the studied factors in increasing a number of cucumber growth indices and change of root-knot nematode population indices. Although the application of red barberry dry powder significantly increased the length and fresh weight of the stem in healthy and infected plants, but the difference in the rate of increase between the two groups was not significant. The bacteria studied also had no significant effect on growth indices. The application of biological control agents caused significant changes in a number of nematode population indices. The lowest average number of galls, egg mass, and egg mass per gram of root were observed in the *B. subtilis* and peppermint dry powder treatments, and the lowest reproductive factor and number of larvae per 100 grams of soil were observed in the peppermint dry powder and red barberry treatments.

Keywords: Biocontrol bacteria, Medicinal plants, Plant parasitic nematodes

How to cite: Fadaei Tehrani, A.A., Karimian, N. & Yosefi Kopaie, F. 2025. Studying the effects of two species of *Bacillus* and dry powder of red barberry and peppermint on the pathogenicity and damage of root-knot nematode in cucumber. Iranian J. of Nematology 1(2), 247-257.

مقدمه

خیار یکی از سبزی‌های مهمی است که به اشکال مختلف توسط انسان مصرف می‌شود. تنوع مصارف تازه‌خوری و فرآوری-شده آن اهمیت اقتصادی قابل‌توجهی به تولید مزرعه‌ای و گلخانه‌ای آن داده است (Kumar *et al.* 2010). همانند بسیاری از سبزی‌ها، آفات و بیماری‌های گیاهی از عوامل عمده کاهش کمی و کیفی تولید خیار محسوب می‌شوند. در بین عوامل بیماری‌زای گیاهی، نماتدهای انگل گیاهی به‌ویژه نماتدهای ریشه گرهی خسارت زیادی به خیار وارد می‌کنند (Aydinli & Mennan 2016). این نماتد اولین بار توسط شریف در سال ۱۳۳۵ از روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی در قصر شیرین با نام *Heterodera marioni* گزارش گردید (Akhiani *et al.* 1984). در بررسی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی و دامنه میزبانی آن‌ها در ایران، ۱۷۸ گونه گیاه میزبان برای نماتد ریشه‌گرهی مشخص شده است (Akhiani *et al.* 1984). نماتد ریشه‌گرهی شرایط نامساعد را به‌صورت تخم سپری کرده و در شرایط مطلوب، تخم‌ها تفریخ شده و لاروهای مرحله دوم ضمن نفوذ به ریشه و حرکت به سمت بافت آوندی، در مجاورت استوانه آوندی ساکن می‌شوند. سپس ضمن پوست‌اندازی و درنهایت بالغ شدن، با ترشحات غدد مری باعث تشکیل سلول‌های بزرگ و تشکیل گال روی ریشه می‌گردند (Dropkin, 1989). برای کنترل این نماتدها از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود ولی در اغلب موارد کنترل آن‌ها به دلیل دامنه میزبانی گسترده، کوتاه بودن چرخه زندگی و میزان بالای تولیدمثل با مشکلات زیادی مواجه می‌باشد (Trudgill & Blok 2001). برای غلبه بر این مشکلات به‌ویژه آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از کاربرد آفت‌کش‌ها، در سال‌های اخیر محققان بررسی‌های خود را به استفاده از ترکیبات طبیعی و عوامل مهار زیستی جهت مدیریت نماتدها متمرکز نموده‌اند (Radwan *et al.* 2012). عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی از جمله فرآورده‌هایی هستند که مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (Feyzi *et al.* 2014). میکروارگانیسم‌هایی مثل باکتری‌ها نیز در این زمینه توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Abdel-Salam & Ann 2013; *et al.* 2018).

نتایج یک بررسی در فعالیت ضدنماتدی عصاره‌های گیاهی مختلف در برابر نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita*، نشان دهنده مرگ بالای لاروهای سن دوم در اثر کاربرد عصاره های گیاهی کاننبال (*Couroupita quianensis* Aublet 1775) و نعناع گربه‌ای معطر (*Nepeta cataria* L. 1753) بود (Pavaraj *et al.* 2012). تعداد قابل‌توجهی از گیاهان دارویی اثرات ممانعت‌کننده روی نماتدهای ریشه‌گرهی نشان داده‌اند و استفاده از آن‌ها باعث غیرفعال‌شدن لاروهای نماتد و کاهش تشکیل گال روی گیاهان میزبان شده است (De Freitas Silva *et al.* 2020).

باکتری‌ها نیز از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که از مدت‌ها پیش به‌عنوان عوامل مهار زیستی مطرح گردیده‌اند. مانکائو و همکاران (Mankau *et al.* 1980) توصیه نمودند که می‌توان از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها علیه نماتدهای انگل گیاهی استفاده کرد. در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی در سراسر جهان در مورد امکان کاهش خسارت نماتدهای بیماری-زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست انجام شده است (Peng *et al.* 2016; Zheng *et al.* 2016). گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* قادر به تولید آنزیم‌های لیتیک، لیپوپپتیدهای حلقوی و بسیاری از متابولیت‌های ثانویه هستند که می‌توانند نقش مهمی در مهار زیستی گونه‌های *Meloidogyne* ایفا کنند (Gray 2006; Yin *et al.* 2021a). نقش بعضی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده از جمله کیتیناز و گلوکاناز تولیدشده توسط گونه‌های جنس مذکور در بروز اثر ضدنماتدی روی *M. javanica* گزارش شده است (Wepuhkhulu *et al.* 2011). در مطالعه کاویتا و همکاران (Kavitha *et al.* 2012)، به نقش لیپوپپتیدهای حلقوی سورفاکتین و ایتورین تولیدشده توسط *B. subtilis* در ممانعت از تفریخ تخم نماتدهای ریشه‌گرهی اشاره شده است.

ترکیبات موجود در گیاهانی مانند زرشک و نعناع فلفلی در رشته‌های مختلف مربوط به سلامت انسان مثل علوم دارویی توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند و تلاش‌هایی برای استفاده از ترکیباتی مانند بربرین (Berbrine) موجود در گیاه زرشک به جای بعضی از آنتی‌بیوتیک‌هایی که بعضی از قارچ‌های بیماری‌زای انسانی نسبت به آن‌ها مقاوم شده‌اند، صورت گرفته است (Zhang *et al.* 2024).

منتول (Menthol) نیز یک ترکیب آلی منوترپنوئید موجود در گیاهان خانواده نعناع است که به‌صورت تجاری تولید شده و به‌طور گسترده در صنایع غذایی، طعم‌دهنده‌ها، بهداشت دهان و صنایع دارویی استفاده می‌شود (Wani *et al*, 2022).

ارزیابی اثرات عصاره‌های آبی و الکلی دو گیاه زرشک قرمز و نعناع فلفلی و دو گونه باکتری از جنس *Bacillus* بر میزان تفریخ تخم در شرایط آزمایشگاهی و شاخص‌های رشدی خیار و شاخص‌های جمعیتی *M. javanica* در شرایط گلخانه، از اهداف این تحقیق بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح نماتد

برای تهیه مایه تلیقح نماتد ریشه‌گرهی، از مزارع و گلخانه‌های خیار مشکوک به آلودگی در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری، تعدادی نمونه ریشه و خاک جمع‌آوری و در کیسه پلاستیک با حفظ شرایط رطوبتی و دمایی مطلوب، به آزمایشگاه نماتدشناسی منتقل گردید. پس از شستشوی ریشه‌های آلوده با جریان ملایم آب شیر، با استفاده از سوزن و میکروسکوپ تشریح، تعدادی توده تخم جداسازی و جهت خالص‌سازی، هر یک جداگانه در مجاورت ریشه یک نشاء چهار برگی گوجه‌فرنگی رقم فلات قرار داده شد و به مدت دو ماه در شرایط مناسب گلخانه (دمای ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۰ تا ۷۰ درصد و دوره روشنایی ۱۴ ساعت) نگه‌داری شد. پس از تکمیل تقریباً دو نسل و تشکیل توده تخم، یکی از گیاهان آلوده انتخاب و با روش قبل تعدادی نماتد ماده و توده تخم، جهت استفاده برای عملیات مربوط به شناسایی گونه نماتد، جداسازی و در ظروف پتری در یخچال نگه‌داری گردید. بقیه توده تخم‌های موجود روی ریشه مذکور به روش هوسی و بارکر (Hussey & Barker 1973) استخراج و جهت تکثیر به گلدان‌های حاوی نشاء چهار برگی گوجه‌فرنگی رقم فلات اضافه گردید و به مدت سه ماه جهت تکثیر جمعیت مورد نیاز در گلخانه نگه‌داری شد.

جهت تعیین گونه، تعدادی از نماتدهای ماده و لاروهای خارج شده از تخم به روش دگریس (De Grisse 1969) تثبیت و از آن‌ها اسلاید دائمی تهیه گردید. خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نمونه‌های آماده‌شده با میکروسکوپ مجهز به لوله ترسیم بررسی، و اندازه‌گیری‌های لازم انجام شد. از الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نیز برای تعیین گونه استفاده شد. به این منظور، تعدادی از نماتدهای ماده به مدت یک ساعت در اسید لاکتیک ۴۵٪ قرار داده شدند و از انتهای بدن آن‌ها برش عرضی تهیه و زیر میکروسکوپ بررسی گردید.

تهیه مایه تلقیح باکتری

دو گونه‌ی باکتری *B. subtilis* و *B. cereus* مورد استفاده در این تحقیق، از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه شهرکرد، تهیه گردید. برای تکثیر آنها از کشت مجدد روی محیط کشت آگار غذایی (Nutrient Agar) استفاده شد. برای تهیه مایه تلقیح مورد نیاز در آزمایش گلخانه‌ای از پرلیت به عنوان بستر کشت باکتری استفاده شد. به این منظور محیط مغذی (Nutrient Broth) (۱۳گرم NB در یک لیتر آب) به میزان مورد نیاز برای اشباع شدن به بالن پرلیت اضافه گردید (۲۵۰ میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰ گرم پرلیت) و جهت سترون شدن در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو قرار داده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^7 cfu/ml به هر بالن اضافه و به مدت ۷۲ ساعت جهت تکثیر باکتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری شد (برای رشد یکنواخت، ارلن‌ها به طور مرتب تکان داده شدند).

تهیه پودر گیاهی

اندام‌های هوایی نعناع فلفلی و برگ‌های زرشک قرمز پس از شست‌وشو در شرایط سایه خشک شده و توسط آسیاب برقی به صورت پودر درآمدند. از پودرهای گیاهان موردنظر برای آزمایش گلخانه‌ای و تهیه عصاره برای بررسی‌های آزمایشگاهی استفاده گردید.

تهیه عصاره‌های گیاهی

برای تهیه عصاره آبی مقدار ۱۰ گرم از هر پودر گیاهی آماده شده، به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه لرزانک (شیکر) در ۳۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. مخلوط حاصل پس از عبور از کاغذ صافی شماره یک واتمن، تا خشک شدن کامل در آون با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای تهیه عصاره الکلی نیز ۱۰ گرم از پودر گیاهی به ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶٪ اضافه و پس از ۲۴ ساعت تکان دادن روی دستگاه لرزانک با سرعت ۳۸۰ دور در دقیقه و رقیق کردن با آب (به نسبت ۳۰٪)، به نسبت مساوی به آن هگزان اضافه گردید و دو ساعت روی لرزانک با همان دور قرار داده شد. سپس محلول تا خشک شدن کامل، در دمای ۴۵ درجه سانتی-گراد نگه‌داری گردید (Abdolmaleki *et al.* 2007).

بررسی‌های آزمایشگاهی

در آزمایشگاه اثر غلظت‌های صفر (شاهد)، پنج و ده هزار میلی‌گرم در لیتر عصاره‌های آبی و الکلی نعناع فلفلی و زرشک قرمز و جمعیت‌های صفر (شاهد)، 10^3 cfu/ml، 10^5 و 10^7 از دو گونه باکتری *B. subtilis* و *B. cereus* بر ممانعت از تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی به‌طور جداگانه و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که یک میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ تخم نماتد، به هر تشتک پتری شش سانتی‌متری (واحد آزمایشی) منتقل و حجم آن با آب مقطر به ۴/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. برای آزمایش اثر عصاره‌ها ابتدا از عصاره خشک به‌دست‌آمده غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ هزار میلی‌گرم در لیتر تهیه و سپس از هر

یک از آنها نیم میلی‌لیتر به هر تشتک پتری اضافه گردید تا غلظت نهایی پنج و ده هزار میلی‌گرم در لیتر حاصل شود. برای آزمایش اثر باکتری‌ها نیز از کشت ۲۴ ساعته آن‌ها روی محیط غذایی، سوسپانسیون باکتری در آب مقطر استریل تهیه شد و پس از تهیه سری رقت‌ها از سوسپانسیون پایه و به کمک کدورت‌سنجی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر و شمارش کلنی تشکیل شده از کشت هر رقت روی محیط کشت، منحنی استاندارد جمعیت باکتری در مقابل میزان جذب ترسیم گردید. به کمک منحنی مذکور جمعیت‌های cfu/ml 10^4، 10^6 و 10^8 تهیه گردید. سپس به هر تشتک پتری حاوی ۱۰۰ تخم نماتد، نیم میلی‌لیتر از هر یک از آن‌ها اضافه شد تا جمعیت نهایی 10^3، 10^5، 10^7 حاصل شود. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند. شمارش تخم‌های تفریخ نشده ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از شروع آزمایش، انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل به کمک نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون LSD صورت گرفت.

بررسی‌های گلخانه‌ای

در گلخانه اثر اضافه کردن یک درصد وزنی دو پودر خشک نعناع فلفلی و زرشک قرمز و مایه تلقیح دو گونه باکتری تکثیرشده روی پرلیت غنی‌شده با ماده مغذی، در حضور شاهد، روی خیار رقم سیمینس (Simins) سالم و آلوده به نماتد به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی گرفت. بدین‌ترتیب که پس از تهیه مخلوط خاک بستر کشت (به نسبت مساوی کود دامی، ماسه و خاک زراعی) و ضدعفونی آن با متیل-بromید، مقدار وزنی لازم از پودر خشک گیاهان و مایه تلقیح باکتری‌های مورد بررسی برای تیمارهای مربوطه، به آن‌ها اضافه، و به گلدان‌های دو کیلوگرمی منتقل شده و بذر خیار در آن‌ها کشت گردید. گلدان‌ها در گلخانه تحت شرایط آبیاری منظم، دمای ۳±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۴ ساعت روشنایی قرار گرفتند. در زمان چهار برگی‌شدن گیاهچه‌های خیار، با ایجاد سه سوراخ به قطر یک و عمق چهار سانتی‌متر در اطراف گیاهچه‌ها، تعداد چهار هزار تخم و لارو نماتد به هر گلدان اضافه گردید. ارزیابی نتایج سه ماه بعد از مایه‌زنی نماتدها و با استفاده از شاخص‌های رشدی گیاه (ارتفاع، وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی، طول، وزن تر و خشک ریشه) و شاخص‌های جمعیتی نماتد (تعداد گال و تعداد توده تخم در گرم ریشه، تعداد تخم در توده تخم، تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک و فاکتور تولیدمثل (نسبت جمعیت نهایی به جمعیت اولیه) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل به کمک نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون LSD در سطح پنج درصد صورت گرفت.

نتایج

خصوصیات ریخت‌شناسی و داده‌های حاصل از اندازه‌گیری خصوصیات ریخت‌سنجی نماتدهای ماده و لاروهای سن دو و شکل کلی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده در نمونه‌های مورد بررسی، با خصوصیات مورد اشاره در کلیدهای شناسایی ایسنبک و تریانتافلو (Eisenback & Triantaphyllou 1991)، و جپسون (Jepson 1987) با گونه *M. javanica* Treub 1885 تطابق داشت.

بررسی‌های آزمایشگاهی

اثر عصاره‌ها

نتایج تجزیه واریانس درصد تخم‌های تفریخ نشده ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی نشان دهنده معنی‌دار بودن اثر تیمارها در زمان‌های مختلف بعد از استفاده بود (جدول ۱) ($P < 0.05$). مقایسه میانگین داده‌های مذکور نیز مؤید وجود اختلاف معنی‌دار بین تعدادی از آن‌ها بود. به عبارت دیگر هر چند دو نوع گیاه و دو روش عصاره‌گیری تفاوت معنی‌داری در ممانعت از تفریخ تخم نداشتند، ولی غلظت‌های مختلف با یکدیگر و با شاهد (غلظت صفر) اختلاف معنی‌دار نشان دادند (جدول ۲). به نحوی که برای مثال بعد از ۲۴ ساعت، بیشترین درصد تخم تفریخ نشده در غلظت ده هزار میلی‌گرم در لیتر عصاره آبی زرشک قرمز مشاهده شد که با کمترین درصد تخم تفریخ نشده در غلظت صفر آن تفاوت معنی‌دار نشان داد. هر چند افزایش ممانعت از تفریخ تخم به موازات افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی از پنج به ده هزار میلی‌گرم در لیتر، نتیجه قابل انتظار بود. ولی در بعضی موارد مانند عصاره آبی نعناع فلفلی برعکس بود و افزایش غلظت باعث تحریک بیشتر تفریخ تخم گردید.

جدول ۱. تجزیه واریانس تخم‌های تفریخ نشده نماتد *Meloidogyne javanica* ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف انواع عصاره‌های نعناع فلفلی و زرشک قرمز

Table 1. Variance analysis of unhatched eggs of *Meloidogyne javanica* caused by the application of different concentrations of peppermint and red barberry extracts

Sources of variation	Degrees of freedom	Variance	
		24 h	72 h
Plant	1	21.6$^{n.s}$	87.0$^{n.s}$
Extract	1	30.3$^{n.s}$	1666$^{n.s}$
Concentration	2	516*	970*
Plant × concentration	2	215*	540*
Extract × concentration	2	252*	448*
Plant × extract × concentration	2	130*	447*
Error	37	193	725
Coefficient of variation		5.6	7.3

*: Significant at 5% probability level
n.s: Non-significant

جدول ۲. مقایسه میانگین تخم‌های تفریخ نشده *Meloidogyne javanica* ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و الکلی نعناع فلفلی و زرشک قرمز

Table 2. Mean comparison of unhatched eggs of *Meloidogyne javanica* caused by the application of different concentrations of aqueous and alcoholic extracts of peppermint and red barberry

Treatment			Time	
Plant	Extract	Concentration (mg/l)	24 h	72 h
Peppermint	Aqueous	0	76.5± 1.9 *b	74 ± 3.8 ab
		5000	89 ± 2.2 a	84.5± 6.9 a
		10000	87 ± 5.2 a	81.5 ± 2.6 a
	Alcoholic	0	70.5 ± 7.9 b	66.5 ± 2.6 b
		5000	76 ± 8.6 b	71.5± 13.8 b
		10000	85.5± 4.8 a	80 ± 4.5 a
Red barberry	Aqueous	0	72.5± 9.3 b	68.5 ± 5 b
		5000	82.5 ± 8.1 a	80± 7.5 a
		10000	89.5± 7.1 a	83.5 ± 6.4 a
	Alcoholic	0	74.5± 3.2 b	70 ± 5.4 b
		5000	85.5 ± 1.5 a	80.5 ± 7.7 a
		10000	89± 6.2 a	83 ± 9.4 a

*Values are mean ± standard error. Values in the same column followed by different letter(s) are significantly different according to LSD test at $P < 0.05$

اثر باکتری‌ها

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) درصد تخم‌های تفریخ نشده ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف باکتری‌های مورد بررسی مؤید معنی‌دار بودن کاربرد آن‌ها نسبت به شاهد بود ($P < 0.05$). به عبارت دیگر هر چند هر دو گونه مورد استفاده به یک میزان در ممانعت از تفریح تخم مؤثر بودند و باهم تفاوت معنی‌داری نداشتند با این‌حال غلظت‌های مختلف با یکدیگر و با شاهد (غلظت صفر) اختلاف معنی‌دار نشان دادند. به نحوی که برای مثال بعد از ۲۴ ساعت، بیشترین درصد تخم تفریخ نشده در غلظت $۱۰^{۷}$ cfu/ml گونه *B. cereus* مشاهده شد که با کمترین درصد تخم تفریخ نشده در غلظت صفر آن تفاوت معنی‌دار نشان داد. هر چند تأثیر *B. subtilis* کمتر از *B. cereus* بود با این‌حال بعد از ۷۲ ساعت غلظت بالای آن نیز با شاهد و غلظت‌های دیگر تفاوت معنی‌دار نشان داد و باعث کاهش تفریخ تخم گردید.

بررسی‌های گلخانه‌ای

نتایج بررسی اثر پودرهای خشک نعناع فلفلی و زرشک قرمز، و باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus* روی خیارهای سالم و آلوده به نماتد *M. javanica* به‌صورت زیر بود.

جدول ۳. مقایسه میانگین درصد ممانعت از تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* ناشی از کاربرد جمعیت‌های مختلف باکتری‌های مورد بررسی

Table 3. Mean comparison of the inhibition percent of *Meloidogyne javanica* egg hatching due to the application of different concentrations of the understudy bacteria

Treatment		Time	
Bacteria	Concentration (cfu/ml)	24h	72h
Bacillus subtilis	0	83.5± 1.3*[b]	79.5 ± 4.7[b]
	10^3	84.5 ± 1.9[b]	79.7 ± 1.9[b]
	10^5	88.3 ± 2.5[b]	83.3 ± 6[a]
	10^7	88.7 ± 3.8[b]	84.0± 4.8[a]
Bacillus cereus	0	78.3± 6[b]	72.3± 4.8[c]
	10^3	85.5 ± 5.9[b]	78.3 ± 1.7[b]
	10^5	89.3± 5.3[ab]	84.3 ± 4[b]
	10^7	94.3± 2.8[a]	86.3 ± 3.9[a]

*Values are mean ± standard error. Values in the same column followed by different letter(s) are significantly different according to LSD test at $P < 0.05$

جدول۴. تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی خیارهای سالم و آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica* در اثر کاربرد عوامل مهار زیستی

Table 4. Variance analysis of the growth indices of healthy and infected cucumbers with *Meloidogyne javanica* caused by the application of biocontrol agents.

Sources of variation	Degrees of freedom	Variance					
		Foliage			Root		
		Length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
Biocontrol agent	4	151.8*	503.8*	23.5*	2.3[n.s]	1.3[n.s]	1.7[n.s]
Nematode population	1	82.4[n.s]	202.7[n.s]	2.6[n.s]	3.5[n.s]	23.9[n.s]	1.6[n.s]
Biocontrol agent × nematode population	4	134.8[n.s]	325.8[n.s]	7.9[n.s]	10.8[n.s]	11.3[n.s]	0.7[n.s]
Error	30	162.6	125.1	14.8	51.8	16.7	0.2
Coefficient of variation		6.9	3.9	3.8	5.7	4.8	2.4

*: Significant at 5% probability level
n.s: Non-significant

شاخص‌های رشدی گیاه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) شاخص‌های رشدونموی گیاهان سالم خیار و آلوده به نماتد ریشه‌گرهی در اثر کاربرد عوامل مهار زیستی نشان‌دهنده معنی‌داربودن اثر آن‌ها بود. مقایسه میانگین (جدول ۵) داده‌های مذکور نیز بیان‌گر تفاوت معنی‌دار بین تعدادی از تیمارها بود. به عنوان مثال شاخص‌هایی مثل طول ساقه و وزن تر ساقه در اثر کاربرد پودر خشک زرشک قرمز روی گیاهان سالم و بیمار افزایش معنی‌داری پیدا کردند. به عبارت دیگر با وجود آن‌که عوامل مهار زیستی به ویژه پودر خشک گیاهان در بیشتر موارد باعث افزایش طول ساقه در گیاهان آلوده و سالم شد ولی افزایش ناشی از استفاده از پودر خشک زرشک در گیاهان شاهد سالم و آلوده تفاوت معنی‌دار نشان دادند.

شاخص‌های جمعیتی نماتد

نتایج مقایسه میانگین (جدول ۶) شاخص‌های جمعیتی نماتد *M. javanica* در روی خیار در اثر کاربرد عوامل مختلف مهارزیستی، نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اثر تیمارهای مذکور بود. به عبارت دیگر شاخص‌هایی چون تعداد گال و تعداد توده تخم در گرم ریشه و تعداد تخم در توده تخم و فاکتور تولیدمثل در اثر کاربرد عوامل مهارزیستی تحت تأثیر قرار گرفتند.

بیشترین میانگین تعداد گال، توده تخم و توده تخم در گرم ریشه در تیمار بدون عامل مهار زیستی (شاهد) و کمترین آن در کاربرد *B. subtilis* و پودر خشک نعناع فلفلی مشاهده شد. کم‌ترین فاکتور تولیدمثل و تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک در تیمار پودر خشک نعناع فلفلی و زرشک قرمز مشاهده شدند. بنابراین، به‌طورکلی بر خلاف اثرات کم و متفاوت عوامل مهار زیستی مورد بررسی روی شاخص‌های رشدی گیاه، عوامل مذکور تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی کاهش تمام شاخص‌های جمعیتی نماتد نشان دادند.

جدول ۵. مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی خیارهای سالم و آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در اثر کاربرد عوامل مهار زیستی

Table 5. Mean comparison of growth indices of healthy and infected cucumbers with root-knot nematode *Meloidogyne javanica*, caused by the use of biocontrol agents

Treatments	Nematode	Foliage			Root		
		Length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Length (cm)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
Control	-	41± 2.7 *b	51.9± 2.1 b	±0.5 a 10.9	29.5 ± 4.7 a	±4.8 b 8.9	±0.8 ab 3.3
	+	40.6 ± 8.5 b	43.4 ± 13.6 c	a 11.4±1.6	24±4.2 ab	±3.5 c 6.2	±0.5 b 2.3
B. subtilis	-	43 ± 4.2 b	51.3± 8.6 b	7.4± 2.3 c	22 ± 2.4 b	12.6 ± 4 b	± 1.6 a 4.4
	+	± 8.4 c 35.7	36.5 ± 11.6 b	c 6.5 ± 1.7	26.7 ± 7.1 a	13.4 ± 12 a	± 1.8 b 2.4
B. cereus	-	44 ± 7.9 b	52.4 ± 13.6 b	9.1 ± 1.5 b	26.2 ± 2.5 a	± 3.8 b 9.7	4.3± 2.3 a
	+	b 41.7 ± 8.6	56.3 ± 7.7 a	b 8.7 ± 2.2	22.7 ± 3.2 b	13.1± 3.1 a	± 0.4 a 3.6
Peppermint	-	± 12.8 b 42	43.2 ± 8.1 b	± 2.9 c 6.4	± 4.6 b 23.5	6.3 ± 4.3 c	b 2.7 ± 1.7
	+	36.3 ± 4 bc	49.9 ± 5.4 b	± 1.4 c 6.7	b 23.7 ± 2.8	bc 7.1 ± 3.7	2.0 ± 0.6 b
Red barberry	-	45 ± 3.2 ab	50.0± 10.7 b	9.0 ± 1.2 b	± 7.2 a 28.2	5.2± 2.2 c	± 0.6 b 2.5
	+	50.7± 1.9 a	64.7 ± 8.6 a	9.3 ±1 b	a 25.7 ± 2.9	± 3.4 b 8.4	2.3 ± 0.9 b

*Values are mean ± standard error. Values in the same column followed by different letter(s) are significantly different according to LSD test at $P < 0.05$

جدول ۶. مقایسه میانگین شاخص‌های جمعیتی نماتد ریشه‌گرهی در اثر کاربرد عوامل مهار زیستی روی خیار آلوده به *Meloidogyne javanica*

Table 6. Mean comparison of population indices of root-knot nematode due to the application of biocontrol agents on cucumber infected with *Meloidogyne javanica*

Treatment	Gall/ 1 gr of root	Egg mass/1 gr of root	Egg/egg mass	J2/100 g of soil	RF
Control	36.4±3.4 *a	17.2±2.7 a	165.4± 12.2 a	372.2± 8 a	7.4± 0.5 a
B. subtilis	4.3 ± 0.9 b	2.3 1.2b	80.7 ± 10.9 b	175 ± 10.4 b	1.1 ± 0.3 b
B. cereus	10 ± 2.5 b	3 ± 1.6 b	85.2± 8 b	179 ± 12.1 b	1.3 ± 0.1 b
Peppermint	4.3± 1.7 c	2.3 ± 0.9 b	81.4± 9.5 b	123.6± 6.4 c	0.6 ± 0.1 c
Red barberry	5.5± 2.4 c	3 ± 1.8 b	82.2± 5.3 b	144± 8.2 c	0.8 ± 0.1 c

*Values are mean ± standard error. Values in the same column followed by different letter(s) are significantly different according to LSD test at $P < 0.05$

بحث

مشکلات روش‌های کنترل نماتد ریشه‌گرهی موجود در مزارع و گلخانه‌های تولید خیار از دلایل توجه به روش‌های مهار زیستی می‌باشد. هدف این بررسی نیز مقایسه کارآیی باکتری‌های مهار زیستی و ترکیبات گیاهی به عنوان روش‌های جای‌گزین یا مکمل در مدیریت این نماتدها بود.

باکتری‌های مهار زیستی نظیر *B. subtilis* و *B. cereus* به دلیل توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی و القای مقاومت سیستمیک در گیاهان، به عنوان گزینه‌های مناسبی برای کنترل نماتدها مطرح شده‌اند. گونه *B. subtilis* با تولید ترکیباتی نظیر پپتیدهای ضدمیکروبی و آنزیم‌های هیدرولیتیک، قادر به مهار رشد و فعالیت نماتدها می‌باشد. گونه *B. cereus* نیز با تولید متابولیت‌های ثانویه، تاثیرات مشابهی بر کنترل نماتدها از خود نشان داده است (Ayaz *et al*. 2023).

گیاهان دارویی نظیر نعناع فلفلی (*M. piperita*) و زرشک قرمز (*B. vulgaris*) به دلیل داشتن ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی، ظرفیت بالایی در مهار عوامل بیماری‌زا از خود نشان داده‌اند. ترکیبات موجود در این گیاهان علاوه بر اثرات ضد میکروبی، می‌توانند با تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه، مقاومت آن‌ها را در برابر حملات نماتدها افزایش دهند (Shekarabi *et al*. 2022).

ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی موجود در گیاهان مذکور می‌تواند از دلایل احتمالی اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی منتهی به تفریخ تخم باشد. بین دو گیاه و دو روش عصاره‌گیری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که نوع و حلالیت ترکیبات موثر در دو گیاه مشابه بوده است. روند مشابه نتایج در دو زمان بررسی مؤید عدم تفاوت زمان اثرگذاری عصاره‌های گیاهی مورد بررسی بود.

کاربرد عوامل مهار زیستی مورد بررسی در شرایط گلخانه روی برخی شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری‌شده خیار تأثیر داشتند. به عنوان مثال شاخص‌هایی مثل طول ساقه و وزن تر ساقه در اثر کاربرد پودر خشک زرشک قرمز روی گیاهان بیمار تغییر معنی‌داری پیدا کردند. وجود عوامل مهار زیستی به ویژه پودر خشک گیاهان در بیشتر موارد باعث افزایش طول ساقه در گیاهان آلوده و سالم شد به نحوی که بیشترین میانگین طول ساقه در تیمار استفاده از پودر خشک زرشک بود که با شاهد سالم و آلوده تفاوت معنی‌دار داشت. هر چند افزایش در هر دو حالت گیاهان آلوده و سالم مشاهده گردید ولی بین آنها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. افزایش مذکور در تیمار استفاده از پودر خشک نعناع نیز مشاهده گردید ولی تفاوت مذکور با شاهد معنی‌دار نبود. سایر شاخص‌های رشدی تغییرات متفاوتی نشان دادند که اغلب معنی‌دار نبودند.

اثر افزایشی پودر خشک گیاهان می‌تواند به دلایل مختلف باشد که ساده‌ترین آنها عمل کردن به‌صورت یک کود آلی است. با این‌حال، بین میانگین‌های تیمارهای سالم و آلوده تفاوت معنی‌داری دیده نشد. به عبارت دیگر اثرات ضدنماتدی احتمالی ترکیبات موجود درگیاهان مذکور قابل مشاهده نبودند. دلیل این امر می‌تواند ناشی از عدم وجود فاصله زمانی لازم برای آزادشدن ترکیبات مذکور، بین کاربرد پودرهای گیاهی و زمان آلوده کردن گیاهان به نماتد باشد.

هر چند استفاده از هر دو گونه باکتری مورد بررسی نیز درگیاهان غیرآلوده باعث افزایش اندکی در طول ساقه نسبت به شاهد شد ولی معنی‌دار شدن طول ساقه در تیمار *B. subtilis* ناشی از کاهش ارتفاع در گیاهان آلوده بوده است که می‌تواند ناشی از خطاهای آزمایشی غیرقابل انتظار هم‌چون شرایط رشدی خاک و گیاه بوده باشد. در حالی‌که در تحقیقات قبلی اشاره شده است که، اکثرگونه‌های جنس *Bacillus* قادر به تولید ترکیبات مختلفی ازجمله هورمون‌های گیاهی (اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها) هستند که باعث رشد گیاه می شوند (Tsotetsi *et al*. 2022).

استفاده از باکتری‌های مورد بررسی روی تعدادی از شاخص‌های جمعیتی نماتد ریشه‌گرهی مثل تعداد گال، تعداد توده تخم در گرم ریشه، تعداد تخم در توده تخم و فاکتور تولیدمثل اثرگذار بودند. بیشترین میزان میانگین گال ریشه در تیمار بدون عامل مهار زیستی (شاهد) و کمترین آن در تیمار *B. subtilis* مشاهده شد. بیشترین و کمترین تعداد توده تخم در گرم ریشه نیز به ترتیب در تیمار بدون عامل مهار زیستی و حضور *B. subtilis* دیده شد. گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* با تولید آنزیم‌هایی مانند کیتینازها و پروتئازها باعث تخریب پوسته تخم نماتد و در نتیجه کاهش تعداد لاروهای نماتد می‌شوند (Yang *et al*. 2013). در این تحقیق نیز باکتری‌های بیوکنترل به طور قابل ملاحظه‌ای تعداد گال‌ها، کیسه‌های تخم و تعداد تخم‌های نماتد را کاهش دادند. در نتیجه فاکتور تولیدمثل نیز به میزان قابل توجهی کاهش یافت. بعضی از سویه‌های *B. cereus* در شرایط آزمایشی باعث مرگ بالای لاروهای*M. incognita* شده‌اند (Yin *et al*. 2021b).

تعدادی از محققین اثرات ضدنماتدی استرین‌های مختلف *B. subtilis* را گزارش کرده‌اند (Kavitha *et al*. 2012). تولید متابولیت‌های سمی بر علیه لاروهای سن دوم نماتد ریشه گرهی

و ممانعت از تفریخ تخم از جمله سازوکارهای مورد اشاره بوده است (Basyony & Abo-Zaid 2018; Ruiz *et al*. 2014)

هنری و همکاران (Henry *et al*. 2011) نشان دادند که باکتری *B. subtilis* قادر به تولید لیپوپپتیدهای مختلف مانند فنژیسین‌ها (Fengycins)، سورفکتین‌ها (Sufectins) و ایتیورین‌ها (Iturins) می‌باشد که با تخریب غشاء سلولی باعث لیزشدن و مرگ لارو نماتد می‌شوند. ترشح متابولیت‌های ثانویه‌ای هم‌چون آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و سیدروفورها و آنزیم‌های هیدرولیتیک نظیر پروتئازها و کیتینازها توسط این باکتری که می‌توانند اثر ضد نماتدی داشته باشند، نیز گزارش شده است (Hashem *et al*. 2019).

گونه *B. cereus* نیز با تولید پروتئاز و باسیلولیزین (Bacillolysin) پروتئین کوتیکولی را تجزیه کرده و باعث اضمحلال و مرگ نماتد می‌شود (Yin *et al.* 2021a). با این‌حال سازوکار دقیق اثرگذار در شرایط این تحقیق، قابل تشخیص و تفکیک نبود.

سپاسگزاری

نگارندگان از مساعدت و همکاری معاونت پژوهشی و ریاست دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد در جهت تأمین امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای تشکر می‌نمایند.

References

Abdolmaleki M., Panjehke N., Bahramnejad S., Salari M. & Abbasi S. 2007. Antifungal effects of extracts of different parts of the sumac plant (*Rhus coriaria*) on four plant pathogenic fungi. *Agricultural Research: Water, Soil and Plants in Agriculture* 7(4), 121 - 131.

Abdel-Salam M., Ameen H.H., Soliman G.M., Elkelany U., & Asar, A.M. 2018. Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lysinibacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28, 1-6.

Akhiani A., Mojtahedi, H. & Naderi H. 1984. Species and physiological races of root-knot nematodes in Iran. *Journal of Plant Diseases* 20, 57-71.

Ann, Y.C. (2013). Screening for nematicidal activities of *Bacillus* species against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *American Journal Experimental Agriculture* 3, 794-805.

Aydinli G. & Mennan S. 2016. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from greenhouses in the Middle Black Sea region of Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 40(5), 675-685.

Ayaz M., Li C.H., Ali Q., Zhao W., Chi Y.K., Shafiq M. & Zhao J.T. 2023. Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules* 28(18), 1-24.

Basyony A.G. & Abo-Zaid G.A. 2018. Biocontrol of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, using an eco-friendly formulation from *Bacillus subtilis*, lab. and greenhouse studies. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28(87), 1-13.

De Freitas Silva, M., Campos, V. P., Barros, A.F., da Silva, J.C.P., Pedroso, M.P., de Jesus Silva, F. & Justino, J.C. 2020. Medicinal plant volatiles applied against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection* 130, DOI.10.1016/j.cropro.2019.105057

De Grisse, A.T. 1969. Redescription or modification of some techniques used in the study of plant-parasitic nematodes. *Mededelingen Rijksfaculteit Landbouwweteschappen Gent* 34, 351- 369.

Dropkin, V.H. 1989. *Introduction to plant nematology, 2nd edition.* New York, Wiley.

Eisenback J.D. & Triantaphyllou H.H. 1991. Root-knot nematodes *Meloidogyne* species and races. In Nickle W.R. (Ed.), *Manual of agricultural nematology* (pp. 281–286). New York, Marcel Dekker.

Feyzi, A., Moghadam, E.M., Azizi, M., & Rouhani H. 2014. Inhibitory effects of essential oils of *Allium hirtifolium*, *Salvia officinalis* and *Kelussia odoratissima* on *Meloidogyne javanica* and to extract of their active substances. *Journal of Plant Protection* 28, 220-225.

Gray E., Lee, K., Souleimanov A., Di Falco M., Zhou X., Ly, A. & Smith D. 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology* 100(3), 545-554.

Hashem A., Tabassum B. & Abd-Allah E.F. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(6), 1291-1297.

Henry G., Deleu M., Jourdan E., Thonart P. & Ongena M. 2011. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related responses. *Cellular Microbiology* 13, 1824–1837.

Hosseini Shekarabi S.P., Shamsaie Mehrgan M., Ramezani F., Dawood M.A., Van Doan H., Moonmanee T., Abdul Hamid N.K. & Abdul Kari Z. 2022. Effect of dietary barberry fruit (*Berberis vulgaris*) extract on immune function, antioxidant capacity, antibacterial activity, and stress-related gene expression of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Aquaculture Reports* 23, 1-11.

Hussey, R. & Barker K. 1973. 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).* Wallingford, CAB International.

Kavitha P., Jonathan E. & Nakkeeran S. 2012. Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* 40, 203-206.

Kumar D., Kumar S., Singh J., Narender J., Rashmi J., Vashistha B.D. & Singh N. 2010. Free radical scavenging and analgesic activities of *Cucumis sativus* L. fruit extract. *Journal of Young Pharmacists* 2(4), 365-368.

Mankau R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review of Phytopathology* 18(1), 415-440.

Pavaraj M., Bakavathiappan G. & Baskaran S. 2012. Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Biopesticides* 5, 106-110.

Peng D., Lin J., Huang Q., Zheng W., Liu G., Zheng J. & Sun M. 2016. A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. *Environmental Microbiology* 18(3), 846-862.

Radwan M.A., Farrag S.A.A., Abu-Elamayem M.M. & Ahmed N.S. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology* 56, 58-62.

Ruiz S.E., Cristóbal A.J., Reyes R.A., Tun S.J., García R.A. & Pacheco A.J. 2014. In vitro antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soils of the *Yucatan peninsula* against *Macrophomina phaseolina* and *Meloidogyne incognita*. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 83: 45-47.

Trudgill D.L. & Blok V.C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39, 53-77.

Tsotetsi, T., Nephali, L., Malebe, M. & Tugizimana, F. 2022. *Bacillus* for plant growth promotion and stress resilience: what have we learned? *Plants* 11(19), 2482.

Wani, S.A., Naik, H.R., Wagay, J.A., Ganie, N.A., Mulla, M.Z. & Dar, B.N. (2022). Mentha: A review on its bioactive compounds and potential health benefits. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods* 14(4), 154-168.

Wepuhkhulu M., Kimenju J., Anyango B., Wachira P., & Kyallo G. 2011. Effect of soil fertility management practices and *Bacillus subtilis* on plant parasitic nematodes associated with common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13(1), 27-34.

Yang J., Liang L., Li J. & Zhang K. 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7081–7095.

Yin N., Liu R., Zhao J.L., Khan R.A.A. & Li Y. 2021a. Volatile organic compounds of *Bacillus cereus* strain Bc-cm103 exhibit fumigation activity against *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease* 105(4), 904–911.

Yin, N., Zhao, J. L., Liu, R., Li, Y., Ling, J., Yang, Y. H., & Mao, Z. C. 2021b. Biocontrol efficacy of *Bacillus cereus* strain Bc-cm103 against *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease* 105(8), 2061-2070.

Zhang C.W., Huang D.Y., Riaz Rajoka M.S., Wu Y., He Z.D., Ye L., Wang Y., & Song X. 2024. The antifungal effects of Berberine and its proposed mechanism of action through CYP51 inhibition, as predicted by molecular docking and binding analysis. *Molecules* 29(21), 1-15.

Zheng, Z., Zheng, J., Zhang, Z., Peng, D. & Sun, M. 2016. Nematicidal spore-forming Bacilli share similar virulence factors and mechanisms. *Scientific Reports* 6(1), 31341.