

اثر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر فعالیت نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به آن در شرایط گلخانه*

مهشید ساعدی^۱، اکبر کارگریده^{۱*} و سیدمحسن تقوی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۴)

چکیده

تأثیر کودهای شیمیایی بر فعالیت نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* و جدایه *Pseudomonas fluorescens* CHA0 در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کودهای شیمیایی باعث افزایش ۶۷/۰-۹۴/۸٪ مرگ‌ومیر لارو سن دو و کاهش ۴۳/۸-۸۰/۸٪ تفریح تخم نماتود نسبت به شاهد شدند ولی مانع رشد باکتری روی محیط کشت NA + کود و LB + کود نشدند. تأثیر کودهای شیمیایی در تلفیق با باکتری بر فعالیت نماتود و شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی رقم ارلی‌اربانا آلوده به آن، در سه آزمون مجزا در خاک سترون در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کودهای سوپرفسفات‌تریپل، گوگرد، سولفات روی و سولفات مس در تلفیق با باکتری باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی در مقایسه با شاهد شدند. در آزمون اول، کاربرد باکتری و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نیتروژن (منبع اوره) باعث کاهش ۵۴/۹٪ و ۶۷/۳٪ تعداد گال و کیسه تخم/گرم ریشه، و تیمار باکتری با ۱۰ میلی‌گرم فسفر باعث کاهش ۱۸٪ فاکتور تولیدمثل نماتود گردید. در آزمون دوم، تعداد گال و تعداد کیسه تخم/گرم ریشه در تیمار باکتری و پنج میلی‌گرم/کیلوگرم مس به ترتیب، ۸۳/۲٪ و ۸۰/۶٪ کاهش یافت. همچنین تیمار باکتری و نیتروژن ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش ۸۱/۷٪ فاکتور تولیدمثل گردید. در آزمون سوم تیمار باکتری و پنج میلی‌گرم/کیلوگرم مس به ترتیب، باعث کاهش ۷۴/۷٪ و ۸۱/۲٪ تعداد گال و تعداد کیسه تخم/گرم ریشه شد. همچنین تیمار باکتری و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نیتروژن باعث کاهش ۶۷/۷٪ فاکتور تولیدمثل گردید. بیشترین افزایش شاخص‌های رشدی گیاه و کاهش شاخص‌های نماتود از کاربرد باکتری و سولفات مس حاصل شد.

کلیدواژه: سولفات مس، نماتود انگل گیاهی، مدیریت

* بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شیراز

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

۱. به ترتیب دانش‌آموخته و استادان بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Effect of combined application of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers on the activity of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, and infected tomato plant in greenhouse*

M. Saedi¹, A. Karegar^{1**}, and S.M. Taghavi¹

(Received: 13.7.2016; Accepted: 24.4.2017)

Abstract

Effects of chemical fertilizers on *Meloidogyne incognita* activity and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 were studied in vitro. The results showed that the chemical fertilizers increased 67.0-94.8% mortality of the second stage juveniles and decreased 43.8-80.8% egg hatching of the nematode, but did not inhibit the bacterium growth on NA and LB culture + fertilizer. Effect of combined application of *P. fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers, on the activity of *M. incognita* and growth indices of infected tomato plant cv. Early Urbana was studied in greenhouse in three turns. Results showed that application of triple superphosphate, sulphur, zinc sulphate and copper sulphate in combination with *P. fluorescense* CHA0 significantly increased the growth parameters of tomato plants. In the first trial, combination of the bacterium with 50 mg/kg of nitrogen (urea) caused 54.9% and 67.3% reductions in galls and egg masses/gram of root, respectively, and with 10 mg/kg of phosphorus caused 18% reduction in reproduction factor (RF) of the nematode. In the second trial, the bacterium and 5 mg/kg of copper caused 83.2% and 80.6% reductions in galls and egg masses/gram of root, respectively, and with 100 mg/kg of nitrogen caused 81.7% reduction in RF. In the third trial, the bacterium and 5 mg/kg of copper caused 74.7% and 81.2% reductions in galls and egg masses/gram of root, respectively, and with 100 mg/kg of nitrogen caused 67.6% reduction in RF. Combination of *P. fluorescens* CHA0 and copper sulphate was the best treatment in increasing tomato growth parameters and decreasing the nematode indices.

Keywords: copper sulphate, management, plant-parasitic nematode

* A Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

**Corresponding author's E-mail: karegar@shirazu.ac.ir

1. Graduated M.Sc. Student and Professors of Plant Pathology, respectively; Department of Plant protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

مقدمه

روش‌های مختلف است. در میان باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه موجود در فراریشه گیاه، گونه‌های جنس *Pseudomonas* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در سال‌های اخیر برخی از سودوموناس‌های فلورسنت فراریشه به دلیل دارا بودن توانایی حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و نماتود توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Hass & Defago 2005). از میان ۴۰ جدایه باکتری جدا شده از فراریشه تعدادی از گیاهان، تأثیر ۱۰ جدایه مؤثر از جمله *Pseudomonas fluorescens* CHA0 بر فعالیت *M. javanica* در خیار رقم سوپرآملیا بررسی گردید و باکتری *P. fluorescens* CHA0، به‌طور میانگین با کاهش ۵/۵۵٪ تعداد گال و ۰/۸۷٪ فاکتور تولیدمثل، به عنوان مؤثرترین جدایه شناخته شد (Majzoub et al. 2012). در پژوهشی دیگر اثر نه جدایه، شامل پنج جدایه از *P. fluorescens* و جدایه‌هایی از *Serratia sp.* و *B. brevis*، *Bacillus subtilis putida* همراه با جدایه *P. fluorescens* CHA0 بر فعالیت *M. incognita* در گوجه‌فرنگی رقم ارلی‌اوربانا بررسی و استفاده از رقت 10^4 CFU ml⁻¹ از سوسپانسیون باکتری‌ها در مخلوط خاک مزرعه و ماسه و خاک مزرعه سترون و غیرسترون، به‌طور معنی‌داری سبب کاهش گال‌زایی و فاکتور تولیدمثل نماتود و افزایش رشد رویشی گیاه در مقایسه با شاهد گردید. همچنین استفاده از خاک غیرسترون سبب کاهش بیشتر شاخص‌های نماتود در مقایسه با خاک سترون گردید. باکتری‌های *P. putida*، *P. fluorescens* (PF19) و *B. subtilis* مؤثرترین جدایه‌ها در کاهش جمعیت نماتود بودند (Behzadi Amin et al. 2014). در بررسی دیگر کنترل بیولوژیک نماتود ریشه‌گرهی *M. javanica* توسط جدایه *P. fluorescens* CHA0 در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در گیاه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) یکی از سبزیجات مهم در مناطق گرمسیری سراسر جهان می‌باشد. طبق آمار سازمان خواروبار جهانی (فائو) در سال ۲۰۱۴ سطح زیر کشت این محصول در ایران ۱۵۹۱۳۲ هکتار و میزان تولید آن ۵/۹۷ میلیون تن برآورد شده است (Anonymous 2017). نماتودهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne spp.*) از جمله بیمارگرهای مهم گوجه‌فرنگی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. گونه‌های مختلف این جنس به بیش از ۳۰۰۰ گونه مختلف گیاهان زراعی، باغی و زینتی، به خصوص در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیب می‌زنند (Sasser & Freckman 1987). نشانه‌های آلودگی ظاهری به نماتود ریشه‌گرهی ضعف عمومی، زردی برگ‌ها، علائم کمبود مواد غذایی، پژمردگی و در صورت آلودگی شدید مرگ گیاه میزبان است. روش‌های سنتی مدیریت نماتودها شامل پیشگیری، آیش و تناوب زراعی با گیاهان غیرمیزبان، استفاده از ارقام مقاوم، روش‌های فیزیکی از قبیل استفاده از نور خورشید، ضدعفونی با بخار آب و استفاده از نماتودکش‌ها می‌باشد (Pakeerathan et al. 2009). در مورد تأثیر اصلاح‌کنندگان آلی خاک در کاهش خسارت نماتودهای انگل گیاهی تحقیقاتی در دنیا انجام شده است. در یک تحقیق که بر روی تأثیر عناصر پرمصرف و کم‌مصرف از قبیل $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ و $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ علیه نماتود سیستی سویا در شرایط مزرعه و آزمایشگاه انجام گرفت، نشان داده شد که ترکیبات مورد آزمایش باعث کاهش بیش از ۹۰٪ تفریح تخم و کاهش معنی‌دار تولیدمثل گردیدند (Zheng et al. 2010). بهترین روش مبارزه با نماتودهای ریشه‌گرهی، تلفیق

خسارت نامتودهای ریشه‌گرهی و بهبود شاخص‌های رشدی گیاه آلوده به آن مؤثر باشد. تعداد پژوهش‌های انجام شده در این زمینه اندک است. در آزمون گلخانه‌ای تأثیر کاربرد تلفیقی کود سبز چهار گیاه به میزان ۱۲ گرم/کیلوگرم خاک و باکتری جدایه *P. fluorescens* با غلظت 10^8 cfu بر فعالیت نامتود ریشه‌گرهی *M. incognita* و رشد گوجه‌فرنگی رقم ارلی‌اوربانا نشان داد که در حضور نامتود و در خاک سترون تیمار گل جعفری-باکتری با ۶۶/۲ و ۶۰/۹٪ افزایش نسبت به شاهد، به ترتیب در وزن تر و خشک شاخساره بیشترین تأثیر را در فاکتورهای رشدی گیاه داشت. همچنین کود سبز منداب-باکتری با ۵۵/۲ و ۵۲/۴٪ کاهش در تعداد تخم و گال/گرم ریشه و ۶۵/۵٪ فاکتور تولیدمثل بیشترین تأثیر را داشتند (Amani Beni et al. 2016). در مطالعه‌ای دیگر اثرات کنترلی باکتری‌های *P. fluorescens* CHA0 و جدایه *Bacillus subtilis* Bs-5 همراه با دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نیتروژن از منبع اوره، بر روی شاخص‌های رویشی گیاه ماش سیاه (*Vigna mungo*) آلوده به نامتود ریشه‌گرهی مورد بررسی قرار گرفته است. در این بررسی بهترین عملکرد مربوط به تیمار باکتری *P. fluorescens* CHA0 همراه ۱۰۰ میلی‌گرم نیتروژن بوده است که باعث افزایش شاخص‌های گیاهی و کاهش تعداد گال نامتود و تعداد نامتود در خاک نسبت به شاهد گردیده است (Akhtar et al. 2013).

به منظور تکمیل مطالعات کاربرد تلفیقی باکتری‌های مؤثر در کنترل نامتوهای انگل گیاهی و کودهای شیمیایی، در این پژوهش استفاده توأم باکتری *P. fluorescens* CHA0 و تعدادی از کودهای شیمیایی بر فعالیت نامتود ریشه‌گرهی *M. incognita* و گیاه گوجه‌فرنگی رقم ارلی‌اربانانا آلوده به آن در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفته است.

گوجه‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه باکتری با رقت 10^9 CFU/ml، آلودگی به نامتود را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داده و سبب از بین رفتن کیسه تخم و کاهش تفریح تخم گردیده است. فعالیت آنزیم‌های مرتبط با مقاومت گیاه، شامل پراکسیداز (POX) و فنیل‌آلانین آمونیلیاز (PAL) در گیاهان تیمار شده با باکتری *P. fluorescens* افزایش یافته است (Tavakol Norabadi et al. 2014). فنیل‌آلانین آمونیلیاز که در فعالیت متابولیکی بسیاری از گیاهان عالی نشان داده شده است، یک آنزیم کلیدی در سنتز چندین ترکیب ثانویه مرتبط با دفاع گیاه از قبیل فنل‌ها و لگنین‌ها می‌باشد (Hemm et al. 2004).

استفاده از کودهای آلی و شیمیایی بر فعالیت نامتوهای ریشه‌گرهی و بهبود شاخص‌های رشدی گیاه آلوده به آن مؤثر است. در یک پژوهش استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم نیتروژن و ۱۰۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک از منابع اوره و سوپرفسفات تریپل، پنج میلی‌گرم روی و ۲/۵ میلی‌گرم آهن در کیلوگرم خاک از منابع سولفات روی و سبب بهترین آهنگ علاوه بر افزایش شاخص‌های رویشی گیاه، باعث کاهش تعداد کیسه تخم و تخم، گال و شاخص گال گردید (Charegani et al. 2010). استفاده از ۵۰ میلی‌گرم گوگرد در کیلوگرم خاک مزرعه پوشیده شده با پلاستیک به طور میانگین باعث افزایش ۳۶٪ وزن خشک شاخساره و ۱۱۴٪ وزن محصول خیار رقم نگین آلوده *M. incognita* نسبت به شاهد گردید. همچنین گوگرد ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم خاک جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل را به ترتیب ۷۰ و ۶۹٪ نسبت به شاهد کاهش داد (Rumiani et al. 2016).

کاربرد تلفیقی باکتری‌های مؤثر در کنترل نامتوهای انگل گیاهی و کودهای آلی و شیمیایی می‌تواند در کاهش

مواد و روش‌های بررسی

الف) آماده‌سازی نماتود، باکتری، خاک و کودهای شیمیایی

نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita*: به منظور تهیه نماتود مورد نیاز، جمعیت خالص *M. incognita* موجود در گلخانه بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز بر روی گوجه‌فرنگی رقم ارلی‌اوربانا (Early Urbana) تکثیر گردید. جهت تهیه لارو سن دو، سوسپانسیون تخم به دست آمده روی کاغذ صافی که درون یک الک کوچک قرار داشت، ریخته شد. این الک درون یک تشتک پتری حاوی آب مقطر استریل قرار داده و درون انکوباتور با دمای $25-27^{\circ}\text{C}$ قرار داده شد. تخم‌ها روی کاغذ صافی تفریخ شده و لاروهای سن دو پس از عبور از کاغذ صافی درون تشتک پتری قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محتویات داخل تشتک از الک ۴۰۰ مش (۳۸ میکرومتر) عبور داده شد و لاروها بر روی الک جمع‌آوری گردید (Barker 1985).

جدایه *P. fluorescens* CHA0: برای انجام آزمایشات از جدایه باکتری *P. fluorescens* CHA0 از کشور هلند، موجود در بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز استفاده گردید. جهت تأیید جدایه باکتری آزمون گرم، اکسیداز و تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت KB انجام شد (Schaad et al. 2001). برای همه آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از کشت ۲۴ ساعته این باکتری استفاده گردید.

تهیه خاک مورد نیاز و افزودن کودهای مورد نظر: خاک مورد نیاز از مخلوط خاک مزرعه و ماسه رودخانه‌ای منطقه سیوند استان فارس به نسبت دو به یک تهیه گردید. بدین منظور ابتدا خاک و ماسه مورد نظر پس از مرطوب کردن با استفاده از دستگاه ضدعفونی‌کننده خاک به صورت

جداگانه ضدعفونی و سپس مخلوط گردید. خاک تهیه شده با داشتن ۶۶/۵٪ ماسه، ۱۷/۱٪ سیلت و ۱۶/۴٪ رس، از نظر بافت در گروه خاک‌های لومی-شنی قرار داشت و از نظر شیمیایی، دارای $\text{pH} = 7/7$ ، $0/4\%$ نیتروژن کل، ۷ میلی‌گرم/کیلوگرم فسفر، ۲۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم پتاسیم، ۰/۳۸ میلی‌گرم/کیلوگرم روی، ۴/۰۲ میلی‌گرم/کیلوگرم آهن، ۰/۵۹ میلی‌گرم/کیلوگرم مس، ۱۴/۶۴ میلی‌گرم/کیلوگرم منگنز بود.

بر اساس آنالیز خاک و توصیه کودی مورد نیاز برای گوجه‌فرنگی، عناصر پرمصرف نیتروژن و فسفر، به ترتیب به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از منبع کود اوره $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ که حاوی ۴۶/۶٪ نیتروژن، و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم از منبع کود سوپرفسفات تریپل $(\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ که حاوی ۲۴/۶٪ فسفر است به خاک اضافه گردید. تیمارهای سولفات روی، سولفات مس، سکوسترین آهن حاوی مقادیری ناخالصی هستند که بر اساس درصد خلوص عناصر کودهای ذکر شده، این مقادیر برای هر کدام به دقت اندازه‌گیری شد و از کود پایه‌ای که می‌بایست به تیمارها افزوده شود، کسر شد. برای افزودن کودها به خاک ابتدا مقدار کود مورد نیاز برای هر گلدان محاسبه گردید و به حجم مشخصی از آب اضافه و به خاک افزوده شد. برای اختلاط صحیح کود با خاک، به سوسپانسیون کود فرصت کافی داده شد که برای مدتی در سطح خاک باقی بماند تا به صورت کامل خشک شده و یک لایه‌ی جداگانه را در سطح خاک تشکیل دهد. سپس لایه‌ی مورد نظر شکسته شد و به طور یکنواخت با لایه‌های زیرین خاک درون گلدان مخلوط گردید. گوگرد قابل حل در آب نیست. بنابراین تیمارهای مربوط به گوگرد بایستی قبل از کشت، به صورت مستقیم و بدون حل شدن در آب، به خاک افزوده شوند. برای سهولت کار و توزیع

جدول ۱. تأثیر کودهای شیمیایی بر تفریح تخم و مرگومیر لاروهای سن دو نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* در شرایط آزمایشگاهی.

Table 1. Effect of chemical fertilizers on egg hatching and mortality of the second stage juveniles of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in vitro.

Treatments	Unhatched eggs (%)	Dead juveniles (%)
Control (distilled water)	17.50 e	0.25 f
Cu (5)*	98.25 a	95.00 a
Zn (5)	91.25 ab	94.25 ab
Zn (10)	93.00 ab	90.00 bc
Fe (2.5)	89.00 b	82.75 d
Fe (5)	93.00 ab	89.25 bc
N (50)	90.50 ab	94.25 ab
N (100)	77.50 c	94.00 ab
P (10)	92.00 ab	89.50 bc
P (20)	92.75 ab	85.25 cd
S (50)	96.25 ab	89.50 bc
S (100)	61.25 d	67.25 e

*: سطوح مختلف (میلی گرم/۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر) عناصر غذایی Cu, Fe, Zn, N, P و S به ترتیب از منابع سولفات مس، سکوسترین آهن، سولفات روی، اوره، سوپرفسفات تریپل و گل گوگرد.

اعداد میانگین چهار تکرار است. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

*: Different levels (mg/300 ml distilled water) of nutrient elements Cu, Fe, Zn, N, P and S respectively, from sources of copper sulfate, Sequestrene (iron chelate), zinc sulfate, urea, triple super phosphate and sulfur powder.

Data are means of four replicates. Values followed by the same letters in each column are not significantly different, according to Duncan's multiple-range test (P=0.05).

۲- تأثیر کودهای شیمیایی بر روی رشد جدایه

Pseudomonas fluorescens CHA0 برای انجام این آزمون ابتدا با استفاده از مقادیر معین کودهای اوره، سوپرفسفات تریپل، سولفات روی، سولفات مس، سکوسترین آهن و گوگرد با استفاده از آب مقطر سوسپانسیون تهیه شد و آزمون به دو روش ادامه یافت:

۱- محیط کشت NA تهیه شد و همزمان با ریختن آن، سوسپانسیون کودهای مختلف نیز به تشتک‌های پتری

یکنواخت‌تر گوگرد در خاک، خاک‌های مربوط به تکرارهای یک تیمار درون کیسه‌ای ریخته شد و کود مورد نیاز برای کل کیسه، محاسبه و به کیسه افزوده شد و به طور کامل مخلوط شد. به منظور جلوگیری از آیشویی احتمالی و ایجاد گیاه‌سوزی، کود اوره در یک مرحله قبل از کاشت و دو مرحله پس از رویش گیاه به خاک اضافه گردید.

ب) آزمون‌های آزمایشگاهی

۱- تأثیر کودهای شیمیایی بر تفریح تخم و مرگومیر لارو سن دو نماتود ریشه گرهی، *Meloidogyne incognita*

با استفاده از آب مقطر، از سطوح مختلف عناصر غذایی مورد استفاده در آزمایشات گلخانه‌ای از منابع اوره، سوپرفسفات تریپل، سولفات روی، سولفات مس، سکوسترین آهن و گل گوگرد (جدول ۱) سوسپانسیون تهیه شد. بدین منظور برای هر تیمار و هر سطح آن به میزان ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون آماده شد. لازم به ذکر است این حجم آب برابر حجم آبی است که خاک یک گلدان سه کیلوگرمی را کاملاً مرطوب کرده و از زیر آن خارج نشود. سپس مقدار چهار میلی لیتر از هر کدام از تیمارهای کودی را به طور جداگانه درون تشتک‌های پتری ریخته و یک میلی لیتر سوسپانسیون شامل 10 ± 100 تخم و یا لارو سن دو نماتود به هر کدام از آنها اضافه شد. در تشتک‌های شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۵-۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از گذشت ۲۴ ساعت تعداد لاروهای سن دو غیرفعال، و پس از سه روز تخم‌های تفریح نشده شمارش گردید. این آزمایش‌ها در یک نوبت و با چهار تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده به کمک نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس یک طرفه قرار گرفت.

شوند و یک لایه‌ی جداگانه را در سطح خاک تشکیل دهد. سپس لایه‌های مورد نظر شکسته و به طور یکنواخت با لایه‌های زیرین خاک درون گلدان مخلوط گردیدند. سپس نشاء‌های یک ماهه گوجه‌فرنگی که در خاک سترون کشت شده بودند، با دقت به آنها منتقل شدند.

آزمون‌های اول و دوم: در این آزمون‌ها از تیمارهای کودی شامل کود اوره در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰، سوپرفسفات تریپل در دو سطح ۱۰ و ۲۰، سولفات روی در دو سطح پنج و ۱۰، سولفات مس در سطح پنج، سکوسترین آهن در دو سطح ۲/۵ و پنج، و گل گوگرد دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم استفاده گردید. ۴۸ ساعت پس از استقرار کامل نشاء‌ها، به ازای هر کیلوگرم خاک، در آزمون اول ۱۰ میلی لیتر و در آزمون دوم ۱۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU (OD₆₀₀ ~ 1) در فاصله دو سانتی متری طوقه گیاهان مایه‌زنی شد. ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی باکتری به ازای هر گرم خاک دو تخم نماتود (۶۰۰۰ تخم/گلدان)، که به روش هوسی و جانس (Hussey & Janssen 2002) تهیه شده بود، در فاصله دو سانتی متری طوقه و در عمق دو تا سه سانتی متری خاک مایه‌زنی شد. بوته‌های گوجه‌فرنگی پس از مایه‌زنی در شرایط گلخانه نگهداری شدند. گلدان‌ها بر اساس نیاز هر دو تا سه روز یکبار آبیاری شدند. پس از گذشت دو ماه شاخص‌های گیاهی شامل، طول شاخساره، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، وزن تر ریشه و شاخص‌های نماتود شامل، تعداد گال و کیسه تخم و تعداد تخم در یک گرم و نیز در کل سیستم ریشه، تعداد لارو در خاک گلدان، فاکتور تولیدمثل و نیز شاخص گال (Taylor & Sasser 1978) مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی، هر کدام با شش تکرار انجام و ۶۰ روز پس از مایه‌زنی نماتود، برداشت

افزوده شد و با پیست کردن به خوبی با محیط کشت مخلوط گردیدند. سپس باکتری مورد نظر بر روی آن‌ها کشت داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، رشد باکتری را با نمونه شاهد که فاقد کود و فقط حاوی محیط کشت بود مقایسه گردید.

۲- از کشت ۲۴ ساعته باکتری *P. fluorescens* CHA0 که روی محیط KB رشد کرده است سوسپانسیونی در آب مقطر سترون تهیه شد. زیر هود میکروبیولوژی ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU (OD₆₀₀ ~ 1) به همراه هر کدام از سطوح تیمارهای کودی به طور جداگانه در لوله‌های آزمایش حاوی محیط مایع LB ریخته شد و لوله‌های آزمایش در دمای ۲۶°C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. برای شاهد از محیط LB، محیط LB به همراه جدایه باکتری و محیط LB به همراه سطوح کودی استفاده شد. سپس تأثیر کودها بر رشد باکتری بررسی شد.

ج) آزمون‌های گلخانه‌ای تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر فعالیت نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* و گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به آن در خاک سترون

سه آزمون متوالی در مخلوط خاک و ماسه سترون (یک قسمت خاک مزرعه + دو قسمت ماسه رودخانه‌ای) با اختلافات جزئی انجام شد. بدین منظور ابتدا گلدان‌ها با خاک سترون پر گردید. سپس تیمارهای کودی با سطوح معین به خاک اضافه گردید.

برای افزودن کودها سطوح مختلف آنها را با حجم مشخصی از آب مخلوط و پس از بهم‌زدن به سطح خاک افزوده و فرصت کافی داده شد تا به صورت کامل خشک

دو و کاهش ۴۳/۸٪ تا ۸۰/۸٪ تفریخ تخم نماتود نسبت به شاهد شدند. تیمار سولفات مس پنج میلی گرم/کیلوگرم بیشترین تأثیر را بر کاهش تفریخ تخم و افزایش مرگ و میر لارو سن دو داشته است. تیمار سولفات مس از نظر کاهش تفریخ تخم با تیمارهای اوره ۵۰، سوپرفسفات تریپل ۱۰ و ۲۰، گوگرد ۵۰، سولفات روی پنج و ۱۰ و سکوسترین آهن پنج میلی گرم/کیلوگرم خاک و همچنین برای مرگ و میر لارو نیز با تیمارهای سولفات روی پنج و اوره در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم اختلاف معنی داری ندارد (جدول ۱).

۲- تأثیر بر روی رشد جدایه *Pseudomonas fluorescens* CHA0

باکتری در حضور همه تیمارهای حاوی محیط کشت های LB و NA و سطوح عناصر مختلف رشد یافت. البته نتایج اندازه گیری جذب تیمارهای اعمال شده در مقایسه با شاهد در (OD ~ 600) نشان داد که تیمارهای سولفات مس پنج، سوپرفسفات تریپل ۲۰، سولفات روی ۱۰ و اوره ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم میزان جذب بیشتری را در طول موج مشخص نسبت به نمونه های شاهد نشان دادند.

ب) آزمون های گلخانه ای کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر فعالیت نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* و گیاه گوجه فرنگی آلوده به آن در خاک سترون

آزمون ها اول و دوم

با توجه به این که آزمون های اول و دوم کاملاً یکسان بوده و فقط تعداد باکتری مورد استفاده آنها یکی نبوده است، لذا

انجام شد و داده ها ثبت گردیدند. سپس داده های بدست آمده با نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آزمون سوم: این آزمون همانند آزمون های قبلی ولی در گلدان های ۱۲ کیلویی انجام شد. سطوح کودی مورد استفاده در این آزمون شامل کود اوره در سطح ۵۰، سوپرفسفات تریپل در سطح ۲۰، سولفات روی و سولفات مس در سطح پنج، سکوسترین آهن در سطح ۲/۵ و گل گوگرد در سطح ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم بود. ۴۸ ساعت پس از استقرار کامل نشاءها، به ازای هر کیلوگرم خاک، ۱۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^4 CFU (OD₆₀₀ ~ 1) در فاصله دو سانتی متری طوقه گیاهان مایه زنی شد. طی این مدت پیشینه و کمینه دمای روزانه ثبت شد. آبیاری گلدان ها با آب مقطر بر اساس نیاز گیاه انجام شد. برداشت داده های مربوط به این آزمون سه ماه پس از مایه زنی نماتود صورت گرفت. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی و با پنج تکرار انجام شد. سپس داده های به دست آمده به کمک نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

الف) آزمون های آزمایشگاهی

۱- تأثیر کودهای شیمیایی بر تفریخ تخم و مرگ و میر لارو سن دو نماتود ریشه گرهی، *Meloidogyne incognita*

مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای مختلف عناصر غذایی بر تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دو نماتود ریشه گرهی نشان داد که همه تیمارها در سطح آماری ۵٪ نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی داری هستند. این تیمارها باعث افزایش ۶۷/۰٪ تا ۹۴/۸٪ مرگ و میر لارو سن

جدول ۲. تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر شاخص‌های رویشی گیاه گوجه‌فرنگی (ارلی‌اربانا) آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* در گلخانه و خاک سترون (آزمون‌های اول و دوم).

Table 2. The combined effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers on the growth parameters of tomato cv. Early Urbana, infected with *Meloidogyne incognita* in greenhouse and sterilized soil (1st and 2nd trials).

Treatments	Shoot fresh weight (g)		Shoot dry weight (g)		Root fresh weight (g)	
	1 st trial	2 nd trial	1 st trial	2 nd trial	1 st trial	2 nd trial
Control	58.6 a	14.1 b	3.9 a	4.1 b	8.2 abc	6.6 bc
Bacterium (Bac)	37.1 ab	9.5 c	1.9 c-f	3.5 bc	5.2 c-f	5.3 c-f
Nematode (Nem)	10.8 b	8.6 cd	1.4 def	3.2 b-d	5.6 c-f	7.2 a-c
Bac-Nem	15.1 b	3.6 f	2.0 c-f	0.9 g	7.1 b-e	3.9 f
Bac-Nem-Zn (5)*	21.6 b	7.3 c-f	3.3 ab	2.1 d-f	10.8 a	4.6 d-f
Bac-Nem-Zn (10)	6.7 b	6.1 c-f	0.9 ef	1.9 e-g	4.2 def	4.1 ef
Bac-Nem-Fe (2.5)	13.9 b	5.5 d-f	2.2 cd	2.2 c-f	5.7 c-f	4.4 d-f
Bac-Nem-Fe (5)	11.1 b	7.8 c-e	1.3 def	2.9 c-e	5.2 c-f	7.1 a-c
Bac-Nem-S (50)	9.6 b	16.9 ab	1.3 def	4.2 b	3.9 ef	8.9 a
Bac-Nem-S (100)	6.4 b	8.4 cd	0.8 f	1.7 e-g	3.3 f	6.1 cd
Bac-Nem-N (50)	17.9 b	4.4 ef	2.7 bc	1.4 fg	9.5 ab	3.9 f
Bac-Nem-N (100)	13.5 b	5.8 c-f	1.7 c-f	1.4 fg	6.8 b-f	4 f
Bac-Nem-P (10)	8.7 b	7.6 c-e	1.2 def	2.3 c-f	3.8 ef	6 c-e
Bac-Nem-P (20)	13.9 b	14.1 b	2.1 cde	2.8 c-e	7.6 a-d	8.3 ab
Bac-Nem-Cu (5)	19.2 b	19 a	2.4 bcd	6 a	8.4 abc	6.8 bc

*: سطوح عناصر غذایی (میلی‌گرم/کیلوگرم خاک) Cu, Fe, Zn, N, P و S به ترتیب از منابع سولفات مس، سکوسترین آهن، سولفات روی، اوره، سوپرفسفات تریپل و گل گوگرد.

اعداد میانگین شش تکرار است. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

*: Levels of nutrient elements (mg/kg soil) of Cu, Fe, Zn, N, P and S respectively, from sources of copper sulfate, sequestrene (iron chelate), zinc sulfate, urea, triple super phosphate and sulfur powder.

Data are means of six replicates. Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P=0.05).

نتایج آن‌ها با هم ارائه شده است. اختصاص داده‌اند. بیشترین وزن تر ریشه در آزمون اول

مربوط به تیمار روی پنج و در آزمون دوم مربوط به تیمار گوگرد ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم است. در شاهد و اکثر تیمارها وزن تر و خشک شاخساره در آزمون دوم کم‌تر از آزمون اول است. به نظر می‌رشد شرایط گلخانه در آزمون اول برای رشد رویشی گیاه مناسب‌تر بوده است (جدول ۲).

مقایسه نتایج تیمارها با شاهد‌های مربوطه نشان داد که اضافه کردن باکتری به خاک باعث کاهش شاخص‌های عمومی گیاه سالم گردیده است، به نحوی که وزن تر شاخساره ۳۶/۷ و ۳۲/۶٪، وزن خشک شاخساره ۵۱/۳ و

شاخص‌های رویشی گیاه گوجه‌فرنگی: بیشترین وزن تر شاخساره در آزمون اول مربوط به تیمار روی پنج میلی‌گرم/کیلوگرم است که به استثناء شاهد (بدون نماتود و باکتری) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. در حالی که در نوبت دوم تیمار مس پنج باعث بیشترین وزن تر شاخساره شده است که نسبت به شاهد و سایر تیمارها، به استثناء تیمار باکتری-نماتود-نیترژن ۵۰، اختلاف معنی‌داری داشت. در مورد وزن خشک شاخساره نیز تیمارهای روی پنج و مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم، به ترتیب در آزمون اول و دوم بیشترین وزن را به خود

جدول ۳. تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر شاخص‌های نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* در گیاه گوجه‌فرنگی (ارلی‌اربانا) آلوده در گلخانه و خاک سترون (آزمون اول).

Table 3. The combined effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers on the nematode indices of *Meloidogyne incognita* in infected tomato plants cv. Early Urbana, in greenhouse and sterilized soil (1st trial).

Treatments	Galls/g root	Egg masses/g root	Gall index	Egg/g root	Eggs/root system	Total juveniles in pot soil	Final population	Reproduction factor
Nematode (Nem)	79.3 ab	44.3 ab	5.0	7662 ab	42600 ab	25.0 abc	29984 ab	5.0 ab
Bacterium (Bac) -Nem	52.3cd	33.5 abc	5.0	4956 b	36118 ab	81.3 ab	37684 ab	6.3 ab
Bac-Nem-Zn (5)*	46.3 cd	19.3 bc	5.0	6654 ab	68292 ab	0.0 c	69279 ab	11.5 ab
Bac-Nem-Zn (10)	63.6 abc	40.4 abc	4.8	12968 a	54964 ab	42.0 abc	55520 ab	9.3 ab
Bac-Nem-Fe (2.5)	66.2 abc	29.6 abc	4.8	7589 ab	44812 ab	18.0 bc	46824 ab	7.8 ab
Bac-Nem-Fe (5)	65.8 abc	47.2 a	5.0	10471 ab	47590 ab	40.0 abc	48286 ab	8.0 ab
Bac-Nem-S (50)	84.5 a	39.2 abc	5.0	9673 ab	43095 ab	24.0 abc	55938 ab	9.3 ab
Bac-Nem-S (100)	58.2 bc	26.4 abc	4.8	7621 ab	28236 ab	24.0 abc	28661 ab	4.8 ab
Bac-Nem-N (50)	35.8 d	14.5 c	4.8	3966 b	40673 ab	90.0 a	41410 ab	6.9 ab
Bac-Nem-N (100)	47.8cd	24.5 abc	4.8	5429 b	31578 ab	95.0 a	32282 ab	5.4 ab
Bac-Nem-P (10)	50.8cd	30.8 abc	5.0	4675 b	20409 b	80.0 ab	24453 b	4.1 b
Bac-Nem-P (20)	66.5abc	29.7 abc	5.0	9685 ab	75327 a	50.0 abc	76343 a	12.7 a
Bac-Nem-Cu (5)	47.7 cd	19.3 bc	4.7	5565 b	46951 ab	0.0 c	42819 ab	7.1 ab

*: سطوح عناصر غذایی (میلی‌گرم/کیلوگرم خاک) Cu, Fe, Zn, N, P و S به ترتیب از منابع سولفات مس، سکوسترین آهن، سولفات روی، اوره، سوپرفسفات تریپل و گل گوگرد.

اعداد میانگین شش تکرار است. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

*: Levels of nutrient elements (mg/kg soil) of Cu, Fe, Zn, N, P and S respectively, from sources of copper sulfate, sequestrene (iron chelate), zinc sulfate, urea, triple super phosphate and sulfur powder.

Data are means of six replicates. Values followed by the same letters in each column are not significantly different (P = 0.05).

کم‌ترین جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل نیز مربوط به تیمار فسفر ۱۰ است که به استثناء فسفر ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، با شاهد و با سایر تیمارها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارد. این تیمار باعث کاهش ۱۸٪ جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل گردیده است. شاخص گال در شاهد و تیمارهای مختلف در دامنه ۴/۷-۵/۰ قرار داشته و کم‌ترین آن مربوط به تیمار مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم می‌باشد (جدول ۳).

در آزمون دوم کم‌ترین تعداد گال و کیسه تخم در گرم ریشه و مربوط به تیمار مس پنج است که از لحاظ آماری با شاهد و تیمار باکتری-نماتود در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارد. این تیمار باعث کاهش ۸۳/۲٪ و ۸۰/۶٪

۱۶/۶٪ و وزن ریشه ۳۶/۶ و ۱۹/۷٪، به ترتیب در آزمون اول و دوم نسبت به شاهد (گیاه سالم بدون باکتری و نماتود) کاهش یافته است.

شاخص‌های نماتود ریشه‌گرهی: در آزمون اول کم‌ترین تعداد گال و کیسه تخم در گرم ریشه مربوط به تیمار باکتری و نیتروژن ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بود که از لحاظ آماری در سطح ۵٪ با شاهد اختلاف معنی‌داری دارد. این تیمار سبب کاهش ۵۴/۹٪ تعداد گال و ۶۷/۳٪ تعداد کیسه تخم در گرم ریشه نسبت به شاهد شده است. کم‌ترین تعداد تخم در گرم ریشه نیز مربوط به تیمار نیتروژن ۵۰ است ولی با شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ندارد. کم‌ترین تعداد تخم در کل ریشه و

جدول ۴. تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر شاخص‌های نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* در گیاه گوجه‌فرنگی (ارلی‌اربانا) آلوده در شرایط گلخانه‌ای و در خاک سترون (آزمون دوم).

Table 4. The combined effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers on the nematode indices of *Meloidogyne incognita* in infected tomato plants (Early Urbana) under greenhouse conditions and sterilized soil (2nd trial).

Treatments	Galls/g root	Egg masses/g root	Gall index	Egg/g root	Eggs/root system	Total juveniles in pot soil	Final population	Reproduction factor
Nematode (Nem)	177.3 ab	112.0 b	5.0	8833 ab	63603 ab	900 a	65703 ab	11.0 ab
Bacterium (Bac) -Nem	132.9 cde	103.0 b	5.0	4688 cd	16967 c	0 c	17442 c	2.9 c
Bac-Nem-Zn (5)*	97.0 d-g	47.0 cd	4.3	4389 cd	23660 bc	0 c	24229 bc	4.0 bc
Bac-Nem-Zn (10)	208.3 a	169.0 a	5.0	6231 c	28474 c-e	300 bc	27861 bc	4.6 bc
Bac-Nem-Fe (2.5)	118.7 c-f	78.0 bc	5.0	9470 a	42602 bc	0 c	43144 abc	7.2 bc
Bac-Nem-Fe (5)	127.7 c-f	105.3 b	5.0	6442 bc	41773 bc	0 c	42660 abc	7.1 bc
Bac-Nem-S (50)	112.0 c-f	62.8 c	5.0	9044 a	80454 a	0 c	81437 a	13.6 a
Bac-Nem-S (100)	87.6 fg	65.2 c	5.0	10261 a	62209 ab	240 b	63000 ab	10.5 ab
Bac-Nem-N (50)	140.8 bcd	103.1 b	5.0	8787 ab	31792 cb	0 c	32304 c	5.4 bc
Bac-Nem-N (100)	68.8 g	55.0 cd	5.0	2310 d	11721 c	0 c	12010 c	2.0 c
Bac-Nem-P (10)	146 bc	105.5 b	5.0	6233 c	36355 bc	0 c	37208 bc	6.2 bc
Bac-Nem-P (20)	92.0 efg	43.7 cd	5.0	9488 a	82405 a	200 bc	83398 a	13.9 a
Bac-Nem-Cu (5)	29.7 h	21.7 d	4.0	3876 cd	30395 bc	0 c	30659 bc	5.1 bc

*: سطوح عناصر غذایی (میلی‌گرم/کیلوگرم خاک) Cu, Fe, Zn, N, P و S به ترتیب از منابع سولفات مس، سکوسترین آهن، سولفات روی، اوره، سوپرفسفات تریپل و گل گوگرد.

اعداد میانگین شش تکرار است. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

*: Levels of nutrient elements (mg/kg soil) of Cu, Fe, Zn, N, P and S respectively, from sources of copper sulfate, sequestrene (iron chelate), zinc sulfate, urea, triple super phosphate and sulfur powder.

Data are means of six replicates. Values followed by the same letters in columns of each index are not significantly different (P= 0.05).

است. شاخص گال تیمار مس پنج و روی پنج میلی‌گرم/کیلوگرم، به ترتیب ۴/۳ و ۴/۰ است و در شاهد و سایر تیمارها پنج می‌باشد (جدول ۴).

آزمون سوم

شاخص‌های رویشی گیاه گوجه‌فرنگی: در میان

تعداد گال و تعداد کیسه تخم در گرم ریشه شده است. کم‌ترین تعداد تخم در گرم و کل ریشه، کم‌ترین جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل نیز مربوط به تیمار نیتروژن ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم است که با شاهد مایه‌زنی شده با نماتود در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارد. این تیمار باعث کاهش ۸۱/۷٪ جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل گردیده

جدول ۵. تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر شاخص‌های رویشی گیاه گوجه‌فرنگی (ارلی‌اربانا) آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* در شرایط گلخانه و خاک سترون (آزمون سوم).

Table 5. The combined effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers on the growth parameters of tomato (Early Urbana), infected with *Meloidogyne incognita* under greenhouse conditions and sterilized soil (3rd trial).

Treatments	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)
Control	150.3 c-f	25 abc	47.3 bcd
Bacterium (Bac)	143.5 c-f	24.3 bcd	40.36 c-f
Nematode (Nem)	75.33 g	14.5 e	46.18 b-e
Bac-Nem	121.3 efg	21.5 cde	42.62 c-f
Bac-Nem-Cu (5)	179.8 bc	15.8 ed	28.18 f
Bac-Nem-Fe (2.5)	118.7 fg	14.14 e	40.42 c-f
Bac-Nem-N (50)	126.6 def	16.1 ed	31.8 def
Bac-Nem-P (20)	152.8 c-f	22.6 b-e	56.62 abc
Bac-Nem-S (50)	159.3 c-f	25.9 abc	42.54 c-f
Bac-Nem-Zn (5)	131.4 c-f	21.2 cde	40.98 c-f
Cu (5)*	216.3 ab	29.2 abc	43.66 c-f
Fe (2.5)	172.3 b-e	31.5 ab	59.88 ab
N (50)	154.4 c-f	26.7 abc	30.24 ef
P (20)	255.8 a	33.7 a	64.02 a
S (50)	172.3 b-e	28.6 abc	29.71 ef
Zn (5)	175.2 bcd	24.4 bcd	51.36 abc

*: سطوح عناصر غذایی (میلی‌گرم/کیلوگرم خاک) Cu, Fe, Zn, N, P و S به ترتیب منابع سولفات مس، سکوسترین آهن، سولفات روی، اوره، سوپرفسفات تریپل و گل گوگرد. اعداد میانگین پنج تکرار است.

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

*: Levels of nutrient elements (mg/kg soil) of Cu, Fe, Zn, N, P and S respectively, from sources of copper sulfate, sequestrene (iron chelate), zinc sulfate, urea, triple super phosphate and sulfur powder.

Data are means of five replicates. Values followed by the same letters in columns of each index are not significantly different (P= 0.05).

شاخص‌های نماتود ریشه‌گرهی: کم‌ترین تعداد گال در گرم ریشه مربوط به تیمار مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم است که با شاهد دارای نماتود و تیمار نماتود-باکتری اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ دارد ولی با تیمارهای دارای آهن، گوگرد و نیتروژن اختلاف معنی‌داری ندارد. این تیمار باعث کاهش ۷۴/۶٪ تعداد گال و ۸۱/۲٪ تعداد کیسه تخم در گرم ریشه گردیده است. کم‌ترین تعداد کیسه تخم در گرم ریشه مربوط به تیمار مس است که با شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ندارد. کم‌ترین تعداد تخم در گرم ریشه نیز مربوط به تیمار مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم است که با شاهد مایه‌زنی شده با نماتود اختلاف معنی‌دار دارد اما با شاهد مایه‌زنی شده با نماتود و باکتری و سایر

تیمارهای مایه‌زنی شده با نماتود، بیشترین وزن تر شاخساره مربوط به تیمار مس در سطح پنج میلی‌گرم است که از نظر آماری با شاهد (بدون نماتود و باکتری)، شاهد دارای باکتری و برخی دیگر از تیمارها دارای عناصر غذایی اختلاف معنی‌داری ندارد. بیشترین وزن خشک شاخساره در تیمارهای دارای نماتود مربوط به تیمار گوگرد ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم است که از نظر آماری با شاهد (بدون نماتود و باکتری) و شاهد دارای باکتری و برخی دیگر از تیمارها دارای عناصر غذایی اختلاف معنی‌داری ندارد. بیشترین وزن تر ریشه نیز مربوط به تیمار فسفر ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم است که در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری با شاهد ندارد (جدول ۵).

جدول ۶. تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *Pseudomonas fluorescens* CHA0 و کودهای شیمیایی بر شاخص‌های نematod ریشه‌گرهی *Meloidogyne incognita* در گیاه گوجه‌فرنگی (ارلی‌اربانا) آلوده در شرایط گلخانه‌ای و در خاک سترون (آزمون سوم).

Table 6. The combined effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and chemical fertilizers on the nematode indices of *Meloidogyne incognita* in infected tomato plants (Early Urbana) under greenhouse conditions and sterilized soil (3rd trial).

Treatments	Galls/g of root	Egg masses/g of root	Gall index	Egg/g of root	Eggs/root system	Juveniles/pot soil	Final population	Reproduction factor
Nematode (Nem)	86.8 a	72.2 a	5.0	15042 a	696982 a	2880 a	703893 a	29.3 a
Bacterium (Bac)-Nem	58.0 b	46.0 a	5.0	11636 ab	544609 a-c	960 b	548280 a-c	22.8 a-c
Bac-Nem-Cu (5)*	22.0 c	13.6 a	5.0	8124 b	226032 d	0 b	396774 cd	16.5 cd
Bac-Nem-Zn (5)	50.2 b	35.8 a	5.0	11585 ab	480573 ab	960 b	483684 a-c	20.2 a-c
Bac-Nem-Fe (2.5)	32.4 c	21.2 a	5.0	9306 b	395757 b-d	0 b	226962 d	9.5 d
Bac-Nem-S (50)	29.4 c	19.0 a	5.0	11828 a	502442 a-c	0 b	503710 a-c	21.0 a-c
Bac-Nem-N (50)	29.6 c	20.8 a	5.0	8449 b	295337 cd	0b	296279 cd	12.3 cd
Bac-Nem-P (20)	50.2 b	23.6 a	5.0	9949 b	597232 ab	0 b	599283 ab	25.0 ab

*: سطوح عناصر غذایی (میلی‌گرم/کیلوگرم خاک Cu, Fe, Zn, N, P و S به ترتیب از منابع سولفات مس، سکوسترین آهن، سولفات روی، اوره، سوپرفسفات تریپل و گل گوگرد.

اعداد میانگین پنج تکرار است. اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر حسب آزمون دانکن در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

*: Levels of nutrient elements (mg/kg soil) of Cu, Fe, Zn, N, P and S respectively, from sources of copper sulfate, sequestrene (iron chelate), zinc sulfate, urea, triple super phosphate and sulfur powder.

Data are means of five replicates. Values followed by the same letters in columns of each index are not significantly different (P= 0.05).

تیمارها، به استثناء گوگرد ۵۰ اختلاف معنی‌دار ندارد. کم‌ترین تعداد تخم در کل ریشه نیز مربوط به تیمار مس است که نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌داری است. پایین‌ترین جمعیت نهایی و شاخص تولیدمثل مربوط به تیمار آهن ۲/۵ است که با شاهد‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارد و با کاهش ۶۷/۷٪ جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل مؤثرترین تیمار بوده است. شاخص گال در همه تیمارها پنج می‌باشد (جدول ۶).

تیمارها، به استثناء گوگرد ۵۰ اختلاف معنی‌دار ندارد. کم‌ترین تعداد تخم در کل ریشه نیز مربوط به تیمار مس است که نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌داری است. پایین‌ترین جمعیت نهایی و شاخص تولیدمثل مربوط به تیمار آهن ۲/۵ است که با شاهد‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارد و با کاهش ۶۷/۷٪ جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل مؤثرترین تیمار بوده است. شاخص گال در همه تیمارها پنج می‌باشد (جدول ۶).

تیمارها، به استثناء گوگرد ۵۰ اختلاف معنی‌دار ندارد. کم‌ترین تعداد تخم در کل ریشه نیز مربوط به تیمار مس است که نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌داری است. پایین‌ترین جمعیت نهایی و شاخص تولیدمثل مربوط به تیمار آهن ۲/۵ است که با شاهد‌ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری دارد و با کاهش ۶۷/۷٪ جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل مؤثرترین تیمار بوده است. شاخص گال در همه تیمارها پنج می‌باشد (جدول ۶).

بحث

مطابق با مطالعات قبلی (Siddiqui & Shaukat 2003,

(دارای نماتود) ۲/۳۹ برابر و نسبت به تیمار باکتری-نماتود ۱/۴۸ برابر افزایش دهد. منتها تأثیری بر وزن خشک شاخساره نداشته است.

کاربرد کودهای شیمیایی حاوی عناصر پر مصرف و عناصر کم مصرف در اکثر موارد سبب بهبود شاخص‌های رویشی گیاه می‌شود که این نتایج با تحقیقات انجام شده مطابقت دارد (Akhtar et al. 2013, Siddiqui et al. 2001, Noweer & Hasabo 2005, Habash & Al-Banna 2013, Seifi & Karegar Bide, 2011). با این حال نتایج آزمون‌ها در مورد تأثیر باکتری بر شاخص‌های رویشی گیاه بر خلاف نتایج مطالعه قبلی است (Oraghi Ardebili et al. 2011). عدم تطابق با نتایج مطالعات قبلی را می‌توان به ترکیب متفاوت خاک، سترون بودن خاک و عاری بودن از میکروارگانیسم‌های مفید جهت تعامل با جمعیت باکتری، زمان متفاوت کشت محصول و مکان متفاوت کشت و رقم متفاوت گیاه گوجه‌فرنگی نسبت داد. منتها نتایج حاضر با مطالعه مطالعه امانی‌بنی و همکاران (Amani Beni et al. 2016)، همچنین کیل و همکاران (Keel et al. 1992) تطابق دارد. نشان داده شده است که جدایه *CHA0* متابولیت ضد میکروبی ۴،۲-دی‌استیل‌فلوروگلوکوسینول تولید می‌کند که علاوه بر داشتن خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی، فعالیت گیاه‌سوزی در گیاهان مختلف از جمله خیار و گوجه‌فرنگی دارد.

نتایج سه آزمون در مورد تأثیر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های نماتود ریشه‌گرهی تا حدودی با هم اختلاف دارند. کم‌ترین تعداد گال و کیسه تخم در گرم ریشه در آزمون اول مربوط به تیمار باکتری و نیتروژن (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و در آزمون دوم مربوط به تیمار دارای مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم است. پایین‌ترین جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل در آزمون اول مربوط به تیمار دارای

موجب مرگ‌ومیر درصدی از لاروها می‌گردد. با توجه به این که جدایه *CHA0* روی محیط کشت NA و سطوح مختلف عناصر رشد یافت و تشکیل پرگنه داد، بنابراین هیچ یک از عناصر اثر منفی بر روی رشد باکتری نداشتند. نتایج آزمون‌های اول و دوم تأثیر کاربرد تلفیقی باکتری *P. fluorescens CHA0* و کودهای شیمیایی بر فعالیت نماتود ریشه‌گرهی *M. incognita* و گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به آن نشان داد که اضافه کردن باکتری به خاک باعث کاهش وزن تر و خشک شاخساره، همچنین وزن ریشه شده است. میزان کاهش در آزمون دوم که از باکتری بیشتری استفاده شده است کم‌تر بوده است.

تیمار کردن گیاه آلوده به نماتود با باکتری توانسته است بخش کوچکی از خسارت نماتود به شاخص‌های رشدی گیاه را جبران کند. منتها استفاده توام باکتری با کودهای شیمیایی باعث کاهش بیشتر میزان خسارت شده است. بهترین نتیجه از استفاده توام باکتری با سولفات مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم خاک در آزمون اول (باکتری کم‌تر) و یا سولفات مس در آزمون دوم (باکتری بیشتر) حاصل شده است.

در آزمون سوم که از گلدان‌های بزرگ استفاده و امکان رشد بیشتر ریشه‌ها فراهم شده است، تأثیر سوء باکتری بر گیاه سالم کمتر است به نحوی که میزان وزن تر و خشک شاخساره به ترتیب ۹۵/۵ و ۹۷/۲٪ شاهد بوده است. در این آزمایش نیز تیمار کردن گیاه آلوده به نماتود با باکتری توانسته است تا حدودی خسارت ناشی از نماتود به شاخص‌های رشدی گیاه را کاهش دهد. ولی استفاده توام باکتری با کودهای شیمیایی باعث کاهش بیشتر میزان خسارت شده است. بهترین نتیجه از استفاده توام باکتری با سولفات مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم حاصل شده است. این تیمار توانسته است وزن تر شاخساره را نسبت به شاهد

این کود هم‌زمان سبب تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه می‌شود، همچنین مس تنظیم‌کننده و یا عاملی ضروری در سامانه‌های مختلف آنزیمی شرکت‌کننده در دفاع گیاه در برابر آلودگی، تولید ترکیبات ضد میکروبی و مقاومت عمومی به بیماری است (Graham & Webb 1991). بنابراین تلفیق عنصر مس با جدایه *P. fluorescens* CHA0 عاملی مؤثر در بهبود فعالیت بیوکنتری این باکتری است و باکتری نه فقط باعث کاهش شاخص‌های نماتود گردیده است، بلکه باعث تحریک رشد گیاه نیز گردیده است. این نتیجه مطابق با مطالعات قبلی است (Duffy & defago 1999, Siddiqui et al. 2001, Zheng et al. 2010, Akhtar et al. 2013). با توجه به نتایج شاخص‌های رشدی گیاه و شاخص‌های نماتود در سه آزمون، می‌توان گفت که تلفیق باکتری با سولفات مس پنج میلی‌گرم/کیلوگرم و بعد از آن تیمارهای دارای نیتروژن و یا سولفات روی پنج میلی‌گرم/کیلوگرم مناسب‌ترین تیمارها بوده و باعث بهبود شاخص‌های گیاهی و کاهش شاخص‌های نماتودی شده‌اند.

سفر ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و در آزمون دوم مربوط به تیمار دارای نیتروژن ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم خاک است. نتایج آزمون سوم نشان داد که کاربرد تلفیقی جدایه CHA0 با تیمار سولفات مس پنج بیشترین تأثیر بر شاخص‌های نماتود داشته است. همچنین تیمار آهن ۲/۵ از نظر کاهش جمعیت نهایی و فاکتور تولیدمثل موثرترین تیمار بوده است. شاخص گال در تیمارهای مختلف دو آزمون اول اختلافی قابل توجهی را نشان نمی‌دهد. در آزمون سوم در همه تیمارها و شاهد بالاترین شاخص (۵) به دست آمده است. علت این امر طولانی شدن فاصله بین افزودن نماتود به خاک و برداشت گیاه بوده است.

در بررسی نتایج این آزمون چنین می‌توان استنباط کرد که اعمال تلفیق عناصر با باکتری در بهبود فعالیت بیوکنتری و کاهش جمعیت نماتود ریشه‌گرهی مؤثر است. احتمالاً سطوح کودی سبب افزایش حجم ریشه گیاهان شده و این موضوع بهبود شرایط رشدی گیاه را سبب می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده است که مس برای رشد گیاه و مقاومت به بیماری عنصر ضروری است. اصلاح با

منابع

- Akhtar A., Hisamuddin A., and Sharf R. 2013. Study on black gram (*Vigna mungo* L.) infected with *Meloidogyne incognita* under the influence of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and urea. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 4:200.
- Amani Beni F., Karegar A. and Taghavi S. M. 2016. Effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and green manures of some inhibitory plants on activity of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and infected tomato growth parameters. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52:339-356. (In Persian with English abstract).
- Anonymous. 2017. FAOSTAT. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Barker K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays, pp:19-35. In: K. R., Baker, C. C. Carter and J. N. Sasser (eds.). *An advanced treatise on Meloidogyne, methodology*. Vol. II. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina USA.
- Behzadi Amin R., Karegar A. and Taghavi S. M. 2014. Evaluation of rhizobacteria effects on the activity of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, under greenhouse and laboratory conditions. *Iranian Journal of Plant Pathology* 50:25-27 [53-68] (In Persian with English abstract).
- Charegani H., Karegar Bideh A. and Hamzehzarghani H. 2010. Effect of chemical fertilizers on root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in greenhouse cucumber cultivation. *Iranian Journal of Plant Pathology* 46:71-73 [263-274] (In Persian with English abstract).
- Duffy B. K. and Defago G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by

- Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied and Environmental Microbiology 65:2429-2438.
- Graham R.D. and Webb M. J. 1991. Micronutrients and plant disease resistance and tolerance in plants, pp. 329-370. In: J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. M. Shuman and R. M. Welch (eds). Micronutrients in Agriculture, SSSA Book Series 4. Soil Science Society of America, USA.
- Haas D. and Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology 3:307-319.
- Habash S. and Al-Banna L. 2011. Phosphate fertilizers suppressed root knot nematode *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. Journal of Nematology 43:95-100.
- Hamid M., Siddiqui I. A. and Shahid Shaukat S. 2003. Improvement of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 biocontrol activity against root-knot nematode by the addition of ammonium molybdate. Letters in Applied Microbiology 36:239-244.
- Hemm, M. R., Rider, S. D., Ogas, J., Murry, D. J., and Chapple, C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. The Plant Journal 38:765-778.
- Hussey R. S. and Janssen G. J. W. 2002. Root knot nematode: *Meloidogyne* species, pp:43-70. In: J. L. Starr, R. Cook and J. Bridge (eds). Plant resistance to parasitic nematodes. CAB International. UK.
- Keel C., Schnider U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D. and Défago G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. Molecular Plant-Microbe Interaction 5:4-13.
- Majzoub S., Karegar A., Taghavi M. and Hamzehzarghani H. 2012. Evaluation of rhizobacteria for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on cucumber, under greenhouse condition. Iranian Journal of Plant Pathology 46:27-29 [69-84] (In Persian with English abstract).
- Noweer E. M. A. and Hasabo S. A. 2005. Effect of different management practices for controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on squash. Egyptian Journal of Phytopathology 33:73-81.
- Oraghi Ardebili Z., Oraghi Ardebili N. and Mahdi Hamdi S. M. 2011. Physiological effects of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and its possible impact on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Australian Journal of Crop Science 5:1631-1938.
- Pakeerathan K., Mikunthan G. and Tharshani N. 2009. Eco-friendly management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofid and White) Chitwood, using different green leaf manures on tomato under field conditions. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 6:494-497.
- Rumiani M., Karegar A., Hamzehzarghani H. and Banihashemi Z. 2016. Effect of elemental sulfur on the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, activities in cucumber plants. Iranian Journal of Plant Pathology 52:85-98. (In Persian with English abstract).
- Sasser J. N. and Freckman D. W. 1987. A world prospective on nematology: The role of the society, pp. 7-14. In: J. A. Veech and D. W. Dickson (Eds). Vistas on Nematology. Society of Nematologists, Inc. Hyattsville, Maryland, USA.
- Schaad N. W. Jones J. B. and Chum W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press 373 pp.
- Seifi S. and Karegar Bide A. 2013. Effect of mineral fertilizers on cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* population and evaluation of wheat. World Applied Programming 3:137-141.
- Shaukat S. S. and Siddiqui I. A. 2003. Zinc improves biocontrol of *Meloidogyne javanica* by the antagonistic rhizobia. Pakistan Journal of Biological Sciences 6:575-579.
- Siddiqui I. A. and Shaukat S. S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. Soil Biology and Biochemistry 35:1615-1623.
- Siddiqui Z. A., Iqbal A. and Mahmood I. M. 2001. Effects of *Pseudomonas fluorescens* and fertilizers on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Applied Soil Ecology 16:179-185.
- Tavakol Norabadi M., Sahebani N. and Etebarian H. R. 2014. Biological control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) disease by *Pseudomonas fluorescens* (CHA0). Archives of Phytopathology and Plant Protection 47:615-621.
- Taylor A. L. and Sasser J. N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). North Carolina State University Graphics, 111p.
- Zheng Y., Duan Y., Chen S., Sun J. and Chen L. 2010. Responses of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* to macroelement and microelement compounds. Bulgarian Journal of Agricultural Science 16:172-18.