بررسی اثر باکتری‌های فراریشه بر نماتود ریشه گرهی (*Meloidogyne javanica*) بر روی خیار در شرایط گلخانه*

EVALUATION OF RHIZOBACTERIA FOR ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST ROOT-KNOT NEMATODE, *Meloidogyne javanica* ON CUCUMBER, UNDER GREENHOUSE CONDITION

شیوا مجذوب، اکبر کارگر بیده**، سیدمحسن تقوی و حبیب‌اله حمزه‌زرقانی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۰)

چکیده

به منظور بررسی اثر باکتری‌های فراریشه گیاهان بر فعالیت نماتود ریشه گرهی، گونه *Meloidogyne javanica*، از خیار، سرو و گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مذکور از مناطق شیراز، مرودشت و گرمسار و هم‌چنین سرو، چمن و گندم سالم از باجگاه نمونه‌برداری شد. نماتودهای جداسازی شده در گلخانه روی گوجه‌فرنگی رقم شفت فلات خالص‌سازی و تکثیر گردید. ابتدا ۴۰ سویه باکتری جدا شده از فراریشه گیاهان آلوده و یا سالم بر میزان تفریخ تخم پس از سه و هشت روز و هم‌چنین فعالیت لاروهای سن دوم، پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در شرایط آزمایشگاه بررسی گردید. سپس از میان سویه‌های مؤثر، ده سویه انتخاب و در شرایط گلخانه روی خیار رقم سوپرآملیا در دو آزمایش مستقل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی سویه‌ها موجب افزایش رشد گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتود شدند. در این میان سویه *Pseudomonas fluorescens* CHAO با کاهش ۵۵/۳٪ و ۵۵/۷٪ تعداد گال و کاهش ۹۱/۱٪ و ۸۲/۸٪ فاکتور تولیدمثل، به ترتیب در آزمایش اول و دوم، به عنوان مؤثرترین سویه شناخته شد. سویه‌ای از *Pantoea* sp. در رتبه بعدی قرار گرفت. هم‌چنین تأثیر سه سویه از باکتری‌های *P. fluorescens* CHAO، *Bacillus subtilis* و *Pantoea* sp. به صورت جداگانه و در ترکیب با هم روی دو رقم خیار سوپرآملیا و رویال بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده کاربرد توأم هر سه باکتری نسبت به استفاده از هریک به صورت جداگانه و یا در ترکیب‌های دوتایی اثر بیشتری در افزایش شاخص‌های رویشی گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتود داشت.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، *Bacillus subtilis*، *Pantoea* sp.، *Pseudomonas fluorescens*

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: karegar@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، دانشیار، استاد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

خیار به عنوان یکی از سبزیجات مهم، از محصولاتی است که در تمام طول سال در سطح مزارع و یا در گلخانه‌های مناطق مختلف ایران تولید و مصرف می‌گردد. براساس برآورد سازمان خواروبار جهانی (FAO)، ایران در سال ۲۰۰۷ میلادی با تولید ۱،۷۲۰،۰۰۰ تن خیار، پس از چین مقام دوم جهان را به خود اختصاص داده است (Anonymous 2010). هم‌چنین براساس آخرین آمار معاونت امور تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی سطح زیر کشت این محصول در سال زراعی ۸۷-۱۳۸۶ ۶۶،۹۸۰ هکتار (۲۴/۸۸٪ از حدود ۲۶۹،۰۰۰ هکتار از اراضی اختصاص یافته به کشت انواع محصولات جالیزی) برآورد گردیده است (Anonymous 2010a).

عملکرد این گیاه تحت تأثیر عوامل بیماری‌زا از جمله نماتودهای ریشه‌گرهی کاهش می‌یابد. نماتودهای ریشه‌گرهی با کاهش ۵٪ محصولات کشاورزی به عنوان مهم‌ترین نماتودهای انگل گیاهی در سطح جهان شناخته شده‌اند (Hussey & Janssen 2002). با توجه به میزان خسارت ناشی از نماتودهای مولد غده، کنترل آنها امری اجتناب‌ناپذیر است. در دهه‌های اخیر استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی در کشورهای پیشرفته با توجه به آگاهی از تأثیرات سوء آنها روند رو به کاهش داشته و روش‌های غیرشیمیایی از جمله کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است. امروزه فرمولاسیون‌های تجاری عوامل کنترل بیولوژیک به بازار عرضه شده و تحقیقات در مورد آنها در حال پیشرفت است. به همین دلیل مطالعه امکان استفاده از عوامل بیولوژیک در کنترل نماتودهای انگل گیاهی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های فراریشه و فعال‌ترین موجودات زنده خاک می‌باشند و تقریباً در کلیه واکنش‌های بیولوژیک که در خاک صورت می‌پذیرد نقش اساسی دارند (Becker *et al*. 1988). بررسی‌ها نشان می‌دهد باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه با تجمع در منطقه حفاظت قابل توجه‌ای را در مقابل نماتودهای انگل گیاهی به وجود می‌آورند (Kim & Misaghi 1996, Siddiqui & Mahmood 1999). تحقیقاتی در زمینهٔ استفاده از باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک، انجام گرفته است. در یک بررسی آزمایشگاهی و گلخانه‌ای اثر ۲۰ جدایه از گونه‌های *Bacillus* بر روی لوبیای سودانی (*Cajanus cajan*) آلوده به *M. incognita* مورد ارزیابی قرار گرفت. پنج جدایه (B605، B603، B605، B615 و B618) اثر نامطلوبی را روی تفریخ تخم و نفوذ نماتود نشان دادند. استفاده از این جدایه‌ها افزایش رشد گیاهان را به دنبال داشتند (Siddiqui & Shakeel 2007). در آزمایشات مزرعه‌ای در فلوریدا جدایه GBO3 *B. subtilis* و Bamyldiquifaciens IN937a در یک فرمولاسیون همراه کیتین پس از اضافه شدن به پوشش دانه و نشاء موجب کاهش تولید گال *M. incognita* و افزایش رشد ریشه فلفل و خربزه شدند (Kokalis-Burelle & Samac 2003).

بررسی‌های وسیعی نیز روی باکتری‌های گرم منفی انجام گرفته است. جدایه‌های مختلف باکتری‌ها اثرات متفاوتی بر روی نماتود دارند به عنوان مثال در یک آزمایش گلخانه‌ای مطالعه تأثیر دو جدایه GRP3 و PRS9 از *P. fluorescens* بر روی *M. incognita* و رشد گوجه‌فرنگی نشان داد که *P. fluorescens* GRP3 نسبت به PRS9 موفقیت بیشتری در کاهش گال و تکثیر نماتود و پیشرفت رشد گوجه‌فرنگی دارند (Siddiqui & Mahmood 2001). در یک آزمایش صاف شده کشت‌های *P. fluorescens* CHAO و CHA89 یا CHAO/PME موجب مرگ ومیر لاروهای

نماتود *M. incognita* در شرایط in vitro شد (Siddiqui & Shaukat 2005). در ایران تحقیقات معدودی در زمینه امکان استفاده از باکتری‌ها به منظور کنترل بیولوژیک صورت گرفته است. در یک آزمایش، میانگین درصد کاهش جمعیت نماتود *M. javanica* در ریشه و خاک برای چهار جدایه از این باکتری PP1، PP3، PPM و PNG به ترتیب ۶۰٪ ، ۶۵٪ ، ۶۳٪ و ۶۹٪ گزارش شد (Damadzadeh *et al* 1996). در آزمایشی دیگر جدایه‌های PNG (گینه‌نو) و PA (اهواز)، از باکتری *Pasteuria penetrans*، به ترتیب باعث کاهش ۷۱/۱٪ و ۸۷/۱٪ از جمعیت *M. javanica* روی گوجه‌فرنگی گردیدند. در حالی که استفاده از سم نماکور با همین شرایط ۷۶/۸٪ جمعیت را کاهش داد (Ameri *et al* 2004). در آزمایش گلخانه‌ای دیگری نشان داده شد که غلظت $۱۰^۴$ اندوسپور در هر گرم خاک جدایه PA *P. penetrans*، تیماری مؤثر جهت کنترل گونه *M. incognita*-R2 و غلظت $۱۰^۴ \times ۶/۴$ جدایه PNG تیماری مؤثر در کنترل گونه *M. javanica* در سطوح کوچک می‌باشند (Karimipour & Damadzadeh 2006).

در آزمایشی استفاده از غلظت $۱۰^۹$ cfu/ml از باکتری *Bacillus cereus* همرا با غلظت پنج میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به صورت خیساندن خاک پیش از آلوده شدن گیاه خیار به نماتود *M. javanica*، موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال و تعداد توده تخم تولید شده به ازای هر گیاه و کاهش تعداد تخم در هر توده تخم گردید (Siahpoush *et al* 2010). در آزمایش گلخانه‌ای کنترل بیولوژیک نماتود ریشه گرهی گونه *M. javanica* بر روی گوجه‌فرنگی، توسط باکتری *P. fluorescens* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری با غلظت $۱۰^۹$ (cfu/ml) به روش محلول‌پاشی اندام‌های هوایی باعث کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد کیسه تخم در هر گیاه و تعداد تخم در هر کیسه تخم نسبت به شاهد گردید (Mokhtari *et al* 2008). در مطالعه‌ای دیگر اثر ۱۱ سویه ایرانی سودوموناس فلورسنت بر روی مرگ و میر لارو سن دوم و عدم تفریخ تخم این نماتود در شرایط آزمایشگاهی بررسی و نشان داده شد که استرین UTPF95 با ۷۸/۸۸ درصد مرگ و میر لاروهای سن دوم و استرین‌های UTPF92 و UTPF95 به ترتیب با ۶۶/۴۲ و ۶۸/۶۱ درصد کاهش تفریخ تخم نماتود بالاترین تأثیر را دارند (Golzary *et al* 2008).

در یک آزمایش، مایه‌زنی گیاهان گوجه‌فرنگی با باکتری CHAO *P. fluorescens* قبل از آلودگی به نماتود *M. javanica* باعث کاهش معنی‌دار تعداد گال و تعداد کیسه تخم نماتود گردید گردید (Sarafraz Nico *et al* 2010). در مطالعه‌ای دیگر اثر تلفیقی دو عامل BI *Trichoderma harzianum* و *P. fluorescens* علیه نماتود *M. javanica* در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که تلفیق دو عامل آنتاگونیست باعث افزایش معنی‌دار در مرگ و میر لاروها نسبت به کاربرد هرکدام به طور جداگانه می‌گردد. با توجه به اهمیت نماتودهای ریشه‌گرهی و ضرورت انجام تحقیقات بیشتر به منظور تکمیل یافته‌های تحقیقات انجام شده و دستیابی به روش‌های مؤثر و بی‌خطر کنترل، بررسی اثر باکتری‌های فراریشه بر نماتود ریشه‌گرهی، *M. javanica*، روی خیار در شرایط گلخانه انجام گرفت.

روش بررسی

الف) آماده‌سازی جمعیت نماتود

نمونه‌هایی از خاک و ریشه خیار، گوجه‌فرنگی و پسته

آلوده به نماتود مولد غده از باغ‌ها و گلخانه‌های اطراف شیراز و گرمسار جمع‌آوری گردید. خالص‌سازی و تکثیر بر روی گوجه‌فرنگی رقم شفت فلات در گلخانه، انجام شد. تخم‌های نماتود با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم از ریشه‌های گوجه‌فرنگی جدا شدند. به این ترتیب که چند میلی‌لیتر محلول ۱٪ هیپوکلریت سدیم به ریشه‌های حاوی کیسه تخم درون مخلوط‌کن اضافه و به مدت ۴۰ ثانیه با سرعت متوسط خرد گردید. سپس مخلوط از الک ۲۰۰ مش که در زیر آن الک ۵۰۰ مش قرار داشت، عبور داده و با آب شسته شد. پس از چند بار شستشو با آب، قطعات ریشه و بقایای گیاهی به وسیله الک ۲۰۰ مش جداسازی شد و تخم‌ها روی الک ۵۰۰ مش باقی ماندند. محتوای سطح الک با آب شسته و در بشر جمع‌آوری گردید (Hussey & Baker 1973). تعداد تخم‌ها به وسیله شمارش‌گر دستی محاسبه گردید.

برای تهیه لارو سن دوم نماتود، تخم‌های استخراج شده بر روی کاغذ صافی درون یک الک کوچک ۵۰۰ میکرومتری که در یک تشتک پتری بزرگ حاوی آب فاقد کلر قرار داشت ریخته شده و درون انکوباتور با دمای ۲۶±۲°C به مدت سه یا چهار روز نگهداری گردید. بدین ترتیب تخم‌ها روی کاغذ صافی تفریخ شده و لاروهای سن دوم پس از عبور از کاغذ صافی درون تشتک پتری قرار گرفتند (Vrain 1977). تخم‌های جمع شده در سطح الک ۵۰۰ مش، هم‌چنین لاروها سن دوم درون تشتک‌های پتری جمع‌آوری و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

ب) جداسازی باکتری از فراریشه گیاهان

برای جداسازی باکتری‌های موجود در فراریشه گیاهان، نمونه‌برداری از گلخانه خیار، مزرعه گوجه‌فرنگی و درخت سرو آلوده به نماتود مولد غده، به ترتیب از مناطق گرمسار، مرودشت و شیراز، هم‌چنین گندم، چمن و سرو سالم از منطقه باجگاه در شیراز انجام گرفت. نمونه‌برداری از ریشه و مقداری خاک اطراف آن انجام شد.

جهت جداسازی باکتری‌های موجود در فراریشه گیاهان، ابتدا ریشه گیاهان به قطعات ۲-۳ سانتی‌متری خرد شدند. یک گرم از ریشه‌های خرد شده به لوله آزمایشی که داخل آن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار داشت، اضافه شد. ترکیب حاصل به مدت یک ساعت بر روی دستگاه تکان‌دهنده گذاشته شد. بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در یک محل ثابت قرار داده شد تا دو فاز تشکیل دهد. سپس از رونشین به وجود آمده سری رقت تهیه شده و به وسیله لوپ روی محیط کشت Nutrient agar (NA) کشت داده شد. ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°C نگهداری شد. پس از آن با توجه به شکل ظاهری و رنگ پرگنه‌ها خالص‌سازی انجام شد. به این ترتیب که تک پرگنه‌های رشد یافته بر روی محیط کشت به صورت نواری بر روی تشتک پتری حاوی NA کشت داده شدند. این عمل آن قدر ادامه یافت تا در هر تشتک پتری پرگنه‌های باکتریایی یکنواخت به دست آمد. در نهایت تعداد ۳۶ جدایه از فراریشه گیاهان مذکور جداسازی شد (Schaas *et al.* 2001). علاوه بر آن، از چهار سویه موجود در بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز (کدهای ۳۷-۴۰ شامل به ترتیب *Burkholderia cepacia*، *Bacillus subtilis*، *Streptomyces* sp. و *Pseudomonas fluorescens* CHAO اهدایی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران-) نیز استفاده گردید.

ج) بررسی‌های آزمایشگاهی

۱. بررسی تأثیر سویه‌های باکتری‌ها بر تفریخ تخم *M. javanica*

حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ تخم نماتود در سه تکرار داخل تشتک پتری ریخته شد. تخم‌ها حداکثر دو ساعت پس از استخراج مورد استفاده قرار گرفتند. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ cfu/ml هر یک از چهل سویه باکتری به آنها اضافه گردید. برای تعیین غلظت دقیق باکتری‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری گردید. در تشتک شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. تخم‌ها تا حداکثر دو ساعت پس از استخراج مورد استفاده قرار گرفتند. تشتک‌های پتری در دمای $۲۷\pm۲^{\circ}C$ نگهداری شده و پس از گذشت سه و هشت روز تعداد لاروهای سن دوم و تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش گردید. هر سویه در سه تکرار آزمایش شد (Siddiqui & Shakeel 2007).

۲. بررسی تأثیر سویه‌های باکتریایی بر مرگ و میر لارو سن دوم *M. javanica*

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ cfu/ml از هر سویه باکتری داخل تشتک‌های پتری حاوی حدود ۵۰-۷۰ لارو سن دوم تازه تفریخ شده نماتود ریخته شد. در تشتک شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. برای هر سویه باکتری سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌ها در دمای $۲۷\pm۲^{\circ}C$ نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد لاروهای مرده با استفاده از استرئومیکروسکوپ شمارش شد و درصد مرگ و میر لاروها مشخص گردید. برای اطمینان از مرگ و میر لاروها با یک سوزن به آنها ضربه زده شد تا لاروهای بی‌حرکتی که شاید فقط غیرفعال شده بودند جزو نماتدهای مرده محسوب نشوند (Cayrol *et al*. 1989).

۳. آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای جهت تشخیص سویه‌های باکتریایی

جهت تشخیص سویه‌های باکتری که بهترین نتیجه را در مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتودها داشتند، از آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی نظیر آزمون‌های گرم (Suslow *et al.* 1982)، اکسیداز (Kovacs 1956)، کاتالاز (Lelliot *et al.* 1966)، لوان، ایجاد رنگ فلورسنت، تولید رنگ سبز متالیک روی محیط کشت EMB، تولید رنگ زرد بر روی محیط کشت YDC، رشد در $۴۰^{\circ}C$ (Schaad *et al.* 2001)، واکنش فوق حساسیت روی توتون (Klement *et al.* 1964)، رشد هوازی و بی‌هوازی (Hugh & Leifson 1953) و تولید اسید از قندها (Fahy & Hayward 1983) و سایر آزمون‌ها استفاده گردید.

د) آزمون گلخانه‌ای

۱. بررسی تأثیر سویه‌های باکتری بر فعالیت *M. javanica* بر روی خیار رقم Super Amelia در خاک سترون و غیرسترون

۱.۱. خاک سترون: برای انجام این آزمون در هر گلدان ۱/۵کیلوگرمی چهار بذر خیار رقم Super Amelia F_1 در خاک سترون (یک قسمت خاک و سه قسمت ماسه) کاشته شد. قبل از مایه‌زنی، گیاهچه‌های اضافی حذف و در هر گلدان فقط دو گیاهچه نگاه داشته شد. جهت مایه‌زنی یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ cfu/ml از هر سویه باکتری (شماره‌های ۲، ۳، ۴، ۱۰، ۱۱، ۳۰، ۳۱، ۳۷، *B. subtilis* و CHAO) به گیاهچه‌های سه هفته‌ای خیار اضافه شد. به این ترتیب که حفره‌ای به عمق ۳-۴ سانتی‌متر بین دو گیاهچه ایجاد و سوسپانسیون باکتری به منطقه ریشه دو گیاهچه اضافه گردید. در گلدان‌های شاهد به جای

سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. پس از گذشت هفت روز ۵۰۰۰ تخم و لارو سن دو نماتود/کیلوگرم خاک به هر گلدان اضافه گردید. گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دمای ۳۵-۲۰°C به مدت ۴۵ روز نگهداری شدند. آبیاری بر اساس نیاز گیاه انجام شد. هم‌چنین به دلیل فقیر بودن خاک مورد استفاده، در طول دوره رشدی گیاه دو مرتبه به فاصله ده روز، از محلول کود شیمیایی مستر ۱۰:۱۰:۱۰ (N:P:K) به نسبت یک در هزار همراه با آب آبیاری به خاک گلدان‌ها اضافه گردید. آزمایش در ۱۱ تیمار و پنج تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از گذشت زمان مذکور گلدان‌ها به آزمایشگاه منتقل و شاخص‌های طول شاخساره، وزن تر و خشک شاخساره، وزن تر ریشه، شاخص گال، تعداد گال، تعداد کیسه تخم، تعداد تخم/گرم بافت ریشه و نیز فاکتور تولیدمثل (جمعیت اولیه، P_i / جمعیت نهایی نماتود، P_f) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲.۱. خاک غیرسترون: این آزمون مانند قسمت قبل انجام گرفت با این تفاوت که از خاک مزرعه غیرسترون همراه با ماسه (به نسبت یک به سه) استفاده شد.

۲. بررسی تأثیر کاربرد همزمان سویه‌های باکتری بر فعالیت *M. javanica* بر روی خیار رقم Super Amelia در خاک غیرسترون و رقم Royal در خاک سترون

۱.۲. خیار رقم Royal در خاک سترون: در این آزمون از سه سویه باکتری (شماره CHAO ، *B. subtilis* و ۲) ، به صورت مجزا و یا ترکیب دو و سه‌تایی آنها استفاده گردید. سویه شماره ۲ به دلیل اثر بهتر در بررسی‌های آزمایشگاهی و سویه‌های CHAO و *B. subtilis* به دلیل گزارش‌های پیشین (Khan & Tarannum 1999، Kokalis-Burelle & Samac 2003، Siddiqui *et al.* 2001، Siddiqui & Shakeel 2007، Siddiqui & Shoukat 2003) مبنی بر کنترل نماتود ریشه‌گرهی در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. در گلخانه در پای هر بوته خیار سه هفته‌ای در خاک سترون شنی لومی (یک قسمت خاک و دو قسمت ماسه) حفره‌ای به عمق ۴-۳ سانتی‌متر ایجاد و یک میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون 10^8 cfu/ml باکتری به گلدان‌های ۱/۵ کیلوگرمی اضافه شد.

یک هفته بعد ۵۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتود/کیلوگرم خاک به هر گلدان مایه‌زنی شد. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. پس از گذشت ۴۵ روز گلدان‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و شاخص‌های مربوط به گیاه و نماتود مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش با چهار تیمار، شامل سویه‌های ۲ و *B. subtilis* و CHAO و *B. subtilis* + CHAO و ۲ + CHAO و *B. subtilis* + ۲ و *B. subtilis* + CHAO + ۲، و پنج تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

۲.۲. خیار رقم Super Amelia در خاک غیرسترون: این آزمایش مانند قسمت قبل انجام گرفت. با این تفاوت که در این‌جا از خیار رقم سوپرآملیا و خاک غیرسترون استفاده گردید. علاوه بر آن فقط از ترکیب دو و سه تایی سویه‌های ۲، *B. subtilis* و CHAO استفاده گردید.

هـ) محاسبات آماری

داده‌های آزمون بررسی تأثیر سویه‌های باکتریایی بر مرگ و میر لارو سن دوم در قالب تجزیه واریانس اندازه‌گیری‌های تکرار شده (Repeated measures ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه آماری شدند و میانگین‌ها با آزمون LSD، جهت انتخاب مؤثرترین سویه‌های باکتریایی مقایسه شدند. تجزیه آماری متغیرهای اندازه‌گیری آزمون‌های گلخانه‌ای یعنی شاخص‌های

رویشی گیاه (طول شاخساره، وزن تر شاخساره، وزن خشک شاخساره و وزن تر ریشه) به روش تجزیه واریانس و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. در مورد شاخص‌های تعداد گال و کیسه تخم از روش خطی تعمیم یافته (generalized linear models) و برای تعداد تخم در هر گرم ریشه و فاکتور تولیدمثل نیز از روش غیرپارامتری آزمون رتبه‌ای ویلکوکسون (Wilkoxon rank test) و نرم‌افزار SAS استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد. لازم به ذکر است از آن جایی که داده‌های مربوط به آزمون‌های تأثیر سویه‌های باکتری‌های فراریشه بر تفریخ تخم و هم‌چنین مرگ و میر لاروهای سن دو به صورت درصد محاسبه شده بودند، جهت نرمال‌سازی آنها از تبدیل ArcSin√X استفاده گردید. بنابراین مقادیر میانگین‌های مقایسه شده بر روی شکل و جدول داده‌های تبدیل شده می‌باشند.

نتایج

الف) آماده‌سازی جمعیت نماتود و باکتری

با بررسی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتود ماده خالص‌سازی شده، گونه مورد مطالعه *M. javanica* تشخیص داده شد. پس از کشت و خالص‌سازی باکتری‌ها با توجه به شکل ظاهری و رنگ پرگنه‌ها ۳۶ سویه خالص باکتری به دست آمد. از این تعداد، ۱۲ سویه از گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده از مرودشت، (کدهای ۱-۱۲)، دو سویه از سرو سالم باجگاه (کدهای ۱۳ و ۱۴)، سه سویه از چمن سالم باجگاه (کدهای ۱۵-۱۷)، هفت سویه از مزرعه گندم سالم باجگاه (کدهای ۱۸-۲۴)، پنج سویه از سرو آلوده شیراز (کدهای ۲۵-۲۹) و هفت سویه از خیار آلوده گرمسار (کدهای۳۰-۳۶) حاصل شد.

ب) بررسی‌های آزمایشگاهی

۱. بررسی تأثیر سویه‌های باکتری بر تفریخ تخم *M. javanica*

جدول تجزیه واریانس آزمون بررسی تأثیر سویه‌های باکتری بر تفریخ تخم‌های نماتود مولد غده پس از گذشت سه و هشت روز، نشان می‌دهد که اثر هر کدام از فاکتورهای زمان، سویه‌های باکتری و نیز اثر متقابل آن‌ها بر تفریخ تخم‌های نماتود در سطح ۱٪ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج حاصل از تأثیر سویه‌های باکتری بر درصد لارو سن دوم تفریخ شده *M. javanica* در شکل ۱ نشان داده شده است. مؤثرترین سویه‌های باکتری به ترتیب شامل سویه‌های شماره ۳۰، ۲، ۳، CHAO ، ۱۱ و ۱۰ می‌باشد.

۲. بررسی تأثیر سویه‌های باکتریایی بر مرگ و میر لاروهای سن دوم *M. javanica*

تعداد لاروهای شمارش شده بین تیمارهای سویه باکتری، هم‌چنین تعداد لارو شمارش شده در زمان‌های مختلف در هر سویه تفاوت معنی‌داری نشان داد. به علاوه اثر متقابل زمان × سویه که نشانگر روند تغییر جمعیت لاروهای سن دوم تیمار شده با سویه‌های مختلف در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی است نیز از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). این بدین معنی است که روند تغییر جمعیت لاروهای شمارش شده در هر تیمار یکسان نمی‌باشد. نتایج حاصل از تأثیر سویه‌های باکتری بر مرگ و میر لارو سن دوم *M. javanica* نشان می‌دهد مؤثرترین سویه‌های باکتری به ترتیب شامل سویه‌های شماره ۲، ۳۰، ۳، CHAO ، ۳۱، ۱۱، ۱۰، ۴، ۲۳ و ۲۰ می باشد (شکل ۲). از آن جایی که رنگ و شکل ظاهری پرگنه سویه‌های شماره ۲۳ و ۲۰ به سویه شماره ۲ بسیار شباهت داشت، بنابراین این دو سویه حذف و سویه‌های شماره ۳۷ و *B. subtilis*

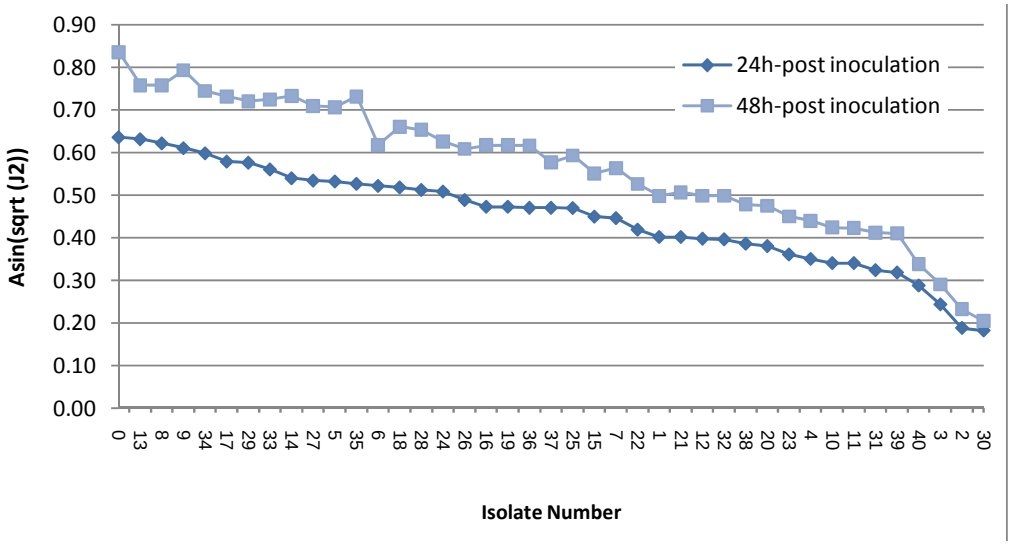
جدول ۱. تجزیه واریانس اثر زمان و اثر متقابل زمان و سویه‌های باکتری بر تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه

Table 1. The analysis of variance on the effects of time and time-rhizobacteria isolate interaction on hatching of *Meloidogyne javanica* eggs under laboratory condition

F value	میانگین مجموع‌مربعات Mean squares	مجموع‌مربعات Sum of squares	درجه‌آزادی Degree of Freadom	منابع تغییرات Source of variation
2557.965**	0.655	0.655	1	Time
13.759**	0.004	0.141	40	Time × rhizobacteria isolate
-	0.00	0.021	82	Error

**: بر حسب آزمون LSD در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است.

= significant at P≤0.01



شکل ۱. تأثیر سویه‌های باکتری‌های فراریشه بر درصد لارو سن دو تفریخ شده *Meloidogyne javanica*

Fig. 1. The effect of isolates of rhizobacteria on the hatching percentage of *Meloidogyne javanica* eggs

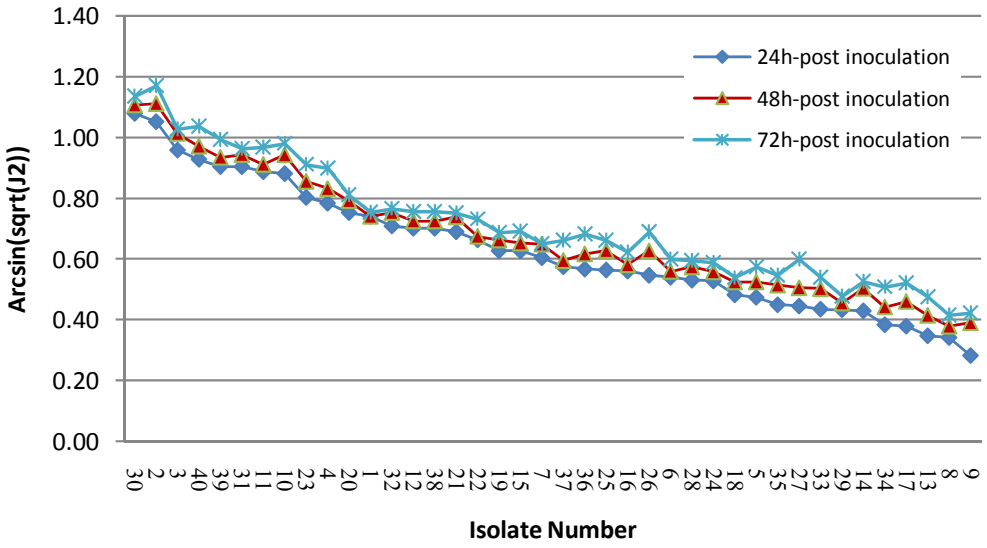
جدول ۲. تجزیه واریانس اثر زمان و اثر متقابل زمان و سویه‌های باکتری بر روی مرگ و میر لارو سن دوم نماتود *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه

Table 2. The analysis of variance on the effects of time and time-rhizobacteria isolate interaction on death of the second stage juvenil of *Meloidogyne javanica* under laboratory condition

F value	میانگین مجموع‌مربعات Mean squares	مجموع‌مربعات Sum of squares	درجه‌آزادی Degree of Freadom	منابع تغییرات Source of variation
714.664**	0.215	0.430	2	Time
3.278**	0.001	0.077	78	Time × rhizobacteria isolate
-	0.00	0.048	160	Error

**: بر حسب آزمون LSD در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است

= significant at P≤ 0.01



شکل ۲. تأثیر سویه‌های مختلف باکتری بر درصد مرگ و میر لاروهای سن دو *Meloidogyne javanica*

Fig. 2. The effect of isolates of bacteria on the death percentage of the second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*

به دلیل وجود گزارشات پیشین (Meyer *et al*. 2000, Kokalis-Burelle & Samac 2003, Siddiqui *et al*. 2001) مبنی بر کنترل نماتود مولد غده در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند.

۳. تشخیص جدایه‌های باکتری آنتاگونیست

براساس آزمون‌های انجام شده، به غیر از سویه شماره ۳۱ سایر باکتری‌های مورد بررسی در خانواده *Enterobacteriaceae* قرار می‌گیرند. این سویه یک گونه از جنس *Bacillus* است. سویه شماره ۲ یک گونه از جنس *Pantoea* و سویه شماره ۳۰ از جنس *Serratia* می باشد (جدول ۳).

ج) آزمون‌های گلخانه‌ای

۱. بررسی تأثیر سویه‌های باکتری بر فعالیت *M. javanica* بر روی خیار رقم Super Amelia در خاک سترون و غیرسترون

نتایج هر دو نوبت آزمون بررسی تأثیر سویه‌های باکتری (خاک سترون و غیرسترون) در جدول‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است.

۱.۱. تأثیر بر شاخص‌های رشدی گیاه: با انجام آزمون‌های چند متغیره مشخص شد سویه‌های باکتری از نظر تأثیر بر تمام صفات گیاهی مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند. همچنین تجزیه آماری تک متغیره بر روی طول شاخساره، وزن تر شاخساره، وزن خشک شاخساره و وزن تر ریشه در تمامی شاخص‌ها ($P = 0.000$، با درجه اطمینان بسیار بالا) نشان داد که تفاوت بین سویه‌ها معنی‌دار است (جدول ۴). همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد، بیشترین افزایش طول شاخساره مربوط به سویه‌های ۲، ۳، ۳۰ و *B. subtilis* در خاک سترون و سویه CHAO در خاک سترون و غیرسترون می‌باشد که مقادیر آنها نسبت به شاهد (بدون باکتری) نیز بالاتر است. از نظر طول شاخساره سویه‌های ۴، ۱۰، ۱۱و ۳۱ در خاک سترون و غیرسترون، سویه ۳۷ در خاک غیرسترون همچنین شاهد در یک سطح قرار گرفته‌اند.

جدول ۳. نتایج شناسایی باکتری‌های مورد بررسی

Table 3. The results of identification of rhizobacteria isolates

شماره سویه Isolate No.	میزبان Host	محل نمونه‌برداری Sampling sites	تشخیص نهایی Final identification
2	گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده	مرودشت	*Pantoa* sp.
3	گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده	مرودشت	عضو خانواده *Enterobacteriaceae*
4	گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده	مرودشت	عضو خانواده *Enterobacteriaceae*
10	گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده	مرودشت	عضو خانواده *Enterobacteriaceae*
11	گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده	مرودشت	عضو خانواده *Enterobacteriaceae*
30	خیار آلوده به نماتود مولد غده	گرمسار	*Serratia* sp.
31	خیار آلوده به نماتود مولد غده	گرمسار	*Bacillus* sp.
37	کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی	دانشگاه شیراز	*Burkholderia cepacia*
38	کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی	دانشگاه شیراز	*Bacillus subtilis*
40	اهدایی دانشگاه تهران	-	*Pseudomonas fluorescens* CHAO

وزن تر شاخساره در سویه‌های ۲، ۳، ۳۰ و CHAO در خاک سترون و غیرسترون، هم‌چنین سویه‌های ۳۱، ۳۷ و *B. subtilis* در خاک سترون در یک سطح قرار داشته و بالاتر از شاهد می‌باشند. وزن خشک شاخساره در سویه‌های ۲ و ۳۰ در خاک سترون، هم‌چنین سویه CHAO در هر دو خاک در یک سطح و بالاتر از شاهد قرار گرفته است. بالاترین وزن تر ریشه متعلق به سویه ۴ و شاهد در هر دو خاک، هم‌چنین سویه‌های ۱۰ و ۱۱ در خاک غیرسترون و کمترین وزن ریشه مربوط به سویه‌های ۲ و ۴ در هر دو خاک و سویه ۳۰ در خاک سترون می‌باشد.

۲.۱. تأثیر بر شاخص‌های نماتود: استفاده از سویه‌های باکتریایی موجب کاهش معنی‌دار ($P = 0.000$) شاخص‌های مربوط به نماتود شده است (جدول۵). شاخص گال در سویه‌های ۲، ۳۰ و CHAO در خاک سترون و غیرسترون، هم‌چنین سویه *B. subtilis* در خاک غیرسترون کمترین میزان بوده است. تعداد گال و تعداد کیسه تخم در گرم ریشه در سویه‌های ۲ ، ۳۰ و CHAO در خاک سترون و غیرسترون، هم‌چنین سویه‌های ۳ و *B. subtilis* در خاک غیرسترون کمترین میزان بوده است. به استثناء سویه ۳ در خاک سترون، سایر تیمارها از نظر تعداد گال و کیسه تخم در گرم ریشه، کمتر از شاهد و نسبت به آن دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

تعداد تخم در گرم ریشه در سویه‌های ۲ و CHAO در خاک سترون و غیرسترون، هم‌چنین سویه ۳۰ در خاک غیرسترون کمترین میزان بوده است. به استثناء سویه ۴ در خاک سترون، سایر تیمارها از این نظر کمتر از شاهد و نسبت به آن دارای اختلاف معنی‌داری هستند. فاکتور تولیدمثل در سویه‌های ۲ و CHAO در خاک سترون و غیرسترون کمترین میزان بوده است و به استثناء سویه ۴ در خاک سترون، سایر تیمارها از نظر فاکتور تولیدمثل، کمتر از شاهد و نسبت به آن دارای اختلاف معنی‌داری هستند.

۲. بررسی تأثیر کاربرد همزمان سویه‌های باکتری بر فعالیت *M. javanica* بر روی خیار رقم Super Amelia در خاک غیرسترون و رقم Royal در خاک سترون

نتایج تأثیر کاربرد تلفیقی سویه‌های مؤثر در آزمایشات قبلی بر شاخص‌های رشدی دو رقم خیار و شاخص‌های نماتود در جداول ۶ و ۷ ارائه شده است

۱.۲. تأثیر بر شاخص‌های رشدی گیاه: نتایج نشان می‌دهد به استثناء وزن تر ریشه و طول شاخساره رقم رویال در تیمار *B. subtilis* + ۲، تأثیر ترکیب‌های مختلف سویه‌های باکتری بر شاخص‌های رشدی هر دو رقم خیار از نظر آماری به یک اندازه می‌باشد. وزن تر ریشه و طول شاخساره رقم رویال در همه تیمارها به یک اندازه است و از نظر آماری با شاهد اختلافی ندارد. هم‌چنین وزن تر شاخساره این رقم در تیمارها با شاهد اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشته، منتها بیشترین وزن خشک شاخساره در تیمارهای *B. subtilis* + ۲، CHAO و ترکیب آن با سایر تیمارها مشاهده می‌شود. وزن تر و خشک شاخصاره رقم سوپرآملیا در ترکیب سویه‌های باکتری به یک اندازه می‌باشد (جدول ۶).

۲.۲. تأثیر بر شاخص‌های نماتود: استفاده از سویه‌های باکتری به تنهایی و یا به صورت تلفیقی باعث کاهش معنی‌داری همه شاخص‌های نماتود در رقم رویال شده است. در این رقم پائین‌ترین شاخص گال در ترکیب‌های دارای سویه CHAO حاصل شده است. هم‌چنین کاربرد تلفیقی سویه‌ها باعث کاهش این شاخص در رقم سوپرآملیا گردیده است (جدول ۷). در رقم رویال کمترین تعداد گال و کیسه تخم در ترکیب‌های دارای سویه CHAO حاصل شده است. هم‌چنین کاربرد تلفیقی سویه‌ها باعث کاهش این شاخص‌ها در رقم سوپرآملیا گردیده است. کمترین تعداد تخم در گرم ریشه و فاکتور تولیدمثل نماتود رقم رویال در تیمارهای *B. subtilis* + CHAO و CHAO + *B. subtilis* +۲ و در رقم سوپرآملیا در ترکیب سه‌تایی سویه‌ها مشاهده می‌شود. در این تیمارها میزان کاهش تعداد تخم در گرم ریشه و فاکتور تولیدمثل در رقم سوپرآملیا نسبت به رویال بیشتر بوده است.

بحث

یکی از روش‌های کاهش جمعیت نماتودها در خاک جلوگیری از تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای مهاجم است. بررسی تأثیر سویه‌های باکتری‌های فراریشه بر تفریخ تخم و مرگ و میر لارهای سن دوم نماتود ریشه گرهی، *M. javanica*، نشان داد که سویه‌های باکتری این پتانسیل را دارند، منتها میزان تأثیر سویه‌های مختلف یکسان نیست. بالاترین و پایدارترین تأثیر بر تفریخ تخم، به ترتیب مربوط به سویه‌های ۲ (*Pantoa* sp.)، ۳۰ (*Serratia* sp.)، ۳ (از اعضای خانواده *Enterobacteriaceae*) و ۴۰ (*Pseudomonas fluorescens* CHAO) می‌باشد. سایر ایزوله‌ها تأثیر کمتری داشته و با گذشت زمان از سه روز به هشت روز از تأثیرشان کاسته و تعداد تخم‌های تفریخ شده افزایش یافته است. این نتایج با آزمایش‌های انجام شده توسط سایر پژوهشگران تطابق دارد. در یک بررسی نشان داده شده است قرار دادن تخم‌های نماتود *M. graminicola* در مقابل متابولیت‌های ثانویه باکتری *Bacillus megatenium* موجب کاهش بیش از ۶۰٪ تفریخ تخم نماتود نسبت به شاهد شده است (Padgham & Sikora 2007). هم‌چنین صاف شده کشت *B. firmus* باعث کاهش تفریخ تخم *M. incognita* (Mendoza *et al*. 2008) و صاف شده کشت باکتری *Pseudomonas oryzihabitans* موجب بازدارندگی

جدول۴. اثر سویه‌های باکتری بر روی شاخص‌های رویشی گیاه خیار رقم سوپرآملیا آلوده به *Meloidogyne javanica* در خاک سترون (۱) و غیر سترون (۲)

Table 4. The effect of several rhizobacteria isolates on growth of infected cucumber, cultivar Super Amelia, with *Meloidogyne javanica* in sterilized (1) and unsterilized (2) soils

سویهٔ باکتری Bacteria isolate	وزن تر ریشه (گرم) Root fresh weight (g.)		وزن خشک شاخساره (گرم) Shoot dried weight (g.)		وزن تر شاخساره (گرم) Shoot fresh weight (g.)		طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot height (cm.)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	9.08a	7.73a	1.70e	2.28g	20.73c	20c	18.8e	14.2f
2	3.94gh	6.01f	3.36ab	2.46g	31.08a	38.19abc	22ab	22b
3	5.06ef	7.08de	3bc	3.63de	29.41a	28.02abc	20.6abcd	17.4cde
4	8.78ab	7070a	1.94de	2.46g	22.15c	20.86c	19e	14.8f
10	8.23bc	7.64ab	2.43cde	2.94f	23.65bc	21.22c	19.2de	15.2def
11	7.61c	7.55abc	2.12de	3.15ef	22.9c	23.05c	19.8cde	15.4def
30	4.39fgh	6.71e	3.24ab	4.22bc	30.63a	31.79ab	21.6abc	19.6bc
31	6.35d	7.31bcd	2.58bcd	3.20ef	27.45ab	25.95bc	19.8cde	16def
37	5.63e	7.25cd	2.99bc	3.40def	28.06a	25.72bc	20.2bcd	16def
38	4.67fg	6.99de	3.13bc	3.84cd	29.56a	21.62c	21abcd	17.8cd
40	3.77h	5.72f	3.92a	5.14a	30.97a	36.16a	22.2a	24.8a

اعداد میانگین پنج تکرار است

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند

- Data are means of five replications
- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P = 0.01)

تفریخ تخم نماتودهای مولد غده ریشه در شرایط in vitro گردید (Vagelas *et al.* 2007).

بیشترین مرگ و میر لاروهای سن دوم، همانند تفریخ تخم، به ترتیب مربوط به سویه‌های ۲ (*Pantoa* sp.)، ۳۰ (*Serratia* sp.)، ۳ (گونه‌ای از *Enterobacteriaceae*) و ۴۰ (*P. fluorescens* CHAO) می‌باشد. افزایش زمان موجب افزایش درصد مرگ و میر لاروها شده است. مؤثرترین سویه‌ها، از فراریشه گیاهان آلوده به نماتود ریشه‌گرهی جدا شده و فرض وجود تعامل بین نماتودهای ریشه‌گرهی و باکتری‌های آنتاگونیست موجود در فراریشه آنها تقویت می‌گردد. مرگ و میر لاروها می‌تواند به دلیل تولید مواد سمی، متابولیت‌های ثانویه و مواد آنتی‌بیوتیکی توسط سویه‌های باکتریایی مورد استفاده باشد. این نتایج با آزمایشات قبلی تطابق دارد. در یک بررسی نشان داده شده است سویه‌ای از *Streptomyces* قادر است روی عصاره مخمر آبجو مایع ترکیبات سمی تولید و تفریخ تخم و فعالیت لاروهای سن دوم نماتود *M. javanica* را کاهش دهد (Meyer *et al.* 2005). هم‌چنین قرار دادن *M. javanica* در صاف شده کشت *P. fluorescens* سبب کاهش تفریخ تخم و افزایش قابل توجه مرگ و میر لاروها شده است (Siddiqui & Shoukat 2003). در آزمایشی دیگر صاف شده کشت باکتری (استرین Bc-2)

جدول۵. اثر سویه‌های باکتری بر روی شاخص‌های *Meloidogyne javanica* بر روی گیاه خیار رقم سوپرآملیا در خاک سترون (۱) و غیرسترون (۲)

Table 5. The effect of rhizobacteria isolates on indices of *Meloidogyne javanica* on cucumber, cultivar Super Amelia, in sterilized (1) and unsterilized (2) soils

سویهٔ باکتری Bacteria isolate	شاخص گال Gall index		تعداد گال در گرم ریشه Galls/g of root		تعداد کیسه تخم در گرم ریشه Egg masses/g of root		تعداد تخم در گرم ریشه Egg No./gram of root		فاکتور تولیدمثل Reproductive factor	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
control	5a	5a	137.4a	127.4a	134a	123.2a	78400a	74940a	95.62a	77.35a
2	3.2c	3.36de	66.8gh	58.4f	64gh	54.2f	19150gh	19100f	9.98h	15.43fg
3	4.2b	3.8bcd	82def	73.8ef	78.8def	70.8ef	30120e	44160d	20.54ef	41.62d
4	4.8a	4.6a	121.6b	114ab	117.8b	107.8ab	68864ab	65360b	80.89ab	67.42b
10	4.6ab	4.4ab	116.2bc	103bc	111.8bc	96.8bc	65576bc	59380bc	72.87bc	60.62b
11	4.8a	4.4ab	108c	95.4cd	104.6c	88.6cd	61138c	67500b	62.78c	67.92b
30	3.6c	3.2de	70.8fgh	62.2f	68.4fgh	58f	21400gf	21460f	12.55g	19.35f
31	4.6ab	3.8bcd	91.8d	94cd	89.2d	86cde	43560d	53920c	37.56d	52.54c
37	4.4ab	3.8bcd	84.6de	83.8de	81.8ed	79e	34310de	35116de	26.09de	33.97e
38	3.8b	3.2de	78.2efg	63.2f	75.8efg	59.4f	24120f	30780e	15.22gf	28.78e
40	3.2c	3e	61.4h	56.4f	59.4h	53f	16640h	17320f	8.48h	13.27g

اعداد میانگین پنج تکرار است

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند

- Data are means of five replications
- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P = 0.01)

Burkholderia cepacia موجب بازدارندگی تفریخ تخم و حرکت لارو سن دوم نماتود *M. incognita* در شرایط آزمایشگاهی شده است. به دلیل فقدان فعالیت کیتیناز و پروتئاز قابل تشخیص و بازدارندگی تفریخ تخم در قطعات با وزن مولکولی پائین در صاف شده کشت Bc-2 پیشنهاد شده است که فعالیت بازدارندگی در صاف شده کشت Bc-2 در طبیعت غیرآنزیمی است. شاید تفریخ تخم و حرکت لاروهای سن دوم در این شرایط تحت تأثیر تولید مواد آنتی‌بیوتیک باشد (Meyer *et al*. 2000).

تأثیر سویه‌های مختلف باکتری بر شاخص‌های رشدی گیاه یکسان نیست. نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد اکثر سویه‌های باکتری موجب افزایش رشد گیاه و کاهش خسارت ناشی از نماتود مولد غده *M. javanica* در گیاهان تیمار شده نسبت به شاهد گردیده است. میزان افزایش رشد بسته به سویه باکتری و شرایط محیطی از جمله نوع خاک متفاوت است. بیشترین افزایش طول، وزن تر و خشک شاخساره عمدتاً مربوط به سویه‌هایی است که بیشترین تأثیر بر تفریخ تخم و مرگ و میر لاروها داشته‌اند. در مورد وزن تر اندام هوایی در بیشتر تیمارها نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. این موضوع می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان رطوبت در اندام هوایی گیاهان مورد آزمایش باشد. اما در مقابل وزن خشک اندام هوایی را می‌توان به عنوان شاخص مناسبی برای این امر معرفی نمود. وزن تر ریشه در تیمارهایی که از نظر افزایش

جدول۶. اثر کاربرد همزمان سویه‌های باکتری‌های فراریشه بر شاخص‌های رویشی گیاه خیار آلوده به *Meloidogyne javanica* ، ارقام رویال (۱) و سوپرآملیا (۲) به ترتیب در خاک سترون و غیرسترون

Table 6. The effect of combination of rhizobacteria isolates on growth of infected cucumber with *Meloidogyne javanica*, cultivars Royal (1) and Super Amelia (2) in sterilized and unsterilized soils, respectively

سویهٔ باکتری Bacteria isolate	وزن تر ریشه (گرم) Root fresh weight (g.)		وزن خشک شاخساره (گرم) Shoot dried weight (g.)		وزن تر شاخساره (گرم) Shoot fresh weight (g.)		طول شاخساره (سانتی‌متر) Shoot height (cm.)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Control	6.9a	-	3.0c	-	29.9c	-	63.3a	-
2	6.5a	-	3.7bc	-	31.9abc	-	70.3a	-
38	6.7a	-	3.2c	-	30.7bc	-	68.0a	-
40	6. 5a	-	4.1ab	-	32.0abc	-	72.7a	-
38 + 2	6.2a	5.7a	4.2ab	5.2a	35.5ab	35.2ab	74.5a	28.0b
40 + 2	5.9a	5.6ab	4.5a	5.2a	36.8a	36.7ab	73.2a	28.8ab
38 + 40	5.6a	5.5ab	4.3ab	5.3a	36.1ab	39.6a	77.8a	30.6ab
2 + 38 + 40	5.3a	5.4b	4.7a	5.4a	34.9abc	40.0a	78.0a	31.8a

اعداد میانگین پنج تکرار است

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون برحسب آزمون دانکن در سطح ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

- Data are means of five replications
- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P = 0.01)

شاخص‌های رویشی و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتود مؤثر بودند، نسبت به شاهد کاهش یافت. وجود گال‌های حاصل از نماتود می‌تواند موجب افزایش وزن ریشه گیاهان تیمارشده با باکتری‌های با تأثیر کم گردد. به نظر می‌رسد باکتری‌های مؤثر با تجمع در منطقه فراریشه با گیاه ارتباط برقرار کرده و بر افزایش رشد آنها تأثیر دارند. هم‌چنین این ریزوباکترها احتمالاً به طور مستقیم (تثبیت ازت، تولید هورمون، افزایش دسترسی به عناصر غذایی) یا غیرمستقیم (تولید سیدروفورها، تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، رقابت بر سر غذا و مکان، القای مقاومت سیستمیک و کاهش اثر تنش‌های محیطی) موجب بهبود رشد گیاهان می‌شوند (Compant *et al.* 2005).

تأثیر سویه‌های مختلف باکتری بر شاخص‌های نماتود نیز یکسان نیست. نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای نشان داد بیشترین تأثیر بر شاخص گال، تعداد گال، کیسه تخم و تعداد تخم در گرم ریشه، هم‌چنین فاکتور تولیدمثل به طور عمده مربوط به سویه‌هایی است که بیشترین تأثیر بر تفریخ تخم و مرگ و میر لاروها داشته‌اند. کمترین شاخص‌های نماتود به ترتیب مربوط به سویه‌های ۴۰ (*P. fluorescens* CHAO) و ۲ (*Pantoa* sp.) می‌باشد که در خاک سترون و غیرسترون بیشترین تأثیر بر فعالیت نماتود داشته‌اند. علاوه بر آن‌ها سویه‌های ۳۰ (*Serratia* sp.) و ۳۸ (*B. subtilis*) نیز مؤثر بوده‌اند.

در مورد کاهش خسارت ناشی از نماتود نیز مکانیسم‌های متفاوتی وجود دارد. به طور مثال سویه شماره ۴۰ (*P. fluorescens*) به عنوان یکی از مؤثرترین، فعال‌ترین و غالب‌ترین باکتری‌های فراریشه، با اثر مستقیم

جدول۷. اثر کاربرد همزمان سویه‌های باکتری بر روی شاخص‌های *Meloidogyne javanica* بر روی گیاه خیار، ارقام رویال (۱) و سوپرآملیا (۲) به ترتیب در خاک سترون و غیرسترون

Table 7. The effect of combination of rhizobacteria isolates on indices of *Meloidogyne javanica* on cucumber, cultivars Royal (C1) and Super Amelia (C2) in sterilized and unsterilized soils, respectively

سویهٔ باکتری Bacteria isolates	شاخص گال Gall index		تعداد گال در گرم ریشه Galls/g of root		تعداد کیسه تخم در گرم ریشه Egg masses/g of root		تعداد تخم در گرم ریشه Egg No./gram of root		فاکتور تولیدمثل Reproductive factor	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Control	5.0a	-	168.0a	-	165.7a	-	74750a	-	68.8a	-
2	3.3bc	-	69.3bc	-	60.7bc	-	29050b	-	25.9b	-
38	3.5b	-	78.2b	-	76.2b	-	34425b	-	32.3b	-
40	3.2bc	-	63.8cd	-	60.8cd	-	21275c	-	19.4bc	-
38 + 2	3.2bc	3.2ab	60.8cde	55.4ab	57.7cde	51.8ab	19850c	16660a	16.1c	12.8a
40 + 2	2.8cd	3.0ab	56.8def	52.6ab	53.2def	49.4ab	16150cd	10268b	12.8cd	7.8b
38 + 40	3.0bcd	2.4b	50.5ef	45.8b	47.2ef	43.6b	11935de	6180c	8.8de	4. 6c
2 + 38 + 40	2.5d	2.2b	43.3f	43.8b	43.3f	42.0b	8700e	3790e	6.4e	2.7d

اعداد میانگین پنج تکرار است

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون برحسب آزمون دانکن در سطح ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند

- Data are means of five replications
- Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P = 0.01)

آنتاگونیستی بر بیمارگر، تولید آنتی‌بیوتیک، رقابت با بیمارگر برای مواد غذایی ضروری مثل آهن و نیز به صورت غیرمستقیم به رشد گیاه کمک می‌کند. احتمالاً این باکتری، فراریشه و ریشه را به طور مؤثر اشغال کرده و یک مقاومت سیستمیک را در گیاهان القاء می‌کند (Siddiqui & Mahmood 1998, Gamliel & Katan 1993). در حالی که در سویه شماره ۳۱ (*Bacillus* sp.) و ۳۸ (*B. subtilis*) ممکن است مقاومت سیستمیک القاء شده یا تحمل بیماری در میزبان افزایش یافته باشد (Kakalis-Burelle and Samac 2003). هم‌چنین *B. subtilis* توکسین bulbiformin تولید می‌کند که ممکن است مانع فعالیت نماتودهای انگل گیاهی شود (Khan & Tarannum 1999).

بررسی منابع موجود نشان داد با وجود این که باکتری جنس *Serratia* (سویه شماره ۳۰) به عنوان ریزوباکتر افزایش‌دهنده رشد گیاه شناخته شده (Glick *et al.* 2001)، اما تابحال گزارشی مبنی بر خاصیت آنتاگونیستی این باکتری در مقابل نماتودهای انگل گیاهی وجود نداشته است. این پژوهش نشان داد که این ریزوباکتر پس از *P. fluorescens* CHAO و *Pantoea* sp. با ۵۱/۱۷٪ کاهش تعداد گال و ۸۵٪ وزن خشک اندام هوایی مؤثرترین باکتری در مقابل کاهش خسارت ناشی از نماتود مولد غده *M. javanica* در بین سویه‌های مورد آزمایش می‌باشد. نتایج به دست آمده در این بررسی با نتایج حاصل از سایر تحقیقات، از جمله کاهش گال‌زایی *M. incognita* بر روی خیار و گوجه فرنگی توسط ۳۵۴ سویه باکتری فراریشه گیاهان (Becker *et al.* 1988)، افزایش رشد لوبیای سودانی و کاهش گال‌های ناشی

از *M. incognita* بـر روی آن توسـط پـنج سـویه از *Bacillus* sp. (Siddiqui & Shakeel 2007)، کـاهش تولید گال *M. incognita* بر روی فلفل و خربـزه توسـط *B. subtilis* (Kokalis-Burelle & Samac 2003)، مطابقت داشت.

براساس نتایج حاصـل از کـاربرد همزمـان سـویه‌هـای باکتریایی در دو رقم مورد آزمایش موجب افزایش رشـد و کاهش معنی‌دار شاخص‌های نماتود در گیاهان تیمـار شـده نسبت به گیاهان شاهد شد. کاربرد هر سه سویه با هـم اثـر بیشتری نسبت به کاربرد آنها بـه صـورت دوتـایی داشـت. نتایج به دست آمده از این آزمـون و بررسـی منـابع نـشان می‌دهد که استفاده تؤام ار باکتری‌های آنتاگونیست نه تنهـا در مکانیسم عمل آنها تداخلی ایجاد نمی‌کند بلکـه ممکـن اسـت موجـب اثـر سینرژیـستی یـا تـشدیدکنندگی ایـن مکانیسم‌ها نیز گـردد. در هـر دو آزمـایش در مـورد تمـام شاخص‌های رویـشی و شـاخص‌هـای مربـوط بـه نمـاتود اختلاف معنی‌داری بـین تیمـاره ۴۰ (*P. fluorescens*) و تیمـــار ۲+۳۸ (*B. subtilis* +*Pantoa* sp) وجـــود نداشت. هم‌چنین در بیشتر شـاخص‌هـا بـین تیمـار ۴۰ (*P. fluorescens*) و اسـتفاده از ترکیـب بـاکتری‌هـا بـه صورت دوتایی تفاوت معنی‌داری دیـده نـشد. ایـن مـسأله می‌تواند به دلیل تأثیر بیشتر سـودوموناس‌هـای فلورسـنت نسبت به سایر باکتری‌های جدا شده از فراریشه گیاهان، در مقابل نماتود ریشه گرهی گونه *M. javanica* باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (29-27) متن انگلیسی مراجعه شود.